

Dreidimensionale Einblicke in die Zellfabriken

Elektronentomographie biologischer Materialien

Jürgen M. Plitzko

Die Kombination der Transmissionselektronenmikroskopie mit tomographischen Aufnahmeverfahren ermöglicht es, die dreidimensionale Struktur komplexer biologischer Materialien im Nanometerbereich zu untersuchen. Die so gewonnenen neuen Einblicke in die molekularen Landschaften von Zellen zeigen, dass deren Inneres riesigen Fabriken gleicht, in denen ein geschäftiges Treiben herrscht.

Seit fast 70 Jahren wird die Transmissionselektronenmikroskopie, kurz TEM, als bildgebendes, hochauflösendes Verfahren eingesetzt, um die Struktur von Materialien in der Festkörperphysik, der Materialwissenschaft, der Chemie und in der Biologie aufzuklären. Anfangs standen viele Wissenschaftler der Elektronenmikroskopie, wie sie in den 1930er-Jahren von Ernst Ruska entwickelt wurde, sehr skeptisch gegenüber. Ruska resümierte 1987 in seinem Nobelvortrag: „Es ist letzten Endes doch fast ein Wunder, dass alle Schwierigkeiten bisher so weit gelöst werden konnten, dass die Elektronenmikroskopie für so viele naturwissenschaftlichen Disziplinen derart fruchtbar geworden ist.“^[1]

Die Elektronenmikroskopie ist im Vergleich zur Lichtmikroskopie immer noch eine sehr „junge“ Technik, in der aber gerade in den letzten zwei Jahrzehnten erstaunliche instrumentelle Fortschritte erzielt wurden. Dazu gehören zum Beispiel die Verwendung von Energiefiltern, Monochromatoren, Aberrationskorrektoren und des weiteren der fast vollständige Wechsel von herkömmlichen Negativen hin zu digitalen Kameras. Maßgeblich beschleunigt wurden diese Innovationen durch immer leistungsstärkere Computer, die die Kontrolle und Automatisierung dieser Instrumente erst ermöglichen.

Die Elektronenmikroskopie (EM) umfasst heutzutage verschiedenste Techniken für die unterschiedlichsten Zwecke: Zu der bekannten konventionellen und der hochauflösenden EM gesellen sich die für die Lebenswissenschaften wichtigsten Techniken der Kryo-EM bzw. der Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET). Ziel dieses Artikels ist es, das Prinzip der Kryo-EM und insbesondere der Kryo-Elektronentomogra-

phie zu erläutern und Anwendungen auf biologische Materialien darzustellen.

Biologische Strukturen wie Organellen oder Zellen sind für bestimmte Funktionen oder Aufgaben „konstruiert“. Ihre Gestalten und Formen sind so zahlreich und vielgestaltig wie die unterschiedlichen Gesichter der Menschen. Während nicht-kristalline bzw. ungeordnete Strukturen in der Festkörperphysik *amorph* genannt werden, bezeichnet man biologische zelluläre Strukturen als *pleomorph* („vielgestaltig“).

Lange Zeit stellte man sich die Zelle vor als ein von Membranen begrenztes Reaktionsvolumen, in dem sich frei diffundierende und gelegentlich aufeinander treffende Makromoleküle befinden. Dieses Bild gilt heute nicht mehr. Der Aufbau und der innere Raum einer Zelle entsprechen vielmehr einer riesigen Fabrik, in der fundamentale zelluläre Prozesse von einzelnen oder gemeinschaftlich von mehreren Makromolekülen oder Proteinkomplexen ausgeführt werden. Jenseits dieser Moleküle gibt es höchstwahrscheinlich, wie in jeder Fabrik, eine supramolekulare Organisation, eine Organisation in Form einzelner „molekularer Maschinen“ [1]. Auf dieser Ebene ist die Zelle für uns noch ein unbekanntes und unentdecktes Terrain. Keine der existierenden Abbildungsverfahren erlaubt es, *pleomorphe* Strukturen wie Organellen oder Zellen mit einer Auflösung von wenigen Nanometern zu untersuchen. Diese ist aber erforderlich, um *in situ* Makromoleküle zu

lokalisieren, zu identifizieren oder sogar ihre Interaktionen untereinander zu beschreiben. Offenbar haben wir bislang das Ausmaß unterschätzt, in dem sich individuelle Proteine zusammenschließen, um bestimmte funktionelle Komplexe zu bilden. Die Ursache für diese Fehleinschätzung liegt darin, dass die traditionellen biochemischen Methoden zur Isolation und Reinigung hauptsächlich die durchhaltefähigsten und häufigsten Proteine und Proteinkomplexe selektieren, während die weniger häufigen, vorübergehend assoziierten oder



Eine beeindruckende Detailfülle zeigt diese elektronentomographische Aufnahme einzelner Poren (lila) und der Membran (gelb) des Zellkerns einer Amöbe.

[1] Physikalische Blätter, Juli 1987, S. 271

KOMPAKT

- ▶ Die Elektronentomographie schließt die Lücke zwischen Lichtmikroskopie und atomarer Strukturanalyse und erlaubt es, biologische zelluläre Strukturen mit einer Auflösung im Nanometerbereich zu untersuchen.
- ▶ Für eine lebensnahe Untersuchung werden die Proben auf eine Temperatur von -190 °C „schockgefroren“.
- ▶ Fortschritte bei der Instrumentierung und den Auswertelgorithmen erlauben nicht-invasive Untersuchungen von einzelnen Zellen und deren Inneren.

Dr. Jürgen M. Plitzko, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung molekulare Strukturbiologie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried

schwach gebundenen Komplexe diesen Prozeduren nicht gewachsen sind und damit dem Nachweis entgegen. Daher sind Bestrebungen verständlich, möglichst nicht-invasive Methoden und Techniken zu entwickeln, die es erlauben, die supramolekulare Architektur im zellulären Kontext zu studieren. Dazu gehört die Kryoelektronentomographie.

Die Elektronentomographie ist zweifelsohne keine neue Abbildungstechnik. Bereits 1968 haben DeRosier und Klug die Prinzipien beschrieben, nach denen sich aus einem Datensatz aus einzelnen zweidimensionalen (2D) Projektionen eine dreidimensionale (3D)

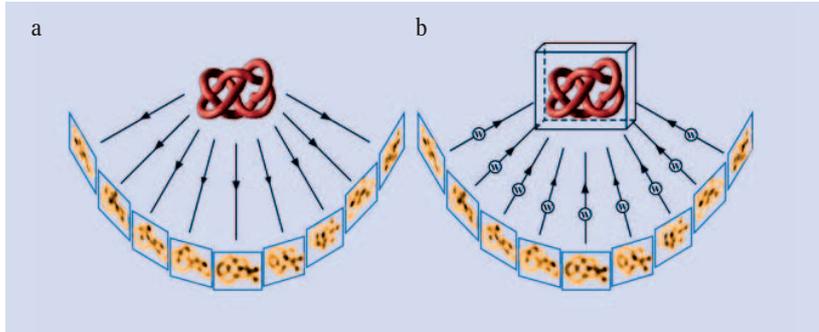


Abb. 1:

► a) Bei der Datennahme für ein Elektronentomogramm wird mit einer CCD-Kamera eine Serie von Bildern aufgezeichnet, während das Objekt, hier zur Veranschaulichung ein Seilknoten, senkrecht zum einfallenden Strahl gedreht wird. Aufgrund der begrenzten Genauigkeit der Kippvorrichtung muss die Probe bei jedem Kippwinkel computergesteuert „nachzentriert“ und „nachfokussiert“ werden.

► b) Für die 3D-Rekonstruktion wird von jeder Aufnahme (2D-Projektion) eine Rückprojektion erstellt. Die Summe aller projizierten Körper ergibt die Dichteverteilung des Ausgangsobjekts – das Tomogramm. Je mehr Bilder über einen maximalen Winkelbereich aufgezeichnet werden können, desto größer ist die resultierende Auflösung im Tomogramm.

Rekonstruktion erhalten lässt [2]. Ihr Studienobjekt waren die Schwanzfasern von T4-Bakteriophagen. Da sie bereits wussten, dass diese Fasern eine helikale Symmetrie aufweisen, genügte ihnen ein einziges Bild, um erstmals eine vollständige 3D-Rekonstruktion zu präsentieren. Im selben Jahr veröffentlichte Hart seine Vision der „polytropic Montage“, wie er seine 3D-Methode bezeichnete. Er untersuchte das stäbchenförmige Tabakmosaikvirus (TMV) und beschrieb seinen Gedankengang sehr präzise [3]: Ausgangsmaterial ist eine Struktur, von der Projektionen aus verschiedenen Richtungen gewonnen werden. Aus der Überlagerung der Rückprojektionen entsteht die Rekonstruktion ihrer dreidimensionalen Struktur. 1974 veröffentlichten Hoppe et al. die Rekonstruktion von negativ kontrastierten Fettsäuresynthetase-molekülen [4]. Während DeRosier und Klug den komplizierten Prozess der Datenaufzeichnung im Elektronenmikroskop geschickt umgingen, indem sie ein Objekt mit hinreichend hoher helikaler Symmetrie verwendeten, wählten Hart und etwas später Hoppe einen deutlich mühevolleren und schwierigeren Weg: die manuelle Drehung des Objekts senkrecht zum Strahl und die Aufzeichnung einzelner Projektionen aus unterschiedlichen Blickrichtungen. In den folgenden zwanzig Jahren wurde diese Methode, die heute Elektronentomographie (ET) genannt wird, nur gelegentlich verwendet – denn weder war die notwendige Technologie verfügbar noch waren die bestehenden Instrumente technisch ausgereift. Erst durch die Entwicklungen innerhalb des letzten Jahrzehnts gelang es, Harts Vision umzusetzen und das einzigartige Potenzial, welches die ET bietet – das Studium großer

Strukturen und vor allem *pleomorpher* Objekte wie intakter Zellen – in die Tat umzusetzen.

Prinzipien und Kernprobleme

Elektronenmikroskopische Abbildungen sind im Wesentlichen 2D-Projektionen des untersuchten Objekts in Richtung des einfallenden Strahls. In erster Näherung ist das EM-Bild ein Interferenzmuster aus Primärstrahl und den fokussierten gestreuten Strahlen, das die Verteilung des elektrostatischen Potentials der Probe darstellt. Einzelheiten aus unterschiedlichen Ebenen innerhalb des Objekts werden aufgrund der großen Fokustiefe des Elektronenmikroskops in einem Bild überlagert und lassen sich so in einer einzelnen 2D-Aufnahme nicht trennen. Tomographische Techniken, wie sie heutzutage in der Medizin, zum Beispiel in der Computertomographie verwendet werden, basieren auf dem Prinzip, möglichst viele 2D-Projektionen aus unterschiedlichen Richtungen aufzuzeichnen, um anschließend über computergestützte 3D-Rekonstruktionsverfahren das Volumen des untersuchten Objekts zu erhalten. Bei der Computertomographie ruht der Patient und das abbildende Instrument wird sukzessive und vollständig, d. h. um einen Winkel von 180° um ihn herumgedreht. Bei der Elektronentomographie bleiben im Gegensatz dazu das Elektronenmikroskop und die aufzeichnende Kamera in ihrer ursprünglichen Position, während die Probe in kleinen Winkelschritten durch den senkrecht dazu einfallenden Elektronenstrahl gedreht und für jeden Kippwinkel ein 2D-Bild aufgezeichnet wird. Eine Kippserie besteht aus typischerweise 100 bis 200 Projektionen aus unterschiedlichen Richtungen, die sich anschließend zu einem 3D-Bild rekonstruieren lassen (Abb. 1). Demzufolge beseitigt die ET so das „Durcheinander“, welches durch die Überlagerung struktureller Einzelheiten entsteht. Das rekonstruierte Objekt lässt sich aus beliebigen Richtungen betrachten, um die räumlichen Zusammenhänge einzelner struktureller Details sichtbar zu machen.

So einfach dieses Verfahren im Prinzip erscheinen mag, die Aufzeichnung einer tomographischen Kippserie (insbesondere von biologischen Materialien) mit Hilfe des Elektronenmikroskops ist auch heute noch eine technische Herausforderung. Dies liegt an den im Folgenden diskutierten fünf technischen Hürden, die gemeistert werden müssen: 1. Probenpräparation, 2. Strahlendosis, 3. Kippgeometrie, 4. Instrument und dessen Ausstattung und 5. Alignierung, Rekonstruktion und Visualisierung.

Kryo-Probenpräparation

Biologische Objekte wie Zellen sind hauptsächlich aus Kohlenstoffverbindungen aufgebaut und bestehen zu fast 70 % aus Wasser. Die „Umweltbedingungen“ innerhalb eines Elektronenmikroskops sind durch Ultra-Hochvakuum und einen konstanten „Beschuss“ von Elektronen mit Geschwindigkeiten von zum Teil mehr als 200000 km/s charakterisiert. Um biologische Objekte in dieser unwirtlichen Umgebung lebensnah untersuchen zu können, müssen diese zunächst „konserviert“ werden. Die üblichen Präparationstechniken, wie das Entwässern und Einbetten in Akryl- bzw. Epoxyharze sowie Kontrastierungsverfahren mit Schwermetallsalzen (Negativkontrastierung), sind für Untersuchungen *in vivo* ungeeignet. Obwohl diese Techniken die Strukturen verändern und zu Artefakten führen, beruht das allgemeine Bild einer Zelle mit ihren inneren Struktu-

ren, welches wir aus Schul- und Lehrbüchern kennen, größtenteils auf elektronenmikroskopischen Analysen mit Hilfe dieser Präparationsverfahren.

Eine Alternative zu diesen Verfahren ist die 1984 von Adrian et al. präsentierte Kryo-Präparationstechnik, das schockartige Einfrieren biologischer Substanzen in ihrer natürlichen Umgebung [5]. Dieser Meilenstein der biologischen Elektronenmikroskopie ermöglichte es zum ersten Mal, lebensnahe Untersuchungen quasi *in vivo* durchzuführen. Dazu wird die Probenlösung zunächst auf einen Objektträger aufgebracht, der aus einem feinen Kupfernetz besteht. Ein nur 4 – 20 nm dünner Kohlenstoff-Film verhindert, dass die Probe durch die Maschen des Netzes hindurch fällt. Das schockartige Einfrieren geschieht mithilfe einer Guillotine-artigen Vorrichtung, die den Objektträger innerhalb von Millisekunden auf eine Temperatur von 90 K (–190°C) abkühlt. Um einen direkten Phasenübergang von der flüssigen zu einer amorphen (vitrifizierten) Phase zu erreichen, wird als Kühlflüssigkeit typischerweise flüssiges Ethan verwendet, da es eine hohe Kühlrate besitzt. Das so vitrifizierte Präparat wird anschließend in den Probenhalter transferiert und durch ständiges, kontrolliertes Kühlen mit flüssigem Stickstoff auf einer Temperatur von ca. –190 °C gehalten. Die native Struktur des Cytoplasmas und die Anordnung der Makromoleküle bleiben für vitrifizierte Proben bestehen, d. h. der physiologische Zustand zum Zeitpunkt des Einfrierens bleibt erhalten. Die anschließende Untersuchung im Elektronenmikroskop bei tiefen Temperaturen wird als Kryo-Elektronenmikroskopie bezeichnet.

Strahlendosis

Wenn die Elektronen des Mikroskops inelastisch an dem Coulomb-Potential der Atomkerne gestreut werden, übertragen sie Energie auf die Probe und ionisieren möglicherweise die betroffenen Probenatome. Dies kann primär zur Erwärmung der Probe im bestrahlten Bereich, zur strahlenchemischen Abspaltung von Wasser (Radiolyse) sowie zu chemischen Sekundärreaktionen führen, die die Probe verändern (Bindungsbrüche, Bildung neuer Moleküle oder die Erzeugung von Radikalen). Im Gegensatz zu anorganischen Materialien, die sehr strahlenresistent sind, ist die Strahlenschädigung bei biologischen Substanzen von erheblicher Bedeutung (Abb. 2).

Diese Schädigung hängt von der Anzahl der Elektronen ab, welche das Objekt durchdringen. Daher ist die Strahlstromdichte j in Abhängigkeit von der Belichtungszeit (in $e^-/\text{Å}^2$ bzw. C/cm^2 ; e^- = Elektronen) ein geeignetes Maß für die Elektronendosis. Im Unterschied dazu wird in der Radiochemie die Dosis als pro Masseneinheit übertragene Energie definiert ($\text{Gy} = \text{J}/\text{kg}$). So würde im Vergleich eine mit $50 e^-/\text{Å}^2$ bestrahlte Kohlenstoffprobe bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV einer Dosis von $1,6 \times 10^8 \text{ Gy}$ ausgesetzt sein, einem Wert, der sonst nur in der Nähe des Zentrums einer Kernreaktion vorkommt.

Da das Ausmaß des Schadens proportional zur eingestrahlten Dosis wächst, sind der hochauflösenden Elektronenmikroskopie Grenzen gesetzt, die sich durch verschiedene Maßnahmen jedoch verschieben lassen. Beispielsweise ist die Ionisationswahrscheinlichkeit in erster Näherung umgekehrt proportional zur verwendeten Beschleunigungsspannung. Bei extrem hohen Spannungen von 1 MV ist die Strahlenschädigung zwar geringer als bei 100 kV, jedoch sind die entsprechenden

Instrumente riesig, teuer und folglich nicht sehr verbreitet. Ein guter Kompromiss zwischen sowohl Strahlenschädigung und Signaleffizienz als auch hinsichtlich der technischen Möglichkeiten sind Mikroskope mit 300 kV Beschleunigungsspannung.

Strahlenschäden lassen sich auch durch Abkühlen der Probe verringern. So verlängert sich die „Standzeit“ der Probe durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff auf 90 K um einen Faktor 9, den so genannten Kryo-protektionsfaktor C_p [6]. Durch weiteres Abkühlen mit flüssigem Helium (ca. 4 K) steigt er in bestimmten Fällen noch weiter an [7, 8].

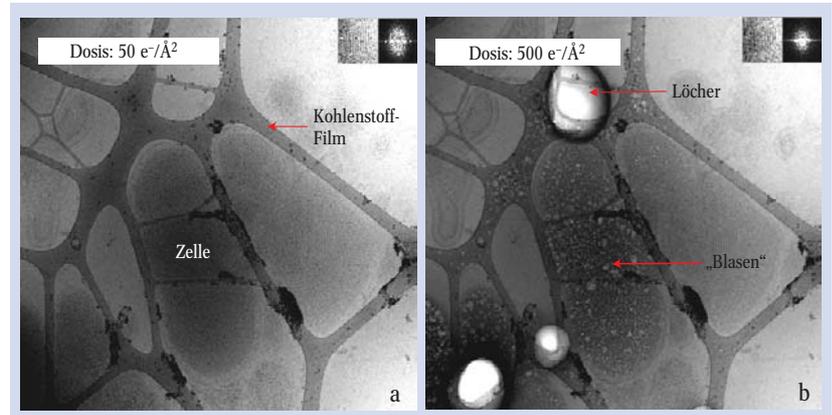


Abb. 2: Biologische Substanzen sind besonders empfindlich für Strahlenschädigung durch Elektronenstrahlen, wie hier anhand einer in Eis eingebetteten Probe für verschiedene Strahlendosen demonstriert: $50 e^-/\text{Å}^2$ (a) bzw. $500 e^-/\text{Å}^2$ (b), jeweils bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV.

Schließlich lässt sich die Strahlenbelastung auch durch eigens dafür entwickelte Aufnahmeverfahren reduzieren. Bei diesen Niedrig-Dosis-Verfahren (*low dose*) trifft der Elektronenstrahl nur während der Belichtung der einzelnen Projektionen auf die Probe und wird ansonsten, z. B. während dem Kippen der Probe, ausgeblendet. Erst die Einführung einer stabilen (reproduzierbaren) Elektronenoptik, computerunterstützter Elektronenmikroskope und digitaler Kameras ermöglicht eine solche probenschonende Vorgehensweise.

Bei der Aufnahme einer tomographischen Bilderreihe ist entscheidend, dass die Gesamtdosis stets unterhalb einer probenspezifischen Grenze bleibt. Nach dem Theorem über die Möglichkeit der Dosis-Fraktionierung von Hegerl und Hoppe reicht die integrale Dosis einer konventionellen zweidimensionalen Aufnahme auch für eine dreidimensionale Rekonstruktion aus, falls die Auflösung und die statistische Signifikanz der Aufnahmen identisch sind [9]. Prinzipiell ist es damit möglich, die Gesamtdosis auf beliebig viele statistisch verrauschte 2D-Projektionen zu verteilen. So entspricht eine Gesamtdosis von $50 e^-/\text{Å}^2$, auf 100 Projektionen verteilt, einer Dosis von $0,5 e^-/\text{Å}^2$ pro Einzelbild. Entsprechend sind die Aufnahmen bei dieser niedrigen Dosis sehr stark „verrauscht“ und die Bildqualität hängt wesentlich von der Qualität des verwendeten Detektors ab. In den Einzelbildern Strukturen auszumachen und vor allem zu lokalisieren, ist aufgrund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses schwierig. Untersuchungen an in Eis eingebetteten Proben unter niedrig-Dosis-Bedingungen sind im wahrsten Sinne des Wortes ein „Fischen im Trüben“ und nur mit Hilfe der tomographischen Rekonstruktion wird diese „Trübung“ beseitigt.

Kippgeometrie

Die Qualität einer tomographischen Rekonstruktion hängt entscheidend von der Kippgeometrie ab. Im Gegensatz zur Computertomographie ist im Elektronenmikroskop keine vollständige Rotation um 180° möglich, sondern nur über einen eingeschränkten Winkelbereich von maximal $\pm 70^\circ$. Dies liegt zum einen daran, dass der Elektronenstrahl den Objektträger bei großen Winkeln nicht durchdringen kann, zum anderen daran, dass die Halterung den Strahl „abschattet“. Der limitierte Kippwinkelbereich erzeugt so einen „blinden“ keilförmigen Bereich im reziproken Raum („missing wedge“, Abb. 3a), der die Rekonstruktion des untersuchten Objekts erschwert. So entspricht

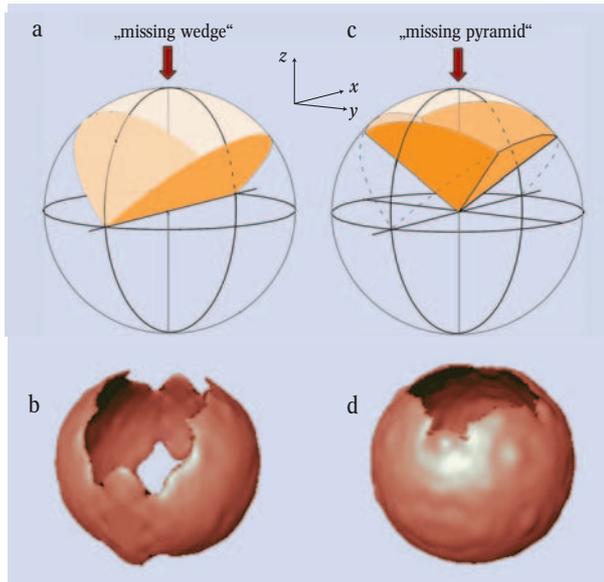


Abb. 3: Bei der Einachsenkippung ist ein keilförmiger Bereich („missing wedge“) aufgrund des beschränkten Kippwinkels nicht zugänglich (a). Das rekonstruierte Objekt ist dadurch verzerrt und unvollständig (b). Die Zweiachsenkippung verkleinert den unzugänglichen Bereich (c), sodass die Rekonstruktion besser mit dem Objekt übereinstimmt (d).

die Auflösung d_x entlang der Kippachse (x -Richtung) der elektronenoptischen Auflösung des verwendeten Instruments, während senkrecht zur Kippachse (y -Richtung) die Auflösung d_y durch das Winkelinkrement $\Delta\alpha$ und damit durch die Anzahl der Aufnahmen bestimmt wird. Der Zusammenhang zwischen Auflösung d_y und Anzahl der Projektionen N eines sphärischen Objekts mit dem Durchmesser D wird bei einem uneingeschränkten Winkelbereich durch das Crowther-Theorem beschrieben: $d_y = \pi \cdot D / N$ [10]. Für die Rekonstruktion einer Mycoplasma-Zelle mit ca. 200 nm Dicke bei einer Auflösung von $d_y = 2$ nm benötigt man demzufolge 320 Projektionen mit einem Winkelabstand von $0,6^\circ$. Aufgrund des unzugänglichen Winkelbereichs ergibt die Rekonstruktion eines kugelförmigen Vesikels jedoch statt einer Kugel ein anisotropes Gebilde, welches zusätzlich in Richtung der optischen Achse (z) verlängert bzw. gedehnt erscheint (Abb. 3b). Damit ist die Auflösung in z -Richtung d_z um diesen Elongationsfaktor e_{yz} , der sich aus dem maximalen Kippwinkel α ableiten lässt, zusätzlich herabgesetzt. Abhilfe bietet die Aufnahme und Kombination zweier Kippserien der gleichen Probenstelle mit um 90° gedrehten Kippachsen (Zwei-Achsen-Kippung) [11]. Aus dem „missing wedge“ entsteht dadurch eine wesentlich kleinere „mis-

sing pyramid“ (Abb. 3c,d). In unserem Beispiel sind so anstelle von 320 Projektionen aber mehr als 600 Aufnahmen nötig mit der entsprechend höheren Strahlenbelastung. Dennoch, um die bestmögliche Auflösung zu erhalten, muss man den größten zugänglichen Winkelbereich mit möglichst kleinen Winkelschritten abdecken und gleichzeitig die Gesamtdosis in tolerierbaren Grenzen halten. Zwei Anforderungen, die offensichtlich nicht leicht in Einklang zu bringen sind und die Herausforderungen der Methode verdeutlichen.

Instrumentierung

Transmissionselektronenmikroskope erreichten zwar bereits in der Vergangenheit laterale Auflösungen unterhalb von 10 Ångström, dennoch dauerte es Jahrzehnte, bis eine komplexe Untersuchungsmethode wie die Elektronentomographie möglich wurde. Erst seit wenigen Jahren sind einerseits elektronenoptische und mechanische Bauteile mit der erforderlichen Stabilität und Präzision vorhanden und andererseits Probenkühlung, Computeransteuerung sowie Digitalkameras verfügbar. Im Folgenden sind nur drei der wichtigen instrumentellen Komponenten erwähnt, die auch heute noch weiterentwickelt werden.

Goniometer - Kippvorrichtung

Der Probenhalter und damit die Probe wird gegenüber dem Elektronenstrahl mit einem rein mechanischen, außerhalb der Mikroskopsäule angebrachten Goniometer gekippt. Wenn man das Präparat, das sich an der Spitze eines ca. 30 cm langen, mit flüssigem Stickstoff gekühlten Probenhalters befindet, kippt, bewegt sich das Präparat um bis zu $0,5 \mu\text{m}$ aus der euzentrischen Ebene. Als euzentrische Ebene zw. Achse bezeichnet man die Probenposition in z -Richtung, bei der die Probenachse und die Achse des Goniometers übereinstimmen. Befindet sich die Probe ober- oder unterhalb dieser Ebene, so verschiebt sich die Probenstelle während des Kippens, ist die Probe jedoch in der euzentrischen Ebene, so bleibt jeder Punkt auf der Kippachse beim Kippen/Drehen in seiner Position. Bei einer angepeilten Auflösung von beispielsweise 10 Ångström darf die Abweichung beim Kippen aber nicht mehr als drei Ångström betragen. Zwischen der Präzision dieses Goniometers und der gewünschten Auflösung liegen also drei bis vier Größenordnungen. Diese Lücke lässt sich heute mit extrem komplexen Datenakquisitionsschemata schließen, die fast vollständig sämtliche Abweichungen von der euzentrischen Achse korrigieren.

CCD-Kamera

Die bereits in den 70er-Jahren für astronomische Beobachtungen entwickelten CCD-Kameras (*Charge Coupled Device*) wurden 1986 erstmals von Mochel in der Elektronenmikroskopie verwendet [12]. Da die aufgenommenen CCD-Bilder sofort für die digitale Weiterverarbeitung zur Verfügung stehen, lässt sich der Aufnahmeprozess nicht nur kontrollieren, sondern auch automatisieren.

Die in der Elektronenmikroskopie verwendeten CCD-Kameras bestehen aus dem Szintillator, der die Primärelektronen „abbremst“ und so durch Kathodolumineszenz Photonen erzeugt, der Faseroptik zur unvergrößerten Übertragung des lichtoptischen Bilds sowie dem CCD-Sensor, der aus einer Matrix von Metall-Oxid-Halbleiter (MOS) Kondensatoren aufgebaut

ist. Die Chipgrößen liegen zwischen 1024×1024 und 4096×4096 Pixel bei einer Pixelgröße zwischen 15 und $30 \mu\text{m}$. Im Gegensatz zu Negativen zeichnen sich CCDs durch ihre hohe Linearität aus, d. h. die Intensitätsverteilung des aufgezeichneten Bildes ist direkt proportional zur Zahl der auftreffenden Primärelektronen. Das laterale Auflösungsvermögen ist dagegen deutlich kleiner als beim fotografischen Film, da es durch das „Übersprechen“ zu einer „Verschmierung“ des Signals, ähnlich einer Bildglättung kommt.

Gerade für die Aufnahme unter niedrig-Dosis-Bedingungen ist die Empfindlichkeit der CCD und das durch die Elektronik eingebrachte Eigenrauschen entscheidend. Leider nimmt bei den herkömmlichen Kameras mit zunehmender Sensitivität das Übersprechen zu. Auch hier muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen der Dicke des Szintillatormaterials und der gewünschten lateralen Auflösung. Der ideale Detektor, der es erlaubt, selbst bei den geringsten Elektronendosen das gesamte Signal zu übertragen, ist noch nicht erfunden.

Energiefilter

Bei der TEM ist die Größe des Objekts für die Abbildungsqualität von erheblicher Bedeutung. Einfache geometrische Überlegungen zeigen, dass die durchstrahlte Distanz eines in Eis eingebetteten 200 nm dicken Objekts bei Kippung um 70° auf 580 nm anwächst. Elektronen können aber nicht beliebig weit und ungehindert Materie durchdringen. Überschreitet die Objektstärke die mittlere freie Weglänge der Elektronen, werden sie mehrfach gestreut und setzen die Interpretierbarkeit der Abbildung herab. Um dem zu begegnen, werden Mikroskope mit höherer Beschleunigungsspannung eingesetzt (300 kV). Bei der Durchstrahlung von mehr Masse erhöht sich der Anteil inelastisch und mehrfach gestreuter Elektronen. Dadurch „verschmiern“ scharfe Objektgrenzen in den Aufnahmen und die

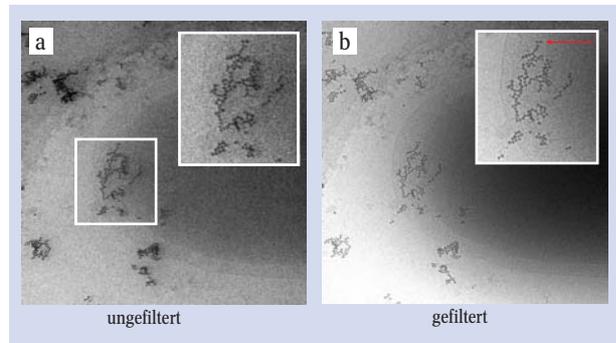


Abb. 4: Werden inelastisch und mehrfach gestreute Elektronen herausgefiltert, so verbessert sich der Bildkontrast deutlich. Der Pfeil in b) zeigt auf die 10 nm kleinen Goldkugeln, die als Bezugspunkte dienen.

Qualität der Tomogramme reduziert sich. So genannte Energiefilter erlauben es, Elektronen mit unerwünschter Energie quasi „herauszufiltern“ und so den Bildkontrast wesentlich zu verbessern (Abb. 4) [13]. Doch auch diesem Verfahren sind praktische Grenzen gesetzt: Zellen, die dicker als $0,5$ bis $1 \mu\text{m}$ sind, lassen sich auch mit Hilfe des Energiefilters nicht mehr als Ganzes untersuchen.

Alignierung, Rekonstruktion und Visualisierung

Aufgrund der Ungenauigkeit des Goniometers müssen nach der Aufnahme einer Kippserie zunächst die Verschiebungen der einzelnen Bilder zueinander bestimmt und herausgerechnet werden. Diese Prozedur bezeichnet man als Alignierung. Bei einem Datensatz von typischerweise 100 bis 200 Bildern und einer Gesamtdosis zwischen 20 und $50 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ entspricht ein einzelnes Bild einer Dosis von nur $0,1$ bis $0,5 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ mit einem entsprechenden sehr kleinen Signal-Rausch-Verhältnis. Zusätzlich sind die Kontrastunterschiede

zwischen dem biologischen Material, dem Eis und der amorphen Kohlenstoff-Folie sehr klein, da sie hauptsächlich aus schwach streuenden Elementen aufgebaut sind. Eine Alignierung, die auf einfachen Kreuzkorrelationsverfahren zwischen den einzelnen Bildern einer Serie beruht, führt somit nur in den seltensten Fällen zum Erfolg. Einen Ausweg liefern Bezugspunkte, kolloidale Goldkugeln mit einem Durchmesser von ca. 10 nm , die vor dem Vitrifizieren auf den Objektträger in Lösung aufgebracht oder zur

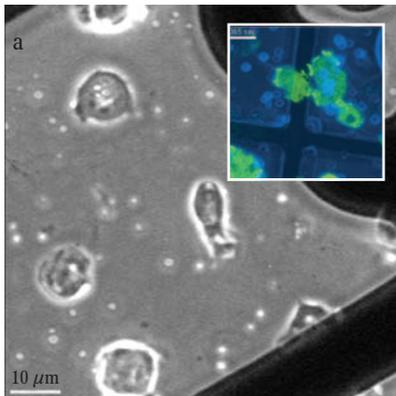
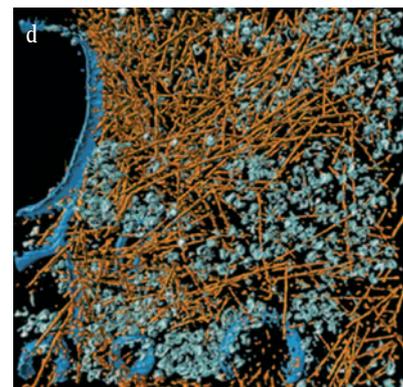
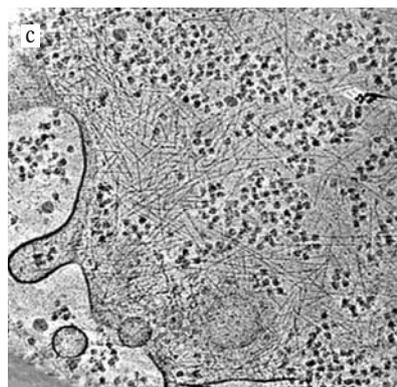
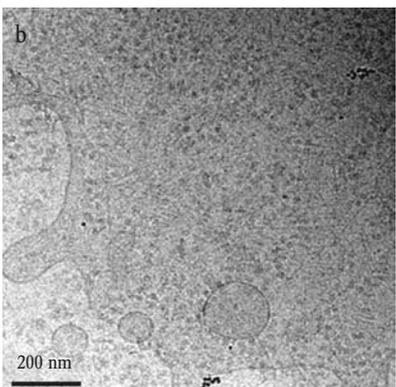


Abb. 5: Die tomographische Untersuchung einer in Eis eingebetteten Amöbe (*Dictyostelium discoideum*) fördert Details im Nanometerbereich zu Tage, die in der lichtmikroskopischen Phasenkontrast- (a) und der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (a, Inset) der Zelle auf einem Kupfernetzchen nicht zu erkennen sind. Gezeigt sind die 0° -Projektion (b), ein x - y -Schnitt durch das Tomogramm (c) und schließlich die visualisierte und segmentierte Darstellung eines Zellausschnitts. Zu erkennen sind die Membran (blau), die Filamente (bräunlich rot) und makromolekulare Komplexe (türkis-blau). (aus [16])



Probenlösung hinzugegeben werden. Diese Marker sind als kleine schwarze Punkte in einer Aufnahme leicht zu identifizieren (Pfeil Abb. 4). Unterstützt durch automatisierte Suchalgorithmen bzw. durch einfache manuelle Selektion lassen sie sich durch die gesamte Bilderserie verfolgen. Neben der Kompensation der Verschiebung erhält man gleichzeitig ein gemeinsames Koordinatensystem für die anschließende Rekonstruktion.

Nach der Alignierung folgt als nächster Schritt die Rekonstruktion, die auf dem von Radon 1917 formulierten Projektions-Schnitt-Theorem beruht, dem Grundstein für alle tomographischen Rekonstruktionsverfahren [14]. Demnach entspricht eine 2D-Projektion eines 3D-Objekts einem zentralen Schnitt durch den 3D-Fourier-Raum des Realraumobjekts. Die Drehung der Probe und die Aufzeichnung verschiedener Projektionen entsprechen folglich dem Abtasten der Probeninformation im Fourier-Raum. Die tomographische Rekonstruktion ist die Rücktransformation (inverse Fourier-Transformation) der Überlagerung aller Fourier-Transformationen der Einzelprojektionen, ein Verfahren, das als direkte Fourier-Rekonstruktion bezeichnet wird. Derzeit werden Rekonstruktionsverfahren im Ortsraum angewendet, da die erforderlichen Interpolationen zwischen den einzelnen „diskreten“ Projektionen leichter zu implementieren sind. Der am häufigsten gebräuchliche Algorithmus ist die gewichtete Rückprojektion (*weighted backprojection*) [15]. Die Wichtung der einzelnen Projektionen ist notwendig, da sich alle Projektionen in einem zentralen Punkt überschneiden. Niedrige Frequenzen werden ohne Gewichtung stärker hervorgehoben als höhere, was zu einer „Verschmierung“ des rückprojizierten Bildes führt. Die Summe aller rückprojizierten Bilder einer Kippserie ergibt dann letztendlich ein Tomogramm.

Sobald das Tomogramm erstellt ist, lassen sich im Computer „optische Schnitte“ in jeder beliebigen Richtung berechnen und darstellen. Für die Visualisierung bestimmter Strukturen, etwa Ribosomen und anderer Makromoleküle, dient das rechnerische Verfahren der *Segmentierung*, d. h. die Markierung (etwa Einfärbung)

von der Umgebung abgrenzbarer Details (Abb. 5). Die Detailrekonstruktion einer in Eis eingebetteten Amöbe (*Dictyostelium discoideum*) mit einer Auflösung d_z von ca. 8 nm zeigt exemplarisch die Möglichkeiten der Elektronentomographie im ungestörten zellulären Kontext. Neben den leicht zu erkennenden Membranstrukturen sieht man das aus einzelnen Aktinsträngen aufgebaute Zytoskelett und verschiedene makromolekulare Komplexe, beispielsweise Ribosomen [16]. Darüber hinaus zeigt das Tomogramm auf der Ebene einzelner Filamente die Art und Weise ihrer Interaktion (isotropes Netzwerk, Filamentbündel etc.) und ermöglicht es bereits, die Verzweigungswinkel einzelner Filamente in 3D zu bestimmen. Für eine quantitative (statistisch signifikante) Analyse solcher Datensätze ist es zum einen jedoch notwendig, automatische Segmentierungsalgorithmen zu entwickeln, um eindeutige Aussagen über die Filamentverbindungen und weitere strukturelle Filamentparameter zu bestimmen. Zum anderen ist eine Verbesserung der Auflösung auf $d_z = 2$ nm nötig, um zwischen zufälligen Überkreuzungen und echten Verzweigungen der einzelnen Filamente unterscheiden zu können.

Erst kürzlich gelang es, isolierte, intakte und funktionsfähige Zellkerne aus dem gleichen Organismus tomographisch zu analysieren (Abb. 6) [17]. Innerhalb der Kernmembran sitzen hunderte von Poren, durch die permanent tausende von Molekülen, wie Proteine oder RNA, transportiert werden. Auf diese Weise gelangen die Baupläne für Eiweißstoffe aus dem Zellkern zu den Ribosomen, während umgekehrt Signale aus dem Zellkörper im Kern zelluläre Prozesse, wie Wachstum, Zellteilung oder -differenzierung initiieren. Diese tomographische Analyse zeigt, wie schwierig es ist, sehr dichte und dicke Strukturen zu untersuchen: Nur im dünnen Randbereich des ca. 2 μm großen Zellkerns ist eine detaillierte Untersuchung möglich, das Innere des Kerns bleibt aufgrund seiner Größe unzugänglich. Zur Verbesserung der Kernporenstruktur wurden Mittelungs- und Klassifizierungstechniken eingesetzt, und aus rund 250 Kernporen-Komplexen ließen sich so zwei Hauptzustände unterscheiden.

Wie diese beiden Beispiele zeigen, enthält ein Tomogramm einer Zelle eine gewaltige Informationsfülle. Prinzipiell liefert es ein Abbild des gesamten Proteoms (bei gegebener Auflösung, derzeit 3–5 nm für prokaryotische Zellen²⁾) und beschreibt gleichzeitig die lokale Interaktion makromolekularer Komplexe. Um diese Information in ihrer Vollständigkeit nutzen zu können, müssen neue Strategien der Bildverarbeitung entwickelt werden. Denn das *Macromolecular Crowding* mit den sehr nahe beieinander liegenden Proteinmolekülen im Cytoplasma der Prokaryoten verhindert eine umfassende Segmentierung der Strukturen. Eine alternative, nicht-invasive Methode bietet die Korrelation strukturell bekannter Proteinkomplexe (z. B. aus der Röntgenkristallographie) mit dem gesamten Zellenvolumen und die Identifizierung des gesuch-

2) Vereinfacht gesagt, sind prokaryotische Zellen oder Prokaryoten Zellen ohne Kern und Eukaryoten solche mit Zellkern.

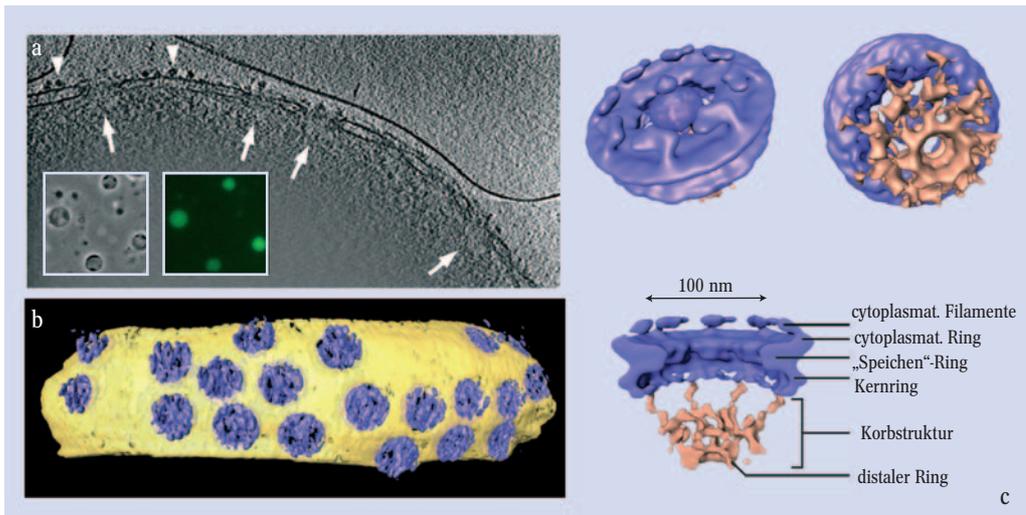


Abb. 6: Mit der Elektronentomographie lassen sich seit kurzem auch intakte Amöben-Zellkerne untersuchen:
 ▶ a) x-y-Schnitt durch das Tomogramm mit lichtmikroskopischer Phasenkontrastabbildung (Inset links) sowie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (Inset rechts).
 ▶ b) Visualisierte und segmentierte Darstellung

eines Zellausschnitts. Die Kernmembran ist gelb, die einzelnen Kernporen sind violett dargestellt.
 ▶ c) Kernpore nach Mittelung aus Richtung des Cytoplasmas betrachtet (links) bzw. vom Kerninneren aus gesehen (rechts). Der Schnitt durch eine Pore (unten) zeigt die einzelnen Komponenten des Komplexes im Detail. (aus [17])

ten Moleküls durch dessen strukturelle Signatur im Tomogramm. Da die Positionen der Proteine unbekannt sind und diese in allen möglichen Orientierungen im Tomogramm vorliegen, sind effiziente Suchalgorithmen für die Mustererkennung (*template matching*) erforderlich. Die Analyse muss sowohl schnell als auch objektiv und reproduzierbar sein, um im Idealfall alle Kopien der gesuchten Moleküle in den großen Datenvolumina zu finden, die mehrere GigaByte Speicherumfang erreichen. Dass diese Strategie prinzipiell erfolgreich ist, haben Versuche mit Lipidvesikeln gezeigt, die mit verschiedenen Proteinkomplexen gefüllt waren.

Ausblick

Derzeit lassen sich nicht-invasive Untersuchungen mit Hilfe von Kryo-Elektronentomographie auf einzelne Zellen anwenden, die eine Dicke von 0,5 – 1 μm nicht überschreiten [18]. Zu diesen zählen flach wachsende Bereiche eukaryotischer Zellen und Neuronen sowie geeignete Prokaryoten. Um dickere Präparate, vor allem ganze eukaryotische Zellen, mehrzellige Verbände oder Gewebe untersuchen zu können, sind Weiterentwicklungen hinsichtlich der Präparation erforderlich. So sollte es möglich sein, größere Objekte unter Hochdruck strukturschonend in Eis einzufrieren, anschließend im Kryo-Mikrotom in geeigneter Dicke Schnitte zu verarbeiten und Tomographie an Zellausschnitten vorzunehmen.

Aber nicht nur im präparativen Bereich werden Verbesserungen vorgenommen. Die neueste Generation von Elektronenmikroskopen ermöglicht es, Proben mit Stickstoffkühlung ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) und bei der Temperatur flüssigen Heliums ($-269\text{ }^\circ\text{C}$) zu untersuchen. Nahe am absoluten Nullpunkt lässt sich die Bestrahlzeit erhöhen, sodass in bestimmten Fällen fast doppelt so viele Projektionen mit noch kleineren Winkelschritten möglich sind. Zusätzlich bestehen Bestrebungen, neuartige Detektoren zu entwickeln, welche eine hohe laterale Auflösung und eine höhere Empfindlichkeit besitzen. Damit könnte es gelingen, weiter in den Bereich molekularer Auflösung von ca. 2 nm vorzudringen und auch kleinere Komplexe ($< 200\text{ kDa}^3$) in Tomogrammen zu lokalisieren und zu identifizieren.

So erweitert jede methodische und instrumentelle Fortentwicklung die Perspektiven und Anwendbarkeit der zellulären Kryo-Elektronentomographie und verspricht neue Einblicke in die molekulare Architektur und strukturelle Organisation lebender Zellen.

Danksagung

Der Autor dankt Prof. Wolfgang Baumeister für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu forschen und zu arbeiten. Für die finanzielle Förderung der Arbeiten gilt der Dank der Deutschen Forschungsgesellschaft und der Europäischen Union (SFB 563 und das EU Netzwerk 3D-EM).

Literatur

- [1] B. Alberts, *Cell* **92**, 291 (1998)
- [2] D. J. DeRosier und A. Klug, *Nature* **217**, 130 (1968)
- [3] R. G. Hart, *Science* **159**, 1464 (1968)
- [4] W. Hoppe et al., *Z. Physiol. Chem.* **355**, 1483 (1974)
- [5] M. Adrian et al., *Nature* **308**, 32 (1984)
- [6] R. M. Glaser in: *Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis*, B. M. Siegel und D. R. Beaman (Hrsg.), Wiley, New York (1975)
- [7] International Experimental Study Group, *Journal of Microscopy* **141**, 385 (1985)
- [8] H. Stark, F. Zemlin und C. Boettcher, *Ultramicroscopy* **63** (2), 75 (1996)
- [9] R. Hegerl und W. Hoppe, *Z. Naturforsch. A* **314**, 1717 (1976)
- [10] R. A. Crowther et al., *Nature* **226**, 421 (1970)
- [11] D. N. Mastronarde, *J. Struct. Biol.* **120**, 343 (1997)
- [12] M. E. Mochel und J. M. Mochel in: *Proc. 51st Ann. Meet. MSA*, G.W. Bailey und C.L. Rieder (Hrsg.), San Francisco Press, 262 (1986)
- [13] L. Reimer (Hrsg.), *Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy*, Springer Verlag Berlin Heidelberg (1995)
- [14] J. Radon, *Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Math. Phys. Klasse* **69**, 262 (1917)
- [15] J. Frank, *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*, Academic Press San Diego (1996)
- [16] O. Medalia et al., *Science* **298**, 1209 (2002)
- [17] M. Beck et al., *Science* **306**, 1387 (2004)
- [18] W. Baumeister, R. Grimm und J. Walz, *Trends Cell Biol.* **9**, 81(1999)

3) Ein Dalton (Da) entspricht der Masse eines Wasserstoffatoms

Der Autor

Jürgen Plitzko ist seit 2002 Gruppenleiter am MPI für Biochemie. Seit seiner Diplomarbeit bewegt er sich zwischen den Disziplinen: Nach dem Studium der Mineralogie in Tübingen und einer Diplomarbeit in der angewandten Physik/Materialwissenschaft hat er an der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart promoviert mit einer am MPI für Metallforschung angefertigten Arbeit. Nach seiner Promotion verbrachte er drei Jahre in den USA am Lawrence Livermore National Lab. Seit über zehn Jahren beschäftigt er sich mit den verschiedenen Varianten der Elektronenmikroskopie.

