

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Elektronentomographische Abbildung eiseingebetteter prokaryotischer Zellen

Stephan Nickell

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. H. Friedrich
Prüfer der Dissertation:	1.	Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
	2.	Univ.-Prof. Dr. P. Böni
	3.	Priv.-Doz. Dr. G. Dollinger (schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 19.12.2001 bei der Technischen Universität
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 31.05.2002 angenommen.

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
2 Elektronentomographie	8
2.1 Die Abbildung im Elektronenmikroskop mit Energiefilter	8
2.1.1 Streuung von Elektronen	8
2.1.2 Kontrastentstehung	10
2.1.3 Kontrasterhöhung durch Energiefilterung	14
2.1.4 Intensitäten im energiegefilterten Bild	17
2.2 Experimenteller Aufbau	20
2.2.1 Elektronenquellen	20
2.2.2 Objektivlinsen	22
2.2.3 Abbildungseigenschaften der Energiefilter	22
2.2.4 Automatisierte Tomographie	27
2.2.5 Eiseinbettung biologischer Objekte	33
2.3 Grundlagen der tomographischen Rekonstruktion	35
2.3.1 Projektions-Schnitt-Theorem	36
2.3.2 Gefilterte Rückprojektion	38
2.3.3 Alignierung und Bestimmung der Kippachse	39
2.3.4 Rekonstruktionsartefakte	41
3 Zwei-Achsen Tomographie eiseingebetteter Zellen	45
3.1 Einführung	45
3.2 Methode der Zwei-Achsen-Kippung	47
3.2.1 Zwei-Achsen-Kippung unter Kryo-Bedingungen	48
3.2.2 Alignierung und Rekonstruktion	49
3.3 Anwendung auf eiseingebettete <i>Pyrodictium abyssi</i> Zellen	50
3.3.1 Einführung	50
3.3.2 Kultivierung und Präparation der Zellen	52
3.3.3 Durchführung der Datenaufzeichnung	53
3.3.4 Interpretation der rekonstruierten <i>Pyrodictium abyssi</i> Zelle	58
3.3.5 Reduzierung der Rekonstruktions-Artefakte	63

4	Parallelisierte Algorithmen zur Mustererkennung	68
4.1	Einführung	68
4.2	Mustererkennung durch Kreuz-Korrelation	70
4.3	Variablentrennung von Ortskoordinaten und Drehwinkeln	72
4.3.1	Parallelisierung über Ortskoordinaten	73
4.3.2	Bestimmung der maximalen Kreuz-Korrelations-Koeffizienten	79
4.3.3	Parallelisierung über Drehwinkel	81
4.3.4	Vergleich der beiden Algorithmen zur Mustererkennung	86
4.4	Dreidimensionale Detektion und Segmentierung	88
4.4.1	Detektion von <i>Thermosomen</i>	88
4.4.2	Segmentierung der <i>Cannulae</i> einer <i>Pyrodictium abyssi</i> -Zelle	91
5	Anwendungen der Elektronentomographie	94
5.1	Rekonstruktion von <i>Pyrodictium</i> - <i>abyssi</i> -Zellen	94
5.1.1	Präparation und Tomographie	94
5.1.2	Rekonstruktionen	95
5.2	Rekonstruktion von <i>Thermoplasma acidophilum</i> -Zellen	102
5.2.1	Präparation und Tomographie	102
5.2.2	Rekonstruktionen	103
6	Diskussion und Ausblick	110
	Physikalische Formeln und Konstanten	114
	Literaturverzeichnis	121
	Danksagung	123

Zusammenfassung

Elektronentomographie ist eine Abbildungstechnik, die auf verschiedenste biologische Proben angewendet werden kann. Sie ist unabhängig von internen Symmetrien des Objektes und setzt keine periodische Anordnung der Struktur voraus. Damit können Mittelungsmethoden, wie sie bei anderen Techniken implizit (Kristalle) oder explizit (Einzel-Partikel) angewendet werden, nicht zu einer Rausch-Reduzierung dienen. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Schädigung biologischer Proben durch den Elektronenstrahl, was zur Entwicklung von Nieder-Dosis Prozeduren zur Datenaufnahme führte. In Kombination mit Methoden der 'Kryo'-Präparation hat die Elektronentomographie das Potential, makromolekulare Komplexe und ganze Zellen in einem nativen Zustand abzubilden. Ein nächster Schritt war eine Verbesserung der Auflösung tomographischer Rekonstruktionen um damit in das Regime molekularer Auflösung vorzudringen, die es erlaubt, größere Makromoleküle im zellulären Kontext zu identifizieren.

Dazu wurde ein Elektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV, einem Energiefilter und einer 2048x2048 Pixel CCD-Kamera installiert und mit einem Tomographie-Software Paket ausgestattet. Mit diesem Aufbau wurden Kippserien von Archäen der Gattung *Pyrodictium abyssi* aufgezeichnet und rekonstruiert. Mit der Analyse von Protein-Kristallen, die innerhalb des Zytoplasmas der Zellen lokalisiert waren, konnte eine Auflösungsbestimmung von 3,5 nm erfolgen.

Um Rekonstruktionsartefakte, die bei der winkelbegrenzten Einachsen-Kippung auftreten, zu reduzieren, wurde ein neuer 'Kryo'-Probenhalter konstruiert und gebaut. Mit diesem Gerät können von einem Objekt Doppel-Kippserien mit einer dazwischenliegenden Rotation um die vertikale Achse der Probe durchgeführt werden. Die Rückprojektion beider Kippserien in ein gemeinsames 3D-Volumen führt zu einer deutlich verbesserten Rekonstruktion von Zellen. In einer Anwendung konnte ein Netzwerk von Archäen visualisiert werden, das den Verlauf einer *Cannula* durch den 'quasi'-periplasmatischen Raum einer Zelle zeigt.

Der geringe Kontrast und das geringe Signal-Rausch-Verhältnis der rekonstruierten Zellvolumina machten die Entwicklung von Mustererkennungs-Methoden notwendig. Dazu wurden zwei Algorithmen implementiert, die das Finden und Identifizieren von Makromolekülen innerhalb ganzer Zellen ermöglichen. Um die Rechenzeit zu reduzieren, wurden diese Algorithmen parallelisiert und stehen jetzt auf verschiedenen Parallelrechner-Architekturen zur Verfügung. Eine erste Anwendung dieser Algorithmen führte zu einer Identifizierung von Makromolekülen innerhalb von Rekonstruktionen von *Thermoplasma acidophilum* Zellen.

Abstract

Electron tomography is an imaging technique which can be applied to a wide range of biological specimens. It does not rely on internal symmetries of the object nor does it require periodic objects. However, since tomographic reconstructions yield a density map from only one single object, image-averaging techniques, which are used implicitly (crystals) or explicitly (single-particle analysis) for noise reduction, can not be applied. A limiting factor is the radiation sensitivity of biological samples, which is addressed by the recent development of automated low-dose data-acquisition schemes. Together with cryo-sample preparation techniques, electron tomography has the potential to allow imaging of macromolecular complexes and even cells, without exposing them to harming chemical procedures like fixation and dehydration. The next step was to improve the resolution of tomographic reconstructions to bring it into the realm of 'molecular resolution', enabling the recognition of larger individual macromolecules by their size and shape.

To increase the resolution of reconstructed cells, an electron microscope with an accelerating voltage of 300 kV, with an energy filter and a 2048x2048 Pixel CCD camera was installed and equipped with a tomography-software package. Several tilt-series of archaea of the species *Pyrodictium abyssi* were acquired and reconstructed. The analysis of protein crystals, found in the tomograms, revealed a resolution of down to 3.5 nm.

A new cryo-holder allowing to rotate the specimen in-place by 100° was designed and manufactured in order to reduce reconstruction-artifacts resulting from the limited angular range of single-axis tilting. With this new device it is possible to acquire double-tilt series with an intermediate rotation of the specimen around the vertical axis. The missing information, forming a 'missing-wedge' in Fourier space is thus reduced to a 'missing-pyramid'. As a consequence, the quality of reconstructed cells was dramatically improved. In an application, a network of archaea could be visualized in 3D, which allowed the tracing of a connecting *Cannula* inside the 'quasi'-periplasmic space of a cell.

The low contrast and the low signal-to-noise ratio, due to the limited dose, both adversely affecting the cell reconstructions, led to the development of pattern recognition methods for molecular structures. Based on correlation techniques, two algorithms were implemented that are able to find and identify macromolecules inside cells. To reduce the computation time the programs were parallelized and can be used on any massive parallel computer system. The application of these algorithms to the tomograms of *Thermoplasma acidophilum* cells resulted in a first identification of macromolecular complexes.

1. Einleitung

Während der letzten 10 bis 20 Jahre wurde es zunehmend offensichtlich, daß viele der grundlegenden zellulären Prozesse nicht als Folge von zufällig zusammentreffenden Reaktionspartnern, wie Proteinen oder Nukleinsäuren innerhalb des Zytoplasmas oder Zellmembran zu sehen sind. Vielmehr finden viele wichtige Prozesse innerhalb von molekularen Maschinen statt, die aus einer großen Anzahl einzelner Proteine und RNA-Untereinheiten bestehen. Da diese Maschinen sehr groß und komplex sind, ist ein Verständnis ihrer Funktion sehr schwierig. Es gibt keine Möglichkeit, herauszufinden wie Zellen leben und funktionieren, wenn nicht vorher die Funktion und dreidimensionale (3D) Struktur dieser Maschinen ergründet wurde. Zu dieser Strukturbestimmung meinte vor mehr als vierzig Jahren Richard Feynman: 'It is very easy to answer many ... fundamental biological questions, you just look at the thing!'. Die Strukturbiologie spielt eine wichtige Rolle bei der Erforschung der molekularen und chemischen Grundlagen der zellulären Funktionen. Genauso wie die dreidimensionalen Strukturen individueller Makromoleküle, wie der DNA oder von Proteinen, die Biologie im zwanzigsten Jahrhundert revolutioniert haben, werden die Strukturen komplexer, makromolekularer Maschinen einen wichtigen Erkenntnisgewinn in der Zukunft liefern.

Die Untersuchung der Protein-Maschinen erfordert die Anwendung verschiedenster Techniken aus der Molekularbiologie, aus der Biochemie und Strukturbiologie. Zu diesen Methoden der dreidimensionalen Strukturbestimmung zählt NMR, die Röntgenkristallographie und die Elektronenmikroskopie (EM). Dabei ist atomare Auflösung durch NMR Spektroskopie im Moment noch bis zu einer molekularen Masse von ca. 30 kD möglich. Die Röntgenkristallographie kann prinzipiell zur Bestimmung der Struktur mit atomarer Auflösung dienen. Ebenso wurde bereits atomare Auflösung mit EM-Techniken durch Analyse von 2D-Kristallen erzielt. Alle bereits genannten Methoden haben dabei den Nachteil, daß sie nur die Struktur des isolierten Proteins analysieren. Der zelluläre Kontext geht bei der Reinigung

der Proteine verloren. Betrachtet man native Zellen unter dem Lichtmikroskop so reicht die Auflösung zwar aus, um große Zellorganellen zu erkennen, aber molekulare Strukturen sind nicht mehr sichtbar. Eine Methode, die komplementär zu den hochauflösenden Techniken zu sehen ist und dabei nach oben in den Größenbereich der Lichtmikroskopie vordringt ist die Elektronentomographie (ET), siehe auch Abbildung 1.1.

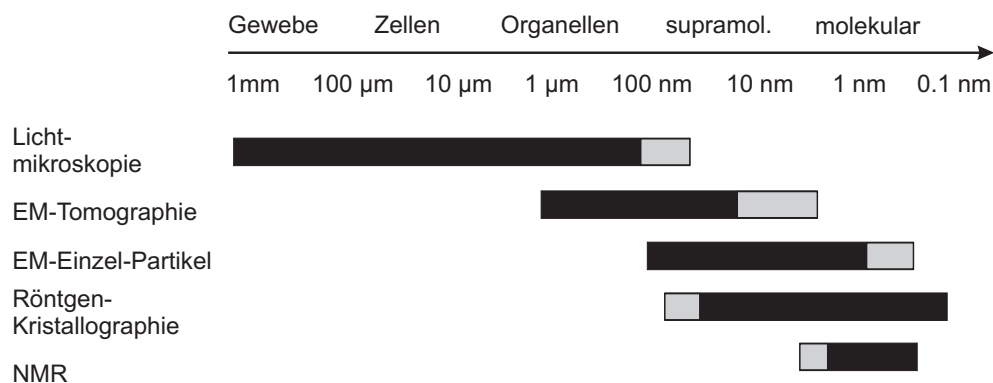


Abb. 1.1: Abbildungsgrenzen von zellulären Strukturen bei verschiedenen Techniken. Die erreichbare Auflösung hängt von der Größe der untersuchten Objekte ab. Die Elektronentomographie stellt dabei die Verbindung von zellulären Objekten zu großen Makromolekülen her.

Grundlage für die tomographische Rekonstruktion ist das Prinzip, daß jede zweidimensionale (2D) Projektion eines 3D-Körpers mit der zentralen Schnittebene durch die 3D-Fourier-Transformierte des Körpers gleichzusetzen ist. Mit einer großen Anzahl von 2D-Aufnahmen aus unterschiedlichen Projektionsrichtungen lässt sich damit die Dichteverteilung des untersuchten 3D-Objektes rekonstruieren. Überträgt man dieses Verfahren auf das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM), so treten einige physikalische und technische Randbedingungen auf. So muss die Probe im Vakuum des TEM fixiert werden, was durch die Einbettung in amorphes Eis geschieht. Die Strahlempfindlichkeit der biologischen Probe und die Ungenauigkeit der Kippvorrichtung machen eine Echtzeit-Bildverarbeitung notwendig. Dabei wird das TEM von einem externen Computer gesteuert, der die Position der Probe mit Hilfe einer CCD-Kamera mitverfolgt, die Korrekturen berechnet und automatisch das Mikroskop nachsteuert. Das geschieht unter Nieder-Dosis-Bedingungen, so daß

für die eigentliche Datenaufzeichnung ein Großteil der zulässigen Gesamt-Dosis verwendet werden kann. Um die Kontrastverhältnisse bei der Abbildung im TEM zu verbessern, kommt ein Energiefilter zum Einsatz, der die inelastisch gestreuten Elektronen, die kaum noch orstauaufgelöste Information tragen, ausblendet; somit tragen nur die elastisch gestreuten und die ungestreuten Elektronen zur Bildgebung bei. Der Rekonstruktionsprozess basiert auf der gewichteten Rückprojektion nach vorheriger Alignierung auf ein gemeinsames Koordinatensystem durch Markierungspunkte. Die so gewonnene 3D-Dichteverteilung des untersuchten Objektes kann dann weiterverarbeitet und visualisiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die tomographischen Verfahren auf ein neues Elektronenmikroskop zu übertragen und weiter zu verbessern, um möglichst molekulare Auflösung zu erreichen. Darunter versteht man eine Auflösungsgrenze, ab der es möglich ist einzelne makromolekulare Komplexe zu lokalisieren und identifizieren. Weiterhin sollte mit diesem experimentellen Aufbau eine Ausweitung der Elektronentomographie auf ganze, eiseingebettete Zellen erfolgen. Aus der Kombination dieser Zielsetzungen lässt sich eine 3D-Rekonstruktion einer Zelle mit molekularer Auflösung ableiten. Die Anwendung der tomographischen Methode auf zelluläre Objekte führte außerdem zu einem neuen Probenhalter-Design und zu neuen Algorithmen für die Datenauswertung. Damit lässt sich die folgende Arbeit in insgesamt vier Kapitel unterteilen:

- Eine grundlegende Darstellung der Abbildung im Elektronenmikroskop mit einer Charakterisierung des verwendeten experimentellen Aufbaus, sowie die Grundlagen der tomographischen Abbildung.
- Die Neuentwicklung eines Zwei-Achsen-Kipphalters für 'Kryo'-Bedingungen und eine Anwendung.
- Neue Algorithmen zur Mustererkennung von molekularen Komplexen in 3D-Rekonstruktionen von Zellen.
- Anwendungen der Elektronentomographie auf ganze Zellen.

2. Elektronentomographie

2.1 Die Abbildung im Elektronenmikroskop mit Energiefilter

Die elektronenmikroskopische Abbildung basiert auf der Wechselwirkung zwischen Elektronen und untersuchtem Objekt. Der Bildgebungsprozess im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) ist charakterisiert durch die optischen Komponenten und ihre jeweiligen Übertragungsfunktionen. Zum besseren Verständnis der Bildentstehung im TEM und zur Motivation des Energiefilters werden die zur Abbildung beitragenden physikalischen Prozesse zunächst beschrieben.

2.1.1 Streuung von Elektronen

Die Grundlage für die Abbildung im Elektronenmikroskop ist die Streuung der Elektronen an den Atomen des Objektes. Man unterscheidet dabei die elastische und die inelastische Streuung.

Elastische Streuung

Werden Elektronen elastisch gestreut, erfolgt also kein Energieverlust, beobachtet man eine Winkelverteilung, die ihr Maximum bei großen Ablenkwinkeln relativ zur Einstrahlrichtung hat. Ursache dafür ist eine Streuung der Elektronen im elektrischen Feld der, durch die Elektronenhülle abgeschirmten, Atomkerne der Probe. Beschreiben lässt sich dies durch das Wentzel-Modell für ein abgeschirmtes Coulomb-Potenzial:

$$V(r) = \frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} \exp(-r/R) \quad (2.1)$$

mit Z als Kernladungszahl und dem Atomradius $R = a_H Z^{-1/3}$, $a_H = 0.0529$ nm. Da es sich um ein schwaches Phasenobjekt handelt, kommt man mit der Bornschen

Näherung auf den differentiellen Streuquerschnitt (Lenz 1954):

$$\frac{d\sigma_{el}}{d\Omega} = |f(\theta)|^2 = \frac{4Z^2R^4(1 + E/E_0)^2}{a_H^2[1 + (\theta/\theta_0)^2]^2}, \quad (2.2)$$

wobei $f(\Phi)$ der elastische Streufaktor, a_H der Bohrsche Radius, E die kinetische Energie der Elektronen und E_0 die Ruheenergie des Elektrons ist. Der sogenannte charakteristische Streuwinkel ist gegeben durch $\theta_0 = \lambda/2\pi R$, mit der Wellenlänge λ für Elektronen. Typischerweise liegt dieser für biologische Objekte bei 18 mrad für eine Beschleunigungsspannung von 100 kV und bei 10 mrad für 300 kV. Die Streucharakteristik ist deshalb im wesentlichen vorwärts gerichtet. Für den totalen Streuquerschnitt gilt:

$$\sigma_{el} = \frac{c^2h^2Z^{\frac{4}{3}}}{\pi\beta^2E_0^2} \quad (2.3)$$

mit βc als relativistische Geschwindigkeit der Elektronen. Die elastische mittlere freie Weglänge ergibt sich zu:

$$\Lambda_{el} = \frac{A}{N_A\rho\sigma_{el}}, \quad (2.4)$$

wobei A die Massenzahl, N_A die Avogadro Konstante und ρ die Dichte ist.

Inelastische Streuung

Eine Reihe von Effekten tragen zur inelastischen Streuung bei; dazu zählen die Anregung quasi-freier Elektronen (Compton-Streuung), die Anregung von Molekülschwingungen und von Phononen im Festkörper (typischerweise einige 100 meV) sowie die Anregung von kooperativen Schwingungen der Valenz- und Leitungsbandelektroden im Volumen (Plasmonen). Der letztgenannte Effekt dominiert in den ersten 20 eV das Energieverlustspektrum. Ebenso gut sichtbar ist die Ionisation der inneren Elektronenschalen, die zu elementspezifischen Ionisationskanten (Ahn und Krivanek 1983) führen kann. Entwickelt man den inelastischen differentiellen Streuquerschnitt (Lenz 1954) für einen Energieverlust von ΔE , so gilt:

$$\frac{d\sigma_{inel}}{d\Omega} = \frac{\lambda^4(1 + E_0/m_0c^2)^2}{4\pi^4a_H^2} \frac{Z(1 - (1 + (\theta + \theta_0)^2)^{-2})}{(\theta^2 + \theta_E^2)^2}. \quad (2.5)$$

Der charakteristische Winkel für inelastische Streuung ist dabei $\theta_E = \frac{\Delta E}{2E}$ mit einer noch stärker vorherrschenden Vorwärtsstreuung. Somit wirkt sich im Gegensatz

zu elastisch gestreuten Elektronen der Einsatz einer Objektivblende bei inelastisch gestreuten Elektronen kaum kontrastverstärkend aus. Der totale inelastische Streuquerschnitt ist nach (Wall et al. 1974):

$$\sigma_{inel} = \frac{1.5 \cdot 10^{-20}}{\beta^2} Z^{\frac{1}{2}} \ln(2/\theta_E) cm^2. \quad (2.6)$$

Für biologische Proben gilt in guter Näherung (Kohlenstoff) ein Verhältnis von $\nu = 3.3$ von inelastischer zu elastischer Streuung,

$$\nu = \frac{\sigma_{inel}}{\sigma_{el}}. \quad (2.7)$$

Für Eis ergibt sich ein Wert von $\nu = 4.0$. Bei hohen Ordnungszahlen wird ν klein; so ist $\nu = 0.2$ für Uran.

2.1.2 Kontrastentstehung

Der Übergang vom Teilchen- zum Wellenmodell erlaubt eine einfache Formulierung der Streuvorgänge von Elektronen im Elektronenmikroskop. So lässt sich im wellenoptischen Bild ein elastischer Streuprozess als eine Phasenschiebung $\Phi(\mathbf{r})$ einer einfallenden ebenen Welle beschreiben, die sich in z-Richtung ausbreitet:

$$\Phi(\mathbf{r}) = -\frac{2\pi}{\lambda E} \frac{E + E_0}{E + 2E_0} \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_C(\mathbf{r}, z) dz, \quad (2.8)$$

mit dem Vektor \mathbf{r} und $\Phi_C(\mathbf{r}, z)$ der Coulombpotenzialverteilung des Objektes. Dementsprechend wird die einfallende Welle $\Psi = \exp(ikz)$ in einer Ebene dicht hinter dem Objekt verzerrt zu $\Psi' = \Psi \exp(i\Phi(\mathbf{r}))$. Unter der Annahme eines schwachen Phasenobjektes, also $\Phi(\mathbf{r}) \ll 1$, lässt sich die Funktion entwickeln zu:

$$\Psi' = \Psi \left(1 + i\Phi(\mathbf{r}) - \frac{1}{2}\Phi^2(\mathbf{r}) + \dots \right). \quad (2.9)$$

Die gestreute Welle lässt sich zerlegen in einen ungestreuten Anteil (Term '1') und einen gestreuten Anteil mit dem Term $i\Phi(\mathbf{r})$ und den folgenden Termen. Wichtig sind zwei weitere Effekte, die bei der Abbildung eine Phasenschiebung gegenüber der Wellenfläche bei idealer Abbildung zur Folge haben: die Aberration der Linsen und der Grad der Defokussierung. Dies lässt sich beschreiben durch die Funktion:

$$\gamma(\mathbf{k}) = 2\pi\chi(\mathbf{k}), \quad (2.10)$$

die von der Koordinate \mathbf{k} in der Fokusebene abhängt. Der Term $\chi(\mathbf{k})$ wird bezeichnet als Wellenaberrationsfunktion und lautet in Polarkoordinaten:

$$\chi(k, \phi) = -\frac{1}{2}\lambda(\Delta z + (z_a/2) \sin 2(\phi - \phi_0))k^2 + \frac{1}{4}\lambda^3 C_s k^4, \quad (2.11)$$

mit $k = |\mathbf{k}|$, $\phi = \arctan(k_y/k_x)$, der Wellenlänge der Elektronen λ , dem Defokus der Objektivlinse Δz , der Fokusdifferenz bedingt durch axialen Astigmatismus Δz_a und C_s , der sphärischen Aberrationskonstante dritter Ordnung. Eine ideale Linse würde die von einem Objektpunkt ausgehende Kugelwelle in eine sphärische Wellenfront transformieren, die im Bildpunkt konvergiert. Die Aberration der Welle hat zur Folge, daß sich diese sphärische Wellenfront deformiert. Im Gegensatz dazu wirkt sich der sphärische Aberrationsterm auf die äußeren Zonen der Wellenfront stärker bzw. schwächer krümmend aus als auf die inneren Zonen. Dies führt zu einer verkürzten Fokusslänge der äußeren Strahlen. Die Wellenfunktion in der hinteren Fokusebene der Objektivlinse $\Psi_{Fok}(\mathbf{k})$ lässt sich also zusammensetzen aus der Fouriertransformierten¹ der Wellenfunktion ψ' und einem Term, der die Phasenschiebung aufgrund der Linsenaberration beschreibt:

$$\Psi_{Fok}(\mathbf{k}) = F\{\Psi'\} \exp(i\gamma(\mathbf{k})). \quad (2.12)$$

Die Wirkung einer Apertur lässt sich durch eine weitere Funktion $A(\mathbf{k})$ beschreiben:

$$\psi_i(\mathbf{r}) = F^{-1}\{F\{\Psi'\}A(\mathbf{k}) \exp(i\gamma(\mathbf{k}))\}, \quad (2.13)$$

$$A(\mathbf{k}) = \begin{cases} 1 & : |\mathbf{k}| = \theta/\lambda \leq \theta_1/\lambda \\ 0 & : \text{sonst} \end{cases}, \quad (2.14)$$

wobei θ_1 der korrespondierende Winkel zur Objektivapertur ist. Die beobachtete Intensitätsverteilung in der Bildebene ist:

$$I(\mathbf{r}) = \Psi_i(\mathbf{r})\Psi_i^*(\mathbf{r}). \quad (2.15)$$

Für ein schwaches Phasenobjekt bricht man die Reihenentwicklung von Gleichung (2.9) nach dem zweiten Term ab. Die Bildintensität wird demzufolge von der Interferenz zwischen der ungestreuten und der gestreuten Welle bestimmt. Aus der

¹im Folgenden wird F für die Fouriertransformierte verwendet, F^{-1} ist die inverse Fouriertransformierte dazu.

Dominanz dieses Terms, der linear in der gestreuten Wellenamplitude vorliegt, folgt die wichtige Eigenschaft, daß der Kontrast des Bildes im Elektronenmikroskop linear verknüpft ist mit dem projizierten Potenzial des Objektes. Dies ist unter anderem eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Projektionstheorems, siehe Abschnitt (2.3.1), und damit für die tomographische dreidimensionale Rekonstruktion, die in Abschnitt (2.3) beschrieben ist.

Kontrast-Transfer-Funktion (CTF)

Vernachlässigt man die Terme höherer Ordnung und setzt ein reales projiziertes Potenzial $\Phi(\mathbf{r})$ voraus, dann beschreibt Gleichung (2.15) eine lineare Beziehung zwischen $O(\mathbf{k}) = F(\Phi(\mathbf{r}))$ und der Fouriertransformierten des Bildkontrastes $F(\mathbf{k}) = F(I(\mathbf{r}))$:

$$F(\mathbf{k}) = O(\mathbf{k})A(\mathbf{k})2 \sin \gamma(\mathbf{k}). \quad (2.16)$$

Die Funktion $2 \sin \gamma(\mathbf{k})$ heißt Kontrast-Transfer-Funktion ('contrast transfer function', kurz CTF). Sie ist charakterisiert durch abwechselnd positive und negative Zonen bei zunehmendem $k = |\mathbf{k}|$, siehe Abbildung (2.1).

Kohärenz

Unter der Annahme einer kohärenten Strahlquelle mit monochromatischen Elektronen wird die Auflösung nur durch die Apertur eingeschränkt, siehe Gleichung (2.16). In der Praxis hat die Elektronenquelle jedoch eine endliche Ausdehnung q_0 und eine endliche Energiebreite. Die daraus resultierende teilweise Kohärenz dämpft die Kontrast Transfer Funktion mit zunehmenden Ortsfrequenzen und beschränkt somit die erreichbare Auflösung. Die exakte Lösung dieses Effektes ist mathematisch schwierig zu beschreiben (Rose 1984), und so hat sich die Darstellung mit Hilfe einer einhüllenden Funktion durchgesetzt (Wade und Frank 1977), die den Einfluss der verschiedenen Parameter wie Defokus, Beleuchtungsdivergenz und Energiebreite in eine anschauliche und handhabbare Form fasst:

$$H_K(k) = 2A(k) \sin \gamma(k) E_i(k) E_e(k), k = |\mathbf{k}|. \quad (2.17)$$

Hierbei ist $E_i(k)$ die einhüllende Funktion aufgrund der teilweisen Kohärenz der Beleuchtung:

$$E_i(k) = \exp(-\pi^2 q_0^2 (C_s \lambda^3 k^3 - \Delta z \lambda k)^2), \quad (2.18)$$

hier für eine Gaußsche Verteilung der Quelle, und $E_e(k)$ die einhüllende Funktion aufgrund der endlichen Energiebreite (Hanszen und Trepte 1971):

$$E_e(k) = \exp(-(\pi \delta z \lambda k^2 / 2)^2). \quad (2.19)$$

Dabei ist δz die charakteristische Breite der Verteilungsfunktion der Defokuswerte aufgrund der Fluktuation der Beschleunigungsspannung, der Linsenströme sowie der Energie der Primärelektronen. Wichtige Kenngröße hierbei ist der chromatische Aberrationskoeffizient C_C :

$$\delta z = C_C \frac{\delta E}{E} \frac{1 + E/E_0}{1 + E/2E_0}, \quad (2.20)$$

mit der Primärenergie E , der Ruheenergie E_0 der Elektronen und der Energiebreite δE . Die einhüllende Funktion aufgrund der partiell kohärenten Beleuchtung $E_i(k)$ ist also abhängig vom Defokus, während $E_e(k)$ unabhängig davon ist. Das besondere an Elektronenmikroskopen mit Feldemissionskathode liegt in eben diesen Parametern $E_i(k)$ und $E_e(k)$ begründet. Aufgrund der kleinen Ausdehnung der Beleuchtung und der geringen Energiebreite der emittierten Elektronen werden beide einhüllende Funktionen zu höheren Frequenzen verschoben und ermöglichen so Aufnahmen mit höherer Auflösung.

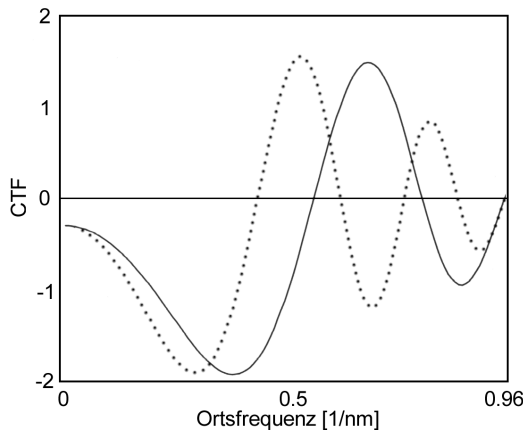


Abb. 2.1: Elektronenoptische Transferfunktion ($C_s = 2mm$) für ein 'gemischtes' Phasen-Amplituden-Objekt ($q_0=0.15$) bei zwei Defokus-Werten: $\Delta z = 0.9\mu m$ (durchgezogene Linie) und $\Delta z = 1.5\mu m$ (gepunktete Linie). Mit höherem Defokus verschiebt sich die erste Nullstelle zu kleineren Ortsfrequenzen.

Amplitudenkontrast

Der Amplitudenkontrast eines Objektes entsteht durch einen stark lokalisierten Verlust von Elektronen, die entweder außerhalb der Blenden gestreut werden, oder aber durch inelastische Streuung und Energiefilterung wegfallen (Rose 1984). Der Amplitudenanteil eines Objektes wird formal durch einen Imaginäranteil des Potentials aus Gleichung (2.9) beschrieben. Dementsprechend ist die Fouriertransformierte für die Amplitudenkomponente in der Form $\cos \gamma$. Der komplette Ausdruck für die Bildintensität wird hiermit zu:

$$I(\mathbf{k}) = 2O_r(\mathbf{k}) \sin \gamma(\mathbf{k}) - 2O_i(\mathbf{k}) \cos \gamma(\mathbf{k}), \quad (2.21)$$

mit den Fouriertransformierten der Phasen- und Amplitudenanteile $O_r(\mathbf{k})$ und $O_i(\mathbf{k})$. Der Zusammenhang aus Gleichung (2.21) zeigt, daß sowohl die Phase als auch die Amplitude in der gemessenen Bildintensität enthalten sind. Diese Tatsache bildet unter anderem auch die Grundlage für die Rekonstruktion von Objekten durch Fokussereien (Schiske 1968) (Typke et al. 1992).

2.1.3 Kontrasterhöhung durch Energiefilterung

Bei der energiefilternden Elektronenmikroskopie ist es möglich Elektronen bezüglich ihrer Energie zu selektieren, so daß nur Elektronen mit einem bestimmten Energieverlust zur Bildentstehung auf dem Detektor beitragen. Dabei unterscheidet man je nach Einsatz eines Energiefensters verschiedene Arten von Energiefilterung.

'Zero-loss' Filterung

Ohne Filterung trägt der Anteil der inelastisch gestreuten Elektronen zu einem verschmierten Hintergrundbild bei. Dies führt zu einer Verminderung der Auflösung und des Kontrastes.

Durch den Einsatz der 'Zero-loss' Filterung werden alle Elektronen, deren Energie außerhalb eines schmalen Energiefensters ($300 \text{ keV} \pm 20 \text{ eV}$) liegt, ausgeblendet. Nur die elastisch gestreuten Elektronen um das markante 'Zero-loss' Maximum herum tragen zur Abbildung auf dem Detektor bei. Die Folge ist eine Verbesserung der Abbildungsqualität (Kihn et al. 1976), insbesondere bei der Untersuchung von einseingebetteten biologischen Objekten bei niedrigen Elektronendosen (Grimm 1998).

Um die Kontrastverstärkung durch Energiefilterung quantitativ am CM 300 FEG zu

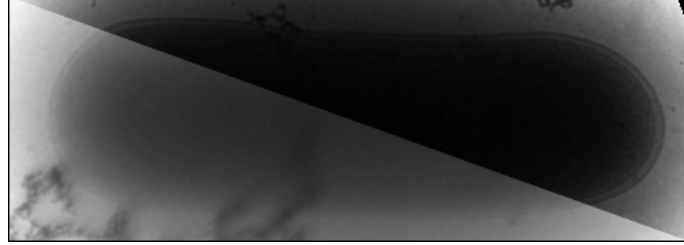


Abb. 2.2: Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen einer eiseingebetteten Ecoli-Zelle. Die untere Bildhälfte zeigt eine ungefilterte Aufnahme. Die inelastisch gestreuten Elektronen tragen zur Bildgebung bei und verschmieren die Bildinformation. Die obere Bildhälfte wurde mit Energiefilter aufgenommen. Die inelastisch gestreuten Elektronen sind ausgeblendet, die elastisch gestreuten Elektronen erzeugen ein kontrastreiches Bild.

untersuchen, wurde die Methode der Fourier-Ringkorrelation (Fourier ring correlation, kurz FRC) verwendet. Diese wird bei der Auflösungsbestimmung von Struktur-Mittelungen verwendet, die aus 2D Kristallen (Saxton und Baumeister 1982) oder aus 3D-Rekonstruktionen von Einzelpartikeln (de la Fraga et al. 1995) berechnet wurden. Dabei werden die Daten halbiert und aus je einer Hälfte der Partikel-datensätze unabhängig voneinander zwei Mittelungen rekonstruiert, die mit Hilfe des Fourier-Ringkorrelationskoeffizienten (Fourier ring correlation coefficient, kurz FRCC) verglichen werden können. Der FRCC ist definiert als:

$$FRCC = \frac{\int F_1 F_2^* d^2 s}{\sqrt{\int F_1 F_1^* d^2 s \int F_2 F_2^* d^2 s}}, \quad (2.22)$$

mit den Fouriertransformierten der Mittelungen F_1 und F_2 bei der Ortsfrequenz s . Lässt man das Integral über das ganze Spektrum laufen, so ergibt der Zähler von Gleichung (2.22) die Höhe des Kreuzkorrelationspeaks, und damit Ähnlichkeit der beiden Strukturen. Im Nenner stehen die Autokorrelationsterme der beiden Mittelungen. Somit ist der FRCC normiert und kann als vergleichende Größe eingesetzt werden. Schränkt man den Integrationsbereich in Gleichung (2.22) ein, so lässt sich eine Aussage über die Ähnlichkeit der beiden Strukturen in einem bestimmten Frequenzband machen. Analog zu dieser Vorgehensweise wurde der FRCC von mehreren Bildpaaren einer eiseingebetteten Zelle (*Pyrodictium abyssi*, siehe Kapitel 3) berechnet. Dazu wurden jeweils zwei ungefilterte und zwei gefilterte Bilder an der gleichen Objektstelle aufgenommen. Da eine mechanisch bedingte Probendrift die Bilder gegeneinander verschieben könnte, müssen diese zunächst aufeinander aligniert

werden. Diese Verschiebung wurde mit Hilfe der Kreuzkorrelation auf Subpixel-Genauigkeit korrigiert. Danach wurde der FRCC für beide Bildpaare berechnet, was in Abbildung (2.3) dargestellt ist. Die Höhe der Ring-Korrelationskoeffizienten gibt die Ähnlichkeit der Bildpaare bei den jeweiligen Frequenzen wieder und ist somit ein Maß für die im Frequenzband übertragene Information. Es wurde festgestellt, daß die Werte der FRCC bei gefilterten Bildern stets über denen der ungefiltert aufgenommenen Bildern liegen. Dies bestätigt die Annahme, daß die inelastisch gestreuten Elektronen, die in den ungefilterten Bildern vorhanden sind, zu einem Verschmieren der Bildinformation beitragen und den Bildkontrast vermindern. Dementsprechend führt eine Abbildung mit rein elastisch gestreuten Elektronen, wie dies bei den gefilterten Aufnahmen der Fall ist, zu einem kontrastverstärktem Bild.

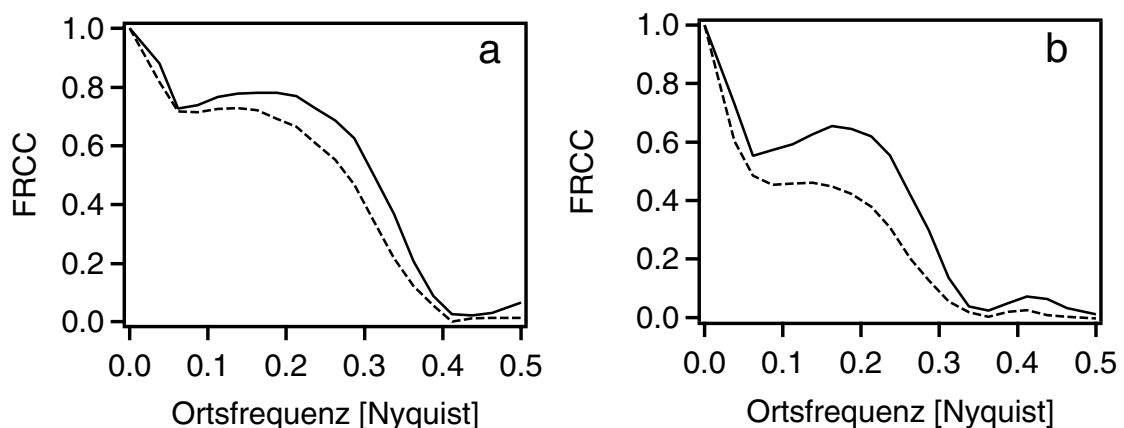


Abb. 2.3: Untersuchung des Kontrastgewinns am CM 300 FEG mit Energiefilter GIF 2002. Es wurden Bildpaare (35.000 fache Vergrößerung, 2x2 Binning) einer eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi*-Zelle jeweils ungefiltert und mit 'Zero-loss' Energiefilterung aufgenommen und die Fourier-Ringkorrelationskoeffizienten (FRCC) berechnet. Deutlich erkennbar ist der Kontrastgewinn durch Energiefilterung (durchgezogene Linie) gegenüber den Aufnahmen ohne Energiefilter (gestrichelte Linie), der sich in höheren FRCC-Werten im gesamten Frequenzbereich niederschlägt. Dabei fällt der Kontrastgewinn für die kleinere Objektiveapertur (Bild a, 20 μm) geringer aus als für die größere (Bild b, 50 μm). Die Ortsfrequenz beträgt 0.292/nm bei 0.5 Nyquist.

Abbildung im Plasmonverlust

Beträgt die Dicke der Probe ein vielfaches der mittleren freien Weglänge der Elektronen wird die Wahrscheinlichkeit von inelastischen Streuprozessen deutlich erhöht.

Dementsprechend nimmt die Intensität im elastischen Peak mit zunehmender Probendicke exponentiell ab, was zu einer Verschiebung des Intensitätsmaximums in den Plasmonbereich führt. Im Vergleich zur 'Zero-loss' Filterung ist jedoch die erreichbare Auflösung, aufgrund der der Ausdehnung des Wechselwirkungspotentials bei inelastischen Streuprozessen, deutlich geringer.

Abbildung von Elementverlustkanten

Die Untersuchung von charakteristischen Ionisationskanten von Elementen erfordert eine Abbildung in einem schmalen Energiefenster oberhalb der Ionisationsenergie ($\Delta E \geq E_I$) und eine oder zwei korrespondierende Aufnahmen unterhalb der Kante ($\Delta E < E_I$). Mit Hilfe der ersten beiden Bilder kann man den Untergrund mittels eines Potenzgesetzes extrapolieren und anschliessend vom dritten Bild subtrahieren. Damit erhält man eine quantifizierbares Bild der Elementkonzentrationen und ihrer Verteilung (Trebba und Mori 1990) (Krivanek et al. 1995).

Aufgrund des deutlichen Kontrastgewinns (2.2) durch Anwendung der 'Zero-loss' Filterung wurde in dieser Arbeit ausschließlich diese Technik bei der Aufnahme von elektronenmikroskopischen Bildern und tomographischen Kippserien verwendet. Der Begriff 'Energiefilterung' versteht sich im Folgenden stets als eine Anwendung der 'Zero-loss' Filterung.

2.1.4 Intensitäten im energiegefilterten Bild

Die Kenntnis der inelastischen und elastischen mittleren freien Weglängen, Λ_{inel} beziehungsweise Λ_{el} , ermöglicht eine Dickenbestimmung des untersuchten Objektes. Dies basiert auf der Annahme, daß die inelastische Streuwahrscheinlichkeit exponentiell mit der Objektstärke zunimmt (Egerton und Leapman 1984). Allgemein lässt sich eine Differentialgleichung für Streuwahrscheinlichkeiten $P(l, m, t)$ aufstellen mit l elastischen und m inelastischen Streuprozessen bei gegebener Probendicke t (Brünger und Menz 1965):

$$\frac{dP(l, m, t)}{dt} = -\frac{P(l, m, t)}{\Lambda_{tot}} + \frac{P(l-1, m, t)}{\Lambda_{el}} + \frac{P(l, m-1, t)}{\Lambda_{inel}}, \quad (2.23)$$

mit der totalen mittleren freien Weglänge $1/\Lambda_{tot} = 1/\Lambda_{inel} + 1/\Lambda_{el}$. Als Lösung ergibt sich:

$$P(l, m, t) = \frac{1}{l!} \left(\frac{t}{\Lambda_{el}}\right)^l \frac{1}{m!} \left(\frac{t}{\Lambda_{inel}}\right)^m e^{-\frac{t}{\Lambda_{tot}}} \quad (2.24)$$

Die mittleren freien Weglängen Λ_{el} und Λ_{inel} sind bereits aus zahlreichen Publikationen für eine Beschleunigungsspannung von 120 kV bekannt: So hat man für amorphes Eis eine mittlere inelastische freie Weglänge im Bereich von $\Lambda_{inel} = 230 \pm 15$ nm (Sun et al. 1993) (LaVerne und Mozumder 1986) (Bailey et al. 1992) gefunden. Auch die Bestimmung von Λ_{inel} mit Hilfe von eiseingebetteten Vesikeln (Grimm et al. 1996) führte in guter Übereinstimmung zu einem ähnlichen Wert von $\Lambda_{inel} = 203 \pm 33$ nm. In der Literatur findet man für die elastische freie Weglänge Werte von $\Lambda_{el} = 342$ nm (Langmore und Smith 1992) bzw. von $\Lambda_{el} = 290$ nm (Angert et al. 1996). Unter der Berücksichtigung von atomaren Streufaktoren kommt man auf (Dinges et al. 1995) $\Lambda_{el} = 375$ nm.

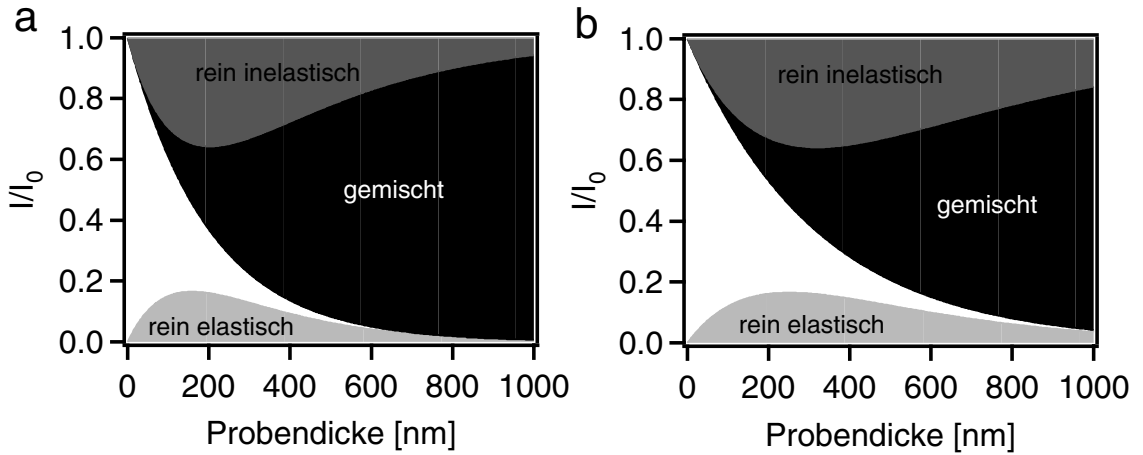


Abb. 2.4: Vergleich von Streuwahrscheinlichkeiten von Elektronen für Eis bei unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen; (a) Verteilung nach Gleichung (2.24) für 120 kV, $\Lambda_{inel} = 200$, $\Lambda_{el} = 350$. (b) Verteilung nach Gleichung (2.24) für 300 kV, $\Lambda_{inel} = 316$, $\Lambda_{el} = 553$. Das Maximum der elastischen Streuung ist zu größeren Objektdicken hin verschoben.

Die mittleren freien Weglängen Λ_{inel} und Λ_{el} verhalten sich proportional zu

$$\beta = \sqrt{1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{E}{m_0 c^2}\right)^2}} \quad (2.25)$$

mit $E = eU$, wobei e die Elementarladung und U die Beschleunigungsspannung der Elektronen ist. Damit lassen sich die Wahrscheinlichkeiten der Streueignisse

für verschiedene Spannungen analytisch berechnen. In Abbildung (2.4) sind diese für zwei Beschleunigungsspannungen, 120 kV und 300 kV, dargestellt. Bei 300 kV ist eine Verschiebung des Maximums der inelastischen und gemischten Streuprozesse zu erkennen. Durch eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung erreicht man also eine erhöhte 'Durchstrahlungsdicke' der Probe. Die mindestens einmal inelastisch gestreuten Elektronen erzeugen ein Hintergrundrauschen und tragen kaum noch spatiale Information. Durch den Einsatz der Energiefilterung werden diese ausgeblendet und nur der Teil der Elektronen, die rein elastisch gestreut wurden und hohe Ortsinformation tragen, werden detektiert. Mehrfach elastisch gestreute Elektronen tragen keine nutzbare Objektinformation, bei den in dieser Arbeit untersuchten Objektdicken sind es jedoch nur wenige.

Mit der hohen Beschleunigungsspannung von 300 kV beim CM 300 FEG erreicht man eine große mittlere freie Weglänge der gestreuten Elektronen und damit die Möglichkeit elektronenoptisch dicke Proben (mehrere hundert nm) zu untersuchen. Der Einsatz des Energiefilters GIF 2002 führt dabei zusätzlich zu einer Kontrasterhöhung der Aufnahmen, so daß mit der Kombination beider Geräte ein hervorragendes Werkzeug zur Untersuchung eiseingebetteter biologischer Objekte zur Verfügung steht.

2.2 Experimenteller Aufbau

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden an verschiedenen Elektronenmikroskopen durchgeführt; an dem CM 120 Biofilter und dem CM 300 FEG. Beide Geräte werden von der Firma FEI (Eindhoven, Niederlande) hergestellt. Das CM 300 FEG wurde im Verlauf dieser Arbeit mit einem Energiefilter vom Typ GIF 2002 der Firma Gatan (Pleasanton, KA, USA) nachgerüstet. In diesem Abschnitt werden beide Mikroskope, ausgehend von der Erzeugung der Elektronen über die Abbildung bis hin zur Detektion von Bildern vergleichend beschrieben und charakterisiert.

2.2.1 Elektronenquellen

Das CM 120 Biofilter ist ausgestattet mit einer Lanthanium Hexaborid (LaB_6) Kathode, aus der Elektronen austreten, die anschließend in einem elektrostatischen Feld beschleunigt werden. Die Wellenlänge der Elektronen berechnet sich zu:

$$\lambda(U) = \frac{h}{\sqrt{2em_0U(1 + \frac{eU}{m_0c^2})}} \quad (2.26)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum $h = 6.6262 \cdot 10^{-34}$ Js, der Lichtgeschwindigkeit $c = 2.9979 \cdot 10^8$ m/s, der Ladung $e = 1.6022 \cdot 10^{-19}$ C, der Ruhemasse $m_0 = 9.1095 \cdot 10^{-31}$ kg des Elektrons und der Beschleunigungsspannung U . Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopen ist die Wellenlänge $\lambda = 3.35$ pm für das CM 120 Biofilter bei $U=120$ kV und $\lambda=1.97$ pm für das CM 300 für $U=300$ kV. Um die Austrittsenergie (Wolfram 4.5 eV, LaB_6 2.7 eV) der Elektronen zu überwinden werden herkömmliche Kathoden durch einen Strom zum Glühen gebracht (ca. 2500 K für LaB_6) und so das Fermi-niveau nach oben verschoben. Die kinetische Energie ist dabei aufgrund der thermischen Anregung nicht einheitlich und folgt einer Maxwell-Verteilung, deren Breite dE proportional zur Temperatur der Kathode ist. Eine deutlich schmalere Energieverteilung (etwa 1 eV) ergibt sich bei Verwendung einer Feldemissionskathode (Field Emission Gun, kurz FEG). Hier wird an der Kathode ein hohes elektrisches Feld angelegt $|\mathbf{E}| \simeq U_F$; mit einer Filamentspannung U_F von typischerweise 3.5 kV ergibt sich eine Feldstärke von ca. 5×10^7 V/cm an der Kathodenspitze. Das Fermi-niveau wird somit nur in einem sehr kleinen Bereich

der Kathodenspitze angehoben und lässt aufgrund des Schottky Effektes Elektronen durch den Potenzialwall tunneln. Um eine höhere Elektronenausbeute zu erreichen wird die Kathode zusätzlich auf ca. 1000 K, erhitzt was zu einer Verbreiterung der Fermi-Verteilung führt, aber den Vorteil hat, daß die Emission wesentlich stabiler ist als bei einer 'kalten' Kathode. Damit ergibt sich eine hohe Strahldichte und damit eine hohe spatiale Kohärenz. Ein Maß für die Helligkeit ist dabei der Richtstrahlwert $b = \frac{j}{\Omega} = \frac{j}{\pi} \alpha^2$, mit der Stromdichte j und dem Raumwinkelelement Ω unter dem Öffnungswinkel α . Die Beleuchtungsapertur β charakterisiert die spatiale Kohärenz. Im Folgenden sind die wichtigsten Parameter einer LaB₆ Kathode des CM 120 Biofilter und die einer Schottky-FEG des CM 300 gegenübergestellt:

	LaB ₆	FEG
j_c [A/cm ²]	1-20	10 ⁴ – 10 ⁶
T_c [K]	2500	1000
β [mrad]	0.5-1.0	0.005-0.2
dE [eV]	1.5-2	0.8-1

Tab. 2.1: Kenngrößen der Elektronenquellen des CM 120 Biofilter (LaB₆) und des CM 300 (FEG).

Ein wesentlicher Vorteil für die Elektronentomographie ergibt sich durch den hohen Richtstrahlwert der FEG, der sich in einer verminderten Belichtungszeit pro Aufnahme niederschlägt. Damit wird der Einfluss der mechanisch bedingten Probendrift vermindert, was schließlich zu einer Erhöhung der Auflösung führt. Vor allem aber verbessert die hohe spatiale und chromatische Kohärenz deutlich die Übertragungseigenschaften (CTF) der Objektivlinse, siehe Gleichung (2.18), so daß in den einzelnen Abbildungen eine höhere Auflösung erreicht werden kann. Die Intensitätsstabilität der Elektronenquelle ist eine wichtige Randbedingung für die Anwendung der Elektronentomographie. So sollten in dem Zeitraum der Datenakquisition konstante Beleuchtungsverhältnisse herrschen, die ein gleichmäßiges Signal-Rausch-Verhältnis der Aufnahmen einer Kippserie garantieren. Bei der LaB₆ Kathode des CM 120 Biofilters wird eine konstante Strahlleistung erst ca. drei Stunden nach dem Einschalten erreicht. Beim CM 300 FEG dauert es ungefähr dreißig Minuten, bis eine gleichmäßige Strahlleistung ($\Delta I < 0.5\%$) gewährleistet ist.

2.2.2 Objektivlinsen

Der grundsätzliche Aufbau der Linsensysteme ist sowohl beim CM 120 Biofilter und dem CM 300 gleich. Entscheidend für die elektronenoptische Abbildung ist die Objektivlinse, alle weiteren Linsen tragen nur unwesentlich zu den Übertragungsfehlern bei und können in der Praxis vernachlässigt werden. Die Dämpfungsterme aus Gleichung (2.17) sind begründet durch die begrenzte spatiale Kohärenz und die Energiebreite der Elektronen. Dabei sind die eingeschränkte spatiale Kohärenz, die Defokussierung und die sphärische Aberration der Objektivlinse die bestimmenden Kenngrößen, siehe Gleichung (2.18). Die Dämpfung, die bedingt wird durch die endliche Energiebreite der Elektronen, findet Ausdruck in dem chromatischen Aberrationskoeffizienten C_C , siehe Gleichung (2.19). In Tabelle (2.2.2) sind die Kenngrößen für die Linsen beider Mikroskope aufgeführt. Sowohl die kürzere Wellenlänge als auch der deutlich kleinere C_S Wert des CM 300, aber auch die bessere Kohärenz der FEG ermöglichen eine Auflösungsverbesserung der aufgenommenen Bilder.

	CM 120 Biofilter (BioTWIN Linse)	CM 300 (TWIN Linse)
f (Brennweite)	6,1 mm	2,7 mm
C_S	6,3 mm	2,0 mm
C_C	5,0 mm	2,0 mm
λ	3,35 pm (120 kV)	1,97 pm (300 kV)

2.2.3 Abbildungseigenschaften der Energiefilter

Geometrische Aberration

Nach Angaben der Herstellerfirma Gatan betragen die geometrischen Verzeichnungsfehler bei dem Energiefilter des CM 120 Mikroskopes ungefähr 1%. Dies ist zurückzuführen auf elektronenoptische Abbildungsfehler des Filters, die eine Verzerrung von bis zu fünf Pixeln am Rand des Bildfeldes (1024x1024 Pixel) bewirken. Um diese zu kompensieren, erfolgt eine Verzerrungskorrektur nach der Aufnahme eines Bildes durch ein von der Firma Gatan bereitgestelltes Computerprogramm, das eine entzerrende Transformation des Originalbildes mit zuvor bestimmten Abbildungskoeffizienten durchführt (Krivanek et al. 1991). Diese Koeffizienten werden aus einer

Referenzmessung mit einer Blendenapertur berechnet, in der sich in regelmäßigen Abständen Löcher befinden, deren Position sehr genau bekannt ist. Durch den Vergleich der Abbildung dieser Lochmaske mit den spezifizierten Werten lässt sich die Transformationsmatrix bestimmen.

Das Energiefilter GIF 2002 ist ausgestattet mit einer CCD-Kamera. Es handelt sich ebenfalls um ein 'post-column'-Filter, das hinter die Optik des Elektronenmikroskopes CM 300 FEG geflanscht wird und so eine etwa vierzigfache Nachvergrößerung relativ zur Bildebene des Mikroskopes erzeugt. Um trotz dieser hohen Nachvergrößerung mit dem TEM arbeiten zu können wurde eine spezielle Linsenserie (d.h. ein Satz von Stromwerten für die abbildenden Linsen) programmiert (FEI, Eindhoven, Niederlande)², die die Mikroskopvergrößerungen um Faktor 20 heruntersetzt. Es bleibt also eine effektive Nachvergrößerung von einem Faktor zwei übrig. Bei diesem Energiefilter sind die geometrischen Abbildungsfehler bereits bis zur dritten Ordnung elektronenoptisch korrigiert, so daß eine Bildentzerrung nicht nötig ist.

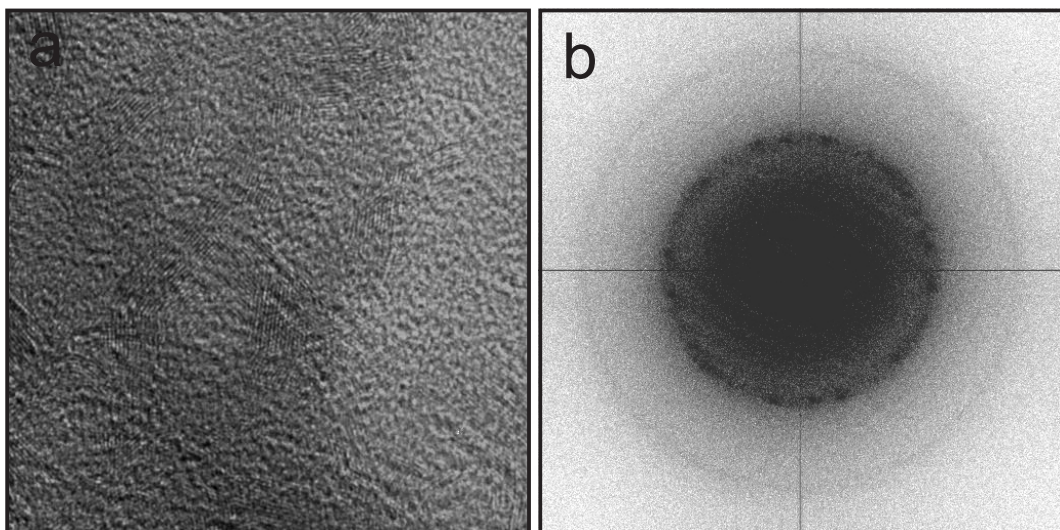


Abb. 2.5: (a) Graphitierter Kohlenstoff bei einer Vergrößerung von 570.000x mit einem 2x2 Pixel Binning der CCD-Kamera und einer Energieschlitzbreite von 20 eV. (b) Das zu (a) korrespondierende Leistungsspektrum. Die Auflösung ist in jeder Richtung gleichmäßig vorhanden.

²Am CM 300 FEG ist bisher kein EFTEM-Kit vorhanden.

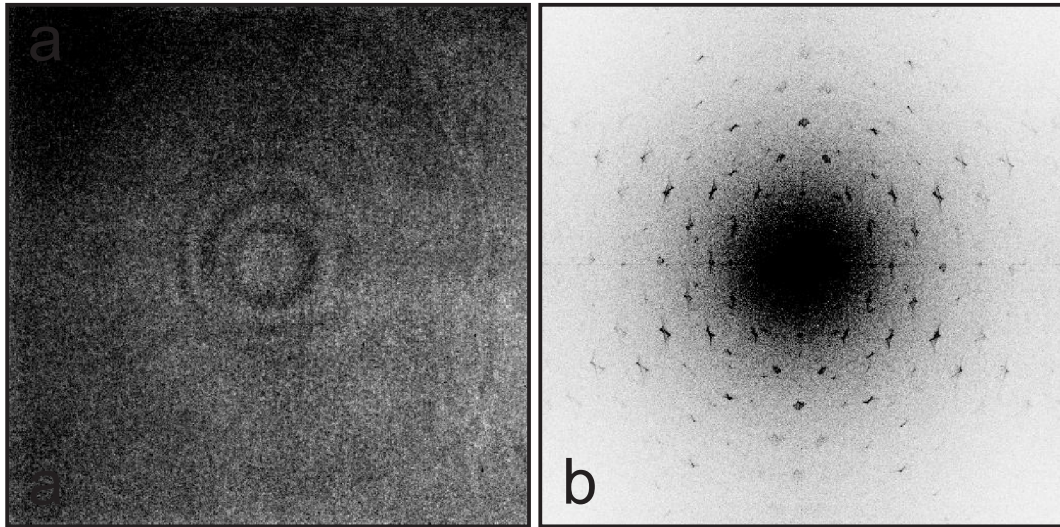


Abb. 2.6: (a) Eigenstrukturbild der CCD-Kamera des GIF 2002. Auffällig sind die konzentrischen Kreise in der Mitte des Bildes. Ursache hierfür sind kleinste Unebenheiten in der Glasfaseroptik, die ein planes Aufliegen verhindern. Um diesen Effekt zu reduzieren, befindet sich zwischen den zwei Faseroptiken eine Flüssigkeit mit dem gleichen Brechungsindex wie die verwendeten Glasfasern. (b) Korrespondierendes Leistungsspektrum (invertiert) zu (a). Deutlich zu sehen sind Maxima, die die regelmäßige Anordnung der Glasfaserbündel in der Faseroptik widerspiegeln.

CCD-Kamera

Die Bilddetektion im Energiefilter erfolgt sowohl bei dem CM 120 Biofilter als auch dem CM 300 FEG durch eine Peltier-gekühlte CCD-Kamera, die mit einer Faseroptik an den Detektor-Chip gekoppelt ist. Auf dieser Faseroptik sitzt ein P43 Phosphorschirm, der auf einer zweiten Faseroptik aufgetragen ist (Krivanek und Mooney 1993). Trifft ein Elektron den Phosphorschirm so werden Photonen erzeugt, die dann mit der Faseroptik auf die CCD-Kamera geleitet werden. Die Detektionsfläche der CCF-Kamera des GIF 2002 beträgt 2048x2048 Pixel bei einer Pixelgröße von 30x30 μm . Das von dem CCD-Chip detektierte Signal wird in ADU (analog digital unit) gemessen. Die Konversionsrate von einfallenden Elektronen zu detektierten Einheiten (ADU) ist bei dem CM 300 mit dem Driftrohr des Energiefilters zu einem Faktor acht bestimmt worden. Dabei diente das Driftrohr als Faradayscher Käfig, der direkt den Strom des einfallenden Elektronenstrahls messen kann³. Die Tiefe der Kamera beträgt 14 Bit. Dies führt bei einem typischen Dunkelstromrauschen von 1,6 ADU zu einer effektiven Tiefe von etwa 12 Bit. Die Auslesezeit beträgt mit einer Frequenz

³Die Messung der Konversionsrate wurde von der Firma Gatan durchgeführt.

von 500 kHz bei voller Auflösung (2048x2048 Pixel) in etwa 8 s. Jedes Bild (O_B) wird pixelweise mit einem zuvor aufgenommenen Dunkelstrombild (D_B) und dem Eigenstrukturbild (E_B) der CCD-Kamera korrigiert:

$$K_B = \frac{O_B - D_B}{E_B - D_B}. \quad (2.27)$$

Da der Dunkelstrom stark von der Temperatur der Kamera abhängt, wird vor jeder Aufnahme ein Dunkelstrombild erzeugt. Das Eigenstrukturbild (2.6) wird unter homogener Ausleuchtung der Kamera aufgezeichnet und einmalig abgespeichert.

Linearität der CCD-Kamera

Aufgrund der Auflösungsreduzierung bedingt durch die mechanische Probendrift ist es wichtig, eine kurze aber sinnvolle Belichtungszeit der CCD-Kamera zu wählen. Dabei muss allerdings die Linearität der Kamera und des Kamerashutters gewährleistet sein, insbesondere dann, wenn eine automatische Variation der Belichtungszeit vorgenommen wird um das Signal-Rausch Verhältnis konstant zu halten, siehe Abschnitt (2.2.4). Die Abweichung von idealen, linearen Verhältnissen ist in Abbildung (2.7) gezeigt. Bis zu einer Belichtungszeit von 0.01 s ist die gemessene Intensität streng linear. Dementsprechend wurden bei der Aufzeichnung von Kippserien Belichtungszeiten im Rahmen von 0.1 s bis zu 1 s gewählt, die typischerweise zu 100 bis 300 ADU/pixel in den aufgenommenen Bildern geführt haben.

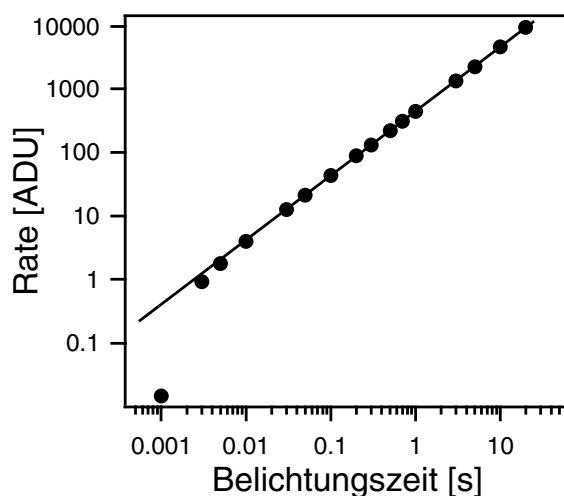


Abb. 2.7: Lineares Verhalten der CCD-Kamera und des Kamerashutters. Erst bei einer Belichtungszeit von kleiner 0.01 s ist eine Abweichung von der Linearität zu erkennen. Typische Belichtungszeiten bei der Elektronentomographie sind im Bereich von 0.1 s - 1 s.

Modulationstransferfunktion (MTF)

Die Auflösung der CCD-Kamera wird bestimmt durch die Modulationstransferfunktion (kurz MTF), die wiederum dominiert ist durch die Dicke des Szintillators und der numerischen Apertur der Faserplatten (Kujawa und Krahl 1992). Den Verlauf der MTF erhält man durch das Abbilden einer scharfen Kante, wie z.B. dem 'Beam Stopper'⁴, der sich in der Bildebene des Elektronenmikroskopes befindet. Aus der Verbreiterung dieser 'idealen' Linie (Edge spread function, kurz ESF) lässt sich die MTF bestimmen zu:

$$MTF = \mathbf{F}\left(\frac{d}{dn_{\perp}}ESF\right), \quad (2.28)$$

wobei n_{\perp} die Richtung senkrecht zur Kante ist, was einer Projektion der MTF eines Punktobjektes in einer zur Kante parallelen Richtung entspricht. Die Intensitäten des Bildes werden also entlang der abgebildeten Kante projiziert, dann abgeleitet und Fourier-transformiert⁵.

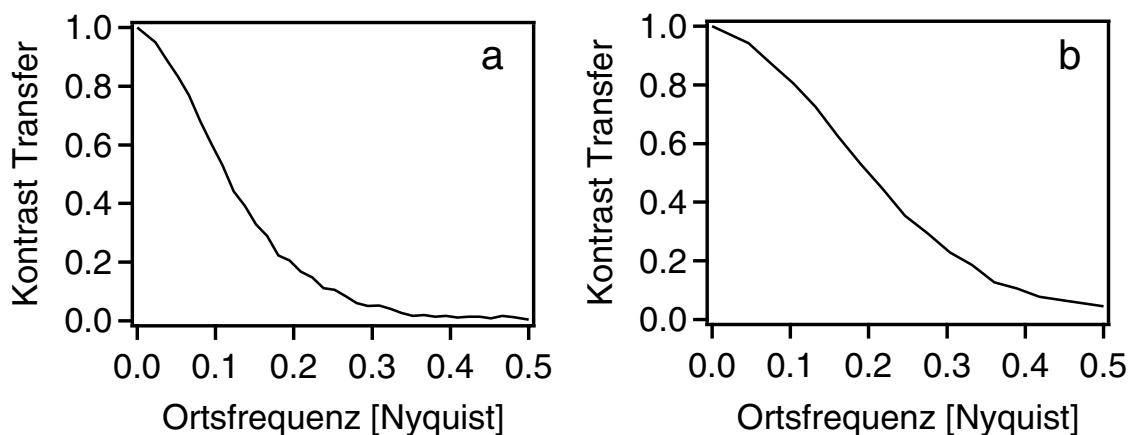


Abb. 2.8: Modulationstransferfunktionen (MTF) der CCD-Kamera des Energiefilters GIF 2002. (a) MTF für eine Aufnahme mit voller Auflösung (2048x2048 Pixel, Pixelgröße 30 μm). Bei einem Achtel der Nyquistfrequenz ist die MTF auf die Hälfte abgesunken. (b) MTF für die CCD-Kamera mit einem 2x2 Binning.

⁴Der 'Beam Stopper' ist ein Dorn aus Metall, der für Justierungsaufgaben in den Strahlengang des Elektronenmikroskopes gefahren werden kann.

⁵Die Auswertung dieser Daten und die Bestimmung der DQE erfolgte in Zusammenarbeit mit David Mastrorade (University of Colorado, USA).

Quantenausbeute der CCD-Kamera (DQE)

Das Systemrauschen der CCD-Kamera wird durch die Quantenausbeute charakterisiert (detective quantum efficiency, kurz DQE). Dieser Wert wird bestimmt durch das quadrierte Verhältnis des Signal-Rausch-Verhältnisses (signal noise ratio, kurz SNR) des Ausgangssignals zum SNR des Eingangssignals:

$$DQE = \frac{SNR_{out}^2}{SNR_{in}^2}. \quad (2.29)$$

Der Idealwert der DQE ist 1.0 für den Fall, daß jedes einfallende Elektron ohne irgendein zusätzliches Signalrauschen detektiert wird. Aufgrund der beschränkten Auflösung der CCD-Kamera ist die Information eines einfallenden Elektrons über mehrere Pixel verschmiert, siehe Abschnitt (2.8), so daß die Angabe der DQE frequenzabhängig erfolgen muss (Ruijter 1995), siehe Abbildung (2.9). Für eine Region im Fourierraum gilt unter der Annahme einer Poisson-Verteilung der Elektronen in einem 'Zufalls'-Bild I_{rnd} :

$$SNR_{in}^2 = \frac{Signal_{in}^2}{var(I_{rnd})}. \quad (2.30)$$

Dementsprechend gilt für das Signal-Rausch-Verhältnis des Ausgangssignals:

$$SNR_{out}^2 = \frac{MTF^2 * Signal_{in}^2}{var(I_{out})}. \quad (2.31)$$

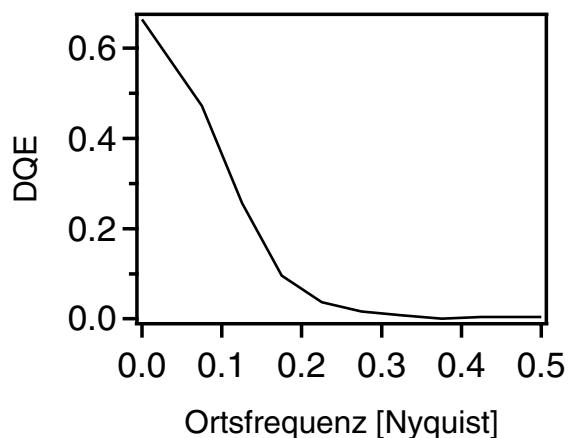


Abb. 2.9: Frequenzabhängige Quantenausbeute (DQE) der CCD-Kamera. Ideal wäre ein Wert von 1.0 für den Fall, daß jedes einfallende Elektron ohne irgendein zusätzliches Signalrauschen detektiert wird.

2.2.4 Automatisierte Tomographie

Aufgrund der großen Strahlempfindlichkeit von biologischen Proben (Baumeister 1982) wurden im Laufe der letzten zehn Jahre Methoden zur Computergestützten

Elektronenmikroskopie entwickelt (Dierksen et al. 1992)(Dierksen et al. 1993), die eine optimale Aufnahme von Bildern mit minimaler Strahlenschädigung ermöglichen. Diese Prozeduren wurden von Rudo Grimm (Grimm 1998) in die Skriptsprache Digital Micrograph (Gatan) auf einen Macintosh Computer (Apple Inc.) übertragen. Basierend auf dieser Implementierung wurde das CM 300 FEG mit einer externen Computersteuerung ausgestattet, siehe Abbildung (2.10), die das Arbeiten unter Nieder-Dosis-Bedingungen erlaubt. Dazu mussten einige Adaptionen der Software

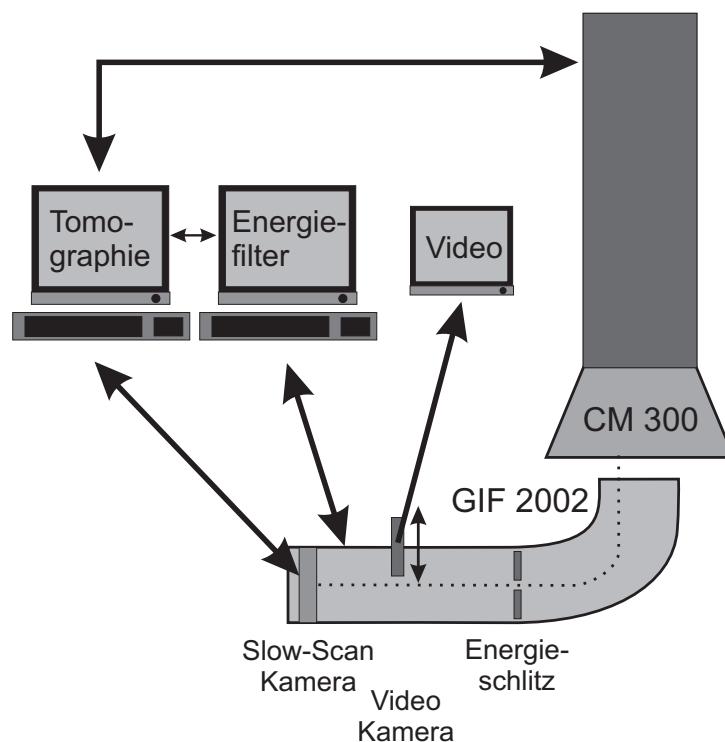


Abb. 2.10: Aufbau des CM 300 FEG mit Energiefilter GIF 2002. Die Pfeile deuten Kommunikations- bzw. Steuerwege der Computer an. Ein Macintosh Computer steuert das TEM an und führt die Tomographie-Software aus, während der zweite die Steuerung des Energiefilters übernimmt. Die gestrichelte Linie ist die Bahn eines elastisch gestreuten Elektrons.

vorgenommen werden, die insbesondere aufgrund des neuen Energiefilters GIF 2002, dem Fehlen der EFTEM-Software für das CM 300 und Veränderungen der Syntax der Digital Micrograph Skripten notwendig waren. Nach der erfolgreichen Portierung wurde auch das CM 120 Biofilter mit der 'neuen' Steuersoftware ausgerüstet. Zur dreidimensionalen Rekonstruktion von Objekten ist es notwendig, eine große

Anzahl von einzelnen Projektionen unter unterschiedlichen Kippwinkeln zu erfassen, siehe Abschnitt (2.3). Diese Reihe von elektronenmikroskopischen Bildern wird als Kippserie bezeichnet. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Objekten handelt es sich um eiseingebettete Zellen die, bedingt durch ihre große Dichte und Ausdehnung, besonders strahlempfindlich sind. Im Folgenden soll kurz auf die nötigen Verarbeitungsschritte bei der automatisierten Elektronentomographie eingegangen werden. Dabei werden in Anlehnung an die Literatur und an die Tomographie-Software die Einstellungen des TEM bei den einzelnen Schritten in sogenannte Positionen zusammengefasst. Die *Autofokus*-, die *Tracking*- und die *Aufnahme*-Position zeichnen sich also durch einen Satz von Mikroskopparametern aus (Vergrößerung, Bildverschiebung, Strahlverschiebung, Belichtungszeit und Binning⁶ der CCD-Kamera etc.), der vom Computer ausgelesen werden kann. Umgekehrt ist eine Einstellung des Mikroskopes durch den Computer möglich, der je nach Aufgabe die nötigen Parameter übermittelt und so den Ablauf einer Kippserie steuert.

Änderung des Kippwinkels und Korrektur der Bildauswanderung

Die Driftbewegung der Probe durch mechanische Instabilitäten des gekühlten Probenhalters, im Folgenden Kryo-Halter genannt, ist ein wesentliches Problem bei der Elektronentomographie. Diese Driftbewegung wirkt sich vor allem beim Kippen des Kryo-Halters im TEM aus und führt zu einer Verschiebung der Probenposition relativ zum Elektronenstrahl und der CCD-Kamera. Um diesen Effekt zu kompensieren wird mit Hilfe der Strahl- und Bildverschiebungsspulen der gleiche Bildausschnitt bei jedem Kippwinkel neu zentriert, siehe auch Abbildung (2.11). Die Berechnung des Verschiebungsvektors erfolgt dabei durch Korrelation des aktuellen Bildes mit einem unter dem vorherigen Winkel aufgenommenen Bild. Dazu wird das Bild zunächst in Abhängigkeit vom Aufnahmewinkel senkrecht zur Kippachse gestreckt und aus dem Maximum der Kreuzkorrelationsfunktion der Verschiebungsvektor berechnet (Guckenberger 1982). Die hierfür benötigten Bilder werden mit einer hohen CCD-Kamera Binning von 4x4 und einer kurzen Belichtungszeit aufgenommen. Die implementierte Tomographiesoftware sieht zwei Korrekturen der Bildauswanderung vor: einen sogenannten *Search*-Schritt für eine grobe Anpassung, meist bei einer

⁶Ein 2x2 Binning ist ein Zusammenfassen von vier benachbarten Pixeln zu einem Pixel.

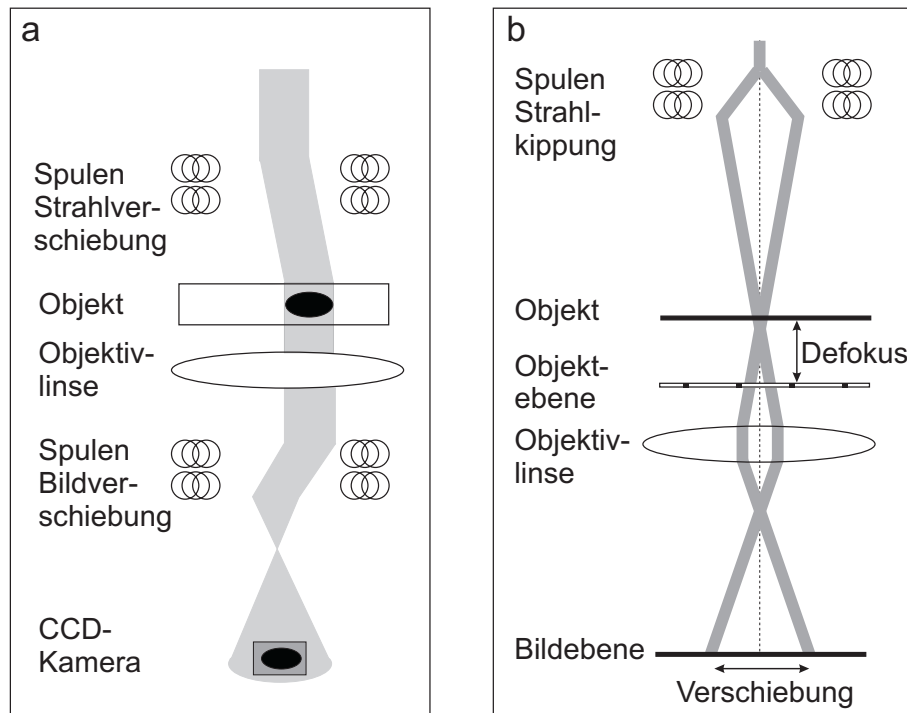


Abb. 2.11: (a) Korrektur der mechanisch bedingten Bildauswanderung bei der Kippung des Objektes. Der Computer berechnet mit Hilfe einer Korrelationsfunktion aus dem vorherigen und dem aktuellen Bildfeld die Verschiebung und kompensiert diese mit Hilfe der Strahlverschiebungs- und Bildverschiebungsspulen. Somit wird das untersuchte Objekt immer im Zentrum der Abbildung nachgeführt. (b) Autofokussierung mit Hilfe der Strahlkippung. Bei defokussiertem Objekt erfolgt unter einem gekippten Strahl eine Bildverschiebung. Bei genauer Kenntnis dieser Verschiebung, kann die Objektivlinse dementsprechend nachfokussiert werden.

niedrigen Vergrößerung, und einen *Tracking*-Schritt, der für eine Feinkorrektur der Auswanderung sorgt. Bei einer optimalen Einstellung der Kippvorrichtung des Mikroskopes⁷ ist die Bildauswanderung nach der Kippung klein (ca. $1\mu\text{m}$ bei $\pm 60^\circ$ für eine 42.000-fache Vergrößerung). Zudem ist die Auswanderung abhängig vom Winkelinkrement; so ist sie gering für kleine Winkel. Dementsprechend ist es möglich den *Search*-Schritt für die Grobverschiebung auszulassen, was zu einer Reduzierung der Strahlendosis führt.

⁷Compustage.

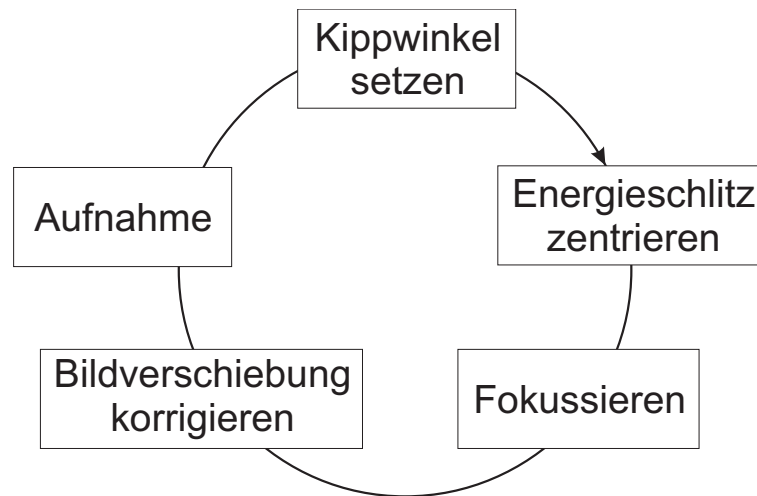


Abb. 2.12: Schematischer Ablauf eines tomographischen Aufnahmezyklus. Für jeden gesetzten Kippwinkel wird die Probe erneut fokussiert und die mechanische Probendrift mit Hilfe der Bildverschiebung korrigiert. Danach erfolgt die eigentliche Aufnahme. Eine Zentrierung des Energieschlitz zur 'Zero-loss' Filterung ist nur alle 20 Aufnahmen nötig.

Autofokussierung

Eine weitere Autotuning Funktion ist die automatische Fokussierung. Diese ist implementiert mit Hilfe der Strahlkippmethode (Koster und deRuijter 1992). Hierbei werden zwei Bilder mit unterschiedlicher Kippung des Elektronenstrahls aufgenommen und aus der Verschiebung der aktuelle Defokus berechnet, siehe auch Abbildung (2.11). Der Differenzbetrag zum gewünschten Defokuswert wird zum Mikroskop übertragen und dementsprechend korrigiert. Ist diese Änderung außerhalb einer frei wählbaren Toleranz, so wird dieser Vorgang (maximal dreimal) wiederholt. Ausführliche Tests haben gezeigt, daß so bei den typischerweise verwendeten Vergrößerungen (42.000-fach) Abweichungen kleiner 50 nm vom gewünschten Defokus erreicht werden. Um die Probe möglichst wenig zu belasten, werden die zur Autofokussierung notwendigen Aufnahmen mit einem Binning von 4x4 Pixel und einer kurzen Zeit belichtet, oder es wird eine Position für den Autofokus gewählt, die sich knapp neben der Probe entlang der Kippachse befindet.

Zentrierung des Energieschlitzes

Die Zentrierung des Energieschlitzes erfolgt durch eine schnelle Folge von sehr kurz belichteten Aufnahmen (typ. 0.005 s) und einem hohen Binning der Pixel der CCD-Kamera (typ. 16x16 Binning). Der Schlitz wird dabei solange um 2 eV verschoben bis die mittlere Intensität des Bildes auf 10% des Ausgangsbildes abgesunken ist. Dann hat man den Rand des Energieschlitzes erreicht und der Computer kennt die dorthin nötige Verschiebung in eV. Der Wert der neuen Schlitzmitte ergibt sich aus dem Wert des neuen Schlitzrandes und der Hälfte der Schlitzbreite. Die für diesen Schritt benötigte Dosis ist vernachlässigbar klein. Typischerweise ist eine solche Zentrierung bei dem GIF 2002 alle zwanzig Aufnahmen notwendig.

Änderung des Kippwinkels und der Belichtungszeit

Die Tomographie-Software am CM 300 FEG lässt verschiedene Strategien zur Aufnahme einer Kippserie zu. Typischerweise wird unter Niederdosis-Bedingungen eine geeignete Objektstelle gesucht, danach die *Autofokus*-Position entlang der Kippachse verschoben und die *Tracking*-Position identisch zur *Aufnahme*-Position gesetzt. Die Auswahl des Objektes erfolgt durch die bessere Übersicht meist bei einer 0°-Kippung. Danach wird die Kippserie in einer ausgewählten Kipprichtung gestartet. Ist der Extremwinkel in einer Richtung erreicht, kippt man den gewünschten Bereich bei einer verminderten Vergrößerung (zwei Stufen unter der Aufnahmevergrößerung) auf die 0°-Position zurück und startet die zweite Hälfte der Kippserie in die entgegengesetzte Kipprichtung. Das Winkelinkrement bestimmt dabei die Anzahl der Aufnahmen N und wird abhängig von der gewünschten Auflösung d des Rekonstruktionsvolumens mit der Größe D abgeschätzt zu:

$$d = \frac{\pi D}{N}. \quad (2.32)$$

Dieses 'Crowther'-Kriterium (Crowther et al. 1970) gilt für eine vollständige Einachsenkippserie ($\pm 90^\circ$) und ist aufgrund des fehlenden Winkelbereiches nur eine Näherung für eine isotrope Auflösung im Rekonstruktionsvolumen. In der Praxis sollte bei der Aufnahme von Kippserien stets ein Kompromiss zwischen Belichtungszeit, Strahlschädigung der Probe sowie Anzahl und Alignierbarkeit der einzelnen Aufnahmen gefunden werden. Die Steuersoftware ermöglicht mehrere Schemata zur

Variation der Belichtungszeit in Abhängigkeit vom Kippwinkel. Diese Variation ist nötig, da die Dicke der durchstrahlten Probe mit höheren Kippwinkel ϕ zunimmt, siehe auch Abbildung (2.18). Um ein möglichst konstantes Signal-Rausch-Verhältnis bei allen Aufnahmen einer Kippserie zu erreichen, wurde in dieser Arbeit stets eine Skalierung der Belichtungszeit mit dem Faktor $1/\cos(\phi)$ gewählt:

$$t(\phi) = \frac{t_0}{\cos(\phi)}, \quad (2.33)$$

wobei t_0 die Belichtungszeit bei einem Kippwinkel von 0° ist. Somit ist zum Beispiel die Belichtungszeit bei einem Kippwinkel von 60° doppelt so hoch wie unter einem Winkel von 0° .

2.2.5 Eiseinbettung biologischer Objekte

Um ein sofortiges Verdampfen der biologischen Objekte im Hochvakuum des Elektronenmikroskopes zu vermeiden, und um gleichzeitig einen möglichst nativen Zustand zu konservieren, wird die Probe in amorphes Eis eingebettet und unter Kryobedingungen untersucht. Dazu bringt man ca. $4 \mu\text{l}$ der Suspension auf ein Trägernetzchen, welches mit einem Kohlelochfilm überspannt ist⁸. Um den Anteil der mehrfach gestreuten Elektronen im TEM klein zu halten, ist ein möglichst dünner Eisfilm (ca. 50-100 nm) erstrebenswert, der die einzelnen Zellen umgibt. Dies wird durch Absaugen der überflüssigen Suspension mit Filterpapier erreicht, was visuell kontrolliert wird. Kommt das Filterpapier mit der Suspension auf dem Trägernetzchen in Berührung, wird ein großer Teil aufgesaugt und das Papier bleibt mit dem Trägernetzchen zunächst in Kontakt. Je nach viskoelastischer Beschaffenheit der Suspension löst sich nach kurzer Zeit (10 s -30 s) das Filterpapier vom Trägernetzchen, welches dann sofort in flüssiges Ethan eingeschossen wird. Ethan eignet sich mit Kühlraten im Bereich von einigen Mega Kelvin pro Sekunde besonders für den direkten Phasenübergang von flüssigem Wasser hin zu amorphem Eis. Nach der Kryopräparation wird die Probe stets unter flüssigem Stickstoff gehalten und so auch in den Probenhalter des Elektronenmikroskops transferiert, der sich ebenfalls auf

⁸Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Neuerungen zu diesen Kohlelochfilmen aufgenommen und ihre Eigenschaften konnten in Zusammenarbeit mit dem Hersteller (Quantifoil) weiter verbessert werden.

Stickstofftemperatur befindet und während der gesamten Datenakquisition auf einer Temperatur von ca. 90 K gehalten wird. Mit Hilfe eines Beugungsbildes wird überprüft, ob die Probe vitrifiziert wurde, oder ob sich kristallines Eis gebildet hat. Zur Bestimmung der Eisdicke lässt sich der Intensitätsabfall des Elektronenstrahls bei Propagation durch das Medium nutzen. Da es sich bei dem verwendeten Aufbau um ein Elektronenmikroskop mit Energiefilter handelt, ist es möglich, mit Hilfe der von Egerton und Leapman (Egerton und Leapman 1984) vorgeschlagenen Methode ('Log-Ratio'-Methode) die Dicke des Objektes zu bestimmen. Man bildet dabei den Quotienten aus einer gefilterten und einer ungefilterten Aufnahme an derselben Objektstelle bei offener Objektiveblende. Unter der Annahme, daß die inelastische Streuwahrscheinlichkeit exponentiell mit der Dicke zunimmt, lässt sich die Proben-*d* berechnen zu:

$$d = \Lambda_{inel} \ln\left(\frac{I_{total}}{I_0}\right). \quad (2.34)$$

Hierbei ist Λ_{inel} die inelastische freie Weglänge, I_{total} die integrierte Gesamtintensität und I_0 die Intensität des 'Zero-Loss'-Peaks.

2.3 Grundlagen der tomographischen Rekonstruktion

Eine wichtige Klasse von Rekonstruktionsverfahren stellen die tomographischen Methoden dar. Sie basieren auf Arbeiten des Mathematikers K. Radon aus dem Jahr 1917, in denen er nachwies, daß ein n -dimensionales Objekt vollständig aus seinen unendlich vielen $(n-1)$ -dimensionalen Projektionen unterschiedlicher Richtung rekonstruiert werden kann (Radon 1917). Diese Erkenntnis wurde unabhängig voneinander durch Mathematiker, Radioastronomen und Radiologen mehrfach wiederentdeckt. Der entscheidende Durchbruch zur vielfältigen Anwendbarkeit dieser Methoden gelang allerdings erst Anfang der achtziger Jahre mit der Entwicklung leistungsfähiger Computer.

Bei der Mathematik der Rekonstruktionsverfahren unterscheidet man zwischen Methoden, die das Objekt im Realraum berechnen und Fouriermethoden, die auf der Interpolation der Fouriertransformierten des Objektes basieren. Grundlage dafür stellt die Entwicklung des Rekonstruktionsvolumens in eine Reihe von orthogonalen Funktionensystemen (Cormack 1963) oder z.B. in Fourier-Bessel Funktionen (Crowther et al. 1970) dar. Iterative Rekonstruktionsmethoden im Realraum, wie die algebraische Rekonstruktion (algebraic reconstruction technique, kurz ART) (Carazo und Carrascosa 1992), lösen die Objektfunktion durch Aufstellen eines Gleichungssystems. So kann in einem iterativen Prozess die quadratische Abweichung der projizierten Objektstruktur mit den gemessenen Projektionen minimiert werden. Diese Methode lässt die Einführung von Nebenbedingungen zu, die regularisierend wirken und z.B. die Vorkenntnis einer Struktur oder die Minimierung eines Entropieterms (Skoglund und B. 1986) beinhalten. Eine weit verbreitete Methode der Rekonstruktion ist die gewichtete Rückprojektion. Sie erfolgt im Realraum, während die mathematisch korrekte Vorbereitung der Projektionen im Fourierraum durchgeführt wird. Die Grundlage hierfür bildet das Projektions-Schnitt-Theorem der Fourier-Theorie, auf das im Folgenden näher eingegangen wird. Hierbei findet zur Vereinfachung eine Reduktion der Objekte auf zwei Dimensionen statt, deren Projektionen entsprechend eindimensional sind. Dies erfolgt jedoch ohne Einschränkung der Allgemeinheit, so daß die Methode analog auf mehrdimensionale Körper erweitert werden kann.

2.3.1 Projektions-Schnitt-Theorem

Die Parallel-Projektion der Funktion $f(x, y)$ unter dem Projektionswinkel $\theta = 0^\circ$ sei definiert als (siehe auch Abbildung 2.13):

$$p_0(x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) dy. \quad (2.35)$$

Die dazugehörige Fourier-Transformierte ist:

$$\mathbf{P}_0(u) = \int_{-\infty}^{\infty} p_0(x) e^{-2\pi i u x} dx. \quad (2.36)$$

Durch Einsetzen der Projektion $p_0(x)$ (2.35) in das Fourier-Integral (2.36) erhält man:

$$\mathbf{P}_0(u) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-2\pi i u x} dx dy. \quad (2.37)$$

Andererseits ist die Fourier-Transformierte der Funktion $f(x, y)$ definiert durch:

$$\mathbf{F}(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-2\pi i (ux + vy)} dx dy. \quad (2.38)$$

Betrachtet man die Werte dieser Fourier-Transformierten (2.38) entlang der u -Achse ($v=0$) des Ortsfrequenzraums kommt man auf:

$$\mathbf{F}(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-2\pi i u x} dx dy = \mathbf{P}_0(u). \quad (2.39)$$

Die Fourier-Transformierte $\mathbf{P}_0(u)$ der senkrechten Projektion $p_0(t)$ im Ortsraum stimmt also mit der Fourier-Transformierten $\mathbf{F}(u, 0)$ im Ortsfrequenzraum überein. Zudem gilt der Drehungssatz der Fourier-Theorie; für eine orthogonale Transformation \mathbf{A} und einem Funktionenpaar $f(\vec{x}) \iff \mathbf{F}(\vec{u})$ gilt also $f(\mathbf{A} \vec{t}) \iff \mathbf{F}(\mathbf{A} \vec{u})$.

Nach dem Übergang von kartesischen Koordinaten in Polarkoordinaten erhält man den folgenden wichtigen Satz:

Projektions-Schnitt-Theorem

Es sei $p_\theta(t)$ die Projektion einer Funktion $f(x, y)$ im Ortsraum mit dem Projektionswinkel θ , und $\mathbf{P}_\theta(w)$ die zugehörige Fourier-Transformierte. Zudem sei $\mathbf{F}(w, \theta)$ die Fourier-Transformierte von $f(x, y)$, eingeschränkt auf die unter dem Winkel θ durch den Nullpunkt verlaufende Schnittlinie. Dann gilt:

$$\mathbf{P}_\theta(w) = \mathbf{F}(w, \theta). \quad (2.40)$$

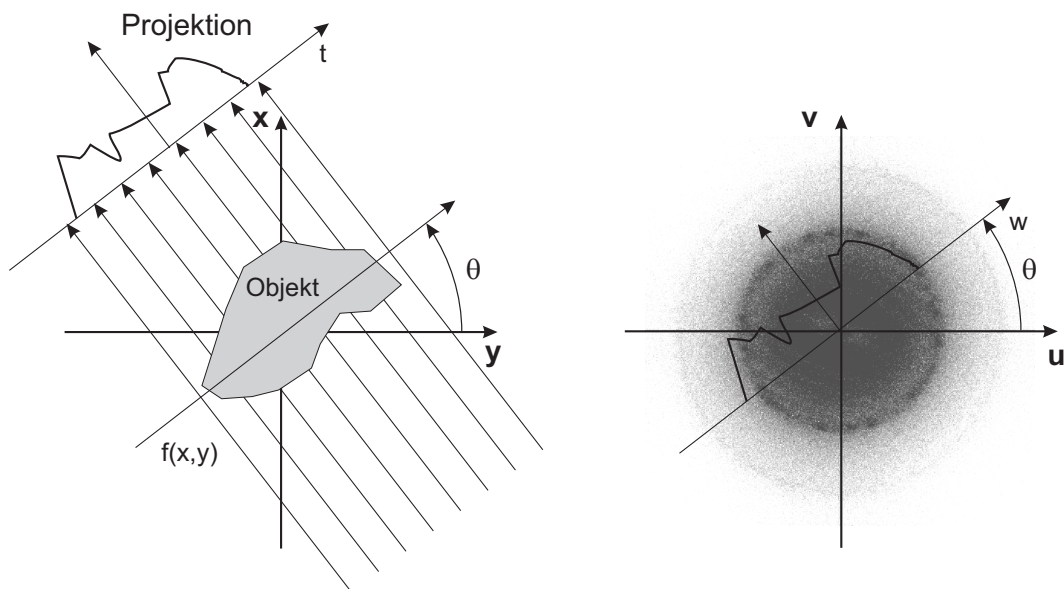


Abb. 2.13: Projektions-Schnitt-Theorem; die Fourier-Transformierte $\mathbf{P}_\theta(w)$ der Projektion $p_\theta(t)$ unter dem Projektionswinkel θ ist gleich der Fourier-Transformierten $\mathbf{F}(w, \theta)$ im Ortsfrequenzraum.

2.3.2 Gefilterte Rückprojektion

Mit den mathematischen Grundlagen aus Abschnitt (2.3.1) lässt sich eine numerisch effiziente Methode zur Rekonstruktion, siehe Abbildung (2.14) von Schnittbildern, bzw. von dreidimensionalen Volumina ableiten. Man geht dazu von der inversen Fourier-Transformation in Polarkoordinaten aus:

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} \mathbf{F}(w, \theta) e^{2\pi i w (x \cos(\theta) + y \sin(\theta))} w dw d\theta \quad (2.41)$$

oder

$$\begin{aligned} f(x, y) = & \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} \mathbf{F}(w, \theta) e^{2\pi i w (x \cos(\theta) + y \sin(\theta))} w dw d\theta \\ & + \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} \mathbf{F}(w, \theta + \pi) e^{2\pi i w (x \cos(\theta + \pi) + y \sin(\theta + \pi))} w dw d\theta. \end{aligned} \quad (2.42)$$

Aus dem Friedel-Gesetz für reelles $f(x, y)$ folgt $\mathbf{F}(w, \theta) = \overline{\mathbf{F}(w, \theta + \pi)}$. Das Integral (2.42) lässt sich umformen zu:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left(\int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{F}(w, \theta) e^{2\pi i w (x \cos(\theta) + y \sin(\theta))} |w| dw \right) d\theta. \quad (2.43)$$

Folgend aus dem Projektions-Schnitt-Theorem lässt sich $\mathbf{F}(w, \theta)$ ersetzen durch $\mathbf{P}_{\theta}(w)$:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left(\int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{P}_{\theta}(w) e^{2\pi i w (x \cos(\theta) + y \sin(\theta))} |w| dw \right) d\theta. \quad (2.44)$$

Betrachtet man nur die Punkte $t = x \cos \theta + y \sin \theta$ auf der durch θ charakterisierten Geraden, dann kommt man auf die Funktion:

$$\mathbf{Q}_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{P}_{\theta}(w) |w| e^{2\pi i w t} dw. \quad (2.45)$$

$$p_\theta(w) \xrightarrow{\text{Fourier-Transformation}} \mathbf{P}_\theta(w) \xrightarrow{\text{Gewichtung mit } |w|} |w|\mathbf{P}_\theta(w) \xrightarrow{\text{inverse Fourier-Transformation}} \mathbf{Q}_\theta(t)$$

Sie lässt sich interpretieren als eine Filterung der ursprünglichen Projektion $p_\theta(w)$: Die Fourier-Transformierte $\mathbf{P}_\theta(w)$ wird mit der Transferfunktion $|w|$ im Ortsfrequenzraum multipliziert und anschließend zurücktransformiert in den Ortsraum (2.3.2). Den Wert der Originalfunktion $f(x, y)$ am Ort (x, y) erhält man durch die Integration der Beiträge $\mathbf{Q}_\theta(t)$ über den Winkelbereich $0 \leq \theta \leq \pi$:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \mathbf{Q}_\theta(x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta. \quad (2.46)$$

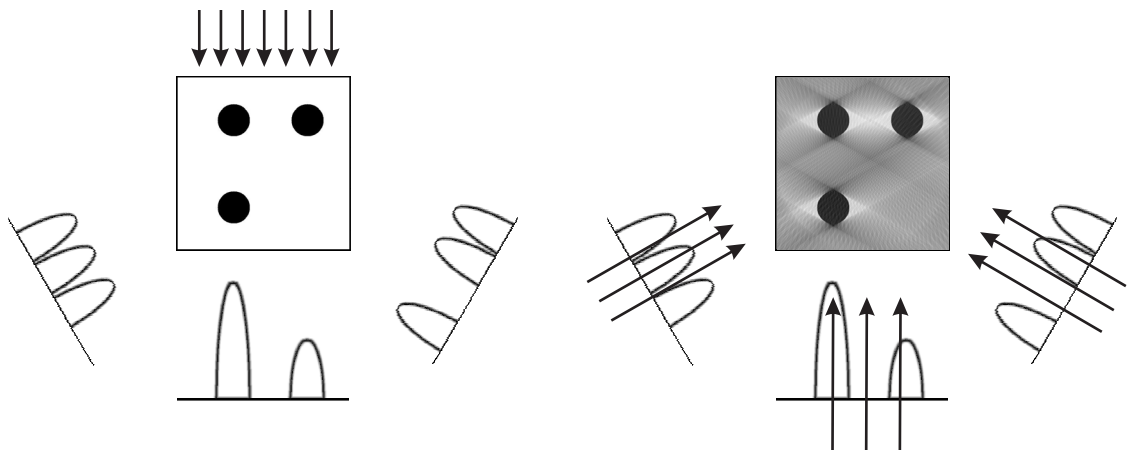


Abb. 2.14: (a) Tomographische 1D-Projektionen des 2D-Objektes unter verschiedenen Projektionswinkeln. Gezeigt ist die -60° -, die 0° - und die $+60^\circ$ -Projektion. (b) Gefilterte Rückprojektion der Projektionen aus (a) mit einem eingeschränkten Winkelbereich von $\pm 60^\circ$. Erkennbar ist eine Elongation der Kreisobjekte, siehe Abschnitt (2.3.4).

2.3.3 Alignierung und Bestimmung der Kippachse

Die Korrektur der Bildverschiebung, bei der Aufzeichnung einer Kippserie dient dazu, das Objekt im erfassbaren Bereich der CCD-Kamera zu halten. Dies wird aufgrund der Probedrift der Kryo-Halter nur bedingt erreicht, so daß nur eine

geringe Zentrierungsgenauigkeit von etwa 50 Pixeln (40 nm) bei 42.000-facher Vergrößerung erreicht werden kann. Diese Genauigkeit ist jedoch für eine analytische Rückprojektion nicht ausreichend, und die einzelnen Projektionen müssen zu einem gemeinsamen Referenzpunkt, relativ zu einem gemeinsamen Ursprung, nachträglich verschoben werden. Dies kann wie bei der Tomographie-Software durch Kreuzkorrelation oder mit Hilfe von Markierungspunkten, siehe Abschnitt (2.15), die sich innerhalb des abgebildeten Bereiches befinden, geschehen.

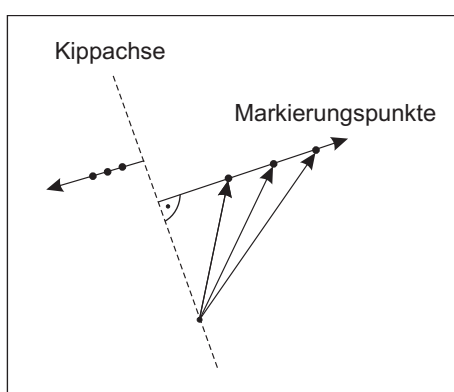


Abb. 2.15: Alignierung mit Hilfe von Markierungspunkten. Die Position eines Goldpartikels wandert in Abhängigkeit vom Projektionswinkel auf einer Geraden senkrecht zur Kippachse.

Alignierung mit Markierungspunkten

Um ein einheitliches Koordinatensystem zu definieren, bietet es sich an, Goldpartikel, die sich in Lösung befinden, dem untersuchten Objekt zuzugeben. Verwendet wird dabei Kolloidgold (Sigma, Saint Louis, USA) mit einer Partikelgröße von 5 nm bzw. 10 nm Durchmesser. Ein Tropfen dieser Lösung (typ. 6 μ l) wird dazu auf ein Lochgrid⁹ gebracht. Die Pufferlösung verdunstet nach wenigen Minuten und das Gold lagert sich gleichmäßig auf dem Lochgrid ab. Beim Auftragen der Probe lösen sich die Goldpartikel und durchmischen sich mit der Probenlösung. Bei der Auswahl eines für die Elektronentomographie geeigneten Objektes ist ein wesentliches Kriterium die Alignierbarkeit der einzelnen Projektionen, d.h. die Markierungspunkte müssen deutlich erkennbar und unterscheidbar sein. Ein Computerprogramm, welches in Form einer Prozedur die Alignierung durchführt, wurde von Reiner Hegerl mit Hilfe des EM Programmpaketes (Hegerl 1996) implementiert. Hierbei wird ausgenutzt, daß sich die Markierungspunkte in Abhängigkeit vom Kippwinkel senkrecht

⁹Kupfernetzchen mit einem Durchmesser von 3 mm, das mit einer Kohlelochfolie belegt ist.

zur Kippachse bewegen, siehe Abbildung (2.15). Zur Berechnung der Richtung der Kippachse und der Verschiebungsvektoren der Projektionen wird zunächst die Position von drei bis zehn Markierungspunkten manuell bestimmt¹⁰. Die Prozedur berechnet dann unter der Annahme eines Referenzpunktes die Verschiebungen aller Punkte relativ zu diesem 'Ursprungs'-Punkt. Mit Hilfe eines 'Least-Squares' Verfahrens wird eine Gerade bestimmt und daraus die Richtung der Kippachse berechnet. Die Verschiebungsvektoren der einzelnen Bilder ergeben sich dann durch die mittlere Verschiebung aller gewählten Markierungspunkte in der jeweiligen Projektion.

2.3.4 Rekonstruktionsartefakte

Sowohl mechanisch bedingte Limitierungen des Elektronenmikroskops, wie der eingeschränkte Winkelbereich, als auch die Drift der Probe sowie eine mögliche Schrumpfung oder Ausdehnung des beobachteten Objektbereichs durch Strahlschädigung beeinflussen die Qualität des rekonstruierten dreidimensionalen Volumens.

Winkelinkrement und Diskretisierung

Durch die limitierte Elektronendosis kann nur eine begrenzte Anzahl von Projektionen eines einzelnen Objektes aufgenommen werden. Dies führt zu einer Auflösungsgrenze, die annähernd durch das 'Crowther'-Kriterium, siehe Gleichung (2.33) beschrieben wird. Zudem erfolgt die elektronenmikroskopische Aufnahme durch eine CCD-Kamera mit 'diskreten' Pixeln, so daß bei der Rückprojektion eine Interpolation der Volumenelemente (Voxel) des rekonstruierten Bereiches nötig wird. Diese Interpolation ist trilinear, es tragen also alle benachbarten Voxel anteilmäßig bei (Jähne 1993). Die Auswirkungen dieser diskreten Abtastung des Objektes ist in der zweiten Spalte der Abbildung (2.17) gut zu erkennen. Obwohl der komplette Winkelraum (-90° bis $+90^\circ$) abgetastet wurde, führt das Winkelinkrement von 5° zu einer sternförmigen Struktur, die das rekonstruierte Objekt überstrahlt.

¹⁰Die EM-Prozedur ermöglicht ein visuell kontrolliertes Anklicken der Markierungspunkte im Bild.

Limitierung des Winkelbereiches

Die Bauweise der Kryo-Halter erlauben eine Kippung der Probe in einem Bereich¹¹ von $\pm 70^\circ$. Die Information des restlichen Winkelbereiches von $\pm 20^\circ$ fehlt bei der Rekonstruktion des Volumens und führt zu einer Elongation der Objekte in z-Richtung, was in der dritten Spalte von Abbildung (2.17) veranschaulicht ist. Dieser fehlende Bereich ist im Fourierraum keilförmig ausgebildet, so daß man hier oft vom 'Missing wedge'-Problem spricht, das die Struktur des Objektes deutlich verfälscht.

Fehlalignierung

Die Alignierungsmethode aus Abschnitt (2.15) geht von einer konstanten Position der Markierungspunkte während der gesamten Kippserie aus. Diese Bedingung ist meist jedoch nicht erfüllt, da sich die Goldpartikel in der Nähe des Objektes oder eines Kohlefilms befinden, der sich durch Strahlschädigung bewegen oder sogar aufplatzen kann. Die Positionen der Markierungspunkte wandern also während einer Kippserie, was zu einer Fehlalignierung der einzelnen Projektionen führt. Die Konsequenz ist ein Verschmieren des rekonstruierten Objektes, siehe Abbildung (2.17, Spalte d), da sich die Rückprojektionstrahlen einer Struktur nicht mehr in einem eng begrenzten Volumen treffen sondern sich aufspreizen.

¹¹In der Praxis ist der Winkelbereich aufgrund von Strukturen, die ins Bildfeld wandern, oft noch kleiner; meist $\pm 60^\circ$ bis $\pm 65^\circ$.

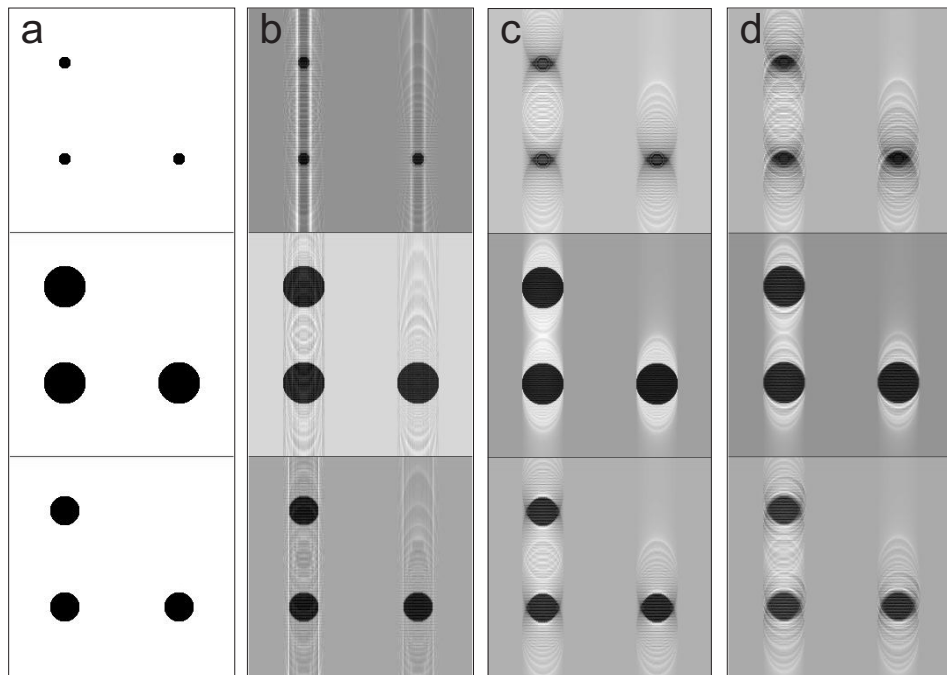


Abb. 2.16: Artefakte bei der 3D-Rekonstruktion; gezeigt sind Schnitte parallel zur x - y -Ebene durch die rekonstruierten Volumina. (a) Modelldaten; gezeigt sind Schnitte unterschiedlicher z -Höhe durch insgesamt drei Kugeln. (b) Winkelbereich: $\pm 90^\circ$, Inkrement von 5° . (c) Winkelbereich: $\pm 60^\circ$. (d) Winkelbereich: $\pm 60^\circ$ und eine Fehlalignierung von 1%.

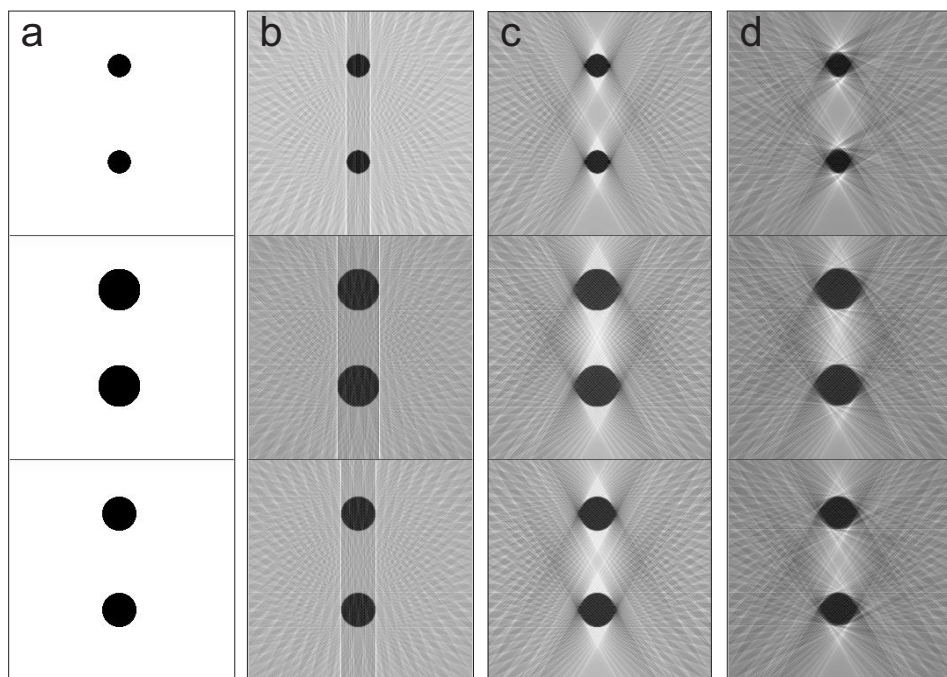


Abb. 2.17: Artefakte bei der 3D-Rekonstruktion; gezeigt sind Schnitte parallel zur x - z -Ebene durch die rekonstruierten Volumina. (a) Modelldaten; gezeigt sind Schnitte unterschiedlicher z -Höhe durch insgesamt drei Kugeln. (b) Winkelbereich: $\pm 90^\circ$, Inkrement von 5° . (c) Winkelbereich: $\pm 60^\circ$. (d) Winkelbereich: $\pm 60^\circ$ und eine Fehlalignierung von 1%.

Einschränkung der rekonstruierbaren Objektgröße

Die Eiseinbettung von biologischen Proben führt zwangsläufig zu einer besonderen Geometrie des durchstrahlten Volumenbereichs. Die laterale Ausdehnung des Trägernetzchens (3 mm) ist um viele Größenordnungen höher als die Objektgröße (typischerweise 500 nm), so daß bei einer Kippung zusätzliche Bereiche der Probe in das Beobachtungsfeld gelangen. Eine Projektion unter einem Kippwinkel $\neq 0^\circ$ enthält also zusätzliche Information von Objekten, die bei der 0° -Projektion nicht sichtbar sind. Dies führt bei einer gegebenen Größe des maximal abgebildeten Bereiches der CCD-Kamera in der Objektebene b , einer lateralen Ausdehnung der Probe l und einem gegebenen Kippwinkelbereich α zu einer maximalen Objektgröße d :

$$d = \frac{b - l}{2 \tan \alpha}. \quad (2.47)$$

Bei einer Vergrößerung von 42.000-fach ergibt sich ein abgebildeter Bereich der CCD-Kamera von 1500 nm. Mit einer lateralen Ausdehnung des Objektes von z.B. 500 nm und einem Kippwinkelbereich von $\pm 65^\circ$ reduziert sich die vollständig, d.h. ohne Überlagerung durch störende Strukturen, rekonstruierbare Objektgröße auf 233 nm.

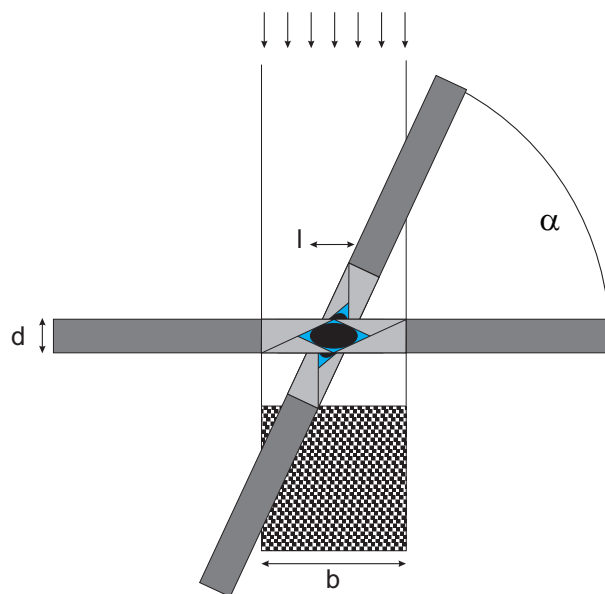


Abb. 2.18: Einschränkung der rekonstruierbaren Objektgröße d , bei einer Ausdehnung l , aufgrund eines Abschattungseffektes der Probenumgebung; mit einem CCD-Kamera-Bereich von b und einem Winkelbereich von α .

3. Zwei-Achsen Tomographie eiseingebetteter Zellen

3.1 Einführung

Zwei Faktoren, die wesentlich die Qualität und damit die Interpretierbarkeit von tomographischen Rekonstruktionen beeinflussen, sind zum einen die limitierte Strahlendosis und zum anderen die Tatsache, daß aufgrund der Geometrie der Probe nur ein begrenzter Winkelbereich (maximal $\pm 70^\circ$) aufgenommen werden kann. Dies ist bedingt durch die große laterale Ausdehnung im Verhältnis zur Probendicke, siehe Abschnitt (2.3.4). Als Folge dieser, rein präparativen, Einschränkung kommt es bei höheren Kippwinkeln zu einer Objektdicke, die vom Elektronenstrahl kaum noch zu durchdringen ist, oder gar zu einer kompletten Abschattung durch den Probenhalter. Das Fehlen der Projektionen mit 'hohen' Kippwinkeln führt bei der Rekonstruktion zu Artefakten, wie sie in Abschnitt (2.3.4) bereits näher erläutert wurden. Da die fehlende Information im Fourierraum die Form eines Doppelkeils hat, spricht man auch vom 'missing wedge'-Problem der Elektronentomographie. Die fehlende Information führt zu einer Elongation der Objektstrukturen in z-Richtung und zu einem Verschmieren der Objektgrenzen. Beide Effekte führen zu einer Verfälschung der Strukturen und erschweren eine weitere Interpretation und Verarbeitung der Daten oder machen sie sogar unmöglich. So ist bei der Rekonstruktion von senkrecht orientierten Einzelpartikeln die schlecht definierte z-Höhe der Partikel ein großes Problem bei der dreidimensionalen Alignierung, siehe (Walz 1997).

Orientierungsabhängige Rekonstruktion von Strukturen

Bei der Untersuchung von polymorphen, ausgedehnten Strukturen wie Zellorganellen oder ganzen Zellen wirkt sich die fehlende Information der Projektionen entscheidend auf die Vollständigkeit der rekonstruierten Objekte aus (Nicastro et al. 2000). Dies

kann so weit führen, daß Strukturen, die eine bestimmte Orientierung relativ zur Kippgeometrie haben, überhaupt nicht dreidimensional abgebildet werden können, da sie im Fourierraum nicht repräsentiert sind. Dies ist ein intrinsisches Problem der winkelbegrenzten Ein-Achsen-Kippung, bei der es wesentlich auf die Lage der Strukturen relativ zur Kippachse ankommt. Die Orientierung der Kippachse ist im Elektronenmikroskop für eine bestimmte Vergrößerung fest vorgegeben und wird bei der Alignment der Aufnahmen für jede Rekonstruktion neu berechnet. Alle Objekte mit Strukturdaten im Fourierraum senkrecht zu dieser gegebenen Achse können bei der Rückprojektion nur teilweise oder gar nicht rekonstruiert werden. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden Modellrechnungen durchgeführt, bei denen mit Hilfe von Prozeduren die Projektion und gewichtete Rückprojektion unterschiedlicher Strukturen simuliert wurde¹. Dazu sind Zylinder mit einem Radius von 30 Pixeln in einem sonst leeren, virtuellen 3D-Volumen erstellt worden. Die Orientierung der Zylinder wurde relativ zur Kippachse in einem Winkelbereich von 0° bis $+90^\circ$ variiert, um so unterschiedliche, einschließende Winkel zwischen Achse und Strukturdaten zu generieren, siehe Abbildung (3.1). Danach wurden für jede

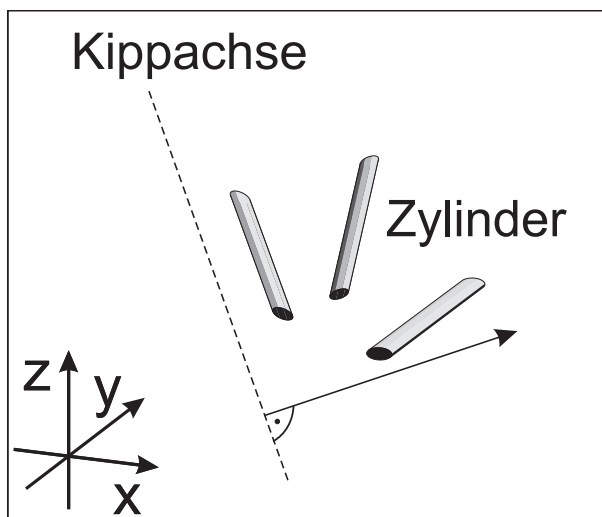


Abb. 3.1: Schematisches Modell zur Simulation von Rekonstruktionsartefakten. In einem 3D-Volumen wurden Zylinder unterschiedlicher Orientierung generiert. Danach wurden Kippserien von $\pm 65^\circ$ erstellt und wieder rekonstruiert.

Winkelkombination Achse-Zylinder tomographische Kippserien in einem Bereich von $\pm 65^\circ$, mit einem Inkrement von 2° simuliert und mit der gewichteten Rückprojektion rekonstruiert. Anschliessend wurden aus den 3D-Volumina Schnitte in x-z-Richtung extrahiert und untersucht, was in Abbildung (3.2) dargestellt ist. Die Kreisscheiben

¹Die Rechnungen wurden mit dem EM Programmpaket durchgeführt.

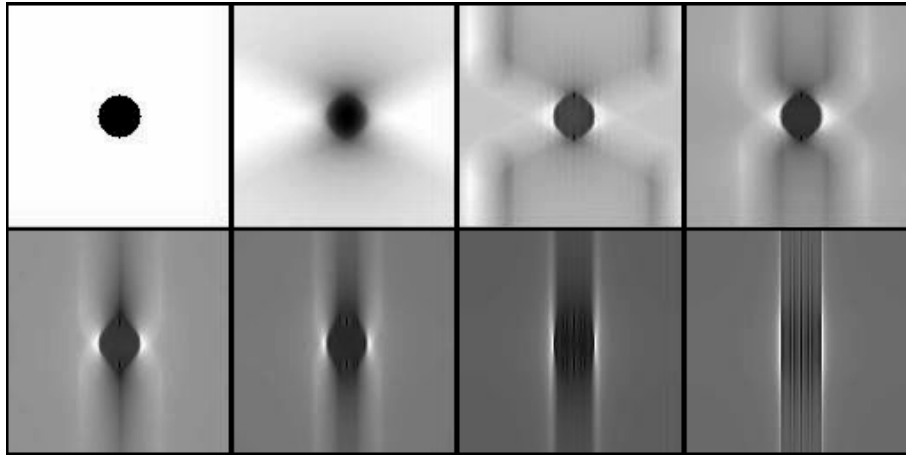


Abb. 3.2: Abhängigkeit der Strukturorientierung relativ zur Kippachse. Gezeigt sind Schnitte durch rekonstruierte Zylinder, die verschiedene Winkel zur Kippachse einschließen. Für die Winkel gelten von links-rechts, oben-unten folgende Werte: Original, 0° , 25° , 45° , 65° , 75° , 85° , 90° . Je größer der einschließende Winkel zwischen Achse und Zylinder ist, desto schlechter bleibt die Kreisform erhalten und desto undefinierter sind die Objektgrenzen.

der Zylinder sind je nach ihrem Winkel relativ zur Kippachse unterschiedlich gut rekonstruiert worden. Dies ist dadurch zu erklären, daß je nach Lage der Zylinder ein Grossteil der Strukturinformation im Bereich des 'missing-wedge' lag, also nicht erfaßt wurde und demzufolge auch nicht rekonstruiert werden konnte. Je größer dabei der einschließende Winkel zwischen Achse und Zylinder war, desto schlechter blieb die Kreisform erhalten und desto undefinierter wurden die Objektgrenzen.

3.2 Methode der Zwei-Achsen-Kippung

Die im vorigen Abschnitt gezeigten Einschränkungen haben bereits vor einigen Jahren zur Entwicklung eines Tomographie-Verfahrens geführt, mit denen man eine Verbesserung der Rekonstruktionsqualität erreichen kann (Taylor et al. 1984)(Penczek et al. 1995)(Mastrorarde 1997). Die Idee dabei ist die Kombination zweier Ein-Achsen-Kippungen, mit einer Drehung des Objektes von 90° , die um seine z-Achse, parallel zur Strahlachse, durchgeführt wird. Die Rekonstruktion beider Kippserien erfolgt danach in ein gemeinsames 3D-Volumen. Bisher konnte die für diese 'Zwei-Achsen Tomographie' notwendige Drehung nur mit Probenhaltern durchgeführt werden, die ausschliesslich bei Raumtemperatur arbeiteten oder die Drehung musste,

außerhalb des Elektronenmikroskopes, manuell geschehen was eine Anwendung des Verfahrens auf eiseingebettete Proben ausgeschlossen hat. Gründe hierfür sind zum einen die Kontamination der Probe durch das zweimalige Einschleusen in das Mikroskop und die nicht zuverlässig durchführbare 90°-Drehung des Trägernetzchens unter Kryo-Bedingungen.

3.2.1 Zwei-Achsen-Kippung unter Kryo-Bedingungen

Um die Zwei-Achsen-Kippung erfolgreich auf eiseingebettete Objekte anwenden zu können, muss die Probe im Elektronenmikroskop unter Kryo-Bedingungen gedreht und gekippt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Gatan (Pleasanton, KA, USA) ein Probenhalter entwickelt, der sowohl diese Rotation als auch die Kippung der Probe zulässt. Dazu wurde ein Standard $\pm 70^\circ$ Kipphalter mit einer Rotations-Mechanik ausgestattet, deren Funktionsweise in Abbildung (3.3) dargestellt ist. Die 'Shutter'-Stange² ist dabei bis zur Spitze des Probenhalters durchgeführt und an ihrem Ende mit einer Zahnstange verbunden. Zudem ist das Trägernetzchen auf einen beweglichen Rotor gespannt, der in einem Kreissegment ebenfalls zahnförmige Aussparungen hat. Durch ein Verschieben der 'Shutter'-Stange und damit der Zahnstange, wird durch das Ineinandergreifen der Zähne auch der Rotor bewegt. Vor allem der Einfachheit dieses Mechanismus ist es zu verdanken, daß ein funktionierender Prototyp des Probenhalters innerhalb weniger Monate in der Feinmechaniker-Werkstatt der Abteilung gebaut werden konnte. Die ersten Experimente zeigten, daß vor allem der Wärmeübergang von der Halter-spitze zum Rotor verbessert werden musste, um den Kristallisationspunkt des Eises nicht zu unterschreiten. Diese Kristallisationstemperatur liegt bei etwa -140°C und führt zu einer Umwandlung des amorphen Eises in eine kristalline Form, die nicht mehr für die Elektronenmikroskopie geeignet ist. Nach weiteren Verbesserungen der Halterspitze steht jetzt ein Probenhalter zur Verfügung der eine Rotation³ von 100° und eine Kippung der Probe um $\pm 70^\circ$ unter stabilen Kryo-Bedingungen ermöglicht.

²Der 'Shutter' dient zum Schutz der Probe vor Kontamination und wird erst im TEM geöffnet.

³Die optimale Drehung wäre um 90° . Aufgrund mechanischer Einschränkungen ist nur eine Drehung um 100° möglich.

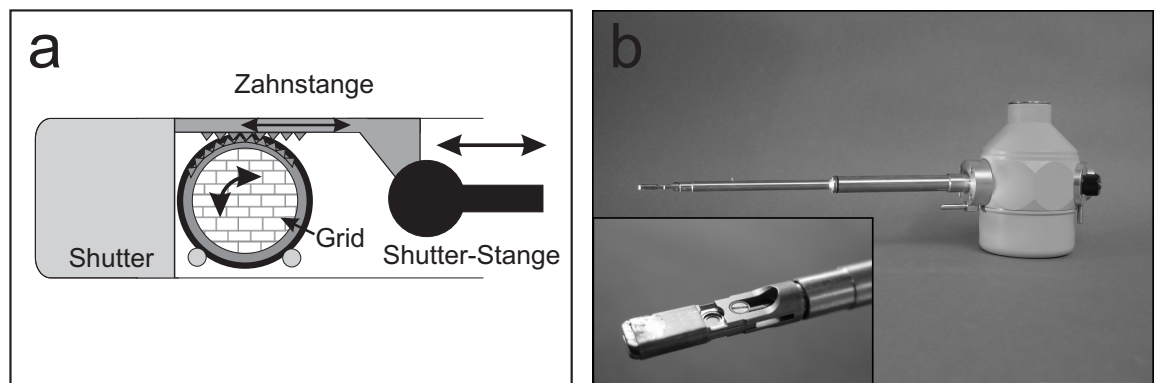


Abb. 3.3: Aufbau des Zwei-Achsen-Kipphalters. (a) Durch die Vor- und Rückwärtsbewegung der 'Shutter'-Stange wird auch die Zahnstange bewegt. Das Trägernetzchen ('Grid') sitzt auf einem Rotor, der einen Zahnkranz, hat und so von der Zahnstange gedreht werden kann. Basierend auf diesem Prinzip wurde in der Feinmechaniker-Werkstatt der Abteilung 'Molekulare Strukturbioogie' ein funktionierender Prototyp gebaut mit dem Zwei-Achsen Kippserien durchgeführt werden können, siehe Abbildung (b).

3.2.2 Alignierung und Rekonstruktion

Zur Auswertung der Zwei-Achsen-Kippserien ist es notwendig, daß vergleichbar zu Abschnitt (2.15) eine Alignierung der Serien auf ein gemeinsames Koordinatensystem erfolgt. Hierfür wurde ebenfalls eine Alignierung durch Markierungspunkte gewählt, die leicht durch eine Zugabe von Goldpartikeln zu realisieren ist. Dazu musste die EM-Prozedur zur Alignierung und Rekonstruktion angepasst werden, was durch Reiner Hegerl erfolgte. Die beiden Kippserien werden dabei zunächst getrennt betrachtet und wie zwei Ein-Achsen-Kippserien aus Abschnitt (2.15) durch das 'Anklicken' von Markierungspunkten auf ihr jeweiliges Koordinatensystem aligniert. Dabei müssen mindestens drei Punkte beider Serien gleich sein; einer dieser Punkte wird als Referenzpunkt ausgewählt und stellt bei der späteren Rückprojektion das Zentrum der Rekonstruktion dar. Nach der getrennten Berechnung der Kippachsen und Verschiebungsvektoren der Bilder kann das Koordinatensystem der einen Kippserie auf das der zweiten Kippserie gedreht werden. Diese Drehung ist durch drei Euler-Winkel festgelegt, da zwar nur eine Rotation um die z-Achse angestrebt ist, aber aufgrund von mechanischen Limitierungen auch geringe Drehungen um die x- und y-Achse auftreten. Nach der Bestimmung der Euler-Winkel werden die neuen Projektionsrichtungen einer Kippserie neu berechnet, so daß bei der Rekonstruktion jede Aufnahme unter dem korrekten Winkel rückprojiziert wird; die

Projektionswinkel der zweiten Kippserie bleiben unverändert. Die Gewichtung der Projektionen erfolgt durch eine Überlagerung der Dichteverteilungen. So wird für jeden Punkt die Datendichte des fouriertransformierten Volumens berechnet. Durch Bildung des Kehrwertes der Datendichte erhält man den Wert der Gewichtsfunktion für das jeweilige Volumenelement.

3.3 Anwendung auf eiseingebettete *Pyrodictium abyssi* Zellen

Die Methode der Zwei-Achsen Tomographie wurde zunächst auf eiseingebettete *Pyrodictium abyssi* Zellen angewendet. Diese prokaryotischen Zellen eignen sich besonders durch ihre geringe Dicke (ca. 100-500 nm) und ihre geringe laterale Ausdehnung von ca. 0.5 - 1.5 μm für die Elektronentomographie. Eine wichtige Fragestellung bei dieser Untersuchung war die Interaktion von *Cannulae* und Zellen in ihrer nativen Umgebung.

3.3.1 Einführung

Pyrodictium war die erste hyperthermophile, prokaryotische Zelle, die erfolgreich bei Temperaturen um 100°C kultiviert werden konnte (Stetter 1982). Die für das Wachstum idealen Temperaturen liegen zwischen 75° und 110°C bei neutralem pH unter streng anaeroben Bedingungen. Die Oberfläche der Zellen ist mit einer zweidimensionalen Matrix von Proteinkomplexen bedeckt. Diese 'Surface'-Layer Struktur besitzt eine hexagonale Symmetrie mit einer Gitterkonstante von 22 nm. Jeder dieser Komplexe besteht aus sechs identischen Untereinheiten, die durch Protrusionen mit der Zytoplasma-Membran verbunden sind und so einen quasi-periplasmatischen Raum mit einer Breite von 35 nm aufspannen (Duerr et al. 1991), (Baumeister und Lembcke 1992). *Pyrodictium* bildet ein weites, extrazelluläres Netzwerk, in das die Zellen eingebettet sind (Koenig et al. 1988). Dieses Netzwerk besteht aus Bündeln hohler Tubuli, den *Cannulae*, mit einem Außendurchmesser von 25 nm, die aus (mindestens) fünf Glyko-Proteinen aufgebaut sind. Unter der Verwendung unterschiedlicher Präparationsmethoden für das Scanning-Elektronenmikroskop (SEM) und für

das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) wurde die Struktur der *Pyrodictium* Zellen und ihr Netzwerk untersucht (Rieger et al. 1995). So zeigen SEM-Bilder, siehe Abbildung (3.4), das komplexe Netzwerk von Zellen und *Cannulae*. Dabei ist

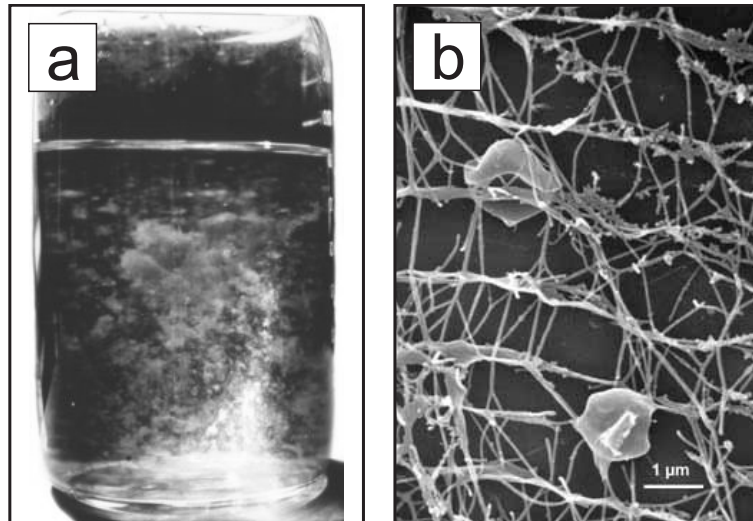


Abb. 3.4: (a) Ein Becherglas mit *Pyrodictium abyssii* Zellen. Zu erkennen sind helle Flocken die ein Netzwerk von einigen *mm* bis *cm* bilden. Die SEM Aufnahme in (b) zeigt deutlich wie die Zellen in einem Netzwerk aus *Cannulae* eingespannt sind. Beide Bilder wurden freundlicherweise von Reinhard Rachel zur Verfügung gestellt.

zu erkennen, daß die *Cannulae* an vielen, unterschiedlichen Stellen in die Zelloberfläche eindringen. Mit Hilfe der Gefrierätzung konnten *Cannulae* abgebildet werden, die teilweise zwischen den Proteinkomplexen des 'Surface'-Layer lagen.

Der Einsatz der oben erwähnten Techniken, ebenso wie die Untersuchung mit ultradünnen Schnitten (Rieger et al. 1995) haben keine weiterführenden Details über den Eintrittsbereich der *Cannulae* oder gar ihren Verlauf in der Zelle erbringen können. Eine Beobachtung des Zellwachstums *in vivo* bei 90°C, das mit einem Hoch-Intensitäts Dunkelfeld-Lichtmikroskop durchgeführt wurde, zeigt, daß die Zellteilung direkt mit dem Wachstum der *Cannulae* verknüpft ist (Horn et al. 1999). Dabei formen eine oder mehrere *Cannulae* eine Schleife auf der Zelloberfläche bevor die Zellteilung erfolgt und bleiben mit den Tochter-Zellen verbunden. Durch weitere Teilungsschritte entwickelt sich eine Zellkolonie, die durch ein dichtes Netzwerk verbunden ist. Auch wurden in dieser Studie einzelne, einseitig freie *Cannulae* beobachtet, die keine Verbindung zu einer zweiten Zelle hatten.

Ebenfalls wichtig in diesem Kontext ist die Tatsache, daß bisher unter Laborbedingungen keine spontanen *Cannula*-freien Mutanten beobachtet wurden. Dies alles lässt den Schluss zu, daß *Pyrodictium*-Zellen auf die Bildung dieses, energetisch aufwändigen, extrazellulären Netzwerks angewiesen sind. Um die Funktion dieses Netzwerks zu studieren, ist eine Analyse des strukturellen Aufbaus des Systems Zelle-*Cannula* notwendig. Nur der Einblick in die dreidimensionale Struktur kann folgende Fragen beantworten:

1. Wo ist der Eintrittspunkt der *Cannulae* in die Zelle?
2. Gibt es Proteinkomplexe die zur Verankerung dienen?
3. Wie ist der Verlauf? Dringt die *Cannula* in das Zytoplasma ein und erlaubt somit einen Molekül-Transport zwischen den Zellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen ist eine hochauflösende, dreidimensionale Abbildung des nativen Systems notwendig, wie sie nur von der Elektronentomographie geleistet werden kann. Gleichzeitig konnte zum ersten Mal ein Probenhalter eingesetzt werden, der von den Nachteilen der begrenzten Ein-Achsen-Kippung befreit ist und trotzdem eine Kryo-Fixation erlaubt. Die Aufnahme von zwei, um 100° gedrehten Kippserien macht eine wirklichkeitsnahe Rekonstruktion einer ganzen *Pyrodictium abyssi* Zelle einschließlich der *Cannulae* möglich.

Da Zellen aufgrund ihrer hohen elektronenoptischen Dichte besonders strahlensensibel sind, wurde für die Datenaufzeichnung ein Schema entwickelt, welches es erlaubt, mit äußerst geringer Dosis die Rotation der Probe durchzuführen.

3.3.2 Kultivierung und Präparation der Zellen

Zellen des *Pyrodictium abyssi* Stamms TAG 11 (Rieger et al. 1995) wurden kultiviert (Pley et al. 1991) in modifiziertem SME Medium mit 1 g S⁰/Liter, und einer Gasphase bestehend aus N₂/CO₂ (80:20; 300 kPa). Danach wurden die Zellen mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf) leicht aufkonzentriert und in 100 µl Lösung resuspendiert. Ein Tropfen der Suspension wurde auf ein mit Kohle-Lochfolie bespanntes Trägernetzchen gebracht. Nach kurzem Absaugen wurde das Netzchen in flüssiges Ethan eingeschossen und in den oben beschriebenen Probenhalter transferiert, der

eine Kippung und eine Rotation der Probe um 100° zulässt. Die gesamte Datenakquisition erfolgte unter Kryo-Bedingungen.

3.3.3 Durchführung der Datenaufzeichnung

Nach der Identifikation einer geeigneten Zelle unter Nieder-Dosis Bedingungen wurde die Probenstelle daraufhin geprüft, ob der erfassbare Winkelbereich ausreichend ist. Dazu wurde die Probe bis zu den Maximalwinkeln, bei denen die Probe noch sichtbar, ist gekippt. Zudem sollte die Probe in der Mitte einer Masche des Trägernetzchens liegen, um nach der folgenden Rotation wiederum eine höchstmögliche Kippung zu erreichen. Die Aufnahme der ersten Kippserie erfolgte mit Hilfe der Tomographie-Software in einem Winkelbereich von -66° bis $+66^\circ$ mit einem Inkrement von 1.5° . Danach erfolgte die Rotation der Probe.

Rotation der Probe unter Nieder-Dosis Bedingungen

Zur Rotation wurde zunächst stufenweise die Vergrößerung heruntersetzt, um die Strahlendosis so gering wie möglich zu halten. Eine in der Skriptsprache Digital Micrograph programmierte Routine unterstützt dabei den Benutzer und zentriert immer wieder das Objekt im Beobachtungsfeld⁴, siehe Abbildung (3.5). Hierbei wird die zweidimensionale Kreuzkorrelation zwischen einem Bild mit höherer Vergrößerung und einem Bild geringerer Vergrößerung berechnet. Dafür muss zunächst das erstgenannte Bild mit einem bereits bekannten Faktor verkleinert werden, so daß die Vergrößerung in beiden Bildern gleich ist. Danach gibt das Maximum der Kreuzkorrelation den Verschiebungsvektor des Objektes an, der durch die Bild- und Strahlverschiebung kompensiert werden kann. Die beim Wechsel der Vergrößerungen auftretenden Bildrotierungen wurden dabei durch eine Rotation der korrelierten Bilder berücksichtigt. Für die anschließende Rotation, siehe Abbildung (3.6), um 100° wurde ebenfalls eine halbautomatische Funktion programmiert um nach jeder manuellen, schrittweisen Drehung, typischerweise $3^\circ - 5^\circ$ eine Zentrierung des Objektes bezüglich des Beobachtungsfeldes der Kamera vorzunehmen. Dabei wird die Kreuzkorrelation von einem zuvor aufgenommenen Referenzbild und dem aktuellen

⁴Bei dem Wechsel von Vergrößerungen treten Bildverschiebungen und teilweise Bildrotationen auf.

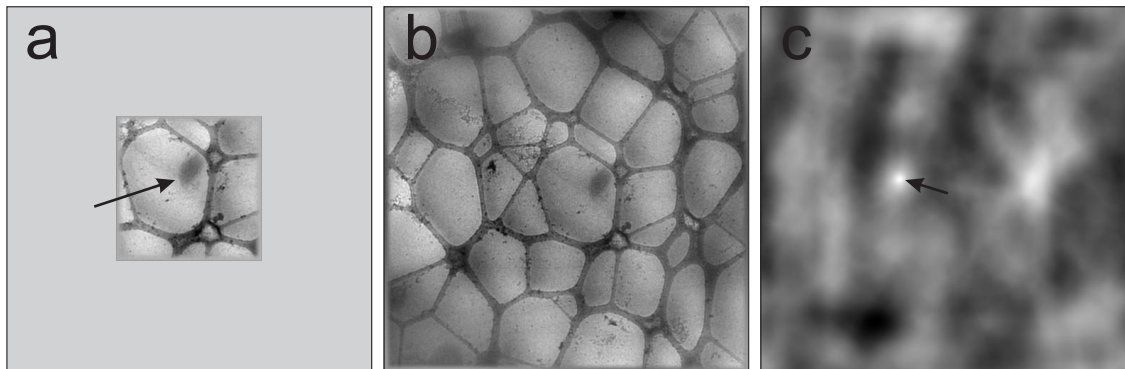


Abb. 3.5: Zentrierung des Objektes bei Vergrößerungsänderung. Um beim Ändern der Vergrößerung das Objekt im abgebildeten Bereich der CCD Kamera zu halten, müssen die elektrooptisch bedingten Auswanderungen kompensiert werden. Dies geschieht durch eine Prozedur, die mit Hilfe der Kreuz-Korrelation die Verschiebung bestimmt. Dazu wird das Bild der vorhergehenden Vergrößerungsstufe (6200x) a) verkleinert und mit dem aktuellen Bildausschnitt (2800x) (b) korreliert. Das Maximum (Pfeil) der Korrelationsfunktion c) ergibt dann den Verschiebungsvektor.

Bildausschnitt berechnet, der um einen kleinen Winkel gedreht wurde (der Drehwinkel wird manuell eingegeben)⁵. Das Maximum der Korrelationsfunktion (Abbildung (3.6)) rechts-unten) gibt dabei die Verschiebung wieder, die der Benutzer dann entweder mit Hilfe der Strahlverschiebung oder durch das Goniometer korrigieren muss. Die gesamte Strahlendosis für einen Rotationsvorgang ist aufgrund der geringen Vergrößerung und des Binnings der Aufnahmen mit 4x4 Pixeln vernachlässigbar klein und liegt bei etwa $0.1 \text{ e}^-/\text{Å}^2$.

Die zweite Kippserie unter einem Rotationswinkel von ca. 100° konnte in einem Winkelbereich von -69° bis $+66^\circ$ mit einem Inkrement von 1.5° aufgezeichnet werden, siehe Abbildung (3.7) untere Hälfte. Bemerkenswert ist der große Winkelbereich beider Kippserien bis jeweils über $\pm 65^\circ$, der durch die zentrale Position der Probe auf dem Trägernetzchen begründet ist. Somit treten die Abschattungseffekte der Halterspitze erst bei extrem hohen Kippwinkeln auf. Insgesamt wurden am CM 120 Biofilter Mikroskop 183 Bilder einer *Pyrodictium abyssi*-Zelle bei einer Vergrößerung von 14500-fach und einem Unterfokus von $-10\mu\text{m}$ aufgenommen. Die daraus folgende Pixelgröße ist 1.62 nm in der Objektebene, die erste Nullstelle der CTF liegt bei 5.8 1/nm. Die gesamte Strahlendosis einschliesslich des Rotationsvorganges betrug dabei ca. $26 \text{ e}^-/\text{Å}^2$.

⁵Die korrelierten Bilder wurden am Rand geglättet und Bandpass gefiltert.

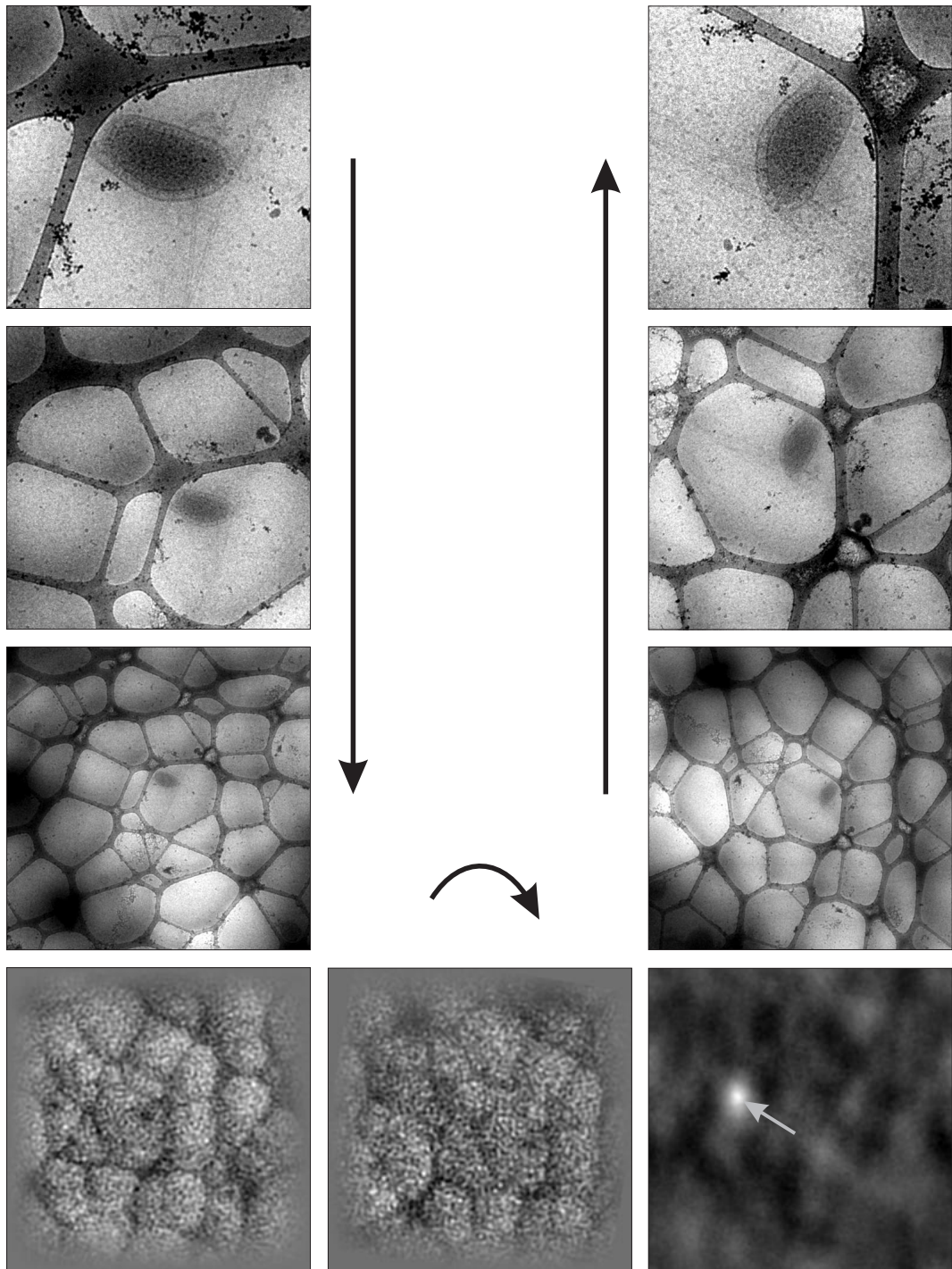


Abb. 3.6: Ablauf des Rotationsvorgangs. Um die Strahlendosis für die Probe möglichst gering zu halten, wird die Vergrößerung zunächst auf 6200-fach und dann auf 2800-fach reduziert. Danach erfolgt die Rotation in kleinen Winkelschritten von $3^\circ - 5^\circ$. Mit Hilfe der Kreuzkorrelation (untere Reihe) kann das Objekt im Beobachtungsfeld gehalten werden; das Maximum der Funktion (Pfeil) gibt dabei die Verschiebung an. Die für den gesamten Rotationsvorgang benötigte Dosis ist somit kleiner als $0.1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

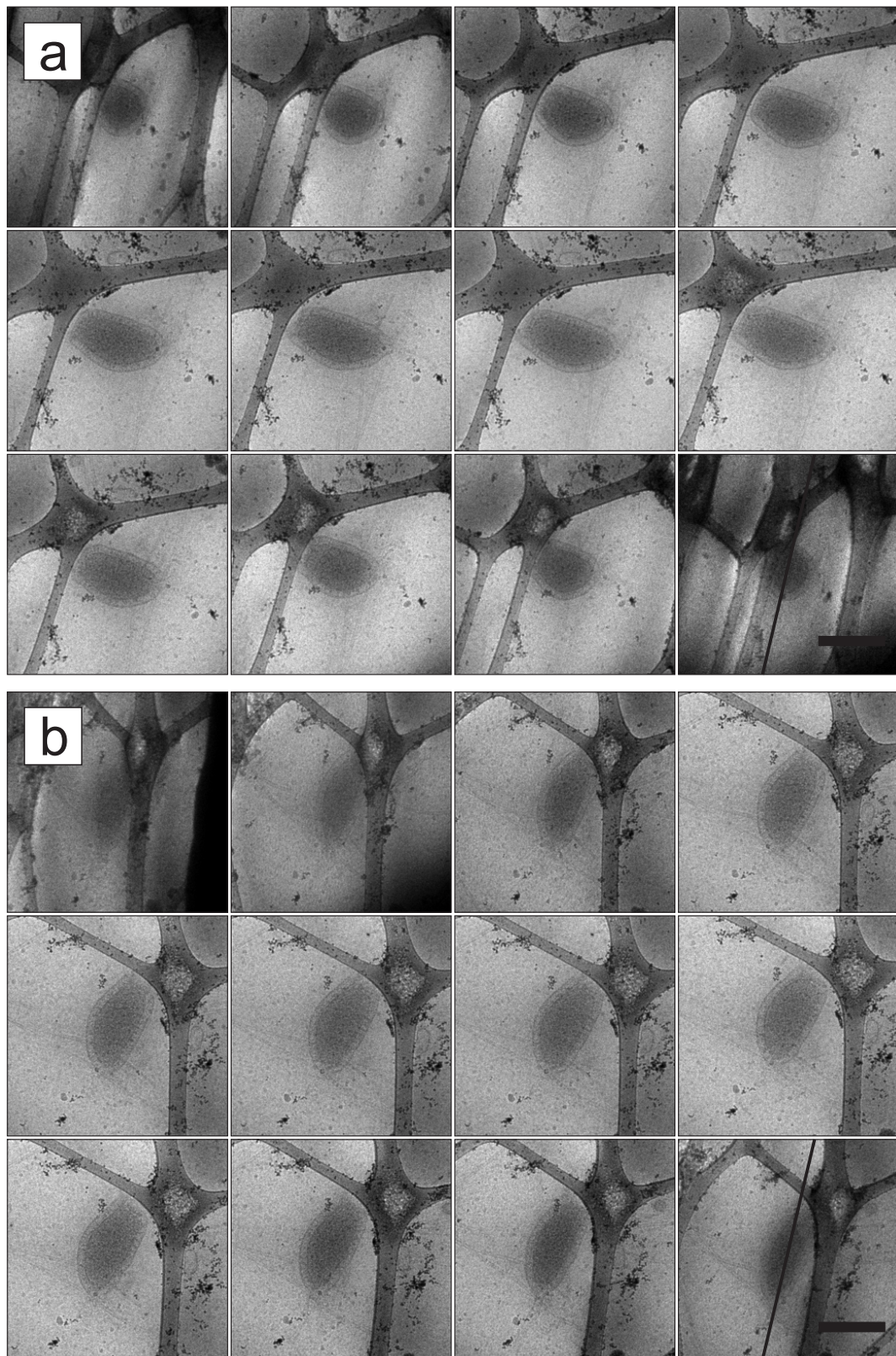


Abb. 3.7: Projektionen der beiden Kippserien der eiseingebetteten *Pyrodictium abyssi* Zelle. Block a) zeigt ausgewählte Bilder (etwa jedes sechste) der ersten Kippserie (-66° - 66° , Inkrement 1.5° , Balken 500 nm). Block (b) zeigt ausgewählte Bilder der zweiten Kippserie (-69° - 66° , Inkrement 1.5° , Balken 500 nm) die aufgenommen wurde, nachdem die Probe um ca. 100° in der Ebene rotiert wurde. Die Linien in den Abbildungen unten rechts geben die Lage der Kippachsen an.

Nach der Alignierung mit Hilfe von Goldpartikeln, die der Probe zugegeben wurden, erfolgte die gewichtete Rückprojektion der beiden Kippserien in ein gemeinsames 3D-Volumen, siehe Abschnitt (3.2.2).

3.3.4 Interpretation der rekonstruierten

Pyrodictium abyssi Zelle

Die Rekonstruktion der ganzen *Pyrodictium abyssi* Zelle gewährt einen Einblick in die dreidimensionale Struktur insbesondere des 'Surface'-Layers und den Verlauf der zwei *Cannulae* in dem abgebildeten Volumen.

Die Zelle

Die Gesamtgröße der ovalen Zelle ist ca. 400 nm x 800 nm x 300 nm. Ein extrem flacher Bereich, wie er oft beobachtet wurde (Rieger et al. 1995), ist hier nicht vorhanden. Die Zelle ist aufgrund der Kapillarkräfte, die beim Absaugen der Suspension entstehen, leicht abgeflacht. Das Zytoplasma ist dicht gepackt und homogen innerhalb der Zelle verteilt. Umgeben ist das Zytoplasma mit einer einlagigen, elektronenoptisch dichteren Hülle, die die zytoplasmatische Membran darstellt. Danach kommt ein weniger dichter Abschnitt mit konstanter Breite von ca. 35 nm, bei dem es sich um den (quasi)-periplasmatischen Raum handelt. Die äusserste Begrenzung der Zelle hat eine zur Membran vergleichbare Dichte, ist ca. 8 nm dick und hat zumindest teilweise eine Zick-Zack-Form, siehe Abbildung (3.8). In den Schnittbildern der *x-y*-Ebene (Abbildung (3.8)) und der *y-z*-Ebene (Abbildung (3.9)) ist ein zweidimensionales Gitter mit einer hexagonalen Periodizität von 22 nm zu erkennen.

Der (quasi)-periplasmatische Raum

Innerhalb des periplasmatischen Raums sind zahlreiche, elektronenoptisch dichte, Partikel mit einem Durchmesser von ca. 15 nm sichtbar. Die meisten sind unregelmäßig verteilt, sie bilden allerdings auch Cluster oder sind aneinandergereiht, siehe Abbildung (3.8 c) d) e)). Insgesamt enthält diese Zelle ca. 80 dieser Partikel, die auf den (quasi)-periplasmatischen Raum verteilt sind. Weitere deutlich kleinere Partikel sind in Abbildung (3.8 e)) und in Abbildung (3.9 b) d)) zu erkennen. Sie haben eine Größe von 5-8 nm und sind in einer Reihe 5 nm von der Zytoplasmamembran angeordnet. Am oberen Ende der Zelle, siehe Abbildung (3.8 e)), ist eine Auswölbung des 'Surface'-Layers und der Zytoplasmamembran sichtbar. Dort sind

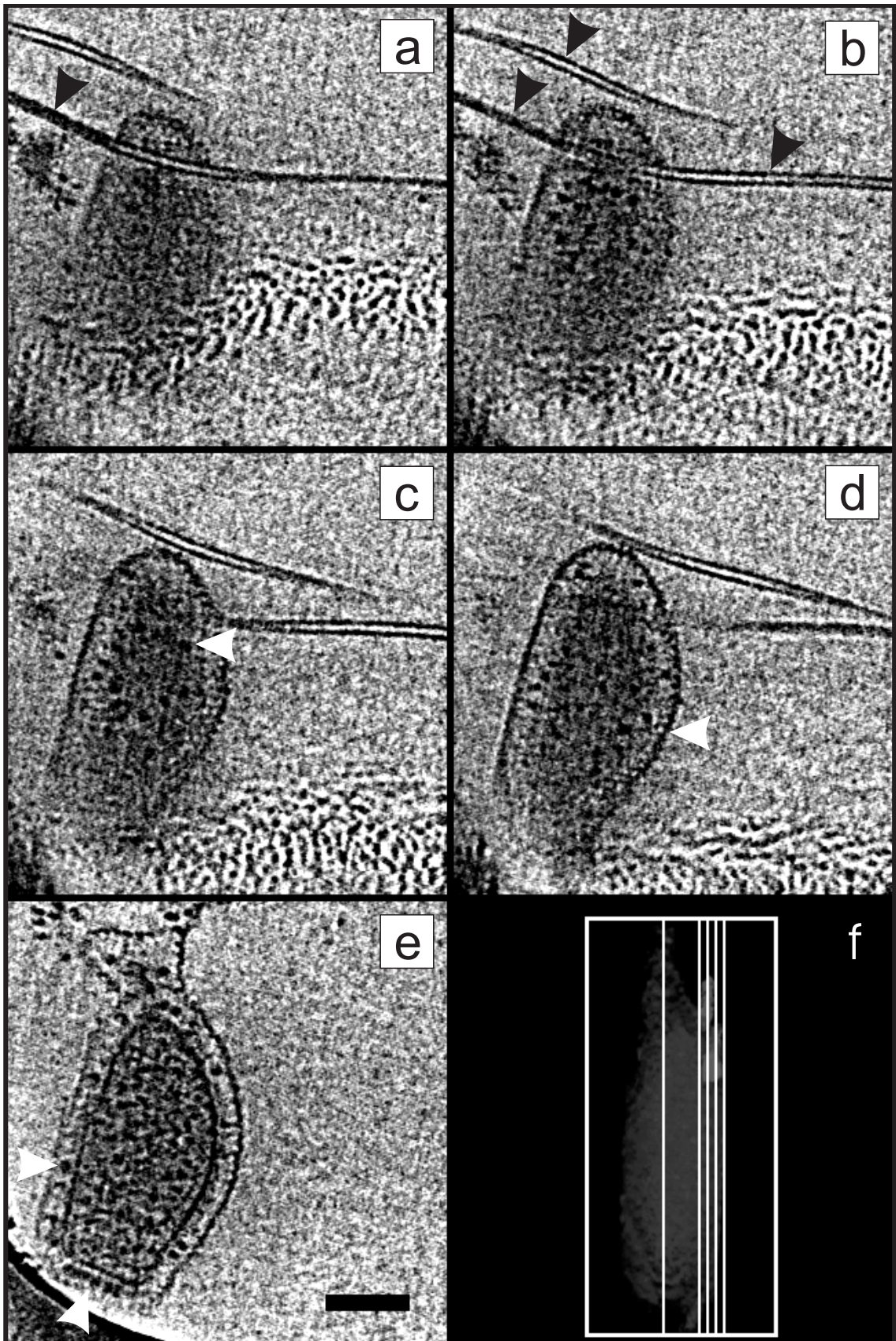


Abb. 3.8: a)-e) Schnitte in x - y -Richtung (Dicke 3,2 nm) bei in f) definierten z -Höhen der 3D-Rekonstruktion (Balken 200 nm). Die schwarzen Pfeile zeigen auf zwei *Cannulae*, wobei in a) deutlich der ausgefüllte Bereich zu erkennen ist. Die weißen Pfeile in c) und e) zeigen auf Partikel im periplasmatischen Raum und auf den 'Surface'-Layer in d).

ebenfalls einige der 15 nm großen Partikel und ein regelmäßiger Verlauf des 'Surface'-Layers vorhanden. Solche Strukturen wurden bereits zuvor beobachtet (Rachel et al. 1997).

Die zwei *Cannulae*

In der Übersichtsaufnahme, Abbildung (3.5 b)), sind schwach zwei dünne Fasern zu erkennen, die die Zelle an einem Ende berühren und parallel zur kurzen Achse verlaufen. Beide Fasern sind deutlich länger als 2 μm und stellen die zwei *Cannulae* dar. Es sind einwandige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 25 nm wobei die Wand dünner als 5 nm ist, siehe dazu Abbildungen ((3.8) und (3.9)). Die oben verlaufende *Cannula*, Abbildung (3.9, Nr. '1'), erscheint auf der gesamten Länge hohl. Die Zweite, Abbildung (3.9, Nr. '2'), ist nur auf der rechten Seite hohl, gerade bis zum Austritt auf der linken Seite der Zelle. Von dort führt diese untere *Cannula* weiter nach links, ist aber elektronenoptisch dicht und vollständig gefüllt, siehe Abbildung (3.9). Beide *Cannulae* sind leicht gebogen, was auf eine gewisse Flexibilität ihrer molekularen Struktur hinweist. Desweiteren läuft *Cannula* Nr. '1' knapp am 'Surface'-Layer vorbei während *Cannula* Nr. '2' vollständig in den periplasmatischen Raum eindringt. Auf einer Länge von ca. 300 nm verläuft diese *Cannula* zwischen der Zytoplasmamembran und dem 'Surface'-Layer ohne in das Zytoplasma zu gelangen. Trotzdem kann ein Kontakt bei der gegebenen Auflösung der Rekonstruktion nicht ausgeschlossen werden.

Diskussion

Mit Hilfe dieser Daten konnte erstmals gezeigt werden, daß der periplasmatische Raum einzelner *Pyrodictium* Zellen durch meist hohle *Cannulae* verbunden ist. Die Zellen bilden somit ein weitläufiges externes Netzwerk, welches Ähnlichkeit hat zur extrazellulären Matrix von Eukaryoten. Dieses Netzwerk ist erstaunlich widerstandsfähig gegen Denaturierung und Temperaturerhöhung; so bleibt die Sekundärstruktur noch bis zu 135°C erhalten. Weiterhin scheint es einen interzellulären Transport bisher unbekannter Moleküle zu geben. Ein Hinweis darauf ist die deutlich gefüllte *Cannula*, die nach dem Eintritt in den periplasmatischen Raum der Zelle

hohl erscheint. Die Struktur der im periplasmatischen Raum vorliegenden makromolekularen Komplexe ist jedoch bisher unbekannt.

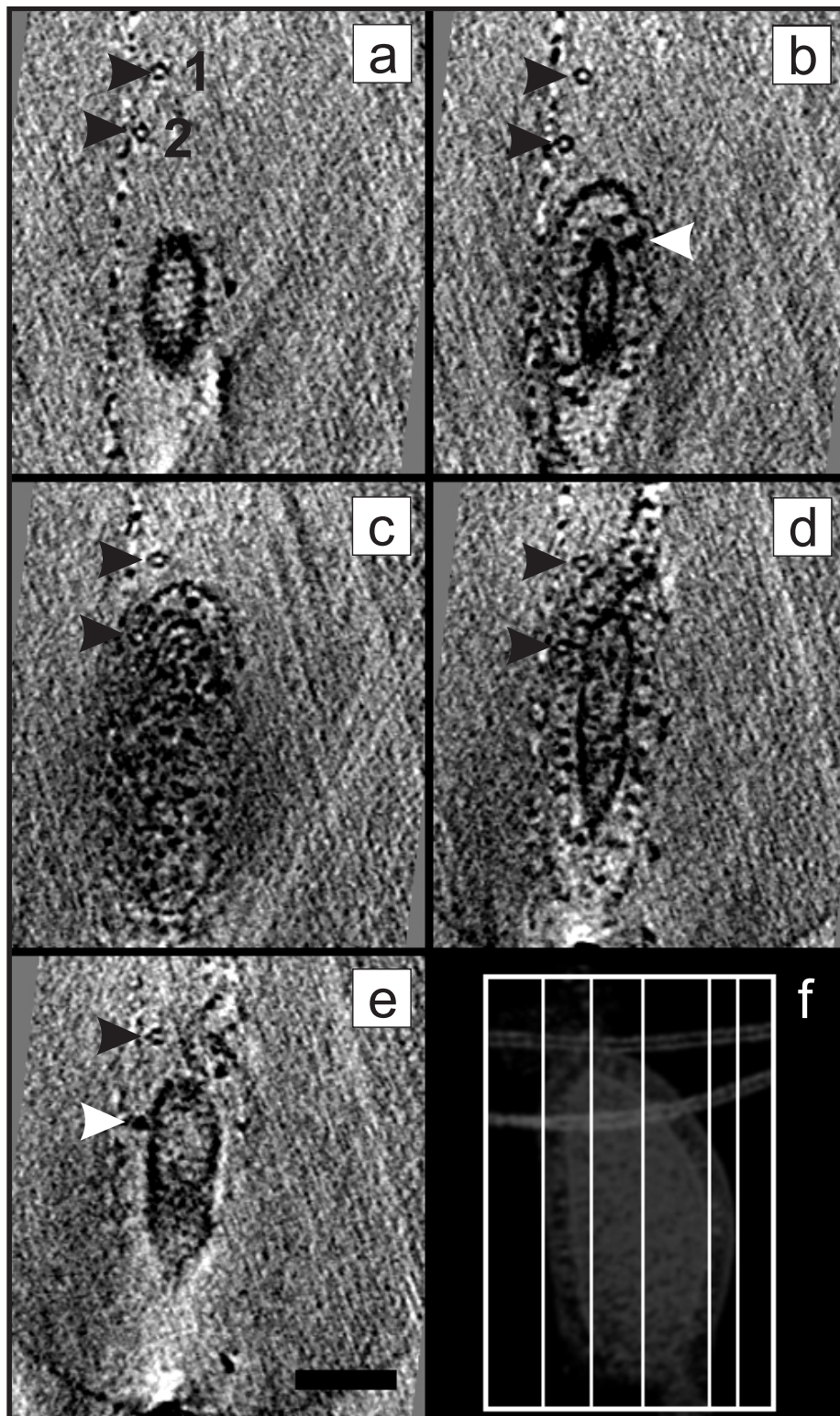


Abb. 3.9: a)-e) Schnitte in y - z -Richtung (Dicke 3,2 nm) bei in f) definierten z -Höhen der 3D-Rekonstruktion (Balken 200 nm). Die schwarzen Pfeile deuten auf die hohlen *Cannulae* mit der Nr. 1 und 2. *Cannulae* Nr. 2 verläuft in c) und d) innerhalb des periplasmatischen Raums und ist nach dem Austritt gefüllt, siehe weißer Pfeil in e). Der weiße Pfeil in b) zeigt auf ein Partikel im periplasmatischen Raum.

3.3.5 Reduzierung der Rekonstruktions-Artefakte

Die in Abschnitt (3.1) beschriebene Orientierungsabhängigkeit der rekonstruierten Objekte kann mit den realen Daten der *Pyrodictium abyssi* Zelle überprüft werden. Dazu wurden die Kippserien, siehe Abbildung (3.7), sowohl getrennt, wie zwei einzelne Ein-Achsen-Kippserien, und gemeinsam als eine Zwei-Achsen-Kippserie ausgewertet und rekonstruiert. Vergleichen lassen sich dabei also insgesamt drei Rekonstruktionen. Um deutlich die Unterschiede herauszuarbeiten ist es sinnvoll sich auf Details, wie die *Cannulae* oder den 'Surface'-Layer zu beschränken, was in den Abbildungen (3.10 und 3.11) dargestellt ist.

Die durch die Zelle verlaufende *Cannula* Nr. 2 ist zwar leicht gebogen, dabei aber, vor allem am rechten Bildrand (Abbildung (3.8)), genau senkrecht zur Kippachse der zweiten Kippserie orientiert, während *Cannula* Nr. 1 ungefähr in einem Winkel von 15° zur Kippachse liegt. Dementsprechend ist die Lage der beiden *Cannulae* bei der ersten Kippserie um 100° gedreht, so daß die Strukturen parallel zur Kippachse liegen. Wie in Abschnitt (3.1) gezeigt wurde, bildet sich bei einer winkel-begrenzten Ein-Achsen-Kippung ein fehlender Doppel-Keil im Fourierraum ('missing-wedge') aus. Liegt die Strukturinformation eines Objektes ganz oder teilweise in diesem fehlenden Bereich, so kann keine oder nur eine verfälschte Rekonstruktion der Strukturen im Realraum erfolgen. Dieser Effekt lässt sich an der beschriebenen *Cannula* Nr. 2 beobachten, die nach der Rekonstruktion der ersten Kippserie, Abbildung (3.10 a)), sehr deutlich rekonstruiert wurde (parallel zur Kippachse) und in dem Rekonstruktionsvolumen der zweiten Kippserie überhaupt nicht wiedergefunden werden kann (senkrecht zur Kippachse), Abbildung (3.10 b)). Die geringe Richtungsvariation der *Cannula* Nr. 1 von ca. 15° relativ zur Kippachse führt zu einer, wenn auch schlechten, Rekonstruktion, da die Strukturinformation nur noch teilweise im 'missing wedge' liegt.

Eine Drehung des Objektes und das Aufzeichnen einer zweiten Kippserie verbessert die Qualität der Rekonstruktion. Die Rückprojektion beider Kippserien in ein gemeinsames Volumen führt zu einer Kombination der Strukturinformation und bildet somit die rekonstruierten Objekte deutlich besser ab, siehe Abbildung (3.10 c)). Beide *Cannulae* sind vollständig und kontrastreich rekonstruiert, da die Rückprojektion von insgesamt 183 Aufnahmen auch zu einem verbesserten Signal-Rausch Verhältnis

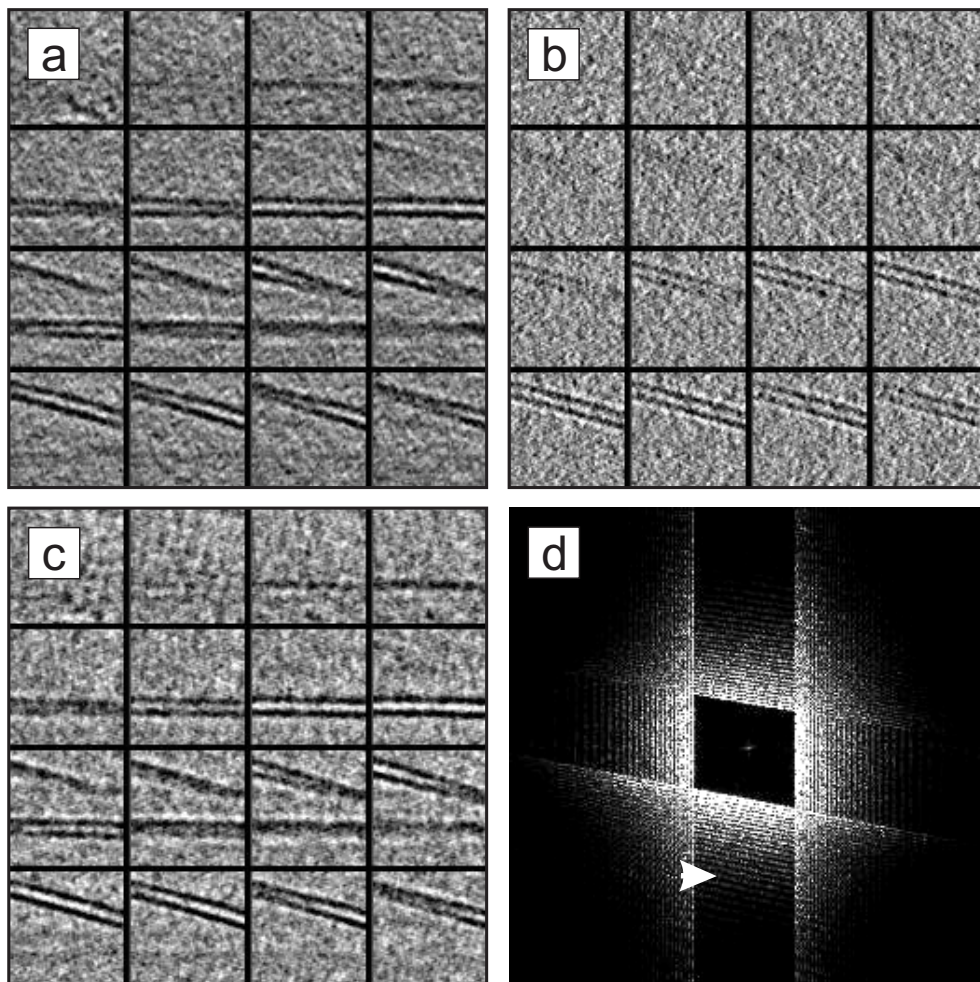


Abb. 3.10: Schnitte in x - y -Richtung der rekonstruierten *Cannulae*. In Serie a) und b) wurde jeweils nur eine Kippserie rückprojiziert (Ein-Achsen-Kippung). Die waagrecht verlaufende Struktur der *Cannula* ist in b) nicht zu erkennen, da diese senkrecht zur Kippachse liegt. Dagegen wurde die *Cannula* in a) gut rekonstruiert (parallel zur Kippachse). In c) sind beide Kippserien kombiniert, so daß eine verbesserte Abbildung der 3D-Strukturen möglich ist. Das Beugungsbild des rekonstruierten Volumens zeigt Abbildung d). Die beiden Kippserien reduzieren den fehlenden Bereich im Fourrierraum ('missing wedge') auf einen Bereich, der die Form einer Pyramide hat. Der weiße Pfeil deutet auf Linien die ein diskretes Abtasten der Struktur durch einzelne Projektionen widerspiegeln.

gegenüber den Einzel-Rekonstruktionen mit je ca. 90 Projektionen führt.

Umgekehrt verhält es sich bei Strukturen die nicht, wie die *Cannulae*, waagrecht orientiert sind, sondern parallel zur y-Achse verlaufen. Ein solches Objekt ist hier beispielsweise ein Ausschnitt des 'Surface'-Layers, der in Abbildung (3.11) gezeigt wird. Nachdem ein Großteil der Strukturinformation in der ersten Kippserie nicht erfaßt wurde, kann das Objekt nur bedingt rekonstruiert werden; die Membranen und die Proteine des periplasmatischen Raums sind stark elongiert und verschmiert, siehe Abbildung (3.11 a)). Dagegen verläuft der 'Surface'-Layer in der zweiten Kippserie parallel zur Kippachse und kann viel detaillierter rekonstruiert werden, siehe Abbildung (3.11 b)). Das optimale Ergebnis erzielt man wieder durch die Kombination der beiden Einzel-Kipp-Serien was in Abbildung (3.11 c)) dargestellt ist.

Veranschaulichen lässt sich dies auch durch eine analytische Berechnung des Beugungsspektrums für das gesamte 3D-Volumen; eine *x-y*-Schnittebene dieses Spektrums ist in Abbildung (3.10 d)) gezeigt. Zu erkennen sind parallele Linien, die zum einen in Richtung der y-Achse und zum anderen fast waagrecht verlaufen und die einzelnen Projektionen der Kippserien widerspiegeln, siehe auch Abschnitt (2.3.1). Nachdem die eine Kippserie gegenüber der zweiten um 100° gedreht aufgenommen wurde, wird der fehlende Bereich des 'missing wedge' zumindest teilweise aufgefüllt und auf die Form einer Pyramide reduziert.

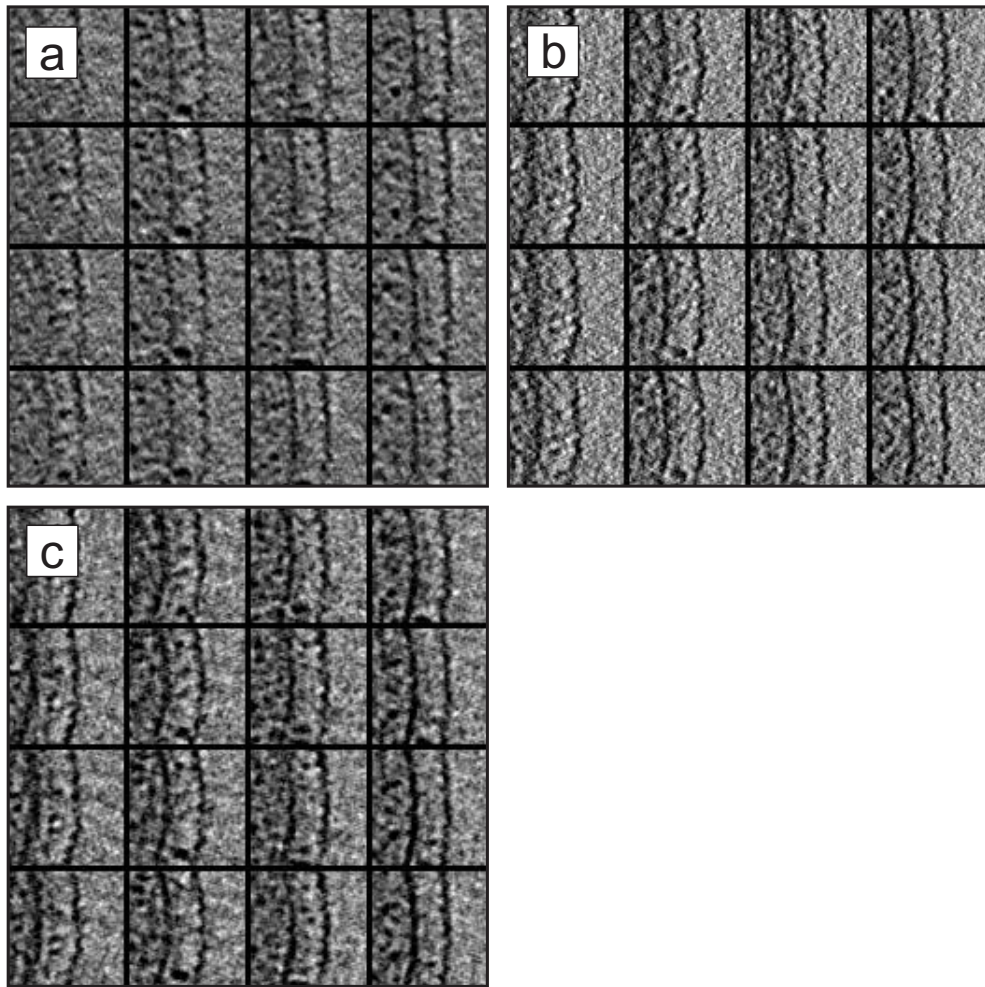


Abb. 3.11: Schnitte in x - y -Richtung des rekonstruierten 'Surface'-Layers. In Serie a) und b) wurde jeweils nur eine Kippserie rückprojiziert (Ein-Achsen-Kippung). Die senkrecht verlaufende Struktur wurde in a) nur bedingt rekonstruiert. Die Membranen und die Partikel im periplasmatischen Raum sind verschmiert und elongiert abgebildet. Dagegen wurde die Struktur in b) gut rekonstruiert (parallel zur Kippachse). Sie ist scharf begrenzt und kontrastreich. In c) sind beide Kippserien kombiniert, so daß eine verbesserte Abbildung des gesamten Objektes möglich ist.

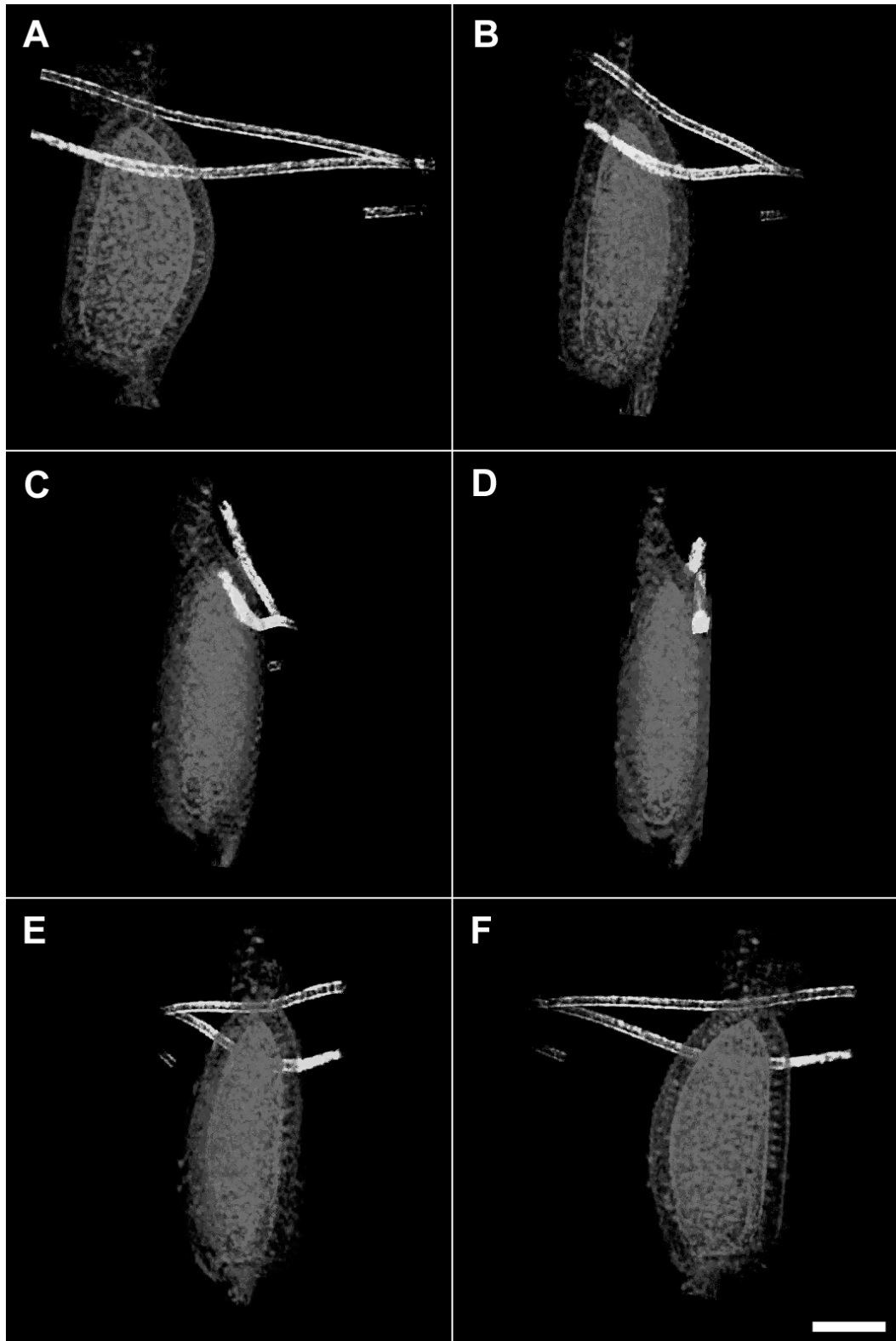


Abb. 3.12: Volumen-Darstellung mit sechs Ansichten der rekonstruierten *Pyrodictium abyssi* Zelle. Die Zelle und das Zellplasma wurden manuell aus dem 3D-Volumen segmentiert und sind blau bzw. rosa dargestellt. Mit der in Abschnitt (4.4.2) gezeigten Mustererkennung konnte eine automatische Segmentierung der *Cannulae* erfolgen (gelb). Zu erkennen ist die abgeflachte Zelle mit den *Cannulae*, von denen eine durch den periplasmatischen Raum stößt und an einem Ende gefüllt erscheint.

4. Parallelisierte Algorithmen zur Mustererkennung

4.1 Einführung

Die Lokalisierung und Identifikation makromolekularer Komplexe innerhalb einer tomographischen Rekonstruktion einer ganzen, eiseingebetteten Zelle erschliesst ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten in der Strukturbiologie. Molekulare Abläufe und Zusammenhänge innerhalb des zellulären Kontextes können so beobachtet und studiert werden, wenngleich die statische Abbildung im Elektronenmikroskop nur eine Momentaufnahme des komplexen, nativen Zustandes einer Zelle widerspiegeln kann. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Suchmethoden und Algorithmen zu entwickeln, um Proteine in einer dreidimensionalen Rekonstruktion einer ganzen Zelle zu finden und zugleich spezifisch zu identifizieren. Diese Mustererkennung, siehe Abbildung (4.1), basiert dabei ausschliesslich auf den unterschiedlichen Grauwertverteilungen der Volumenelemente (Voxel) der Rekonstruktion, die eine Variation der Objektdichte darstellt. Voraussetzung für die Erkennung ist zum einen eine möglichst gute tomographische Rekonstruktion der Zelle bei gleichzeitig hoher Auflösung, im folgenden als 'Zellvolumen' bezeichnet, und zum anderen ein 'Modellvolumen' welches aus der bekannten Struktur der Makromoleküle erzeugt werden kann. Dabei dienen die Daten aus hochauflösenden Techniken wie der Röntgenkristallographie, NMR oder auch die elektronenmikroskopische Analyse von Einzelpartikeln als Ausgangspunkt um ein gut determiniertes Modell zu generieren (Böhm et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit ist die rein künstliche Erzeugung eines Modellvolumens durch primitive 3D-Objekte wie z.B. einen hohlen Zylinder. Ebenso können frei gewählte Subvolumina der Rekonstruktion als Modell dienen. Unter den verschiedenen Verfahren der Mustererkennung ((Pratt 1978), (Gonzalez und Woods 1992)) ist die

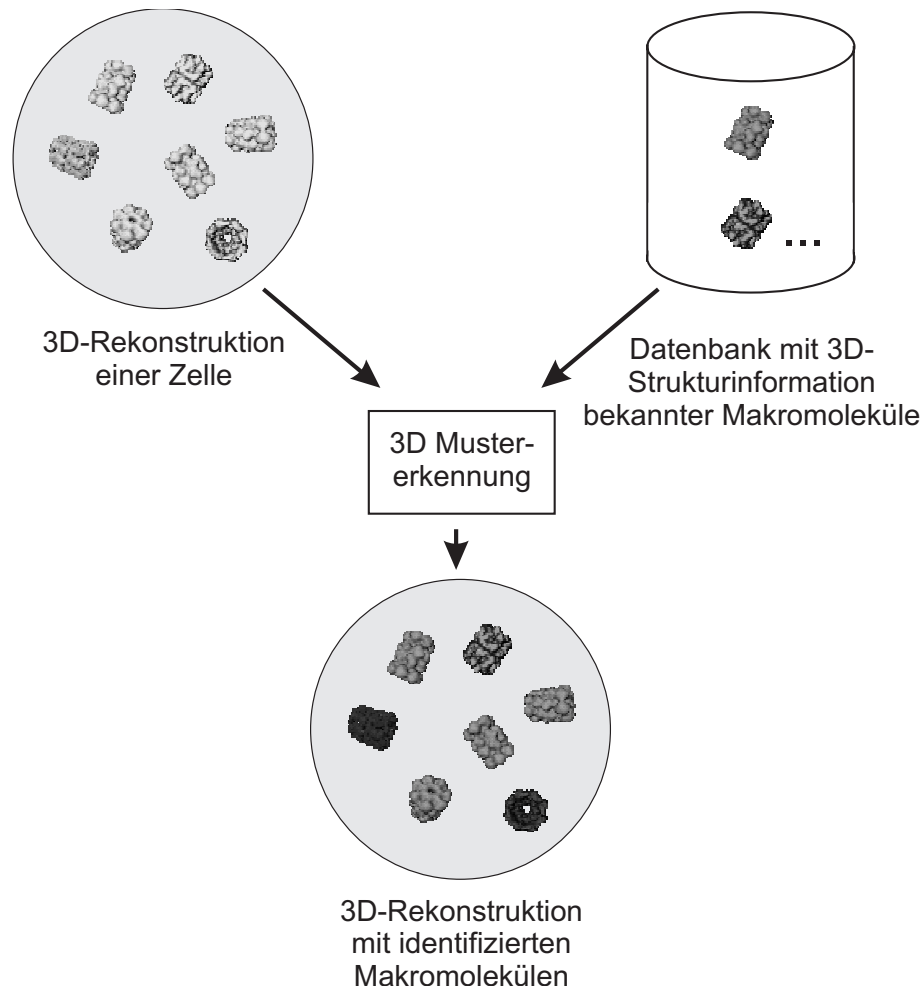


Abb. 4.1: Identifikation von Makromolekülen innerhalb tomographischer 3D-Rekonstruktionen. Grundlage sind Zell-Rekonstruktionen und eine Datenbank bekannter Molekülstrukturen, die als Suchmodelle dienen. Ein Mustererkennungs-Algorithmus lokalisiert die Modelle und erzeugt eine dreidimensionale 'Karte' der Proteine in der Zelle.

Korrelationsmethode, gerade wegen des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses elektronentomographischer Daten, am geeignetsten. Im folgenden soll deswegen vor allem auf unterschiedliche Suchstrategien basierend auf der erweiterten, dreidimensionalen normalisierten Korrelation von Dichtevolumina eingegangen werden.

4.2 Mustererkennung durch Kreuz-Korrelation

Die Mustererkennung mit Hilfe der Kreuz-Korrelation basiert auf einem Abstandsmass, dem quadratischen Euklidischen Abstand:

$$d_{f,t}^2(u, v) = \sum_{x,y} (f(x, y) - t(x - u, y - v))^2, \quad (4.1)$$

mit den Bilddaten¹ f ergibt sich die Summe über den Bildkoordinaten x und y innerhalb des Fensters der das Suchobjekt t an der Position u und v enthält. Multipliziert man Gleichung (4.1) aus,

$$d_{f,t}^2(u, v) = \sum_{x,y} (f^2(x, y) - 2f(x, y)t(x - u, y - v) + t^2(x - u, y - v)) \quad (4.2)$$

erhält man zwei konstante Terme: $\sum t^2(x - u, y - v)$ und $\sum f^2(x, y)$ sowie einen gemischten Term der die Kreuz-Korrelation darstellt,

$$c(u, v) = \sum_{x,y} f(x, y)t(x - u, y - v) \quad (4.3)$$

und ein Mass für die Ähnlichkeit zwischen dem Bild und dem Suchobjekt ist. Die Berechnung von $c(u, v)$ ist aber nicht ausreichend für eine erfolgreiche Mustererkennung:

1. wenn sich die Summe der Quadrate der Bildelemente des Korrelationsbereiches $\sum f^2(x, y)$, also die 'Energie' des Bildbereichs, mit der Position ändert. So kann der Korrelationswert (nach Gleichung (4.3)) zwischen dem Suchobjekt und einer exakt gleichen Bildinformation kleiner sein als die Korrelation zwischen dem Suchobjekt und einem 'hellen' Bildbereich, der hohe Grauwerte hat.
2. da der Wertebereich von $c(u, v)$ abhängig von der Größe des Suchobjektes ist.
3. da Gleichung (4.3) nicht invariant gegenüber Veränderungen der Bildamplitude wie z.B. einem Grauwert-Gradienten ist.

¹Zur vereinfachten Darstellung wurde zunächst eine zweidimensionale Herleitung gewählt. Diese wird im Folgenden ohne Einschränkung auf drei Dimensionen erweitert.

Normalisierte Kreuz-Korrelation

Durch die Normierung der Daten des Bildes und des Suchobjektes ergibt sich ein Kreuz-Korrelations-Koeffizient, der von den im vorigen Abschnitt gezeigten Nachteilen der Korrelationsfunktion befreit ist:

$$\gamma(u, v) = \frac{\sum_{x,y} (f(x, y) - \bar{f}_{u,v})(t(x - u, y - v) - \bar{t})}{\sqrt{\sum_{x,y} (f(x, y) - \bar{f}_{u,v})^2 \sum_{x,y} (t(x - u, y - v) - \bar{t})^2}}. \quad (4.4)$$

Hierbei ist \bar{t} der Mittelwert des Suchobjektes und $\bar{f}_{u,v}$ der Mittelwert von $f(x, y)$ in der Region des Suchobjektes. Im folgenden wird Gleichung (4.4) auch als normalisierte Kreuz-Korrelation bezeichnet.

4.3 Variablentrennung von Ortskoordinaten und Drehwinkeln

Die normalisierte Kreuz-Korrelation ist nicht invariant gegenüber der Rotation der Bilddaten, was einen Nachteil bei der Mustererkennung darstellt. Die Translations- und Rotationsparameter eines Suchobjektes beeinflussen zwar den Korrelationswert aus Gleichung (4.4), lassen sich aber nicht in einem Schritt berechnen, sondern müssen getrennt voneinander abgetastet werden. Es ist also eine Variablentrennung von Ortskoordinate und Drehwinkel (Euler-Winkel) notwendig, siehe Abbildung (4.2), die zu zwei Suchstrategien führt. Zum einen lässt sich der Ortsraum in den drei Raumrichtungen abfahren um an jeder Position einen 'idealen' Tupel der Euler-Winkel, mit maximalem normierten Kreuz-Korrelations-Koeffizienten, zu bestimmen. Diese Herangehensweise wird im folgenden Abschnitt (4.3.1) beschrieben. Eine zweite Möglichkeit ist eine Korrelation des gesamten Zellvolumens mit vielen unterschiedlich gedrehten Modellvolumina und einer anschließenden Bestimmung des Maximums des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten für jede Position wie es in Abschnitt (4.3.3) beschrieben wird. Da in beiden Fällen eine große Anzahl von Berechnungen mit dreidimensionalen Volumina, also großen Datenmengen, notwendig ist, wurden die Algorithmen für Computer mit massiver paralleler Architektur programmiert. Im Zuge des Einsatzes der Parallelrechner ergab sich eine Suchstrategie die auf der 'Parallelisierung über Ortskoordinaten' basiert und eine weitere die auf der 'Parallelisierung über Drehwinkel' beruht.

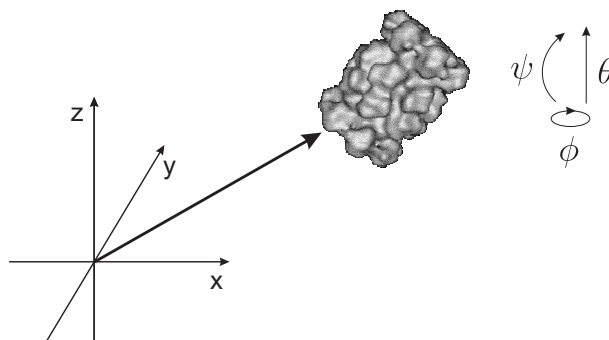


Abb. 4.2: Darstellung der sechs Freiheitsgrade eines Makromoleküls in einer Zelle. Die drei Ortskoordinaten in x -, y - und z -Richtung bestimmen die Position, die drei Euler-Winkel ϕ , ψ und θ die Drehung des Objektes.

4.3.1 Parallelisierung über Ortskoordinaten

Eine Möglichkeit der Trennung von Ortskoordinate und Drehwinkel ist ein 'Abfahren' des Zellvolumens mit einem Modellvolumen. An jeder Position wird dabei der dreidimensionale Kreuz-Korrelations-Koeffizient berechnet und abgespeichert. Da dieser Koeffizient von der Rotation des Modellvolumens abhängt, muss dementsprechend für jede Position der ganze Winkelbereich der drei Euler-Winkel abgeschritten werden. Eine solche vollständige Winkelabtastung ist zwar wünschenswert, aber bzgl. des Rechenaufwands nicht zu realisieren. Deswegen wurde im Laufe dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, welches die Rechenzeit so weit reduziert, bis eine Anwendung auf reale Daten möglich war. Diese Optimierung geschah in zwei Schritten, wobei zunächst ein Verfahren implementiert wurde, welches die Bestimmung der Drehwinkel beschleunigte. Um die Berechnung an den verschiedenen Ortskoordinaten auf mehrere Prozessoren zu verteilen wurden die Programme anschliessend parallelisiert, was zu einer linearen Skalierung für die Rechenzeit des Problems führte².

Simplex Methode zur optimierten Suche der Drehwinkel

Ein sehr verbreitetes und wichtiges Problem in allen Zweigen der Wissenschaften ist die Maximierung einer Funktion in Abhängigkeit mehrerer Variablen. Dieses Problem tritt bei Optimierungen auf, die versuchen, die 'beste' Kombination von Variablen zu finden, die z.B. den Gewinn eines Geschäftes, die minimale Energie einer Atomkonfiguration oder den kürzesten Weg entlang einer Oberfläche optimieren. Bei dem Problem der dreidimensionalen Korrelation an einem Ort (x, y, z) gilt es, den höchsten Wert einer Funktion f in Abhängigkeit der drei Euler-Winkel ϕ, ψ und θ zu bestimmen, also $f(\phi, \psi, \theta) = \text{Maximal}$. Zwei grundlegend unterschiedliche Typen von Algorithmen kommen zur Maximierung von multivariablen Funktionen zum Einsatz. Die eine versucht den maximalen Punkt einzuklammern und dann sukzessive den Klammerungsbereich zu verkleinern, bis eine gewünschte Genauigkeit erreicht wurde. Dieses Verfahren heisst 'Simplex Methode' und wurde von Nelder und Mead

²Die erforderliche Rechenzeit ist bei der linearen Skalierung nur noch ein n -ter Bruchteil der ursprünglichen Rechenzeit, wobei n die Anzahl der verwendeten Prozessoren ist.

(Nelder und Mead 1965) entwickelt. Eine weitere Klasse von Maximierungsverfahren bedient sich der Ableitung der Funktion f , um entsprechend der Krümmung auf einem kurvigen Weg ein Maximum zu suchen. Diese Art von Algorithmen nennt man quasi-Newton Methoden, die zwar gewöhnlich effizienter, aber deutlich schwieriger zu implementieren sind und aufgrund ihrer komplexen Struktur hier nicht zum Einsatz kommen.

Simplex Methode

Die Grundidee bei der Suche nach dem Maximum der Funktion f in Abhängigkeit von mehreren Variablen ist das 'Einklammern' des Maximums in ein Intervall welches stetig verkleinert wird. Diese Vorgehensweise setzt voraus, daß man bei der Bestimmung des Startintervalls auch bestimmt das Maximum mit einschliesst. Dies ist jedoch nur im eindimensionalen Fall gewährleistet; Maxima bei mehrdimensionalen Problemen lassen sich nicht immer in dieser Art und Weise einfangen. Trotzdem

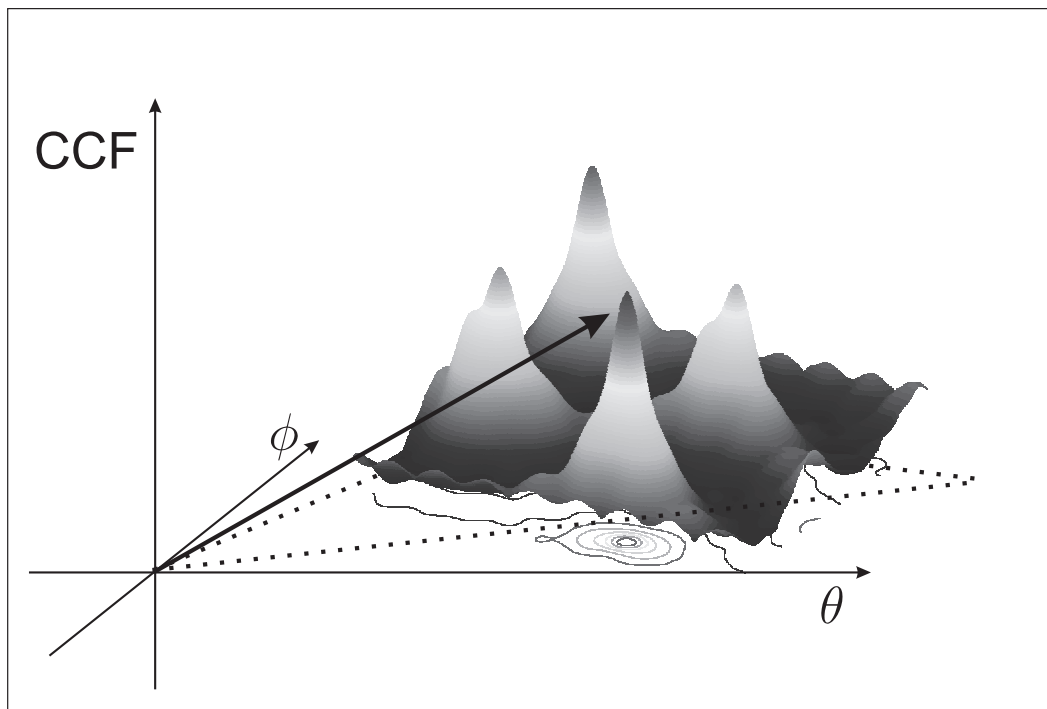


Abb. 4.3: Verteilung des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten in Abhängigkeit der Euler-Winkel ϕ und θ . Korreliert wurde dabei eine vierfach symmetrisierte, stark verrauschte 3D-Struktur mit sich selbst. Zu erkennen sind die vier scharfen Korrelationsmaxima. Ziel der Optimierung mit Hilfe der Simplex Methode ist das Finden des höchsten Maximums mit möglichst wenigen Korrelationsoperationen.

lässt sich aus dieser, eher geometrischen Betrachtung ein Verfahren entwickeln, welches entlang einer n -dimensionalen Fläche ein Maximum sucht, siehe Abbildung (4.3). Hierzu werden nicht Volumina in Form von rechtwinkligen Parallelepipeden definiert sondern die Volumenelemente genügen dem einfachst möglichen Strukturelement eines Volumens, nämlich dem Simplex. So entspricht in zwei Dimensionen ein solches Volumen einem Gebiet in der x - y -Ebene, und das Strukturelement wäre ein Dreieck welches definiert ist durch drei nicht kollineare Punkte. In n Dimensionen, ist der Simplex die Region, die in $n + 1$ Punkten beinhaltet ist. Bildlich darstellen lässt sich die Simplex-Methode mit einer Region, die eingeschlossen wird von $n + 1$ Vektoren x_i , $x_i = x_0 + \lambda * e_i$, mit einem beliebigen Vektor x_0 als erste Schätzung für die Position des Maximums, und e_i , mit $i = 1, \dots, n$, als orthogonalen Einheitsvektoren im n -dimensionalen Raum. Ziel der Prozedur ist es, diesen Simplex auf das Maximum zu verschieben und, falls dies nicht möglich ist, die Größe zu verringern, siehe Abbildung (4.4).

Im folgenden soll kurz die Vorgehensweise des Algorithmus, vereinfacht in Abhängigkeit von zwei Variablen gezeigt werden: Es gilt die Funktion $f(x, y)$ zu maximieren mit einem Startwert von x_0 , der dementsprechende zweidimensionale Simplex ist damit ein Dreieck, dessen Eckpunkte beschrieben sind durch die Vektoren x_0 , $x_1 = x_0 + \lambda * e_1$ und $x_2 = x_0 + \lambda * e_2$. Die Funktion wird dann an diesen Eckpunkten berechnet und sortiert in der Form: x_{max} , x_{min} , x_{next} entsprechend dem Punkt wo die Funktion am grössten, am kleinsten und am zweitgrössten ist.

Diese drei Punkte werden auch im mehrdimensionalen Fall in der Suchstrategie benutzt, die versucht, x_{max} langsam dem Maximum zu nähern:

1. Bestimme x_{max} , x_{min} und x_{next} entsprechend f_{max} , f_{min} und f_{next} .
2. Spiegele den Punkt x_{max} am Mittelpunkt der gegenüberliegenden Seite des Dreiecks. Dieser Mittelpunkt ist der Durchschnitt aller Vektoren nach Ausschluss von x_{max} . In n Dimensionen also $x_{avg} = 1/n * \sum x_i$. Der reflektierte Punkt sei $x_{try1} = x_{avg} - x_{max}$ (s.a. Abbildung (4.4)).
3. Wenn $f(x_{try1}) > f_{max}$ ist, so hat die Reflexion ein neues Maximum in dieser Richtung gefunden. Also versuche einen noch größeren Schritt entlang dieser Linie: $x_{try2} = \gamma * x_{try1} + (1 - \gamma) * x_{avg}$, mit γ einem Skalierungsfaktor größer

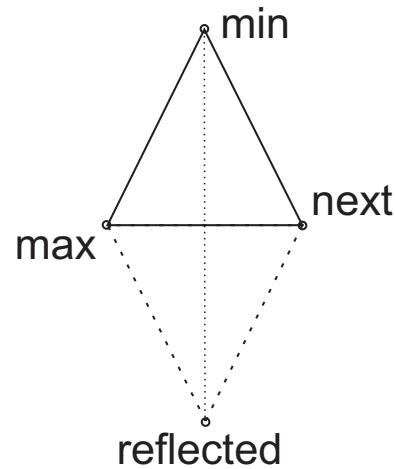


Abb. 4.4: Vereinfachte Darstellung der Simplex Methode. Das Korrelationsmaximum wird begrenzt von dem einfachsten geometrischen Objekt, dem Simplex. Deformationen des Simplex, wie hier Reflektieren oder Verkleinern führen schliesslich zur Findung des maximalen Korrelations-Koeffizienten in Abhängigkeit der drei Euler-Winkel.

als eins. (a) Wenn $f(x_{try2}) > f_{max}$, ersetze $x_{max} = x_{try2}$. (b) Andernfalls, war der Schritt zu weit, aber x_{try1} wird trotzdem $x_{max} = x_{try1}$.

4. Wenn der reflektierte Punkt x_{try1} auch kein neues Maximum liefert, so kann er dennoch benutzt werden, wenn der zugehörige Funktionswert zwischen f_{next} und f_{max} liegt:

(a) x_{try1} wird zu x_{next}

(b) Teste einen Punkt auf der Verbindungslinie, aber auf der gleichen Seite wie x_{max} : $x_{try2} = \beta * x_{max} - (1 - \beta) * x_{avg}$, mit β als Verkleinerungsfaktor (kleiner 1). Schrumpfe also den Simplex entlang der Reflexionslinie. Ist der neue Wert größer, also $f(x_{try2}) > f_{max}$, dann sei $x_{max} = x_{try2}$.

5. Sollte nichts von diesen Strategien nutzen verkleinere den Simplex in Richtung des grössten Wertes. Also sei für alle Eckpunkte ausser dem Maximum $x'_i = x_{max} + \lambda(x_i - x_{max})$.

6. Überprüfe die Abbruchbedingung (gewünschte Genauigkeit erreicht) und beende die Berechnung, ansonsten gehe wieder zu 1.)

Programmstruktur des optimierten Such-Algorithmus

Die Umsetzung der optimierten Suche eines Modells in einem dreidimensionalen Volumen unter Ausnutzung des 'Simplex-Search' Algorithmus soll hier näher beschrieben werden.

Nachdem es sich bei den untersuchten Volumina um große Datenmengen handelt (typ. 512x512x256 Voxel) ist es notwendig, Subvolumina auszuschneiden und getrennt zu bearbeiten. Um diese Methode jedoch praktisch anwenden zu können, ist eine Reduktion der Rechenzeit notwendig, was durch eine Parallelisierung des Algorithmus erreicht werden kann. Dementsprechend wurde ein parallelisiertes Programm unter der Programmiersprache C, mit Kommunikationsroutinen der 'shared memory' Bibliothek (Silicon Graphics, Palo Alto, KA, USA) und der oben vorgestellten optimierten 'Simplex-Suche' auf der *Cray T3e* am Max-Planck-Rechenzentrum in Garching implementiert.

Programmablauf

Ausgehend von einem Zellvolumen, der 3D-Rekonstruktion, und einem kleineren Modellvolumen mit einer typ. Größe von 32^3 Voxeln erfolgt die Partikelsuche nach folgendem Schema, das in Abbildung (4.5) nochmals grafisch dargestellt ist:

1. Das Prozessor-Element³ (PE) mit der Nummer 1 rechnet die räumliche Verteilung des Zellvolumens auf alle zur Verfügung stehenden PEs aus. Dabei wird die Größe der einzelnen Subvolumina durch die Anzahl der PEs bestimmt. Zusätzlich ist ein Überlappungsbereich an den Grenzen der Subvolumina von der Größe des halben Modellvolumens notwendig, da zur Berechnung des Korrelationswertes alle Voxel des Modells beitragen müssen.
2. Prozessor-Element (PE) Nummer 1 lädt sequentiell die in 1. berechnete Blockgröße in den Arbeitsspeicher und verteilt die Daten der Reihe nach an die restlichen PEs.
3. Alle PEs laden das gleiche Modellvolumen in den zugehörigen Arbeitsspeicher.

³Ein PE ist ein eigenständiger Computer mit einem Prozessor, Arbeitsspeicher und IP-Adresse der mit anderen PEs vernetzt ist.

4. Jedes PE führt die Abtastung seines Subvolumens aus. Die folgenden Schritte erfolgen parallel auf jedem PE:
 - (a) Es wird aus dem Subvolumen ein Volumen mit der Größe des Modellvolumens ausgeschnitten.
 - (b) Danach erfolgt die Berechnung des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten nach Gleichung (4.4) innerhalb eines einbeschriebenen Kugelvolumens. Somit tragen immer gleich viele Voxel zur Korrelation bei.
 - (c) Mit Hilfe der Simplex-Methode, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, erfolgt eine Maximierung des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten durch eine Rotation des Modellvolumens⁴ bis die Änderung kleiner als ein gewisser Schwellwert ist, oder aber die maximale Anzahl von Rotationen, typischerweise 50, erreicht wurde.
 - (d) Der Winkeltupel des Ergebnisses wird in ein Winkelvolumen gespeichert, welches die Größe des Subvolumens hat. Somit wird an jeder Stelle eine optimale Winkelkombination für einen maximalen Kreuz-Korrelations-Koeffizienten gefunden.
5. Hat ein PE sein zugewiesenes Subvolumen abgearbeitet, wartet die Programmausführung, bis alle PEs an der gleichen Stelle angekommen sind.
6. Der PE mit der Nummer 1 sammelt die Winkelvolumina der restlichen PEs sequentiell ein und schreibt diese fortlaufend in eine Ausgabedatei.

Mit diesem Such-Algorithmus werden nur drei Dateien mit den Euler-Winkeln für eine optimalen Kreuz-Korrelations-Koeffizienten ausgegeben. Die dazugehörigen Zahlenwerte der Kreuz-Korrelations-Koeffizienten werden aufgrund des limitierten Speicherplatzes anschliessend berechnet. Somit liegen vier Datensätze als Endergebnis vor; ein Volumen mit den Werten der Kreuz-Korrelations-Koeffizienten und drei Volumen mit den dazugehörigen Winkeln. Die Größe dieser Volumina ist dabei in allen drei Raumrichtungen um die Dimensionen des Modellvolumens verringert, da an den Rändern keine vollständige Korrelation berechnet werden kann.

⁴Die Rotation wird nur in einem einbeschriebenen Kugelvolumen ausgeführt, damit immer gleich viele Voxel zur Korrelation beitragen. Die Werte der Voxel werden dabei trilinear interpoliert.

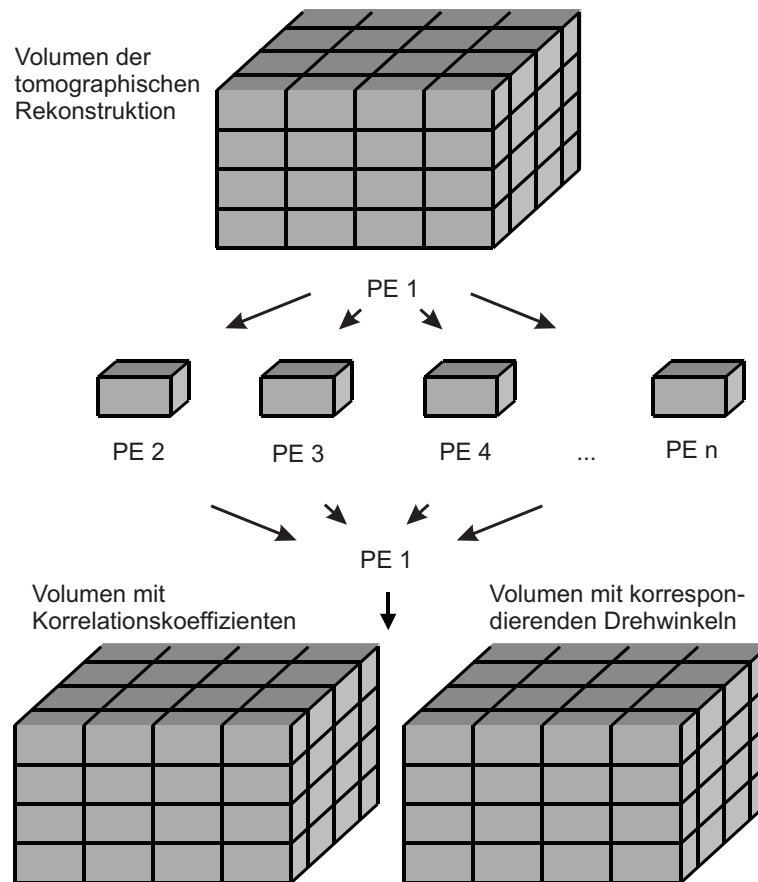


Abb. 4.5: Parallelisierung über Ortskoordinaten. Das gesamte Zellvolumen wird in Subvolumina unterteilt und verschiedenen Prozessierungselementen (PE) zugewiesen. Innerhalb der Subvolumina wird eine optimierte Suche der Kreuz-Korrelations-Koeffizienten in Abhängigkeit der Drehwinkel des Modellvolumens berechnet. Das 'Verteilen' und das 'Einsammeln' der Daten erfolgt durch ein ausgewähltes PE. Das Ergebnis ist ein 3D-Volumen mit maximalen Korrelations-Koeffizienten und den dazu korrespondierenden Drehwinkeln.

4.3.2 Bestimmung der maximalen Kreuz-Korrelations-Koeffizienten

Nachdem die Kreuz-Korrelations-Koeffizienten mit den dazu korrespondierenden Drehwinkeln berechnet wurden, erfolgt eine Bestimmung der höchsten Koeffizienten aus dem dreidimensionalen Ergebnisdatsatz, die in einer Liste gespeichert werden. In dieser Liste stehen sortiert nach der Höhe des Koeffizienten nur noch die Ortskoordinaten in x , y und z , sowie die drei Drehwinkel ϕ , ψ , θ und der Koeffizient. Diese Extraktion geschieht durch eine Bestimmung des globalen Maximums aller Korrelationswerte des Volumens. Danach werden alle Voxel innerhalb eines frei definierbaren

Radius um die Koordinaten dieses Maximums auf einen kleinen Wert, typischerweise null, gesetzt. Somit wird der ganze Korrelationsbereich des Maximums, der oft aus mehreren Voxeln besteht, herausgeschnitten. Eine mehrfache Interpretation des gleichen Maximums ist somit ausgeschlossen. Mit der Position des Maximums ist auch die dazugehörige Winkelkombination bekannt, und kann aus dem Winkelvolumen in die Liste übertragen werden. Dieser Vorgang wird iterativ wiederholt, bis eine vorher definierte Anzahl von Maxima extrahiert wurde oder ein gewisser Schwellwert für den Korrelationswert nicht mehr erreicht wird.

4.3.3 Parallelisierung über Drehwinkel

Ein weiterer Ansatz (Frangakis und Boehm 2000) zur Bestimmung dreidimensionaler Kreuz-Korrelations-Koeffizienten setzt leistungsfähige Computer mit großem Arbeitsspeicher voraus⁵. Basierend auf dem Korrelationstheorem lässt sich ein Korrelationswert durch eine Multiplikation im Fourierraum bestimmen. Die anschließende Normalisierungs-Operation führt zum Kreuz-Korrelations-Koeffizienten. Multipliziert man Gleichung (4.4) aus ergibt sich:

$$\gamma(u, v) = \frac{\sum_{x,y} f(x, y)t(x - u, y - v) - \sum_{x,y} f(x, y)\bar{t} - \sum_{x,y} \bar{f}_{u,v}t(x - u, y - v) + \sum_{x,y} \bar{f}_{u,v}\bar{t}}{\sqrt{\sum_{x,y} (f(x, y) - \bar{f}_{u,v})^2 \sum_{x,y} (t(x - u, y - v) - \bar{t})^2}} \quad (4.5)$$

Die Bereiche von f und t sind unterschiedlich; somit ist auch f von u, v abhängig. Unter der Voraussetzung, daß \bar{t} mittelwertfrei ist verschwindet auch: $\sum_{x,y} f(x, y)\bar{t}$, $\sum_{x,y} \bar{f}_{u,v}t(x - u, y - v)$ und $\sum_{x,y} \bar{f}_{u,v}\bar{t}$. Damit lässt sich Gleichung (4.5) reduzieren auf:

$$\gamma(u, v) = \frac{\sum_{x,y} f(x, y)t(x - u, y - v)}{\sqrt{\sum_{x,y} (f(x, y) - \bar{f}_{u,v})^2 \sum_{x,y} t(x - u, y - v)^2}}. \quad (4.6)$$

Im folgenden wird der Zähler und der Nenner dieses Ausdrucks (4.6) getrennt betrachtet und auch separat berechnet.

Korrelationstheorem

Das Korrelationstheorem beschreibt den Zusammenhang zwischen der Korrelationsfunktion, die definiert ist durch (Press et al. 1992):

$$Corr_{g,h}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau + t)h(\tau)d\tau, \quad (4.7)$$

oder für den 'diskreten' Fall:

$$Corr_{g,h}(j) = \sum_{k=0}^{N-1} g_{j+k}h_k. \quad (4.8)$$

⁵Diese wurden im Laufe dieser Arbeit verfügbar.

und den zu den reellen Funktionen g und h korrespondierenden, fouriertransformierten Funktionen \mathcal{G} beziehungsweise \mathcal{H} mit:

$$\text{Corr}_{g,h}(j) \iff \mathcal{G}_k \mathcal{H}_k^* \quad (4.9)$$

Hierbei ist \mathcal{H}_k^* die komplex konjugierte Funktion von \mathcal{H}_k . Mit Hilfe des Korrelations-Theorems lässt sich also an jeder Position j ein Korrelationswert wie im Zähler von Gleichung (4.6) bestimmen indem:

1. die Ausgangsfunktionen fouriertransformiert werden $\mathcal{G} = \mathcal{F}\{g\}$ und $\mathcal{H} = \mathcal{F}\{h\}$,
2. die Funktion \mathcal{G} dann mit der komplex konjugierten Funktion von \mathcal{H} multipliziert wird,
3. das Produkt invers fouriertransformiert wird: $c = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{G}\mathcal{H}^*\}$ ⁶.

Zur Bestimmung des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten ist eine Normalisierung mit dem Nenner aus Gleichung (4.6) notwendig. Dieser 'lokale' Normalisierungsfaktor muss für jede Position des dreidimensionalen Zellvolumens berechnet werden (Frangakis und Boehm 2000), (Lewis 1995):

$$\gamma(u, v) = \frac{1}{\sqrt{\sum_{x,y} (f(x, y) - \bar{f}_{u,v})^2 \sum_{x,y} t(x - u, y - v)^2}} \quad (4.10)$$

Ein Computerprogramm welches diese Normierung durchführt, wurde von Achilleas Frangakis implementiert und zur Verfügung gestellt. Eine 'schnelle' Berechnung des Normalisierungsfaktors wurde von J.P. Lewis vorgeschlagen (Lewis 1995) und macht sich die Bildung von laufenden Summen zu nutze.

⁶in der Praxis ist aufgrund der Implementierung der Fast-Fourier-Transformation (FFT) ein Vertauschen der Volumenquadranten (überkreuz) nötig. Ebenso ist je nach Programmierung der FFT eine Normierung mit der Dimensionen des Volumens erforderlich.

Schnelle Fouriertransformationen mit Hilfe der *FFTW*-Bibliothek

Die Grundlage für die 'Parallelisierung über Drehwinkel' besteht in der Berechnung von mehreren hundert bis hunderttausend diskreten Fouriertransformationen (DFT) eines dreidimensionalen Volumens mit einer typischen Größe von 256^3 Volumenelementen (Voxeln). Alle weiteren Rechenoperationen wie das Drehen des Modellvolumens oder die Bestimmung des Korrelationsmaximums sind bzgl. der Rechenzeit vernachlässigbar. Der Implementierung der DFT Routine kommt also eine zentrale Rolle zu.

Eine Reihe von schnellen, in der Programmiersprache *C* realisierten Programmen zur Fouriertransformation von reellen und komplexen Daten wurde unter dem Namen *FFTW* (*Fastest Fourier Transform in the West*) zusammengefaßt (Frigo und Johnson 1999) und ist auf dem *World Wide Web* (www.fftw.org) frei erhältlich. Die *FFTW* Routinen bestehen nicht aus starren Algorithmen, sondern aus sich selbst optimierenden Programmteilen, die auf die zugrundeliegende Hardware des jeweiligen Computers abgestimmt werden. Durch eine Optimierung verschiedener Parameter wie z.B. des Speicherzugriffes (Cache) oder das Prüfen auf eine ideale Datenlänge wird eine hohe Ausführungsgeschwindigkeit auf den verschiedenen Computer-Plattformen⁷ erreicht. Dementsprechend ist der Aufruf der *FFTW*-Routinen in zwei Schritte unterteilt. Zunächst wird ein sogenannter 'Plan' erstellt, bei dem der *FFTW-Planner* den schnellsten Ausführungsweg 'lernt' und in einer Datenstruktur speichert. Danach wird dieser Plan zu dem *FFTW-Executor* Programmteil übertragen und kann beliebig oft zur Durchführung von DFTs verwendet werden.

Programmstruktur des optimierten Such-Algorithmus

Im folgenden soll kurz auf die Implementierung der optimierten Suche eines Modellvolumens in einem Zellvolumen mit Hilfe der diskreten Fouriertransformation eingegangen werden.

Je nach den Symmetrieeigenschaften der Modelldaten ist eine unterschiedliche Anzahl von Winkel-Abtastungen notwendig. So hat zum Beispiel ein *Thermosom* eine

⁷Die in diesem Abschnitt beschriebenen Programme sind auf SGI-Workstations, auf dem Parallelrechner Hitachi 9000 SR (Leibniz-Rechenzentrum, TU München) und auf Linux-Clustern ausführbar.

16-fache Symmetrie (8-zählige Symmetrie um die z-Achse, sowie 2-zählige Symmetrie um 4 horizontale Achsen). Diese Eigenschaft reduziert den abzutastenden Winkelbereich um einen Faktor 16, da die Information einer Rotation um die Symmetrie-Achsen redundant ist. Bei anderen Makromolekülen wie dem *Ribosom* sind keine Symmetrieeigenschaften vorhanden, so daß der gesamte Bereich der Euler-Winkel in ϕ, ψ und θ abgetastet werden muss. Die Abtastgenauigkeit wird dabei durch das Winkelinkrement bestimmt, welches frei gewählt werden kann, aber sinnvollerweise in einem Bereich von 5° bis 15° liegt. Dementsprechend müssen für eine Partikelsuche bis zu 200.000 Fouriertransformationen durchgeführt werden was einen hohen Aufwand an Rechenzeit erfordert. Eine Reduzierung kann nur mit Hilfe von parallel ausgeführten Programmteilen erfolgen. Dieses parallelisierte Programm wurde unter der Programmiersprache C, mit der Kommunikationssoftware *MPI* (Message Passing Interface, www.mcs.anl.gov/mpi) und der oben vorgestellten *FFTW*-Bibliothek implementiert.

Programmablauf

Ausgehend von einem Zellvolumen, einer 3D-Rekonstruktion mit einer typ. Größe von 256^3 Voxeln und einem kleineren Modellvolumen mit einer typ. Größe von 32^3 Voxeln erfolgt die Partikelsuche nach folgendem Prinzip, welches in Abbildung (4.6) nochmals grafisch dargestellt ist:

1. Die Daten des Zell- und des Modellvolumens werden in den Speicher eines jeden Prozessor-Elementes (PE) geladen.
2. Das Zellvolumen wird einmalig fouriertransformiert, ohne daß zusätzlicher Speicher alloziert werden muss.
3. Jeder PE führt die Abtastung eines bestimmten Winkelbereichs aus. Der Start- und Endwert für die Winkel wird dabei aus der Prozessornummer berechnet. Die folgenden Schritte erfolgen parallel auf jedem PE:
 - (a) Das Modellvolumen wird um die festgelegten Euler-Winkel gedreht und zentral in ein Volumen (mit null belegt) eingefügt. Dieses Volumen wird im folgenden als Korrelations-Modell-Volumen bezeichnet.

- (b) Das Korrelations-Modell-Volumen wird fouriertransformiert.
 - (c) Das Zellvolumen wird mit dem konjugiert komplexen des Korrelations-Modell-Volumens multipliziert, siehe auch Abschnitt (21). Dieses Produktvolumen wird dabei in den Speicher des Korrelations-Modell-Volumens geschrieben.
 - (d) Das Produktvolumen wird rücktransformiert und damit die Korrelationswerte berechnet.
 - (e) Es wird ein Vergleich der Höhe der neu berechneten Korrelationswerte und gespeicherter Korrelationswerte durchgeführt. Ist der neue Korrelationswert eines Voxels größer als der gespeicherte, wird er übernommen und stellt den neuen maximalen Korrelationswert des Voxels dar. Die zugehörigen Euler-Winkel werden in ein Winkelvolumen mit identischer Größe des Korrelationsvolumens gespeichert.
 - (f) Hat ein PE alle zugewiesenen Winkelwerte abgearbeitet, wartet die Programmausführung bis alle PEs an der gleichen Stelle angekommen sind.
4. Der PE mit der Nummer 1 sammelt die Korrelationsvolumina und die Winkelvolumina der restlichen PEs sequentiell ein und führt wiederum eine Maximumbestimmung der Korrelationswerte durch. Es wird also aus den einzelnen, lokalen maximalen Korrelationswerten ein globaler, maximaler Korrelationswert an jeder Stelle des Volumens bestimmt. Der korrespondierende Winkeltupel wird dabei in ein Winkelvolumen übernommen.
5. Es erfolgt eine einmalige Ausgabe des globalen Korrelationsvolumens und des korrespondierenden Winkelvolumens⁸ durch den PE mit der Nummer 1 in zwei Dateien.

Nach der Bestimmung der Kreuz-Korrelation für jedes Voxel muss gemäß Gleichung (4.6) dieser Wert normalisiert werden um einen Kreuz-Korrelations-Koeffizienten zu erhalten. Die Extraktion der höchsten Koeffizienten, sowie die Zuordnung der

⁸Um Speicherplatz zu reduzieren wurden die Euler-Winkel durchnummeriert und abgespeichert. Die Zuordnung der Winkel-Nummer zu den Euler-Winkeln ist eindeutig und wird bei der Auswertung rückgängig gemacht.

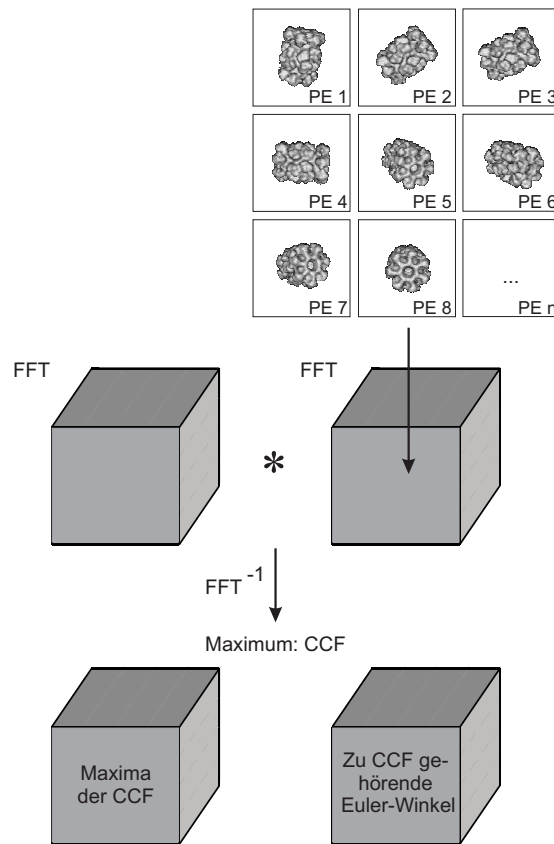


Abb. 4.6: Parallelisierung über Drehwinkel. Das Zellvolumen wird (einmalig) fouriertransformiert und mit der Fouriertransformierten eines Volumens multipliziert in dessen Mitte ein gedrehtes Modellvolumen eingefügt wurde. Nach der Rücktransformation des Produktvolumens erhält man aufgrund des Korrelationstheorems die lokalen maximalen Korrelationswerte für das gesamte Zellvolumen. Der gewünschte Winkelbereich wird dabei auf die Prozessierelemente (PE) verteilt und parallel abgearbeitet. Ein PE führt schließlich die Bestimmung der globalen maximalen Korrelationswerte durch. Das Ergebnis ist ein 3D-Volumen mit maximalen Korrelations-Koeffizienten und den dazu korrespondierenden Drehwinkeln.

Winkel erfolgt danach analog zu Abschnitt (4.3.2) in einem weiteren Prozessierungsschritt.

4.3.4 Vergleich der beiden Algorithmen zur Mustererkennung

Die Anwendung der in den vorigen Abschnitten (4.3.1 und 4.3.3) beschriebenen Algorithmen, zur Partikelsuche in dreidimensionalen Volumen hängt von verschiedenen Rahmenbedingungen ab, die im folgenden näher erläutert werden sollen. So hat die 'Parallelisierung über Ortskoordinaten' den Vorteil, daß fast beliebig große

Volumina prozessiert werden können, da eine Verteilung der Daten geschieht, so daß auch kleine Arbeitsspeicher der Computer geeignet sind. Von Nachteil ist die hohe Rechenzeit und die Gefahr, daß bei zu geringer Signifikanz der Daten die Simplex-Methode fehlschlägt und Partikel somit nicht gefunden werden. Die Bereitstellung von Computern mit großen Kapazitäten machte die Entwicklung eines Algorithmus möglich, der sich das Korrelationstheorem zu nutze macht und es erlaubt, schnell große Volumina nach Partikeln abzusuchen. Ein Vergleich der beiden Such-Algorithmen wurde anhand eines realen Datensatzes, wie er in Abschnitt 4.4.1 gezeigt ist, durchgeführt. Die mit beiden Algorithmen getrennt ermittelten Kreuz-Korrelations-Koeffizienten mit den dazu gehörenden Drehwinkeln unterscheiden sich dabei nur geringfügig. Jedoch wurde aufgrund der geringeren Rechenzeit dem Algorithmus mit der 'Parallelisierung über Drehwinkel' in der weiteren Arbeit der Vorzug gegeben.

4.4 Dreidimensionale Detektion und Segmentierung

Die auf der dreidimensionalen Korrelation beruhenden Algorithmen dienen vor allem zur Partikelsuche und Identifikation innerhalb rekonstruierter Zellvolumina. Im folgenden werden zwei Anwendungen erläutert, die wichtige Fälle in der elektronenmikroskopischen Bildverarbeitung behandeln: die Detektion von Einzelpartikeln und die Segmentierung von Strukturen.

4.4.1 Detektion von *Thermosomen*

Die Strukturanalyse von Makromolekülen mit Hilfe elektronentomographischer Methoden wurde bereits mehrfach erfolgreich angewendet (Walz 1997). Die Grundidee ist dabei die dreidimensionale Mittelung vieler Partikel (mehrere hundert bis tausend) um das Signal-Rausch-Verhältnis soweit zu verbessern, bis eine deutliche, interpretierbare Struktur vorhanden ist. Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Mittelung ist dabei das Vorliegen eines einheitlichen Konformationszustandes der Proteine bei der Cryo-Fixierung. Dabei wird das isolierte Protein in einer möglichst dünnen, amorphen Eisschicht (ca. 50 nm) eingefroren und unter Cryo-Bedingungen untersucht. Die Aufzeichnung der Kippserien und ihre Auswertung erfolgt analog zu den in Kapitel 1 beschriebenen Methoden. Dies führt zunächst zu einer 3D-Rekonstruktion eines Volumens in dem viele Einzelpartikel vorhanden sind. Ein Schnitt entlang der x - y -Ebene einer solchen Rekonstruktion von Einzelpartikeln ist in Abbildung (4.7 a)) dargestellt. Es handelt sich dabei um isolierte *Thermosomen*, deren Struktur in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie untersucht werden⁹. Der nächste Prozessierungsschritt ist die dreidimensionale Alignierung der Partikel (Walz 1997). Dabei werden alle Partikel iterativ aufeinander geschoben und rotiert. Dies setzt aber eine vorherige Detektion der Partikel voraus, die dann in Subvolumina (typ. Größe von 64x64x64 Voxel) aus der Rekonstruktion ausgeschnitten werden. Fast immer lassen die schlechten Kontrastverhältnisse aufgrund des geringen Defokus eine visuelle Detektion der Partikel (insbesondere in allen drei Raumrichtungen) nicht zu, siehe Abbildung (4.7 a)). Um trotzdem einen Anhaltspunkt über

⁹Die Daten wurden freundlicherweise von Irina Gutsche zur Verfügung gestellt.

die Position der *Thermosomen* zu erhalten, wurde nach der Datenaufzeichnung ein Bild (bei einem Kippwinkel von 0°) mit hohem Defokus (ca. $8 \mu\text{m}$) aufgenommen, siehe Abbildung (4.7 c)). Die aufgrund der CTF (siehe Abschnitt (1)) verbesserten Kontrastverhältnisse machen eine eindeutige Detektion der Partikel in x - y -Richtung möglich.

Die Anwendung der in den vorigen Abschnitten beschriebenen Algorithmen erweitern nun die zweidimensionale Detektion von Einzelpartikeln hin zu einer Detektion mit gleichzeitiger Voralignierung in drei Raumrichtungen. Dazu wurde als Modellvolumen ein hohles Zylinderobjekt erzeugt, siehe Abbildung (4.7 b)), welches die Maße eines *Thermosoms* (Durchmesser und Höhe ca. 16 nm) hat. Das Ergebnis des Suchalgorithmus aus Abschnitt (4.3.3) ist in Abbildung (4.7 b)) dargestellt. Die Höhe der Korrelation ist farblich kodiert wobei helle Grauwerte einen hohen Wert des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten repräsentieren. Deutlich zur erkennen sind die scharfen Maxima die mit einer einfachen Schwellwert-Operation isoliert werden können. Die Positionen dieser Maxima geben die dreidimensionalen Ortskoordinaten der Einzelpartikel, siehe Abbildung (4.7 d)), in dem ursprünglichen Volumen wieder. Zusätzlich werden als Ergebnis bei der Korrelation auch die Drehwinkel ausgegeben, die zu dem höchsten Korrelations-Koeffizienten führen. Damit liegen ideale Startparameter für weiterführende Prozessierungsschritte der 3D-Alignierung vor. Bemerkenswert ist auch, daß für eine Detektion nur ein zweifach in der Auflösung reduziertes Volumen (je $8 \times 8 \times 8$ Voxel wurden zusammengefaßt) notwendig ist. Dies führt zu einer Auswertestrategie für Mittelungen von Einzelpartikeln:

1. Berechnung einer tomographischen Rekonstruktion mit reduzierter Auflösung.
2. Detektion der Einzelpartikel mit Hilfe der dreidimensionalen, normalisierten Kreuz-Korrelation.
3. Berechnung vieler, begrenzter tomographischer Rekonstruktionen mit voller Auflösung an den Positionen aus Schritt 2.
4. 3D-Alignierung mit Startwerten für die Drehwinkel aus Schritt 2.

Dieses Prinzip wird im folgenden Kapitel (5) aufgegriffen und auf tomographische Rekonstruktionen ganzer Zellen angewendet.

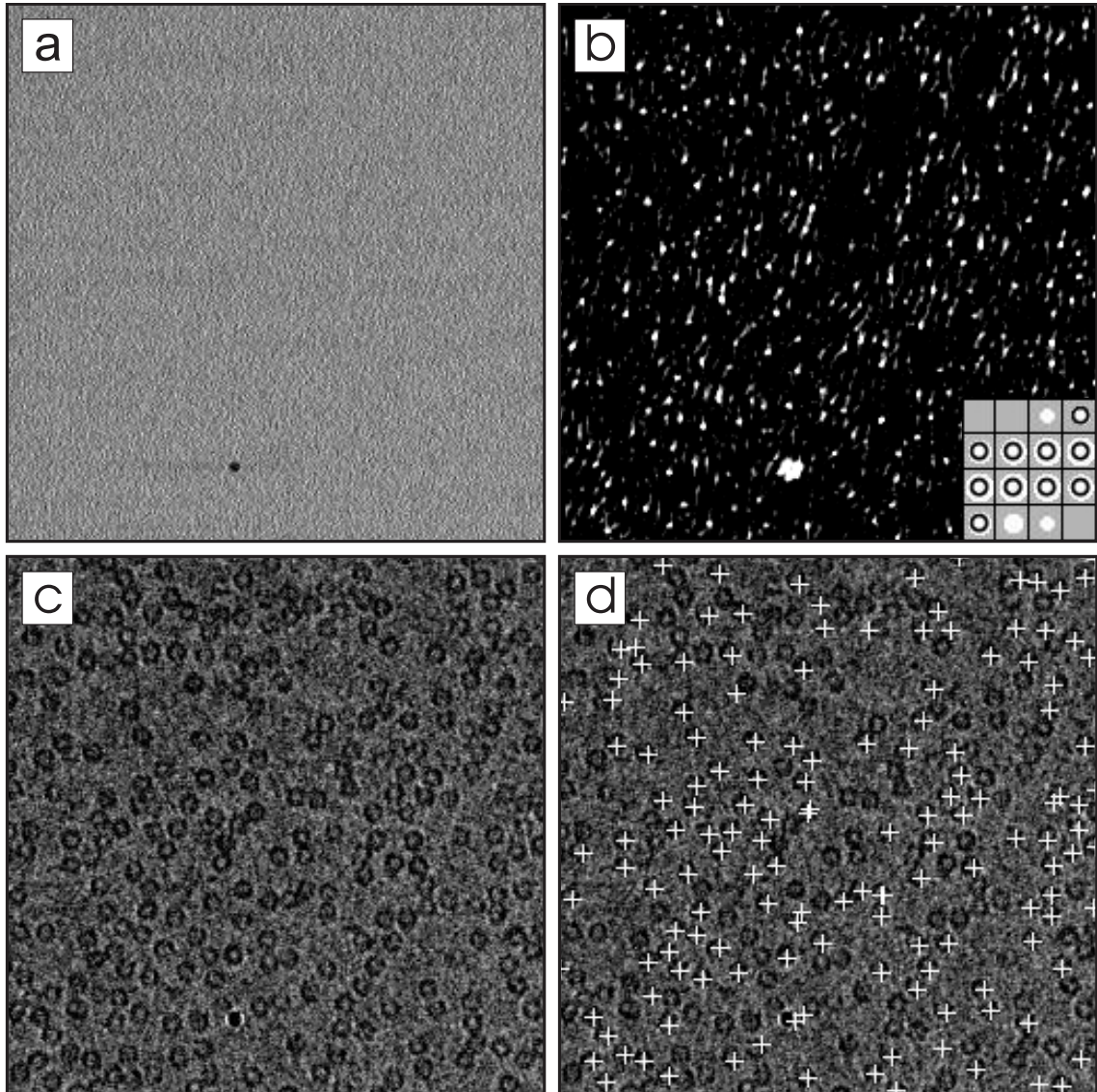


Abb. 4.7: Detektion von *Thermosomen* durch Kreuz-Korrelation. a) x - y -Schnitt der tomographische Rekonstruktion. Aufgrund des geringen Defokus ist kein Partikel zu erkennen. b) x - y -Schnitt des Volumens der aus a) berechneten Kreuz-Korrelations-Koeffizienten. Unten rechts ist die Schnittserie des Modellvolumens, ein hohler Zylinder, dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die hellen Maxima. c) Zweidimensionales Projektionsbild, das an der gleichen Objektstelle mit hohem Defokus ($8\ \mu\text{m}$) aufgenommen wurde. d) Vergleich der Maxima (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die höchsten hundert markiert) aus b) mit den visuell detektierten *Thermosomen* aus c). Neben der sehr guten Übereinstimmung liefert die Detektion auch die z -Koordinate der Partikel und eine Voralignierung der Drehwinkel. Mit dieser Detektions-Methode konnten 96 % aller Partikel gefunden werden.

4.4.2 Segmentierung der *Cannulae* einer *Pyrodictium abyssi*-Zelle

Eine weitere Anwendung der dreidimensionalen Kreuz-Korrelation ist die Segmentierung von Strukturen innerhalb von 3D-Volumina tomographischer Rekonstruktionen. Eine Segmentierung ist wichtig für die Interpretation und für die Visualisierung der Daten. Dabei versucht man eine einzelne Struktur in einem Volumen zu isolieren um sie getrennt von dem Rest des Volumens darstellen zu können. Anhand der bereits in Kapitel 2 vorgestellten Rekonstruktion einer *Pyrodictium abyssi* Zelle soll die Segmentierung einer Struktur, der *Cannulae*, gezeigt werden.

Ausgehend von der 3D-Rekonstruktion der *Pyrodictium abyssi* Zelle wie sie in Abbildung (4.8 a)) dargestellt ist¹⁰ wurde ein Subvolumen von 32x32x32 Voxeln gewählt das einen Ausschnitt der *Cannulae* enthält, siehe Quadrate in Abbildung (4.8 a)). Dieses Modellvolumen wurde zur Kreuz-Korrelation des gesamten Zellvolumens verwendet, wobei die Winkelabtastung in einem Bereich von je -90° bis $+90^\circ$ für ϕ , ψ und θ mit einem Inkrement von 5° gewählt wurde. Die Korrelations-Koeffizienten sind in Abbildung (4.8 b)) farblich kodiert dargestellt. Zu jeder Schicht des Zellvolumens gehört eine Schicht eines Volumens das die Höhe der Korrelations-Koeffizienten widerspiegelt; helle Grauwerte bedeuten dabei einen hohen Wert, dunkle einen kleinen Wert. Deutlich zu erkennen ist der helle Verlauf der Grauwerte im oberen Viertel der Bilder, der sich über mehrere Schichten hinweg von rechts nach links durch das Volumen zieht. Hier korreliert das Modellvolumen der *Cannulae* sehr gut, was sich bis in die Zelle hinein fortsetzt. Wie im vorigen Abschnitt (4.4.1) lassen sich mit einer einfachen Schwellwert-Operation die hohen Korrelationswerte isolieren. In einem weiteren Prozessierungsschritt, der in einer EM-Prozedur realisiert wurde, lässt sich aus den selektierten Korrelations-Koeffizienten ein 3D-Volumen generieren, welches als Maske dient und mit dem Zellvolumen multipliziert werden kann. Dabei werden die maskierten Bereiche ausgelöscht und nur die Bereiche erhalten, die eine hohe Ähnlichkeit mit den *Cannulae* haben. Das auf diese Weise segmentierte Volumen zeigt Abbildung (4.8 c)).

¹⁰gezeigt sind nur die wesentlichen Schichten des insgesamt 256x256x256 großen Volumens

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Korrelationsalgorithmen ist sowohl eine Detektion von Einzelpartikeln als auch eine effiziente Segmentierung komplexer Strukturen innerhalb tomographischer 3D-Rekonstruktionen möglich. Dabei eignen sich sowohl künstlich erzeugte Modelle als auch Teilbereiche, die aus der Rekonstruktion selbst stammen, zur Detektion bzw. zur Segmentierung.

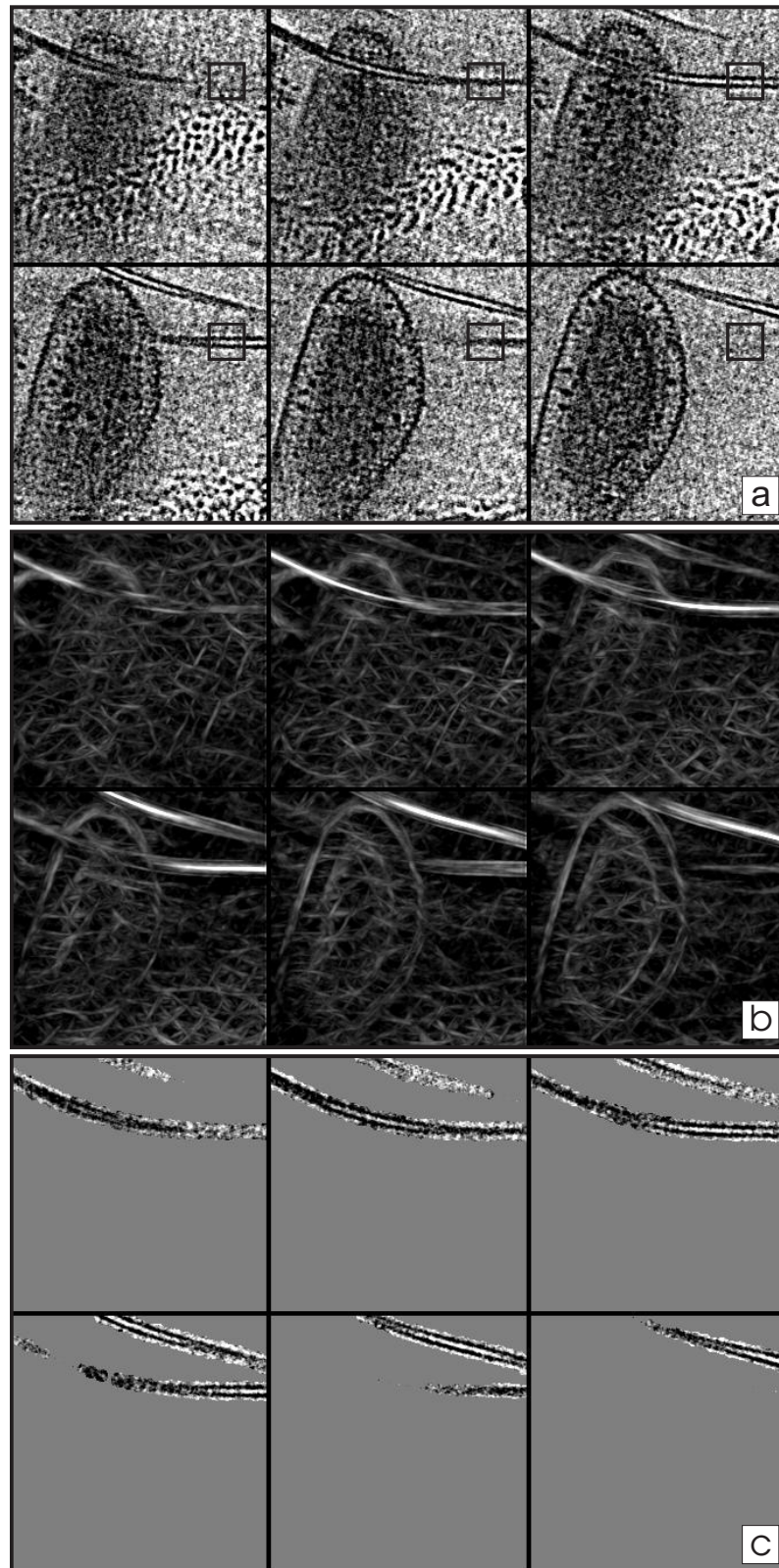


Abb. 4.8: Segmentierung von *Cannulae* einer *Pyrodictium abyssi* Zelle; a) x - y -Schnitte aus dem rekonstruierten Volumen einer *Pyrodictium abyssi* Zelle (Dicke 3,2 nm, Abstand 3,2 nm). Das Subvolumen innerhalb des Quadrats (32x32x32 Voxel) wurde zur Korrelation verwendet. b) x - y -Schnitte eines Volumens, das mit Korrelations-Koeffizienten besetzt ist. Die hellen Grauwerte im oberen Viertel der Bilder stellen eine gute Korrelation der *Cannulae*-Struktur dar. c) Segmentierte Schnitte aus a) basierend auf der Korrelation mit Schwellwert-Operation.

5. Anwendungen der Elektronentomographie

5.1 Rekonstruktion von *Pyrodictium-abyssei*-Zellen

Einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der tomographischen Rekonstruktion hat die Größe des untersuchten Objektes. So wirkt sich eine geringere Objektstärke auf ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis der einzelnen Aufnahmen einer Kippserie aus, siehe Abschnitt (2.1.4). Ausserdem ist für 'kleine' Proben eine höhere 3D-Auflösung der Rekonstruktion bei gegebener Dosis zu erreichen, siehe Gleichung (2.33). Somit eignen sich insbesondere einige Archäen aufgrund ihrer geringen Größe von wenigen 100 nm Durchmesser für die tomographische Abbildung. Die bereits in Abschnitt (3.3) untersuchten *Pyrodictium abyssii*-Zellen und ihr *Cannulae*-Netzwerk bieten dabei nicht nur interessante biologische Fragestellungen sondern stellen auch ein Modellsystem dar, mit dem die Leistungsfähigkeit der Elektronentomographie als Methode gezeigt werden kann.

5.1.1 Präparation und Tomographie

Die Züchtung der Archäen erfolgte analog zu Abschnitt (3.3). Bei dem Aufbringen der Probe auf das Trägernetzchen wurden verschiedene Techniken studiert. So wurden die Zellen direkt aus der Nährlösung auf das Netzchen gebracht. Dies geschah durch das Eintauchen einer Pinzette, an deren Spitze das Trägernetzchen befestigt war, in eine flache Schale mit Lösung. Dabei wurde versucht, die deutlich sichtbaren weißen Flocken aufzusammeln. Im Ergebnis führte dies zu einer hohen Zellkonzentration und zu hohen Schichtdicken der Probe ($> 1\mu\text{m}$), die teilweise nicht mehr für die Elektronenmikroskopie geeignet waren. Eine vorangehende Zentrifugation der

Probe (1000 μl , optische Dichte von ca. 0.4 bei 570 nm) mit einer Tisch-Zentrifuge (Beckmann) und ein Aufnehmen des resultierenden 'Pellets' in 50 μl Lösung, führte zu einer ausreichenden Zell-Konzentration auf dem Trägernetzchen nach der Kryopräparation. Die erzeugten Eisdicken bewegten sich in einem Bereich von 150-500 nm und damit in der Größenordnung von 0.4-2 mittleren freien Weglängen der Elektronen. Die Gesamtdosis der Kippserien lagen je nach Anzahl der Aufnahmen (50-120 Stück) zwischen 40-80 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$. Die verwendeten Vergrößerungen waren 38.000-fach und 42.000-fach, was zu einer Pixelgröße von 0.85 nm und 0.72 nm in der Objektebene führte. Der Defokus war so gewählt (3 μm bis 8 μm Unterfokus), daß die erste Nullstelle der CTF bei $(2.4 \text{ nm})^{-1}$ bis $(4 \text{ nm})^{-1}$ lag. Um den Effekt des 'missing wedge', siehe Abschnitt (2.3.4), möglichst gering zu halten wurden nur Kippserien aufgenommen die im Bereich von $\pm 60^\circ$ lagen oder zu noch höheren Kippwinkeln reichten. Oft wurde ein Hervorstehen der Zelle aus dem umgebenden Eis beobachtet, so daß eine Variation der Belichtungszeit mit $1/\cos(\alpha)$ ausreichend war um eine nahezu konstante Zählrate auf der CCD-Kamera zu erhalten.

5.1.2 Rekonstruktionen

Die dreidimensionale Rekonstruktion der einzelnen Kippserien erfolgte nach einer Alignierung mit Markierungspunkten, siehe Abschnitt (2.15) durch gefilterte Rückprojektion. Dabei wurde zunächst eine Übersichts-Rekonstruktion mit einem 4x4 Binning berechnet was zu einer typischen Volumengröße von 512x512x256 Voxeln führte. Interessante Bereiche des 3D-Volumens wurden danach visuell identifiziert und in voller Auflösung rekonstruiert. Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mit dem EM-Programm. Zur weiteren 3D-Visualisierung und Segmentierung kamen AVS (Advanced Visualisation Software) und VizDexter (Volume Interactions, Singapore) zum Einsatz.

Dreidimensionale Protein-Kristalle

Bei der Untersuchung von *Pyrodictium abyssi*-Zellen im TEM konnten vereinzelt Protein-Kristalle gefunden werden. Ähnliche, kristalline Strukturen innerhalb des Zytoplasmas wurden bereits in gefrier-substituierten Schnitten von Zellen gefunden (Rieger et al. 1995). Diese Untersuchungen waren jedoch auf zweidimensionale Analysen beschränkt, die unter anderem zur Bestimmung von zwei Gitterkonstanten eines Kristalls mit $(11.6 \text{ nm})^{-1}$ und $(7.8 \text{ nm})^{-1}$ führten. Ob hierbei auch tatsächlich die Einheitszellen erfaßt worden waren, bleibt unklar. Mit der Tomographie-Methode war es erstmals möglich, die Struktur dieser Kristalle in allen drei Raumrichtungen zu untersuchen. Insgesamt drei Zellen mit Kristallen wurden tomographisch erfaßt und rekonstruiert. Die visuelle Suche unter Nieder-Dosis-Bedingungen war dabei nur bedingt möglich, da die Kristalle teilweise ungünstig orientiert waren. Eine Lage der

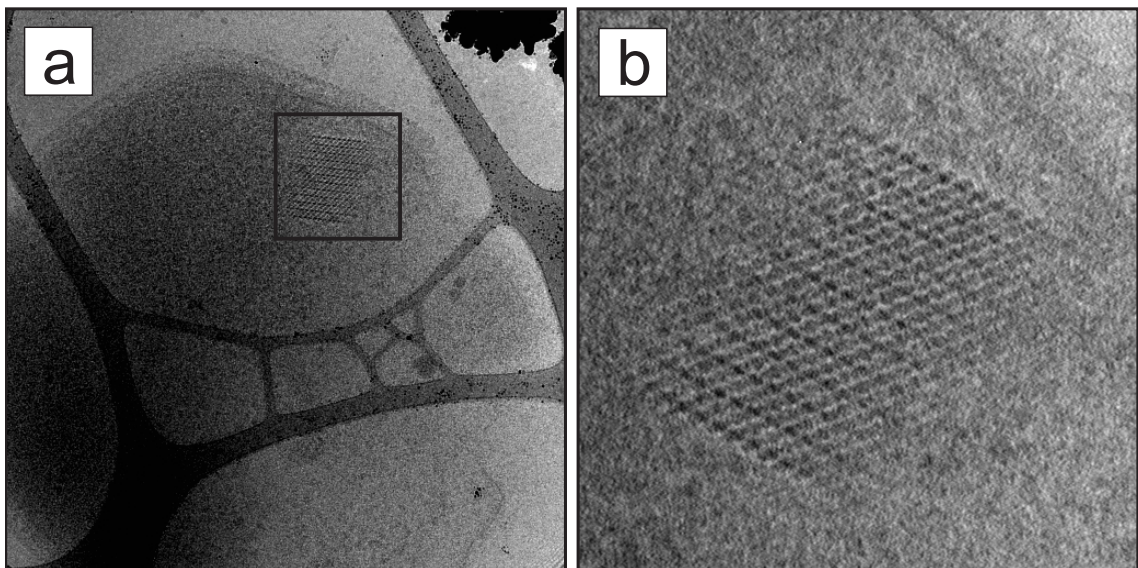


Abb. 5.1: Protein-Kristall im Zytoplasma einer *Pyrodictium abyssi*-Zelle. (a) Übersichtsaufnahme bei 42.000-facher Vergrößerung unter einem Kippwinkel von 0° . (b) Detail-Ausschnitt des 3D-Kristalls. Die Strahlachse steht senkrecht auf den Gitternetz-Linien. Somit ist die Projektion trotz der Ausdehnung in z-Richtung kontrastreich.

Gitternetz-Linien (bei einem Kippwinkel von 0°) senkrecht zur Strahlrichtung wie in Abbildung (5.1) erleichtert eine Identifikation, da sich die Kristall-Struktur kontrastreich abbildet.

Die 3D-Analyse der rekonstruierten Kristalle erfolgte in Zusammenarbeit mit Reiner Hegerl. Dabei wurde zunächst das 3D-Beugungsbild numerisch berechnet. Danach wurden durch Rotation die Gitternetzebenen des reziproken Gitters parallel zur z -Koordinate des Raumkoordinatensystems ausgerichtet. Daraufhin konnten die Einheitszellen identifiziert werden und eine Indizierung der Reflexe in allen drei Raumrichtungen erfolgen, siehe auch Abbildung (5.2 b)). Die Gitterkonstanten und Gittertypen waren bei allen drei Kristallen unterschiedlich, was in Tabelle (5.1) dokumentiert ist. Die gefundenen Kristallgitter waren kubisch, monoklin und triklin.

	Kristall 1	Kristall 2	Kristall 3
Gitterkonstanten [1/nm]	9.4 x 9.4 x 9.5	11.5 x 8.4 x 19.1	9.9 x 9.8 x 14.8
Kristallgitter	kubisch	triklin	monoklin
Auflösungsgrenze [1/nm]	4.5	5.0	3.5

Tab. 5.1: Charakterisierung der 3D-Kristalle von *Pyrodictium abyssi*-Zellen. Insgesamt konnten drei Kristalle innerhalb der Zellen tomographisch erfaßt werden. Das Kristallgitter ist für alle drei Kristalle unterschiedlich. Die Genauigkeit der Lokalisation der Beugungsmaxima beträgt ± 0.1 [1/nm].

Dreidimensionale Mittelung der Kristallstruktur

Zur genaueren Analyse der Kristall-Struktur wurde eine Mittelung durchgeführt. Dazu wurde analog zur 3D-Mittelung von Einzelpartikeln, siehe Abschnitt (4.4.1), ein zufällig ausgewählter Bereich ('Referenz') des Kristalls ausgeschnitten und mit dem Gesamtvolumen korreliert. Die Positionen der Korrelationsmaxima wurden in den Realraum des rekonstruierten Volumens übertragen; Bereiche mit großer Ähnlichkeit zur 'Referenz' konnten damit identifiziert werden. Summiert man diese Bereiche (bis zu 900 Einheitszellen) in einem gemeinsamen Volumen auf, so erhält man eine deutlich rauschärmeres Bild. Mit dieser neuen, gemittelten Struktur als 'Referenz' kann die Korrelation erneut berechnet werden. Dieses iterative Verfahren wiederholt man so lange, bis sich keine sichtbare Änderung der Struktur mehr erkennen lässt, siehe Abbildung (5.2).

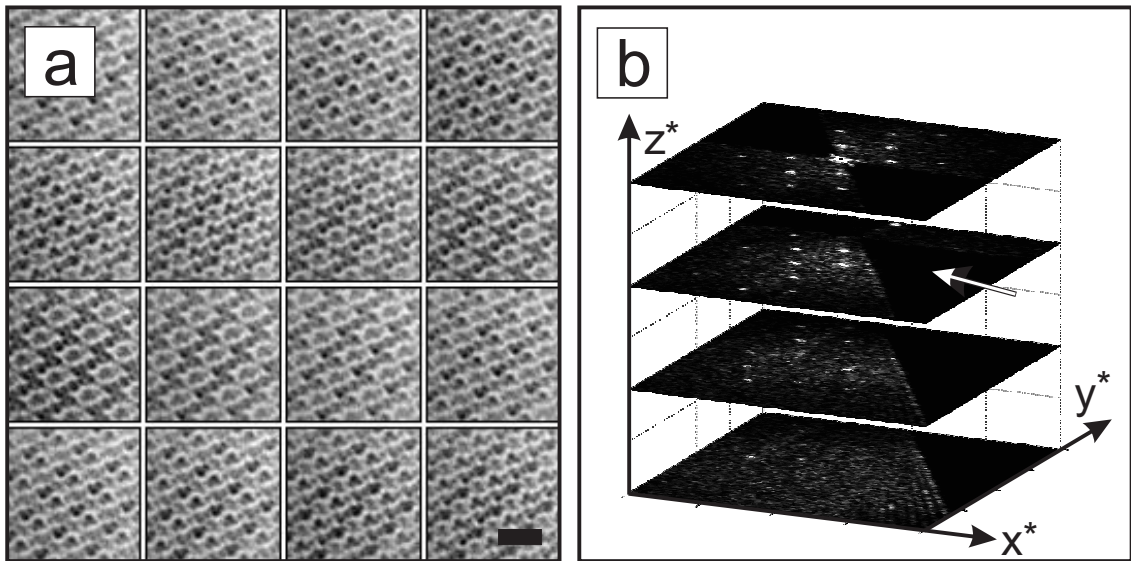


Abb. 5.2: Protein-Kristall einer *Pyrodictium abyssi*-Zelle. (a) Schnitte in x - y -Richtung des rekonstruierten 3D-Kristalls (Balken: 30 nm). (b) Dreidimensionales Beugungsspektrum eines weiteren Protein-Kristalls. Zu erkennen ist der 'missing wedge' (Pfeil), in dem keine Strukturinformation vorliegt. Die hellen Beugungsmaxima sind in z -Richtung bis zur 3. Ordnung sichtbar.

Diskussion

Bei der Analyse von dreidimensionalen Protein-Kristallen, die innerhalb von *Pyrodictium abyssi*-Zellen lokalisiert waren konnten insgesamt drei unterschiedliche Kristallstrukturen gefunden werden. Sowohl die Gitterkonstanten als auch das Kristallgitter deuten auf eine Kristallisation von verschiedenen Proteinkomplexen hin. Auffällig ist dabei, daß die Positionen der Kristalle innerhalb des Zytoplasmas stets am Rande der Zelle, in der Nähe des 'Surface'-Layers liegen. Möglicherweise werden diese Strukturen dicht gepackter Proteine zur Erneuerung des 'Surface'-Layers der Zellen benötigt.

Bemerkenswert ist die erreichte Auflösung von bis zu $(3.5 \text{ nm})^{-1}$ bei der Rekonstruktion der *Pyrodictium abyssi*-Zellen. Sie zeigt das enorme Potential der Elektronentomographie von eiseingebetteten Proben und erschließt ein weites Feld von Anwendungen für die Strukturuntersuchung von Zellorganellen, makromolekularen Komplexen und ganzen Zellen.

'Surface'-Layer

Nahezu alle Zellhüllen von Archäen bestehen aus einer regelmäßig geformten Oberflächen-Schicht dem sogenannten 'Surface'-Layer. Wenige Arten wie *Thermoplasma*, *Halococcus* oder *Methanobrevibacter* bilden hier die Ausnahme. Der 'Surface'-Layer wird meist aus einem einzigen makromolekularen Komplex gebildet (Baumeister und Lembcke 1992). Er ist über einen hydrophoben Membran-Anker mit der zytoplasmatischen Membran verbunden. Diese Gruppe von 'Surface'-Layeren wurde bereits ausführlich studiert und analysiert (Lechner und Sumper 1987) (Kessel et al. 1988) (Mengele und Sumper 1992). Die Ordnung der zweidimensionalen Kristallstrukturen unterschiedlicher Organismen variiert dabei stark. Einige 'Surface'-Layer zeigen eine fast perfekte, kristalline Struktur (Wildhaber et al. 1987) (Phipps et al. 1991), während z.B. die Oberfläche der pleomorphen *Sulfolobus* Spezies zahlreiche Defekte aufweist, was eine genaue Analyse mit Methoden der Bildverarbeitung gezeigt hat (Lembcke et al. 1991). Die bislang untersuchten 'Surface'-Layer der Archäen scheinen fast alle aus einer einzelnen Polypeptid-Spezies zu bestehen¹.

Die ungewöhnlichen chemischen Eigenschaften der 'Surface'-Layer haben ihren Ursprung in den extremen Umweltbedingungen, denen die Zellen ausgesetzt sind. So haben sich diese Strukturen an Temperaturen von 100°C und mehr, an hohe Druckverhältnisse und extreme pH-Bedingungen angepasst. Die strukturellen Voraussetzungen, die ein Überleben unter solchen extremen Bedingungen ermöglichen sind deswegen von großem theoretischen und experimentellen Interesse.

Diskussion

Eine Detail-Analyse der rekonstruierten *Pyrodictium abyssi*-Zellen gestattete erstmals die Visualisierung der dreidimensionalen Struktur der 'Surface'-Layer. Dabei konnte gezeigt werden, siehe Abbildung (5.3), daß der 'quasi'-periplasmatische Raum (Baumeister et al. 1988) hauptsächlich von sogenannten 'Spacer'-Elementen aufgespannt wird und eine, gleichmäßige, Ausdehnung von 35 nm hat. Die zytoplasmatische Membran ist wellig strukturiert, siehe Abbildung (5.4), und erscheint an den Positionen der 'Spacer'-Elemente um ca. 3-5 nm erhöht. Die Dicke der zyto-

¹Eine Ausnahme bildet z.B. *Pyrobaculum organotrophum* (Phipps et al. 1991) mit zwei getrennten Schichten, die aus unterschiedlichen Proteinen bestehen.

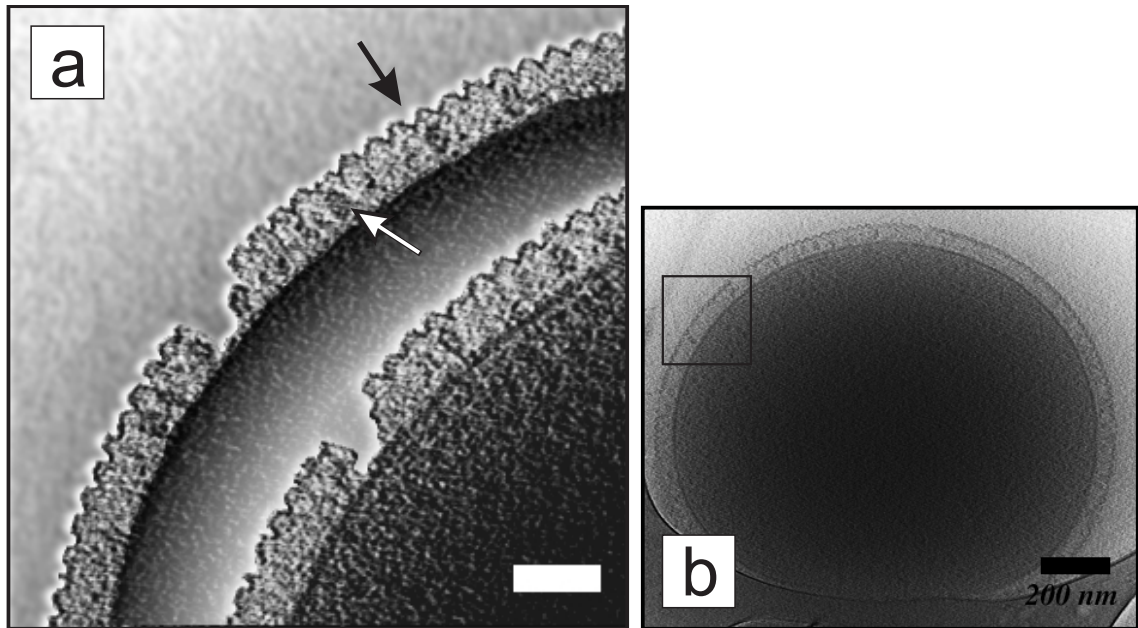


Abb. 5.3: Tomographische Rekonstruktion des 'Surface'-Layers einer *Pyrodicticum abyssi*-Zelle. (a) Zwei x - y -Schnitte einer Detail-Rekonstruktion unterschiedlicher z -Höhe (Balken: 50 nm). Erkennbar ist der quasi-periplasmatische Raum, der durch 'Spacer'-Elemente aufgespannt ist. Die regelmäßige Gitterstruktur hat eine Konstante von 22 nm (Pfeil). Bei den Proteinen (weißer Pfeil) zwischen zytoplasmatischer Membran und oberem Netzwerk könnte es sich um Proteasen handeln, die für den Stoffwechsel der Zelle notwendig sind. (b) x - y -Schnitt einer Übersichts-Rekonstruktion der ganzen Zelle (Dicke ca. 600 nm, Balken: 200 nm). Der 'Surface'-Layer umschließt die gesamte Zelle und hat eine regelmäßige Breite von 35 nm. Das Zytoplasma der Zelle ist dicht gepackt. Trotzdem konnte im Zytoplasma ein 3D-Kristall lokalisiert werden, siehe auch Abschnitt (5.1.2).

plasmatischen Membran beträgt dabei ebenfalls ca. 5 nm. Die 'Spacer'-Elemente sind sowohl in der zytoplasmatischen Membran als auch in dem darüberliegenden, äußeren Netzwerk verankert, welches eine sechsfache Symmetrie mit einer Gitterkonstanten von 22 nm aufweist. Jeweils in der Mitte befinden sich makromolekulare Komplexe mit einer Ausdehnung von ca. 15 x 10 x 10 nm die teilweise untereinander verbunden sind. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Protease, die eine katalytische Aktivität hat, ähnlich wie eine Protease, die im 'Surface'-Layer des Archae-Bakteriums *Staphylothermus marinus* gefunden und genauer charakterisiert wurde (Mayr et al. 1996). Die Positionen dieser Proteasen weisen auf eine Funktion bei der Erzeugung von Peptiden hin welche für den Energie-Metabolismus der Zelle notwendig sind. Deutlich in Abbildung (5.3) zu erkennen sind zwei 'Fehl'-Stellen

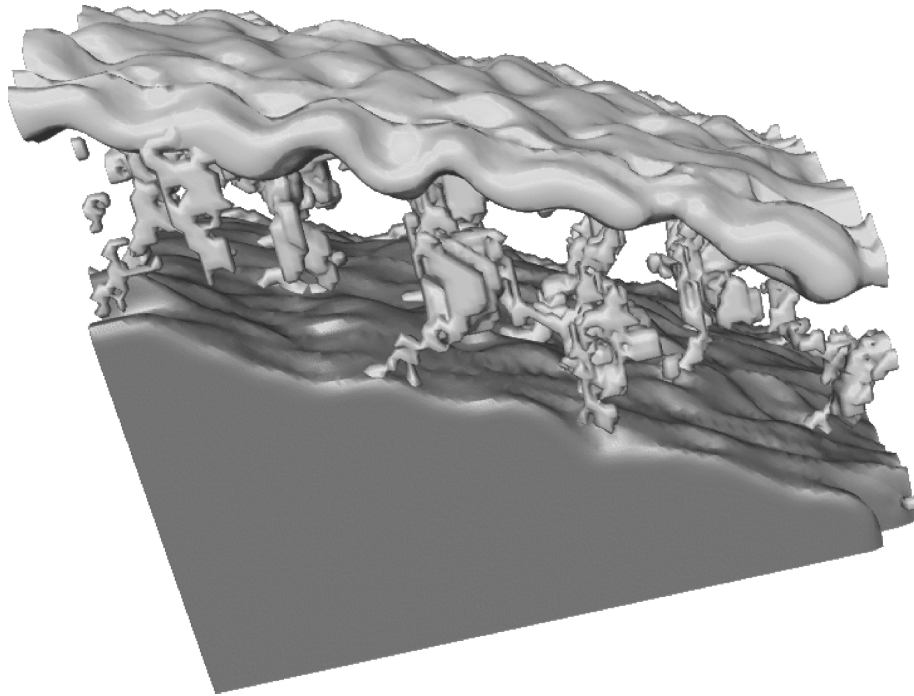


Abb. 5.4: Oberflächendarstellung des rekonstruierten 'Surface'-Layers. Das Zytoplasma und die zytoplasmatische Membran wurden dunkel eingefärbt. Zu erkennen ist die wellige Struktur der Membran mit einer Amplitude von ca. 3-5 nm. Das Netzwerk-Dach des 'Surface'-Layers (hell) hat eine regelmässige, kristalline Struktur in allen drei Raumrichtungen. In der Mitte der 'Spacer'-Elemente im 'quasi'-periplasmatischen Raum befinden sich Proteasen, die teilweise untereinander verbunden sind.

des 'Surface'-Layers, die die sonst regelmäßige Struktur unterbrechen. Möglicherweise kommt es zu solchen Defekten, wenn durch mechanische Spannungen Teile des *Cannulae*-Netzwerkes, siehe Abschnitt (3.3), herausgerissen werden. Ähnliche Defekte wurden häufig bei der Untersuchung von *Pyrodictium abyssi*-Zellen festgestellt. Die laterale Ausdehnung von 30-60 nm und die Tatsache, daß nie eine gleichzeitige Verletzung der zytoplasmatischen Membran beobachtet wurde, unterstreicht diese Hypothese.

5.2 Rekonstruktion von *Thermoplasma acidophilum*-Zellen

Thermoplasma acidophilum gehört ebenso wie *Pyrodictium abyssi* zu den Archäen, die ein eigenes, von den Bakterien verschiedenes Reich bilden. Archäen leben meist in extremen Lebensräumen, sie können an hohe Temperaturen und hohen Säure- oder Salzgehalt angepasst sein. *Thermoplasma acidophilum* wurde bereits Anfang der 70-er Jahre in selbsterhitzten Kohleabraumhalden entdeckt (Segeer und Stetter 1992). Ihre besonderen Merkmale sind das Fehlen einer Zellwand, eine Wachstumstemperatur von bis zu 63°C und die Fähigkeit, sich an ein extrem saures Milieu in einem pH-Bereich von 0,5 bis 4 anzupassen. Zudem zeichnen sie sich dadurch aus, daß einige ihrer zentralen zellulären Systeme - dazu gehören Komponenten der Proteinsynthese, der Proteinfaltung und des Proteinabbaus - denen hochentwickelter Organismen ähnlich sind. Mit ihren wesentlich einfacher aufgebauten molekularen Komplexen, die an der Faltung und dem Abbau von Proteinen beteiligt sind, sind sie deshalb ein geeignetes Modell für die Erforschung der komplexeren Systeme höher entwickelter Lebewesen. Einige dieser Proteine wurden bereits eingehend untersucht. Dazu zählt das *20S Proteasom* (Baumeister et al. 1998), die *Tricorn*-Protease und die zugehörigen Amino-Peptidasen (Tamura et al. 1996) sowie das *Tricorn*-Kapsid (Walz et al. 1997a), das *Thermosom* (Gutsche et al. 2000), und *VAT*, ein Homolog zu den eukaryotischen *CDC48/p97* Vesikel-Fusions-Proteinen (Golbik et al. 1999).

5.2.1 Präparation und Tomographie

Die Präparation der *Thermoplasma acidophilum*-Zellen erfolgte analog zu (Tamura et al. 1996). Beim Aufbringen der Zell-Lösung auf das Trägernetzchen wurden, wie in Abschnitt (5.1.1), zwei verschiedene Methoden angewendet. Das direkte Eintauchen des mit Kohle-Loch-Folie bespannten Kupfer-Netzchens in die bei 60°C gehaltene Zell-Lösung (optische Dichte ca 0.5 bei 570 nm) führte zur einer zu geringen Zell-Dichte auf dem Träger. Trotzdem konnten, reproduzierbar, Zell-Ketten (bis 15 µm Länge), siehe Abbildung (5.5), mit bis zu zehn Einzelzellen gefunden werden. Die durchschnittliche Größe der Zellen beträgt dabei etwa 1-1.5 µm mit einer Dicke von ca. 600-900 nm; aufgrund der Oberflächenspannung der Zell-Lösung wurden die

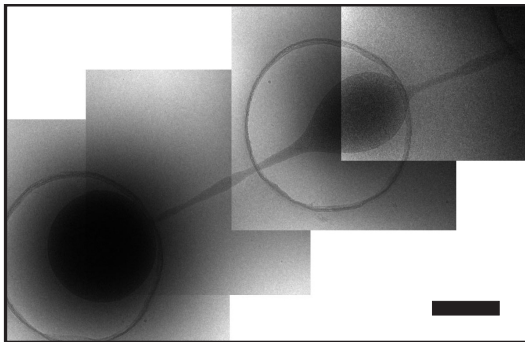


Abb. 5.5: Montage von vier TEM-Aufnahmen (Balken: 1 μm) von *Thermoplasma acidophilum*-Zellen. Die Kryo-Präparation der Zellen erfolgte durch ein Eintauchen des Trägernetzchens in die Zell-Lösung die bei ca. 60°C gehalten wurde. Danach wurde die Lösung kurz 'geblotet' und eingefroren. Die Zellen verbleiben bei dieser Präparations-Methode in ihrem nativen Netzwerk. Zell-Ketten mit bis zu zehn Einzelzellen wurden beobachtet.

Thermoplasma-Zellen abgeflacht eingefroren. Um die Zell-Dichte zu erhöhen und um damit auch eine höhere Anzahl kleinerer Zellen auf dem Trägernetzchen fixieren zu können, wurden die Zell-Lösung vor der Kryo-Fixation mit einer Tischzentrifuge aufkonzentriert. Bei dieser Präparationsmethode konnten keine Zell-Ketten mehr gefunden werden. Die Gestalt der Zellen war meist sphärisch, bzw. ellipsoidförmig und nur in Ausnahmefällen konnten flache Zellen lokalisiert werden.

Um eine möglichst hohe Auflösung in der 3D-Rekonstruktion zu erhalten wurde eine Vergrößerung von 42.000-fach, mit einer Pixelgröße von 0.72 nm und einem Unterfokus von 3-12 μm (erste Nullstelle der CTF bei $(2.5-5 \text{ nm})^{-1}$) zur Aufzeichnung der Kippserien gewählt. Dabei wurden 50-120 Einzelbilder mit unterschiedlichen Kippwinkeln in einem Bereich von $\pm 60^\circ$ oder höher aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde mit $1/\cos(\alpha)$ variiert²; die Gesamtdosis belief sich auf ca. 50-120 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$.

5.2.2 Rekonstruktionen

Die Rekonstruktion der Kippserien erfolgte nach einer Alignierung mit Markierungspunkten, siehe Abschnitt (2.15), mit Hilfe der gefilterten Rückprojektion. Nach einer Berechnung von Übersichts-Rekonstruktionen mit 4x4 Binning wurden Teilbereiche des 3D-Volumens visuell identifiziert und in voller Auflösung rekonstruiert. Dabei wurde festgestellt, daß aufgrund der hohen Protein-Dichte des Zytoplasmas und der großen z -Ausdehnung nur 'dünne' Zellen mit einer Dicke bis 400 nm zur Identifikation von Makromolekülen, wie sie im Kapitel (4) geschildert ist, herangezogen werden können. Bei ausgedehnteren Objekten war es aufgrund des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses innerhalb des Zytoplasmas unmöglich, molekulare Strukturen

²Typische Werte für die Belichtungszeit waren 0.2-0.5 s

zu erkennen.

Große, makromolekulare Komplexe

In allen 3D-Rekonstruktionen von elektronenoptisch 'dünnen' Zellen, mit einer Dicke von 200-400 nm, wurden sphärische Partikel gefunden, die einen Durchmesser von 40-55 nm hatten, siehe Abbildung 5.6 und 5.7.

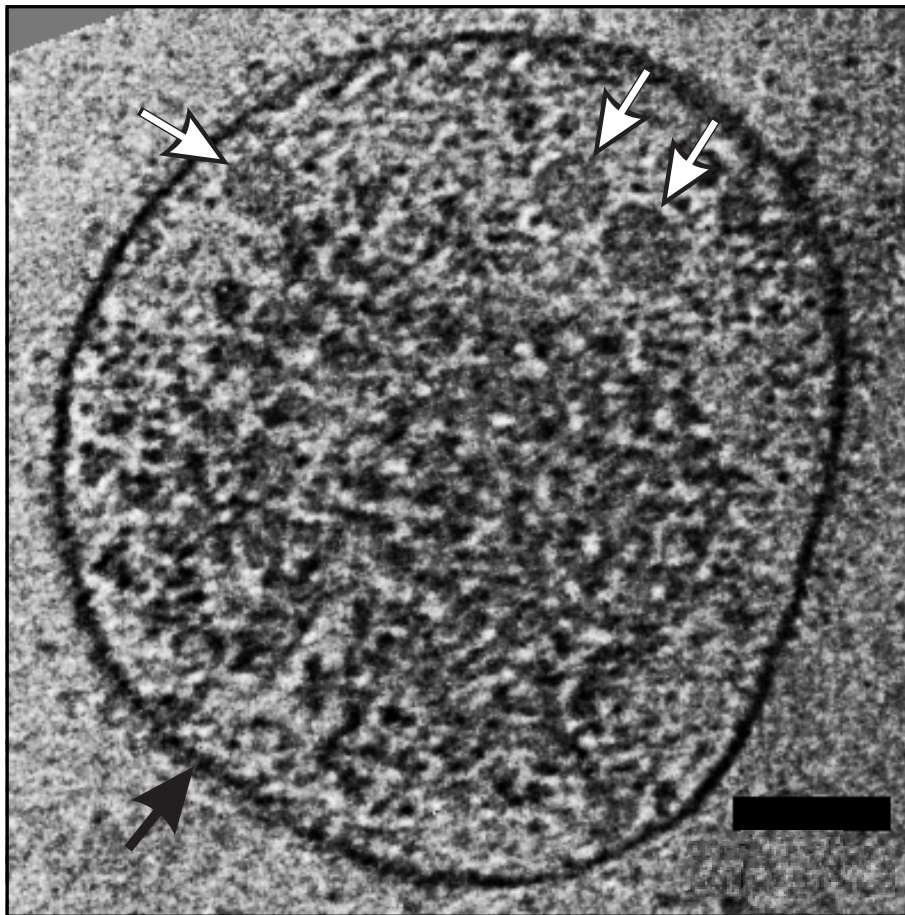


Abb. 5.6: x - y -Schnitt einer Rekonstruktion einer *Thermoplasma*-Zelle (Balken: 100 nm). Der Durchmesser beträgt etwa 500 nm. Zu erkennen ist das Zytoplasma in der Zelle dessen Dichte zur Zellmembran (Pfeil) hin abnimmt. Im oberen Teil sind drei große Makromoleküle (weiße Pfeile) sichtbar die einen Durchmesser von 45-55 nm haben.

Die Größe und die Form dieser makromolekularen Komplexe hat Ähnlichkeit mit dem *Tricorn*-Kapsid, einem großen Enzym-Komplex, der bereits mit elektronenmikroskopischen Methoden unter Kryo-Bedingungen in der Abteilung untersucht

worden ist (Walz et al. 1997a). Das Kapsid ist aufgebaut aus 20 Kopien der Tricorn-Protease (Tamura et al. 1996) und besitzt streng ikosaedrische Symmetrie. Die einzelnen Kopien der Tricorn-Protease wiederum sind Homohexamere des Tricornproteins. Die relative molekulare Masse des Hexamers beträgt 730 kDa, was zu 14.6 MDa für das Kapsid führt. Damit ist das *Tricorn*-Kapsid die grösste bekannte Protease. Die zitierten Arbeiten beschränkten sich auf eine Untersuchung der Struktur unter *in vitro* Bedingungen, sowie 2D- und 3D-Analysen von lysierten Zellen. In dieser Arbeit konnten erstmals ganze, eiseingebettete *Thermoplasma*-Zellen, nahe am nativen Zustand, mit hoher Auflösung (ca. 5 nm) tomographisch erfaßt werden. Die ungünstigen Kontrastverhältnisse, sowie die große Dosis-Empfindlichkeit des elektronenoptisch dichten Zytoplasmas limitierten allerdings stark die Qualität der Rekonstruktionen. Zudem konnte aufgrund der geringen Anzahl mit 3 bis 8 einzelnen, sphärischen Partikeln pro Zelle, die zudem leicht unterschiedliche Größe hatten, keine dreidimensionale Mittelung erfolgen. Diese Größenvariation ist möglicherweise auf eine Deformation der Moleküle zurückzuführen, wogegen allerdings die stabile ikosaedrische Struktur der *Tricorn*-Kapside spricht. Diese Symmetrie-Eigenschaft wurde bei der Auswertung der oben zitierten Arbeit ausgenutzt und führte zu einer Auflösung von 2,5 nm. Eine solche ikosaedrische Struktur konnte hier nicht nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, daß die gefundenen sphärischen Partikel gefüllt sind und eine ungleichmäßige Dichteverteilung besitzen (*Tricorn*-Kapside *in vitro* sind hohl). Möglicherweise sind diese grossen Komplexe mit anderen, kleineren Proteinen gefüllt. Eine klare Verifizierung, ob es sich bei den Partikeln tatsächlich um *Tricorn*-Kapside handelt, konnte jedoch nicht erfolgen.

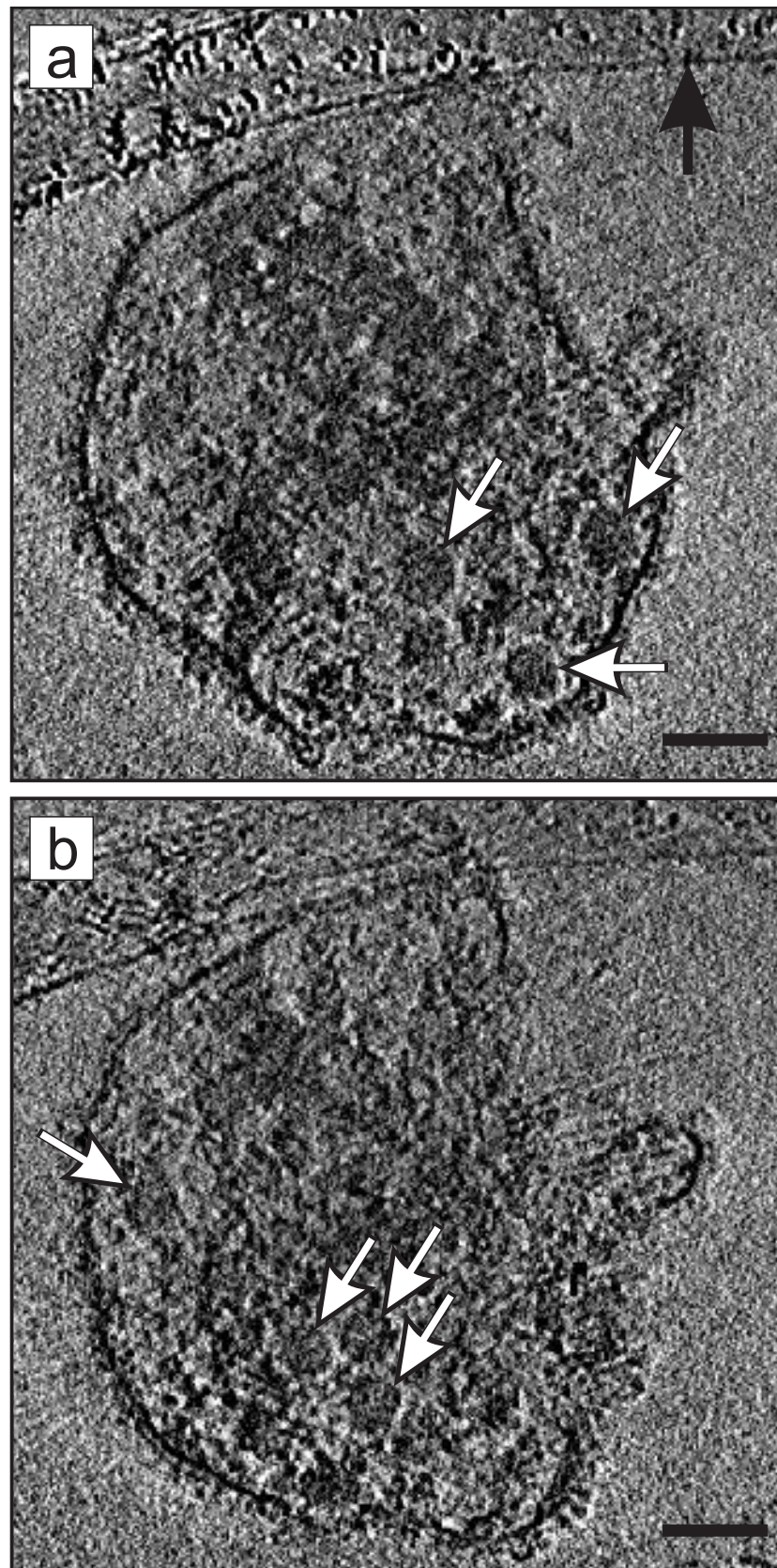


Abb. 5.7: Zwei x - y -Schnitte einer Rekonstruktion einer *Thermoplasma*-Zelle (z -Abstand 100 nm, Balken: 100 nm). Die weißen Pfeile deuten auf sieben sphärische Partikel die einen Durchmesser von 40-55 nm haben. Der schwarze Pfeil in (a) zeigt auf den Rand eines angrenzenden Kohle-Stegs der Loch-Folie

Identifikation von *Thermosomen*

Bei der Analyse der Rekonstruktionen von ganzen Zellen konnten vereinzelt bestimmte Partikel identifiziert werden, siehe Abbildung 5.2.2. Dies war jedoch ausschliesslich bei 'dünnen' Objekten (bis ca. 200 nm Dicke) möglich. Auf diese Rekonstruktionen konnten die in Abschnitt (4) entwickelte Suchstrategie zur Mustererkennung von bekannten Protein-Strukturen angewendet werden.

Anhand des in Abbildung 5.2.2 gezeigten Datensatzes soll das Vorgehen zur Identifikation von Makromolekülen veranschaulicht werden:

1. Zunächst wird das gesamte Zellvolumen mit einem Modellvolumen abgesucht. Das Modellvolumen ist in diesem Fall ein kurzer zylindrischer Körper mit einem Durchmesser von 16 nm, wie er bereits in Abschnitt 4.4.1 verwendet wurde. Das Absuchen wurde mit Hilfe des in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Algorithmus: 'Parallelisierung über Drehwinkel' durchgeführt.
2. Nach der Lokalisierung der Korrelations-Maxima wurden die dazugehörigen Subvolumina des Rekonstruktions-Volumens in einem 64x64x64 Bereich ausgeschnitten und abgespeichert.
3. Mit einer visuellen Selektion der gefundenen Bereiche werden störende Datensätze, wie z.B. Gold-Cluster, entfernt.
4. Durch die MRA-Methode (Multi Reference Alignment) (Walz et al. 1997b), siehe auch Kapitel 4.4.1, werden alle Subvolumina iterativ aufeinander geschoben und rotiert bis ein stabiles Ergebnis vorliegt. Dies ist der Fall wenn keine Änderungen zum vorherigen Iterations-Schritt mehr auftauchen.

Die Partikel-Suche führte zu insgesamt 300 Korrelationsmaxima. In Volumina mit je 64x64x64 Voxeln wurden um die gefundenen Positionen eine Detail-Rekonstruktion erstellt. Danach erfolgte die manuelle Auswahl, die in 115 zylindrische Partikel resultierte. Es zeigte sich, daß die örtliche Verteilung der ausgewählten Partikel in der Zelle stark inhomogen ist. Etwa 80 % der Partikel befinden sich konzentriert in einem Bereich, der nur wenige hundert nm Ausdehnung hat. Dies kann allerdings auch auf die unterschiedliche Dichte zurückzuführen sein, die eine schlechtere Detektion der Partikel in manchen Regionen der Zelle zur Folge hat. Die 115

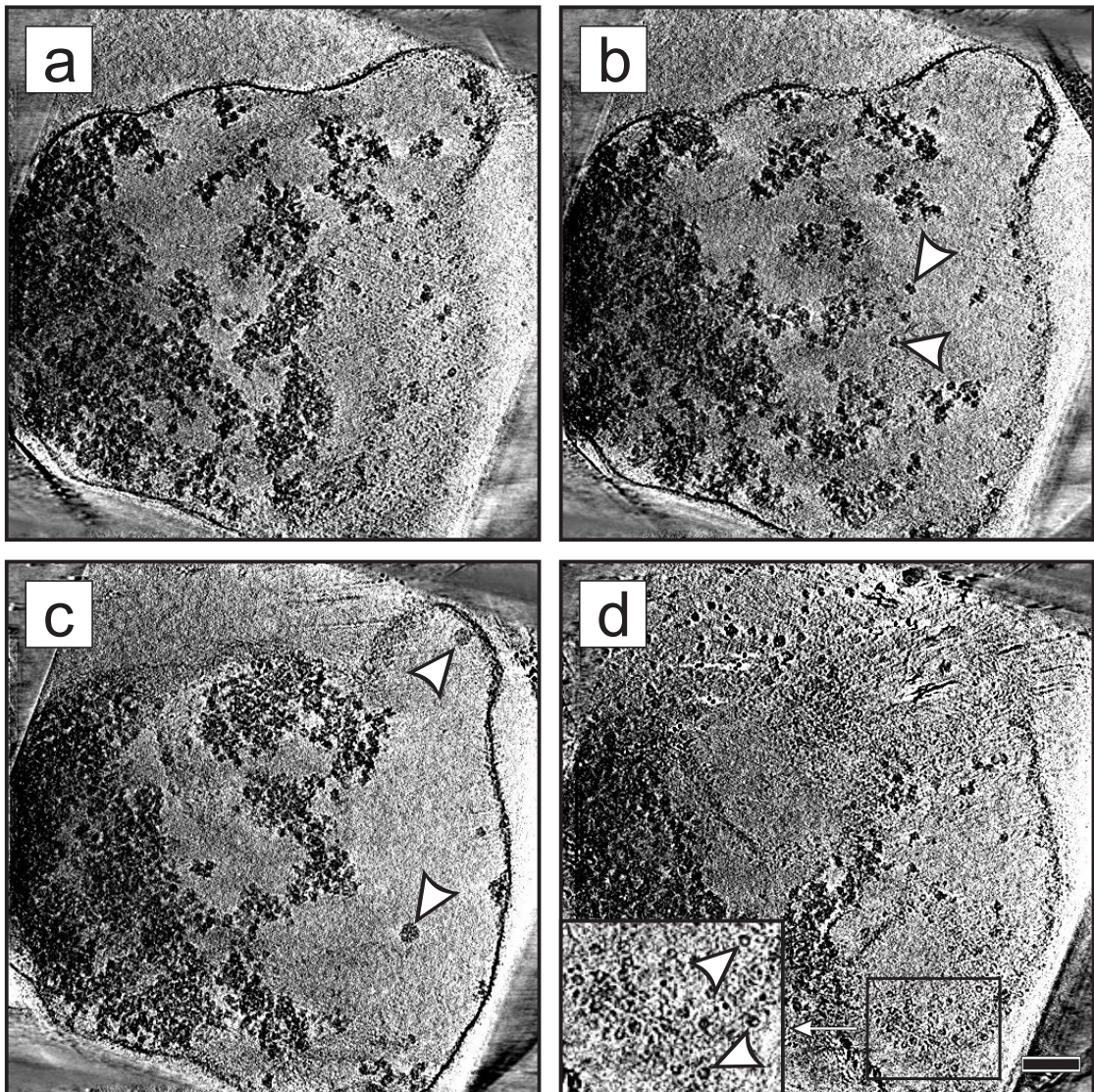


Abb. 5.8: x - y -Schnitte einer Rekonstruktion einer *Thermoplasma*-Zelle (z -Abstand 40 nm, Balken: 100 nm). (a) Die Dichteverteilung innerhalb der Zelle ist stark unterschiedlich; am linken Rand (Pfeil) ist die Konzentration von Partikeln im Zytoplasma hoch, nach rechts wird die Proteindichte deutlich niedriger. (b) Innerhalb des Zytoplasmas sind einzelne Moleküle sichtbar (Pfeile), bei denen es sich vermutlich um Ribosomen handelt. (c) größere, sphärische Makromoleküle (Pfeile) mit einer Ausdehnung von ca. 40 nm. (d) Der Detail-Ausschnitt zeigt ringförmige Partikel (Pfeile) mit einem Durchmesser von ca. 16 nm in unterschiedlicher Orientierung innerhalb der Zelle. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um *Thermosomen*.

Partikel wurden mit einer EM-Routine von Reiner Hegerl, die auf der MRA-Methode beruht, aufeinander aligniert. Nach 10 Zyklen des iterativ arbeitenden Algorithmus stabilisierte sich die Struktur. Das Ergebnis der Mittelung (die Partikel wurden dabei normiert) ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

Die Algnierung und Summation aller Partikel führt zu einer Struktur, deren Ausdehnung, mit 16 nm im Durchmesser, sehr genau mit der Größe des *Thermosoms*, siehe Abbildung 5.9 c), übereinstimmt. Der Innenraum des Partikels ist etwa um 25 % größer als bei der gezeigten *Thermosom*-Struktur, was möglicherweise auf eine deutliche Strahlschädigung hinweist. Es handelt sich offensichtlich um einen offenen Konformationszustand des Proteins, wie aus den Horizontal- und Vertikalschnitten in Abbildung 5.9 zu ersehen ist.

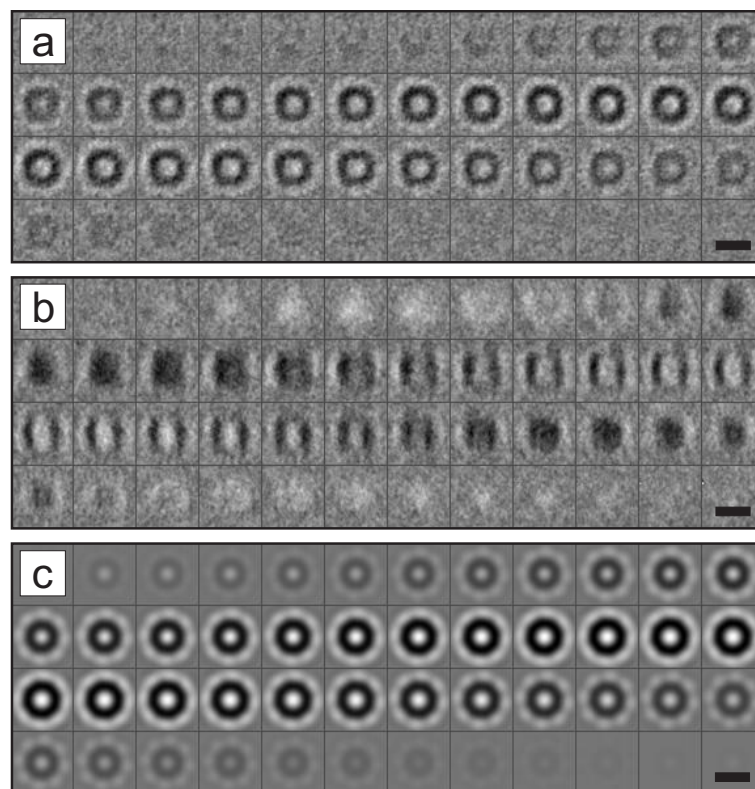


Abb. 5.9: Dreidimensionale Mittelung von 115 Partikeln. (a) x - y -Schnitte der gemittelten Struktur. Der Durchmesser der zylindrischen Struktur ist 16 nm. Schwach zu erkennen ist bereits eine 4-fache Symmetrie wie sie auch beim *Thermosom* auftritt. (b) Die x - z -Schnitte zeigen sie Struktur von der Seite; die vertikale Ausdehnung ist ebenfalls ca. 16 nm. Die Struktur ist geöffnet. (c) Zum Vergleich die x - y -Schnitte der Tiefpass-gefilterten (4 nm^{-1}) *Thermosom*-Struktur die aus kristallographischen Daten berechnet wurde.

6. Diskussion und Ausblick

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war es, die Auflösung tomographischer Rekonstruktionen soweit zu verbessern, daß eine Abbildung makromolekularer Komplexe innerhalb eiseingebetteter Zellen möglich wurde. Insgesamt drei Ansatzpunkte zur Verbesserung der Qualität von Tomogrammen wurden hierfür adressiert. Dazu zählt die Inbetriebnahme eines neuen experimentellen Aufbaus in Form eines Transmissions-Elektronenmikroskops (TEM), das mit einem Energiefilter ausgestattet wurde. Dieses Mikroskop mußte für die Aufzeichnung von Kippserien unter Nieder-Dosis-Bedingungen mit einer externen Computersteuerung versehen werden. Nach Anpassungen der bereits vorhandenen Tomographie-Software stand daraufhin ein TEM mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV, einer 2K x 2K CCD-Kamera und einem Energiefilter zur Verfügung, das für die tomographische Untersuchung von mehrere 100 nm dicken biologischen Proben geeignet war. Die Leistungsfähigkeit dieses Aufbaus konnte anhand von Protein-Kristallen gezeigt werden, die sich innerhalb prokaryotischer Zellen befanden. Mit einer erreichten Auflösung von 3,5 nm unter 'Kryo'-Bedingungen kommt die Elektronentomographie erstmalig in einen Bereich, in dem einzelne Makromoleküle im zellulären Kontext analysiert werden können. Anwendungen hierzu erfolgten auf die Struktur des 'Surface'-Layers von *Pyrodictium abyssi*-Zellen und auf große molekulare Strukturen innerhalb von *Thermoplasma acidophilum*-Zellen.

Ein intrinsisches Problem bei der winkelbegrenzten Ein-Achsen-Kippung ist das Auftreten von Artefakten bei der tomographischen Abbildung. Die erfaßten Objekte werden verfälscht rekonstruiert, was sich in einer Elongation und einem Verschmieren der Objektgrenzen widerspiegelt. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde ein neuartiger Kipphalter konstruiert und in der Abteilungs-Werkstatt in Zusammenarbeit mit der Firma Gatan gebaut. Dieser Probenhalter erlaubt eine Kippung in einem Winkelbereich von $\pm 70^\circ$ und eine Rotation der Probe um 100° unter 'Kryo'-Bedingungen (-180°C). Damit wurde erstmals die Aufnahme einer Doppel-Kippserie

möglich, die sich aus zwei einzelnen Kippserien mit einer dazwischenliegenden Rotation zusammensetzt. Diese neue Methode wurde bei der Abbildung einer prokaryotischen Zelle angewendet und führte zu deutlichen Verbesserungen im Vergleich zur standardmäßig durchgeführten Ein-Achsen-Kippung. Viele Strukturen die aufgrund ihrer Lage relativ zur Kippachse nicht, oder nur ungenügend rekonstruiert worden wären, konnten durch die Kombination zweier Kippserien sehr detailgetreu abgebildet werden. Somit konnte erstmalig der Verlauf einer *Cannula* innerhalb des 'Surface'-Layers einer *Pyrodictium abyssi*-Zelle visualisiert werden.

Das geringe Signal/Rausch-Verhältnis tomographischer Rekonstruktionen, welches begründet ist durch die Strahlempfindlichkeit biologischer Proben, erschwert die Analyse von molekularen Komplexen im dicht gepackten Zytoplasma oder macht sie gar unmöglich. Um trotzdem innerhalb einer Rekonstruktion einer Zelle einzelne Proteine finden zu können, wurden verschiedene Such-Algorithmen entwickelt. Mit Hilfe von Korrelations-Methoden werden dabei zu einem Modellvolumen ähnliche 3D-Verteilungen in Teilbereichen des rekonstruierten Volumens gesucht. Die Position und Orientierung der gesuchten Objekte sind durch insgesamt sechs Parameter (drei der Translation und drei der Rotation) bestimmt. Aufgrund der großen Datenmengen dreidimensionaler Volumina wurden parallelisierte Algorithmen implementiert, die auf verschiedenen Parallelrechnern zum Einsatz kamen und die erforderlichen Rechenzeiten reduzierten. Angewendet wurden die entwickelten Algorithmen auf rekonstruierte Zellen, und sie dienten auch zur Segmentierung von Strukturen. Trotz der verbesserten Auflösung und des Einsatzes geeigneter Such-Algorithmen konnte nur in Ausnahmefällen eine Analyse makromolekularer Komplexe innerhalb von Zellen erfolgen. Die begrenzte Auflösung aufgrund der Objektstärke, der geringe Kontrast und die fehlende Strukturinformation durch den eingeschränkten Winkelbereich sind bei der Rekonstruktion ganzer Zellen die limitierenden Größen.

Um die Qualität der tomographischen Rekonstruktionen weiter zu verbessern, ist es notwendig, deutlich mehr Bilder aus unterschiedlichen Projektionsrichtungen aufzunehmen. Die Anzahl der Projektionen ist begrenzt durch die Strahlempfindlichkeit

der biologischen Probe, die wiederum von der Temperatur abhängt, bei der die Messungen durchgeführt werden. Dies ist begründet durch die Bewegungen freier Radikale, die eine Strahlschädigung der Probe verursachen und die bei tiefen Temperaturen stärker eingeschränkt sind. Ein Elektronenmikroskop, das mit flüssigem Helium gekühlt wird und so auf Temperaturen an der Probe von ca. 10°K kommt, wird seit kurzem von der Firma FEI hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei ersten Studien Dosis-Messungen an einem Prototypen eines solchen 'Helium'-Mikroskops durchgeführt¹. Dazu wurden prokaryotische Zellen in amorphes Eis eingebettet und in einer Folge von einigen hundert Bildern aufgenommen, bis die kumulative Elektrodosis zu sichtbaren Veränderungen der Strukturen führten. Mehrere Versuchsreihen wurden bei Temperaturen von ca. -180°C (Kühlung mit flüssigem Stickstoff) und ca. -220°C (Kühlung mit flüssigem Helium) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Korrelationsmethoden, mit denen die Strahlschädigung zellulärer Strukturen in Abhängigkeit von der Proben temperatur gezeigt wurde, siehe Abbildung 6.1. Obwohl die Signifikanz der aufgezeichneten Daten gering ist lässt sich

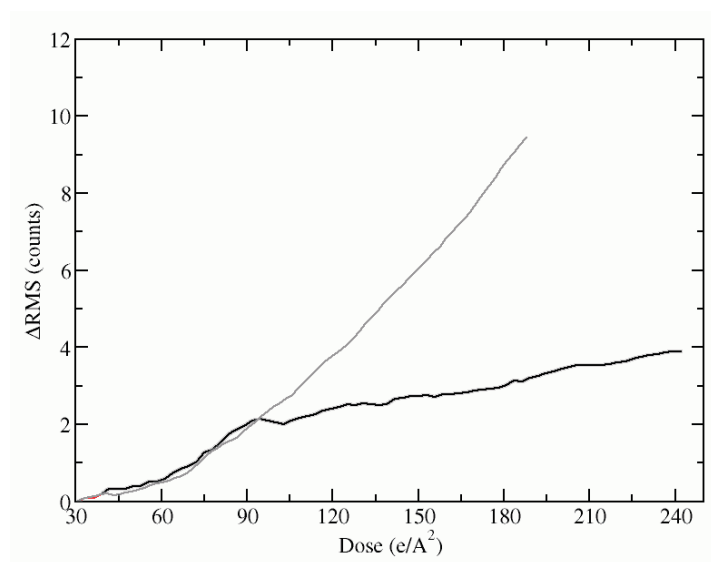


Abb. 6.1: Vergleich von Strahlschädigung biologischer Proben bei unterschiedlichen Temperaturen (grau: 'Stickstoff'-Kühlung; ca. -180°C und schwarz 'Helium'-Kühlung; ca. -220°C). Die Veränderungen bei einer Dosis-Serie von eiseingebetteten Zellen ist mit 'Helium'-Kühlung kleiner gegenüber der 'Stickstoff'-Kühlung der Probe.

¹Die Messungen wurden am Imperial College, London, zusammen mit Herrn Rishi Matadeen durchgeführt.

ein Trend bei diesen Versuchsreihen erkennen, der auf eine deutliche Reduzierung der Strahlschädigung bei biologischen Proben unter 'Helium'-Bedingungen hinweist. Ein weiterer Vorteil dieses 'Helium'-Mikroskopes ist die geringe Auswanderung bei der Kippung des Probenhalters, so daß weniger Aufnahmen zur Kompensation der Probenbewegung notwendig sein werden.

Eine höhere Auflösung der aufgezeichneten Bilder ist durch linsengekoppelte CCD-Kameras möglich, die in absehbarer Zeit auf dem Markt sein werden. Diese Kameras haben gegenüber den fasergekoppelten CCDs eine verbesserte Modulationstransferfunktion (MTF).

Eine Kombination aus einem 'Helium'-Mikroskop ausgestattet mit einer 300 kV FEG als Strahlquelle und einem Energiefilter mit einer linsengekoppelten CCD-Kamera bei 4096x4096 Pixeln und einer Doppel-Kipp-Vorrichtung der Probe sollte zu einer deutlichen Auflösungssteigerung und damit zu einer besseren Interpretierbarkeit von tomographischen 3D-Rekonstruktionen führen.

Mit einer neuen Methode der Probenpräparation, der Herstellung von 'Kryo'-Schnitten, ist es erstmals möglich, große eukaryotische Zellen zu untersuchen und tomographisch zu erfassen. Somit kann ein weiter Bereich von Anwendungen erschlossen werden, indem man mit einer Kombination der Techniken viele Größenordnungen, von ganzen Zellen mit mehreren μm -Größe bis hin zu einzelnen Makromolekülen mit einer Größe von wenigen nm, erfassen kann.

Physikalische Formeln und Konstanten

Die berechneten Werte in Klammern beziehen sich auf eine Beschleunigungsspannung des TEM von 300 kV.

Lichtgeschwindigkeit	$c = 2,9979 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$
Elementarladung	$e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Ruhemasse des Elektrons	$m_0 = 9,1091 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
Ruheenergie des Elektrons	$E_0 = m_0 c^2 = 511 \text{ keV}$
Plancksches Wirkungsquantum	$h = 6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ Nms} = 4,136 \cdot 10^{-15} \text{ eVs}$
Dielektrizitätskonstante	$\epsilon_0 = 8,8419 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{N}^{-1} \text{m}^{-2}$ $\epsilon_0 = 1,4165 \cdot 10^{-30} \text{ C}^2 \text{eV}^{-1} \text{m}^{-1}$
Bohrscher Radius	$a_H = \frac{h^2 \epsilon_0}{\pi m_0 e^2} = 0.0529 \text{ nm}$
Kernladungszahl	Z
Dichte	ρ (amorpher Kohlenstoff: 1 g cm^{-3}) (amorphes Eis: $0,97 \text{ g cm}^{-3}$)
Atomgewicht	A (Kohlenstoff: $12,011 \text{ g mol}^{-1}$) (Sauerstoff: $15,9994 \text{ g mol}^{-1}$)
Avogadro Konstante	$N_A = 6,602 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Wellenlänge des Elektrons	$\lambda = hc(EE_0 + E^2)^{-1/2}$ ($1.97 \cdot 10^{-12} \text{ nm}$)
Elektronenmikroskopischer Defokus	Δz

Literaturverzeichnis

- C. Ahn und O. Krivanek (1983). *EELS Atlas*. Technischer Bericht
- I. Angert, C. Burmester, C. Dinges, H. Rose und S. R.R. (1996). *Elastic and inelastic-scattering cross-sections of amorphous layers of carbon and vitrified ice*. *Ultramicroscopy*, 63:181–192.
- G. Bailey, J. Bentley und J. Small, Hrsg. (1992). *A data base for energy-loss cross sections and mean free paths*, Bd. 90. San Francisco Press, Boston.
- W. Baumeister (1982). *Towards higher resolution in biomolecular electron microscopy*. *Ultramicroscopy*, 9:151–155.
- W. Baumeister und G. Lembcke (1992). *Structural features of archaebacterial cell envelopes*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24:567–575.
- W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl und E. Seemüller (1998). *The Proteasome: Paradigm of self-compartmentalizing protease*. *Cell*, 92:367–380.
- W. Baumeister, I. Wildhaber und E. H. (1988). *Bacterial surface proteins: some structural, functional and evolutionary aspects*. *Biophys. Chem.*, 29:39–49.
- J. Böhm, A. 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*. *PNAS*, 97:14245–14250.
- W. Brünger und W. Menz (1965). *Wirkungsquerschnitt für elastische und inelastische Elektronenstreuung an amorphen Kohlenstoff- und Germaniumschichten*. *Zeitschrift für Physik*, 184:271–285.
- J. Carazo und J. Carrascosa (1992). *The fidelity of 3D reconstruction from incomplete data and the use of restoration methods*. *Electron Tomography*. Plenum Press, New York.

- A. Cormack (1963). *Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications*. J. Appl. Phys., 34:2722–2727.
- R. Crowther, D. DeRosier und K. A. (1970). *The reconstruction of a three-dimensional structure from its projections and its applications to electron microscopy*. In: *Proceedings of the Royal Society, London*, Bd. 317, S. 319–340.
- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. Koster und B. W. (1992). *Towards automatic electron tomography*. Ultramicroscopy, 40:71–87.
- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl und B. W. (1993). *Towards automatic electron tomography. II. Implementation of autofocus and low-dose procedures*. Ultramicroscopy, 49:109–120.
- C. Dinges, A. Berger und R. H. (1995). *Simulation of TEM images considering phonon and electronic excitations*. Ultramicroscopy, 60:49–70.
- R. Duerr, R. Hegerl, S. Volker, U. Santarius und B. W. (1991). *Three-dimensional reconstruction of the surface protein of Pyrodictium brockii: comparing two image processing strategies*. Journal of Structural Biology, 106:181–190.
- R. Egerton und R. Leapman (1984). *Quantitative electron energy-loss spectroscopy. Energy-filtering transmission electron microscopy*. Springer Verlag, Heidelberg.
- L. de la Fraga, J. Dopazo und J. Carazo (1995). *Confidence limits for resolution estimates in image averaging by random subsampling*. Ultramicroscopy, 60:385–391.
- A. Frangakis und J. Boehm (2000). *Persönliche Kommunikation*.
- M. Frigo und S. Johnson (1999). *FFTW User's Manual*. Technischer Bericht, Massachusetts Institute of Technology.
- R. Golbik, A. Lupas, K. Koretke, W. Baumeister und J. Peters (1999). *The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding*. Biol. Chem., 380(9):1049–1462.

- R. Gonzalez und R. Woods (1992). *Digital Image Processing*, Bd. third edition. Addison-Wesley, Massachusetts.
- R. Grimm (1998). *Anwendung von Energiefilterung bei der automatisierten Elektronentomographie von eiseingebetten biologischen Objekten*. Doktorarbeit, TU München.
- R. Grimm, D. Typke, M. Bärmann und B. W. (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.
- R. Guckenberger (1982). *Determination of a common origin in the micrographs of tilt series in three-dimensional electron microscopy*. *Ultramicroscopy*, 9:167–174.
- I. Gutsche, O. Mihalache und W. Baumeister (2000). *ATPase cycle of an archaeal chaperonin*. *Journal of Molecular Biology*, 300:187–196.
- K.-J. Hanszen und L. Trepte (1971). *The contrast transfer of the electron microscope with partial coherent illumination*. *Optik*, 33:166–198.
- R. Hegerl (1996). *The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy*. *Journal of Structural Biology*, 116:30–34.
- C. Horn, B. Paulmann, G. Kerlen, N. Junker und H. Huber (1999). *In vivo observation of cell division of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope*. *J. Bacteriol.*, 181:5114–5118.
- B. Jähne (1993). *Digitale Bildverarbeitung*. Springer-Verlag, 3. Aufl.
- M. Kessel, I. Wildhaber, S. Cohen und W. Baumeister (1988). *Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of Halobacterium volcanii from the dead sea*. *EMBO Journal*, 7:1549–1554.
- Y. Kihn, G. Zachni, J. Sevely und B. Jouffrey (1976). *Application du filtrage en energie des electrons a l'observation des objets epais en microscopie electronique*. *J. Micr. Spectr. Electr.*, 1:363.

- H. Koenig, P. Messner und K. Stetter (1988). *The fine structure of the fibres of Pyrodictium occultum*. FEMS Microbiol. Lett., 49:207–212.
- A. Koster und W. deRuijter (1992). *Practical autoalignment of transmission electron microscopes*. Ultramicroscopy, 40:89–107.
- O. Krivanek, A. Gubbens und N. Dellby (1991). *Developments in EELS instrumentation for spectroscopy and imaging*. Microscopy, Microanalysis and Microstructures, 2:315–332.
- O. Krivanek, M. Kundman und K. Kimoto (1995). *Spatial resolution in EFTEM elemental maps*. Journal of Microscopy, 180:277–287.
- O. Krivanek und P. Mooney (1993). *Applications of slow-scan CCD cameras in transmission electron microscopy*. Ultramicroscopy, 49:95–108.
- S. Kujawa und D. Krahl (1992). *Performance of a low-noise CCD camera adapted to a TEM*. Ultramicroscopy, 46:395–400.
- J. Langmore und M. Smith (1992). *Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice*. Ultramicroscopy, 46:349–373.
- J. LaVerne und A. Mozumder (1986). *Effect of phase on the stopping and range distribution of low-energy electrons in water*. Journal of Physical Chemistry, 90:3242–3247.
- J. Lechner und M. Sumper (1987). *The primary structure of a prokaryotic glycoprotein*. J. Biol. Chem., 262:9724–9729.
- G. Lembke, R. Dürr, R. Hegerl und B. W. (1991). *Image analysis and processing of an imperfect two-dimensional crystal: the surface layer of the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius re-investigated*. J. Microsc., 161:263–278.
- F. Lenz (1954). *Zur Streuung mittelschneller Elektronen in kleinste Winkel*. Zeitschrift für Naturforschung, 9:185–204.
- J. Lewis (1995). *Fast template matching*. Vision Interface, S. 120–123.

- D. Mastrorarde (1997). *Dual-Axis Tomography: An Approach with Alignment Methods that preserve resolution*. Journal of Structural Biology, 120:343–352.
- J. Mayr, A. Lupas, J. Kellermann, C. Eckerskorn, W. Baumeister und J. Peters (1996). *A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface layer of the Archaeon Staphylothermus marinus*. Current Biology, 6:739–749.
- R. Mengele und M. Sumper (1992). *Drastic differences in glycosylation of related S-layer glycoproteins from moderate and extreme halophiles*. J.Biol.Chem., 267:8182–8185.
- J. Nelder und R. Mead (1965). *The simplex method*. Computer Journal, 7:308–318.
- D. Nicastro, A. Frangakis, D. Typke und W. Baumeister (2000). *Cryo-electron tomography of Neurospora Mitochondria*. Journal of Structural Biology, 129:48–56.
- P. Penczek, M. Marko, K. Buttle und J. Frank (1995). *Double-tilt electron tomography*. Ultramicroscopy, 60:393–410.
- B. Phipps, A. Hoffmann, K. Stetter und W. Baumeister (1991). *A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria*. EMBO J., 10:1711–1722.
- U. Pley, J. Schipka, H. Gambacorta, A. and Jannasch, H. Fricke, R. Rachel und K. Stetter (1991). *Pyrodictium abyssi represents a novel heterotropic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C*. System. Appl. Microbiol., 14:245–253.
- W. Pratt (1978). *Digital Image Processing*. John Wiley, New York.
- W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. Vetterling und B. P. Flannery (1992). *Numerical Recipes in C*. Cambridge Books. Academic Press.
- R. Rachel, D. Pum, J. Smarda, D. Smajs, J. Komrska, V. Krzyzanek, G. Rieger und K. Stetter (1997). *Fine structure of S-layers*. FEMS Microbiol. Rev., 20:13–23.

- G. Radon (1917). *Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten*. Ber. Verh. K. Sächs. Ges. Wiss. Leipzig, Math.-Phys. Kl., 69:262–277.
- G. Rieger, R. Rachel, R. Hermann und K. Stetter (1995). *Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon Pyrodictium abyssi*. J. Struct. Biology, 115:78–87.
- H. Rose (1984). *Information transfer in transmission electron microscopy*. Ultramicroscopy, 15:173–192.
- W. Ruijter (1995). *Imaging properties and applications of slow-scan charge-coupled device cameras suitable for electron microscopy*. Micron, 26:247–251.
- O. Saxton und W. Baumeister (1982). *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. Journal of Microscopy, 127:127–138.
- P. Schiske (1968). *Zur Frage der Bildrekonstruktion durch Fokusreihen*. Fourth European Conference on Electron Microscopy, Rome, S. 145–146.
- A. Segerer und K. Stetter (1992). *The Prokaryotes*. Springer, New York.
- U. Skoglund und D. B. (1986). *Electron microscope tomography*. TIBS, 11:499–503.
- K. Stetter (1982). *Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105° C*. Nature, 300:258–260.
- S. Sun, S. Shi und R. Leapman (1993). *Water distribution of hydrated biological specimens by valence electron energy loss spectroscopy*. Ultramicroscopy, 50:127–139.
- T. Tamura, N. Tamura, Z. Cejka, R. Hegerl, F. Lottspeich und B. W. (1996). *Tricorn protease - the core of a modular proteolytic system*. Science, 274:1385–1389.
- K. Taylor, M. Reedy, L. Cordova und M. Reedy (1984). *Three-dimensional reconstruction of rigor insect flight muscle from tilted thin sections*. Nature, 310:285–291.
- P. Trebbia und C. Mori (1990). *EELS elemental mapping with unconventional methods*. Ultramicroscopy, 34:179–203.

- D. Typke, R. Hegerl und J. Kleinz (1992). *Image restoration for biological objects using external TEM control and alectronic image recording*. Ultramicroscopy, 46:157–173.
- R. Wade und J. Frank (1977). *Electron microscopic transfer functions for partially coherent axial illumination and chromatic defocus spread*. Optik, 49:81–92.
- J. Wall, M. Isaacson und J. Langmore (1974). *The collection of scattered electrons in dark field electron microscopy*. Optik, 38:359–374.
- J. Walz (1997). *Elektronentomographische Abbildung und dreidimensionale Mittelung von biologischen Makromolekülen*. Doktorarbeit, TU München.
- J. Walz, T. Tamura, N. Tamura, R. Grimm, W. Baumeister und A. Koster (1997a). *Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo*. Molecular Cell, 1:59–65.
- J. Walz, D. Typke, M. Nitsch, A. Koster, R. Hegerl und W. Baumeister (1997b). *Electron Tomography of Single Ice-embedded Macromolecules: Three-Dimensional Alignment and Classification*. Journal of Structural Biology, 120:387–395.
- I. Wildhaber, U. Santarius und W. Baumeister (1987). *Three-dimensional structure of the surface protein of Desulfurococcus mobilis*. Journal of Bacteriology, 169:5563–5568.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten

J. Böhm, A. 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. PNAS, 97: 14245-14250.

R. Rachel, S. Nickell, R. Hegerl, B. Armbruster und W. Baumeister (2001). *In Vorbereitung.*

S. Nickell, R. Gatz, R. Hegerl, B. Armbruster, R. Zolkowksi und W. Baumeister (2001). *In Vorbereitung.*

Weitere Veröffentlichungen

D. Pranghishvilli, I. Holz, E. Stieger, S. Nickell, J.K. Kristjansson und W. Zillig.
Sulfolobicins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus Sulfolobus. Journal of Bacteriology, 182:2985-2988.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1998 bis November 2001 in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern für das gute Arbeitsklima bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Baumeister danke ich für seine Unterstützung, seine gute Betreuung und sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Sackmann danke ich für die Möglichkeit, am Physik-Department der Technischen Universität München zu promovieren.

Ich danke Dieter Typke für Rat und Tat alle Probleme der Elektronenmikroskopie betreffend, sowie für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Bei Reiner Hegerl bedanke ich mich für die Unterstützung und Hilfe bei allen Fragen der Bildverarbeitung.

Ich möchte mich bei meinem Zimmernachbarn Günter Pfeifer für seine stete Hilfsbereitschaft und Tatkraft bedanken.

Meinen Mit-Doktoranden Jochen Böhm und Achilleas Frangakis danke ich für die gute Kameradschaft und viele interessante Diskussionen.

Herrn Rudi Gatz danke ich für die Mühe die er sich mit dem Zwei-Achsen-Kipphalter gemacht hat. Er hat entscheidend zum Erfolg dieses Projektes beigetragen. Herrn Matthes und Herrn Eberhard danke ich für Ihre hervorragende Feinmechaniker-Arbeit.

Ich danke Brigitte Kühlmorgen für die Unterstützung bei verschiedenen Techniken der Probenpräparation.

Danken möchte ich Friedrich Förster und Christine Kofler für die Hilfe bei der Auswertung der 'Helium'-Daten und wünsche ihnen noch viel Spaß bei der Elektrentomographie.

Reinhard Rachel danke ich für die Züchtung verschiedenster Archäen und für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke Jürgen Plitzko und Harald Engelhardt für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit.

Herrn G. Oostergetel möchte ich für die Unterstützung während der Programmierung des Elektronenmikroskops danken.

Bedanken möchte ich mich bei Barbara Armbruster und bei Ron Zolkowski sowie einigen anderen Mitarbeitern der Firma Gatan für die gute und unbürokratische Unterstützung beim Bau des Probenhalters und bei der Installation des Energiefilters.

Bei Uwe Lücken und Herrn Binder von der Firma FEI bedanke ich mich für die Hilfe bei der Behebung einiger Probleme mit den Elektronenmikroskopen.

Ich danke Steffi und Reinhard für so manche Aufmunterung.

Ich danke meiner Mutter und Helmut für alles, was sie während meines Studiums für mich getan haben.