

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Molekulare Strukturbiologie

# **Identifikation makromolekularer Komplexe in Elektronentomogrammen eiseingebetteter Phantomzellen**

**Jochen Böhm**



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

# **Identifikation makromolekularer Komplexe in Elektronentomogrammen eiseingebetteter Phantomzellen**

**Jochen Böhm**

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann  
2. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister

Die Dissertation wurde am 3. August 2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 20. September 2001 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2. HINTERGRUND .....</b>	<b>13</b>
2.1. KRYO-PRÄPARATION .....	13
2.2. AUFBAU EINES ELEKTRONENMIKROSKOPS.....	14
2.3. STREUUNG .....	15
2.3.1. <i>Streuung am Atomkern – elastische Streuung</i> .....	16
2.3.2. <i>Streuung unter Anregung der Elektronenhülle – inelastische Streuung</i> .....	17
2.4. KONTRASTMECHANISMEN IM ELEKTRONENMIKROSKOP .....	18
2.4.1. <i>Streukontrast</i> .....	18
2.4.2. <i>Phasenkontrast</i> .....	20
2.5. ENERGIEGEFILTERTE ELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	24
2.6. PRINZIP DER ELEKTRONENTOMOGRAPHIE .....	27
2.6.1. <i>Theoretischer Hintergrund</i> .....	28
2.6.2. <i>Das ‚missing wedge‘ Problem</i> .....	31
2.6.3. <i>Automatisierte Elektronentomographie</i> .....	33
2.7. AUTOMATISCHE IDENTIFIKATION VON MAKROMOLEKÜLEN IN ELEKTRONENTOMOGRAMMEN .....	34
2.7.1. <i>Die Kreuzkorrelation</i> .....	34
<b>3. ANWENDUNG DER ENERGIEGEFILTERTEN ELEKTRONENTOMOGRAPHIE AUF EIN T5-PHAGEN-VESIKEL MODELLSYSTEM .....</b>	<b>39</b>
3.1. DAS BIOLOGISCHE MODELLSYSTEM.....	39
3.2. PRÄPARATION.....	41
3.3. AUFNAHME UND REKONSTRUKTION DER KIPPSERIEN.....	41
3.4. AUFLÖSUNGSBESTIMMUNG.....	45
3.5. VISUALISIERUNG DER VIRENSCHWÄNZE INNERHALB DER VESIKEL .....	48
3.6. IMPLIKATIONEN DER TOMOGRAPHISCHEN DATEN AUF DAS VERSTÄNDNIS DER VIRALEN INJEKTION .....	51

<b>4. 3D-IDENTIFIKATION MAKROMOLEKULARER KOMPLEXE IN ELEKTRONENTOMOGRAMMEN.....</b>	<b>55</b>
4.1. IDENTIFIKATION VON MAKROMOLEKÜLEN IN ELEKTRONENTOMOGRAMMEN VON ISOLIERTEN PROTEINKOMPLEXEN .....	58
4.1.1 <i>Präparation und tomographische Datenaufzeichnung.....</i>	59
4.1.2 <i>Erzeugung der Referenzpartikel .....</i>	60
4.1.3 <i>Segmentierung der Volumina durch MCM.....</i>	61
4.1.4 <i>Identifikation der isolierten Proteinkomplexe .....</i>	63
4.2 IDENTIFIKATION VON MAKROMOLEKÜLEN IN SIMULIERTEN 3D-REKONSTRUKTIONEN	65
4.2.1 <i>Erzeugung der simulierten Rekonstruktionen.....</i>	66
4.2.2 <i>Identifikation der simulierten Proteinkomplexe.....</i>	67
4.3 IDENTIFIKATION VON MAKROMOLEKÜLEN IN PHANTOMZELLEN .....	70
4.3.1 <i>Biochemische Präparation der Phantomzellen .....</i>	70
4.3.2 <i>Aufzeichnung der Kippserien und 3D-Rekonstruktionen.....</i>	71
4.3.3 <i>Identifikationsalgorithmus .....</i>	73
4.3.4 <i>Identifikation der Proteinkomplexe in 20S Proteasomen-Phantomzellen .....</i>	76
4.3.5 <i>Identifikation der Proteinkomplexe in Thermosom-Phantomzellen .....</i>	78
4.3.6 <i>Identifikation der Proteinkomplexe in 20S Proteasomen/Thermosomen-Phantomzellen.....</i>	79
<b>5. DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>81</b>
<b>6. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>85</b>
<b>7. FORMELN UND KONSTANTEN .....</b>	<b>86</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>87</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>97</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 2.1 Kryo-Präparation .....	14
Abbildung 2.2 Aufbau eines Transmissions-Elektronenmikroskops.....	15
Abbildung 2.3 Mittlere freie Weglänge.....	18
Abbildung 2.4 Verteilung der Streuarten bei einer Präparatdicke $t$ .....	20
Abbildung 2.5 Phasenverschiebung zwischen einlaufender Welle und gestreuter Welle.....	21
Abbildung 2.6 Strahlengang bei sphärischer Aberration.....	22
Abbildung 2.7 Strahlengang bei veränderter Präparatposition.....	23
Abbildung 2.8 Strahlengang bei Veränderung der fokalen Länge.....	23
Abbildung 2.9 Veränderung des optischen Weges.....	24
Abbildung 2.10 Post-Column-Energiefilter.....	25
Abbildung 2.11 Ungefilterte und gefilterte Aufnahmen von eiseingebetteten <i>Pyrodictium abyssii</i> Zellen .....	26
Abbildung 2.12 FRC der Aufnahmen von eiseingebetteten <i>Pyrodictium abyssii</i> Zellen .....	27
Abbildung 2.13 Abbildungstheorem.....	29
Abbildung 2.14 Auflösung der Rekonstruktion.....	30
Abbildung 2.15 Schematische Darstellung der tomographischen Datenaufzeichnung und Rekonstruktion.....	30
Abbildung 2.16 Schematische Darstellung der Rekonstruktion durch Rückprojektion und des „missing wedges“ .....	32
Abbildung 2.17 Beispiel zum „missing wedge“ .....	32
Abbildung 2.18 Flussdiagramm zur Automatisierung der Elektronentomographie.....	34
Abbildung 2.19 Schemata zweier auf Korrelation basierender Suchstrategien.....	37
Abbildung 2.20 Rechenzeit der Partikelidentifikation.....	38
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des T5-FhuA Modellsystems .....	40
Abbildung 3.2 Serie von x-y-Schnitten durch eine 3D-Rekonstruktion des T5-Proteoliposomen Systems.....	43
Abbildung 3.3 Iso-Oberflächendarstellungen des T5-Proteoliposomen Systems .....	44
Abbildung 3.4 Vergleich der Rekonstruktionen mit am CM 300 FEG und am CM 120 Biofilter aufgenommenen Daten.....	44
Abbildung 3.5 Beine der Viren und Spitze des Virenschwanzes innerhalb des Vesikels.....	45
Abbildung 3.6 Sinogramm zweier paralleler Linien.....	46
Abbildung 3.7 Sinogramm der in Abbildung 3.4 gezeigten Virenschwänze.....	46
Abbildung 3.8 Auflösung der Rekonstruktionen.....	47

Abbildung 3.9 Theoretische Auflösungsgrenze der Elektronentomographie bei 120 und 300 kV.....	48
Abbildung 3.10 Statistische Verteilung der Länge der Schwanzspitzen innerhalb der Vesikel .....	49
Abbildung 3.11 x-y-Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion eines an ein leeres Vesikel gebundenen DNS-gefüllten Phagen.....	49
Abbildung 3.12 Kondensierte DNS innerhalb eines Vesikels.....	50
Abbildung 3.13 Transfer des Phagen-Genoms über zwei unabhängige Doppelmembranen ...	51
<a href="#">Abbildung 3.14</a> Vorgeschlagenes Modell zum Transfer viraler DNS in den Wirt.....	53
Abbildung 4.1 x-y-Schnitte durch eine eiseingebetteten <i>Pyrodictium abyssi</i> Zelle .....	55
Abbildung 4.2 Identifikationsstrategie.....	57
Abbildung 4.3 Atomare 3D-Struktur des Thermosoms und des 20S Proteasoms.....	58
Abbildung 4.4 Projektion durch die 3D-Rekonstruktion des Thermosoms.....	59
Abbildung 4.5 Projektion durch die 3D-Rekonstruktion des 20S Proteasoms.....	60
Abbildung 4.6 Oberflächendarstellung der auf 4 nm Auflösung gefilterten Referenzstrukturen Thermosom, GroEL und 20S Proteasom.....	61
Abbildung 4.7 MCM-prozessiertes Bild einer Thermosomen- und einer 20S Proteasomen-Rekonstruktion.....	63
Abbildung 4.8 Detektierungserfolge des MCM-Algorithmus .....	63
Abbildung 4.9 Verteilung der Korrelationswerte für die Thermosomen-Rekonstruktion.....	64
Abbildung 4.10 Verteilung der Korrelationswerte für die 20S Proteasomen-Rekonstruktion.....	65
Abbildung 4.11 Thermosom, GroEL und 20S Proteasom bei 2 nm, 4 nm und 8 nm Auflösung .....	66
Abbildung 4.12 x-y-Schnitte durch simulierte Partikelvolumina mit 4 nm Auflösung.....	<a href="#">67</a>
Abbildung 4.13 Verhältnis der Kreuzkorrelationskoeffizienten bei verschiedenen Auflösungsstufen .....	68
Abbildung 4.14 Identifikation der Partikel in den simulierten Tomogrammen bei verschiedenen Auflösungen.....	<a href="#">68</a>
Abbildung 4.15 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer Thermosomen-Phantomzelle.....	72
Abbildung 4.16 Volumen-gerenderte Darstellung einer mit Thermosomen gefüllten Phantomzelle.....	72
Abbildung 4.17 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer 20S Proteasomen-Phantomzelle.....	73
Abbildung 4.18 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer Thermosomen/20S Proteasomen-Phantomzelle.....	73
Abbildung 4.19 x-y-Schnitt durch eine 20S Proteasomen-Phantomzelle.....	75
Abbildung 4.20 Ausgeschnittenen Subvolumina aus einer 20S Proteasomen-Phantomzelle ..	76



Abbildung 4.21 Verteilung der Korrelationskoeffizienten der aus den 20S Proteasomen-  
Phantomzellen extrahierten Partikel .....77

Abbildung 4.22 Verhältnis der Korrelationskoeffizienten beim Vergleich der 20S  
Proteasomen-Partikel mit der 20S Proteasom- und der Thermosom-Referenz .....77

Abbildung 4.23 Verteilung der Korrelationskoeffizienten der aus den Thermosomen-  
Phantomzellen extrahierten Partikel .....79

Abbildung 4.24 Verhältnis der Korrelationskoeffizienten beim Vergleich der Thermosomen-  
Partikel mit der Thermosom- und der 20S Proteasom-Referenz .....79

Abbildung 4.25 Volumengerenderte Darstellung einer 20S Proteasomen/Thermosomen-  
Phantomzelle und Ergebnis der angewandten Identifikationsprozedur.....80



## Zusammenfassung

Die Elektronentomographie ist die am allgemeinsten anwendbare Technik zur dreidimensionalen Strukturformung mittels Elektronenmikroskopie. Es ist die einzige Methode zur Untersuchung pleomorpher Strukturen, von supramolekularen Komplexen, Organellen und zellulärer Modellsysteme bis hin zu ganzen Zellen. Durch die Einführung automatisierter Datenerfassungssysteme ist es neuerdings möglich, in Eis eingebettete biologische Systeme in quasi-nativem Zustand zu untersuchen. Die vielversprechendste Entwicklung der Elektronentomographie ist ihre Anwendung auf zelluläre Organellen und ganze Zellen: Erstmals können makromolekulare Komplexe in ihrer nativen zellulären Umgebung dreidimensional visualisiert werden. Die Identifikation dieser Komplexe anhand ihrer strukturellen Signatur war bei der bislang erzielten Auflösung jedoch nicht möglich.

Ein vorrangiges Ziel war folglich die Auflösung der Elektronentomogramme von zellulären Objekten zu verbessern. Die durchgeführte Installation eines 300 kV Mikroskops mit Feldemissionskathode und eines Energiefilters ermöglichte es erstmals, pleomorphe eiseingebettete biologische Präparate mit einer Auflösung unter 4 nm abzubilden. Die dreidimensionale Untersuchung eines Modellsystems zur Injektion viraler DNS in Wirtszellen hat nicht nur gezeigt, dass die Auflösung um den Faktor 2 verbessert werden konnte; zusätzlich erlaubte die verbesserte Abbildungsqualität wichtige Rückschlüsse zur Wechselwirkung zwischen Virus und Wirt zu ziehen: Der Virenschwanz vollzieht beim Binden an das Wirtprotein eine drastische konformelle Änderung und dringt ca. 23 nm in den Wirt ein. Die strukturelle Untersuchung führte zu einem mechanistischem Modell, welches den Transfer der viralen DNS durch die Zellhülle beschreibt.

Obwohl die Qualität der tomographischen Rekonstruktionen verbessert werden konnte, ist eine Interpretation der Tomogramme durch visuelle Inspektion auf Grund des hohen Rauschanteils schwer vorstellbar. Folglich wurden rechnerisch realisierbare Algorithmen zur Identifikation makromolekularer Komplexe entwickelt und auf verschiedene Modellsysteme angewandt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Identifikation schon bei schlechterer Auflösung möglich ist, falls die molekularen Komplexe aus dem Zellverbund aufgereinigt werden. Bei einer Präparatdicke ab 250 nm ist eine Auflösung von 4 nm notwendig, um strukturell ähnliche Komplexe, wie z. B. das Thermosom, GroEL oder das 20S Proteasom zu unterscheiden. Die Anwendung der Algorithmen auf Protein-gefüllte Vesikel - sogenannte Phantomzellen - zeigt, dass mit dem momentanen experimentellen Aufbau bereits mehr als 90% der Partikel in einer quasi-zellulären Umgebung korrekt identifiziert werden können.

## Abstract

Electron tomography is the most widely applicable method for obtaining three-dimensional information by electron microscopy. It is, in fact, the only method for investigating pleomorphic structures, ranging from supramolecular assemblies, organelles and cellular model systems to whole cells. With the recent developments of automated data-acquisition schemes, it is now possible to study biological systems embedded in vitreous ice under low-dose conditions with minimal perturbations of the physiologic state. The most promising development in electron tomography is its application to cellular organelles and whole cells: macromolecular complexes can now be visualized three-dimensionally in their native cellular environment with molecular resolution. However, the identification of these macromolecular complexes by virtue of their structural signature is not possible at the resolutions reached so far.

Consequently, a major challenge was to improve the resolution of electron tomograms of cellular objects. The installation of a 300 kV microscope with a field-emission gun and an energy filter allows to visualize pleomorphic biological samples three-dimensionally with a resolution below 4 nm for the first time. The three-dimensional analysis of a model system for the injection of viral DNA into host cells did not only reveal that the resolution could be improved by a factor of two, but the advanced imaging capabilities also allow to draw important conclusions concerning the interaction of virus and host: upon binding to the bacterial receptor protein, the phage tail undergoes a major conformational change and protrudes 23 nm into the host. This observation led to a mechanistic model how the viral DNA is transferred across the cell envelope.

Even though the quality of the tomographic reconstructions could be improved, one cannot expect to be able to interpret such tomograms by visual inspection. Hence, computational feasible algorithms to identify macromolecular complexes within the cellular environment were mapped out and applied to several model systems. The results show that identification is possible even at lower resolutions, given that the macromolecular complexes are purified biochemically from the cellular context. For specimens thicker than 250 nm, a resolution better than 4 nm turns out to be necessary to distinguish complexes structurally as similar as the Thermosom, GroEL and the 20S Proteasom. The application of the identification algorithms to protein-filled vesicles - so called phantom cells - reveals that more than 90% of the particles can be identified correctly within their quasi-cellular environment with the presently used experimental setup.

# Kapitel 1

## 1. Einleitung

Ende der achtziger Jahre wurde die biologische Elektronenmikroskopie durch zwei technische Entwicklungen revolutioniert. Die im wesentlichen in der Gruppe von J. Dubochet entwickelte Kryo-Elektronenmikroskopie erlaubte erstmalig die tatsächliche biologische Struktur in ihrer gefroren-nativen Form abzubilden [Dubochet et al., 1988]. Dabei wird das Präparat – gleich ob Protein, Virus oder Zelle – in seiner wässrigen Umgebung in flüssigem Ethan bei 80 K schockgefroren. Das extrem schnelle Einfrieren verhindert das Entstehen von kristallinem Eis, welches die biologische Struktur zerstören würde. Stattdessen nimmt das Wasser einen ‚amorphen‘, extrem viskosen Zustand an, die Struktur bleibt somit bis auf atomare Dimensionen erhalten und die Dichteverteilung kann direkt im Elektronenmikroskop abgebildet werden [Kühlbrandt et al., 1994].

Direkt im Anschluss an die Einführung der Kryo-Elektronenmikroskopie wurden zahlreiche Nieder-Dosis-Verfahren entwickelt, da die eiseingebetteten Präparate extrem strahlempfindlich sind. Eine manuelle Einstellung und die Korrektur wichtiger Mikroskopparameter wie Defokus oder Drift war nicht mehr möglich ohne die kritische Elektronendosis für eiseingebettetes biologisches Material zu überschreiten [Koster et al., 1992; Koster et al., 1989]. Diese Entwicklung war erst durch die Einführung von großflächigen CCD-Kameras [Daberkow et al., 1991] und die Möglichkeit der externen online Mikroskopkontrolle durch Mikroprozessoren möglich geworden [Typke et al., 1992].

Viele der bereits in den 60er und 70er Jahren angedachten drei-dimensionalen Aufnahmeverfahren wurden somit erstmals realisierbar [DeRosier und Klug 1968; Hart 1968; Hoppe 1974]. Ziel dieser Verfahren ist es, ein drei-dimensionales Objekt aus möglichst vielen Projektionsrichtungen unter konstanten Aufnahmebedingungen aufzunehmen. Unter der Voraussetzung, dass der Projektionswinkel bekannt ist, bzw. bestimmt werden kann, ist die vollständige Rekonstruktion der drei-dimensionalen Struktur des Objekts durch Superposition der Einzelprojektionen möglich. Liegt das Präparat in identischen, strukturell gut definierten Kopien vor, wie es bei vielen Proteinen der Fall ist, können die Einzelprojektionen durch sogenannte quasi-tomographische Verfahren aufaddiert werden und die statistische Signifikanz der biologischen Struktur kann somit erhöht werden [Frank 1996; van Heel 1987]. Ist es möglich, viele tausend Projektionen zu mitteln, kann selbst für nicht-symmetrische

Proteinstrukturen mit Hilfe der Einzelpartikelanalyse atomare Auflösung erzielt werden [DeRosier and Klug 1968; Frank 1997; Stark et al., 1996].

Das bloße Verständnis der atomaren Struktur der Proteine reicht jedoch oft nicht aus, um die Funktionsweise zellulärer biologischer Systeme zu analysieren. Zellen sind extrem komplexe Systeme, die auf dem Zusammenspiel vieler Basiskomponenten, u. a. Proteine, beruhen. Diese aus vielen Teilen bestehenden molekularen Maschinen sind zum einen dynamische Objekte, die innerhalb des Zellzyklus auf- und abgebaut werden oder sich auf Grund externer Stimuli (wie z. B. Nährstoffmangel) verändern. Zum anderen ist die strukturelle Organisation nicht mehr starr festgelegt, vielmehr ist jedes zelluläre Organell ein aus vielen Komponenten zusammengesetztes Unikat [Alberts 1998]. Eine Strukturbestimmung durch die Einzelpartikelanalyse scheidet daher grundsätzlich aus.

Die 3D-Charakterisierung zellulärer Organellen oder gar ganzer kleiner Zellen ist jedoch durch die Elektronentomographie möglich. Hierbei wird das Präparat im Elektronenmikroskop über einen möglichst großen Winkelbereich gekippt. Für jeden eingestellten Kippwinkel wird eine 2D-Projektion des 3D-Objektes aufgenommen. Die 3D-Struktur des Präparats kann wiederum durch Superposition der Einzelprojektionen unter dem geeigneten Rückprojektionswinkel rekonstruiert werden. Die erlaubte Strahlendosis muss bei der Elektronentomographie also auf eine Vielzahl von Einzelprojektionen verteilt werden, was ein hohes Maß an Automatisierung der Mikroskopsteuerung voraussetzt [Dierksen et al., 1993; Dierksen et al., 1992]. Mitte der 90er Jahre war es erstmals möglich, die 3D-Struktur eines einzigartigen eiseingebetteten biologischen Modellobjektes mit Hilfe der Elektronentomographie zu bestimmen [Dierksen et al., 1995].

In den letzten Jahren wurde die Elektronentomographie auf eine Vielzahl biologischer Systeme angewandt, von einzelnen Proteinkomplexen [Nitsch et al., 1998], über quazelluläre Modellsysteme [Grimm et al., 1997], zelluläre Organellen [Frey und Manella 2000; Nicastro et al., 2000] zu ganzen Zellen [Grimm et al., 1998]. Die Elektronentomographie stellt für individuelle biologische Objekte momentan die bestauflösende abbildende Technik dar. Die erreichte Auflösung reicht hierbei von 2.6 nm für Rekonstruktionen des Thermosoms bis zu ca. 4 nm für ganze Zellen. Vor allem die zelluläre Elektronentomographie eröffnete ungeahnte Möglichkeiten: erstmals sind einzelne Proteinkomplexe in ihrer natürlichen zellulären Umgebung ohne die Anwendung von indirekten Markierungsmethoden erkennbar [Baumeister und Steven 2000]. Eine eindeutige Identifikation selbst großer makromolekularer Komplexe war jedoch selbst bei der erreichten Auflösung noch nicht möglich.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente haben die folgenden zwei Ziele verfolgt. Zum einen war es die Aufgabe, die bereits an älteren Geräten erzielte Auflösung weiter zu verbessern. Möglichen Spielraum bot hier vor allem die Erhöhung der Beschleunigungsspannung des verwendeten Mikroskops von 120 kV auf 300 kV: Bei den dicken zellulären Präparaten kann die mittlere freie Weglänge der Elektronen um etwa einen Faktor 2 erhöht werden. Zusätzlich wurde an das neu installierte 300 kV Gerät ein Post

Column Energiefilter angebracht. Die vor der Durchstrahlung des Objekts monoenergetischen Elektronen verlieren durch inelastische Streuprozesse teilweise an kinetischer Energie. Die chromatische Aberration der elektromagnetischen Linsen führt im folgenden zu einer ‚Verschmierung‘ der Objektinformation und somit zu einem Auflösungsverlust. Die Filterung der inelastisch gestreuten Elektronen kann hier folglich zu einer erheblichen Verbesserung der Abbildungsprozesse führen.

Trotz des erstmaligen Einsatzes eines 300 kV Mikroskops mit Energiefilter für die Tomographie von Zellen sind die resultierenden Elektronentomogramme stark verrauscht. Die hohe Strahlempfindlichkeit limitiert das Signal-zu-Rausch Verhältnis auf Werte weit unterhalb von 0.5. Eine eindeutige Detektierung und anschließende Identifizierung von Proteinkomplexen durch manuelle Selektion unter subjektiven Gesichtspunkten ist momentan – und bleibt wohl auch für die nahe Zukunft – utopisch. Ein Hauptschwerpunkt dieser Arbeit war folglich die Entwicklung und die Applikation von automatischen Identifikationsalgorithmen zur objektiven Erkennung von bekannten Proteinstrukturen in stark verrauschten Elektronentomogrammen von Zellen. Diese Algorithmen beruhen auf dem quantitativen Vergleich von Elektronentomogrammen mit strukturell gut aufgelösten Proteinstrukturen, welche durch komplementäre Techniken gewonnen werden (z.B. Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie oder Einzelpartikelanalyse). Die Identifikationswahrscheinlichkeit und –zuverlässigkeit wurde sowohl an simulierten Daten als auch an quasi-zellulären Modellsystemen evaluiert.

## ***Gliederung der Arbeit:***

### **Kapitel 2**

- Fixierung biologischer Präparate in amorphem Eis
- Grundlagen der Abbildungsmechanismen im Elektronenmikroskop unter besonderer Berücksichtigung dicker Präparate
- Grundlagen der Energiefilterung bei dicken biologischen Präparaten
- Tomographische Datenaufzeichnung und Rekonstruktion unter Berücksichtigung der elektronentomographischen Artefakte
- Mögliche Strategien zur Identifikation makromolekularer Komplexe in Elektronentomogrammen

### **Kapitel 3**

- Tomographische Analyse eines Modellsystems zum Transfer viraler DNS in Phantomzellen
- Evaluierung der verbesserten Abbildungsqualität durch den Einsatz eines energiefilternden 300 kV Mikroskops zur Tomographie von eiseingebetteten biologischen Präparaten
- Diskussion eines Modells zum Transfer viraler DNS in die Wirtszelle

## Kapitel 4

- Anwendung von Identifikationsalgorithmen auf Elektronentomogramme von aufgereinigten eiseingebetteten makromolekularen Komplexen
- Simulation von tomographischen Kippserien und Anwendung der Identifikationsalgorithmen zur Untersuchung der Auflösungsabhängigkeit der Identifikationsergebnisse
- Anwendung der Identifikationsalgorithmen auf tomographische Rekonstruktionen von Phantomzellen

## Kapitel 5

- Diskussion der vorgelegten Ergebnisse sowie der Limitationen der vorgelegten Machbarkeitsstudien bei der Anwendung auf Elektronentomogrammen von ganzen eiseingebetteten Zellen
- Mögliche technische Verbesserungen und ihre Auswirkung auf die Qualität der rekonstruierten Zellen werden diskutiert

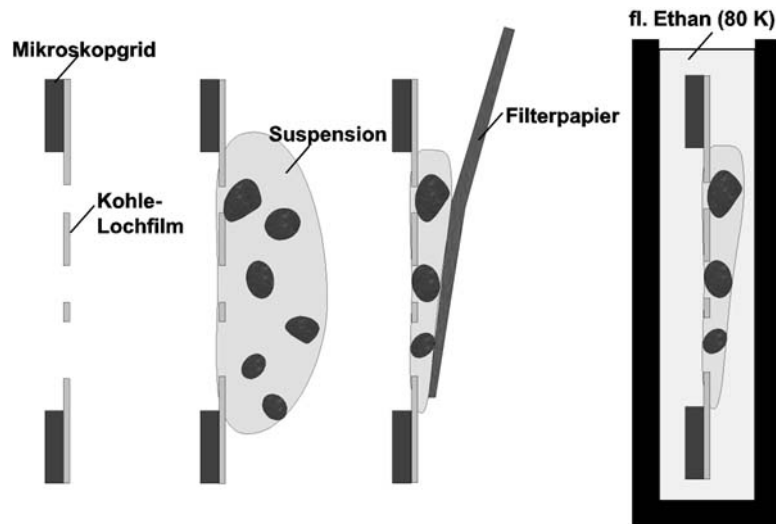


## Kapitel 2

### 2. Hintergrund

#### 2.1. Kryo-Präparation

Eine wichtige Voraussetzung zur strukturellen Untersuchung biologischer Substanzen im Elektronenmikroskop ist die geeignete Fixierung, da natives biologisches Material in wässriger Lösung im Ultrahochvakuum des Mikroskops verdampfen würde. Mitte der 80er Jahre wurde die konventionelle Fixierung durch Schwermetallsalz oder die Einbettung in Kunstharz [Armbruster et al., 1982; Bremer et al., 1992] durch die Einführung der Kryo-Elektronenmikroskopie revolutioniert. Diese Technik erlaubt es, die biologische Substanz in gefrorenem Zustand direkt in ihrer nativen Umgebung abzubilden [Dubochet et al., 1988; Dubochet et al., 1982]. Die biologische Lösung wird hierzu auf einen dünnen lödrigen Kohle-Trägerfilm aufgebracht. Anschließend wird durch Absaugen von überstehender Flüssigkeit mit Filterpapier eine wenige nm bis  $\mu\text{m}$  dicke Suspension erzeugt. Das Präparat wird durch eine Fallvorrichtung in flüssiges Ethan (Temperatur: ca. 90 K) ‚eingeschossen‘ (Abbildung 2.1) und im flüssigen Stickstoff in den Probenhalter transferiert. Diese speziellen Kryo-Mikroskophalter erlauben es, die Probe in gefrorenem Zustand in das Ultra-Hochvakuum des Mikroskops einzuschleusen und dort über mehrere Stunden thermisch stabil bei etwa 90-100 K zu untersuchen. Durch das schockartige Einfrieren in Ethan können Kühlraten im K/ms-Bereich erreicht werden, d.h. die Wassermoleküle haben keine Möglichkeit sich als Kristall zu organisieren, was zu einer Zerstörung der biologischen Strukturen führen würde. Stattdessen wird ein wasserähnlicher Zustand eingenommen, bei dem sich das Präparat nach wie vor wie eine Flüssigkeit, jedoch – ähnlich wie Glas - mit extrem hoher Viskosität verhält. Diesen Aggregatzustand nennt man ‚amorphes‘ Eis. Die biologische Probe bleibt bis in atomare Dimensionen in ihrer natürlichen Umgebung strukturell erhalten.



**Abbildung 2.1** Bei der Kryo-Präparation wird das Präparat in wässriger Lösung auf einen Kohle-Lochfilm aufgebracht. Nach dem Entfernen der überstehenden Flüssigkeit durch Filterpapier wird das Grid in flüssiges Ethan eingeschossen und schockgefroren (von links nach rechts). Es werden Kühlraten im K/ms Bereich erreicht, das Präparat bleibt somit in einem amorphen Zustand.

Die Kryo-Präparation weist im Vergleich zu anderen Fixierungsmethoden neben der strukturellen Erhaltung des Präparats jedoch auch Nachteile auf: Durch den geringen Dichteunterschied von Wasser und Protein ist der Kontrast der im Elektronenmikroskop abgebildeten Struktur sehr gering. Zusätzlich ist das eingefrorene Präparat extrem empfindlich gegenüber Bestrahlung; die maximale Elektronendosis beträgt für biologische Präparate, abhängig von der angestrebten Auflösung, ca. 20 bis 100  $e/\text{Å}^2$ . Die ab dieser Dosis erkennbaren strukturellen Veränderungen beruhen auf der Bildung und der Diffusion von freien Radikalen und durch sie ausgelösten Reaktionen. Eine mögliche Abhilfe ist die Abbildung des Präparats bei noch tieferen Temperaturen (etwa 10 bis 20 K durch die Kühlung mit flüssigem Helium). Die Diffusion der entstehenden Radikale ist hierbei stark eingeschränkt und die Strahlenschäden daher auf einen kleineren Bereich lokalisiert [Dubochet et al., 1988; Stark et al., 1996].

## 2.2. Aufbau eines Elektronenmikroskops

Seit der Entwicklung des Elektronenmikroskops in den 30er Jahren durch E. Ruska und Mitarbeiter hatte die Elektronenmikroskopie wesentlichen Anteil an der strukturellen Aufklärung von biologischen Zellen, Zellorganellen, Viren und Proteinen. Die erzielte Auflösung hängt hierbei stark von der Dicke des Präparats ab und reicht von ca. 50 nm für dicke Zellschnitte bis zu wenigen Angström für einzelne aufgereinigte Proteine oder Proteinkristalle [Nogales et al., 1996; Unwin und Henderson 1975]. Im folgenden soll kurz auf den prinzipiellen Aufbau eines Elektronenmikroskops eingegangen werden (Abbildung 2.2).

In der Leuchtquelle werden freie Elektronen emittiert und durch ein Hochspannungsfeld im Hoch- oder Ultrahochvakuum ( $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  Pa) auf typischerweise 100 bis 400 keV

beschleunigt. Als Elektronenquellen dienen thermische Wolfram- oder  $\text{LaB}_6$ -Kathoden (Betriebstemperatur: 2800 K bei Wolfram und 1500 – 2000 K bei  $\text{LaB}_6$ ). Alternativ werden Feldemissions-Kathoden (FEG) eingesetzt, die neben erhöhter Helligkeit ( $10^8 - 10^9 \text{ A/cm}^2 \text{ sr}$  im Vergleich zu  $2 \cdot 10^6 \text{ A/cm}^2 \text{ sr}$ ) auch ein schmaleres Energiespektrum bieten (0.8 eV im Vergleich zu 2 eV). Die Elektronen werden durch die Kondensoren - idealerweise parallel - auf das Objekt abgebildet und können mit Hilfe der Strahl-Ablenkspulen verschiedene Bereiche des Präparats ausleuchten (Beam Shift). Durch Wechselwirkung mit dem Präparat wird ein Teil der Elektronen gestreut (siehe 2.3) und durch die Objektivlinse in der Bildebene mit dem ungestreuten Primärstrahl zur Interferenz gebracht. Die Objektivapertur erlaubt es zusätzlich, einen Teil der elastisch gestreuten Elektronen auszublenden und trägt somit zu verbessertem Bildkontrast bei. Die Bild-Ablenkspulen (Image Shift) erlauben es dabei, verschiedene Bereiche des Präparats abzubilden. Ein System aus Projektionslinsen wirft das vergrößerte Bild auf einen fluoreszierenden Leuchtschirm, der bei Bedarf hochgeklappt werden kann und somit den Weg der Elektronen auf die CCD-Kamera und/oder in das Energiefilter freigibt (siehe 2.5).

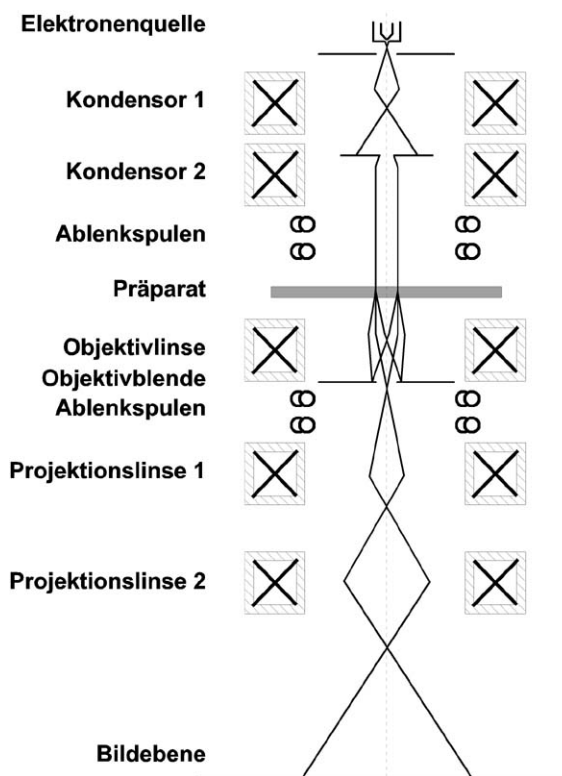


Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Transmissions-Elektronenmikroskops.

### 2.3. Streuung

Der für die elektronenmikroskopische Bildgebung entscheidende physikalische Prozess ist die Streuung der hochenergetischen Elektronen am Objektpotential des zu untersuchenden Präparats. Die Streuung am Objekt kann zum einen durch die Ablenkung der Elektronen am

durch die Elektronenhülle abgeschirmten elektrischen Feld der Atomkerne in der Probe erfolgen, zum anderen kann die Wechselwirkung der beleuchtenden Elektronen mit den Elektronen der Atome des Präparats unter Übertragung von Energie ursächlich sein. Die beiden Wechselwirkungsmechanismen weisen grundlegend verschiedene Streueigenschaften auf, die im folgenden kurz beschrieben werden [Reimer 1989].

### 2.3.1. Streuung am Atomkern – elastische Streuung

Bei der Streuung der Elektronen am Atomkern handelt es sich um eine klassische Rutherford-Streuung: Das relativ leichte negativ geladene Elektron wird durch die Coulomb-Wechselwirkung vom teilweise durch die Elektronenwolke abgeschirmten schweren positiven Kern angezogen und beschreibt - klassisch betrachtet - eine hyperbolische Bahn mit einem vom Abstand zum Kern abhängigen Streuwinkel. Der Energieübertrag vom Elektron auf das Atom kann hierbei auf Grund des niedrigen Elektronen/Kern Masseverhältnisses im allgemeinen vernachlässigt werden, es handelt sich um einen elastischen Streuvorgang. Eine Ausnahme stellt hierbei die elastische Streuung bei sehr kleinem Stoßparameter dar. Bei diesem fast zentralen Stoß kann das Atom bei hohen Beschleunigungsspannungen aus seiner Bindung geschlagen werden (sogenannter ‚knock-on‘-Effekt, [Scherzer 1970]).

Die von der Elektronenwolke abgeschirmte potentielle Energie des Elektrons im Feld des Atomkerns kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$V(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} + \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \sum_{j=1}^Z \int \frac{\rho(r_j)}{|\vec{r} - \vec{r}_j|} d^3\vec{r}_j \quad (1)$$

Wird nur der erste Abschirmungsterm berücksichtigt, spricht man vom Wentzel-Modell:

$$V(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} e^{\frac{-r}{a_H Z^{-1/3}}} \quad (2)$$

Unter Verwendung des Wentzel-Modells für  $V(r)$  kann für den elastischen Streuquerschnitt mit Hilfe der Born'schen Annahme, dass es sich bei dem zu untersuchenden Objekt um ein ‚schwaches Phasenobjekt‘ handelt, eine analytische Lösung angegeben werden [Lenz 1954]:

$$\frac{d\sigma_{el}}{d\Omega} = \frac{4Z^2 R^4 (1 + E/m_0 c^2)^2}{a_H^2 [1 + (\theta/\theta_0)^2]^2} \quad (3)$$

$\theta_0$  bezeichnet hierbei den charakteristischen Streuwinkel für die elastische Streuung, d.h. der Winkel, bei dem der Streuquerschnitt auf ein Viertel des Wertes in Vorwärtsrichtung gefallen ist:  $\theta_0 = \lambda/2\pi R$ , mit der Wellenlänge der Elektronen  $\lambda = hc/(2EE_0 + E^2)^{1/2}$ . Die Werte des charakteristischen Streuwinkels bei der elastischen Streuung betragen in der Regel mehrere mrad. Die elastisch gestreuten Elektronen lassen sich folglich relativ einfach durch eine Blende in der hinteren Brennebene der Objektivlinse begrenzen. Die Objektivblende trägt somit durch Ausblenden der elastisch gestreuten Elektronen wesentlich zum Streukontrast bei.

---

<sup>1</sup> Die verwendeten physikalischen Größen sind in Abschnitt 7 zusammengefasst

Für den totalen Streuquerschnitt  $\sigma_{el} \cong \int_0^\infty (d\sigma_{el}/d\Omega) 2\pi\theta d\theta$  erhält man für biologische Objekte

in guter Näherung:

$$\sigma_{el} = \frac{Z^2 R^2 \lambda^2 (1 + E/m_0 c^2)^2}{\pi a_H^2} = \frac{c^2 h^2 Z^{4/3}}{\pi E_0^2 \beta^2} = 1.87 \cdot 10^{-20} Z^{4/3} / \beta^2. \quad (4)$$

Die elastische Streuung steigt also stärker als linear mit der Kernladungszahl an und ist außerdem nur noch von der Energie, bzw. der Geschwindigkeit der beleuchtenden Elektronen abhängig. Mit Hilfe des Streuquerschnittes kann nun die mittlere freie Weglänge (MFW<sup>2</sup>) für elastische Streuung angegeben werden:

$$\Lambda_{el} = \frac{A}{N_A \rho \sigma_{el}} = \frac{A \beta^2}{1.87 \cdot 10^{-20} N_A \rho Z^{4/3}}. \quad (5)$$

### 2.3.2. Streuung unter Anregung der Elektronenhülle – inelastische Streuung

Neben der elastischen Streuung am Atomkern tragen verschiedene Wechseldwirkungen der beleuchtenden Elektronen mit der atomaren Elektronenhülle (wie z.B. Anregung von Phononen-, Plasmonen- oder Exzitonenschwingungen, Anregung von quasi-freien Elektronen oder elementspezifische Ionisation von Elektronen in den inneren Schalen) zur inelastischen Streuung bei. Hierbei wird durch die Gleichheit der Massen der beiden Stoßpartner Energie auf das Präparat übertragen, d.h. die Primärelektronen verlieren Energie. Unter der erneuten Annahme des Wentzel-Modells lässt sich analog zur elastischen Streuung der differentielle Streuquerschnitt der inelastischen Streuung angeben [Lenz 1954]:

$$\frac{d\sigma_{in}}{d\Omega} = \frac{\lambda^4 (1 + E/m_0 c^2) Z \left\{ 1 - \left[ 1 + (\theta/\theta_0)^2 \right]^2 \right\}}{4\pi^4 a_H^2 (\theta^2 + \theta_E^2)^2} \quad (6)$$

$\theta_E$  ist hierbei der charakteristische Streuwinkel für inelastische Streuung,  $\theta_E = \Delta E / mv^2 \approx \Delta E / 2E$ .  $\theta_E$  ist wesentlich kleiner als der charakteristische Streuwinkel bei der elastischen Streuung  $\theta_0$ ,  $\theta_E \ll \theta_0$ . Dies hat zur Folge, dass die meisten inelastisch gestreuten Elektronen nicht durch die Objektivblende abgefangen werden; sie tragen in der konventionellen Elektronenmikroskopie nur geringfügig zum Streukontrast bei. Da die inelastisch gestreuten Elektronen jedoch eine von  $E$  verschiedene Energie haben ( $\Delta E$ ), lassen sie sich durch den technisch aufwendigeren Einsatz eines abbildenden Energiefilters aus dem Bildstrahlengang entfernen (siehe 2.5).

Der totale inelastische Streuquerschnitt lässt sich auf Grund der für jedes Element sehr spezifischen Streucharakteristik nur numerisch annähern. Unter der Annahme, dass der Plasmonverlust am stärksten zur inelastischen Streuung beiträgt, lässt sich ein mittlerer inelastischer Streuquerschnitt angeben [Wall et al., 1974]:

<sup>2</sup> MFW: Ist die Präparatdicke gleich der MFW, wird jedes Elektron im Schnitt einmal gestreut

$$\sigma_{in} = \frac{1.5 \cdot 10^{-20}}{\beta^2} \sqrt{Z} \ln\left(2/\theta_E\right) \quad (7)$$

Für eine praktische Angabe des totalen Streuquerschnittes ist das Verhältnis aus  $\sigma_{in}$  und  $\sigma_{el}$  von Bedeutung:  $\nu = \sigma_{in}/\sigma_{el} \approx 20/Z$  [Reimer und Ross-Messemer 1989]. Für eiseingebettete biologische Proben ist der inelastische Streuquerschnitt also etwa 3.5 mal höher als der elastische.

Die mittlere freie Weglänge für inelastisch gestreute Elektronen wurde von Malis et al. [Malis et al., 1988] empirisch zu

$$\Lambda_{in} = \frac{106F(E/7.6Z^{0.36})}{(1-n^{-2})\ln(2\beta E/7.6Z^{0.36})} \quad \text{mit } F = \frac{1+E/2E_0}{(1+E/E_0)^2} \quad (8)$$

bestimmt.

Die mittlere freie Weglänge, sowohl die elastische als auch die inelastische, ist also in etwa proportional zu  $\beta^2$  (Abbildung 2.3). Eine theoretische Erhöhung der Beschleunigungsspannung von 100 kV auf  $\infty$  würde lediglich einen 3.2-fachen Gewinn bei der mittleren freien Weglänge bedeuten, wobei durch eine Erhöhung auf 300 kV schon ein Faktor 2 gewonnen ist. Eine Beschleunigungsspannung von 300 kV stellt also einen guten Kompromiss aus Erhöhung der mittleren freien Weglänge und experimenteller Machbarkeit dar, da 300 kV Geräte mit Feldemissions-Kathode kommerziell erhältlich sind.

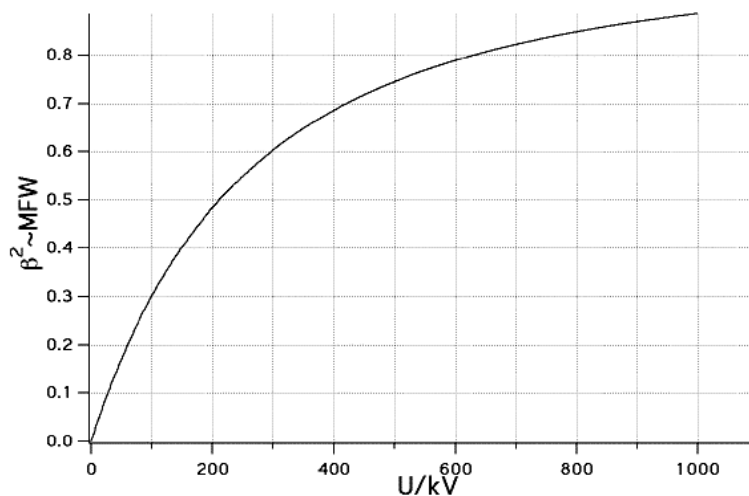


Abbildung 2.3 Die mittlere freie Weglänge ist proportional zum quadrierten Verhältnis aus Elektronengeschwindigkeit und Lichtgeschwindigkeit.

## 2.4. Kontrastmechanismen im Elektronenmikroskop

### 2.4.1. Streukontrast

Wie in 2.3 gezeigt wurde ist die Streuung zum einen elementspezifisch, zum anderen von der Dichte des Präparats abhängig. Die gestreuten Elektronen können durch die geeignete Wahl der Aperturblende und durch ein Energiefilter aus dem Abbildungsstrahlengang entfernt

## 2. Hintergrund

werden und tragen somit direkt zum Amplitudenkontrast bei. Die Einbuße an Transmission  $T(\alpha)$  bei Verwendung einer Objektivblende mit dem Öffnungswinkel  $\alpha_0$  beträgt:

$$\frac{dn}{n} = -\frac{N_A}{A} [\sigma_{el}(\alpha_0) + \sigma_{in}(\alpha_0)] dx, \text{ mit der Massendicke } x = \rho t \quad (9)$$

Durch Integration und unter Verwendung der Kleinwinkel-Näherung erhält man [Reimer 1989]:

$$T(\alpha) = \frac{n}{n_0} = \exp\left[-\frac{x}{x_k(\alpha_0)}\right], \text{ wobei } \frac{1}{x_k(\alpha_0)} = \frac{4}{Z\Lambda_{el}} \left[ \frac{Z-1}{4[1+(\alpha_0/\theta_0)^2]} + \ln \sqrt{1+(\theta_0/\alpha_0)^2} \right] \quad (10)$$

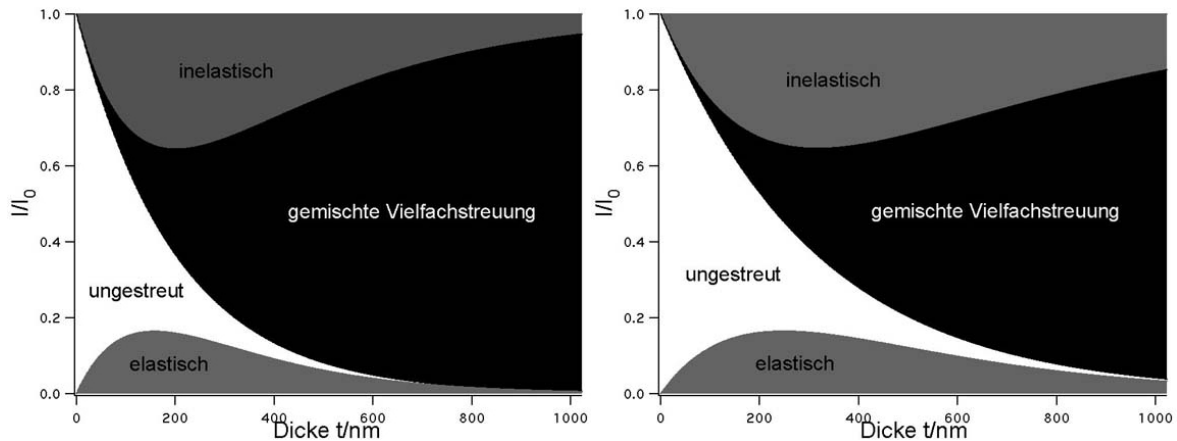
Der Streukontrast setzt sich also zum einen durch die unterschiedliche Elementverteilung, zum anderen aus der unterschiedlichen Dicke und Dichte des Präparats zusammen. Unter der Annahme einer konstanten Elementverteilung und einer konstanten Dichte kann durch die Messung des Streukontrastes die Dicke des Präparats ermittelt werden [Grimm et al., 1996; Reimer 1989].

Für eine Betrachtung des Streukontrastes ist bei dicken Proben ( $t > \text{MFW}$ ) zusätzlich noch die Vielfachstreuung zu berücksichtigen. Mit Hilfe der mittleren freien Weglänge für elastische und inelastische Streuung lässt sich eine Lösung der Differentialgleichung zur Berechnung der Streuwahrscheinlichkeiten  $P(l, m, t)$  von  $l$  elastischen und  $m$  inelastischen Streuprozessen aufstellen [Brünger und Menz 1965; Grimm 1997]:

$$P(l, m, t) = \frac{1}{l!} \left( \frac{t}{\Lambda_{el}} \right)^l \frac{1}{m!} \left( \frac{t}{\Lambda_{in}} \right)^m e^{-t/\Lambda_{tot}} \quad (11)$$

Es können somit die verschiedenen Kombinationen aus Streueignissen unterschieden und die Verteilung der Elektronen in die verschiedenen ‚Streukanäle‘ angegeben werden:

- ungestreute Elektronen:  $\frac{I_{un}}{I_0} = e^{-t/\Lambda_{tot}}$
- einfach elastisch gestreute Elektronen:  $\frac{I_{1el}}{I_0} = \frac{t}{\Lambda_{el}} e^{-t/\Lambda_{tot}}$
- einfach inelastische gestreute Elektronen:  $\frac{I_{1in}}{I_0} = \frac{t}{\Lambda_{in}} e^{-t/\Lambda_{tot}}$
- nur elastisch gestreute Elektronen:  $\frac{I_{nur-el}}{I_0} = (e^{t/\Lambda_{el}} - 1) e^{-t/\Lambda_{tot}}$
- nur inelastisch gestreute Elektronen:  $\frac{I_{nur-in}}{I_0} = (e^{t/\Lambda_{in}} - 1) e^{-t/\Lambda_{tot}}$
- gemischt gestreute Elektronen:  $\frac{I_{gem}}{I_0} = 1 - (e^{t/\Lambda_{el}} + e^{t/\Lambda_{in}} - 1) e^{-t/\Lambda_{tot}}$



**Abbildung 2.4** Verteilung der verschiedenen Streuarten bei einer Präparatdicke  $t$ . Als mittlere freie Weglänge wurde in a) die Werte für 120 kV (350 nm für die elastische Streuung und 200 nm für die inelastische Streuung) und in b) für 300 kV angenommen (550 nm, bzw. 315 nm).

Unter Verwendung der experimentell bestimmten mittleren freien Weglängen für amorphes Eis [Dinges et al., 1995; Grimm et al., 1996; Langmore und Smith 1992] kann die Streucharakteristik für verschiedene Beschleunigungsspannungen angegeben werden (Abbildung 2.4). Es zeigt sich, dass der Anteil der inelastisch und vielfach gestreuten Elektronen ab einer Präparatdicke, die in etwa der mittleren freien Weglänge entspricht, dominiert. Diese Elektronen tragen jedoch praktisch keine Strukturinformation, da die chromatische Aberration der Linsen zu einer Variation der fokalen Länge und somit zu einer ‚Verschmierung‘ der Bildinformation führt. Die Elektronen tragen vorwiegend zu einem niederfrequenten Untergrundrauschen bei und reduzieren somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SRV) der Aufnahme. Durch den Einsatz eines Energiefilters können die inelastisch und mehrfach-gemischt gestreuten Elektronen entfernt werden, was bei dicken Proben zu einer ausgeprägten Verbesserung des SRV führen kann (für 500 nm dicke Proben ein ca. 5-mal erhöhtes SRV, [Grimm 1997]).

### 2.4.2. Phasenkontrast

Bei der Betrachtung der Streuung wurde bislang vernachlässigt, dass neben der Veränderung der Energie und des Streuwinkels der Elektronen auch eine Phasenschiebung auftritt. Zur Beschreibung der Phasenschiebung können die auf das Präparat treffenden Elektronen als eine ebene, kohärente Welle mit der Wellenfunktion

$$\Psi_{em} = |\Psi_0| e^{2\pi i k z} \quad (12)$$

betrachtet werden, wobei  $k$  die Wellenzahl und  $z$  die Einfallsrichtung beschreibt (übernommen aus [Typke 2000]). Die Störung der einfallenden Welle auf Grund des atomaren elektrischen Potentials kann durch Lösen der Schrödingergleichung<sup>3</sup> für das Streuproblem folgendermaßen berücksichtigt werden

<sup>3</sup>  $\left[ -\frac{\hbar^2}{2m} \vec{\nabla}^2 + V(\vec{x}) \right] \Psi(\vec{x}) = E \Psi(\vec{x}), \text{ mit } E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m}$



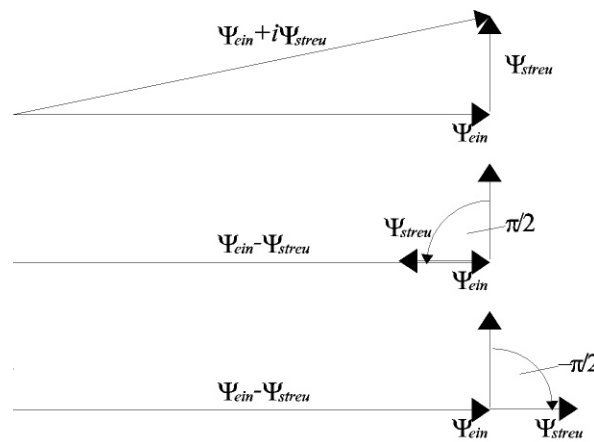
## 2. Hintergrund

$$\Psi_{aus} = |\Psi_0| \left( e^{2\pi i k z} + f(\theta) \frac{e^{2\pi i k r}}{r} \right), \text{ mit der komplexen Streuamplitude } f(\theta) = |f(\theta)| e^{i\eta(\theta)}. \quad (13)$$

Im Bild hat man zusätzlich zur Phasenverschiebung um  $90^\circ$  ( $i = \exp(i\pi/2)$ ), die auch bei der Streuung von Licht auftritt, also eine kleine, vom Streuwinkel abhängige Phasenschiebung  $\eta(\theta)$  (für leichte Elemente wird dieser Term vernachlässigt). Die auslaufende Welle in einer Ebene dicht hinter dem Objekt  $\Psi_{aus}$  setzt sich für kleine Phasenverschiebungen  $\varphi_s$  zum einen aus der einlaufenden Welle  $\Psi_{ein}$ , und zum anderen aus der um  $90^\circ$  phasenverschobenen gestreuten Welle  $\Psi_{streu}$  zusammen:

$$\Psi_{aus} = |\Psi_0| e^{2\pi i k z + i\varphi_s} = |\Psi_0| e^{2\pi i k z} (1 + i\varphi_s + \dots) = \Psi_{ein} + i\Psi_{streu}. \quad (14)$$

Die sich aus einfallender und gestreuter Welle zusammensetzende Bildintensität  $I = |\Psi_{ein} + i\Psi_{streu}|^2$  hat bei idealer Abbildung also den gleichen Wert wie die ungestörte Welle,  $I_0 = \Psi_{ein} \Psi_{ein}^* = |\Psi_{ein}|^2$ . Dies bedeutet, dass ein reines Phasenobjekt bei Gaußscher Fokussierung im Elektronenmikroskop – identisch zur Lichtmikroskopie – unsichtbar ist. Um tatsächlich positive oder negative Interferenz zwischen einfallender und gestreuter Welle, und somit sichtbaren Kontrast zu erreichen, muss eine zusätzliche Phasenverschiebung um - idealerweise -  $\pi/2$  erfolgen (Abbildung 2.5).

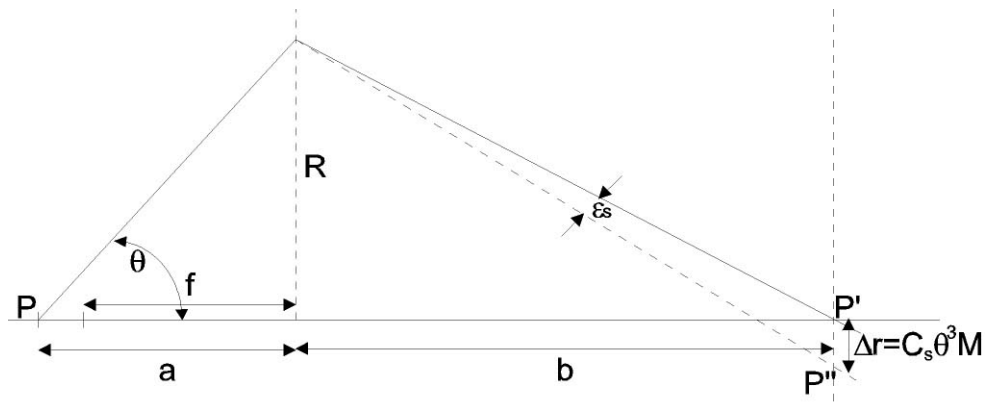


**Abbildung 2.5** Die Phasenverschiebung  $\pi/2$  zwischen einlaufender Welle und gestreuter Welle führt zu keiner Veränderung der Kontrastverhältnisse. Erst eine zusätzliche Phasenverschiebung um  $\pm\pi/2$  bewirkt eine erkennbare Intensitätsänderung.

In der Lichtmikroskopie kann diese Phasenverschiebung mit Hilfe eines Zernike-Phasen-Plättchens ( $\lambda/4$ -Plättchen) realisiert werden. In der Elektronenmikroskopie waren alle Versuche solch ein elektromagnetisches ' $\lambda/4$ -Plättchen' zu konstruieren bislang wenig erfolgreich, kommerziell ist ein solches System nicht erhältlich. Stattdessen kann man sich die komplexe Übertragungseigenschaft der Objektivlinse zu Nutze machen, da durch die Defokussierung und die sphärische Aberration der Objektivlinse ebenfalls eine Phasenschiebung induziert wird [Scherzer 1948]. Um die Phasenkontrastsübertragungsfunktion zu verstehen, müssen drei unterschiedliche optische Effekte berücksichtigt werden [Reimer 1989]: (i) die sphärische Aberration der Objektivlinse,

(ii) die Veränderung der Distanz zwischen Objektiv und Präparat  $\Delta a$ , sowie (iii) die Veränderung der fokalen Länge  $\Delta f$ .

- (i) Die Strahlableitung optischer wie elektromagnetischer Linsen ist eine nichtlineare Funktion des Linsenradius; dabei werden stark abgelenkte Strahlen an eine anderen Stelle fokussiert als schwächer abgelenkte Strahlen. Dieser Effekt wird sphärische Aberration genannt und ist in Abbildung 2.6 illustriert.



**Abbildung 2.6 Strahlengang bei sphärischer Aberration: Stark gestreute Strahlen werden näher an der Linse fokussiert.**

Für kleine Streuwinkel  $\theta$  gilt, dass  $R \approx a\theta$  ist. Weiterhin gilt, dass der Strahl die Gauss'sche Bildebene wegen der sphärischen Aberration nicht im Punkt  $P'$ , sondern im Punkt  $P''$  trifft. Dabei ist der Abstand  $\Delta r$  zwischen  $P'$  und  $P''$  durch  $\Delta r = C_s \theta^3 M$  gegeben, wobei  $M$  die Vergrößerung der Linse angibt ( $M = b/a$ ) und die sphärische Aberrationskonstante  $C_s$  ein Maß für die sphärische Aberration der verwendeten Linse ist. Unter der Annahme, dass die Streuwinkel klein sind und dass sich das Objekt nahe am Fokus befindet ( $a \approx f$ ), kann die durch die sphärische Aberration verursachte Winkelabweichung  $\varepsilon_s$  angegeben werden:

$$\varepsilon_s \cong \Delta r / b = C_s \theta^3 M / b = C_s R^3 / f^4 \quad (15)$$

- (ii) Die durch die Veränderung der Position des Präparats verursachte Winkelabweichung  $\varepsilon_a$  (Abbildung 2.7) kann mit Hilfe der Linsengleichung dargestellt werden:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{a + \Delta a} + \frac{1}{b + \Delta b} = \frac{1}{a} \left( 1 - \frac{\Delta a}{a} + \dots \right) + \frac{1}{b} \left( 1 - \frac{\Delta b}{b} + \dots \right) \quad (16)$$

Durch Auflösen nach  $\Delta b$  und unter der Annahme das  $\theta' \approx R/b$  erhält man durch Verwendung der Linsengleichung:

$$\varepsilon_a = |\Delta b| \theta' / b = \Delta a R / f^2 \quad (17)$$

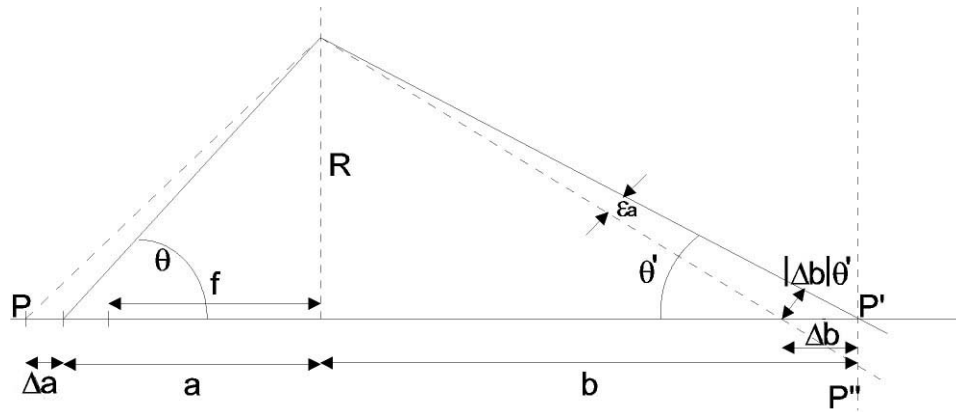


Abbildung 2.7 Strahlengang bei veränderter Präparatposition: Eine Verschiebung weg vom Fokuspunkt führt zu einer stärkeren Ablenkung der Strahlen.

- (iii) Der dritte Fall, die Änderung der fokalen Länge (Abbildung 2.8), kann analog zu (ii) behandelt werden, wobei nach Verwendung von  $1/(f+\Delta f)=1/a+1/(b+\Delta b)$  gilt:

$$\varepsilon_f = -|\Delta b|\theta'/b = -\Delta f R/f^2 \quad (18)$$

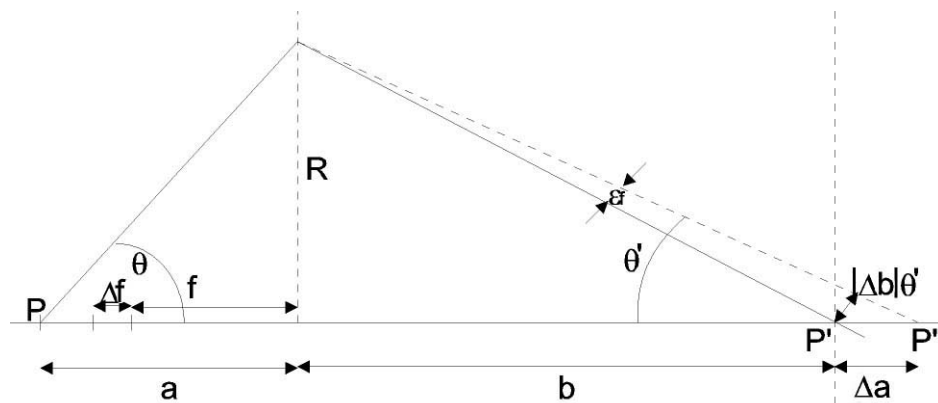


Abbildung 2.8 Strahlengang bei einer Veränderung der fokalen Länge: Eine Verringerung der fokalen Länge führt zu einer schwächeren Ablenkung.

Die drei dargestellten Winkelabweichungen sind additiv und für die gesamte Winkelabweichung  $\varepsilon$  erhält man:

$$\varepsilon = \varepsilon_s + \varepsilon_a + \varepsilon_f = C_s \left( R^3/f^4 \right) - (\Delta f - \Delta a) R/f^2 \quad (19)$$

Die Winkelabweichung  $\varepsilon$  führt zu einer veränderten Länge des optischen Weges  $\Delta s$  (Abbildung 2.9), und durch Integration kann die gesamte Phasenverschiebung relativ zur optischen Achse berechnet werden:

$$W(\theta) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta s = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^R ds = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^R \varepsilon dR = \frac{2\pi}{\lambda} \left[ \frac{1}{4} C_s \frac{R^4}{f^4} - \frac{1}{2} (\Delta f - \Delta a) \frac{R^2}{f^2} \right] \quad (20)$$

Mit Hilfe der für kleine Streuwinkel gültigen Näherung  $R/f \approx \theta$ , der Einführung des Defokus  $\Delta z = \Delta f - \Delta a$  und der Ortsfrequenz  $q$  erhält man die Scherzer-Formel:

$$W(\theta) = \frac{\pi}{2\lambda} (C_s \theta^4 - 2\Delta z \theta^2), \text{ oder } W(q) = \frac{\pi}{2} (C_s \lambda^3 q^4 - 2\Delta z \lambda q^2) \quad (21)$$

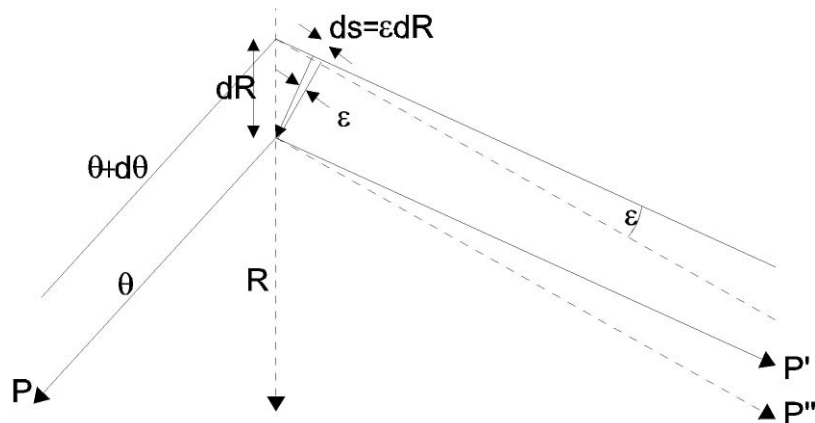


Abbildung 2.9 Eine Winkelabweichung  $\varepsilon$  führt im Außenbereich einer Linse zu einer Veränderung des optischen Weges  $s$ :  $ds = \varepsilon dR$ .

Durch geeignetes Defokussieren der Objektivlinse kann für einzelne Frequenzbereiche eine Phasenverschiebung von  $\pm\pi/2$  erzielt werden. Der maximale Phasenkontrast kann bei

$$W(q) = (2m - 1) \frac{\pi}{2} \quad (22)$$

erzielt werden, wobei für geradzahlige  $m$  negativer Kontrast, für ungeradzahlige  $m$  positiver Kontrast vorliegt.

## 2.5. Energiegefilterte Elektronenmikroskopie

Eine wesentliche Limitation des SRV und der Auflösung in Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Präparaten stellt die inelastische Streuung der Elektronen dar. Die chromatischen Aberration der elektromagnetischen Linsen führt dazu, dass die fokale Länge dieser langsameren Elektronen reduziert ist [Reimer 1995]:

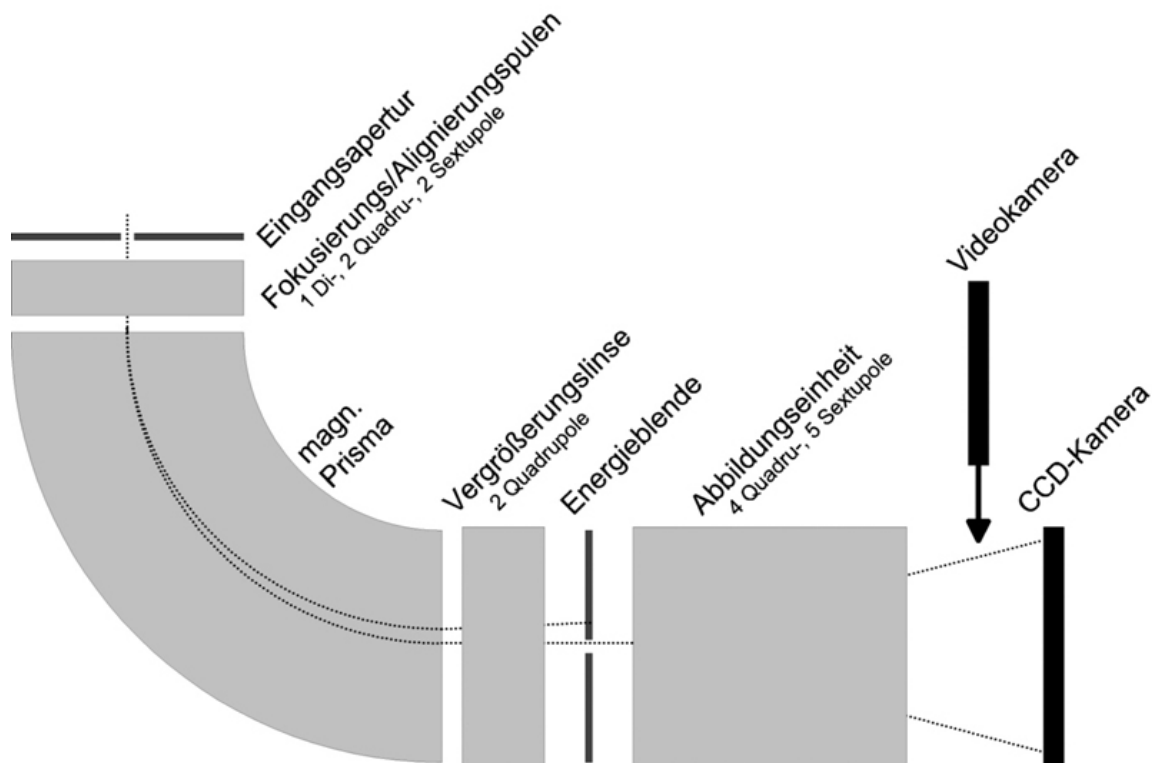
$$\frac{\Delta f_c}{f} = \frac{\Delta E}{E} - 2 \frac{\Delta I}{I} \quad (23)$$

Ein Punkt in der Objektebene wird in der Gaußschen Bildebene nicht als einzelner Punkt abgebildet, sondern als chromatische Aberrationsscheibe mit dem Durchmesser

$$d'_c = d_c M = 2C_c \frac{\Delta E}{E} \frac{1 + E/E_0}{1 + E/2E_0} \alpha_0 M. \quad (24)$$

Die inelastisch gestreuten Elektronen - bei 300 kV Beschleunigungsspannung und einer Präparatdicke von 300 nm sind dies in etwa 50 % (Abbildung 2.4) - tragen somit zu einem niederfrequenten Untergrundrauschen, jedoch kaum zur Strukturinformation bei. Abhilfe kann durch Herausfiltern der inelastisch gestreuten Elektronen mit einem Energiefilter geschaffen werden. Prinzipiell ist es hierbei gleichgültig, welche der bereits realisierten Filterarten verwendet wird (Henry-Castaing-, Omega-, oder Post-Column-Filter, siehe [Reimer 1995]). Da in Martinsried jedoch nur Post-Column-Filter verwendet werden, soll hier

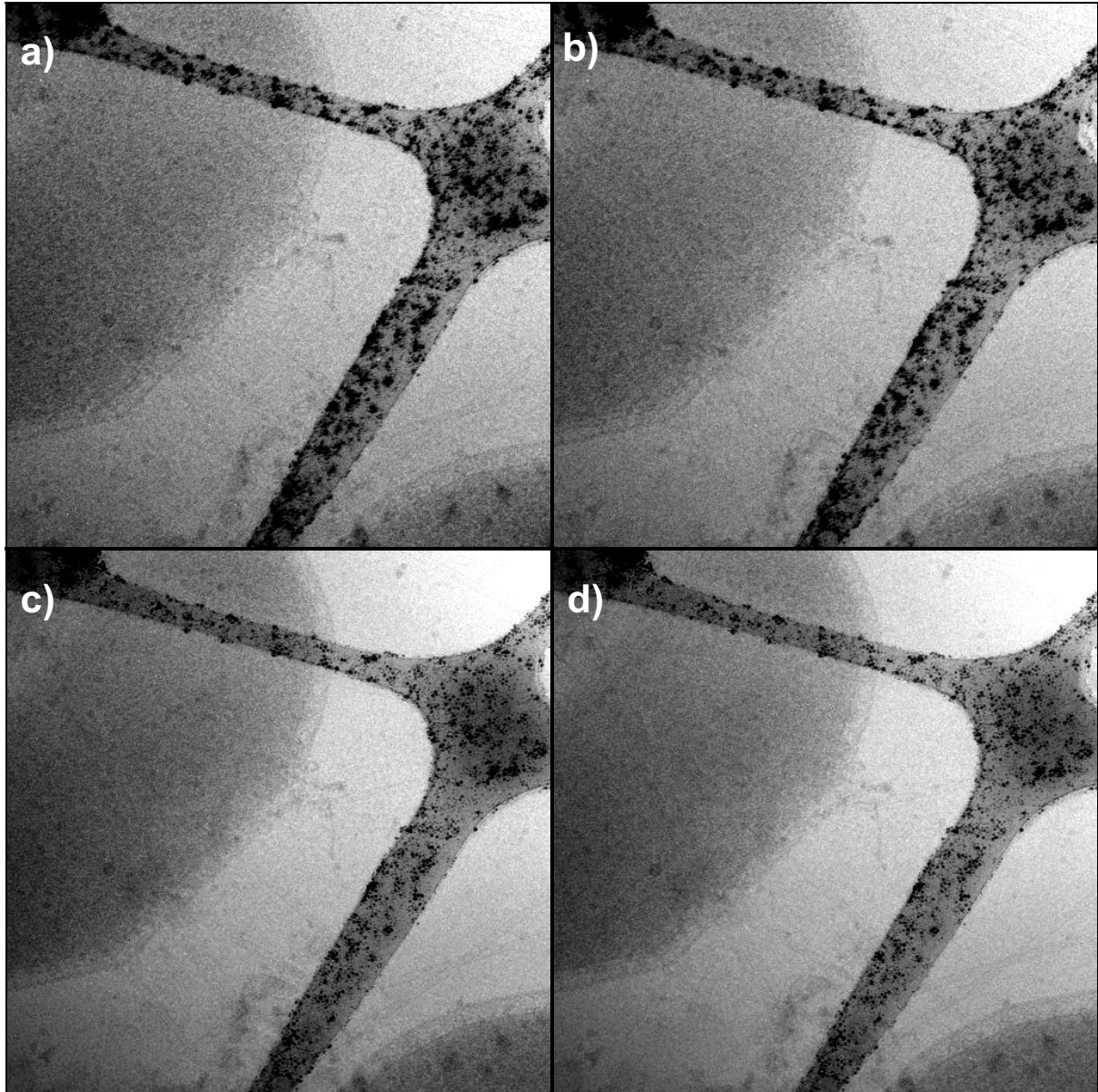
lediglich auf dieses Filterprinzip eingegangen werden. Das Post-Column-Filter wird unterhalb der Säule an das ansonsten unveränderte Mikroskop angebracht. Durch Anheben des Leuchtschirms gelangen die Elektronen in den Hauptbestandteil dieses Filtertyps, ein magnetisches Prisma. Die Elektronen werden dabei um ca.  $90^\circ$  abgelenkt, wobei die niederenergetischeren Elektronen eine größere Ablenkung erfahren als die hochenergetischen. Die Elektronen werden also entsprechend ihrer Energie örtlich separiert, und bestimmte Energiebereiche können mit Hilfe einer Schlitzblende selektiert werden. Im Anschluss an das Prisma werden die Elektronen mit entsprechend selektierter Energie durch eine Abbildungseinheit auf eine Videokamera oder eine Slow-Scan-CCD-Kamera abgebildet (Abbildung 2.10). Bei den in Martinsried verwendeten Energiefiltern der Firma Gatan Inc. handelt es sich um ein GIF 100 mit einer  $1024 \times 1024$  Pixel Kamera mit  $24 \mu\text{m}$  Pixelgröße am CM 120 Biofilter, sowie um ein GIF 2002 mit einer  $2048 \times 2048$  Pixel Kamera mit  $30 \mu\text{m}$  Pixelgröße am CM 300 FEG.



**Abbildung 2.10** Schematische Darstellung zur Funktionsweise eines Post-Column-Energiefilters. Die eintreffenden Elektronen werden entsprechend ihrer Energie durch ein magnetisches Feld örtlich aufgefächert. Durch eine Schlitzblende können Elektronen mit vorgegebener Energie für die Abbildung selektiert werden.

Die Verbesserung der Abbildungsqualität durch Energiefilterung am CM 120 Biofilter wurde in der Dissertationsarbeit von Rudo Grimm bereits ausführlich diskutiert [Grimm 1997]. Um die Verbesserung der Abbildungsqualität am CM 300 FEG beurteilen zu können, wurde auch hier die Fourier-Ringkorrelation (FRC) herangezogen. Hierbei werden abwechselnd zwei gefilterte und zwei ungefilterte Bilder aufgenommen (Abbildung 2.11) und Fourier-transformiert. Die Fourierspektren jedes Bildpaares werden entlang von Ringen multipliziert

und aufintegriert (d.h. korreliert). Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Bildähnlichkeit in verschiedene Frequenzbereichen der Bilder und kann somit zur Evaluierung der Abbildungsqualität herangezogen werden (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.11** Zwei ungefilterte (a und b) und zwei gefilterte Aufnahmen (c und d) von eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi* Zellen. Die Korrelation der Fourier-Transformierten der Bildpaare kann als Maß für die Verbesserung der Bildqualität durch Energiefilterung am CM 300 FEG herangezogen werden.

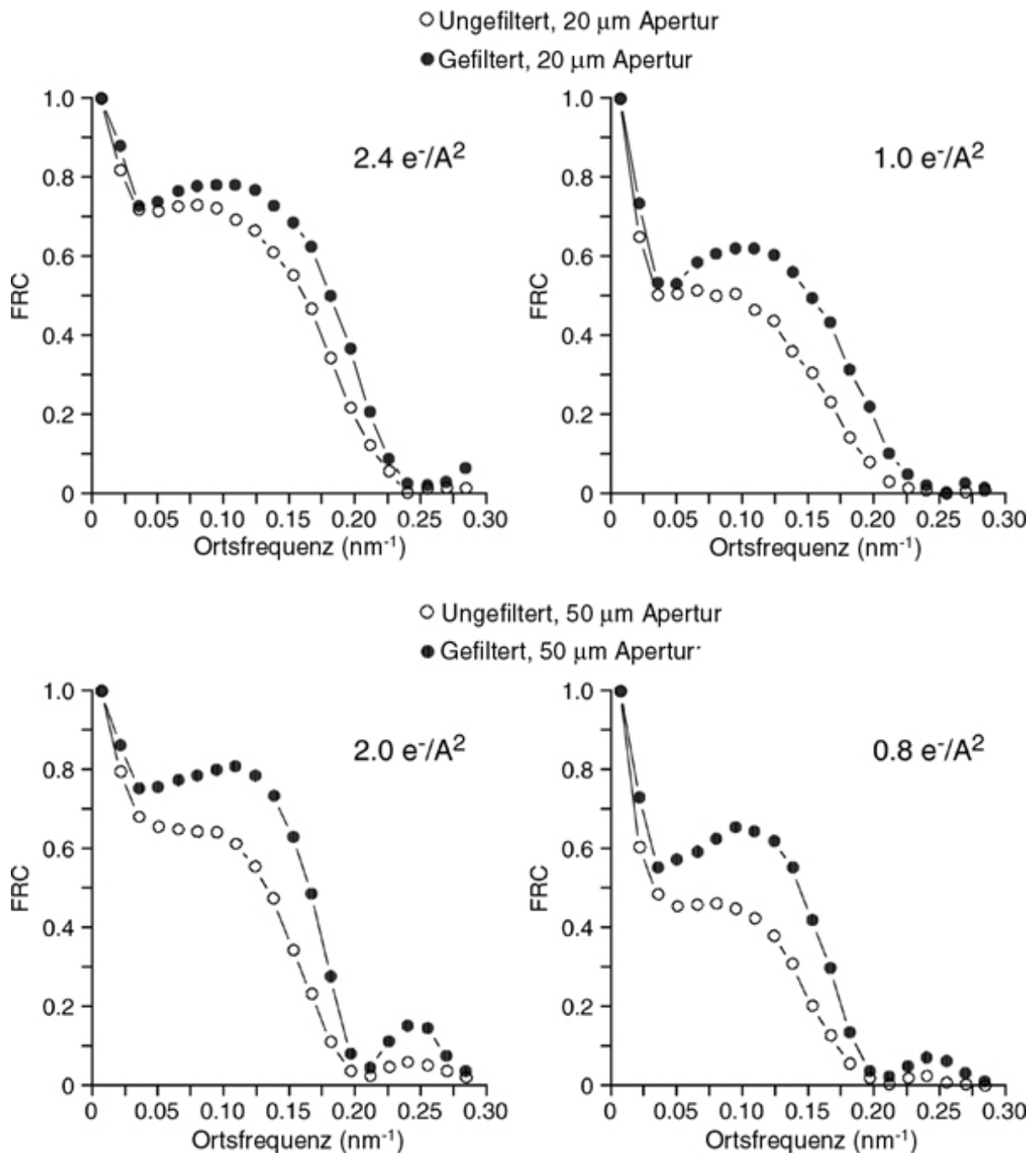


Abbildung 2.12 FRC der Aufnahmen von eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi* Zellen in Abhängigkeit der Objektiveperturgröße (a, b und c, d) und der Dosis.

## 2.6. Prinzip der Elektronentomographie

Eine wesentliche Limitation der zwei-dimensionalen Elektronenmikroskopie von ‚dicken‘ Präparaten ( $t > 50$  nm) ist in der hohen Schärfentiefe der Abbildung zu sehen. Die Aufnahme stellte eine Projektion aller Schichten, und somit eine Integration der Objektinformation entlang der z-Achse dar. Die Strukturinformation von Objekten in verschiedener Höhe kann nicht separiert werden, da nur eine Mittelung entlang der Strahlachse aufgenommen wird. Was sich als Nachteil für die zweidimensionale Elektronenmikroskopie erweist, ist

grundlegende Voraussetzung für die 3D-Elektronentomographie: liegen zweidimensionale Projektionen eines dreidimensionalen Objektes aus unterschiedlichen Richtungen vor, kann durch tomographische Verfahren die 3D-Struktur des ursprünglichen Objektes rekonstruiert werden.

### 2.6.1. Theoretischer Hintergrund

Der mathematischen Hintergrund für tomographische Verfahren ist durch das Projektionstheorem gegeben [Hoppe und Hegerl 1980; Rosenfeld und Kak 1982]. Dies besagt, dass die Projektion eines Objekts  $f(x, y, z)$  unter dem Winkel  $\alpha$  äquivalent zu einem Zentralschnitt durch die Fourier-Transformierte des Objektes  $f(x, y, z)$  unter dem Winkel  $\alpha$  ist. Die Fourier-Transformierte des Objekts ist gegeben durch

$$F(u, v, w) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) e^{-2\pi i(ux + vy + wz)} dx dy dz . \quad (25)$$

Durch Kippung des Objektes um die y-Achse ergibt sich bezüglich der tomographischen Rekonstruktion, dass die neue Koordinate  $\bar{y}$  mit  $y$  identisch ist. In den folgenden Gleichungen wird nur der zweidimensionale Fall betrachtet. Die Projektion des Objekts entlang der z-Achse bei Rotation des Objekts um den Winkel  $\alpha$  um die y-Achse ist

$$p_{\alpha}(\bar{x}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\bar{x}, \bar{z}) d\bar{z} , \quad (26)$$

$$\text{wobei } \begin{pmatrix} \bar{x} \\ \bar{y} \\ \bar{z} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \alpha & 0 & \sin \alpha \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \alpha & 0 & \cos \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} .$$

Mit  $u = R \cos \alpha$  und  $w = R \sin \alpha$  erhält man für die Fourier-Transformierte der Projektion:

$$\begin{aligned} P_{\alpha}(R) &= \int_{-\infty}^{\infty} p_{\alpha}(\bar{x}) e^{-2\pi i(R\bar{x})} d\bar{x} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, z) e^{-2\pi i R(x \cos \alpha + z \sin \alpha)} dx dz \\ &= F(R \cos \alpha, R \sin \alpha) = F(u, w) \end{aligned} \quad (27)$$



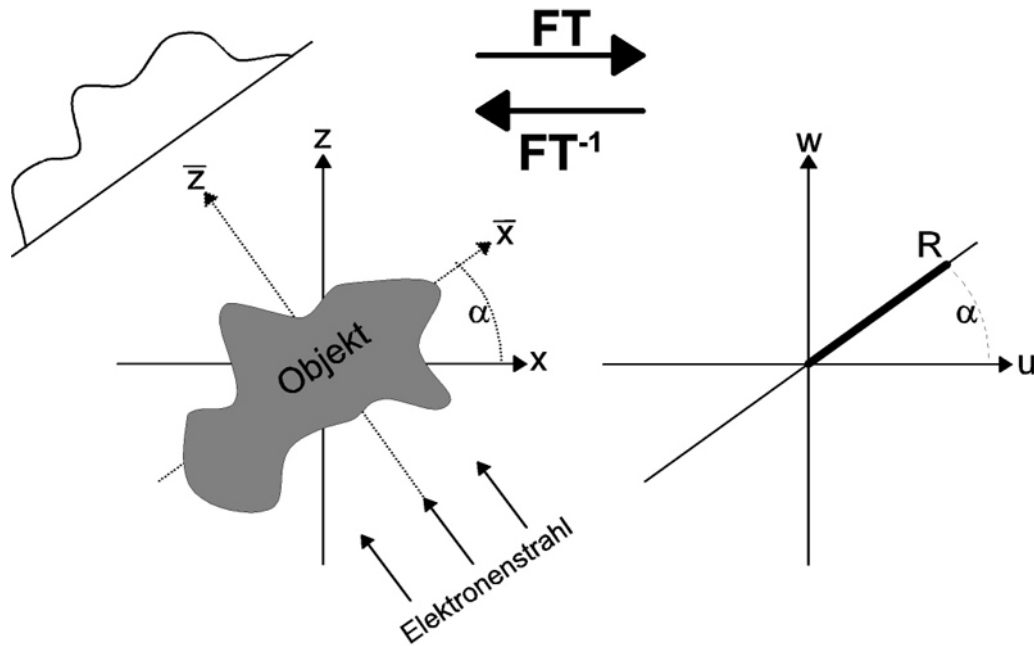


Abbildung 2.13 Die Projektion eines Objektes im Realraum entspricht einem Zentralschnitt durch die Fourier-Transformierte des Objektes und umgekehrt.

Durch Aufnahmen unendlich vieler Projektionen von  $0 < \alpha < \pi$  könnte man ein beliebiges Objekt im Fourier-Raum vollständig beschreiben. Durch Umwandlung von  $F(R, \alpha)$  in  $F(u, w)$  und Fourier-Transformation ließe sich folglich das Objekt vollständig rekonstruieren:

$$f(x, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, w) e^{2\pi i(ux + wz)} du dw. \quad (28)$$

In der Praxis kann natürlich nur eine endliche Anzahl von Projektionen aufgenommen werden, so dass  $F(u, w)$  für große  $R$  nicht mehr eindeutig bestimmt ist und Interpolationsartefakte bei der Transformation von Polarkoordinaten zu kartesischen Koordinaten dominieren [Hoppe 1969]. Die Auflösung  $d$  der Rekonstruktion ist bei einer endlichen Anzahl von Projektionen  $N$  durch mit der Dicke  $D$  des Objektes verknüpft. Der Abstand zweier abgetasteter Punkte im Fourier-Raum bei  $R_o=1/d$  darf nicht größer als  $1/D$  sein. Für eine tomographische Einachsenkippsreihe ergibt sich (Abbildung 2.14, [Crowther et al., 1970]):

$$d = \frac{\pi D}{N}. \quad (29)$$

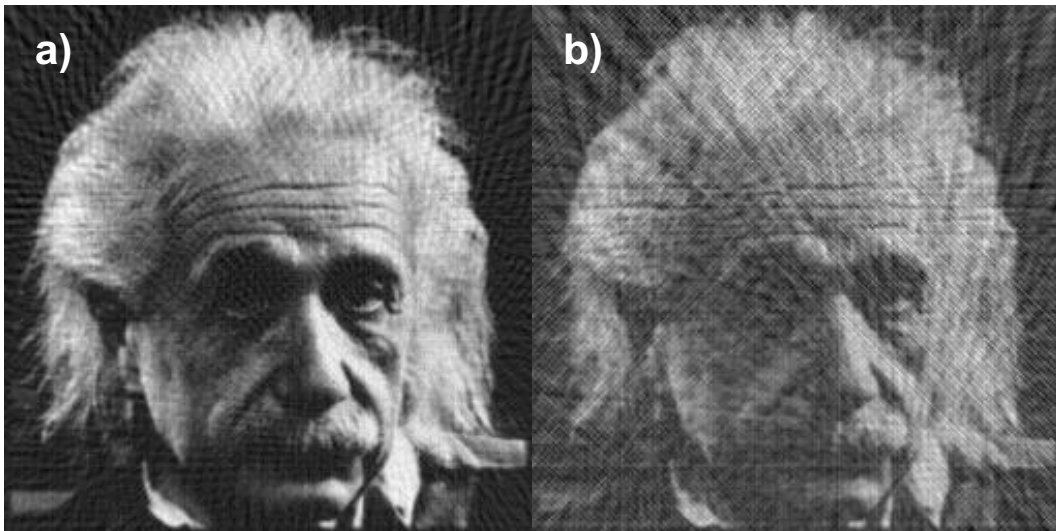


Abbildung 2.14 Die Auflösung der Rekonstruktion ist linear von der Anzahl der aufgenommenen Projektionen abhängig. In (a) wurden für die Rekonstruktion 90 Projektionen von  $-90^\circ$  bis  $+90^\circ$  verwendet ( $2^\circ$  Inkrement), in (b) 36 ( $5^\circ$  Inkrement).

Praktisch erfolgt die Rekonstruktion in der Elektronentomographie durch gewichtete Rückprojektion. Die aufgenommenen Bilder werden gewichtet, entsprechend ihrem Projektionswinkel in ein Volumen rückprojiziert und superponiert (Abbildung 2.15). Die Gleichung (28) kann umgeformt werden zu

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty P_\alpha(R) e^{2\pi i R \bar{x}} R dR d\alpha. \quad (30)$$

Das Objekt wird für alle modifizierten Projektionen  $\overline{P}_\alpha$  rekonstruiert, wobei  $\overline{P}_\alpha$  durch eine frequenzabhängige Gewichtung im Fourier-Raum aus  $P_\alpha$  berechnet wird:

$$\overline{P}_\alpha(\bar{x}) = \int_{-\infty}^{\infty} P_\alpha(R) |R| e^{2\pi i R \bar{x}} dR.$$

Das rekonstruierte Objekt erhält man dann aus

$$f(x, y) = \int_0^\pi \overline{P}_\alpha(x \cos \alpha + z \sin \alpha) d\alpha. \quad (31)$$

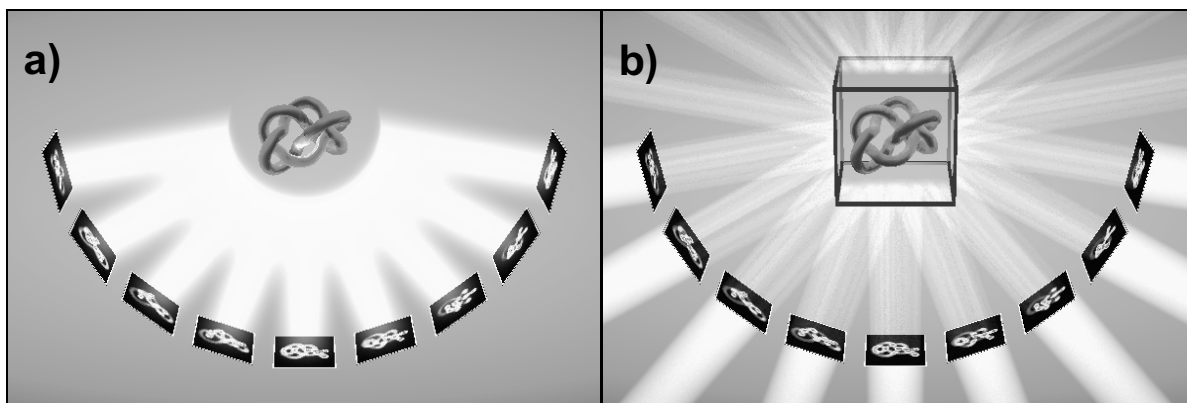


Abbildung 2.15 Schematische Darstellung der tomographischen Datenaufzeichnung und Rekonstruktion: Von einem 3D-Objekt wird eine möglichst hohe Anzahl von 2D-Projektionen aus unterschiedlichen Richtungen aufgenommen (a). Die einzelnen Projektionen werden gewichtet und in ein gemeinsames

## 2. Hintergrund

**Volumen rückprojiziert (b). Das ursprüngliche Objekt lässt sich somit theoretisch vollständig rekonstruieren (Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von J. Walz).**

Die Datenaufzeichnung, d.h. die Gewinnung der Projektionen kann auf zwei Arten erfolgen:

- (i) Das zu untersuchende Objekt liegt in einer Vielzahl von identischen, jedoch zufällig orientierten Kopien vor (z.B. Proteinkomplexe). In diesem Fall kann man die räumliche Struktur aus einer großen Anzahl zweidimensionaler Aufnahmen der unterschiedlich orientierten Partikel gewinnen. Man muss dann ihre Orientierung - das heißt die Eulerwinkel des Objektes - aus den Aufnahmen bestimmen (z. B. durch projection matching, common lines, siehe [Frank 1996; van Heel 1987]). Man spricht hierbei von quasi-tomographischen Verfahren.
- (ii) Handelt es sich bei den Objekten um Unikate (z.B. Zellen, Organellen, Phantomzellen), so muss man Tomographie im engeren Sinne anwenden. Die einzelnen Projektionen aus verschiedenen Richtungen können dann entweder durch Veränderung der Strahlrichtung (z.B. Computertomographie, [Cormack 1980]) oder durch Kippung des Objektes im Abbildungsgerät (Elektronentomographie, Röntgentomographie) gesammelt werden. Man spricht hierbei von sogenannten Kippserien [Hoppe et al., 1974].

### 2.6.2. Das ‚missing wedge‘ Problem

Die Rekonstruktion der Objekt-Struktur kann in beiden Fällen durch Rückprojektion der aufgenommenen Projektionen unter den entsprechenden Aufnahmewinkeln erfolgen. Es sei jedoch angemerkt, dass es bei der Aufzeichnung von Kippserien mit dem Elektronenmikroskop nicht möglich ist, über den gesamten Winkelbereich von  $-90^\circ$  nach  $+90^\circ$  zu kippen. Der Objekthalter schattet bei hohen Kippwinkeln ( $\vartheta > 70^\circ$ ) das Präparat ab, eine Aufnahme ist folglich nicht möglich. Die fehlenden Projektionen bilden im Fourier-Raum einen Doppelkeil, der nicht mit Objektinformation gefüllt werden kann (‚missing wedge‘). Der fehlende Bereich nimmt in einer Kugel im Fourier-Raum mit Radius  $r_0^*$  einen Bereich der Größe

$$V = \frac{8}{3} r_0^{*3} \left( \frac{\pi}{2} - \vartheta_{\max} \right) \quad (32)$$

ein. Daraus resultierend kann die Objektstruktur nicht komplett rekonstruiert werden, im Realraum ist eine ‚Verschmierung‘ der Strukturinformation in z-Richtung festzustellen (Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17).

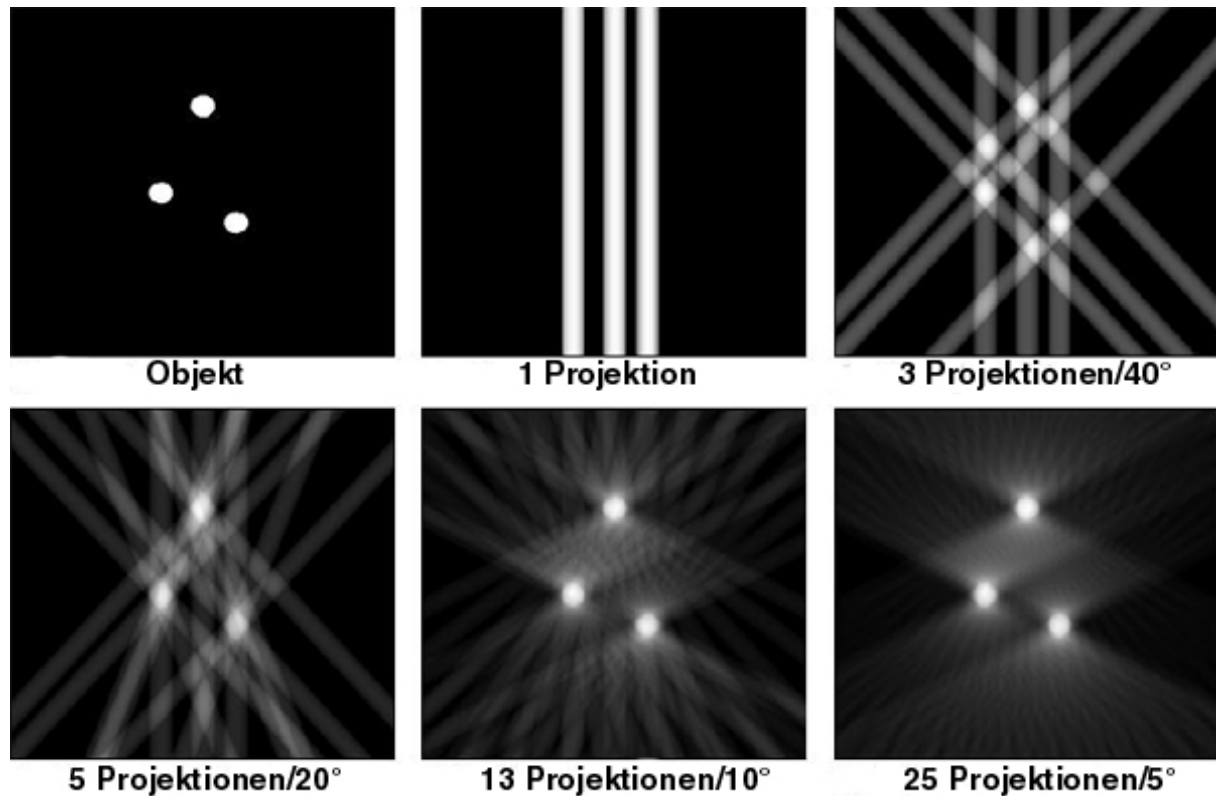


Abbildung 2.16 Schematische Darstellung der Rekonstruktion durch Rückprojektion und des ‚missing wedges‘. Die Abbildung links oben zeigt das ursprüngliche Objekt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Superposition von Projektionen unter dem entsprechenden Rückprojektionswinkel. Durch Addition möglichst vieler Projektionen kann das ursprüngliche Objekt fast perfekt rekonstruiert werden.

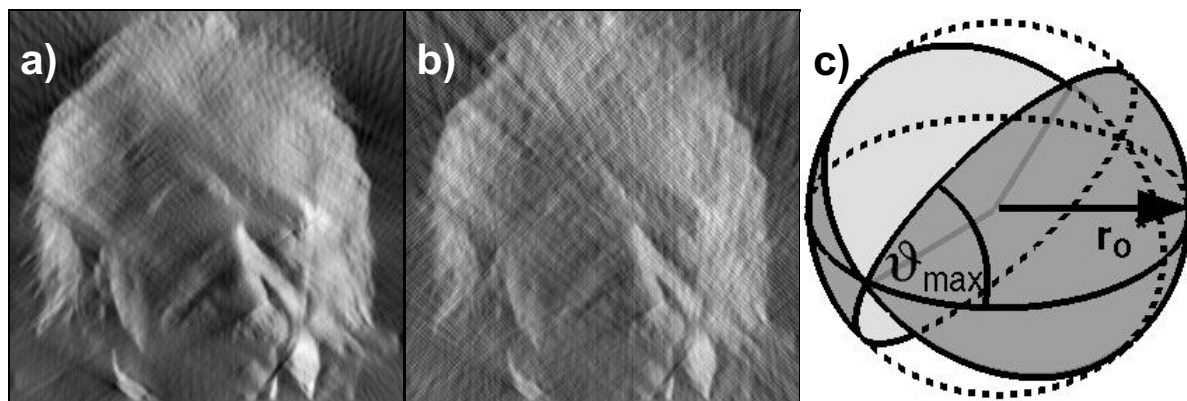


Abbildung 2.17 In der Elektronentomographie ist es nicht möglich, das Präparat von  $-90^\circ$  bis  $90^\circ$  zu kippen, da der Präparathalter das Objekt abschattet. (a) wurde von  $-60^\circ$  -  $60^\circ$  gekippt mit  $2^\circ$ , (b) mit  $5^\circ$  Inkrement. Der Fourierraum kann nicht komplett mit Objektinformation gefüllt werden, ein Doppelkeil bleibt unbesetzt (c). Bilddetails in der Rekonstruktion sind folglich in z-Richtung verschmiert. Dies ist besonders deutlich an den Falten auf der Stirn und an der Augenpartie zu erkennen (vgl. Abbildung 2.14 ohne ‚missing wedge‘).

Der fehlende Doppelkeil kann durch die Verwendung eines Rotations-Kipphalters zu einer Doppelpyramide reduziert werden. Die Idee bei diesem Haltertyp ist es, zwei Ein-Achsen-Kippserien aufzunehmen. Nach der Aufnahme der ersten Serie ist es durch eine mechanische Drehvorrichtung am Halter möglich, das Präparat im Mikroskop um  $90^\circ$  zu rotieren. Nun kann eine zweite Kippserie aufgenommen werden. Für Kryo-Präparate ist solch ein Dreh-Kipphalter jedoch kommerziell nicht erhältlich, was zu der Eigenentwicklung eines solchen

Halters in Zusammenarbeit mit der Firma Gatan führte. Die Ergebnisse der Vorabtests dieses Halters sind jedoch noch nicht abgeschlossen und werden hier nicht präsentiert.

### 2.6.3. Automatisierte Elektronentomographie

Um individuelle, d.h. jeweils nur einmal vorhandene biologische Objekte, wie etwa Zellen, Phantomzellen oder Viren tomographisch zu erfassen, werden Einachsen-Kippserien aufgezeichnet. Hierbei wird das Präparat im Mikroskop um eine zum Strahl senkrecht stehende Achse gekippt und für jeden Kippwinkel eine Aufnahme aufgezeichnet. Die Kippung erfolgt mechanisch mit Hilfe eines Goniometers, des sogenannten ‚Compustage‘ bei Philips CM-Geräten. Ohne weiteren mechanischen Aufwand ist es nicht möglich, ein Auswandern des Präparats um etwa 1 - 2  $\mu\text{m}$  beim Kippen zu verhindern. Zusätzlich zu einer lateralen Auswanderung ist eine Änderung des Fokus sowie eine ‚Drift‘ auf Grund thermischer Effekte zu beobachten. Diese Effekte müssen bei jedem Kippwinkelschritt korrigiert werden. Eine manuelle Korrektur ist hierbei nicht möglich, da eiseingebettete biologische Präparate extrem strahlempfindlich sind, und die Strahlenbelastung, welche für die Korrekturen benötigt wird, zu einer Zerstörung der biologischen Struktur führt. Mit der Einführung von computergesteuerten Mikroskopen und CCD-Kameras ist man Anfang der 90er Jahre dazu übergegangen, Prozeduren zur automatischen Aufnahme von Kippserien zu entwickeln [Dierksen et al., 1993; Dierksen et al., 1992; Koster et al., 1992]. Die laterale Auswanderung der Probe wird mit Hilfe der Kreuzkorrelation von Bildern aufeinanderfolgender Kippwinkel bestimmt. Die Korrektur wird durch die Strahl- und Bildablenkspulen (Beam und Image Shift) des Mikroskops durchgeführt. Die Messung der Fokusänderung basiert auf der sogenannten Strahlkippmethode: Wird ein defokussiertes Präparat mit gekipptem Strahl aufgenommen, ist eine laterale Verschiebung des Bildes der Probe zu verzeichnen. Durch Messung der Verschiebung mittels Kreuzkorrelation kann nach vorangegangener Kalibrierung der Defokus quantifiziert und korrigiert werden [Koster und de Ruijter 1992]. Die Korrektur der Auswanderungen erfolgt iterativ, wobei sogenannte ‚States‘ mit festgelegten Aufnahmebedingungen (Belichtungszeit, Binning, Defokus, Vergrößerung und Aufnahmeestelle) definiert werden können. Der Ablauf einer automatischen tomographischen Serie ist im Flussdiagramm Abbildung 2.18 dargestellt. Neben den bereits beschriebenen Prozeduren zur automatischen Datenerfassung [Dierksen et al., 1993; Dierksen et al., 1992; Grimm et al., 1997] wurde noch eine Prozedur zur Vorkorrektur des Fokus und der lateralen Auswanderung implementiert. Der Hintergrund ist hierbei, dass die zwei wichtigsten Ursachen für die Auswanderung – die nicht optimale Einstellung der euzentrischen Höhe sowie eine thermische Drift des Halters – nicht zufällig, sondern über große Kippbereiche nahezu konstant sind, insbesondere dann, wenn man bei relativ dicken Objekten mit kleinen Winkelinkrementen arbeiten muss. Die Korrekturwerte des vorhergehenden Zyklus können dann direkt auf den aktuellen Zyklus (also ohne erneute Messung) angewandt werden. Durch die Verwendung dieser Prozedur ist es möglich,

zusätzlich Dosis und Zeit für Korrekturschritte zu sparen, indem z.B. die Fokussierung nur bei jedem zweiten Zyklus durchgeführt wird. Die tatsächliche Einsparung hängt von der Voreinstellung des Mikroskops und/oder des Halters ab und ist somit nicht zu quantifizieren.

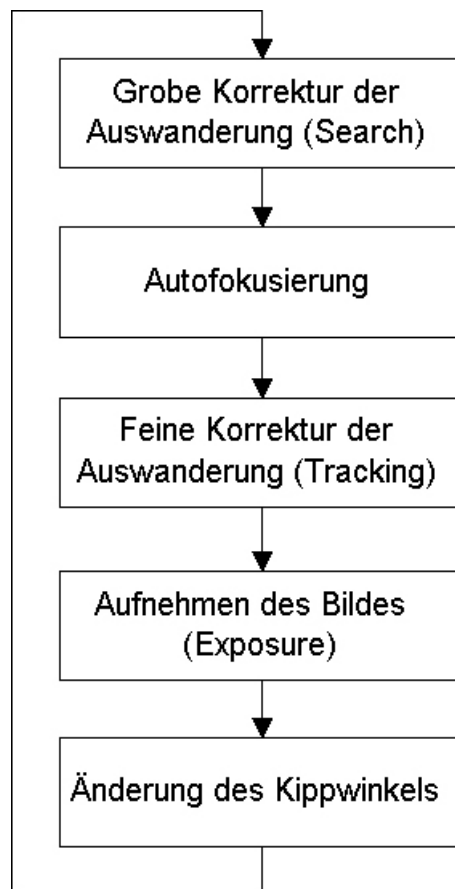


Abbildung 2.18 Flussdiagramm zur Automatisierung der Elektronentomographie.

## 2.7. Automatische Identifikation von Makromolekülen in Elektronentomogrammen

Ein wesentliches Ziel der Elektronentomographie von eiseingebetteten Zellen ist die eindeutige Detektierung und Identifikation von Makromolekülen in ihrer gefroren-nativen zellulären Umgebung [Baumeister et al., 1999]. Die zellulären Rekonstruktionen weisen jedoch auf Grund der großen Strahlempfindlichkeit der biologischen Strukturen ein sehr niedriges SRV auf. Wohingegen eine interaktive Detektierung der Proteinkomplexe in Zellvolumina am Bildschirm trotz großem Zeitaufwand noch grundsätzlich möglich wäre, ist eine eindeutige Identifizierung unter den gegebenen Umständen nur mit Hilfe von automatischen Objekterkennungsalgorithmen möglich.

### 2.7.1. Die Kreuzkorrelation

Die Objekterkennung ist in dem vorliegendem Fall insofern vereinfacht, als dass die 3D-Struktur einer Vielzahl von zellulären Proteinkomplexen bereits durch hochauflösende

## 2. Hintergrund

Techniken, wie z.B. Röntgenkristallographie, molekulare NMR-Spektroskopie oder elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse bestimmt worden ist. Zur Identifikation bieten sich folglich vergleichende Algorithmen an, die jeden Ort des unbekanntes Volumens mit einer strukturell gut definierten Vorlage vergleichen („template matching“). Hierzu werden die beiden Volumina ‚übereinander geschoben‘ und der Grauwert jedes Pixels von Volumen 1 mit dem Grauwert des entsprechenden Pixels von Volumen 2 multipliziert. Die Summe der Produkte bildet den Korrelationswert der beiden Volumina an dem der relativen Verschiebung der Volumina entsprechenden Pixel. Mathematisch lässt sich die Korrelationsfunktion  $c(i,j)$  von zwei 2D-Funktionen  $f(x,y)$  und  $g(x,y)$  wie folgt beschreiben:

$$c(i,j) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x+i, y+j)g(x,y)dx dy \quad (33)$$

Da es sich bei den Elektronentomogrammen um diskrete Funktionen mit einer endlichen Anzahl von Werten handelt lässt sich die normalisierte Korrelation umformen zu:

$$c(x,y) = \frac{\sum_i \sum_j f_{x+i,y+j} \cdot g_{i,j}}{\sqrt{\sum_i \sum_j f_{x+i,y+j}^2 \cdot \sum_i \sum_j g_{i,j}^2}} \quad (34)$$

Für große Bilder/Volumina ist diese Operation relativ ineffizient, die äquivalente Operation kann jedoch auch durch eine wesentlich schnellere Multiplikation im Fourier-Raum ausgedrückt werden:

$$C(u,v) = F(u,v)G^*(u,v), \quad * \text{ bedeutet konjugiert-komplex.} \quad (35)$$

Zur Berechnung der Kreuzkorrelation sind also drei Fourier-Transformationen, sowie eine Multiplikation im Fourier-Raum nötig. Die Rechenzeit  $t$  für eine Fourier-Transformation ist hierbei proportional zu  $t^n(n \log l)$ , wobei  $l$  die Größe und  $n$  die Dimension des Bildes/Volumens angibt.

Die Kreuzkorrelation in Gleichung 34 ist zwischen  $-1$  und  $1$  normiert, wobei die  $1$  für zwei identische Bilder/Volumina, die  $-1$  dann auftritt, wenn eines der identischen Bilder/Volumina invertiert wurde. Die Koordinaten des Maximums der Korrelationsfunktion entsprechen dem Verschiebungsvektor der beiden Bilder/Volumina. Der Korrelationswert ist ein Maß für die Ähnlichkeit, die Position des Korrelationsmaximums gibt die relative Verschiebung der Bilder/Volumina an. Weiterhin ist die Korrelation relativ unempfindlich gegenüber starkem Rauschen, weshalb sie bevorzugt in der elektronenmikroskopischen Bildverarbeitung eingesetzt wird. Die Korrelation ist somit die Technik der Wahl, um ein bekanntes Objekt in einem Bild/Volumen zu detektieren und zu identifizieren.

Neben den drei Translationsfreiheitsgraden, die durch die Kreuzkorrelation abgedeckt werden, müssen die drei Rotationsfreiheitsgrade der Molekülkomplexe bestimmt werden. Anders als bei der Einzelpartikelanalyse, bei der in den meisten Fällen eine statistisch abhängige Verteilung der Orientierung der Moleküle vorliegt, ist innerhalb des zellulären Volumens mit einer zufälligen Verteilung der Rotationskoordinaten zu rechnen. Der durch die

Euler-Winkel aufgespannte 3D-Raum muss folglich mit hinreichend feinen Schritten komplett abgetastet werden. Die Abtastung kann lediglich eingeschränkt werden, wenn das zu suchende Moleküle eine Symmetrie aufweist. Zur Bestimmung der Rotationskoordinaten wird die Referenz zu jeder möglichen Kombination der drei Euler-Winkel gedreht und die Korrelationsfunktion aus gedrehter Referenz und Suchvolumen wird berechnet. Die 6-dimensionale Suche nach der richtigen Position und der richtigen Orientierung der Moleküle ist rechnerisch äußerst aufwendig, so dass im folgenden auf die Wahl der optimalen Suchparameter eingegangen wird.

Es bieten sich zwei grundsätzliche Suchstrategien an, deren Ergebnis mathematisch identisch ist:

- i) Zum einen kann das Referenzpartikel in ein Volumen eingepasst werden, das die gleiche Größe hat wie das Partikel selbst. Dieses Suchvolumen kann nun Pixel für Pixel durch das zu untersuchende Volumen geschoben werden und die Suche nach der Orientierung zwischen Referenzpartikel und Volumen kann an jeder Stelle durchgeführt werden. Der für jedes Voxel berechnete Korrelationskoeffizient wird an die entsprechende Stelle in ein Korrelationsvolumen eingetragen. Es werden also sehr viele Korrelationsrechnungen mit kleinen Volumina durchgeführt.
- ii) Im zweiten Grenzfall passt man das Referenzpartikel in ein Volumen ein, das genauso groß ist wie das zu untersuchende Volumen. In diesem Fall muss die Suche nach den richtigen Orientierungskoordinaten, d.h. den Eulerwinkeln, nur einmal durchgeführt werden, dafür müssen die Berechnungen der Korrelationsfunktionen mit großen Volumina durchgeführt werden (Abbildung 2.19).



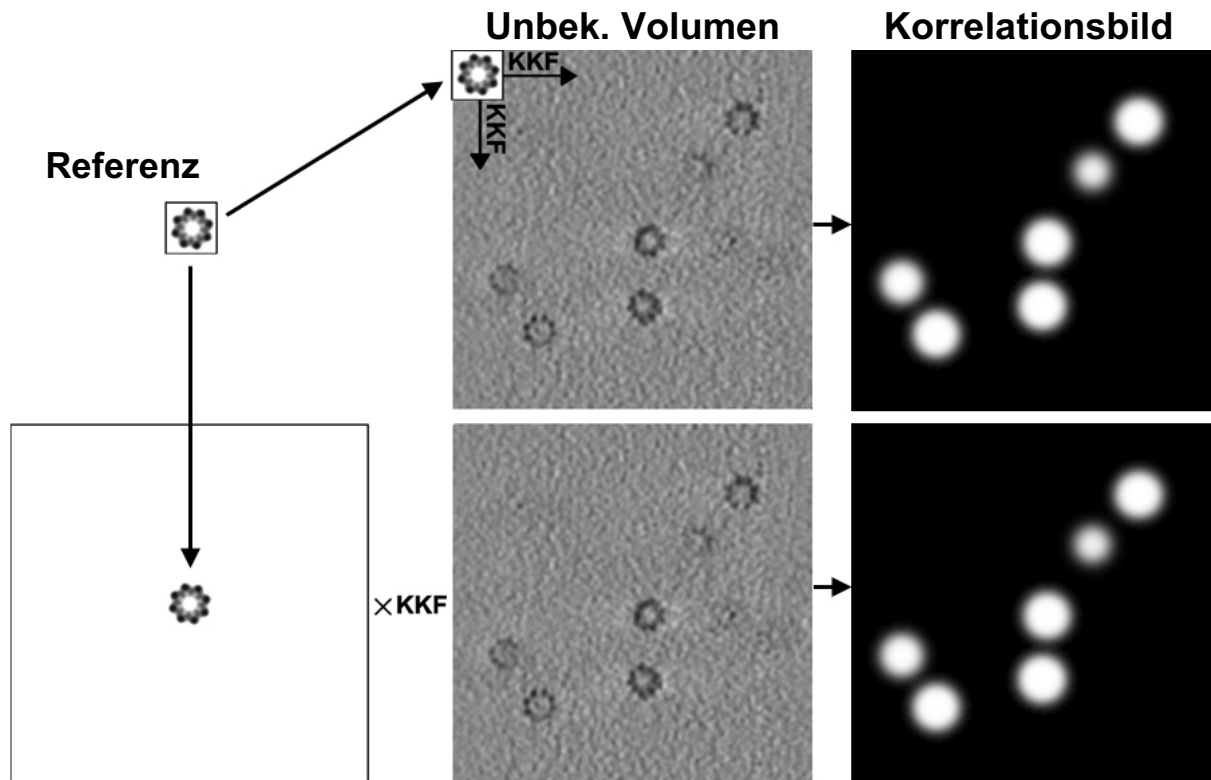
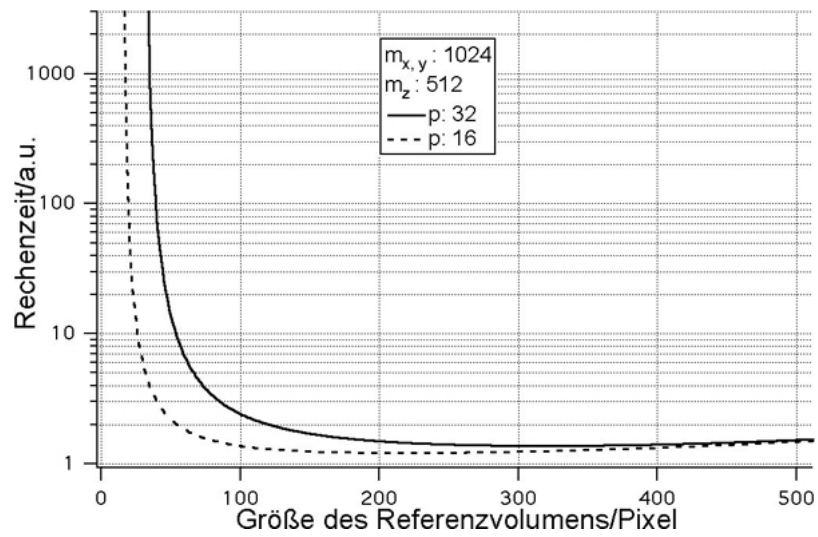


Abbildung 2.19 Schemata der zwei Suchstrategien. Oben: die Korrelation zwischen Referenz und zu untersuchendem Volumen wird an jeder Stelle des Volumens berechnet. Die Korrelationswerte werden an der entsprechenden Position in ein Korrelationsvolumen eingetragen. Unten: Alternativ kann die Referenz in ein großes Volumen eingepasst werden. Die Berechnung der Korrelationsfunktion muss nur einmal durchgeführt werden und die Maxima der Korrelationsfunktion geben direkt die Position der Partikel wieder.

Neben den beiden beschriebenen Extremfällen gibt es natürlich auch Zwischenlösungen, d.h. die Referenz mit der Größe  $p$  wird in ein Volumen  $l$  eingepasst, das größer als die Referenz, aber kleiner als das zu untersuchende Volumen ist (das Volumen habe in  $x$  und  $y$  die Größe  $m_{x,y}$ , in  $z$  die Größe  $m_z$ ). Die Anzahl der unabhängigen Eulerwinkel sei  $w$  und die Dimension  $n = 3$ . Die Rechenzeit  $t$  ist dann proportional zu:

$$t \sim \left[ \left( \frac{m_{x,y} - p}{l - p} \right)^2 \left( \frac{m_z - p}{l - p} \right) (1 + w) + w \right] nl^n \ln l \quad (36)$$

Für typische Werte für  $m_{x,y}$ ,  $m_z$  und  $w$  ergibt sich, dass das Referenzvolumen in etwa halb so groß gewählt werden sollte wie das zu untersuchende Volumen (Abbildung 2.20).  $l$  sollte nur kleiner gewählt werden, wenn der Hauptspeicher des verwendeten Rechners ein limitierender Faktor ist.



**Abbildung 2.20** Rechenzeit der Partikelidentifikation: Das Referenzvolumen sollte ca. halb so groß wie das zu untersuchende Volumen sein.

## **Kapitel 3**

### **3. Anwendung der energiegefilterten Elektronentomographie auf ein T5-Phagen-Vesikel Modellsystem**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die tomographische Datenerfassung für eiseingebettete zelluläre Präparate soweit zu verbessern, dass eine Identifikation von makromolekularen Komplexen innerhalb dünner Zellen möglich wird. Bei dieser Art von zellulären Proben ist die Dicke größer als die mittlere freie Weglänge der Elektronen in Eis. Die Mehrzahl der Elektronen wird inelastisch und/oder mehrfach gestreut und trägt durch die chromatische Aberration der elektromagnetischen Linsen vorwiegend zum niederfrequenten Untergrundrauschen bei. Mögliche Abhilfe verspricht neben der Filterung der inelastisch gestreuten Elektronen die Erhöhung der Beschleunigungsspannung, sowie die Verwendung einer Feldemissions-Kathode [Koster et al., 1997]. Zu Beginn dieser Arbeit wurde zusätzlich zu dem schon vorhandenen CM 120 Biofilter [Grimm et al., 1996] ein CM 300 FEG installiert. An dieses Gerät wurde ein Gatan Post-Column Energiefilter GIF 2002 angebaut, eine Weiterentwicklung des am CM 120 Biofilter verwendeten GIF 100. Um die Verbesserung der Abbildungsverhältnisse für zelluläre Tomographie durch die neu installierte Instrumentierung quantifizieren zu können, wurde an beiden Geräten ein identisches Objekt tomographisch untersucht. Bei dem Präparat handelt es sich um ein biologisches Modellsystem zum Studium der Injektion von viraler DNS in Wirtszellen. Neben der Analyse der Abbildungsbedingungen konnten durch die verbesserte Instrumentierung neue biologische Erkenntnisse gewonnen werden [Böhm et al., 2001], die im folgenden ebenfalls beschrieben werden.

#### **3.1. Das biologische Modellsystem**

Der Transfer von viraler DNS in bakterielle Wirtszellen durch sogenannte Phagen ist ein nach wie vor nicht vollständig verstandener Prozess. Das bisher gesammelte Wissen basiert auf Untersuchungen der Phagen T4, T5 und Lambda [Dreiseikermann 1994; Letellier und Boulanger 1989; Letellier et al., 1999]. Der Eintritt der DNS in die Wirtszelle erfolgt dabei in drei Schritten: Zuerst bindet der Phage reversibel an die Zelloberfläche, dann erfolgt die spezifische, irreversible Bindung an ein Protein der äußeren Zellmembran. Nach der Bindung

an den Rezeptor wird die DNS aus dem Virenkopf durch die äußere und innere Membran in die Wirtszelle injiziert. Für die Freisetzung der DNS sind bei manchen Phagen noch zusätzliche Membrankomponenten und/oder zusätzliche Energiequellen nötig [Hancock und Braun 1976], nicht jedoch bei T5 Phagen (Abbildung 3.1). Die Bindung des Phagen an den Rezeptor reicht aus, um die DNS freizusetzen [Boulanger et al., 1996; McCorquodale und Warner 1975]. Im Fall von T5 ist FhuA das Rezeptorprotein. FhuA ist ein Katalysator für den Im- und Export von Ferrichrom in der äußeren Membran von *Escherichia coli*. Die vor kurzem gelöste Röntgenstruktur von FhuA zeigt, dass es sich um einen hohlen Zylinder mit 2.5 nm Innendurchmesser handelt, der aus 22 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht [Ferguson et al., 1998; Locher et al., 1998]. Der Kanal ist durch eine hydrophile Domäne auf der periplasmatischen Seite verschlossen. Die Kenntnis der atomaren 3D-Struktur hat wesentlich zum Verständnis des Ferrichrom-Transports in *Escherichia coli* beigetragen; die Wechselwirkungsmechanismen zwischen FhuA und T5, sowie der DNS-Transport durch die Zellmembran ist jedoch nach wie vor umstritten. Das einfachste Modell geht davon aus, dass der Schwanz von T5 an FhuA bindet und die DNS-Doppelhelix durch den 2.5 nm weiten FhuA Kanal diffundiert. Alternativ ist ein Transport der DNS durch die Spitze des Schwanzes (bestehend aus dem Protein pb2) denkbar. Pb2 würde hierbei entweder direkt durch die Membran in den Wirt eindringen (und somit FhuA nur als Bindestelle nutzen), oder den FhuA Kanal nutzen. Dies würde jedoch eine komplette Öffnung des Kanals und eine große strukturelle Konformationsänderung bedeuten.

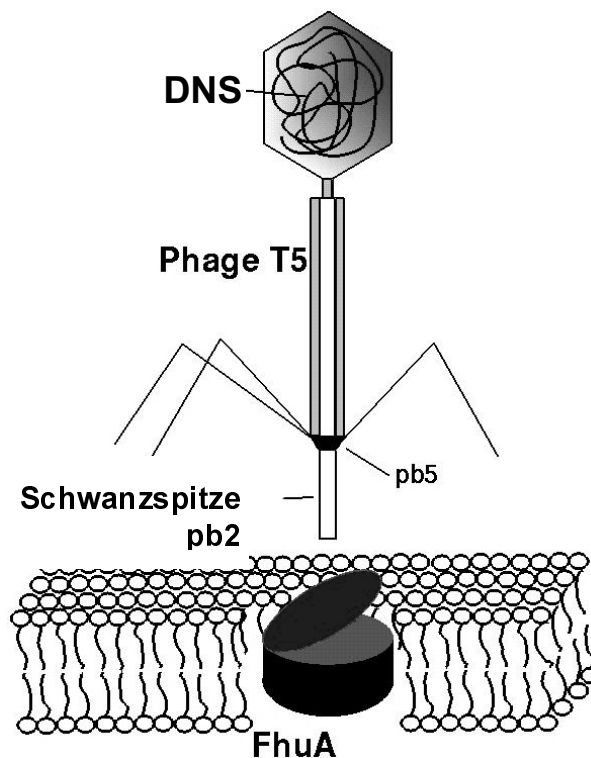


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des T5-FhuA Modellsystems: T5 besteht aus einem ikosaedrischen Kopf ( $\varnothing$  80 nm), der die DNS enthält. Die DNS wird durch einen 180 nm langen Schwanz in den Wirt injiziert. Am unteren Ende des Schwanzes befindet sich das Protein pb5, dass spezifisch an

### 3. T5-Proteoliposomen-Modellsystem

das Membranmolekül FhuA bindet, und die Spitze des Schwanzes, die aus dem Protein pb2 zusammengesetzt ist.

2D kryo-elektronenmikroskopische Experimente der Gruppe von Prof. Rigaud haben bereits die Bindung von T5 Phagen an FhuA-Proteinliposome und die Injektion der viralen DNS in das Vesikel demonstriert [Lambert et al., 2000; Lambert et al., 1998; Plançon et al., 1997]. Die konventionell aufgenommenen 2D-Projektionen des 3D-Objektes erlauben jedoch keine strukturelle Charakterisierung der Wechselwirkungen der Phagen und der Proteinliposome, da die 3D-Objektinformation entlang der Strahlachse aufintegriert wird. Die Anwendung der Kryo-Elektronentomographie versprach daher – neben dem Vergleich des 120-kV- und des 300-kV-Mikroskops – neue strukturelle Erkenntnisse zur viralen Infektion.

#### 3.2. Präparation

Die biochemische Präparation des Phagen-Vesikel-Modellsystems wurde zum größten Teil durch Olivier Lambert aus der Gruppe von Prof. Rigaud vom Institut Curie, Paris durchgeführt. Es soll hier nur kurz auf die wesentlichen Schritte eingegangen werden.

FhuA wurde genetisch mit einem His-Tag versehen, in *Escherichia coli* überexprimiert und in 0.05% LDAO gelöst [Moeck et al., 1996]. Das gereinigte Protein wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einem 20 mM Hepes, pH 7.2, 150 mM NaCl, 33 mM OG Puffer gelagert. Die unilaminaren Phosphatidylcholin-Vesikel wurden durch umgekehrte Phasenseparation präpariert [Plançon et al., 1997]. Die Herstellung der Protein-Vesikel beruht auf einer Entfernung des Lösungsmittels durch Styroporkügelchen [Lambert et al., 1998]: Hierzu wurden die Vesikel (330  $\mu\text{l}$ , 5 mM) mit OG inkubiert und nach 30 Minuten mit 35  $\mu\text{g}$  FhuA gemischt. Die Konzentration des Lösungsmittels wurde auf 45 mM eingestellt. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Lösungsmittel mit SM2 Bio-Beads 18 (80 mg/ml) adsorbiert. Die Lösung wurde über Nacht geschüttelt und sorgfältig dekantiert. Die T5-Phagen ( $10^{11}$ ) wurden den Protein-Vesikeln beigefügt (T5/FhuA  $\approx$  1:100) und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Bei allen Experimenten wurde 1  $\mu\text{g}$  DNase und 5 mM  $\text{MgSO}_4$  beigefügt um die in den Puffer injizierte DNS abzubauen. Um nach erfolgter Aufzeichnung der Kippserien die Alignierung der einzelnen Projektionen zu ermöglichen, wurden 5  $\mu\text{l}$  einer 1:1 Mischung von 5 und 10 nm großen Goldkugeln auf ein Quantifoil oder ein Lacey-Carbon Mikroskopgrid aufgebracht. Nach dem Eintrocknen der Goldlösung wurden 5  $\mu\text{l}$  der T5-Protein-Vesikel Lösung auf die Lochfilme aufgebracht, die überstehende Lösung wurde mit Filterpapier aufgesaugt und das Grid wurde in flüssiges Ethan eingeschossen (vgl. 2.1).

#### 3.3. Aufnahme und Rekonstruktion der Kippserien

Insgesamt wurden 16 Kippserien des T5-FhuA-Systems aufgenommen, davon sieben am CM 120 Biofilter bei einem nominellen Unterfokus von 3  $\mu\text{m}$  und neun am CM 300 FEG bei 4.5  $\mu\text{m}$  Unterfokus. Der Kippwinkelbereich deckte dabei typischerweise  $140^{\circ}$  ab; er wurde mit

jeweils  $1.5^\circ$  Kippwinkelinkrement abgetastet. Die das Mikroskop steuernde Tomographiesoftware war an beiden Geräten identisch. Um die größere effektive Dicke des Präparats bei hohen Kippwinkel zu kompensieren, wurde die Belichtungszeit  $t$  als Funktion des Kippwinkels  $\alpha$  variiert:  $t(\alpha) = t_0 / \cos \alpha$ . Die auf das Präparat umgerechnete Pixelgröße betrug 1 nm für die am CM 120 Biofilter aufgenommenen Serien und 0.72 nm für das CM 300 FEG. Strahlenschäden waren nach Ende der Bilderserien nicht offensichtlich.

Nach dem Transfer der Kippserien vom Steuerrechner auf SGI-Workstations wurden die Projektionen durch manuelle Lokalisierung der Goldmarker auf einen gemeinsamen Koordinatenursprung aligniert, gewichtet und rückprojiziert. Hierbei wurden die von Reiner Hegerl geschriebenen Prozeduren „marker\_alignment.emp“ und „marker\_rec3D.inp“ des EM-Programmpakets verwendet [Hegerl 1996]. Um eine Iso-Oberflächendarstellung zu ermöglichen, wurden die rekonstruierten Volumina teilweise segmentiert und das Rauschen durch einen nicht-linearen Diffusionsalgorithmus reduziert [Frangakis und Hegerl 1999].

Die 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass praktisch alle T5-Phagen über den Virenschwanz an die Vesikeloberflächen gebunden sind. Dabei erscheinen manche Phagenköpfe dicht gepackt, andere sind komplett leer. Die leeren Phagen waren jeweils mit gefüllten Vesikeln assoziiert. Der Transfer der DNS aus dem Virenkopf in das Vesikel war also in ca. der Hälfte der Fälle erfolgreich. Halbleere Virenköpfe waren nicht zu sehen, was für einen schnellen und kompletten Transfer der DNS spricht. Die Rekonstruktionen mit am CM 300 FEG aufgenommenen Daten erlauben weiterhin in einzelnen Fällen die Visualisierung der DNS im Vesikel. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.2 zu sehen. Diese Rekonstruktion zeigt zentral ein gefülltes Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 250 nm. An dieses Vesikel sind von der linken Seite drei Phagen gebunden (zwei leere und ein voller) und von der rechten Seite sind ebenfalls drei Phagen (ein leerer und zwei volle) gebunden. Die relativ flexiblen Schwänze dieser Phagen sind über den Kohlesteg gebogen (Abbildung 3.3). Die im Vesikel sichtbare DNS stammt also von insgesamt drei Phagen und ist unregelmäßig und unstrukturiert angeordnet.

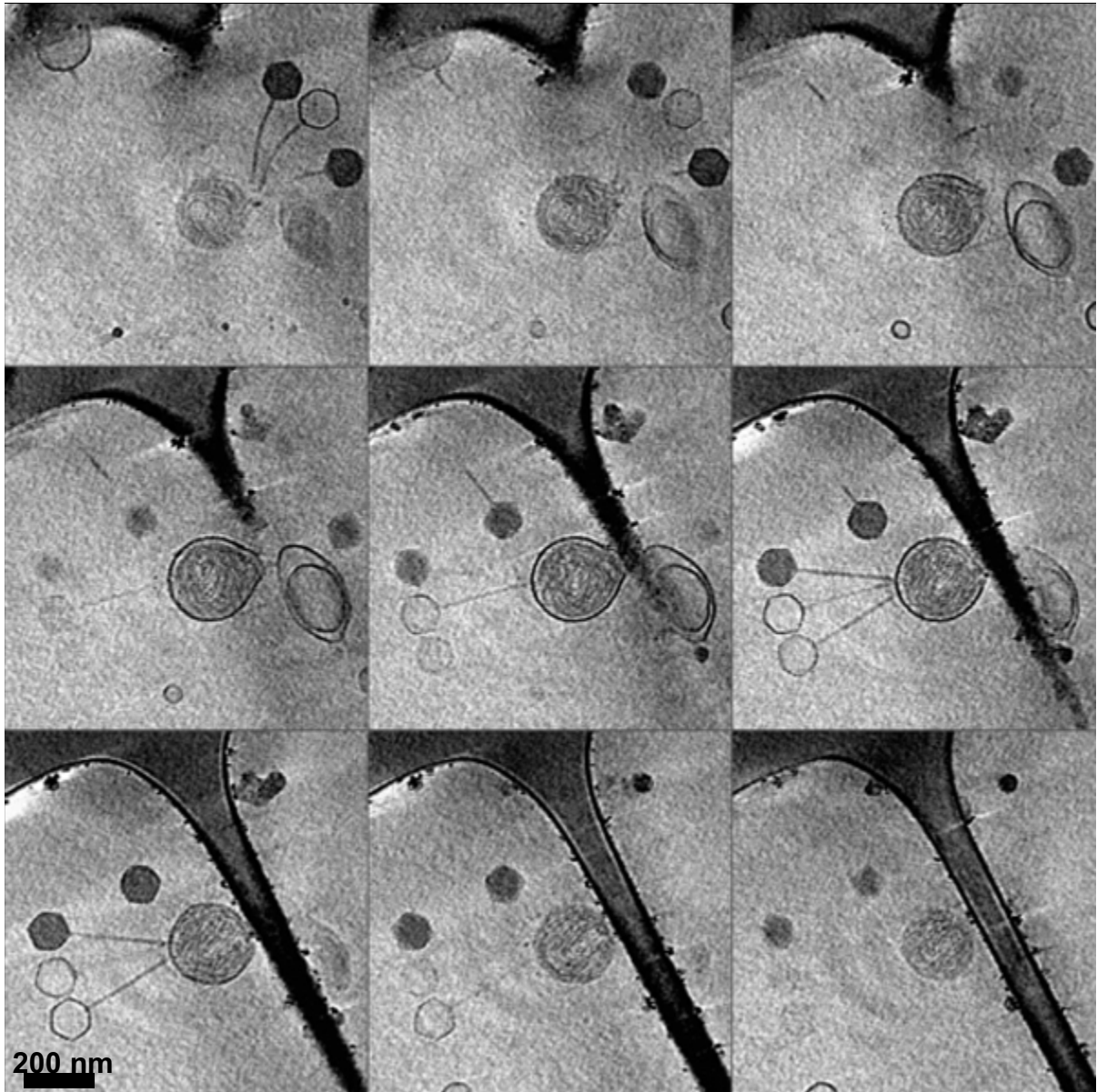
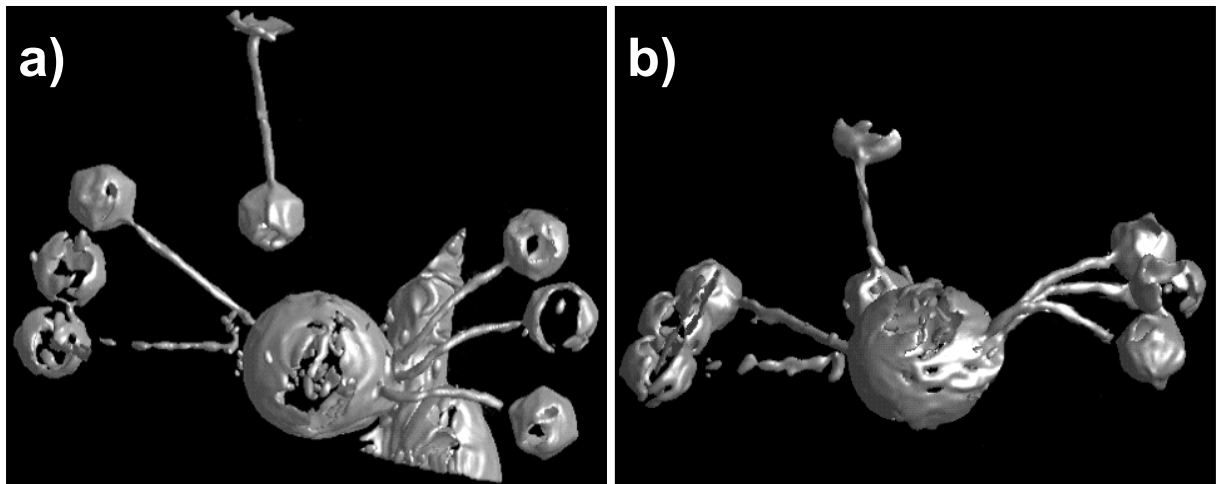
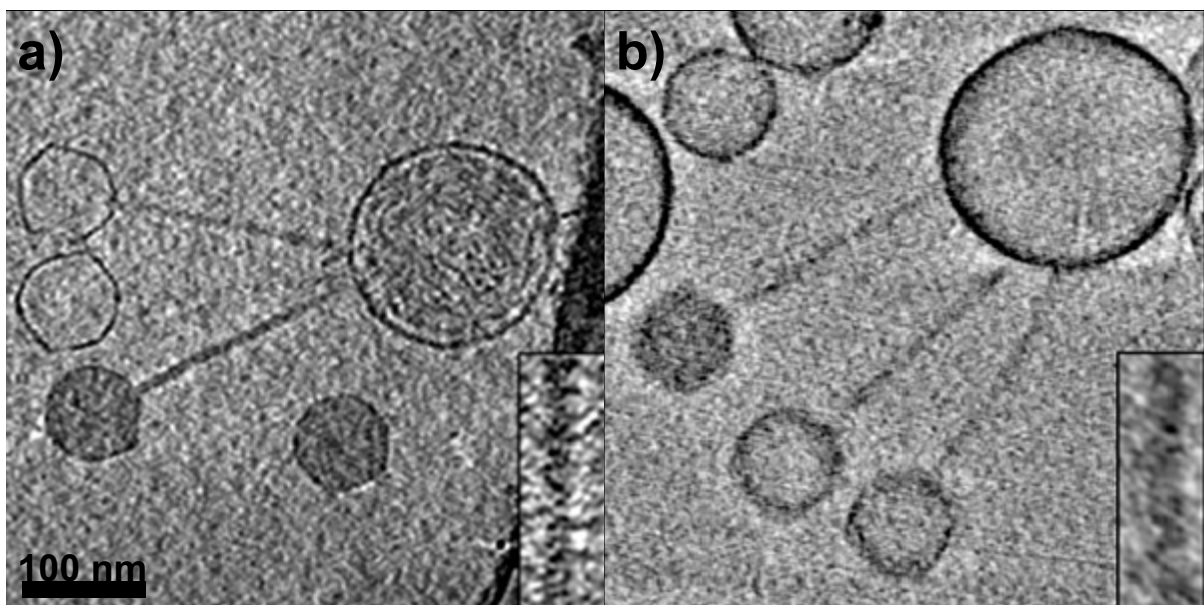


Abbildung 3.2 Eine Serie von x-y-Schnitten durch eine 3D-Rekonstruktion des T5-Proteoliposomen Systems: Zentral ist ein mit der viralen DNS gefülltes Vesikel zu sehen. An dieses Vesikel sind insgesamt sechs Phagen gebunden, von denen drei ihre DNS injiziert haben.



**Abbildung 3.3** Iso-Oberflächendarstellungen der gleichen Rekonstruktion wie in Abbildung 3.2. In (b) wurde der Kohlesteg segmentiert, um die Flexibilität der Virenschwänze zu verdeutlichen.

Der Vergleich der von den zwei unterschiedlichen Mikroskopen stammenden Rekonstruktionen zeigt subjektiv, dass jeder Aspekt der Bildqualität durch die Installation des CM 300 FEG mit Energiefilter verbessert werden konnte (Abbildung 3.4). Der Kontrast der Bilddetails ist erhöht, was z. B. an der Wand leerer Viren besonders deutlich wird.

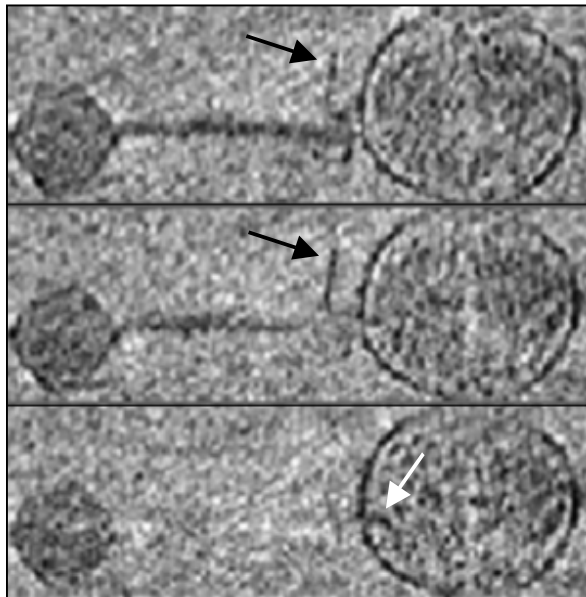


**Abbildung 3.4** Vergleich der Rekonstruktionen mit am CM 300 FEG (a) und am CM 120 Biofilter (b) aufgenommenen Daten. Beide Präparate zeigen jeweils drei an das gleiche Vesikel gebundene Viren. Die Bildeinsätze zeigen je einen Virenschwanz mit voller Auflösung. Dabei ist in (a) das hohle Innere des Schwanzes zu erkennen.

Weiterhin ist die Auflösung verbessert, was an zahlreichen Bilddetails zu erkennen ist. In Abbildung 3.4a ist der Virenschwanz als hohle Röhre zu erkennen. Die Wand der leeren Virenköpfe ist wesentlich besser definiert und als dünne Hülle zu erkennen. Die nur 2.3 nm dicke DNS kann im Vesikel abgebildet werden. Schnitte durch die Rekonstruktion senkrecht zur x-y-Ebene zeigen, dass sogar die nur 2 nm dicken antennenartigen Beine der Viren erkennbar sind (Abbildung 3.5). Die Schnitte senkrecht zur x-y-Achse zeigen außerdem, dass der durch den ‚missing wedge‘ schlecht definierte Bereich sehr klein ist. Das Vesikel ist oben



und unten fast geschlossen und die ‚Verschmierung‘ der Objektinformation in z-Richtung ist minimal. FhuA war trotz der verbesserten Abbildungsbedingungen nicht erkennbar.

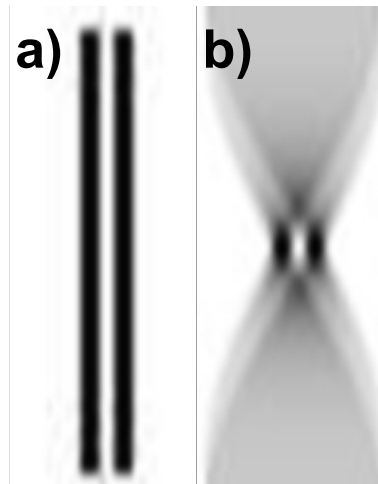


**Abbildung 3.5** Die Schnitte senkrecht zur x-y-Ebene zeigen die nur 2 nm dicken Beine der Viren (siehe schwarze Pfeile). Wichtiger jedoch in Bezug auf das Verständnis der DNS-Injektion ist die Visualisierung der Spitze des Virenschwanzes innerhalb des Vesikels (weißer Pfeil).

### 3.4. Auflösungsbestimmung

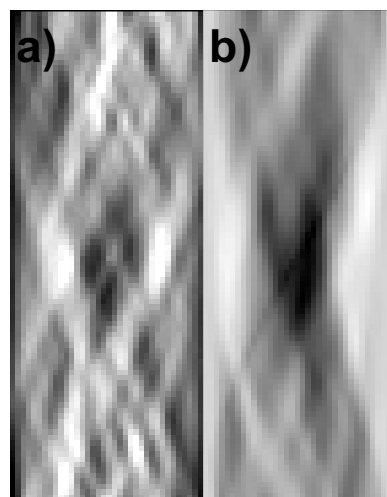
Zur quantitativen Bestimmung der Auflösungsverbesserung bietet sich die Transformation eines Realraumbildes in einen geeigneten komplementären Raum an. Das bekannteste Beispiel ist die Fourier-Transformation, bei der ein Realraumbild in den Frequenzraum transformiert wird. Die Fourier-Transformation ist also zur Hervorhebung von sinusförmigen Strukturen geeignet. Generell ist eine Bestimmung der Auflösung bei pleomorphen Strukturen jedoch nicht möglich. In dem vorliegenden System sind einige der Virenschwänze allerdings erstaunlich gerade, strukturell gut definierte hohle Zylinder. Die Abbildung dieser Virenschwänze wurden im Folgenden als Auflösungskriterium herangezogen: Die geeignete Operation um gerade Strukturen hervorzuheben ist die Transformation des Realraumbildes in ein Sinogramm [Russ 1995]. Dabei wird das Bild unter allen möglichen Winkeln  $\varphi$  projiziert. Das Bild wird entlang von Linien integriert, was bei geraden Strukturen zu einem maximalen Kontrast führt. Die Projektionen werden auf einem rechteckigem Gitter angeordnet, wobei die x-Koordinate die Projektionsdaten und die y-Koordinate die Winkelabtastung darstellt. Analog zur Fourier-Transformation, bei der ein Maximum einem Sinusgitter im Realraumbild entspricht, korrespondiert ein Maximum in einem Sinogramm einer geraden Linie im Realraumbild. Unter der Annahme dass es sich bei den aufgenommenen Virenschwänzen um Hohlzylinder handelt, ergibt die Projektion der Schwänze zwei parallele Linien, deren Sinogramm zwei horizontale kontrastreiche Punkte und zwei vertikale weniger kontrastreiche

Punkte zeigt (Abbildung 3.6). Die vertikalen Maxima ergeben sich dabei aus der Superposition der beiden Linien.



**Abbildung 3.6** Das Sinogramm zweier paralleler Linien (a) ergibt vier Punkte, die als Parallelogramm angeordnet sind (b)

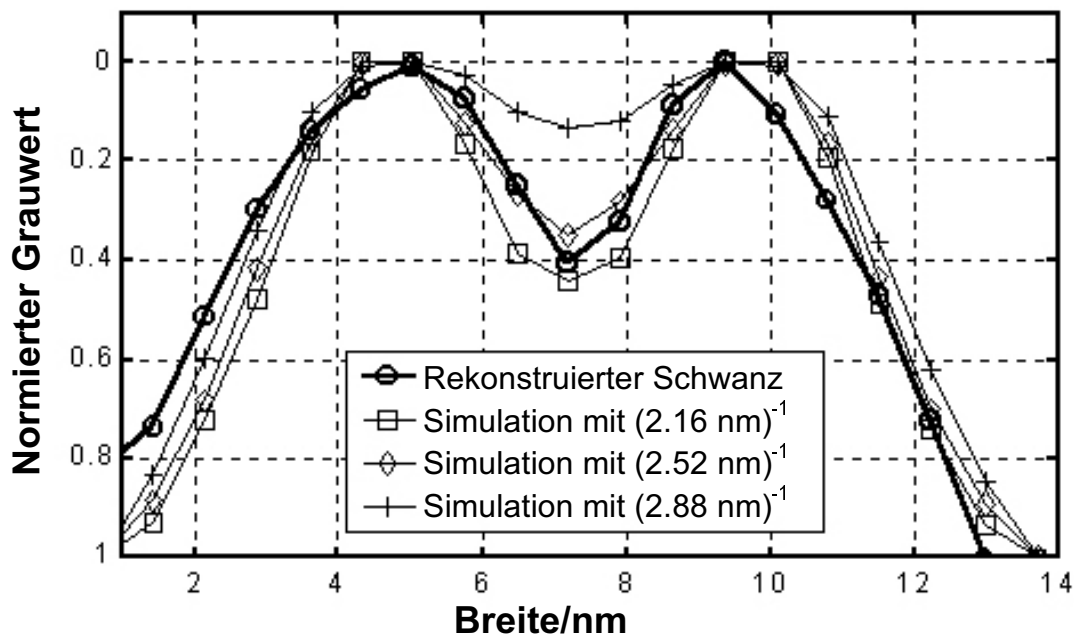
Sinogramme der am CM 300 FEG und am CM 120 Biofilter aufgenommenen Virenschwänze sind in Abbildung 3.7 gezeigt. In (a) sind dabei zentral vier dunkle Punkte in Form eines Parallelogramms zu erkennen, wohingegen in (b) nur ein relativ verschmierter zentraler Punkt zu sehen ist. Die klare Separation der horizontalen Punkte zeigt, dass der Virenschwanz in der am CM 300 FEG aufgenommenen Rekonstruktion als hohler Zylinder aufgelöst werden kann.



**Abbildung 3.7** Sinogramm der in Abbildung 3.4 gezeigten Virenschwänze aus Rekonstruktionen vom CM 300 FEG (a) und vom CM 120 Biofilter (b). In (a) können die vier zentralen Punkte separiert werden, wohingegen in (b) nur ein ‚verschmierter‘ zentrales Maximum erkennbar ist.

Um die am CM 300 FEG erreichte Auflösung weiter zu quantifizieren, wurden Virenschwänze mit verschiedenen Auflösungen simuliert. Hierzu wurden zwei parallele Linien mit den Dimensionen des tatsächlichen Virenschwanzes erzeugt und im Realraum mit einer quadratischen Filterfunktion tiefpassgefiltert. Anschließend wurde sowohl von den simulierten wie auch von den experimentellen Daten das Sinogramm berechnet. Schnitte

durch die Sinogramme bei  $\varphi=0$  (dies entspricht einer Projektion entlang der Längsachse des Virenschwanzes) zeigen in wie weit die zwei Linien separiert - und somit aufgelöst - werden können. Der Vergleich der Projektionen der simulierten Schwänze bei 2.16, 2.52 und 2.88 nm Auflösung und einem experimentell rekonstruierten Schwanz ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Die experimentellen und die simulierten Daten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, vor allem die Simulation bei 2.52 nm Auflösung ist beinahe identisch mit der experimentellen Rekonstruktion.



**Abbildung 3.8** Der Vergleich des rekonstruierten und der verschieden gut aufgelösten simulierten Phagenschwänze zeigt, dass die erreichte Auflösung unter Verwendung dieses Auflösungskriteriums zwischen 2.16 und 2.52 nm liegt.

Die für die Rekonstruktionen des T5-Vesikel-Systems abgeschätzten Auflösungswerte bestätigen die theoretische Vorhersagen von Grimm et al. [Grimm et al., 1998]. Für eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung von 120 auf 300 kV wurde bei ansonsten identischen experimentellen Bedingungen für dicke Proben eine von der Dicke des Präparats abhängige Verbesserung der Auflösung um einen Faktor 1.5 bis 2 berechnet (Abbildung 3.9). Die Aussagen gingen von einer Gesamtdosis von  $60 \text{ e}/\text{Å}^2$  aus, was auch für die vorliegenden Kippserien ein realistischer Wert ist. Zusätzlich wurde angenommen, dass für eine sinnvolle Alignierung der Einzelprojektionen mindestens 5 Zählereignisse pro Pixel vorliegen müssen und die Auflösung durch das ‚Crowther Kriterium‘ gegeben ist.

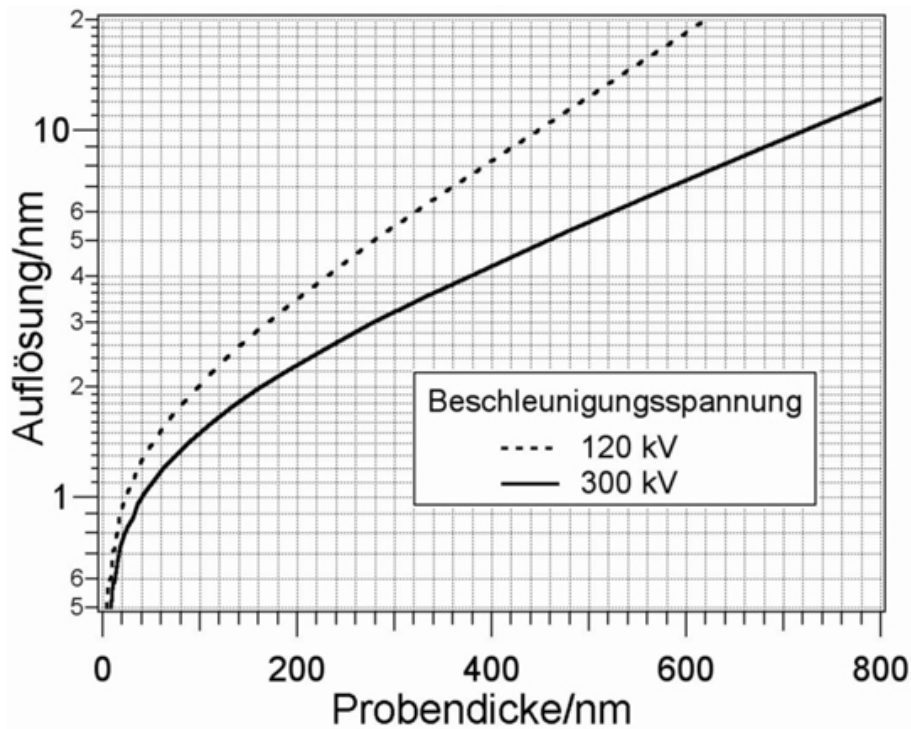


Abbildung 3.9 Theoretische Auflösungsgrenze der Elektronentomographie bei 120 und 300 kV, nach [Grimm et al., 1998].

### 3.5. Visualisierung der Virenschwänze innerhalb der Vesikel

Ein wesentliches Ziel der in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Rigaud durchgeführten Experimente war die Gewinnung neuer strukturelle Erkenntnisse zur Injektion viraler DNS in einen zellulären Wirt. Die Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Proteinen des Virenschwanzes pb2 und pb5, sowie dem Rezeptorprotein FhuA aus der äußeren Membran von *Escherichia coli* sind weitestgehend unverstanden. Bei der Auswertung der zahlreichen Kippserien wurde folglich ein besonderes Augenmerk auf den Kontaktpunkt von Virenschwanz und Vesikel gelegt. Besonders geeignet erweisen sich hierbei Viren-Vesikel-Systeme, bei denen die DNS noch im Virenkopf enthalten ist und das Vesikel keine - für die Visualisierung störende - DNS enthält. Die Auswertung der Rekonstruktionen zeigte, dass die Spitze des Phagenschwanzes in das Vesikel eindringt. Die Länge des Schwanzes innerhalb des Vesikels konnte zu  $23.5 \pm 3.5$  nm und der Durchmesser zu  $4 \pm 0.7$  nm bestimmt werden ( $n = 24$ , Abbildung 3.10).

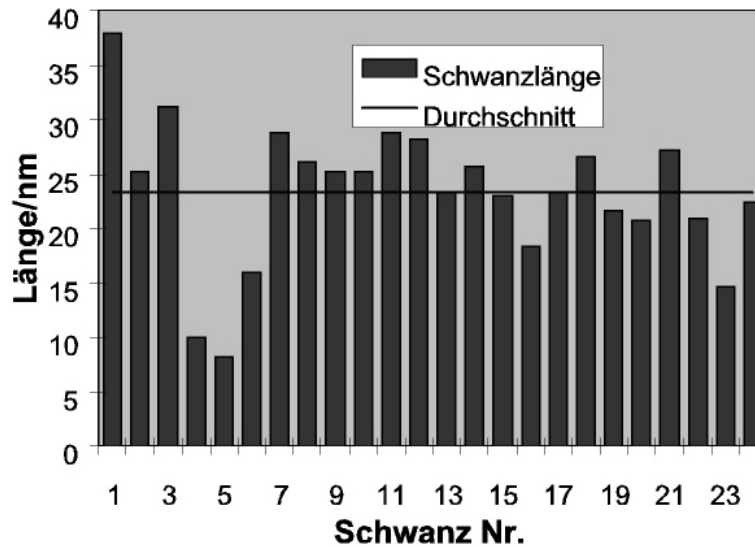


Abbildung 3.10 Statistische Verteilung der Länge der Schwanzspitzen innerhalb der Vesikel. Die durchschnittliche Schwanzlänge beträgt 23.5 nm.

Der Vergleich mit freien T5-Phagen zeigt, dass die Schwanzspitze beim Binden an das Vesikel eine große strukturelle Veränderung vollzieht. Die Spitze verkürzt sich von 50 nm auf ca. 23 nm und vergrößert gleichzeitig ihren Durchmesser von ca. 2 nm auf 4 nm (Abbildung 3.11, vgl. [Adams 1959]).

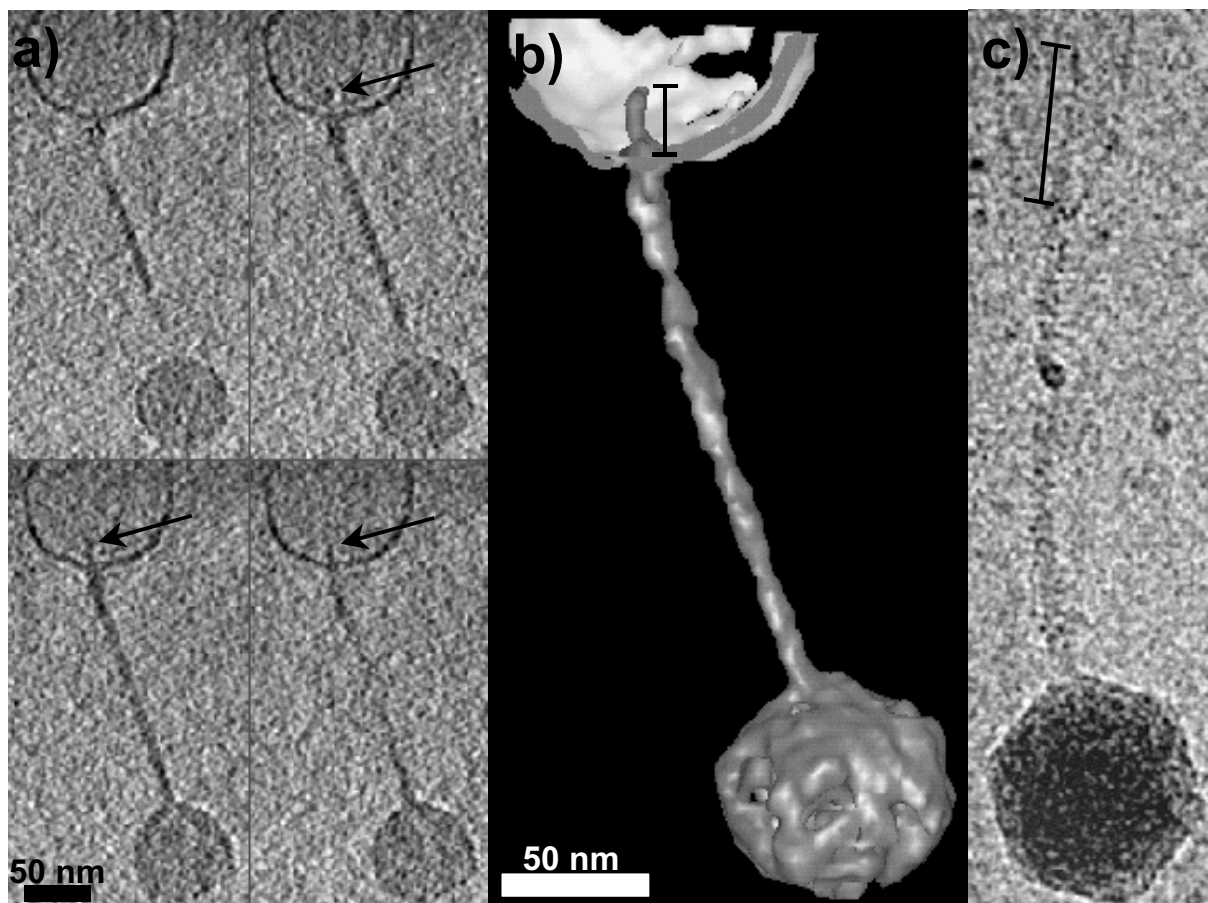
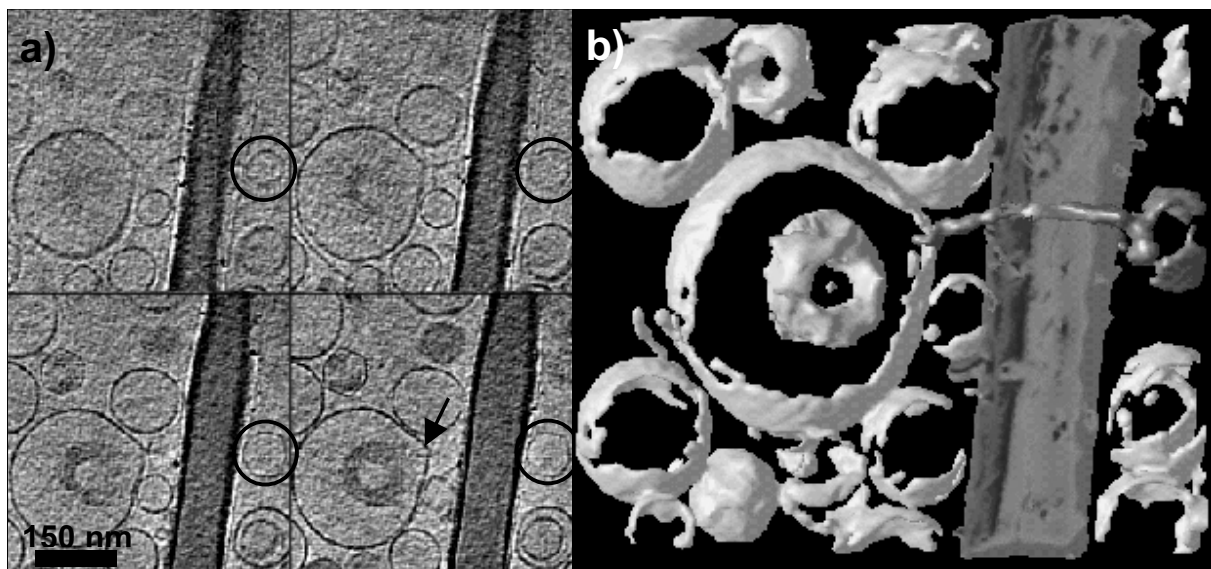


Abbildung 3.11 Vier aufeinanderfolgende x-y-Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion eines DNS-gefüllten Phagen, der an ein leeres Vesikel gebunden ist (a). An der Kontaktstelle zwischen Phagenschwanz und Vesikel ist die Spitze des Virenschwanzes deutlich innerhalb des Vesikels zu erkennen (Pfeile). Die Länge

der Schwanzspitze ist 24 nm bei einer Dicke von ca. 4 nm. In (b) ist eine Oberflächen Repräsentation der gleichen Rekonstruktion wie in (a) zu sehen (Phage dunkel, Vesikel hell). Die Vesikeloberseite wurde abgeschnitten um die Visualisierung der Schwanzspitze innerhalb des Vesikels zu ermöglichen. (c) zeigt eine 2D kryo-elektronenmikroskopische Aufnahme eines freien T5-Phagen. Im Vergleich dazu ist bei den gebundenen Phagen (b) die Schwanzspitze ca. einen Faktor zwei verkürzt und gleichzeitig hat sich der Durchmesser in etwa verdoppelt (vgl. Balken).

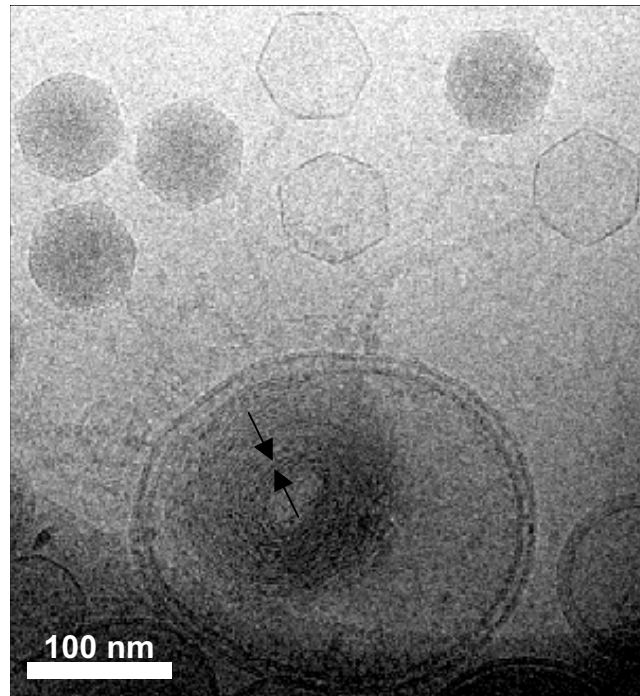
Um die Konformationsänderung des Schwanzes nach erfolgtem Transfer des Genoms zu bestätigen, wurde zusätzlich versucht, die Länge der Schwanzspitzen innerhalb der DNS-gefüllten Vesikel zu bestimmen. Als störend stellte sich hierbei die dichte Packung der DNS dar. Wie in Abbildung 3.4a zu sehen ist, kann die Schwanzspitze innerhalb des Vesikels aufgrund des geringen Dichteunterschiedes zwischen DNS und Schwanzspitze und der daraus resultierenden schlechten Kontrastverhältnisse nur sehr begrenzt visualisiert und vermessen werden. Dieses Problem konnte durch die Zugabe von 50 mM Spermin gelöst werden: Spermin ist ein Protein das einzelne DNS-Stränge aneinander bindet und somit die DNS zu sogenannten DNS-Torussen kondensiert [Lambert et al., 2000]. Die DNS-Torusse bilden sich in der Regel im Zentrum des Vesikels aus, so dass Bereiche in direkter Nachbarschaft der Vesikelmembran frei von DNS bleiben. Die Dimensionen der somit vermessbaren Schwanzspitzen wiesen dabei – wie erwartet – keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Schwanzspitzen in leeren Vesikeln auf. Abbildung 3.12 zeigt ein mit einem DNS-Torus gefülltes Vesikel. Da lediglich ein einziger Phage an das Vesikel gebunden hat, besteht der gezeigte Torus mit einem Durchmesser von ca. 120 nm aus einem einzigen zusammenhängenden DNS-Strang.



**Abbildung 3.12** Durch die Zugabe des Proteins Spermin kondensiert die DNS innerhalb des Vesikels zu einem Torus. Die in das Vesikel eindringende Schwanzspitze wird nicht durch die DNS verdeckt und bleibt somit visualisier- und vermessbar (siehe Pfeil). Die Schwanzspitze konnte einem Phagen zugeordnet werden, der sich auf der gegenüberliegenden Seite des Kohlesteges befindet (innerhalb des Kreises). Der Phagenschwanz biegt sich über den Kohlesteg (b).

Durch die von O. Lambert durchgeführten Vorexperimente war durch 2D Kryo-Aufnahmen bekannt, dass die DNS beim Kondensieren eine Spirale mit konstantem Abstand der einzelnen

Stränge (2.3 nm) bildet (Abbildung 3.13). Bei der tomographischen Untersuchung des Spermin-kondensierten DNS-Systems konnten diese regelmäßig angeordneten Doppelstränge der DNS jedoch nicht 3D aufgelöst werden.



**Abbildung 3.13** Die 2D-Kryo-Aufnahme zeigt die regelmäßige Anordnung der kondensierten DNS als Spirale mit einem Strangabstand von 2.6 nm. Die Abbildung zeigt weiterhin den Transfer des Phagen-Genoms über zwei unabhängige Doppelmembranen.

Neben der regelmäßigen Anordnung der einzelnen DNS-Stränge zeigt die Abbildung 3.13 noch ein weiteres – wenn auch nur selten auftretendes – Phänomen. Das gefüllte Vesikel ist nicht einschalig, sondern besteht aus zwei Lipid-Doppelschichten mit etwa 6-7 nm Abstand. Ebenso wie in den tatsächlichen *Escherichia coli*-Wirtszellen wurde die DNS durch eine ‚äußere‘ und eine ‚innere‘ Membran in das Vesikel injiziert. Die drei Komponenten dieses Modellsystems (T5-Phagen, FhuA und Vesikel) sind also für den kompletten Transfer der DNS in den Wirt ausreichend. Ebenso wie beim tatsächlichen *Escherichia coli*-bakteriensystem ist der Mechanismus, der die Durchquerung der zweiten Membran erlaubt, noch unverstanden.

### 3.6. Implikationen der tomographischen Daten auf das Verständnis der viralen Injektion

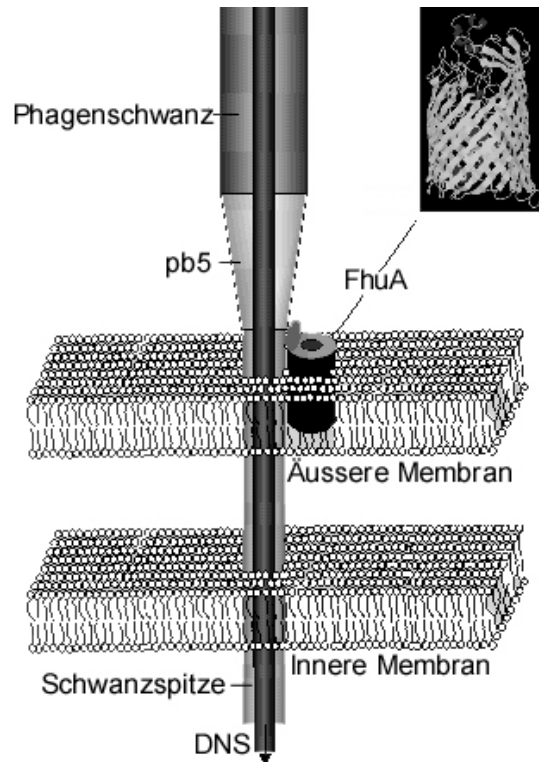
Die durch diese tomographische Untersuchung erstmalige Visualisierung des Phagenschwanzes innerhalb des ‚Wirtes‘ ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Funktionsweise der Genom-Injektion von Phagen zu ziehen. Die gängigen Meinungen bezüglich der Wechselwirkung des Phagenschwanzes und des Rezeptorproteins FhuA war divergent: Eine Vorstellung ging davon aus, dass der Schwanz zwar an FhuA bindet, die DNS dann aber

‚ungeschützt‘ durch den 2.5 nm weiten Kanal in den Wirt eindringt. Dieses Modell kann anhand der vorliegenden Daten aus zwei Gründen verworfen werden: Zum einen ist die Spitze des Schwanzes eindeutig innerhalb des Vesikels erkennbar, zum anderen wäre das Überqueren einer zweiten Membran durch die DNS – wie in *Escherichia coli* oder dem Vesikel aus Abbildung 3.13 – nicht möglich.

Die Erkenntnis, dass die Dimensionen der Schwanzspitze innerhalb des Vesikels die Breite des FhuA Kanals (2.5 nm) um fast einen Faktor 2 überschreitet erlaubt die Schlussfolgerung, dass FhuA nicht als Kanal, sondern nur als Rezeptor durch den Phagen genutzt wird. Unterstützung erhält diese Hypothese durch elektrophysiologische Messungen [Bonhivers et al., 1996; Killmann et al., 1993]. Es wurde gezeigt, dass die Rate des Ferrichrom-Transports durch die Bindung der T5-Phage an FhuA in der äußeren Membran von *Escherichia coli* nicht beeinflusst wird, der Kanal bleibt also auch während der Bindung von T5 zugänglich. Weitere Unterstützung erhält das Modell sowohl durch Experimente von Feucht et al. [Feucht et al., 1990], die gezeigt haben, dass das Schwanzprotein pb2 Kanäle formt, als auch durch Experimente von Guihard et al. [Guihard et al., 1992]: Pb2 wurde sowohl in der äußeren, als auch in der inneren Membran von *Escherichia coli* gefunden.

Auf Grund der tomographischen Experimente und der zahlreichen biochemischen Daten kann folgendes Szenario vorgeschlagen werden (siehe auch [Heller und Schwarz 1985]): Die Schwanzspitze prüft die Bakterienoberfläche auf mögliche Bindestellen. Durch den Kontakt von pb2 und FhuA wird eine konformelle Änderung der Schwanzspitze induziert (Verkürzung und Verdickung um den Faktor zwei) und das Eindringen des Schwanzes in den Wirt ermöglicht. Die Schwanzspitze innerhalb des Wirts ist hierbei lang genug (23 nm), um sowohl die äußere, als auch die innere Membran zu durchdringen. Das Eindringen des Schwanzes erlaubt als nächsten Schritt die Bindung des Phagenproteins pb5 an FhuA. Diese Bindung induziert die Injektion der DNS aus dem Kopf des Virus durch den Schwanz (inklusive Schwanzspitze) in den Wirt. Dieses Modell ist in Abbildung 3.14 schematisch zusammengefasst.





**Abbildung 3.14** Vorgeschlagenes Modell zum Transfer viraler DNS in den Wirt. Zuerst bindet pb2 an die äußere Membran, die Schwanzspitze vollzieht eine strukturelle Änderung und dringt 23 nm in den Wirt ein. Durch die dadurch mögliche Bindung von pb5 an FhuA wird die Injektion der DNS aus dem Phagenkopf in den Wirt induziert.



## Kapitel 4

### 4. 3D-Identifikation makromolekularer Komplexe in Elektronentomogrammen

Die energiegefilterte Elektronentomographie von eiseingebetteten Zellen hat in den letzten Jahren die 3D-Charakterisierung ganzer Zellen mit einer einzigartigen Auflösung von wenigen Nanometern ermöglicht. Die von Rudo Grimm an einem CM 120 Biofilter aufgenommenen Rekonstruktionen erlaubten bereits die Visualisierung einzelner makromolekularer Komplexe in ihrer nativen zellulären Umgebung (Abbildung 4.1).

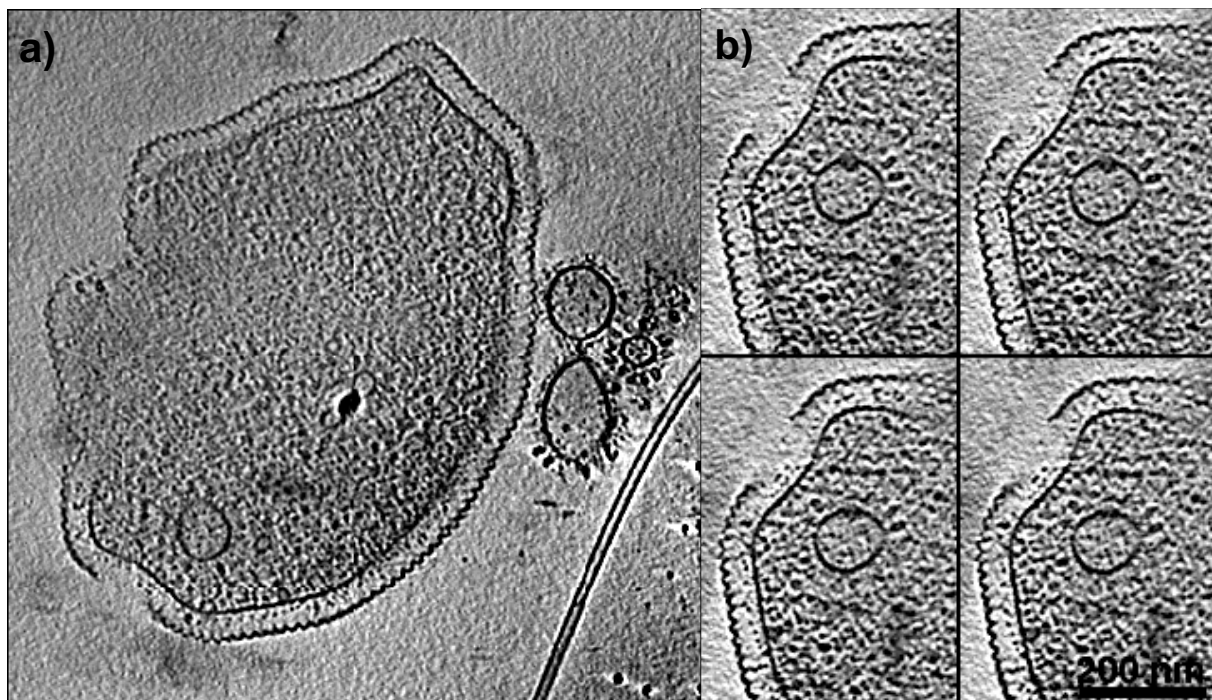
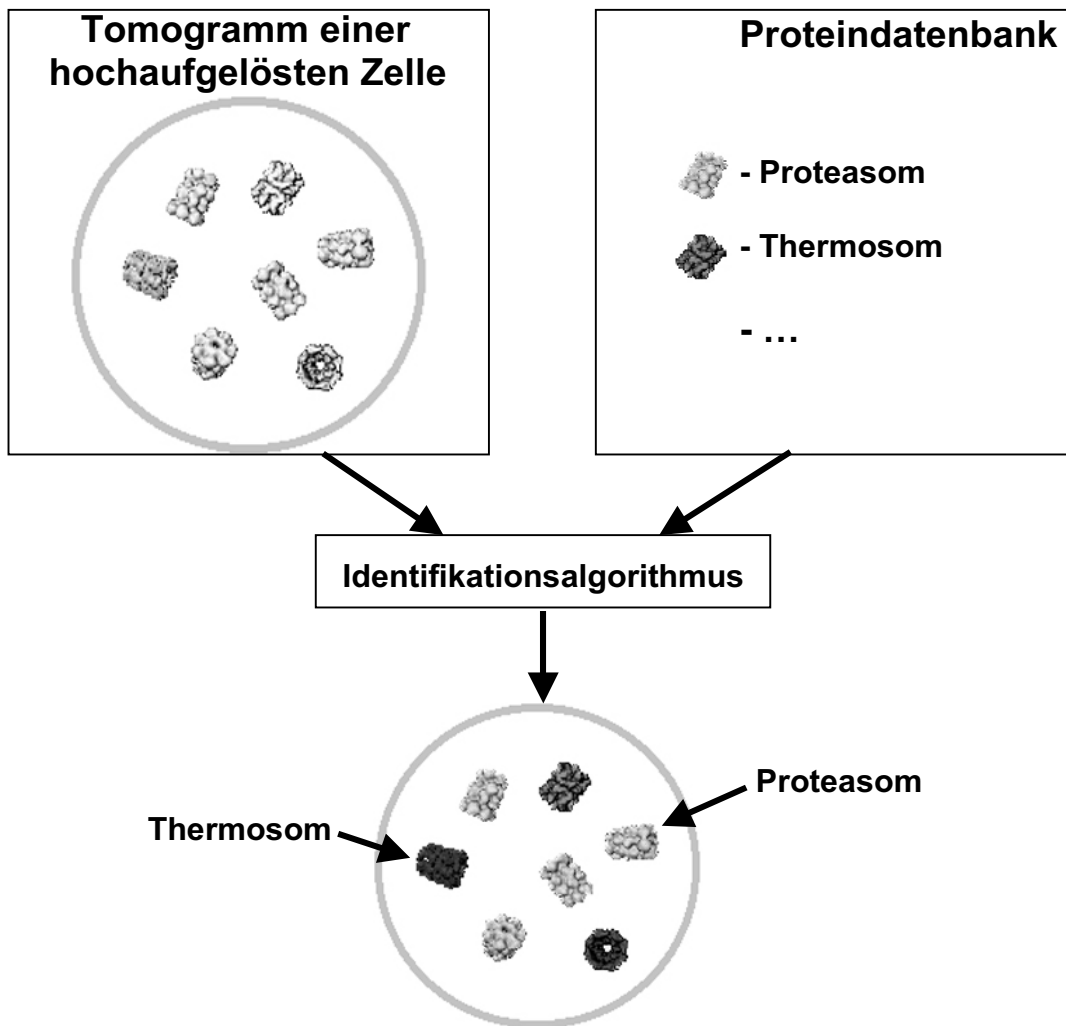


Abbildung 4.1 x-y-Schnitte durch ein am CM 120 Biofilter aufgenommenes Elektronentomogramm einer eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi* Zelle. a) zeigt die komplette Zelle; das Zytoplasma ist extrem dicht mit Proteinkomplexen gefüllt. Die äußere Membran der Zelle besteht aus einer periodischen Oberflächenschicht (S-Layer). Auf der rechten Seite sind mehrere extrazelluläre Vesikel zu erkennen, die von makromolekularen Komplexen umgeben sind. Rechts unten ist ein sogenannter Tubulus zu sehen. Diese Röhren dienen wahrscheinlich der Kommunikation und dem Austausch von Nährstoffen zwischen einzelnen Zellen. In b) sind die Plasmamembran und ein innerzelluläres Vesikel deutlich zu erkennen. Das Vesikel ist von zahlreichen makromolekularen Komplexen umgeben, die u.U. für die Steuerung der Exo- bzw. Endozytose verantwortlich sind.

Die Auflösung dieser Rekonstruktionen wurde durch Berechnung des Beugungsbildes einer die Zelle umgebenden periodischen Oberflächen-Schicht (S-Layer) zu etwa 8 nm bestimmt. Diese Auflösung erlaubt noch keine eindeutige Identifizierung von Proteinkomplexen mit einer Größe die kleiner als 15 nm ist (dies entspricht etwa 1 MDa). Durch diese Studien wurde jedoch deutlich, dass eine Identifizierung bei einer weiteren Auflösungsverbesserung um einen Faktor 2-3 ein realistisches Ziel darstellt [Koster et al., 1997]. Um dies zu erreichen, wurde ein CM 300 FEG installiert und mit einem Energiefilter ausgestattet, was zu einer Verbesserung der Auflösung der Elektronentomogrammen von unter 4 nm führte (vgl. Kapitel 3.4 und [Nickell 2000]). Das Ziel der zellulären Tomographie ist es jedoch nicht, die Auflösung soweit zu verbessern, dass eine strukturelle Charakterisierung hochaufgelöster makromolekularer Komplexe möglich wäre. Das Ziel ist vielmehr einzelne Moleküle anhand ihrer strukturellen Signatur innerhalb ihrer nativen zellulären Umgebung zu identifizieren [Böhm et al., 2000]. Trotz der Auflösungsverbesserung erscheint eine manuelle und subjektive Identifizierung in naher Zukunft nicht möglich zu sein: Zum einen ist die anfallende Datenmenge immens (über 2 GByte pro Rekonstruktion), zum anderen sind die Rekonstruktionen nach wie vor stark verrauscht. Eine objektive Identifizierung wird folglich nur durch die Entwicklung und die Anwendung automatisierter Identifikationsprozeduren möglich sein.

Die im folgenden beschriebenen Experimente haben zum Ziel, eine technisch realisierbare Identifikationsstrategie aufzuzeigen. Die vorgestellten Algorithmen beruhen auf dem quantitativen Vergleich einer bekannten hochaufgelösten Proteinstruktur mit den unbekannt rekonstruierten Objekten (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2** Das rekonstruierte zelluläre Volumen wird durch einen Identifikationsalgorithmus mit verschiedenen hochaufgelösten Referenzstrukturen einer Proteindatenbank verglichen. Die beste Übereinstimmung zwischen den rekonstruierten Objekten und den Referenzpartikeln erlaubt die Identifikation der unbekannt Proteinstrukturen innerhalb der Zelle.

Vorraussetzung ist also die vorangegangene strukturelle Charakterisierung der in der Zelle vermuteten Proteine durch Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie oder EM-Einzelpartikelanalyse. Verschiedene in einer Proteindatenbank abgelegte Referenzstrukturen werden quantitativ mit den Tomogrammen korreliert. Die Proteinstruktur mit der besten Übereinstimmung wird der unbekannt Struktur zugewiesen. Das Verfahren liefert folglich eine statistische Aussage, welche der verwendeten Referenzstrukturen am besten mit der unbekannt rekonstruierten Struktur korreliert, nicht jedoch, ob es sich bei dem rekonstruierten Objekt tatsächlich um eine der verwendeten Referenzstrukturen handelt. Für eine eindeutige Aussage wäre zusätzlich eine spezifische Markierung der Proteine notwendig. Um die Identifikationswahrscheinlichkeit zu quantifizieren, wurden die entwickelten Prozeduren auf verschiedene Modellsysteme angewandt. Diese Modellsysteme haben den Vorteil, dass sowohl die Dicke als auch die Dichte des Präparats – und somit in begrenztem Ausmaß auch die Auflösung – experimentell beeinflussbar sind. Alle Modellsysteme

beinhalteten bekannte Proteinkomplexe in vorgegebener Konzentration, bzw. festem Konzentrationsverhältnis. Das ideale Identifikationsergebnis war folglich bei allen Experimenten von vornherein absehbar. Diese Machbarkeitsstudie ermöglicht jedoch, die aus den Identifikationsergebnissen resultierende statistische Aussage zu analysieren und dient somit zur Verbesserung der Identifikationsalgorithmen. Weiterhin bietet das System der Phantomzellen die Möglichkeit, den Identifikationsalgorithmus zu ‚kalibrieren‘, da die Aufnahmebedingungen und das Präparat bekannt sind. Die Präparation und die Identifikationsergebnisse der einzelnen Modellsysteme sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.1. Identifikation von Makromolekülen in Elektronentomogrammen von isolierten Proteinkomplexen

Ziel dieser Vorstudie war es aufzuzeigen, dass die Identifikation von Proteinkomplexen in Elektronentomogrammen grundsätzlich möglich ist. Es wurde versucht, die Proteinkomplexe unter möglichst optimalen Bedingungen aufzunehmen und zu rekonstruieren. Hierzu wurden die Proteinkomplexe aus den Zellen biochemisch aufgereinigt und in einer möglichst dünnen Eisschicht präpariert. Bei den verwendeten Komplexen handelt es sich um zwei strukturell sehr ähnliche Moleküle; zum einen wurde das Thermosom (933 kDa) verwendet, ein aus zwei identischen Ringen mit jeweils acht Untereinheiten zusammengesetztes tonnenförmiges Molekül mit einem Außenradius von ca. 15.5 nm und einer Höhe von ca. 16 nm. Als zweites Modellmolekül wurde das 20S Proteasom ( $\approx$  721 kDa) genutzt, ein ebenfalls aus zwei identischen Ringen mit jeweils sieben  $\alpha$ -,  $\beta$ -Paaren von Untereinheiten zusammengesetzter Zylinder mit 12 nm Außenradius und einer Höhe von 15 nm (Abbildung 4.3).

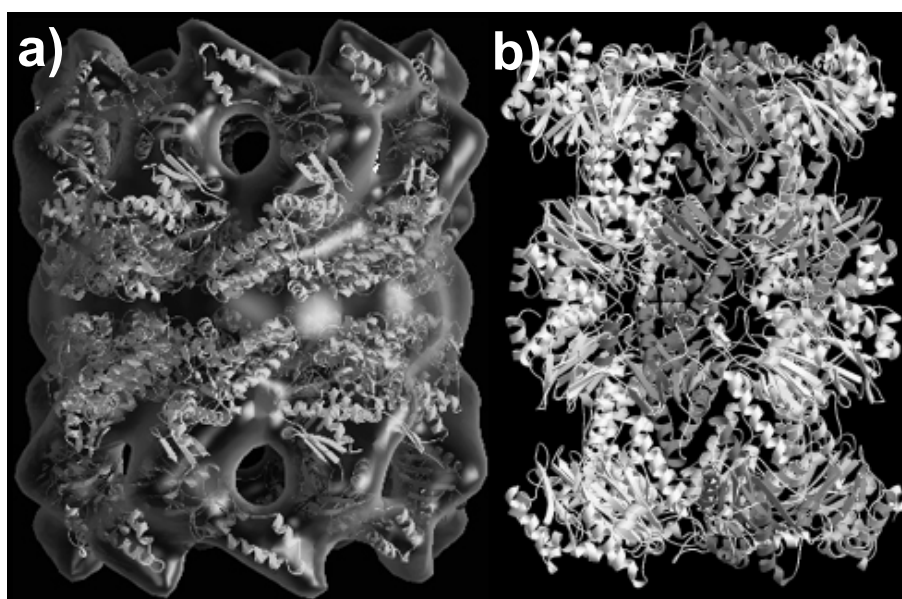


Abbildung 4.3 Atomare 3D-Struktur der beiden verwendeten Makromoleküle. a) Der Hohlzylinder des Thermosoms besteht aus zwei identischen achtfach-symmetrischen Ringen und hat einen Außendurchmesser von ca. 15.5 nm. b) Das 20S Proteasom ist ebenfalls ein Hohlzylinder, jedoch mit

siebenfacher Symmetrie und einem Außendurchmesser von 12 nm. Nach [Baumeister et al., 1998; Nitsch et al., 1998].

### 4.1.1 Präparation und tomographische Datenaufzeichnung

#### 4.1.1.1 Thermosom

Im Falle des Thermosoms wurde auf bereits vorhandene Rekonstruktionen zurückgegriffen, die von Michael Nitsch, Dieter Typke und Jochen Walz erstellt wurden [Nitsch et al., 1998]. Das  $\alpha$ -Thermosom wurde hierzu in *Escherichia coli* exprimiert und biochemisch aufgereinigt [Nitsch et al., 1997; Waldmann et al., 1995]. Nicht-korrekt gefaltete  $\alpha$ -Thermosomen wurden direkt vor dem Einfrieren durch Ausschlusschromatographie in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5% Glycerin, 1 mM Natriumazid und 1mM DTT durch eine Superose 6 Säule abgetrennt. Nach dem Einfrieren der Präparate auf einem löchrigen Kohlfilm [Dubochet et al., 1988] wurden die Kippserien an einem CM 200 FEG bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen. Die nominelle Pixelgröße auf Objektebene betrug dabei 0.48 nm bei einem Unterfokus von 2  $\mu\text{m}$ . Der Winkelraum wurde von  $-54^\circ$  bis  $+56^\circ$  mit  $6^\circ$  Winkelinkrement abgetastet. Die Projektionen wurden durch Selektion von 10 nm Goldmarkern aligniert und durch gewichtete Rückprojektion wurde die 3D-Struktur rekonstruiert (Abbildung 4.4).

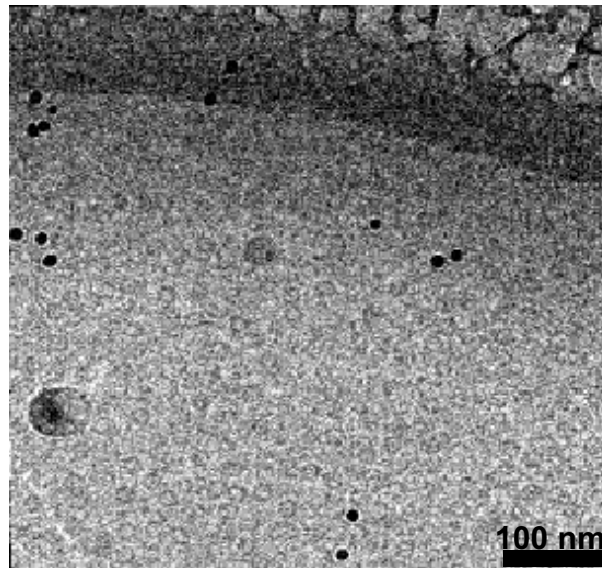
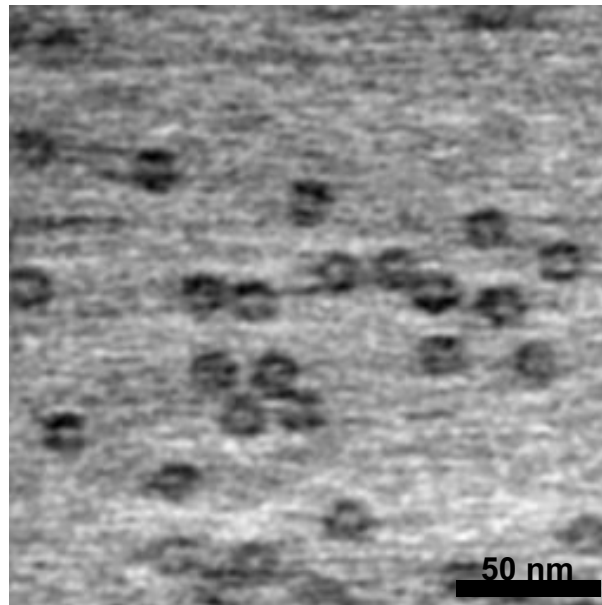


Abbildung 4.4 Projektion durch die 3D-Rekonstruktion einer am CM 200 FEG aufgenommenen Kippserie des Thermosoms entlang der z-Achse. Neben den Partikeln im Eis sind die 10 nm großen Goldmarker zu erkennen (aus [Nitsch et al., 1998]).

#### 4.1.1.2 20S Proteasom

Die 20S Proteasomen wurden aus Embryonen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* biochemisch durch Erika Seemüller aufgereinigt [Walz et al., 1998]. Nach der Vitrifizierung der Präparate wurden die Kippserien an einem CM 120 Biofilter bei einem Unterfokus von 3  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Der abgedeckte Winkelbereich reichte von  $-69^\circ$  bis  $+66^\circ$ . Das Kippwinkelinkrement war nicht konstant, sondern folgte dem sogenannten Saxton-Schema

mit einem Anfangsinkrement von  $2.5^\circ$ . Ziel dieses Aufnahmeschemas ist es, im Fourier-Raum entlang der  $z^*$ -Achse eine homogene Auflösung zu erzielen [Saxton et al., 1984]. Dies wird durch eine engere Abtastung des Winkelbereiches bei höheren Kippwinkeln erreicht. Vor der gewichteten Rückprojektion wurden die Bilder durch manuelles Selektieren mehrerer Goldmarker auf einen gemeinsamen Koordinatenursprung aligniert. Eine Projektion der 3D-Rekonstruktion entlang der  $z$ -Achse ist in Abbildung 4.5 gezeigt.



**Abbildung 4.5** Projektion durch die 3D-Rekonstruktion der am CM 120 Biofilter aufgenommenen Kippserien des 20S Proteasoms bei voller Auflösung.

#### 4.1.2 Erzeugung der Referenzpartikel

Der verwendete Identifikationsalgorithmus beruht auf einem quantitativen Vergleich einer bekannten molekularen Referenzstruktur mit der zu untersuchenden 3D-Rekonstruktion. Um gut definierte und reproduzierbare Referenzstrukturen zu erstellen, wurden die atomaren Koordinaten des aus Hefezellen aufgereinigten 20S Proteasoms von der Proteindatenbank heruntergeladen (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>, [Berman et al., 2000; Groll et al., 1997]). Im Falle des Thermosoms existiert für die im Elektronenmikroskop vorliegende sogenannten ‚offene‘ Konformation bislang noch keine hochaufgelöste Röntgenstruktur. Es sind jedoch Strukturdaten eines pseudo-atomaren Modells vorhanden, die durch das Einpassen der Röntgenstruktur des ‚geschlossenen‘ Thermosoms in die durch Elektronentomographie erstellte 3D-Dichteverteilung des ‚offenen‘ Thermosoms gewonnen wurden [Nitsch et al., 1998].

Zusätzlich zu den beiden tatsächlich tomographisch erfassten Proteinkomplexen wurden die rekonstruierten Partikel noch mit einer weiteren Referenz verglichen. Hierbei handelte es sich um das strukturell sehr ähnliche GroEL aus *Escherichia coli*. GroEL bildet ebenso wie die beiden anderen Moleküle eine Tonne, die sich aus zwei identischen siebenfach



symmetrischen Ringen zusammensetzt. Der Außendurchmesser ist 15 nm bei einer Höhe von 15.5 nm. Die atomaren Koordinaten wurden ebenfalls von der Proteindatenbank heruntergeladen [Berman et al., 2000; Boisvert et al., 1996].

Um die atomaren Koordinaten der Referenzstrukturen in eine Dichteverteilung umzuwandeln wurden die Grauwerte der Voxel entsprechend der Summe der Atomgewichte der in dieses Voxel fallenden Atome berechnet. Die Auflösung der Referenzstrukturen wurde schließlich durch eine geglättete Tiefpassfilterung an die im Elektronenmikroskop erzielte Auflösung angepasst. Eine Iso-Oberflächendarstellung der Referenzstrukturen ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

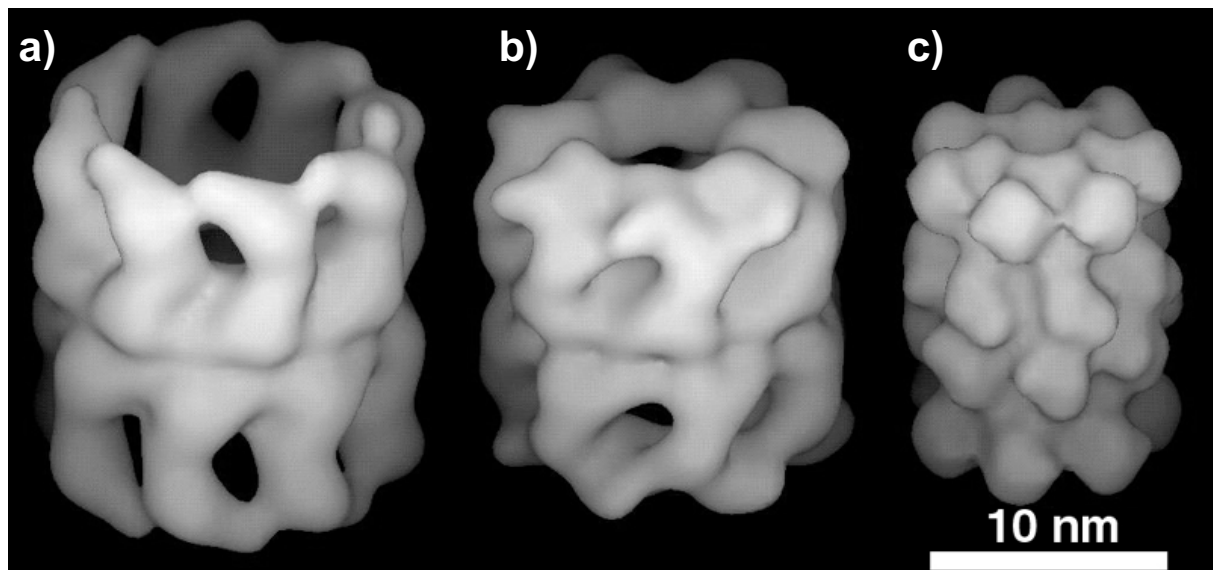


Abbildung 4.6 Iso-Oberflächendarstellung der auf 4 nm Auflösung gefilterten Referenzstrukturen Thermosom (a), GroEL (b) und 20S Proteasom (c).

#### 4.1.3 Segmentierung der Volumina durch MCM

Ziel der Algorithmen war, eine rechnerisch machbare Strategie zur Identifizierung darzulegen. Die durch die tomographischen Rekonstruktionen anfallende Datenmenge und der daraus resultierende Rechenaufwand sind jedoch immens. Um die Identifikation auf Bereiche des Volumens zu reduzieren, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Proteinkomplexe enthalten, wurde von Achilleas Frangakis ein Segmentierungsalgorithmus entwickelt und auf die Rekonstruktionen der Proteinkomplexe angewandt. Der Segmentierungsalgorithmus basiert auf dem nicht-linearen Schrumpfen von Iso-Intensitätsflächen [Frangakis 2001]. Die Schrumpfrate ist dabei eine Funktion des Krümmungsradius der Iso-Intensitätsfläche. Der Prozess wird daher Mean-Curvature Motion (MCM) genannt.

Die Grundidee ist dabei, dass die Iso-Intensitätsfläche einer sehr kleinen Struktur eine hohe Krümmung aufweist, die einer großen Struktur eine kleine. Die Strukturinformation innerhalb der Volumina wird mit der Iterationszeit degradiert, wobei große Strukturen länger erhalten bleiben als kleine. Jede Struktur schrumpft mit der Zeit zu einem Singularitätspunkt, der schließlich verschwindet. Bei einem krümmungsabhängigen Schrumpfen der Iso-

Intensitätsfläche bleibt die Iso-Intensitätsfläche einer großen Struktur jedoch länger erhalten als die einer kleinen. Bei kleinen Strukturen handelt es sich in erster Linie um Rauschen und um nicht aufgelöste Proteinstrukturen, bei den großen um zelluläre Organellen und um Makromoleküle. Der MCM-Algorithmus eignet sich folglich, um Partikel mit bestimmtem Radius vom Rauschen und von größeren zellulären Strukturen abzutrennen. Das entsprechende Partikel kann dabei durch einen Algorithmus zur automatischen Detektierung der Maxima innerhalb der MCM-Volumina lokalisiert werden (Abbildung 4.7). Dazu wird erst eine Kugel mit dem vorgegebenen Partikelradius um jedes lokale Maximum ausgeschnitten, und das Maximum der Kugelschale wird berechnet. Genügt dieses Maximum einem vorher festgelegten Schwellwert wird diese Stelle innerhalb des Volumens weiterhin prozessiert.

Mathematisch kann der krümmungsabhängige Schrumpfungsprozess durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{\partial I}{\partial t} = |\nabla I| \operatorname{div} \left( \frac{\nabla I}{|\nabla I|} \right) = \kappa |\nabla I|, \quad (37)$$

wobei  $I$  die Intensität,  $t$  die Zeit und  $\kappa$  die Krümmung bezeichnet. Der iterationszeitabhängige Radius  $r$  eines Partikels kann berechnet werden mit:

$$r(t) = \sqrt{r(0)^2 - 2ct}, \quad c: \text{Diffusionskonstante} \quad (38)$$

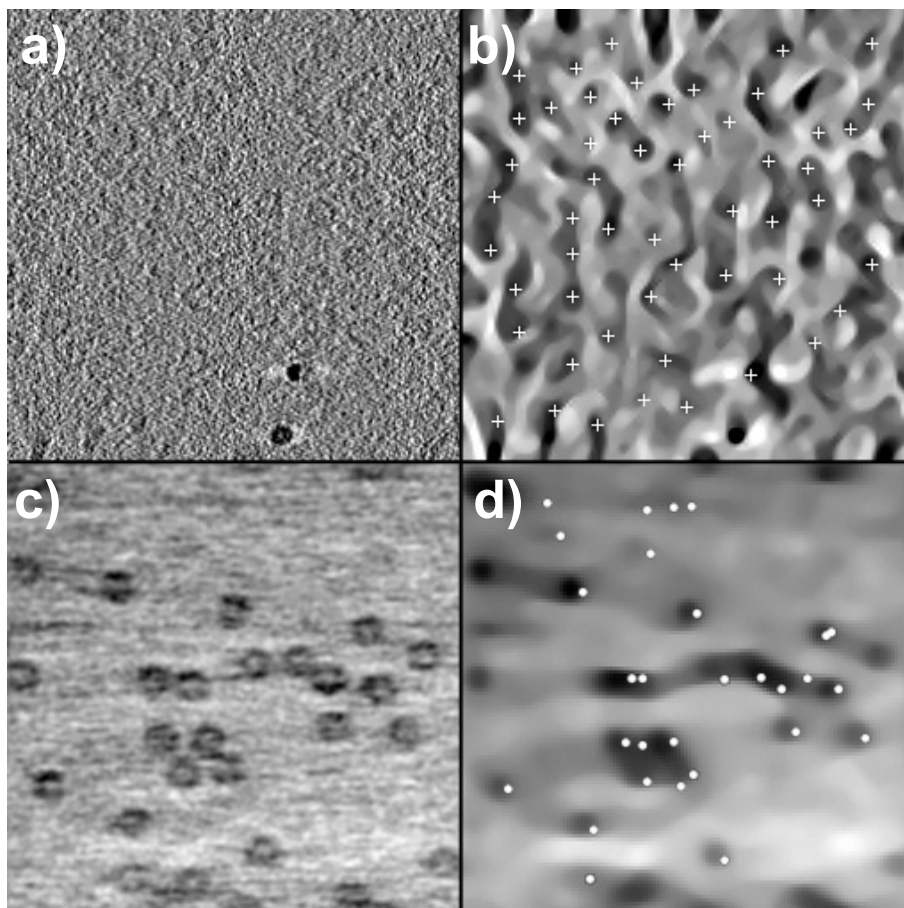


Abbildung 4.7 Der MCM-Algorithmus erlaubt es, Partikel innerhalb einer tomographischen Rekonstruktion zu lokalisieren. In (a) ist eine Rekonstruktion von Thermosom-Partikeln gezeigt, in (b) das zugehörige MCM-prozessierte Bild mit den zugehörigen lokalisierten Maxima (Kreuze). In (c) ist eine 20S Proteasomen-Rekonstruktion zu sehen mit dem entsprechenden MCM-Bild (d) und den Detektionsergebnissen (Punkte).

In der Elektronentomographie versagen konventionelle Segmentierungsmethoden, wie z. B. verschiedene Schwellwertmethoden oder Verfahren die auf Iso-Konturlinien beruhen, wegen des hohen Rauschanteils in den Elektronentomogrammen [Stoschek 1997]. Die MCM-Prozedur ist Rauschen gegenüber relativ robust (Abbildung 4.8) und ist auch nicht auf kontrastreiche Bilddetails angewiesen. Eine wichtige Eigenschaft für die Anwendung von MCM zur Detektierung von Partikeln ist die Erhaltung des Zentrums des Partikels [Frangakis 2000]. Nur die Größe und die Form eines Objektes sind für die Segmentierung relevant. Zusätzlich ist auch - im Gegensatz zu Korrelationsmethoden - keine Referenzstruktur notwendig, und die für den MCM-Algorithmus benötigte Rechenzeit kann im wesentlichen vernachlässigt werden. Für einen Iterationsschritt werden auf einer herkömmlichen Workstation ca. 15 s für ein  $256^3$  Voxel großes Volumen benötigt (bei typischerweise 15-20 benötigten Iterationsschritten).

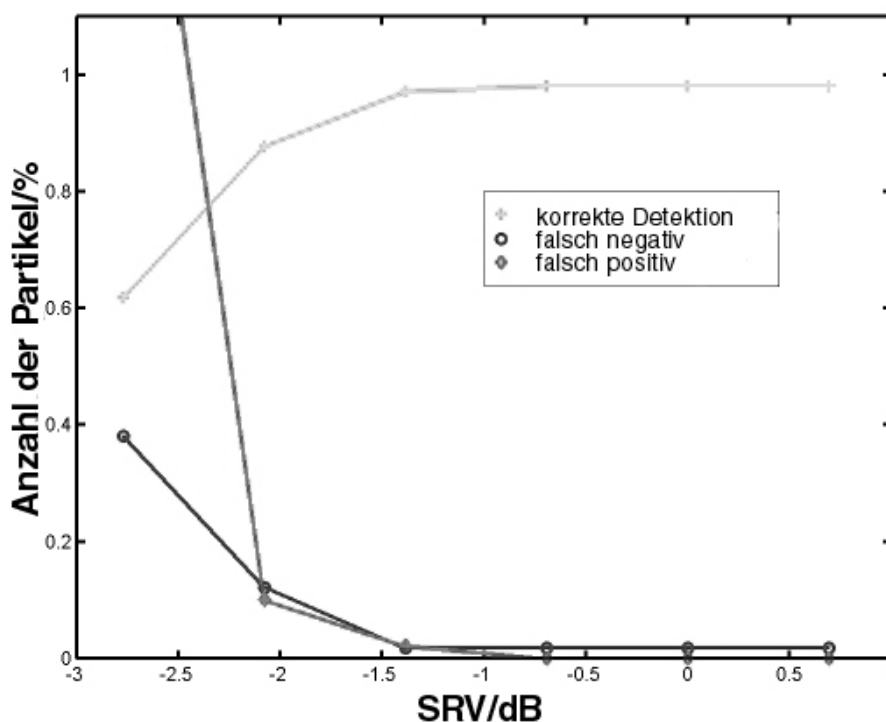


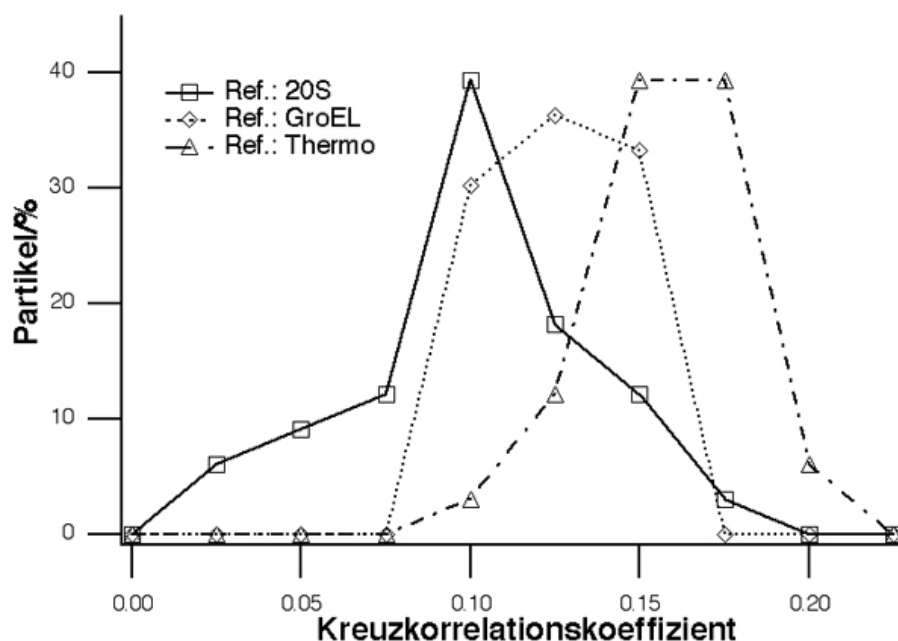
Abbildung 4.8 Detektierungserfolge des MCM-Algorithmus. Ab einem SRV von  $-2$  dB werden mehr als 90% der Partikel korrekt detektiert (Falsch positiv: es wurden Partikel detektiert, obwohl an diesen Stellen tatsächlich keine Partikel existieren; falsch negativ: Partikel, die tatsächlich existieren, wurden nicht detektiert).

#### 4.1.4 Identifikation der isolierten Proteinkomplexe

Nach der Segmentierung wurden die Teilvolumina mit den Referenzstrukturen (vgl. 4.1.2) verglichen (Volumengröße  $32^3$  Voxel). Es wurde davon ausgegangen, dass die Orientierung

der Partikel in der 3D-Rekonstruktion willkürlich und unbekannt ist. Der ganze Winkelraum wurde durch Rotation der Referenz zu jedem möglichem Satz von Eulerwinkeln mit  $10^\circ$  Inkrement abgetastet und für jede Kombination von Eulerwinkeln wurde der Kreuzkorrelationskoeffizient zwischen Referenz- und Partikelvolumen berechnet. In einem zweiten Schritt wurde der Winkelraum mit  $1^\circ$  Inkrement um einen Bereich von  $\pm 5^\circ$  um den im ersten Schritt bestimmten Satz von Eulerwinkeln abgetastet. Die Rechenzeit für einen dieser Rechenschritte beträgt in etwa eine Stunde, was bei einigen hundert Partikeln, die mit mehreren Referenzen verglichen werden, zu einer Gesamtrechendauer von bis zu einer Woche führt. Um die Rechenzeit zu reduzieren, wurden die Korrelationsalgorithmen unter Verwendung des für den Parallelrechner Cray T3E adaptierte EM-Programms [Hegerl und Walz 1998] parallelisiert. Theoretisch können alle 784 Prozessoren des am RZG installierten Rechners in Garching genutzt werden, wobei jeder Prozessor ein Partikel und eine Referenz in den lokalen Speicher einliest um dann die Korrelation unabhängig von den anderen Prozessoren durchführt. Die Rechenzeit kann also invers mit der Anzahl der verwendeten Prozessoren skaliert werden.

Eine Darstellung der Identifikationsergebnisse ist für die Thermosomen-Rekonstruktion in Abbildung 4.9 und für die 20S Proteasomen-Rekonstruktion in Abbildung 4.10 gezeigt. Die Teilvolumina wurden hierbei mit den drei Referenzen Thermosom, GroEL und 20S Proteasom korreliert und das Histogramm der jeweils höchsten Korrelationswerte ist für jede Referenzstruktur dargestellt.



**Abbildung 4.9** Verteilung der Korrelationswerte für die mit den drei verschiedenen Referenzen verglichene Thermosomen-Rekonstruktion.

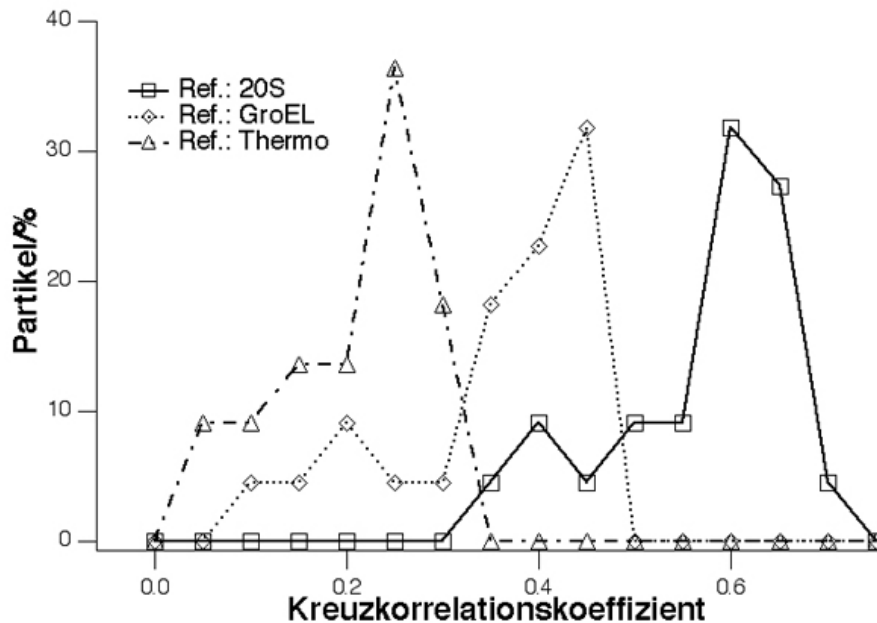


Abbildung 4.10 Verteilung der Korrelationswerte für die mit den drei verschiedenen Referenzen verglichene 20S Proteasomen-Rekonstruktion.

Aus den Histogrammen ist ersichtlich, dass die richtige Referenz mit den Teilvolumina etwa 1.5- bis 2-mal so gut korreliert wie mit den beiden anderen Referenzen. In allen Fällen war der Korrelationskoeffizient am höchsten, wenn das rekonstruierte Partikel mit dem entsprechenden Referenzpartikel korreliert wurde. Der Korrelationskoeffizient war ein in 100% der Fälle korrektes Kriterium zur richtigen Identifikation der aufgereinigten molekularen Komplexe.

## 4.2 Identifikation von Makromolekülen in simulierten 3D-Rekonstruktionen

Die Ergebnisse aus 4.1 und 4.2 haben die Frage nach den Grenzen des Identifikationsalgorithmus aufgeworfen. Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen simulierten Experimente war es, die experimentellen Parameter zu bestimmen, bei denen eine Identifikation nicht mehr möglich ist. Da Rekonstruktionen ganzer Zellen mit einer für die Identifikation ausreichenden Auflösung noch nicht vorhanden waren, wurden tomographische Rekonstruktionen mit verschiedenen Auflösungen und verschiedenen makromolekularen Komplexen simuliert. Als Testpartikel wurden die gleichen makromolekularen Komplexe wie in 4.1.2 verwendet (Thermosom, GroEL und 20S Proteasom). Die Simulationen wurden mit Auflösungen durchgeführt, die bereits am CM 120 Biofilter erreicht wurden (8 nm), momentan am CM 300 FEG erreicht werden (4 nm) und u.U. in Zukunft erreicht werden können (2 nm). Eine Iso-Oberflächendarstellung der drei Testpartikel mit den entsprechenden Auflösungen ist in Abbildung 4.11 gezeigt.

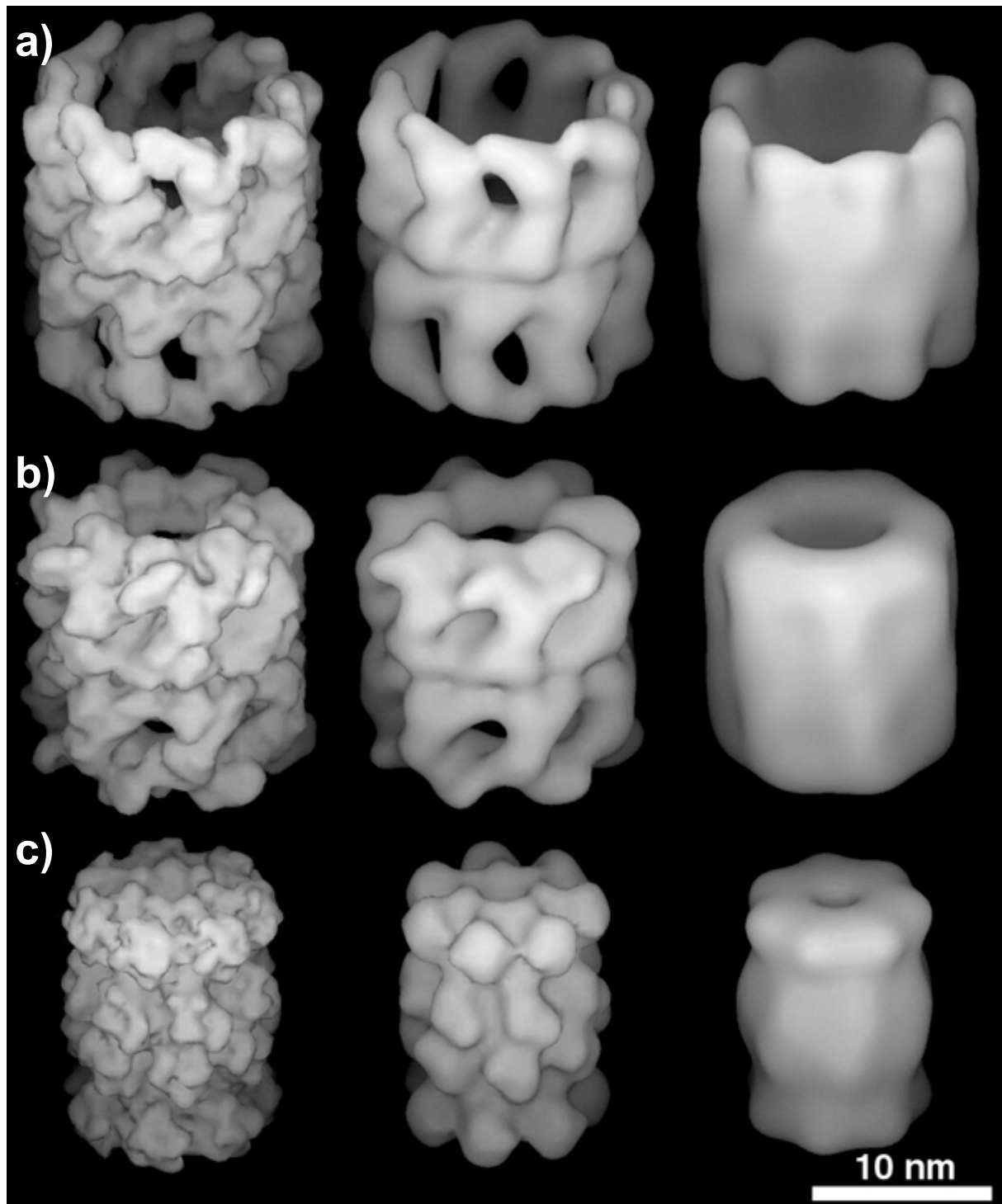


Abbildung 4.11 Die drei Testpartikel Thermosom (a), GroEL (b) und 20S Proteasom (c) bei 2 nm (links), 4 nm (Mitte) und 8 nm (rechts) Auflösung.

#### 4.2.1 Erzeugung der simulierten Rekonstruktionen

Zur Erzeugung der simulierten Rekonstruktionen wurden die Partikel zu der gewünschten Auflösung tiefpassgefiltert und mit zufälliger Orientierung an eine zufällige Stelle innerhalb eines  $256^3$  Volumens platziert. Um eine tomographische Kippserie zu simulieren, wurde das Partikelvolumen von  $-60^\circ$  bis  $+60^\circ$  mit  $5^\circ$  Inkrement projiziert. Die Projektionen wurden mit einer Phasenkontrastübertragungsfunktion gefaltet, die der Übertragungsfunktion einer Philips

Twinlinse bei 4  $\mu\text{m}$  Unterfokus und 300 kV Beschleunigungsspannung entspricht ( $C_s = 2$  mm). Zusätzlich wurde farbiges Rauschen addiert, das zu einer Auflösung von 3.6 nm gefiltert wurde (dies entspricht  $\frac{1}{4}$  der Nyquistfrequenz). Das SRV in den simulierten Volumina war 0.5, ein realistischer Wert für Tomogramme, die am CM 300 FEG bei 4  $\mu\text{m}$  Unterfokus aufgenommen wurden. Um den Alignierungsfehler zu simulieren, wurden die Projektionen mit einem Pixel Standardabweichung in der x-y-Ebene verschoben. Die Rekonstruktion erfolgte durch gewichtete Rückprojektion. Schnitte durch simulierte Volumina sind in Abbildung 4.12 gezeigt.

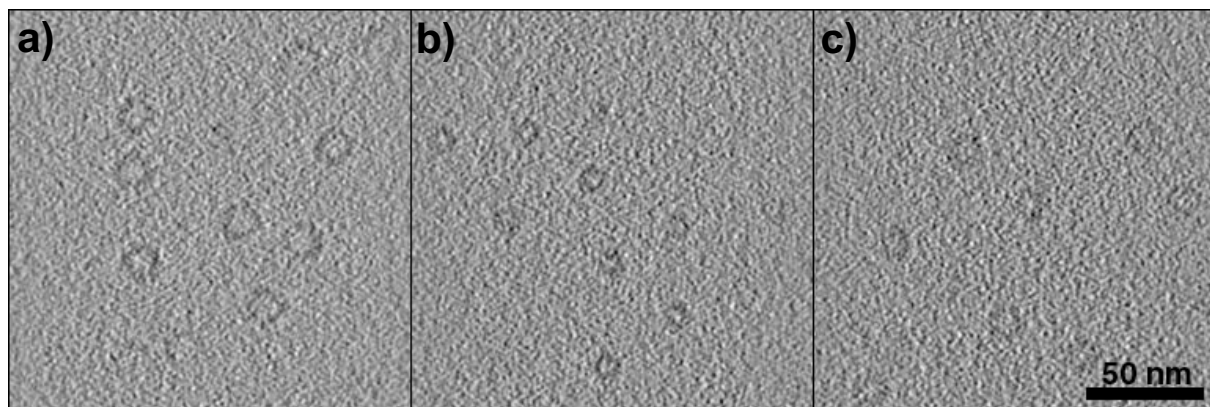


Abbildung 4.12 x-y-Schnitte durch simulierte Partikelvolumina mit 4 nm Auflösung. In (a) sind Thermosomen, in (b) 20S Proteasomen und in (c) sind GroEL-Partikel enthalten.

#### 4.2.2 Identifikation der simulierten Proteinkomplexe

Um die Identifikationswahrscheinlichkeit von Proteinen in simulierten tomographischen Rekonstruktionen zu beurteilen, wurden die gleichen Referenzstrukturen und die gleichen Identifikationsroutinen wie in 4.1.4 verwendet. Als Identifikationskriterium wurde wiederum die relative Höhe des Korrelationsmaximums betrachtet. Hierbei wurden die Partikelvolumina mit der ‚richtigen‘ und mit den ‚falschen‘ Referenzen korreliert (‚richtige‘ Referenz bedeutet hierbei, dass Partikelvolumina und Referenzvolumen die gleiche Partikelsorte enthielten, d.h. Volumen A korreliert mit Referenz A, ‚falsche‘ Referenz meint, dass Partikelvolumina und Referenzvolumen unterschiedliche Partikelsorten enthielten, d.h. Volumen A korreliert mit Referenz B). Der Quotient der somit ermittelten Korrelationskoeffizienten wurde als Identifikationskriterium herangezogen:

$$h_{AB} = \frac{KKK_{\max}(\text{Vol A, Ref A})}{KKK_{\max}(\text{Vol A, Ref B})} \quad (39)$$

Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind für alle Partikel, alle Referenzen und für alle Auflösungen in Abbildung 4.13 zusammengefasst. Die Identifikation wird als erfolgreich betrachtet, falls  $h_{AB} > 1$ , d.h. falls das Partikel A mit der dem Partikel entsprechenden Referenz A besser korreliert als mit jeder anderen Referenzstruktur B. Der prozentuale Anteil der nach diesem Kriterium korrekt identifizierten Partikel ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

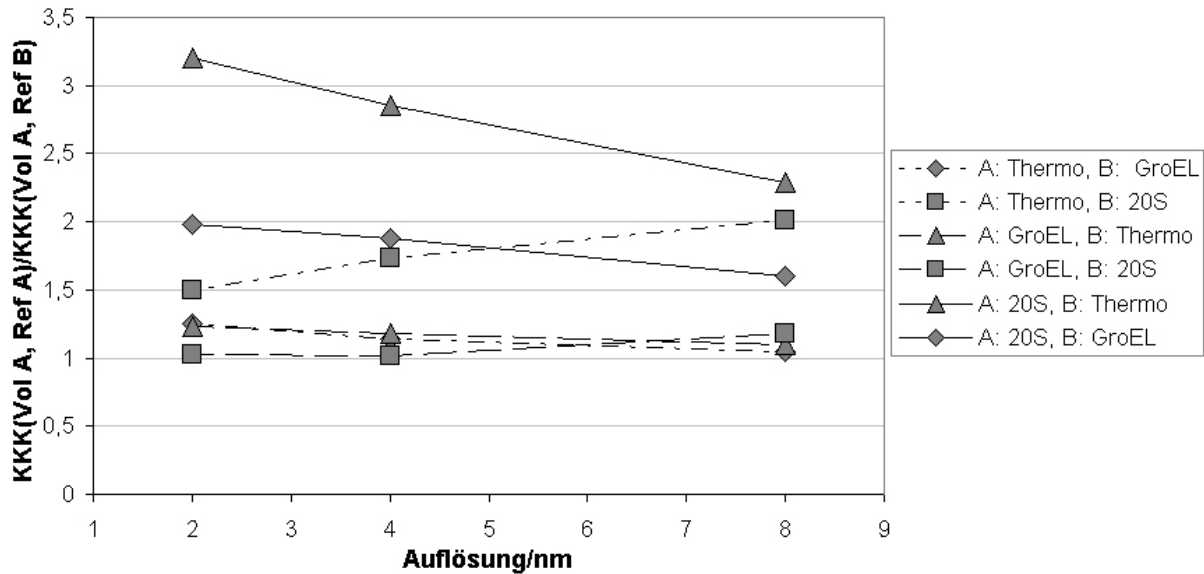


Abbildung 4.13 Das Verhältnis der Kreuzkorrelationskoeffizienten bei verschiedenen Auflösungsstufen.

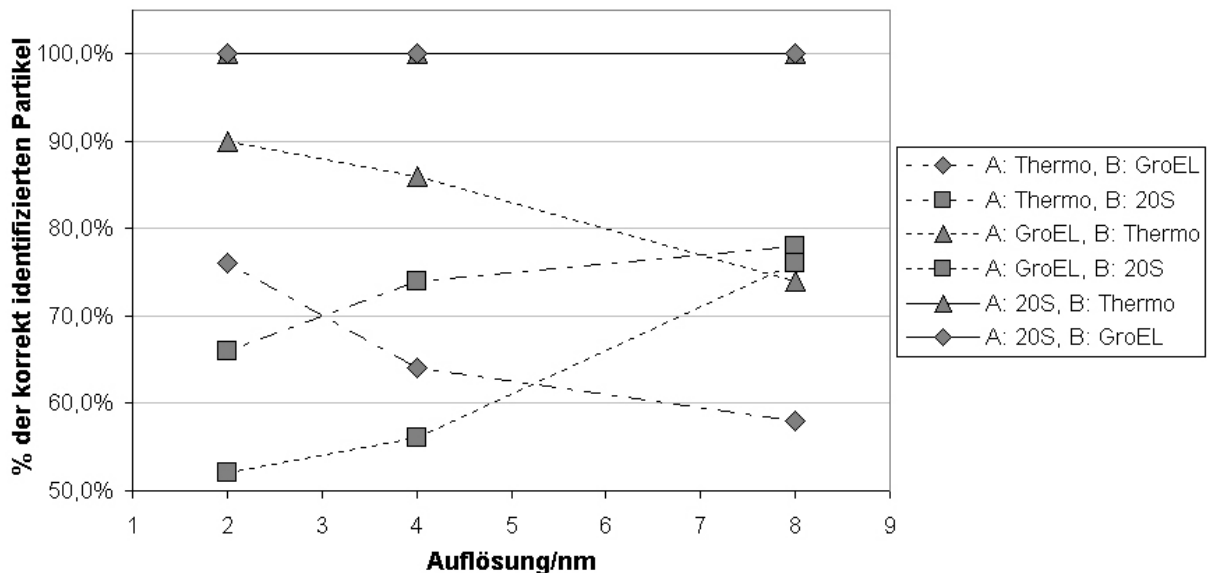


Abbildung 4.14 Identifikation der Partikel in den simulierten Tomogrammen bei verschiedenen Auflösungen.

Es zeigt sich, dass das 20S Proteasom in jedem Fall von Thermosom- und GroEL-Partikeln unterschieden werden kann. Für die beiden anderen Partikel ergibt sich ein differenzierteres Bild: Das Thermosom und GroEL können bei hoher Auflösung sehr gut voneinander getrennt werden, wohingegen zur Unterscheidung von GroEL und 20S Proteasom, bzw. Thermosom und 20S Proteasom eine niedrigere Auflösung von 8 nm ausreichend ist.

Eine Erklärung dieses Verhalten ist in der gleichen Größe, bzw. der unterschiedlichen Feinstruktur von Thermosomen und GroEL zu sehen. Um diese Partikel zu identifizieren, muss die hochfrequente Feinstruktur der beiden Partikel mit in den Korrelationsprozess einbezogen werden. Bei einer Auflösung von 8 nm ist dies jedoch nicht der Fall, die hohen Frequenzen sind abgeschnitten. Beide Partikel erscheinen als Tonne mit ca. 15,5 nm



Durchmesser, das wesentliche Unterscheidungsmerkmal bei dieser Auflösung ist lediglich die unterschiedliche Symmetrie (sieben- bzw. achtfach).

Im Fall des 20S Proteasoms als Referenzpartikel ist dies genau umgekehrt. Das wesentliche Unterscheidungskriterium ist die unterschiedliche Größe, wohingegen die Feinstruktur der Partikel relativ ähnlich ist, beim Vergleich von 20S Proteasom und GroEL ist darüber hinaus auch die Symmetrie gleich. Die niederfrequente Größeninformation reicht hier für eine erfolgreiche Unterscheidung aus. Werden die hohen Frequenzen- und damit auch ein großer Teil des Rauschens – wie z. B. bei 2 nm Auflösung mitkorreliert, ist eine Unterscheidung nicht möglich.

Als ein weiteres Maß für die Identifikationsqualität wurde die ein statistischer Signifikanztest durchgeführt. Dieser Hypothesentest prüft anhand der statistischen Verteilung der Korrelationswerte, inwieweit eine Aussage „bei Partikel 1 handelt es sich um die Partikelsorte A“ nur rein zufällig richtig ist, oder aber statistisch signifikant. Voraussetzung für diesen Test ist eine Normalverteilung der Experimente. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  sei durch

$$\alpha(q) = 1 - \frac{2}{\sqrt{2\pi}} \int_0^q e^{-\frac{1}{2}x^2} dx \quad (40)$$

gegeben [Bronstein und Semendjajew 1981; Papoulis 1991],

$$\text{mit } q = \frac{|\overline{KKK}_{AA} - \overline{KKK}_{AB}|}{\sqrt{\frac{\sigma_{AA}^2}{n_{AA}} + \frac{\sigma_{AB}^2}{n_{AB}}}}, \quad (41)$$

wobei  $\sigma$  die Standardabweichung bei  $n$  Experimenten ist.

In Tabelle 4.1 sind die Werte für alle Simulationen angegeben. Als kritisch erweist sich die Unterscheidung eines GroEL-Partikels, welches mit einem 20S Proteasom als Referenz verglichen wird. Eine Unterscheidung ist bei 2 und 4 nm Auflösung nicht möglich, da die gleiche Symmetrie und die ähnliche Feinstruktur hier wegen des hohen Rauschanteils sehr ähnliche Korrelationswerte liefern. Erst bei 8 nm Auflösung macht sich die unterschiedliche Größe der beiden Partikel deutlich bemerkbar.

Vol		Thermo	GroEL	20S
	2 nm	<del></del>	2%	<1%
Thermo	4 nm	<del></del>	7%	<1%
	8 nm	<del></del>	33%	<1%
	2 nm	<1%	<del></del>	66%
GroEL	4 nm	5%	<del></del>	40%
	8 nm	25%	<del></del>	<1%
	2 nm	<1%	<1%	<del></del>
20S	4 nm	<1%	<1%	<del></del>
	8 nm	<1%	<1%	<del></del>

Tabelle 4.1 Die nach Gleichung 40 berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit für alle durchgeführten Simulationsrechnungen.

### 4.3 Identifikation von Makromolekülen in Phantomzellen

In Kapitel 4.1 und 4.2 wurden die Detektionswahrscheinlichkeiten der entwickelten Identifikationsalgorithmen mit Hilfe zweier relativ stark idealisierter Modellsysteme - zum einen Rekonstruktionen aufgereinigter Proteinkomplexe, zum anderen simulierte Kippserien - analysiert und getestet. Die im folgendem Abschnitt beschriebenen Experimente hatten zum Ziel, die Algorithmen auf ein realistischeres Modellsystem anzuwenden, nämlich sogenannte ‚Phantomzellen‘. Hierbei handelt es sich um Lipidvesikel, deren Membran makromolekulare Komplexe verschiedener Spezies und unterschiedlicher Konzentration umschließt. Im Vergleich zu tatsächlichen biologischen Zellen kann aufgrund der bekannten Zusammensetzung des ‚Zellinhalts‘ eine statistische Aussage zur Identifikationswahrscheinlichkeit getroffen werden. Zusätzlich ist durch die reduzierte Proteinkonzentration die Qualität der Rekonstruktionen erhöht und die Identifikation somit vereinfacht.

#### 4.3.1 Biochemische Präparation der Phantomzellen

Ein Hauptproblem bei der Präparation der Phantomzellen war es, die nicht in den Vesikeln eingeschlossenen makromolekularen Komplexe aus dem Puffermedium zu entfernen. Dieser Schritt ist notwendig, da sonst die freien Moleküle die Phantomzellen während der tomographischen Datenaufzeichnung verdecken und dadurch die Qualität der Rekonstruktion verschlechtern. Um eine möglichst hohe ‚Einschlussrate‘ zu garantieren, wurde die von Monnard et al. entwickelte Präparation der Phantomzellen [Monnard et al., 1999] von Daniela Nicastro modifiziert und verbessert.

Als Testmoleküle dienten wiederum in *Escherichia coli* überexprimierte  $\alpha$ -Thermosomen aus *Thermoplasma acidophilum* [Gutsche et al., 2000] und ebenfalls in *Escherichia coli* überexprimierte 20S Proteasomen aus *Rhodococcus erythropolis* [Mayr et al., 1998]. Die tiefgefroren in Glycerin gelagerten 20S Proteasomen wurden hierzu durch Dialyse gegen 1 l

Tris-Puffer aufgereinigt und durch Zentrifugation mit einem 10k Spin-Filter aufkonzentriert. Das Lipid (1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin von Avanti Polar Lipids) wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml in Chloroform gelöst. 150  $\mu$ l dieser Lösung wurden am Boden eines dünnen Reagenzglases Vakuum-getrocknet. Der Lipidfilm wurde in 100 mM Tris Puffer gelöst und bei Raumtemperatur stark gevortext. Die hierbei entstandenen - noch leeren - Vesikel wurden 10 Minuten in ein Ultraschallbad getaucht. Anschließend wurden die einzuschließenden Proteine hinzugegeben und die Mischung erneut gevortext. Die Vesikel wurden durch einen 10-fach wiederholten Einfrier- und Auftauzyklus aufgeschlossen (2 Minuten in flüssigem Stickstoff, gefolgt von 3 Minuten im 30 °C Wasserbad). Der Aufschluss der Vesikel beim Einfrieren und die Bildung neuer Vesikel beim Auftauen garantiert eine gleichmäßige Verteilung der Proteine innerhalb und außerhalb der Vesikel. Nach einer 1:1 Verdünnung mit Tris-Puffer wurde das nicht in die Vesikel eingeschlossene Protein durch Filterung mit einer Nickel-Spin-Affinitätssäule aus dem Puffer entfernt (sowohl 20S Proteasomen als auch  $\alpha$ -Thermosomen sind mit einem zugänglichen His-Tag versehen). Die Säule wurde hierbei zuerst mit 600  $\mu$ l Tris-Puffer gespült, dann mit 200  $\mu$ l 0.5 M Imidazol in 0.1 M Tris gewaschen und anschließend noch zweimal mit 600  $\mu$ l Tris-Puffer gespült.

#### 4.3.2 Aufzeichnung der Kippserien und 3D-Rekonstruktionen

5  $\mu$ l der Phantomzellenlösung wurden auf mit 5 und 10 nm großen Goldmarkern versehene löchrige Lacey-Carbon Mikroskopgrids aufpipettiert, die überstehende Lösung wurde mit Filterpapier entfernt. Die Grids wurden in flüssiges Ethan eingeschossen und in einen Gatan-Kryomikroskophalter eingesetzt. Die tomographischen Kippserien wurden am CM 300 FEG bei 300 kV und einem nominellen Unterfokus von 8 bis 10  $\mu$ m aufgenommen. Die Pixelgröße auf Objektebene betrug für alle durchgeführten Experimente 0.72 nm. Der Kippwinkelbereich reichte typischerweise von  $-70^\circ$  bis  $+70^\circ$  und wurde mit  $1.5^\circ$  bis  $2^\circ$  Inkrement abgetastet, wobei die Belichtungszeit  $t_\alpha$  mit  $t_\alpha = t_0 / \cos \alpha$  variiert wurde. Die aufgenommenen Projektionen wurden durch manuelles Markieren der Goldmarker auf einen gemeinsamen Ursprung ausgerichtet, die Rekonstruktionen wurden durch den gewichteten Rückprojektionsalgorithmus des EM-Programmpakets berechnet [Hegerl 1996].

Die Phantomzellen waren entweder mit 100% Thermosomen, 100% 20S Proteasomen oder einer Mischung aus beiden Komplexen gefüllt. Drei jeweils orthogonale Schnitte durch die verschiedenen Rekonstruktionen sind in Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16 (Thermosomen), Abbildung 4.17 (20S Proteasomen) und Abbildung 4.18 (Mischung aus beiden) gezeigt. Die Qualität der 20S Proteasomen-Phantomzelle ist dabei auffallend besser als die anderen beiden gezeigten, was zum einen an der geringeren Dicke des abgeflachten Vesikels, zum andern an der präparativ bedingt geringeren Proteinkonzentration liegt. Wie in allen drei gezeigten Rekonstruktionen sichtbar, ist die Filtration der nicht eingeschlossenen Partikel nahezu perfekt, nur sehr wenige Komplexe sind im Puffer zu finden.

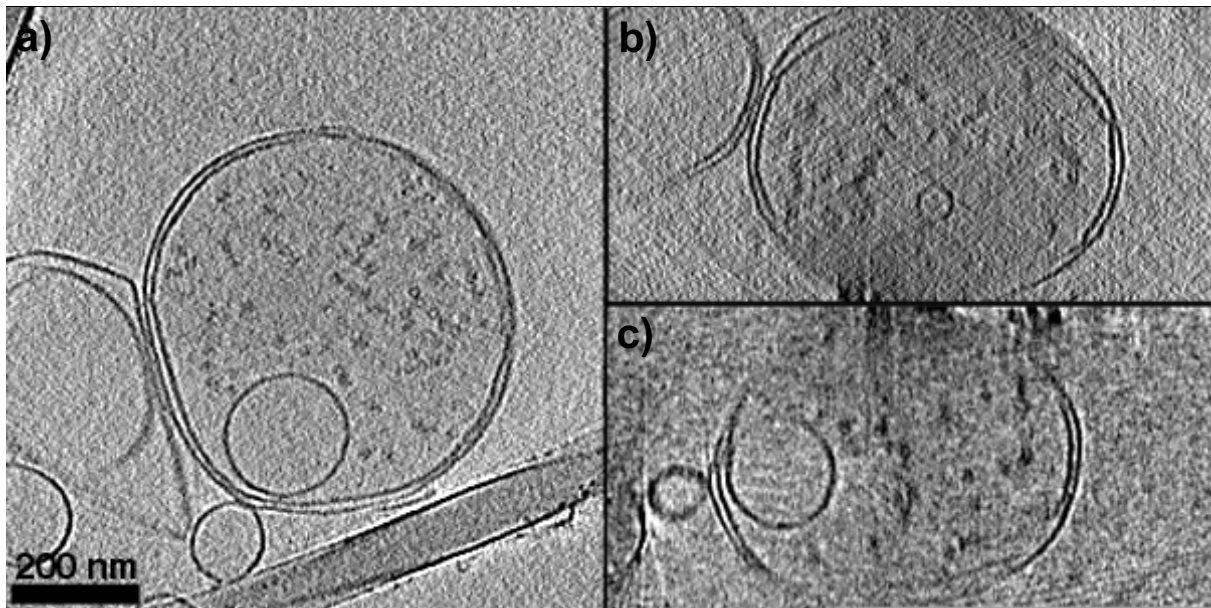


Abbildung 4.15 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer mit Thermosomen gefüllten Phantomzelle. In den Abbildungen 4.15, 4.17 und 4.18 zeigt a) jeweils einen Schnitt parallel zur x-y-Ebene, b) einen Schnitt parallel zur x-z-Ebene und c) einen Schnitt parallel zur y-z-Ebene.

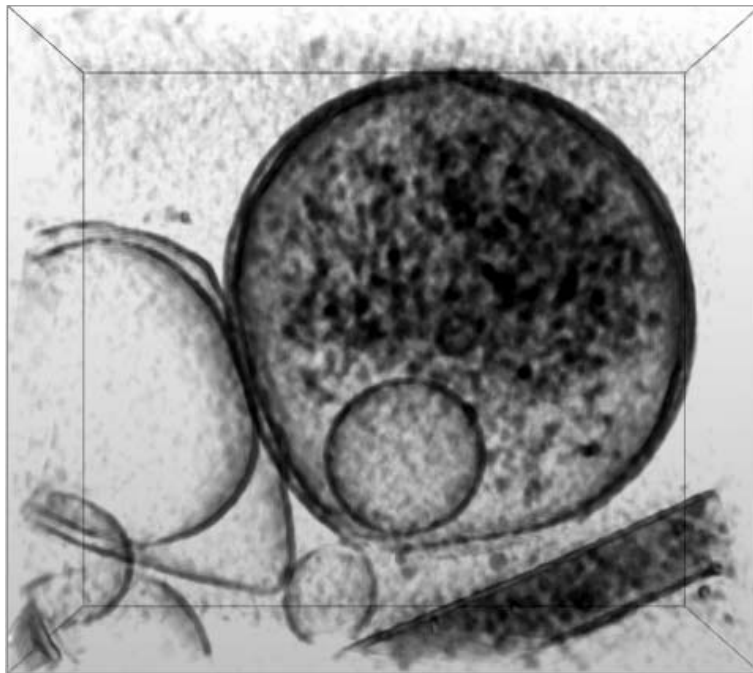


Abbildung 4.16 Volumengerechtere Darstellung einer relativ dicht mit Thermosomen gefüllten Phantomzelle.

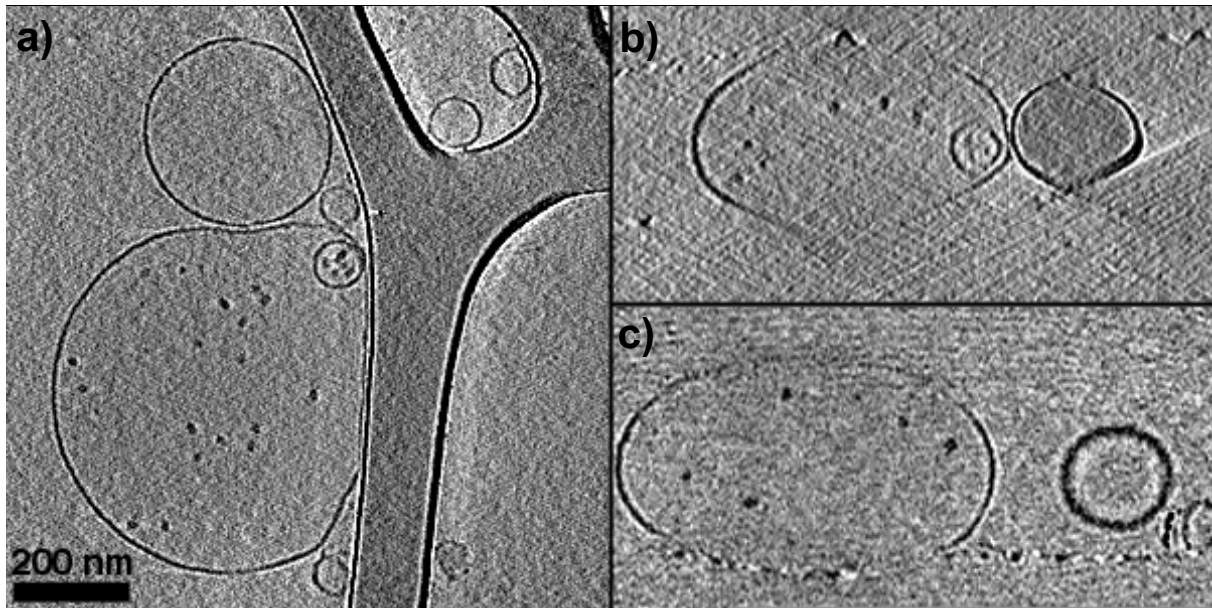


Abbildung 4.17 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer mit 20S Proteasomen gefüllten Phantomzelle. Die relativ stark abgeflachte Phantomzelle ist nur ca. 250 bis 300 nm dick.

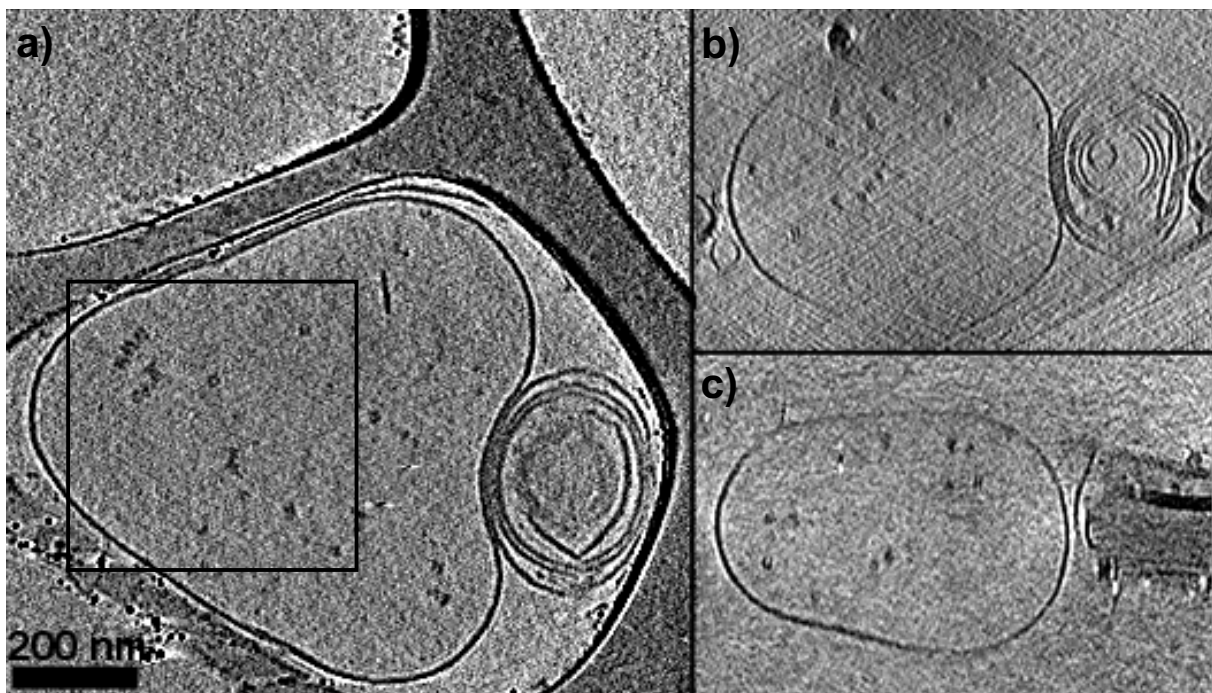


Abbildung 4.18 Senkrechte Schnitte durch die 3D-Rekonstruktion einer mit Thermosomen und 20S Proteasomen gefüllten Phantomzelle.

### 4.3.3 Identifikationsalgorithmus

Der für die Identifikation der in Phantomzellen eingeschlossenen Proteinkomplexe verwendete Algorithmus wurde im Vergleich zu der in 4.1 und 4.2 angewandten Vorgehensweise grundlegend modifiziert. In Kapitel 4.1.3 wurden durch die Anwendung von Mean-Curvature Motion aus den Rekonstruktionen Subvolumina ausgeschnitten, die mit großer Wahrscheinlichkeit Proteinkomplexe beinhalten. Die segmentierten Teilvolumina  $x$  der

Größe  $R$  wurden daraufhin mit verschiedenen Referenzpartikeln  $y$  korreliert. Der Korrelationswert ist gegeben durch (zur Vereinfachung hier nur eindimensional):

$$KK = \frac{\sum_{n=1}^R x_n y_n}{\sqrt{\sum_{n=1}^R x_n^2} \sqrt{\sum_{n=1}^R y_n^2}} \quad (42)$$

Wie bereits in Kapitel 2.7 gezeigt, ist diese Vorgehensweise in Bezug auf die Rechenzeit nicht ideal, statt dessen wird die Korrelation mit wesentlich größeren Volumina durchgeführt (Größe  $N$ ). Rechner mit einem entsprechend großen Hauptspeicher standen für die Identifikation der Proteinkomplexe in Phantomzellen zur Verfügung, so dass im folgenden  $256^3$  Voxel große Volumina verglichen wurden. Die Referenzstruktur der Größe  $R$  wird hierzu in ein Referenzvolumen der Größe  $z$  eingepasst. Innerhalb des Referenzvolumens sind hierbei nur wenige der Voxel tatsächlich mit Strukturinformation belegt, der Großteil des Referenzvolumens ist null.

Um zum einen den durch die Korrelation großer Volumina möglichen Zeitvorteil ausnutzen zu können, und zum anderen ein zu Formel 42 identisches Ergebnis zu erzielen, muss die Korrelation umformuliert werden. Die Korrelationsfunktion ist gegeben durch:

$$KK(k) = \frac{\sum_{n=1}^N x_{n-k} z_{n-k} \text{mask}(n-k)}{\sqrt{\sum_{n=1}^R x_{n-k}^2} \sqrt{\sum_{n=1}^R z_{n-k}^2}} = \frac{\sum_k^{k+R} x_k z_k}{\sqrt{\sum_k^{k+R} x_n^2} \sqrt{\sum_k^{k+R} z_n^2}}, \text{ wobei } \text{mask}(n) = \begin{cases} 1 & \text{für } k \leq n \leq R \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (43)$$

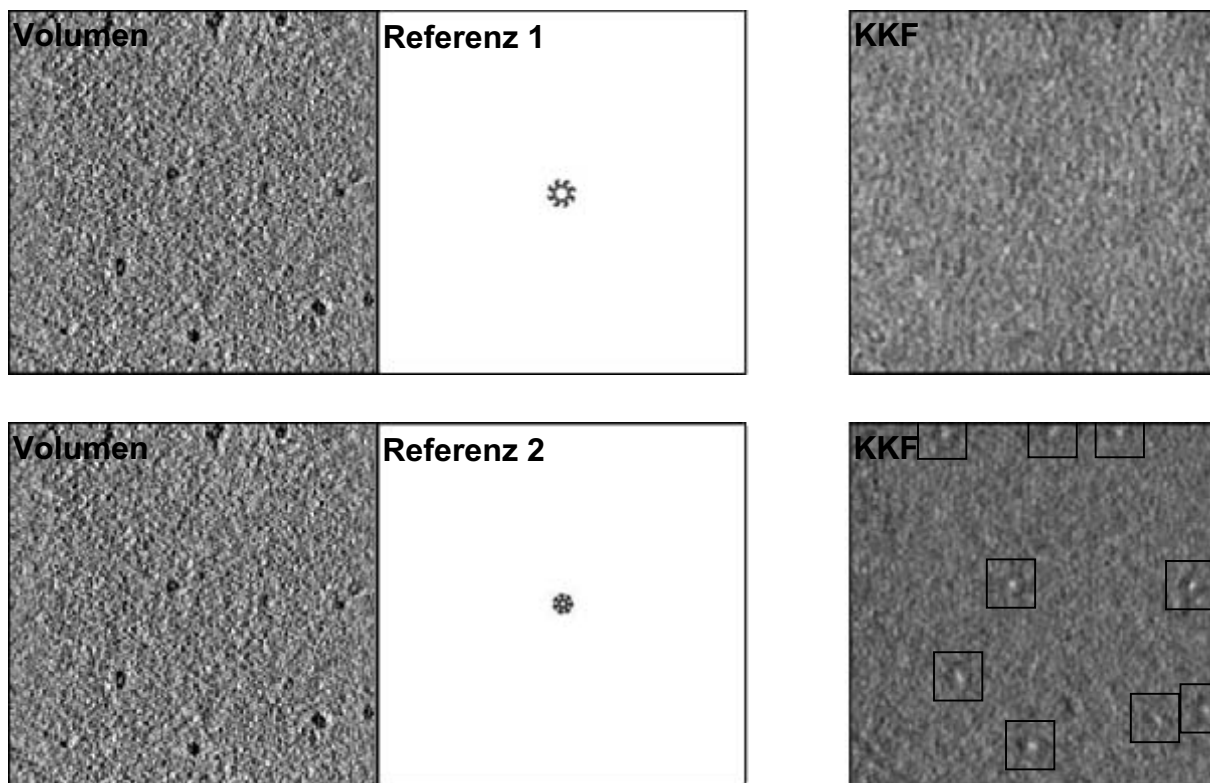
Bis auf den Normierungsterm  $\sqrt{\sum_k^{k+R} z_n^2}$  ist dieser Ausdruck identisch zu Formel 42. Für die

korrekte Gewichtung der Korrelationsfunktion ist also eine spezielle Vorgehensweise notwendig. Dabei wird zuerst an jedem Ort des zu untersuchenden Volumens der lokale Mittelwert abgezogen und die lokale Energie  $E(k)$  berechnet ( $E(k) = \sum_{n=k}^{k+R} |x(n)|^2$ ). Die Größe

des für die Energieberechnung verwendeten kugelförmigen Kerns ist dabei durch  $R$  gegeben. Auf Grund der Rotationsinvarianz muss diese Berechnung nicht für jeden möglichen Eulerwinkel durchgeführt werden, sondern nur einmal. Weiterhin wird die Energie des Referenzpartikels berechnet. Diese Vorgehensweise garantiert, dass lokal der tatsächliche Korrelationskoeffizient berechnet wird. Das Korrelationsvolumen wird wiederum für jede mögliche Kombination von Eulerwinkeln berechnet. Für diesen Rechenschritt stand ein von Stephan Nickell optimiertes und parallelisiertes Programm zur Verfügung („oscar“), das sowohl die Multiprozessorfähigkeit der abteilungseigenen Rechner nutzt, als auch auf verschiedenen Großrechnern der MPG in Garching oder des Leibniz-Rechenzentrums anwendbar ist. Die Rechenzeit für eine Korrelationsberechnung bei einem  $256^3$ -Volumen beträgt dabei auf einem Prozessor etwa 40s, so dass der komplette Winkelraum innerhalb eines Tages abgetastet werden kann. Größere Volumina können momentan nicht prozessiert

werden; der limitierende Faktor ist wiederum durch die Größe des Hauptspeichers der zur Verfügung stehenden Rechner gegeben.

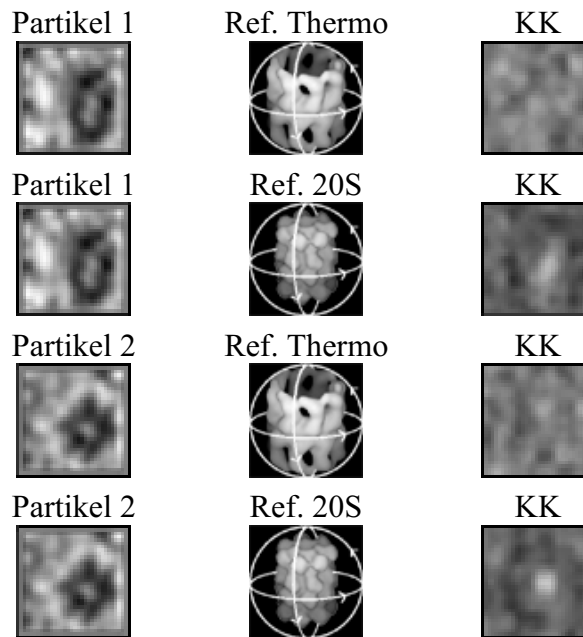
Vor der Anwendung der Identifikationsalgorithmen wurden die zu untersuchenden Volumina einmal unterabgetastet und ein geeigneter Bereich ausgeschnitten. Die Korrelationen und die Abtastung des Winkelraumes (mit  $6^\circ$ , bzw.  $10^\circ$  Inkrement) wurden mit Hilfe von „oscar“ durchgeführt, anschließend wurden die Volumina entsprechend 4.3.3 gewichtet. In Abbildung 4.19 ist ein Schnitt durch ein rekonstruiertes Volumen, Schnitte durch die verwendeten Referenzen sowie Schnitte durch die resultierenden nicht-linearen Korrelationsfunktionen gezeigt.



**Abbildung 4.19** x-y-Schnitt durch eine rekonstruierte 20S Phantomzelle (links). Die rekonstruierten Volumina wurden mit Thermosomen und 20S Referenzpartikeln korreliert (Mitte, nicht maßstabsgetreu dargestellt). Auf der rechten Seite sind die korrespondierenden nicht-linearen Korrelationsfunktionen gezeigt. Die selektierten Maxima dienen als Eingabeliste für den folgenden Feinkorrelationsschritt.

Die Korrelationsfunktion zeigt im Falle der den rekonstruierten Partikeln korrespondierenden Referenzen klare Maxima, wohingegen die ‚falsche‘ Referenz nur einzelne, dem Rauschen zuzuordnende Spitzen aufweist. Die durch die nicht-lineare Korrelation gefundenen Koordinaten der Maxima können folglich zur Erzeugung von Subvolumina verwendet werden, welche mit großer Wahrscheinlichkeit Partikel enthalten. Die Subvolumina werden in einem zweiten Korrelationsschritt nochmals linear mit den Referenzstrukturen korreliert, der Winkelbereich wird jedoch feiner abgetastet (dieser Schritt wurde mit Hilfe des EM-Programmsystems realisiert und wird mit  $5^\circ$  Inkrementsschritten durchgeführt). In Abbildung 4.20 sind Schnitte durch zwei repräsentative Subvolumina und die entsprechenden Korrelationsfunktionen gezeigt. Das Korrelationsmaximum ist bei der Verwendung der 20S

Proteasomen Referenz wesentlich stärker ausgeprägt, so dass die Partikel eindeutig als 20S Proteasomen identifiziert werden können.

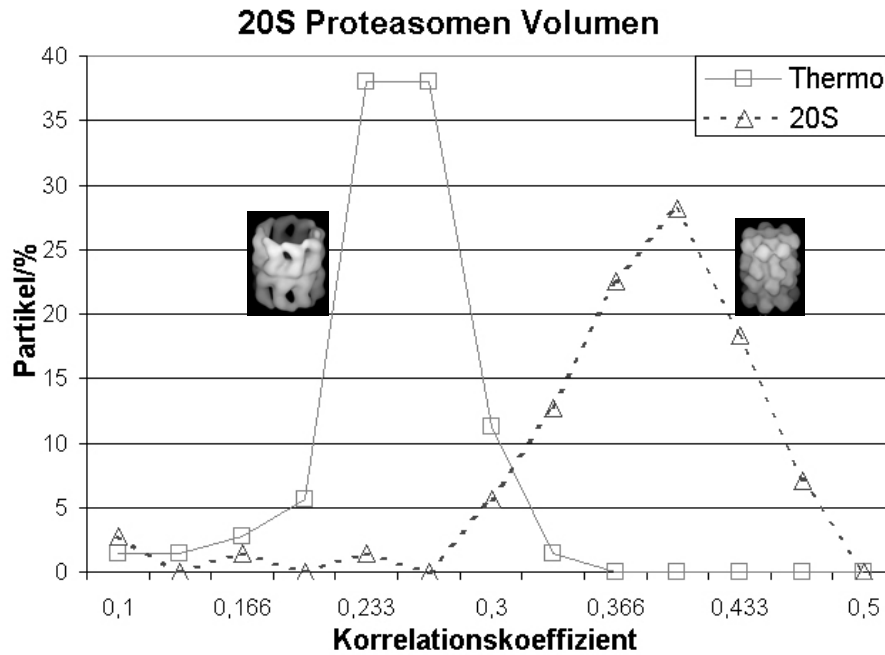


**Abbildung 4.20** Die ausgeschnittenen Subvolumina werden nochmals mit feinerer Winkelabtastung mit den Referenzstrukturen korreliert. Die hier dargestellten Partikel wurden aus der 20S Proteasom-Phantomzelle extrahiert.

#### 4.3.4 Identifikation der Proteinkomplexe in 20S Proteasomen-Phantomzellen

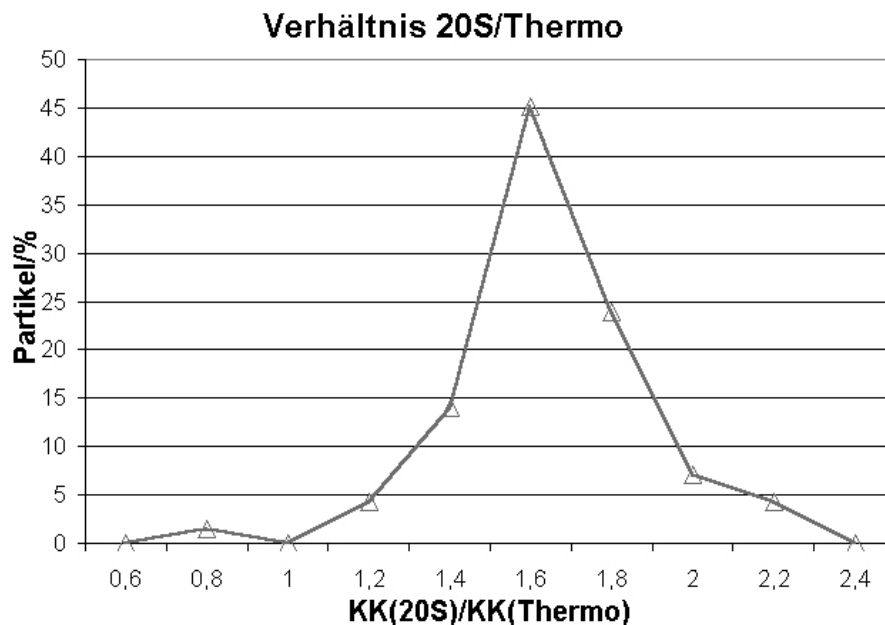
Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wurden über 70 20S Proteasom-Partikel, wie im vorgehenden Abschnitt beschrieben, aus Phantomzellen extrahiert und mit beiden Referenzen korreliert. Die Identifikationsergebnisse sind in Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22 zusammengefasst. Die erste Abbildung zeigt dabei die Verteilung der absoluten Korrelationswerte. Bei der Korrelation der 20S Proteasomen-Volumina mit der Thermo-Referenz ergibt sich im Mittel ein Korrelationskoeffizient von  $0.23 \pm 0.035$  (Standardabweichung). Die Korrelation mit der ‚richtigen‘ 20S Referenz resultiert in einem über 1.5-fach höheren mittleren Korrelationskoeffizienten von  $0.359 \pm 0.069$ . Diese Werte sind durchaus mit den durch Simulation tomographischer Kippserien (siehe 4.2) gewonnenen Koeffizienten vergleichbar. Bei einer Auflösung von 4 nm ergaben sich für den 20S Proteasom - 20S Proteasom Vergleich ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient von 0.35, für den 20S Proteasom-Thermosom-Vergleich war der Wert 0.16.





**Abbildung 4.21** Verteilung der Korrelationskoeffizienten der aus den 20S Proteasomen-Phantomzellen extrahierten Partikel.

Der direkte Vergleich der Korrelationskoeffizienten ist in Abbildung 4.22 aufgetragen. Nur bei einem 20S Proteasom-Partikel ist der Thermosomen-Korrelationskoeffizient fälschlicherweise höher als der 20S-Korrelationskoeffizient. Über 95% der Partikel konnten somit richtig identifiziert werden.



**Abbildung 4.22** Verhältnis der Korrelationskoeffizienten beim Vergleich der 20S Proteasom-Partikel mit der 20S Proteasom- und der Thermosom-Referenz.

### 4.3.5 Identifikation der Proteinkomplexe in Thermosom-Phantomzellen

Bei der Identifikation der aus Thermosomen-Phantomzellen gewonnenen Partikeln ergibt sich bei der Korrelation mit der Thermosom-Referenz ein mittlerer Korrelationskoeffizient von  $0.221 \pm 0.044$ , der Vergleich mit der 20S Proteasom-Referenz ergibt einen Wert von  $0.168 \pm 0.031$  (siehe Abbildung 4.23). Die bessere Korrelation der Thermosomen mit der Thermosom-Referenz reicht aus, um über 90% der Partikel korrekt zu identifizieren (Abbildung 4.24). Im Mittel korreliert hier die ‚richtige‘ Referenz 1.32-fach besser als die ‚falsche‘. Auch bei diesem Experiment ergibt sich eine sehr gut Übereinstimmung zu den simulierten Daten aus Kapitel 4.2. Bei einer Auflösung von 4 nm ergeben sich mittlere Korrelationskoeffizienten von 0.253 beim Vergleich mit einer Thermosom-Referenz und 0.152 bei der 20S Proteasom-Referenz.

Im Vergleich zu den Partikeln aus der 20S Proteasomen-Phantomzelle ist die Identifikationsstatistik im Falle der Thermosomen-Phantomzelle klar schlechter. Für dieses Verhalten sind zwei Gründe anzuführen:

Zum einen ist die Thermosomen-Phantomzelle dicker als die 20S Proteasomen-Phantomzelle (vgl. Abbildung 4.15 und Abbildung 4.17), zum anderen ist die Konzentration der 20S Proteasomen wesentlich geringer. Beide Effekte tragen zu einer besseren Qualität der 20S Proteasomen-Rekonstruktion bei. Weiterhin handelt es sich bei der Thermosom-Referenz nur um ein quasi-atomares Modell (vgl. 4.1.2). Die zur Erzeugung dieses Modells verwendete Röntgenstruktur des geschlossenen Thermosoms [Ditzel et al., 1998] weist vor allem an den Termini schlecht definierte Bereiche auf, so dass mehr als 10% aller Aminosäuren nicht im atomaren Modell enthalten sind. Hiervon sind vor allem die äquatorialen Domänen betroffen, die im Röntgenmodell, im Gegensatz zu EM-Struktur, fast komplett fehlen. Eine Gleichheit der Referenzstruktur und der im Mikroskop abgebildeten Thermosom-Struktur - und somit eine perfekte Korrelation der beiden Strukturen - ist also a priori nicht gegeben.

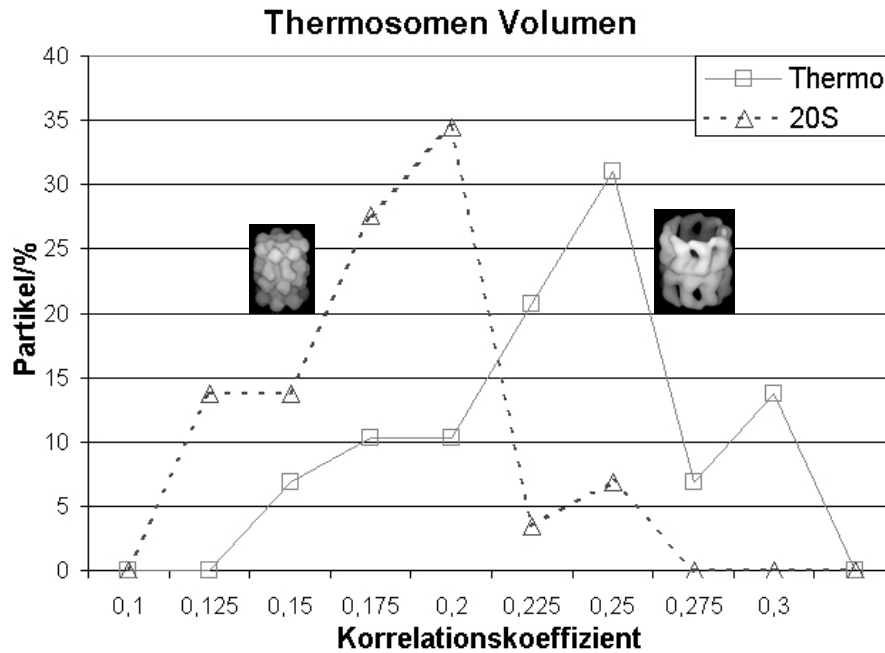


Abbildung 4.23 Verteilung der Korrelationskoeffizienten der aus den Thermosomen-Phantomzellen extrahierten Partikel.

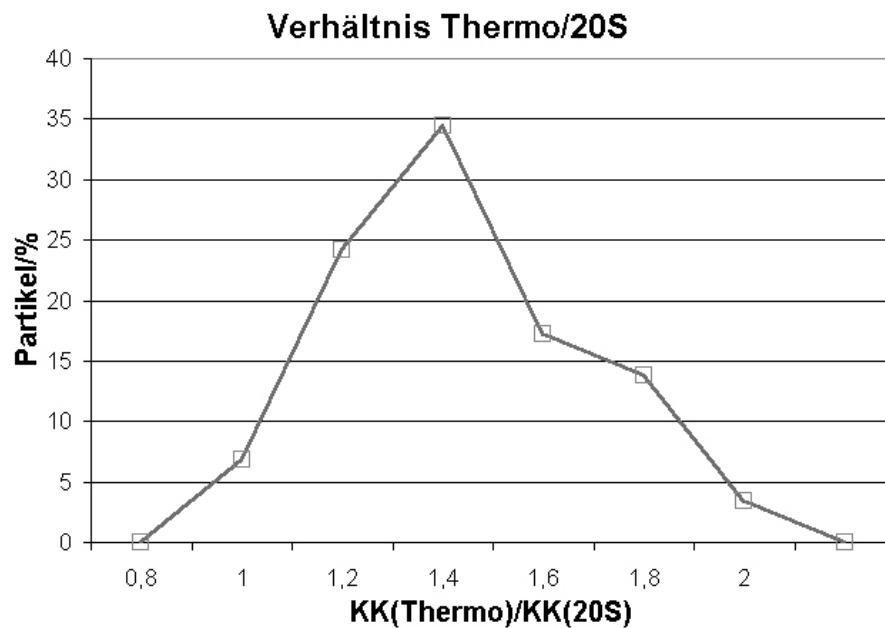


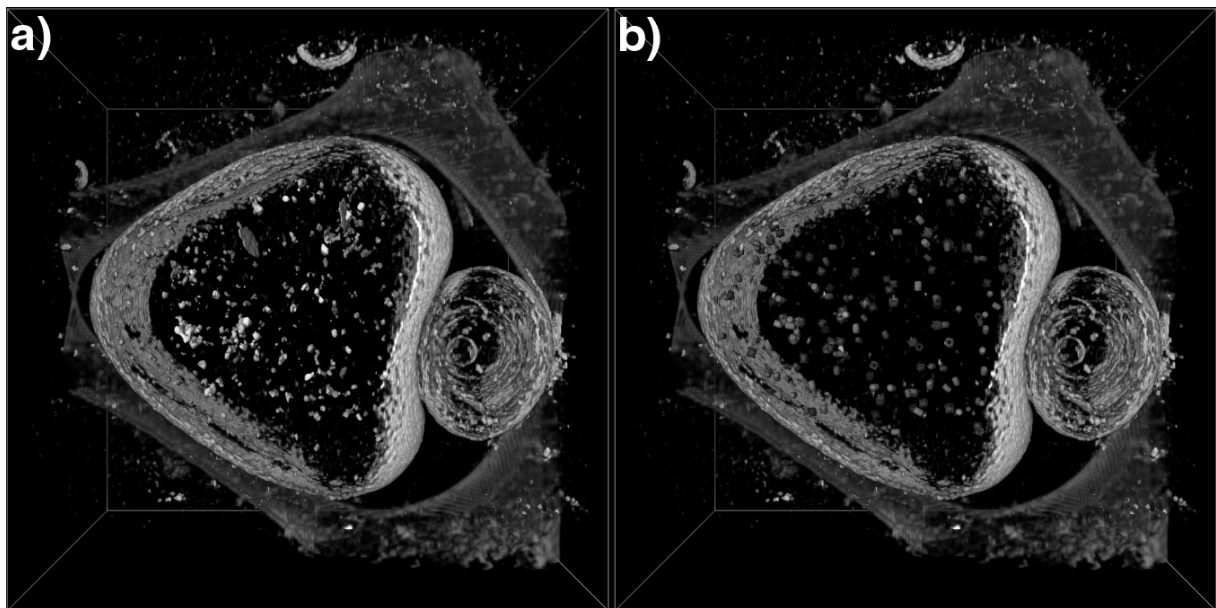
Abbildung 4.24 Verhältnis der Korrelationskoeffizienten beim Vergleich der Thermosom-Partikel mit der Thermosom- und der 20S Proteasom-Referenz.

### 4.3.6 Identifikation der Proteinkomplexe in 20S Proteasomen/Thermosomen-Phantomzellen

Ein wesentlicher Vorteil der 20S Proteasomen-Phantomzellen und der Thermosomen-Phantomzellen zur statistischen Beurteilung der Identifikationsergebnisse ist die genaue Kenntnis des Proteininhaltes. Bei den rekonstruierten Phantomzellen mit gemischtem 20S Proteasom/Thermosom-Inhalt ist eine solche statistische Aussage nicht möglich, da die

relative Konzentration der Proteinkomplexe innerhalb der Phantomzellen nicht genau genug bestimmt werden kann. Zu einer solchen Bestimmung wäre der Aufschluss der Phantomzellen nach der Filterung der nicht in den Vesikeln eingeschlossenen Proteinkomplexe durch eine Nickel-Spin-Affinitätssäule nötig. Unter der Annahme, dass nur ca. 0.1% der Proteinkomplexe tatsächlich in Vesikel eingeschlossen sind wären für eine Konzentrationsbestimmung sehr große Mengen an Protein erforderlich. Da aber vor allem das 20S Proteasom nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung stand, wurde auf eine solche Bestimmung verzichtet.

Unter der Annahme, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen mehr als 90% der Partikel richtig identifiziert werden können, kann auf Grund der Identifikationsergebnisse von einem Thermosom/20S Proteasom-Verhältnis von 1:0.93 ausgegangen werden. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht verifiziert werden und eine statistische Aussage ist somit nicht möglich. Eine mit Thermosomen und 20S Proteasomen gefüllte Phantomzelle und die darin identifizierten Partikel ist in Abbildung 4.25 dargestellt.



**Abbildung 4.25 (a) Eine volumengerenderte Darstellung einer 20S Proteasomen/Thermosomen-Phantomzelle (vgl. Abbildung 4.18). Das Ergebnis der angewandten Identifikationsprozedur ist in (b) dargestellt. An die Stelle der identifizierten Proteinkomplexe wurde ein entsprechendes oberflächengerendertes Partikel eingefügt. 52% der Partikel wurden als Thermosomen, 48% als 20S Proteasomen identifiziert.**

## Kapitel 5

### 5. Diskussion und Ausblick

Die automatisierte Kryo-Elektronentomographie ist derzeit die einzige Technik, um ganze Zellen in ihrer natürlichen Umgebung dreidimensional mit molekularer Auflösung abzubilden. Die von Rudo Grimm durchgeführten Experimente an einem 120 kV Elektronenmikroskop haben bereits gezeigt, dass einzelne makromolekulare Komplexe innerhalb der Zelle abgebildet werden können [Baumeister et al., 1999]. Diese Komplexe anhand ihrer strukturellen Signatur zu identifizieren, war jedoch bei der erzielten Auflösung von etwa 8 nm nicht möglich. Die Qualität der Tomogramme wurde durch die Installation eines Mittelspannungsmikroskops, das Anbringen eines verbesserten Energiefilters, sowie die Adaption der vorhandenen Steuersoftware an die neuen Rahmenbedingungen wesentlich verbessert.

Die Abbildungsbedingungen wurden durch den Vergleich von am CM 120 Biofilter und am CM 300 FEG aufgenommenen Rekonstruktionen quantifiziert. Hierzu wurde ein Modellsystem zum Transfer viraler DNS in eine Phantomzelle unter identischen präparativen Bedingungen untersucht. Wichtige strukturelle Details, die in den am CM 120 Biofilter aufgenommenen Rekonstruktionen verborgen bleiben, werden in der bei 300 kV aufgenommenen Rekonstruktionen deutlich: Sowohl die 2.5 nm dicke DNS-Doppelhelix innerhalb der Vesikel als auch die nur 2 nm dicken antennenartigen Beine des Virus sind klar sichtbar. Der Virenschwanz kann zusätzlich als hohle Röhre aufgelöst werden. Der Vergleich mit simulierten Virenschwänzen zeigt, dass zwei getrennte Linien mit einer Auflösung von 2.5 nm abgebildet werden können.

Die im Vergleich zu 120 kV etwa 2-fach verbesserte Auflösung eröffnet neue Möglichkeiten zur Identifikation makromolekularer Komplexe in ihrer natürlichen zellulären Umgebung. Eine Identifizierung aufgereinigter Komplexe ist zwar schon bei 120 kV gegeben, die durchgeführten Simulationen zeigen jedoch, dass für die Erkennung sehr ähnlicher makromolekularer Komplexe (> 700 kDa) in Elektronentomogrammen ‚dicker‘ Präparate durch den Vergleich mit einer strukturell gut definierten Referenzstruktur eine Auflösung von mindestens 4 nm nötig ist. Die Anwendung der Identifikationsalgorithmen auf proteingefüllte Vesikel, sogenannte ‚Phantomzellen‘ war ein weiterer Schritt, die notwendigen Machbarkeitsstudien realistischer zu machen. Die Dicke der Präparate und die

experimentellen Parameter wurden identisch zu Kippserien von kleinen ganzen Zellen gewählt. Entscheidender Unterschied zu Rekonstruktionen tatsächlicher Zellen ist zum einen die genaue Kenntnis des Inhalts der Phantomzellen, zum anderen ist die Proteindichte des ‚Zytoplasmas‘ reduziert. Auch bei diesem Modellsystem ist eine eindeutige Identifizierung der Proteinkomplexe mit der bereits vorhandenen Mikroskopausstattung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% möglich. Für eine Identifizierung in Zellen ist zum einen die erreichte Auflösung ein limitierender Faktor, zum anderen das in Elektronentomogrammen ganzer Zellen reduzierte Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Eine weitere Verbesserung der Abbildungsbedingungen ist mit der momentan in Martinsried installierten Hardware nur bedingt möglich. Auch die tomographische Steuerungssoftware bietet wenig Spielraum für technische Optimierungen. Um die Qualität der Rekonstruktionen weiter zu verbessern, bieten sich die im folgenden aufgeführten Möglichkeiten an; die Machbarkeit und das Potential dieser Optionen soll hier kurz diskutiert werden.

### ***Kryo-Dreh-Kipphalter***

Das Kryo-Präparat kann momentan im Mikroskop nur um eine Achse von ca  $-70^\circ$  bis  $+70^\circ$  gekippt werden. Diese experimentelle Beschränkung resultiert in einem Artefakt bei der Rekonstruktion der 3D-Strukturinformation, auf Grund des sogenannten ‚missing wedge‘. Der fehlende Doppelkeil von Strukturdaten in Fourier-Raum kann durch den Einsatz eines Dreh-Kipphalters zu einer Doppelpyramide verkleinert werden. Nach der Aufnahme einer ersten Einachsenkippsreihe wird das Präparat im Mikroskop  $90^\circ$  um die Strahlachse gedreht, dann wird eine zweite Kippserie aufgenommen. Die Vorarbeiten und ein erster Prototyp eines Kryo-Dreh-Kipphalters sind in Zusammenarbeit mit der Firma Gatan Inc. entstanden, und einer kommerziellen Einführung eines solchen Halters steht nichts im Wege. Die für die Rekonstruktion einer Doppelkippsreihe notwendigen Prozeduren sind bereits vorhanden und wurden schon auf erste Testkippsreihen angewandt. Die rekonstruierten Strukturen und die für die Identifikation notwendigen makromolekularen Referenzen wären strukturell ähnlicher, da zusätzliche Bereiche im Fourier-Raum mit Objektinformation gefüllt werden können. Die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten – und damit die Identifikationswahrscheinlichkeit – ist somit erhöht.

### ***He-Mikroskop***

Die gravierendste Limitation der Elektronentomographie ist die Strahlempfindlichkeit eiseingebetteter biologischer Objekte. Eine bessere Resistenz gegenüber Strahlschäden verspricht die Abkühlung der Präparate auf die Temperatur flüssigen Heliums (theoretisch 4 K, experimentell realisiert ca. 20 K). Die für die Strahlschäden verantwortlichen freien Radikale wären durch eine bei tiefen Temperaturen eingeschränkte Diffusion stärker lokalisiert. Ein erster Prototyp eines von Philips (FEI) entwickelten Helium-Mikroskops stand für erste Vortests zur Verfügung und die von Stephan Nickell zusammen mit Uwe Lücken (FEI) und Fritz Zemlin (vormals FHI der MPG) durchgeführten Experimente versprechen eine Erhöhung der während einer Kippserie möglichen Elektronendosis um mindestens einen

Faktor zwei [Nickell et al., 2001]. Bei gleicher Auflösung kann ein ca. 1.5-fach verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erwartet werden, was durch den direkten Zusammenhang zwischen dem SRV und der Höhe der Kreuzkorrelationskoeffizienten [Frank 1996] zu ca. 30-40% erhöhten Korrelationskoeffizienten führt.

### ***Kryo-Schnitte ganzer Zellen***

Die zelluläre Elektronentomographie ist momentan entweder auf sehr dünne Archaeobakterien oder auf aufgereinigte Zellorganellen beschränkt [Grimm et al., 1998; Nicastro et al., 2000]. Der Durchbruch der Elektronentomographie ganzer Zellen als Standardtechnik in der Zellbiologie und der medizinischen Forschung wird wesentlich von der technischen Verbesserung bei der Herstellung von Kryo-Schnitten abhängen. Nur in Kombination mit dieser neuartigen Technik wird es möglich sein, wissenschaftlich und medizinisch hochrelevante Systeme (wie z. B. unbehandelte Nerven- oder Krebszellen) mit molekularer Auflösung 3D abzubilden. Versuche, eiseingebettete Präparate unter Kryo-Bedingungen zu schneiden, sind schon so alt wie die Kryo-Elektronenmikroskopie selbst [McDowall et al., 1983]. Nach fast zwei Jahrzehnten scheint es jedoch nun durch vibrierende Klappen erstmals möglich zu sein, artefaktfreie Schnitte herzustellen [Studer und Gnägi 1999]. Die technisch äußerst aufwendige Umsetzung dieser Technik und die artefaktfreie Applikation auf ganze Zellen bedarf jedoch in den nächsten Jahren noch erheblicher Anstrengungen.

Die Elektronentomographie eiseingebetteter Zellen bietet großes Potential und die einmalige Möglichkeit, Proteine im zellulären Kontext zu lokalisieren und zu identifizieren. Einen entsprechenden technischen Einsatz vorausgesetzt, kann die Auflösungslücke zwischen konfokaler Lichtmikroskopie und der Röntgenstrukturanalyse überbrückt werden. Dies würde erstmals die Lücke zwischen Zellbiologie und Strukturbiologie schließen.





## 6. Abkürzungen

2D/3D	Zwei-/Dreidimensional
CCD	Charged-coupled device
CM 120 Biofilter	120 kV Elektronenmikroskop der Firma FEI-Philips (Eindhoven, NL)
CM 300 FEG	300 kV Elektronenmikroskop der Firma FEI-Philips (Eindhoven, NL)
FEG	Field emission gun, Feldemissions-Kathode
FRC	Fourier-Ringkorrelation
GIF	Gatan Imaging Filter (Gatan Inc., Pleasanton, CA)
KKK	Kreuzkorrelationskoeffizient
MCM	Mean-Curvature Motion
MFW	Mittlere freie Weglänge
SRV	Signal-zu-Rausch-Verhältnis

## 7. Formeln und Konstanten

Elementarladung:	$e = 1.602189 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Lichtgeschwindigkeit:	$c = 2.99792458 \cdot 10^8 \text{ m/s}$
Dielektrizitätskonstante:	$\epsilon_0 = 8.8542 \cdot 10^{-12} \text{ As/Vm}$
Ruhemasse des Elektrons:	$m_0 = 9.10953 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
Ruheenergie des Elektrons:	$E_0 = m_0 c^2 = 511 \text{ keV}$
Plancksches Wirkungsquantum:	$h = 6.626176 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
Bohrscher Radius:	$a_H = h^2 \epsilon_0 / \pi m_0 e^2 = 0.529177 \cdot 10^{-10} \text{ m}$
Atomradius:	$R = a_H Z^{1/3}$
Dichte:	amorpher Kohlenstoff: $1 \text{ g/cm}^3$ amorphes Eis: $0.97 \text{ g/cm}^3$
Avogadro-Konstante:	$NA = 6.02205 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Atomare Masseneinheit Dalton (Da):	$(1/12) \cdot m(^{12}\text{C}) = 1.66055 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
Ångström:	$1 \text{ \AA} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$
Brechungsindex:	$n$
Kernladungszahl:	$Z$
Atomgewicht:	$A$
Beschleunigungsspannung:	$U$
kinetische Energie des Elektrons:	$E = eU$
Geschwindigkeitsverhältnis:	$\beta = v/c = \sqrt{1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{E}{E_0}\right)^2}}$
Wellenlänge des Elektrons:	$\lambda = hc(2EE_0 + E^2)^{-1/2}$

## 8. Literaturverzeichnis

M. H. Adams (1959): *Bacteriophages*. Wiley (Interscience), New York.

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

B. L. Armbruster, E. Carlemalm, R. Chiovetti, R. M. Gavarito, J. A. Hobot und E. Kellenberger (1982): Specimen preparation for electron microscopy using low temperature embedding resins. *Journal of Microscopy* **126**: 77-85.

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

W. Baumeister und A. C. Steven (2000): Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 624-630.

W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl und E. Seemüller (1998): The Proteasome: Paradigm of self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**: 367-380.

H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**: 235-242.

J. Böhm, A. S. Frangakis, R. Hegerl, S. Nickell, D. Typke und W. Baumeister (2000): Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: Template matching applied to electron tomograms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 14245-14250.

J. Böhm, O. Lambert, A. Frangakis, L. Letellier, W. Baumeister und J.-L. Rigaud (2001): FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: A cryo-electron tomography study. *Current Biology* in press.

D. C. Boisvert, J. Wang, Z. Otwinowski, A. L. Horwich und P. B. Sigler (1996): The 2.4Å crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with gamma S. *Nature Structural Biology* **3**: 170-174.

M. Bonhivers, A. Ghazi, P. Boulanger und L. Letellier (1996): FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. *EMBO Journal* **15**: 1850-1856.

P. Boulanger, M. le Maire, M. Bonhivers, S. Dubois, M. Desmadril und L. Letellier (1996): Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochemistry* **35**: 14216-14224.

A. Bremer, C. Henn, A. Engel, W. Baumeister und U. Aebi (1992): Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy* **46**: 85-111.

I. N. Bronstein und K. A. Semendjajew (1981): *Taschenbuch der Mathematik*. 20 ed. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig.

W. Brünger und W. Menz (1965): Wirkungsquerschnitte für elastische und unelastische Elektronenstreuung an amorphen Kohlenstoff- und Germaniumschichten. *Zeitschrift für Physik* **184**: 271-285.

A. M. Cormack (1980): Early two-dimensional reconstruction (CT scanning) and recent topics stemming from it. Nobel lecture, December 8, 1979. *Journal of Computer Assisted Tomography* **4**: 658-664.

R. A. Crowther, D. J. DeRosier und A. Klug (1970): The reconstruction of a three-dimensional structure from its projections and its applications to electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society, London* **317**: 319-340.

I. Daberkow, K.-H. Herrmann, L. Liu und W. D. Rau (1991): Performance of electron image converters with YAG single-crystal screen and CCD sensor. *Ultramicroscopy* **38**: 215-223.

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 und W. Baumeister (1993): Towards automatic electron tomography. II. Implementation of autofocus and low-dose procedures. *Ultramicroscopy* **49**: 109-120.

K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. J. Koster und W. Baumeister (1992): Towards automatic electron tomography. *Ultramicroscopy* **40**: 71-87.

K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, J. Walz, E. Sackmann und W. Baumeister (1995): Three-dimensional structure of lipid vesicles embedded in vitreous ice and investigated by automated electron tomography. *Biophysical Journal* **68**: 1416-1422.

C. Dinges, A. Berger und H. Rose (1995): Simulation of TEM images considering phonon and electronic excitations. *Ultramicroscopy* **60**: 49-70.

L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, K.-O. Stetter, H. Huber, R. Huber und S. Steinbacher (1998): Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* **93**: 125-138.

Dreiseikelmann (1994): Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol. Rev* **58**: 293-316.

J. Dubochet, M. Adrian, J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz (1988): Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews in Biophysics* **21**: 129-228.

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**: 219-37.

A. D. Ferguson, E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederich und W. Welte (1998): Structural basis for siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215-2220.

A. Feucht, A. Schmid, R. Benz, H. Schwarz und K. Heller (1990): Pore formation associated with the tail-tip protein pb2 of bacteriophage T5. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 18561-18567.

A. S. Frangakis (2000): Durch MCM wird das Zentrum eines Partikels beibehalten. Persönliche Mitteilung.

A. S. Frangakis: *Noise reduction and segmentation techniques developed for multidimensional electron microscopy of biological samples*. Dissertation, Technische Universität München, 2001.

A. S. Frangakis und R. Hegerl (1999): Nonlinear anisotropic diffusion in three dimensional electron microscopy. *Lecture Notes in Computer Science: Scale Space Theories in Computer Vision* **1682**: 386-397.

J. Frank (1997): The ribosome at higher resolution - the donut takes shape. *Current Opinion in Structural Biology* **7**: 266-272.

J. Frank (1996): *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*. Academic Press, San Diego.

T. G. Frey und C. A. Mannella (2000): The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 319-324.

R. Grimm: *Anwendung von Energiefilterung bei der automatisierten Elektronentomographie von eiseingebetteten biologischen Objekten*. Dissertation, TU München, 1997.

R. Grimm, M. Bärmann, W. Häckl, D. Typke, E. Sackmann und W. Baumeister (1997): Energy-filtered electron tomography of ice-embedded actin and vesicles. *Biophysical Journal* **72**: 482-489.

R. Grimm, A. J. Koster, U. Ziese, D. Typke und W. Baumeister (1996): Zero-loss energy-filtering under low-dose conditions using a postcolumn energy filter. *Journal of Microscopy* **183**: 60-68.

R. Grimm, H. Singh, R. Rachel, D. Typke, W. Zillig und W. Baumeister (1998): Electron tomography of ice-embedded procaryotic cells. *Biophysical Journal* **74**: 1031-1042.

R. Grimm, D. Typke, M. Bärmann und W. Baumeister (1996): Determination of the inelastic mean free-path in ice by examination of tilted vesicles and automated most probable loss imaging. *Ultramicroscopy* **63**: 169-179.

M. Groll, L. Dietzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, B. H.D. und R. Huber (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* **386**: 463-471.

G. Guihard, P. Boulanger und L. Letellier (1992): Involvement of the T5 tail proteins and contact sites between the outer and inner membrane of *escherichia coli* in phage T5 injection. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 3173-3178.

I. Gutsche, O. Mihalache und W. Baumeister (2000): ATPase cycle of an archaeal chaperonin. *Journal of Molecular Biology* **300**: 187-196.

R. Hancock und V. Braun (1976): Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and f80 to *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **125**: 409-415.

R. G. Hart (1968): Electron microscopy of unstained biological material: the polytopic montage. *Science* **159**: 1464-1467.

R. Hegerl (1996): The EM program package: A platform for image processing in biological electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **116**: 30-34.

R. Hegerl und J. Walz (1998): Parallel processing in conjunction with structure analysis of biological macromolecules by electron microscopy. Fourth European SGI/Cray MPP Workshop, Garching.

K. Heller und H. Schwarz (1985): Irreversible binding to the receptor of bacteriophage T5 and BF23 does not occur with the tip of the tail. *Journal of Bacteriology* **162**: 621-625.

W. Hoppe (1969): Das Endlichkeitspostulat und das Interpolationstheorem der dreidimensionalen elektronenmikroskopischen Analyse aperiodischer Strukturen. *Optik* **29**: 617-621.

W. Hoppe (1974): Towards three-dimensional electron microscopy at atomic resolution. *Naturwissenschaften* **61**: 239-249.

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 Z. Physiol. Chem.* **355**: 1483-1487.

W. Hoppe und R. Hegerl In *Computer processing of electron microscope images*; P. W. Hawkes, Ed.; Springer Verlag: Heidelberg, 1980; Vol. 13; pp 127-186.

H. Killmann, R. Benz und V. Braun (1993): Conversion of the FhuA transport protein into a diffusion channel through the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **12**: 3007-3016.

A. J. Koster, H. Chen, J. W. Sedat und D. A. Agard (1992): Automated microscopy for electron tomography. *Ultramicroscopy* **46**: 207-27.

A. J. Koster und W. J. de Ruijter (1992): Practical autoalignment of transmission electron microscopes. *Ultramicroscopy* **40**: 89-107.

A. J. Koster, R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz und W. Baumeister (1997): Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *Journal of Structural Biology* **120**: 276-308.

A. J. Koster, W. J. d. Ruijter, A. v. d. Bos und K. D. v. d. Mast (1989): Autotuning of a TEM using minimum electron dose. *Ultramicroscopy* **27**: 251-72.

W. Kühlbrandt, D. N. Wang und Y. Fujiyoshi (1994): Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**: 614-21.

- O. Lambert, W. Gelbart, L. Letellier und J.-L. Rigaud (2000): DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7248-7253.
- O. Lambert, L. Plançon, L. Letellier und J. L. Rigaud (1998): Protein-mediated DNA transfer into liposomes. *Molecular Microbiology* **30**: 761-765.
- J. P. Langmore und M. F. Smith (1992): Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice. *Ultramicroscopy* **46**: 349-373.
- F. Lenz (1954): Zur Streuung mittelschneller Elektronen in kleinste Wirbel. *Zeitschrift für Naturforschung* **9**: 185-204.
- L. Letellier und P. Boulanger (1989): Involvement of ion channels in the transport of phage DNA through the periplasmic membrane of *E. coli*. *Biochimie* **71**: 167-174.
- L. Letellier, L. Plancon, M. Bonhivers und P. Boulanger (1999): DNA transport across membranes. *Research in Microbiology* **150**: 499-505.
- K. P. Locher, B. Rees, R. Koebnick, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch und D. Moras (1998): Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structure of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**: 771-778.
- T. Malis, S. C. Cheng und R. F. Egerton (1988): EELS log-ratio technique for specimen-thickness measurement in the TEM. *Journal of Electron Microscopy Technique* **8**: 193-200.
- J. Mayr, E. Seemüller, S. A. Müller, A. Engel und W. Baumeister (1998): Late events in the assembly of 20S Proteasomes. *Journal of Structural Biology* **124**: 179-188.
- D. J. McCorquodale und H. R. Warner In *The Viruses*; H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, Eds., 1975; pp 439-475.
- A. W. McDowell, J. J. Chang, R. Freeman, J. Lepault, C. A. Walter und J. Dubochet (1983): Electron microscopy of frozen sections of vitrified biological samples. *Journal of Microscopy* **131**: 1-9.
- G. S. Moeck, P. Tawa, H. Xiang, A. A. Ismail, J. L. Turnbull und J. W. Coulton (1996): Ligand-induced conformational change in the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **22**: 459-471.
- P. A. Monnard, N. Berclaz, K. Conde-Frieboes und T. Oberholzer (1999): Decreased solute entrapment in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes prepared by



freeze/thaw in the presence of physiological amounts of monovalent salts. *Langmuir* **15**: 7504-7509.

D. Nicastro, A. S. Frangakis, D. Typke und W. Baumeister (2000): Cryo-electron tomography of *neurospora* mitochondria. *Journal of Structural Biology* **129** (1):

S. Nickell (2000): Durch die Berechnung des Beugungsmusters eines 3D Proteinkristalls innerhalb einer eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi* Zelle konnte die Auflösung der zellulären Elektronentomographie zu 3.5 nm bestimmt werden. Persönliche Mitteilung.

S. Nickell, F. Zemlin und U. Lücken (2001): Evaluation of the Philips 300 kV He-electron microscope. Persönliche Mitteilung.

M. Nitsch, M. Klumpp, A. Lupas und W. Baumeister (1997): The thermosome - alternating alpha-subunits and beta-subunits within the chaperonin of the archaeon thermoplasma acidophilum. *Journal of Molecular Biology* **267**: 142-149.

M. Nitsch, J. Walz, D. Typke, M. Klumpp, L. O. Essen und W. Baumeister (1998): Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography. *Nature Structural Biology* **5**: 855-857.

E. Nogales, S. G. Wolf und K. H. Downing (1996): A high-resolution 3-d map of tubulin. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 251-251.

A. Papoulis (1991): *Probability, random variables and stochastic processes*. 3 ed. McGraw-Hill, Inc., New York.

L. Plançon, M. Chami und L. Letellier (1997): Reconstitution of FhuA, an *Escherichia coli* outer membrane protein, into liposomes. Binding of phage T5 to FhuA triggers the transfer of DNA into the proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 16868-16872.

L. Reimer (1995): *Energy filtering transmission electron microscopy*. 1st ed. Springer Verlag, Heidelberg.

L. Reimer (1989): *Transmission electron microscopy*. 2nd ed. Springer Verlag, Heidelberg.

L. Reimer und M. Ross-Messemer (1989): Contrast in the electron spectroscopic imaging mode of a TEM. II. Z-ratio, structure sensitive and phase contrast. *Journal of Microscopy* **159**: 143-160.

A. Rosenfeld und A. C. Kak (1982): *Digital Picture Processing*. 2. Auflage ed., New York, San Francisco, London.

J. C. Russ (1995): *The image processing handbook*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

W. O. Saxton, W. Baumeister und M. Hahn (1984): The three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy* **13**: 57-70.

O. Scherzer (1970): Die Strahlenschädigung der Objekte als Grenze für die hochauflösende Elektronenmikroskopie (Radiation damage of objects as limiting factor of high-resolution electron microscopy). *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **74**: 1154-1167.

O. Scherzer (1948): The theoretical resolution limit of the electron microscope. *Journal of Applied Physics* **20**: 20-28.

H. Stark, F. Müller, E. V. Orlova, M. Schatz, P. Dube, T. Erdemir, F. Templin, R. Brimacombe und M. Van Heel (1996): 3D-structure of the 70S ribosome revealed by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. 11th European Congress on Microscopy, Dublin.

H. Stark, F. Zemlin und C. Boettcher (1996): Electron-radiation damage to protein crystals of bacteriorhodopsin at different temperatures. *Ultramicroscopy* **63**: 75-79.

A. Stoschek: *Entwicklung von Detektionsfiltern und Multiskalentransformationen für die elektronenmikroskopische Bildverarbeitung*. Dissertation, Technische Universität München, 1997.

D. Studer und H. Gnägi (1999): Ultravibratomey applied in ultrathin sectioning results in sections without distortions and compression. EMSA, Portland/USA.

D. Typke (2000): Brief account of the theory of TEM bright field image formation (kinematical approximation). Interner Bericht.

D. Typke, R. Hegerl und J. Kleinz (1992): Image restoration for biological objects using external TEM control and electronic image recording. *Ultramicroscopy* **46**: 157-173.

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.

M. van Heel (1987): Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstructions. *Ultramicroscopy* **21**: 111-124.

T. Waldmann, M. Nitsch, M. Klumpp und W. Baumeister (1995): Expression of an archeal chaperonin in *Escherichia coli*: formation of homo- ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) and heterooligomeric ( $\alpha + \beta$ ) thermosome complexes. *FEBS Letters* **376**: 67-73.

J. S. Wall, M. Isaacson und J. P. Langmore (1974): The collection of scattered electrons in the dark field electron microscopy. II. Inelastic scattering. *Optik* **39**: 359-374.

J. Walz, A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A. J. Koster und W. Baumeister (1998): 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **121**: 19-29.



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung und die Mithilfe zahlreicher Betreuer, Kollegen, Freunden und Verwandten in dieser Form nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Wolfgang Baumeister für seine über das gewöhnliche Maß hinausgehende Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Die von ihm zur Verfügung gestellten experimentellen Bedingungen können wohl nur als perfekt bezeichnet werden. Außerdem möchte ich ihm für seine korrekte und faire Art im Umgang mit meinen Anliegen und Problemen danken.

Ich danke Prof. Erich Sackmann für die Möglichkeit, am Physik-Department der TU-München zu promovieren, sowie für die gute Zusammenarbeit bei den mit Mitarbeitern seiner Gruppe durchgeführten Experimente. Danke auch für die jährlichen Einladungen zur Teilnahme an der ‚Winterschule‘ in Antholz.

Dr. Dieter Typke und Dr. Reiner Hegerl danke ich für die Einführung und die Unterstützung bei den auftretenden ‚Alltagsproblemen‘ am Elektronenmikroskop und bei der Bildverarbeitung. Mein spezieller Dank gilt Dieter Typke für die Durchsicht und die konstruktive Korrektur dieser Arbeit. Danke, Dieter!

Besonderer Dank gilt meinen beiden ‚Mitreitern‘, Dr. Achilleas Frangakis und Stephan Nickell. Ich danke Euch für die Hilfe und Eure Geduld bei Programmierarbeiten, für die täglichen, meist hitzigen, Diskussionen und für Alles, was ich von Euch lernen konnte.

Ich danke meinen Kollegen, die mir bei der Durchführung zahlreicher Experimente tatkräftig zur Seite standen: Dr. Daniela Nicastro für die Präparation der Phantomzellen, Olivier Lambert und Prof. Jean-Louis Rigaud für die Bereitstellung des T5-Proteoliposomen Modellsystems, Oana Mihalache und Dr. Jutta Mayr für die Aufreinigung des Thermosomes und des 20S Proteasomes, Dr. Bin Hu und Dr. Michael Bärmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Sackmann und Günter Pfeifer für seine Einführung in die Elektronenmikroskopie, seine tägliche Hilfsbereitschaft und sein offenes Ohr.

Für ihre unbürokratische und unmittelbare Hilfe bei allen technischen Problemen danke ich den Mitarbeitern der Werkstatt, vor allem Rudolf Gatz und Thomas Matthes, sowie Klaus Binder von Philips.

Mein Dank gilt weiterhin zahlreichen Kollegen, die über die Jahre zu einem konstruktiven und positiven Arbeitsklima beigetragen haben: Dr. Harald Engelhard, Friedrich Förster, Toni Hillebrand, Steffen Meyer, Dr. Michael Nitsch, Dr. Beate Rockel, Dr. Dieter Voges, Dr. Jochen Walz, Dr. Peter Zwickl, sowie den Damen aus dem Sekretariat.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie für die Förderung und die Unterstützung, die ich in den letzten Jahren erhalten habe.

Ich danke meiner Freundin Manuela für ihr Verständnis für meine Arbeit und für ihre Bereitschaft, die Entbehrungen der letzten Jahre auf sich zu nehmen.