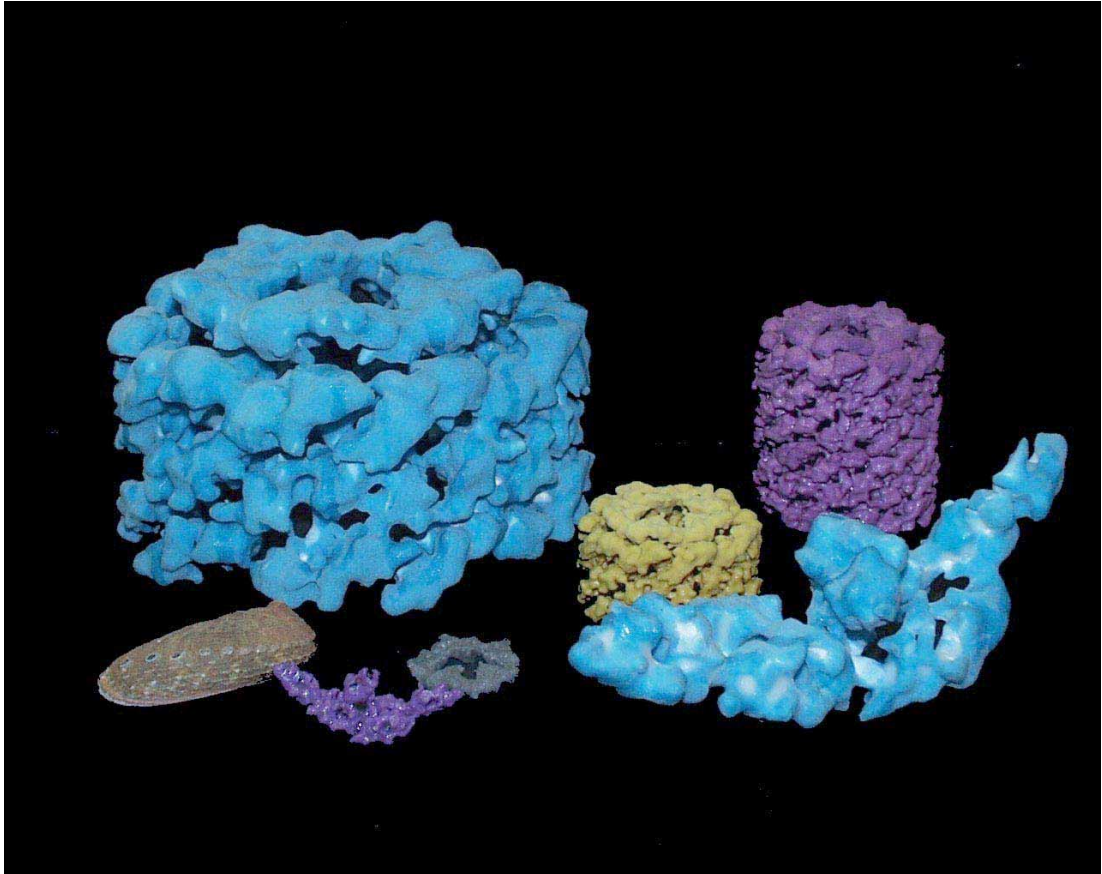


Kryoelektronenmikroskopie von Proteinen:
3D-Struktur (12 Å)
des Hämocyanins der Schnecke *Haliotis*



D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades

„ D o k t o r

d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n “

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

U l r i c h M e i ß n e r

geb. in Mainz

Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2000

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl danke ich für die Überlassung des Themas und der hervorragenden technischen Ausstattung, die mir für die Fertigung der Arbeit zur Verfügung stand, sowie für zahlreiche Diskussionen.

Herr Dr. Prakash Dube (IMT, Marburg) hat die elektronenmikroskopischen Aufnahmen für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Datensätze angefertigt, dafür : Danke!

Bei Herrn Dr. Robin Harris und Herrn Dirk Scheffler bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Qualitätskontrolle.

Herr Dr. Wolfgang Gebauer und Herr Rolf Lehnert haben mir bei der biochemischen Isolierung des HtH1 geholfen, auch dafür ein Dankeschön.

Ich danke auch Herrn Dr. Holger Stark (IMT, Marburg). Er hat mit seinem Hintergrundwissen über die physikalischen Grundlagen der Elektronenmikroskopie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigesteuert.

Die Arbeit wurde in Teilen durch die DFG (Ma 843/4-2) und die Stiftung Innovation von Rheinland Pfalz (GZ 8312-386261/281) gefördert.

Danke!

J ü r g e n , R o b i n , P r a k i ,
H o l g i , D i r k y , F r a n k y ,
W o l f g a n g , R o l f , L e n a ,
B u n n y , S v e n j a , M a r t i n ,
W i l f r i e d , E l k e , H e i n z ,
T h o m a s , N a d j a ,
T h o r s t e n , B e r n d , B e n n i ,
U t e , R a l l e u n d M i c h a e l .

Außerdem danke ich allen innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe, die mich durch Ihre Freundschaft unterstützt und beflügelt haben.

für Marina

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
A Einleitung.....	1
1 Allgemeines.....	1
2 Das Sauerstoffbindungszentrum.....	2
3 Die Hämocyane der Arthropoden.....	2
4 Molluskenhämocyane.....	3
4.1 Das Hämocyanin der Schlüssellochschnecke (KLH)	5
4.2 Das Hämocyanin des Seeohrs <i>Haliotis tuberculata</i> (HtH).....	8
5 3D-Rekonstruktion von Proteinstrukturen aus EM-Aufnahmen.....	9
6 Ziel der Arbeit.....	11
B Material und Methoden	12
1 Material.....	12
1.1 Tiere.....	12
1.2 Chemikalien	14
1.3 Hämocyane von <i>Haliotis tuberculata</i> (HtH1 und HtH2)	14
1.4 Elektronenmikroskope	15
1.5 Hardware	17
1.6 Software.....	20
2 Elektronenmikroskopische Methoden	24
2.1 Negative Kontrastierung zur Kontrolle von Proben am Zeiss-EM in Mainz	24
2.2 Negative Kontrastierung zur 3D-Rekonstruktion am Philips CM20 FEG in Marburg.....	25
2.3 Eiseingebettete Präparation (nicht kontrastiert) zur 3D-Rekonstruktion am Philips CM 20 FEG in Marburg.....	26
2.4 Defokusreihen zur Auflösungsverbesserung (Abhängigkeit der Fourier-Schalenkorrelation (FSC) von der CTF)	27

3	Methoden zur 3D-Rekonstruktion aus EM-Bildern und Bildbearbeitung	29
3.1	Kristallographie	29
3.2	Kippserienanalyse	29
3.3	Immun-Elektronenmikroskopie	30
3.4	Übersicht zur angularen Einzelpartikelanalyse	30
3.5	Auswählen und Extrahieren von Einzelmolekülen vom Negativ	32
3.6	Der Band-Pass-Filter	33
3.7	Das Alignment der Einzelbilder	34
3.8	Klassifizierung und multivariate statistische Analyse (MSA)	38
3.9	<i>Angulare Reconstitution</i> (Winkelzuweisung)	42
3.10	Rückprojektionen von 3D-Bildern	46
3.11	3D-Rekonstruktion	46
3.12	Rendern der 3D-Oberfläche	49
4	Prototyping und Modellbau	50
5	Molekulares Modellieren	51
5.1	Vergleich der Primärstrukturen	52
5.2	Modellierung der Sequenz anhand einer Referenz	52
5.3	Minimierung der Energie	52
5.4	Überprüfung der Plausibilität des Modells nach Ramachandran	53
5.5	Einpassen einer 3D-Tertiärstruktur in eine 3D-Dichtekarte	53
C	Ergebnisse	54
1	Isolierung von HtH1-Didekameran und Reinheits- bzw. Stabilitätskontrolle	54
1.1	Elektronenmikroskopische Kontrolle	54
1.2	SDS-PAGE	54
2	Vorversuche mit schwermetallkontrastiertem HtH1	56
3	Hauptversuche mit unkontrastiertem HtH1	58
3.1	Aufnahmen am Philips CM20 FEG von HtH1 in glasartigem Eis	58
3.2	Anzahl der selektierten Molekülbilder bei den verschiedenen Defokuswerten	59
3.3	Anzahl der Klassen zur Rekonstruktion	60
3.4	Winkelverteilung der Klassen im Datensatz	60
4	3D-Rekonstruktion des HtH1-Didekamers	62
4.1	Signal-Stärke Analyse	62
4.2	Bestimmung der Auflösung der 3D-Rekonstruktion	63
4.3	Verifizierung der Symmetrievoraussetzungen für die Rekonstruktion	65
4.4	Anordnung der Dekamere im Didekamer	72
4.5	3D-Schnittserie	73
4.6	Die Seitenansicht des HtH1-Didekamers bei verschiedenen Schwellenwerten für die Oberflächenberechnung	75
4.7	Symmetrieeigenschaften im HtH1-Didekamer	77
4.8	Symmetrieeigenschaften im aufgeschnittenen HtH1-Didekamer	78
4.9	Auflösung funktioneller Domänen im HtH1-Didekamer	79

5	Das HtH1-Dekamer.....	80
6	Das ausgerollte HtH1-Didekamer	81
6.1	Das gesamte HtH1-Didekamer geöffnet und ausgerollt.....	82
6.2	Die Wand des HtH1-Didekamers geöffnet und ausgerollt.....	82
6.3	Der Kragenkomplex des HtH1-Didekamers geöffnet und ausgerollt	83
7	Das Untereinheitendimer	87
7.1	Extraktion des HtH1-Untereinheitendimers	87
7.2	Strukturelle Beschreibung des HtH1- Untereinheitendimers.....	88
7.3	Lage des Untereinheitendimers im HtH1-Didekamer.....	88
8	Das solide Modell des HtH1-Didekamers	91
8.1	Beschreibung des Modells	91
8.2	Sollbruchstellen im Modell des HtH1-Dekamers	93
9	Molekulares Modellieren der funktionellen Domäne HtH1-g	94
9.1	Vorhersage der 3D-Struktur von HtH1-g	94
9.2	Einpassen der vorhergesagten HtH1-g Struktur in die Masse des Arc.....	99
D	Diskussion.....	102
1	Stand der Forschung.....	102
2	Verfahrensweise bei der 3D-Rekonstruktion und der Auflösungsbestimmung	102
3	Darstellung des HtH1-Didekamers	103
4	Abmessungen der Quartärstruktur des HtH1.....	104
5	Isolierung des Untereinheitendimers aus dem Didekamer	105
6	Intramolekulare Symmetriebetrachtungen am HtH1-Dimer.....	105
7	Anordnung der beiden Untereinheiten im Untereinheitendimer	107
8	Die Anordnung der funktionellen Domänen im Untereinheitendimer	108
9	Einpassen der vorhergesagten 3D-Struktur von HtH1-g in den Arc.....	110
10	Ausblick	111

E	Zusammenfassung.....	112
F	Literatur	114
G	Anhang.....	130
1	Fourier-Transformation	130
1.1	Herleitung der 1D-Fourier-Transformation	130
1.2	Beziehung zwischen Fourierraum und Bildraum	132
2	Die Kontrastübertragungsfunktion (CTF)	133
2.1	Kontrastentstehung.....	133
2.2	Phasenkontrastübertragungsfunktion.....	135
2.3	Abhängigkeit der CTF vom Fokus	136
	Lebenslauf	138

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrom ($1 \text{ Å} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$)
CCF	Kreuzkorrelationsfunktion (<i>Cross correlation function</i>)
CT	Computer Tomographie
CTF	Kontrast Transfer Funktion (<i>Contrast transfer function</i>)
Da	Dalton
EM	Elektronenmikroskop
FEG	Feld Emissionskanone (<i>Field emission gun</i>)
FSC	Fourier Schalen Korrelation (<i>Fourier Shell Correlation</i>)
FTP	Fast Transfer Protokoll
FU	Funktionelle Domäne (= <i>functional unit</i>)
HtH1 / HtH2	<i>Haliotis tuberculata</i> Hämocyanin Typ 1 / Typ 2
IMT	Institut für molekulare Tumorforschung, Marburg
kDa	Kilodalton ($1 \text{ kDa} = 10^3 \text{ Da}$)
KLH	<i>Keyhole Limpet</i> Hämocyanin
kV	Kilovolt ($1 \text{ kV} = 10^3 \text{ V}$)
MDa	Megadalton ($1 \text{ MDa} = 10^6 \text{ Da}$)
MRA	Multi Referenz <i>Alignment</i>
MSA	Multivariate statistische Analyse
nm	Nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)
OdH	<i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin
OS	Betriebssystem (<i>Operating System</i>)
PCTF	Phasenkontrast Transfer Funktion (<i>Phase contrast transfer function</i>) (siehe CTF)
PDB-Datei	Dateiformat für 3D-Röntgenstrukturen (atomare Auflösung)
PMSF	(Proteaseinhibitor)
RCF	Drehkorrelationsfunktion (<i>Rotational correlation function</i>)
SCSI	Computer-Bustyp zum Anschluss von Peripheriegeräten (<i>Small Computer Serial Interface</i>)
SoH	<i>Sepia officinalis</i> Hämocyanin
SOPHIE	<i>Superconducting Objective in a Philips Electron microscope</i>
STL-Datei	3d-Dateiformate für stereolithographische Anwendungen
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TIF-Datei	Format für 2D-Pixelbilddateien (<i>Tagged Image Format</i>)
V	Volt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbare Modellvorstellung zur Quartärstruktur von KLH. (geändert nach Gebauer <i>et al.</i> , 1994)	7
Abb. 2:	Das Grüne Seeohr <i>Haliotis tuberculata</i>	13
Abb. 3:	Aufbau des Philips CM20 FEG Elektronenmikroskops (Standort Marburg, IMT)	16
Abb. 4:	Aufbau der Scaneinrichtung.	18
Abb. 5:	Schematische Darstellung des rapid Prototyping-Verfahrens (nach Z-Corp.)	19
Abb. 6:	Guillotine zum Schockgefrieren von EM-Grids bei der Präparation für Kryoelektronenmikroskopie	26
Abb. 7:	Vergleich der Kontrasttransferfunktion (a) mit der Fourier-Schalenkorrelation (b) zur Auflösungsbestimmung. Dabei zeigt sich, dass die Auflösungsgrenze durch den zweiten Nulldurchlauf der CTF bestimmt wird. Hier als Beispiel eine Ausgabe von IMAGIC zur FSC von der 3D-Rekonstruktion von HtH1 aus den Bildern bei einem Defokus von 1,0 μm (vgl. Ergebnisse)	28
Abb. 8:	Übersicht über die Vorgehensweise bei der 3D-Rekonstruktion einzelner HtH1-Moleküle aus EM-Negativen.	31
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Ausrichtungskorrektur eines Objektes gegen eine gleichgestaltliche Referenz (nach IMAGIC-Dokumentation)	35
Abb. 10:	Darstellung der Raumwinkel zur Betrachtung eines dreidimensionalen Körpers.	43
Abb. 11:	Verhältnis verschiedener zweidimensionaler Projektionen des gleichen Objektes im Fourierraum: (nach (Schatz, 1992))	44
Abb. 12:	Sinogramme sind eine spezielle Darstellungsform einer gegebenen 2D-Projektion eines 3D-Objektes. Dabei werden in der 2D-Projektion die Grauwerte aller Linien durch den Bildmittelpunkt ($0^\circ - 180^\circ$) jeweils gegen den zugehörigen Winkel aufgetragen.	45
Abb. 13:	Kontrolle der HtH1-Probe auf Unversehrtheit und Reinheit:	55
Abb. 14:	Vorversuche mit Daten aus Aufnahmen negativ kontrastierter HtH1-Moleküle. Die Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV am Philips CM20 in Marburg gemacht.	56
Abb. 15:	In glasartiges Eis eingebettete HtH1-Didekamere aufgenommen im Philips CM20 Elektronenmikroskop.	58
Abb. 16:	Verteilung der Ansichtswinkel im Datensatz zur 3D-Rekonstruktion von HtH1. Dargestellt sind hier die Eulerwinkel der Klassensummenbilder, die zur Rekonstruktion verwendet wurden.	61
Abb. 17:	Bestimmung der Auflösung der HtH1-Rekonstruktion anhand der Fourier Schalen Korrelation.	64

Abb. 18:	Übersicht über die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion unter Verwendung der C5-Symmetrie.	67
Abb. 19:	3D-Rekonstruktion von HtH1, die mit einer C10-Symmetrie berechnet wurde, wobei der Schwellenwert gemäß der berechneten Molekülmasse angeglichen wurde.	68
Abb. 20:	3D-Rekonstruktion von HtH1, die mit einer D5-Symmetrie berechnet wurde, wobei der Schwellenwert gemäß der berechneten Molekülmasse angeglichen wurde.	69
Abb. 21:	Falsifizierung einer C10-Symmetrie anhand von Rückprojektionen der C10-symmetrischen 3D-Rekonstruktion.	71
Abb. 22:	Die Orientierung der Dekamere zueinander im Didekamer ist nur in einer Position möglich:.....	72
Abb. 23:	Schnittserie durch ein HtH1-Dekamer mit Verteilung der Dichte (Auflösung: 12 Å). Die verschiedenen Dichtewerte werden durch die Intensität repräsentiert.	74
Abb. 24:	Oberflächengerenderte Stereoansichten des HtH1-Didekamers bei verschiedenen Schwellenwerten für die Oberflächenbegrenzung.	76
Abb. 25:	Stereoansichten bei einem Schwellenwert, der mit der Molekülmasse des HtH1 korreliert, welche aus der Aminosäuresequenz ermittelt wurde (8 MDa):	77
Abb. 26:	Längsschnitt durch das HtH1-Didekamer entlang der 5fach-Achse:	78
Abb. 27:	12 Å Rekonstruktion des HtH1 Didekamers:.....	79
Abb. 28:	Der Collar des HtH1 von oben betrachtet:	80
Abb. 29:	Stereobilder des HtH1-Dekamers.....	81
Abb. 30:	Oberflächenansicht des geöffneten und ausgerollten Didekamers. Die kleinen Pfeile in (a) und (c) zeigen dabei die kleine Furche, die großen Pfeile die große Furche, welche bereits anhand der KLH1-Rekonstruktion beschrieben wurden (Orlova <i>et al.</i> , 1997).	84
Abb. 31:	Oberflächenansicht der geöffneten und ausgerollten Zylinderwand des Didekamers. Die kleinen Pfeile in (a) zeigen dabei die kleine Furche, die großen Pfeile die große Furche. Die Pfeile in (c) zeigen durchgehende Kanäle oder Poren durch die Molekülwand.	85
Abb. 32:	Oberflächenansicht des Kragenkomplexes des Didekamers. Der Schwellenwert ist so gewählt wie bei der 8 MDa Ansicht des Didekamers. Der Kragenkomplex wurde digital durch Anlegen einer Maske aus der Rekonstruktion ausgeschnitten.....	86
Abb. 33:	Schnittserie durch das isolierte Untereinheitendimer:	87
Abb. 34:	Stereoansichten des isolierten Untereinheitendimers aus verschiedenen Ansichtswinkeln.....	89
Abb. 35:	Orientierung des Untereinheitendimers im HtH1-Didekamer:.....	90
Abb. 36:	Modell des HtH1-Didekamers bei einem massekorrelierendem Schwellenwert von 8 MDa. Erstellt wurde das Modell mittels <i>rapid prototyping</i> anhand des Datensatzes aus IMAGIC	92
Abb. 37:	Zerbrochenes Modell des HtH1-Dekamers.	93

Abb. 38:	Modell des HtH1-Dimers ohne das <i>Collar</i> -Segment.	94
Abb. 39:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von HtH1-g (Keller <i>et al.</i> , 1999) und OdH-g (Miller <i>et al.</i> 1998). Das Ergebnis entspricht völlig den Alignments von Keller <i>et al.</i> (1999) und Lieb <i>et al.</i> (1999, 2000)	95
Abb. 40:	3D-Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domäne g von <i>Octopus</i> und <i>Haliotis</i>	97
Abb. 41:	Ramachandran-Plot: die roten Bereiche sind „verbotene“ Abbildungsbereiche für Aminosäuren außer Glycin. In der Graphik sind Glycine als Kästchen, andere Aminosäuren als Kreuzchen markiert.	98
Abb. 42:	Folgen der rechnerischen Energieminimierung:.....	99
Abb. 43:	Fitting der alignierten Domäne g in die Masse des <i>Arc</i> aus der 3D-Rekonstruktion :.....	100
Abb. 44:	Anordnung von zwei Kopien der funktionellen Domänen HtH1-g als Homodimer:	101
Abb. 45:	Untereinheitendimer in Stereoansicht:	107
Abb. 46:	Zwei mögliche Anordnungen der beiden Untereinheiten im HtH1-Untereinheitendimer	109
Abb. 47:	Entstehung von Interferenzen durch verschiedene Lauflängen (Phasenverschiebung) des Lichtes bei verschiedenen Defokussierungen:.....	134
Abb. 48:	PCTF von SOPHIE (<i>Superconducting Objective in a Philips Electron microscope</i> , (Zemlin <i>et al.</i> , 1996)) bei verschiedenen Defokuswerten (a, b) und deren Einfluss auf die Abbildung eines Objektes (c, d, e nach (Stark, 1996)).....	136
Tab. 1:	Darstellung eines Datensatzes in einer Matrix:	40
Tab. 2:	Anzahl der selektierten Molekülbilder und der resultierenden ausgewählten Klassen bei verschiedenen Defokuswerten	59
Tab. 3:	Veränderung der Signalstärke (=Δ-Grauwert) während der 3D-Rekonstruktion.....	63
Tab. 4:	Übersicht der Kriterien, die zur Beurteilung der Qualität der Rekonstruktionen, bei verschiedenen Symmetrievoraussetzungen herangezogen wurden. Der angegebene Fehler ist ein Wert, den IMAGIC 5 aus der Übereinstimmung der verschiedenen beteiligten Klassenbilder zur resultierenden 3D-Rekonstruktion berechnet und ausgibt. Zur Berechnung und dem zustande kommen dieses Fehlers sind keine Angaben in der Dokumentation von IMAGIC gemacht.	71

A Einleitung

1 Allgemeines

Jede Zelle eines Organismus benötigt für die Energiegewinnung ausreichend Sauerstoff. Bei sehr kleinen oder sehr dünnen Lebewesen stehen die meisten Zellen im direkten Kontakt mit der Außenwelt. Es sind vom Sauerstoff also nur Strecken im Mikrometerbereich zu überbrücken, um die Zellmembran zu passieren, und Diffusion reicht aus, um den Sauerstoff aus dem umgebenden Medium (Luft oder Wasser) den Zellen nutzbar zu machen. Größere Organismen dagegen benötigen zusätzliche Sauerstofftransportmechanismen, weil die Diffusion allein viel zu langsam erfolgt. Lungen- und Kiemenatmer haben daher die Strategie entwickelt, den Sauerstoff mit Hilfe von Körperflüssigkeiten von den respiratorischen Epithelien an die Orte im Körper zu transportieren, wo er tatsächlich verbraucht wird. Da jedoch Flüssigkeiten im Gegensatz zu Luft nur einen Bruchteil des Löslichkeitspotentials für Sauerstoff bieten, wird die Transportkapazität der Flüssigkeiten für Sauerstoff durch Proteine erhöht. Diese respiratorischen Proteine sind in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden.

Man kennt drei unterschiedliche Klassen respiratorischer Proteine: die Hämoglobine in fast allen Tierstämmen (Terwilliger, 1992; Vinogradov, 1985), die Hämerythrine bei Anneliden, Sipunculiden und Brachiopoden (Kurtz, 1992; Mangum, 1992) und die Hämocyanine (Swammerdam, 1669; Van Holde & Miller, 1982). Diese verschiedenen unabhängig von einander entstandenen Proteine ähneln sich alle, indem sie reversibel Sauerstoff in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und allosterischen und kooperativen Effekten binden. In Bezug auf ihre Struktur sind sie jedoch sehr verschieden. Diese Arbeit handelt von der Raumstruktur des Hämocyanins der Mollusken.

Das blaue kupferhaltige Protein Hämocyanin ist das respiratorische Protein vieler Mollusken und Arthropoden („Häm“ = Blut, „cyan“ = blau; der Name Hämocyanin wurde 1878 von Leon Fredericq als „Blutblau“ geprägt: (Preaux *et al.*, 1988)). Es liegt im Gegensatz zum Hämoglobin der Wirbeltiere nicht zellgebunden, sondern frei in der Hämolymphe vor. Meist werden Konzentrationen von 5-50 mg/mL in der Hämolymphe gemessen (Van Holde & Miller, 1982). Die Sauerstoffaffinität der Hämocyanine ist vergleichsweise niedrig. Sie kann von verschiedenen Substanzen durch allosterische Effekte beeinflusst werden, hängt aber auch von kooperativen Effekten ab, welche die Interaktionen zwischen den Untereinheiten beeinflussen (Reviews:

Markl & Decker, 1992; Salvato & Beltramini, 1990; Van Holde *et al.*, 1992). Dem Hämocyanin wird neben seiner Funktion als respiratorisches Protein auch eine Beteiligung an der Energiespeicherung (Ugnow, 1969a; Ugnow, 1969b), der Osmoregulation (Mangum, 1983), dem Metallmetabolismus sowie dem Transport von Metallionen zugeschrieben (Chan & Weeks, 1992; Salvato & Beltramini, 1990; Zatta, 1984). Zudem zeigen Molluskenhämocyanine im Gegensatz zu Arthropodenhämocyaninen eine schwache Katalase-Aktivität gegenüber Peroxiden sowie eine schwache Tyrosinase-Aktivität (Decker & Rimke, 1998; Nakahara *et al.*, 1983; Van Holde & Miller, 1995).

2 Das Sauerstoffbindungszentrum

Hämocyanin besitzt aktive Zentren, die aus je zwei Kupferionen bestehen, welche in der Lage sind, jeweils ein Sauerstoffmolekül reversibel zu binden. Die für alle Hämocyanine charakteristische Blaufärbung wird durch die Bildung des Kupfer-Sauerstoff-Komplexes verursacht. Die beiden Kupferatome werden jeweils von drei Histidinen gebunden. Die Bindungsstellen für die Kupferatome werden als A und B bezeichnet. Je drei kupferbindende Histidine stehen an besonders konservierten Positionen in der Aminosäuresequenz, sowohl beim Arthropoden- als auch beim Molluskenhämocyanin (Markl & Decker, 1992; Salvato & Beltramini, 1990; Van Holde & Miller, 1995; Van Holde *et al.*, 1992). Dies wurde durch Röntgenstrukturanalysen am Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus* (Gaykema *et al.*, 1984), des Pfeilschwanzkrebsses *Limulus polyphemus* (Hazes *et al.*, 1993) sowie des Cephalopoden *Octopus dofleini* (Cuff & Hendrickson, 1996; Cuff *et al.*, 1998) belegt. Mutationsexperimente an Tyrosinasen, welche ein ähnliches Histidin-Kupferzentrum aufweisen, zeigten, dass Substitutionen bestimmter Histidine in der Primärstruktur der Tyrosinasen die Bindung von Kupferatomen verhindern (Huber *et al.*, 1985). Auch bei Tyrosinasen liegen diese drei Histidine der Kupferbindungsstellen A und B an konservierten Positionen.

3 Die Hämocyanine der Arthropoden

Bei den Arthropoden findet man das Hämocyanin bei den Spinnentieren, den Pfeilschwänzen, den höheren Krebsen und einigen Tausendfüßern. Trotz einiger Gemeinsamkeiten mit dem Molluskenhämocyanin stellen die Arthropodenhämocyanine eine strukturell völlig andersartige Proteinklasse dar. Die typischerweise hexamere Struktur der Arthropodenhämocyanine wird aus sechs nierenförmigen Untereinheiten

ten gebildet, wobei je nach Spezies solitäre Hexamere oder Oligohexamere aus 2, 4, 6 oder 8 Hexameren vorliegen. Der Aggregationsgrad ist artspezifisch. Eine detaillierte Übersicht über die molekularen Strukturen der Arthropodenhäemocyanine geben Markl (1986), Markl & Decker (1992) sowie Markl (1996). Weitere vergleichende Darstellungen zu Aufbau, Funktion und Evolution der Häemocyanine sind bei anderen Autoren zu finden, (z.B. Ellerton & Lankovsky, 1983; Jaenicke *et al.*, 1999; Van Holde & Miller, 1982; Van Holde & Miller, 1995; Van Holde *et al.*, 1992).

4 Molluskenhäemocyanine

Die Struktur des Molluskenhäemocyanins weicht völlig von der des Arthropodenhäemocyanins ab (Van Holde *et al.*, 1992). Innerhalb der Mollusken findet man Häemocyanin bei den Käferschnecken, Schnecken, Cephalopoden und einigen Muscheln (Ellerton & Lankovsky, 1983). Das Molluskenhäemocyanin stellt mit Molekulargewichten von bis zu 9 Millionen die größten funktionellen Proteine im Tierreich dar (Van Holde & Miller, 1982). Es ist als Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ca. 35 nm und einer Höhe von ca. 17 nm aufgebaut. Dieser Hohlzylinder ist ein Dekamer und setzt sich aus zehn chemisch gleichen Untereinheiten zusammen, die jeweils eine Masse von ca. 4 MDa besitzen. Jedes dieser Dekamere ist auf einer Seite offen, auf der anderen durch einen Kragenkomplex geschlossen (Abb. 1). Ein Dekamer besteht aus einer dreireihigen zylindrischen Wand und dem inneren Kragenkomplex. Die offenen Enden können sich bei einer Reihe von Tierarten „Gesicht-an-Gesicht“ zum Didekamer mit einem Molekulargewicht von ca. 8 Millionen aggregieren (Van Holde *et al.*, 1992; Van Holde & Miller, 1982). Durch Anlagerung weiterer Dekamere bilden sich teilweise tubuläre Multidekamere. Die einzelnen Untereinheiten sind 350-450 kDa groß und bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, welche in 7-8 globuläre funktionelle Domänen (engl.: FUs = *functional units*) unterteilt ist. Die Domänen weisen Molekülmassen von 45-60 kDa auf und vermögen jeweils über ein aktives Zentrum ein Molekül Sauerstoff reversibel zu binden. Solitäre Dekamere findet man vor allem bei den Cephalopoden, wie z.B. *Octopus dofleini*. Sie sind symmetrisch aufgebaut und weisen einen zentral angeordneten Kragen auf. Dieser ist eine Einstülpung ins Innere des Zylinders (siehe Van Holde *et al.*, 1992). Bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia*, einem Vertreter der pulmonaten Schnecken, liegen asymmetrisch gebaute Dekamere vor, welche nur an einer Seite des Hohlzylinders einen vom Zentrum nach außen gehenden Kragen aufweisen. Je zwei dieser Dekamere sind an den kragenlosen Seiten zu einem Didekamer assoziiert (siehe Abb. 1). Die Molekülmasse eines Didekamers beträgt 8 Millionen Da, und es sedimentiert in der analytischen Ultrazentrifuge mit 100 S (Ellerton & Lankovsky, 1983).

Die wenigen Muscheln, die Hämocyanin besitzen, bilden ebenfalls Didekamere (Mangum *et al.*, 1987; Morse *et al.*, 1986). Ein Teil der bisher untersuchten Molluskenhämocyanine besteht offenbar aus nur einer Untereinheit, wie z.B. bei der Muschel *Yoldia thraciaeformis* (Terwilliger *et al.*, 1988), der Käferschnecke *Katharina tunicata* (Ryan *et al.*, 1985), dem Tintenfisch *Sepia officinalis* (Gielens *et al.*, 1983; Wichertjes *et al.*, 1986) und *Octopus dofleini* (Lamy *et al.*, 1986). Bei *Octopus dofleini* wurde jedoch gezeigt, dass in der Sequenz eine geringfügige Heterogenität vorliegt, die allerdings immunologisch nicht nachweisbar ist (Lang, 1988; Lang & van Holde, 1990; Lang & van Holde, 1991; Miller *et al.*, 1998). Zwei verschiedene Untereinheiten wurden für die prosobranchen Schnecken *Murex fulvescens* (Brouwer *et al.*, 1978), *Buccinum undatum* (Lips *et al.*, 1981) und *Rapana thomasiana* beschrieben (Gebauer *et al.*, 1997; Gebauer *et al.*, 1999; Idakieva *et al.*, 1993; Stoeva *et al.*, 1997a; Stoeva *et al.*, 1995; Stoeva *et al.*, 1997b). Bei *Nautilus pompilius* wurden sogar drei unterschiedliche Untereinheiten gefunden (Bonaventura *et al.*, 1981). Die Hämocyanine der Schnecken *Helix pomatia* und *Helix aspersa* nehmen unter den bisher untersuchten Molluskenhämocyaninen eine besondere Stellung ein: Es wurden drei verschiedene Polypeptidketten (α_D , α_N , β_C) gefunden, die Unterschiede in der Löslichkeit, im Assoziationsverhalten und den Sauerstoffbindungseigenschaften aufweisen. Dennoch sind die Untereinheiten immunologisch eng miteinander verwandt (Preaux *et al.*, 1983; Preaux *et al.*, 1981). Das α_D - und β_C -Hämocyanin bestehen wiederum aus zwei sehr ähnlichen Untereinheiten (Lontie, 1983; Preaux *et al.*, 1983; Verschueren *et al.*, 1981).

Bei Tintenfischen sind isolierte Dekamere mit einem einzelnen, zentralen Kragen zu beobachten, wie Arbeiten an *Octopus dofleini* und *Octopus vulgaris* belegen (Cuff & Hendrickson, 1996; Cuff *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1994a; Lamy *et al.*, 1993; Lamy *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1990; Miller & Van Holde, 1982).

Die Hämocyanin-Didekamere der Schnecken dissoziieren bei pH-Werten über 9 zunächst in Dekamere, die wiederum instabil sind und über ein Untereinheitendimer weiter in ihre Untereinheiten zerfallen. Diese Untereinheiten weisen eine ungewöhnliche Perlschnurstruktur auf und bestehen aus einer durchgehenden Polypeptidkette mit einer Molekülmasse von ca. 400 kDa (ca. 3.500 Aminosäuren). Damit sind sie wesentlich größer als fast alle bekannten Polypeptide. Sie faltet sich zur „Untereinheit“, einer Kette aus sieben oder acht globulären „funktionelle Domänen“ zu je ca. 50 kDa. Jede funktionelle Domäne trägt ein aktives Zentrum aus zwei Cu-Ionen und kann somit ein Sauerstoffmolekül binden. Ein Didekamer des Schnekenhämocyanins hat also 160 aktive Zentren, welche in einem Gerüst von rund 65.000 Aminosäuren angeordnet sind (Markl, 1996; Van Holde *et al.*, 1992).

Bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia* sowie den Tintenfischen *Sepia officinalis* und *Octopus dofleini* wurden verschiedene funktionelle Domänen isoliert und ihre exakte Lage in der Untereinheit bestimmt (Drexel *et al.*, 1987; Gielens *et al.*, 1986; Gielens *et al.*, 1983; Lamy *et al.*, 1986; Lamy *et al.*, 1987; Lang, 1988; Lang & van Holde, 1991; Top *et al.*, 1990; Van Bruggen *et al.*, 1981; Wichertjes *et al.*, 1986; Xin *et al.*, 1990).

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen von intakten und partiell dissoziierten Didekameren und Dekameren gezeigt haben, sind die Untereinheiten mit einem Sechs-Domänensegment in einer helikalen Schrägstruktur in die zylindrische Wand des Dekamers eingebaut. Drei Domänenpaare (wahrscheinlich *ab*, *cd* und *ef*) sind in der Zylinderwand lokalisiert (vgl. z.B. Cuff *et al.*, 1998; Herskovits, 1988; Mellema & Klug, 1972; Miller *et al.*, 1990; Orlova *et al.*, 1997; Pilz *et al.*, 1974; Van Bruggen *et al.*, 1962a; Van Bruggen *et al.*, 1962b; Wichertjes *et al.*, 1990; Wichertjes *et al.*, 1986). Der Kragenkomplex wird aus den übrigen beiden Domänen (*g* und *h*) gebildet (siehe z.B. Cuff *et al.*, 1998; Gebauer *et al.*, 1994; Orlova *et al.*, 1997). Bei der Dissoziation in Untereinheiten wurden Zwischenstufen beobachtet, die darauf hinweisen, dass Untereinheitendimere als „*Repeating Units*“ die Dekamere aufbauen. Dies wird auch durch hochauflösende EM-Analysen bestätigt (Lambert *et al.*, 1994a; Lambert *et al.*, 1994b; Lambert *et al.*, 1995a; Lambert *et al.*, 1995b). Die sauerstoffbindenden Domänen (*a-g* bzw. *a-h*) innerhalb einer Untereinheit sind nicht identisch, sondern unterscheiden sich so stark, dass sie von Antikörpern als verschiedene Proteine erkannt werden. Die limitierte proteolytische Spaltung der Untereinheiten durch Proteasen führt zu einem Gemisch von Domänen. Durch die Wahl der Proteasen kann beeinflusst werden, ob dies zu einem Gemisch der einzelnen funktionellen Domänen oder einem Gemisch von Domänengruppen führt. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Domänenstruktur sowohl beim KLH1 als auch beim KLH2 vollständig aufgeklärt werden (Gebauer *et al.*, 1994; Söhngen *et al.*, 1997). Die isolierten funktionellen Domänen sind weiterhin in der Lage, Sauerstoff zu binden (Van Holde *et al.*, 1992).

4.1 Das Hämocyanin der Schlüssellochschnecke (KLH)

In unserer Arbeitsgruppe wird seit geraumer Zeit an dem Hämocyanin der Großen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* gearbeitet (Albrecht & Markl, 1995; Gebauer *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1993; Harris & Markl, 1992; Harris *et al.*, 1992b; Markl *et al.*, 1991; Markl *et al.*, 1990). Aus historischen Gründen und weil es schon lange kommerziell erhältlich ist, wurde KLH (*Keyhole Limpet* Hämocyanin) in den letzten 30 Jahren zu einem häufig verwendeten experimentellen Antigene in der

immunologischen Grundlagenforschung. Oft wird es außerdem als stark antigener Träger kleiner Moleküle („Hapten-Carrier“) verwendet, gegen die Antikörper hergestellt werden sollen (Asano & Tada, 1989; Helling *et al.*, 1994; Hersh & Dyre, 1974; Maier *et al.*, 1989; Palfreyman *et al.*, 1984). Molluskenhäemocyanine sind Glykoproteine, die einen Kohlenhydratanteil von bis zu 9 % besitzen können (Dawson & Wood, 1983; Drexel *et al.*, 1986; Stoeva *et al.*, 1999; Van Holde *et al.*, 1992; Van Kuik *et al.*, 1990). Aufgrund ihrer komplexen, xenogenen Proteinstruktur enthalten sie eine Vielzahl von Epitopen, die in Vertebraten eine starke Immunantwort auslösen. KLH ist ein wichtiges Agens in der immunologischen Grundlagenforschung (Denizot & Golstein, 1981; Markl, 1987; Ward, 1981) und ist von Bedeutung im klinischen Bereich zum Testen der Immunkompetenz. Es wird als Wirkstoff bei der Immunrezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms eingesetzt (Flamm *et al.*, 1990; Flamm *et al.*, 1994; Jurincic *et al.*, 1988; Jurincic-Winkler *et al.*, 1995a; Jurincic-Winkler *et al.*, 1995b; Lamm *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1974). Außerdem spielt KLH eine gewisse Rolle bei der Immuntherapie des renalen Zellkarzinoms (Bichler *et al.*, 1990; Flamm & Bucher, 1991; Kleinknecht *et al.*, 1992a; Kleinknecht *et al.*, 1992b). Einen Überblick der klinischen und therapeutischen Einsatzmöglichkeiten geben Harris & Markl (1999).

KLH besteht aus den zwei unabhängigen Häemocyanintypen KLH1 und KLH2, die immunologisch zu unterscheiden sind (Gebauer *et al.*, 1994; Markl, 1996; Markl *et al.*, 1991). Die Quartärstruktur des KLH wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken bereits detailliert untersucht (Harris *et al.*, 1997a; Harris *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995a; Harris *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1995b; Harris *et al.*, 1997b) und schließlich durch Einzelpartikelanalyse aus elektronenmikroskopischen Bildern 3D-rekonstruiert (Dube *et al.*, 1995; Meissner, 1998; Orlova *et al.*, 1997). KLH1 und KLH2 bilden die für Gastropodenhäemocyanine typischen Didekamere. Innerhalb des Dekamers sind die Untereinheiten offenbar paarweise angeordnet, so dass eine pentamere Symmetrie entsteht. Dabei liegt das KLH ausschließlich in Form homooligomerer Didekamere vor. Es existieren keine Didekamere, die aus beiden Untereinheiten aufgebaut sind (Gebauer *et al.*, 1994). Die genauere Anordnung der Untereinheiten innerhalb des Dekamers ist unklar. Es wird jedoch angenommen, dass die Untereinheiten leicht zur Zylinderachse geneigt und die funktionellen Domänen in drei Schichten angeordnet vorliegen. Wie bei anderen Gastropodenhäemocyaninen sind die Dekamere bei *Megathura crenulata* auf einer Seite offen. Die gegenüberliegende Seite bildet hingegen einen Kragenkomplex, wahrscheinlich aus den funktionellen Domänen *g* und *h* (Lieb *et al.*, 2000). Die 3D-Rekonstruktion von KLH2 (Meissner, 1998) mit 25 Å Auflösung zeigte keine deutlichen Unterschiede zu der 3D-Rekonstruktion des KLH1 mit 15 Å Auflösung (Orlova *et al.*, 1997). Diese Ähnlichkeit, vor allem im Kragenbereich der beiden KLH Typen war zu diesem Zeit-

punkt unerwartet, da aufgrund der vorliegenden immunologischen Untersuchungen für KLH2 nur von 7 funktionellen Domänen (2a-2g) ausgegangen wurde (Söhngen *et al.*, 1997). Somit war eine deutlich geringere Masse im Kragenkomplex zu erwarten, als dann tatsächlich gefunden wurde. Spätere Untersuchungen zeigten dann tatsächlich, dass eine funktionelle Domäne KLH2-h vorhanden ist (Gebauer *et al.*, 2000).

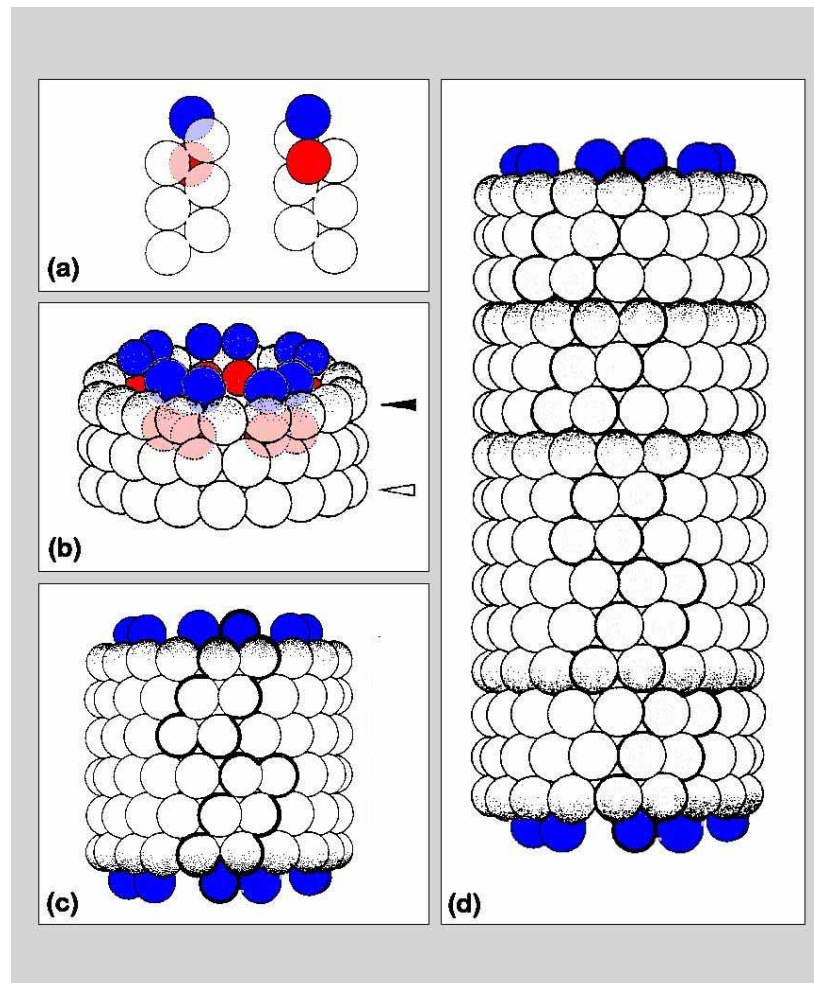


Abb. 1: Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbare Modellvorstellung zur Quartärstruktur von KLH. (geändert nach Gebauer *et al.*, 1994)

- (a) Modell des KLH1-Monomers mit 8 funktionellen Domänen: KLH1-a bis KLH1-f wandständig (weiß), KLH1-g im unteren Bereich des Kragenkomplexes (=Arc **rot**) und KLH1-h im Kragen (= Collar **blau**)
- (b) KLH1-Dekamer, besteht aus 10 Untereinheiten, also insgesamt 80 funktionellen Domänen
- (c) KLH1-Didekamer
- (d) KLH2-Multidekamer

4.2 Das Hämocyanin des Seeohrs *Haliotis tuberculata* (HtH)

Aufgrund der unkomplizierten Hälterung und der besseren Handhabbarkeit bei einigen biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen hat in unserer Arbeitsgruppe *Haliotis tuberculata*, das grüne Seeohr (auch Abalone) - eine enge Verwandte von *Megathura* innerhalb der Prosobranchia -, inzwischen die gleiche Bedeutung erlangt wie *Megathura crenulata*, unser ursprüngliches Hauptforschungsobjekt auf dem Hämocyaninsektor. Abalonen werden in vielen Teilen der Welt seit langem erfolgreich gezüchtet (Aguirre, 1988; Calmorin, 1994; Flassch & Aveline, 1984; Keller, 1998; Leighton, 1989; Owen *et al.*, 1984; Sheehy & Vik, 1981). Vor allem die dekorative Schale, deren Innenseite aus einer dicken Perlmuschel besteht und sie dadurch zu beliebten Schmuck- und Sammelobjekten macht, fördert das Interesse an diesen Tieren. Außerdem werden sie zur Produktion künstlicher Perlen eingesetzt (Catalano, 1995). Hauptsächlich werden sie jedoch zum Verzehr gezüchtet. Der Fuß und die Epipodialmuskeln können nach Entfernen von Eingeweiden und Mantelrand verspeist werden. Schon Ende des letzten und zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde *Haliotis* in bezug auf Systematik, Morphologie und Histologie untersucht (Crofts, 1929; De Lacaze-Duthiers, 1859; Fleure, 1902; Fleure, 1904; Marquand, 1903; Smith, 1888; Stephenson, 1924; Totzauer, 1905). Jüngere Forschung beschäftigt sich mit der Optimierung der Zucht von *Haliotis* (Hahn, 1989; Leighton, 1989; Tegner & Butler, 1985). Auch entwicklungsbiologische (Lebel *et al.*, 1996; Slattery, 1987; Trapido-Rosenthal & Morse, 1986; Vacquier & Youn-Ho, 1993; Van den Biggelaar, 1993) und phylogenetisch-systematische Fragestellungen wurden untersucht (Haszprunar, 1988; Lindberg, 1992; Tillier *et al.*, 1992; Vacquier & Youn-Ho, 1993; Van den Biggelaar, 1993).

Über das Hämocyanin von *Haliotis* existieren Untersuchungen über die Schwankungen der Hämocyaninkonzentration in der Hämolymphe verschiedener *Haliotis*-Arten (Ainslie, 1980b; Pilson, 1965). Sauerstoffbindungsstudien wurden an den Hämocyaninen von *Haliotis ruber*, *Haliotis laevigata* und *Haliotis roei* durchgeführt (Ainslie, 1980a). Daten zur Hämocyaninstruktur existieren aus unserer Arbeitsgruppe an *Haliotis tuberculata* sowie von der neuseeländischen Art *Haliotis iris*, doch sind letztere nicht sehr detailliert (Ellerton *et al.*, 1983; Ellerton & Lankovsky, 1983).

Ähnlich wie das KLH kommt auch HtH in zwei immunologisch unterscheidbaren Isoformen (HtH1 und HtH2) vor (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 1999). Das Verhältnis von HtH1 zu HtH2 in der Hämolymphe liegt in etwa bei 3:1, wobei die Hämocyaninkonzentration in der Hämolymphe von *Haliotis tuberculata* bei 10-15 mg/mL liegt. Die beiden Untereinheiten lassen sich in nativen Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in zwei distinkte Banden auftrennen und besitzen beide eine Molekülmasse von ca. 390 kDa. Jede Untereinheit bildet eigene Didekamere; heterogene Oligomere konn-

ten nicht nachgewiesen werden. Neben den Didekamern wurden elektronenmikroskopisch noch vereinzelt Dekamere beobachtet sowie sehr kurze Multidekamere, die vom HtH2 gebildet werden. Versuche zur immunologischen Verwandtschaft zwischen KLH und HtH zeigten, dass eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit zwischen KLH1 und HtH1 einerseits sowie zwischen KLH2 und HtH2 andererseits besteht (Keller *et al.*, 1999).

Inzwischen konnte in unserer Arbeitsgruppe die Genstruktur und daraus resultierend die Primärstruktur der Polypeptidkette der beiden HtH-Subtypen weitgehend aufgeklärt werden (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 2000; Lieb *et al.*, 1999). Dabei wurde durch ein multiples Sequenzalignment ein evolutionärer Vergleich der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Genfamilie der Molluskenhämocyanine durchgeführt, welcher wie bereits bei früheren Autoren (z.B. Miller *et al.*, 1998) zeigte, dass die einzelnen funktionellen Domänen einer Sorte (z.B. g: SoH-g, OdH-g, HtH1-g) zwischen den verschiedenen Molluskenhämocyaninen eine engere phylogenetische Verwandtschaft aufweisen, als die funktionellen Domänen (a-h) innerhalb einer Spezies (Lieb *et al.*, 2000).

5 3D-Rekonstruktion von Proteinstrukturen aus EM-Aufnahmen

Ausgehend von der ersten 3D-Rekonstruktion des Didekamers eines Gastropodenhämocyanins (*Kelletia kelletia*) in der bahnbrechenden Veröffentlichung von Mellema & Klug (1972) konnte die Aufklärung der Quartärstruktur bei Molluskenhämocyaninen aus EM-Bildern durch computergestützte Bildverarbeitung entscheidend vorangetrieben werden (Lambert *et al.*, 1994b). Dabei lassen sich zwei grundlegend verschiedene Methoden unterscheiden: Die Strukturberechnung durch Auswertung von 2D-Kristallen (Harris *et al.*, 1992b) und die rechnerische Auswertung großer Mengen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen einzelner Moleküle (Dube *et al.*, 1995; Van Heel, 1992).

Bei der kristallographischen Analyse werden die Objekte mittels Diffraktionsmuster, wie bei der Röntgenstrukturanalyse (Blundell & Johnson, 1976), untersucht. Die Elektronenkristallographie aus 2-dimensionalen Proteinkristallen hat, ungeachtet der zerstörerischen Wirkung des Elektronenstrahls auf Makromoleküle, inzwischen nahezu die atomare Auflösung der Röntgenkristallographie erreicht (Henderson *et al.*, 1986).

Kristalle bieten eine hohe Symmetrie, welche gut zur 3D-Rekonstruktion herangezogen werden kann. Da sich jedoch viele Proteine nur recht schwierig kristallin darstellen lassen, ist diese Methode nicht universell einsetzbar.

Eine 3D-Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Transmissionsbildern ist möglich, weil die Abbildungen aus einem Transmissionselektronenmikroskop wie ein Röntgenbild alle Rauminformationen des abgebildeten Gegenstands beinhalten. Mit dem Programm IMAGIC 5 (Van Heel *et al.*, 1996) erfolgt dabei anhand von Klassensummenbildern, welche verschiedene Ansichten des Moleküls als Klassen repräsentieren, eine Winkelrekonstruktion im dreidimensionalen Raum (Orlova *et al.*, 1997). Um verschiedene Ansichten der Projektionsbilder zu erhalten, kann man z.B. eine Kippserie eines Objektes anfertigen, indem mehrere Aufnahmen des gleichen Objektes in verschiedenen Kippwinkeln des Objektträgers gemacht werden (Schatz, 1992). Allerdings ist für diese Methode ein Objekt notwendig, das unter Elektronenbeschuss stabil bleibt und mehrere Aufnahmen ohne Schädigung übersteht. Als Nachteil von Kippserien ändert sich oft die Fokusebene, oder Objekte überstehen den Elektronenbeschuss nicht. In diesem Fall ist nämlich durch das mehrfache Aufnehmen und ggf. durch Nachfokussierung die Elektronendosis sehr hoch. Ein Vorteil der Methode ist, dass die Ansichtswinkel der Projektionen bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Einzelpartikelanalyse angewendet. Diese Methode geht davon aus, dass in einem elektronenmikroskopischen Transmissionsbild Aufnahmen von fixierten Proteinmolekülen in großer Zahl und in vielen verschiedenen Ansichten vorliegen. Jede dieser einzelnen Ansichten trägt Teile der Strukturinformation des Gesamtmoleküls. Richtet man diese Ansichten nun aus, ordnet sie und summiert die verschiedenen Bilder, so verbessert man statistisch die Strukturdetails. Die so erhaltenen verbesserten Bilder zahlreicher Ansichten sind Grundlage für eine 3D-Rekonstruktion. Neben der Qualität des Ausgangsmaterials sowie der elektronenmikroskopischen Aufnahmen spielt die Präparation der Probe eine wesentliche Rolle. So nimmt z.B. die prozentuale Verteilung der Ansichtswinkel auf das Molekül offensichtlich Einfluss auf die Qualität der 3D-Rekonstruktion.

Seit der Publikation der KLH1-Rekonstruktion bei 15 Å Auflösung (Orlova *et al.*, 1997), wurden bislang keine besser aufgelösten 3D-Rekonstruktionen von Molluskenhämocyaninen aus EM-Bildern veröffentlicht. Allerdings ist es gelungen, die 3D-Struktur der funktionellen Domäne g aus *Octopus* über Röntgenstrukturanalyse aufzuklären (Cuff *et al.*, 1998). Mit Hilfe dieser Tertiärstruktur wurden bereits Versuche unternommen, die funktionelle Domäne g in eine Dichtekarte aus EM-Rekonstruktionen einzupassen (Cuff, persönliche Mitteilung)(Mouche *et al.*, 1999), was aber aufgrund der dazu verwendeten 3D-Rekonstruktionen aus EM-Daten, welche in Auflösungsbereichen jenseits der 20 Å lagen, nicht recht gelang. Bei den Gastropodenhämocyaninen kommt ist zudem der Kragenbereich asymmetrisch im Dekamer orientiert ist, was die Lage der „Arc“-Domänen (vgl. Abb. 1), welchen Kopien der funktionellen Domäne g zugeordnet

pien der funktionellen Domäne g zugeordnet werden (Gebauer & Harris, 1999; Lamy *et al.*, 1998; Mouche *et al.*, 1999; Orlova *et al.*, 1997), schwer interpretieren lässt. In der vorliegenden Arbeit, die in Teilen bereits veröffentlicht ist (Meissner *et al.*, 2000), wird nun eine 12 Å aufgelöste 3D-Rekonstruktion des Molluskenhämocyans HtH1 vorgestellt, mit der eine deutlich bessere Aufklärung der Quartärstruktur dieser Riesenproteine möglich wird.

6 Ziel der Arbeit

Es war Ziel dieser Arbeit, eine höhere Auflösung bei der 3D-Rekonstruktion eines Molluskenhämocyans Didekamers am Beispiel des HtH1 zu erreichen, um das Untereinheitendimer, die Untereinheiten und die Anordnung der einzelnen funktionellen Domänen zu identifizieren. Hierzu wurde aus folgenden Gründen das HtH1 gewählt:

- (1) Es lässt sich relativ schonend in großer Menge aus der Hämolymphe von *Halio-*
tis isolieren und liegt dabei quantitativ als Didekamer vor (Keller *et al.*, 1999).
- (2) Es ist vollständig sequenziert (Lieb *et al.*, 2000).

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Tiere

1.1.1 Systematische Einordnung der Tiere

Linné (Linneaus, 1740) benannte die Gattung der von mir untersuchten Tiere aufgrund ihrer charakteristischen Schalenform (siehe Abb. 2) als *Haliotis*, was Seeohr bedeutet. In Gourmetkreisen ist *Haliotis* auch als Abalone oder Meerohr bekannt.

Das Grüne Seeohr, *Haliotis tuberculata*, ist eine marine Schnecke, die in der Klasse der Gastropoda der Unterklasse der Vorderkiemer (*Prosobranchia*) zugeordnet ist. Die Familie Haliotidae, der *Haliotis tuberculata* angehört, ist mit der Familie der Fissurellidae, zu denen *Megathura crenulata* - das andere Forschungsobjekt unserer Arbeitsgruppe – zählt, nah verwandt. Beide sind Vertreter der Ordnung der Altschnecken, Archaeogastropoda oder Diotocardia, welche die ursprünglichste Ordnung in der Klasse der Gastropoda ist. Allerdings ist die exakte systematische Einordnung der Altschnecken noch umstritten (Hickmann, 1988).

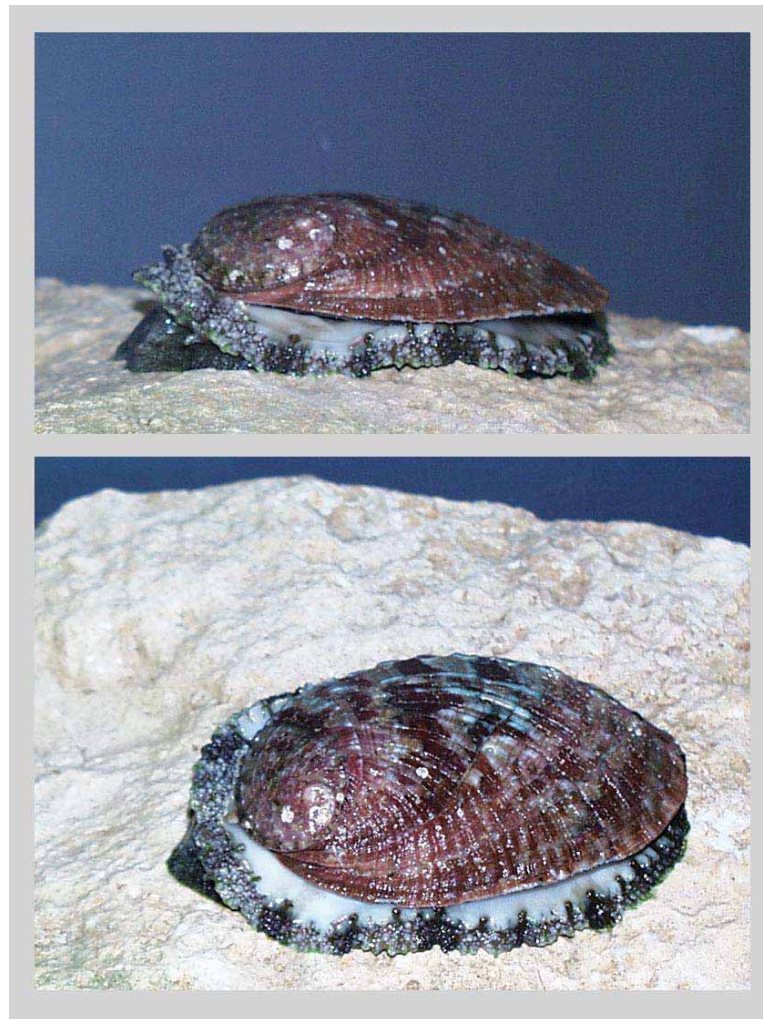


Abb. 2: Das Grüne Seeohr *Haliotis tuberculata*

1.1.2 Habitat

Haliotis tuberculata besiedelt das Sublitoral und die Flachwasserzone des Meeres. Stark vertreten sind diese Mollusken vor allem in einer Tiefe zwischen 9 und 12 Metern; sie sind jedoch darüber hinaus bis zu einer unbestimmten Tiefe zu finden.

Tagsüber sind die Tiere meist auf der Unterseite von Felsen und Steinen zu beobachten. Sie zwängen sich häufig in enge Spalten und Zwischenräume und bevorzugen die Dunkelheit. Nachts verlassen sie ihre Zufluchtsstätten.



Bevorzugt lebt *Haliotis tuberculata* an sauberen felsigen Küstenabschnitten mit prägnantem Tidenhub und gut belüftetem Wasser, während sie dort, wo sandiger Untergrund vorherrscht, nicht zu finden ist, weil dadurch ihre Respiration beeinträchtigt wird. Zudem wird in diesem Habitat das Anhaften am Substrat erschwert und das Wachstum bestimmter Makroalgen, die sie abweidet, verhindert.

1.1.3 Geographische Verbreitung

Die Gattung *Haliotis* ist sowohl in tropischen als auch in gemäßigten Meeren weit verbreitet. *Haliotis tuberculata* ist die für den Ärmelkanal und die französische Atlantikküste typische Art: Sie ist an allen felsigen Küsten Frankreichs, der Kanalinseln und Großbritanniens zu finden, kommt aber auch im Mittelmeer vor. Die verwendeten Tiere wurden uns freundlicherweise von der Firma S.M.E.L. (Frankreich) zur Verfügung gestellt.

1.2 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien lagen in Analysenqualität vor. Sie wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Boehringer Mannheim, Dianova (Hamburg), Gibco Life Technologies (Eggenstein), ICN Biomedicals (Meckenheim) und Plano (Marburg) in Analysenqualität bezogen.

1.3 Hämocyanine von *Haliotis tuberculata* (HtH1 und HtH2)

1.3.1 Ausbluten der Tiere

Es wurde Hämolymphe von Wildfängen der französischen Atlantikküste untersucht. Die Tiere wurden direkt nach ihrer Ankunft entblutet. Die Tiere wurden hierzu äußerlich gereinigt. Zur Hämolymphegewinnung wurden sie einzeln in Kunststoffbeutel verpackt und auf Eis gelegt. Nach zwei bis drei Stunden unter Frostbedingungen hatten die Tiere einen Großteil ihre Hämolymphe durch die Haut abgegeben. Die Hämolymphe wurde dann direkt aus dem Kunststoffbeutel, in den die Schnecken sie abgaben, in Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Als Proteaseinhibitor wurde 1 mM PMSF hinzugegeben (Keller *et al.*, 1999).



1.3.2 *Haliotis tuberculata* Hämocyanin Typ I (HtH1)

Das Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* besteht aus einem Gemisch der beiden Isoformen, HtH1 und HtH2, die immunologisch andersartige funktionelle Domänen besitzen, jedoch auch teilweise sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen. Um eine 3D-Rekonstruktion des Aufbaus des HtH1 durchzuführen, ist es deshalb notwendig, dieses aus dem Gemisch von HtH1 und HtH2 zu isolieren (Keller *et al.*, 1999).

1.3.3 Bereitstellung des Hämocyanins

Die Isolierung des HtH1 erfolgte wie in (Keller *et al.*, 1999) beschrieben. Herr Rolf Lehnert hat im Rahmen seiner Diplomarbeit die Trennung der HtH-Subtypen durchgeführt und mir somit das HtH1 zur Verfügung gestellt. Nach der Isolierung von HtH1 wurde dies direkt mit Stabilisierungspuffer (pH 7,4) so stabilisiert, dass in der Lösung ausschließlich Didekamere vorlagen und sofort für die weitere Verwendung im Elektronenmikroskop präpariert.

1.4 Elektronenmikroskope

Es wurden zwei verschiedene Mikroskope verwendet: Ein konventionelles Elektronenmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss 900), um die Proben während und nach den einzelnen Reinigungsschritten mittels negativer Kontrastierung auf die Qualität und die Aggregationszustände der HtH-Moleküle zu überprüfen. Das zweite verwendete Mikroskop war ein mit einer Feldemissionskanone ausgerüstetes Gerät der Firma Philips (CM20 FEG (*Field emission gun*)). Das Gerät war am Institut für Tumorforschung der Universität Marburg installiert. Mit ihm wurde die hochauflösende Mikroskopie anhand von kryofixierten Proben (negativ kontrastiert oder eiseingebettet) für die 3D-Rekonstruktion durchgeführt (siehe unten).

1.4.1 Zeiss 900

Das Zeiss 900 ist ein konventionelles Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit einer Beschleunigungsspannung von 50-80 kV. Die Primärvergrößerung des Gerätes ist von 150 bis 250.000fach einstellbar. Die Aufnahmen wurden bei 80 kV auf Kodak 4489 Film mit Belichtungsautomatik bei minimaler Strahlenbelastung der Probe gemacht (siehe Ergebnisse, Elektronenmikroskopische Kontrolle).



1.4.2 Philips CM20 FEG (*Field emission gun*)

Das Philips CM20 ist ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit einer Stickstoffgekühlten Probenkammer, welche das Arbeiten mit kryopräparierten Proben ermöglicht. Es kann mit einer Beschleunigungsspannung bis zu 200 kV betrieben werden. Die Kohärenz des Elektronenstrahls wird durch die Feldemissionskanone stark gegenüber konventionellen Glühkathoden verbessert, was in Verbindung mit der hohen Beschleunigungsspannung zu wesentlich besseren Aufnahmen gegenüber dem Zeiss Elektronenmikroskop führt (siehe Ergebnisse, Aufnahmen von in glasartigem Eis eingebetteten HtH1-Didekameran am Philips CM20 FEG).



Abb. 3: Aufbau des Philips CM20 FEG Elektronenmikroskops (Standort Marburg, IMT)



1.5 Hardware

1.5.1 Computer

Scan-Computer: Digital PC 486DX100 16 MB RAM, SCSI-Adapter, Netzwerkkarte, Graphikkarte ET4000, OS: DOS/Win95

Rekonstruktions- und 3D-Modelling-Computer: DEC-Alpha 433 MHz, 384 MB RAM, OS: DEC-UNIX

Bildbearbeitungs-Computer: Fujitsu PII-400, 128 MB RAM, OS: Windows-NT 4.0

3D-Fitting: Siemens Xpert PIII-500, 128 MB RAM, OS: Windows-NT 4.0

1.5.2 Scanner

EM-Scanner EmIL

Der Scanner (Abb. 4), der zum Digitalisieren der elektronenmikroskopischen Aufnahmen negativ kontrastierter Moleküle eingesetzt wurde, ist ein Produkt der Fa. OptoTech, Hannover. Neben einem Stativ und einem Leuchtkasten besteht die Einheit aus einer SCSI-Box und einer hochauflösenden 12 Bit Raster-Scan Balgen-Kamera mit einem Objektiv (Rodagon WA 1:4, f=60 mm) der Fa. Rodenstock. Die Blende kann über das Objektiv geregelt werden, während der Fokus über das Stativ verändert wird. Die Fokussierung konnte wesentlich verbessert werden, indem wir durch unsere Institutswerkstatt einen Feintrieb am Stativ einrichten ließen. Die Einstellung und Überprüfung des Fokus wird später bei der Beschreibung der Software beschrieben (siehe unten).

Die Sekundärvergrößerung gegenüber dem EM-Negativ und damit die Dimensionierung ($\text{\AA}/\text{Pixel}$) in dem Scan lässt sich aus einer Eichkurve in Abhängigkeit des Balgenauszugs bei optimaler Fokussierung entnehmen.

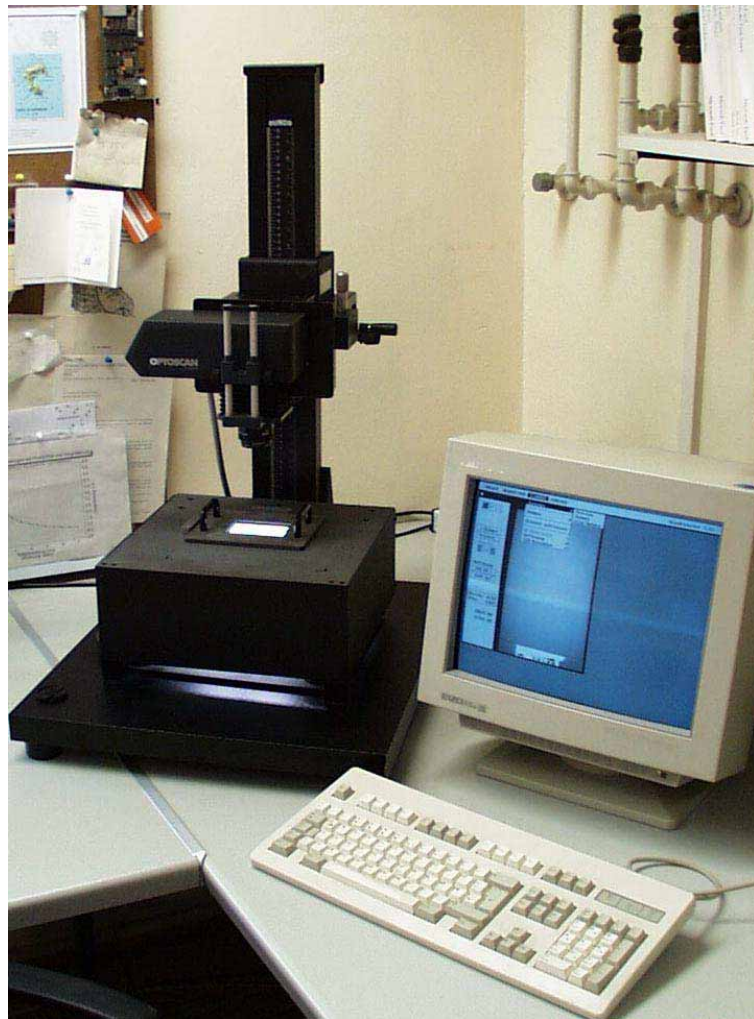


Abb. 4: Aufbau der Scaneinrichtung.

Rotationsscanner Tango

Zum Scannen der Aufnahmen von den in amorphem Eis eingebetteten Molekülen wurde ein Rotationsscanner Tango (Standort Marburg, IMT) der Firma Heidelberger Druckmaschinen, Heidelberg eingesetzt. Die Negative wurden dabei mit 16-Bit Graustufen in der gleichen Vergrößerung wie die o.a. negativ kontrastierten Bilder eingescannt.

1.5.3 Rapid Prototyping

Rapid Prototyping ist ein „3D-Druckverfahren“ (Abb. 5), bei dem als Resultat ein Körper (die Größe ist abhängig von der Größe der Probenkammer, hier: max. 20cm x 25cm x 20cm = L x B x H) entsteht. Dabei wird in einer Modellkammer jeweils eine definierte Schicht eines Granulats aufgetragen und im Anschluss mit einem Druckkopf - analog zu einem Tintenstrahldrucker - ein Binder in Form einer Schnittschicht des Modells darauf gedruckt. Dies wird Schicht für Schicht wiederholt. Da an den Stellen, wo der Binder aufgetragen wird, das Material gebunden wird, entsteht in der Modellkammer ein 3D-Körper des gewünschten Objekts. Dies kann durch einfaches Absaugen des überschüssigen Materials freigelegt werden. Um dem Modell im Anschluss zusätzliche Festigkeit zu verleihen wird die Oberfläche mit Sekundenkleber fixiert.

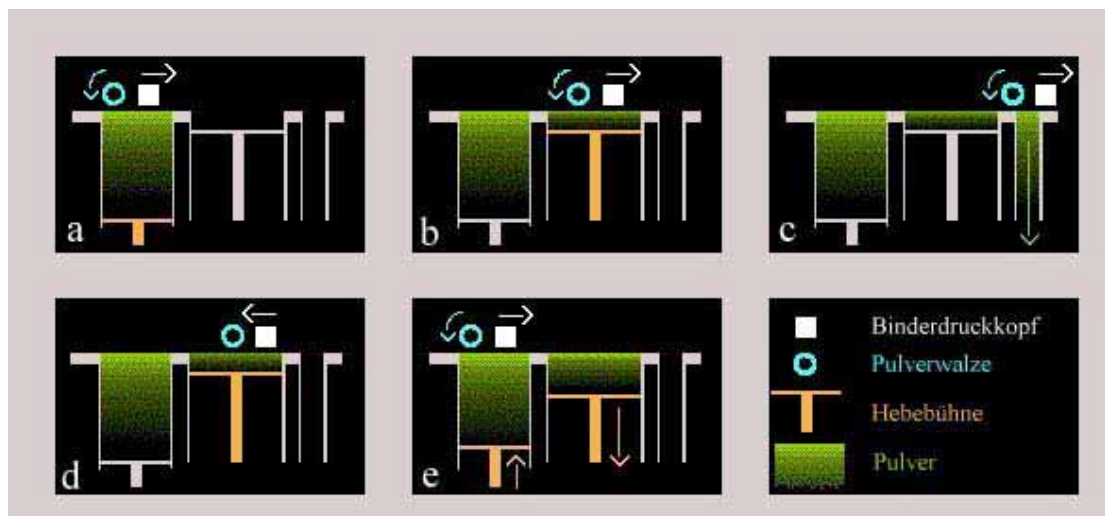


Abb. 5: Schematische Darstellung des rapid Prototyping-Verfahrens (nach Z-Corp.)

- (a) und (b) Service-Kopf (bestehend aus Pulverwalze und Druckkopf) verteilt Pulver aus der Vorratskammer (links) über der Baukammer (Mitte)
- (c) Überschüssiges Pulver fällt in den Abfallschacht (rechts).
- (d) Mit dem Binder wird eine Schicht des 3D-Modells auf das Pulver in der Baukammer gedruckt
- (e) Die Hebebühne in der Vorratskammer hebt sich, während sich die in der Baukammer um eine Schichtdicke senkt. Darauf wird erneut eine Pulverschicht in der Baukammer aufgetragen (b).



Das Verfahren, das in Deutschland erst seit Januar 1999 etabliert ist, hat gegenüber herkömmlichen 3D-Modellierungsverfahren wie Stereolithographie den großen Vorteil, dass die Statik der gefertigten Teile während der gesamten Entstehungszeit in dem umgebenden Pulver gewährleistet ist. Somit sind keine Unterbauten und Stützkonstruktionen, wie sie in der Stereolithographie üblich sind, nötig. Eine aufwendige Nachbearbeitung der Modelle wird dadurch überflüssig.

Das Modell des HtH1 wurden nach diesem Verfahren bei der Firma 4D-Concepts in Groß-Gerau mit einem Rapid Prototyper Z402 der Fa. Z-Corperation, Boston, USA gefertigt.

1.5.4 Digitalkamera

Zur Aufnahme des HtH1-Modells und der Apparaturen wurde eine Digitalkamera, Modell C-1400XL der Firma Olympus verwendet.

1.6 Software

1.6.1 Scannersoftware

Zum Scannen unter Verwendung des o.a. EM-Scanners der Fa. Optoscan wurde die DOS-Software ScanDirector 3.63 eingesetzt. Das Programm bietet eine menügeführte graphische Oberfläche, in der alle Operationen per Mausklick ausgeführt werden können. ScanDirector 3.63 benötigt neben dem EM-Scanner als zusätzliche Hardwarekomponente eine spezielle Graphikkarte (ET2000 von Zen-Labs), weshalb eine aufwendige Rechnerkonfiguration nötig ist. ScanDirector 3.63 beinhaltet neben einer Auswahl an Rahmen- und Auflösungsoptionen auch Tools zur Fokus- und Blendeneinstellung des Scanners, bei denen mittels einer Oszilloskop-Funktion diese Werte anhand einer manuell getroffenen Auswahl im Bild optimiert werden können. Mit dieser Oszilloskop-Funktion lässt sich die Kontraststeilheit der Grauwertfunktion maximieren, die im Bereich von Kanten oder Helligkeitsunterschieden im Bild deutliche, vom Fokus abhängige Übergänge zeigt. Daraus resultiert eine Optimierung der Fokuseinstellung.

Zum Digitalisieren der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde jeweils ein Viertel eines Negativs mit maximaler Auflösung gescannt und als TIF- Datei (=Tagged Image Format) mit 6000 x 5000 Pixel Kantenlänge auf die lokale Festplatte gespeichert.



1.6.2 Software zur 3D-Rekonstruktion: IMAGIC 5

IMAGIC 5 (Firma Image Science, Berlin) ist ein modular aufgebautes Softwarepaket, dessen einzelne Module als Unterprogramme aus einer Benutzeroberfläche durch Eingabe von Befehlen an einem Prompt aufgerufen werden. Dabei werden die Befehle von einem Parser interpretiert. Dieser Parser ermöglicht gleichzeitig, in jeder Situation (auch innerhalb der Unterprogramme) Systemkommandos abzusetzen. Die einzelnen Programme werden durch interaktive Sequenzen eingeleitet, in denen der Benutzer in einem Dialog die Funktions- und Berechnungsparameter eingibt. Das Programm ist zudem skriptfähig, was bedeutet, dass man in einer Stapeldatei verschiedene Unterprogramme abarbeiten kann, wobei die gewünschten Parameter ebenfalls an die Stapeldatei übergeben werden müssen. IMAGIC stellt eine Art Makrorekorder zur Verfügung, mit dem Stapeldateien erstellt werden können.

Das IMAGIC-Dateiformat ist ein wichtiger Bestandteil der Software, da sie das Speichern ganzer Bilddatensätze in einem Dateien-Duplett ermöglicht: Die Bildinformationen (=Pixeln) aller Bilder werden dabei in einer Image-Datei gespeichert, während alle Informationen über die Einzelbilder in einer Header-Datei abgelegt werden. Somit ist es möglich z.B. viele verschiedene Einzelbilder in einer Datei zusammenzufassen.

Im folgenden werden die wichtigsten IMAGIC 5 Programme kurz angesprochen.

- IMPORT-EXPORT dient zur Dateikonvertierung der von IMAGIC unterstützten Dateiformate, z.B. Tif nach IMAGIC oder umgekehrt. Nicht unterstützte Dateiformate mussten über weitere Konvertierprogramme zugänglich gemacht werden (siehe unten).
- DISPLAY bietet viele Möglichkeiten der Darstellung von Bilddateien im IMAGIC-Format: Dabei werden die Bilder in einem X-Window dargestellt, während ein Textfenster zum Dialog geöffnet bleibt. DISPLAY bietet die Möglichkeit verschiedener Darstellungen, z.B. Zoom, Lupe im Mausbereich, Relativierung von Grauwerten oder absolute Grauwertdarstellung, Inversdarstellung u.v.m. Allerdings ist DISPLAY auch in der Lage interaktiv Koordinaten mit der Maus aus einem Bild auszuwählen und in Dateien zu speichern. Dies spielt vor allem bei der Auswahl von Molekülen aus den ursprünglichen Scan-Dateien (siehe unten: Auswählen und Extrahieren von Einzelmolekülen vom Negativ) oder beim Maskieren von Molekülen eine Rolle.
- SUBFILE kann interaktiv oder anhand von Koordinatendateien Bildbereiche ausschneiden und in IMAGIC-Dateien speichern.



- Der INC-PREP Filter dient zum Bandpassfiltern von Bildern, bei denen hohe und niedrige Frequenzen herausgefiltert werden (siehe unten: Der Band-Pass-Filter).
- HUGE-ALI ist eine Routine, die Bilder aus IMAGIC-Dateien mit Referenzbildern vergleicht und gegen diese ausrichtet (siehe unten: Das Alignment).
- Verschiedene MSA-Programme dienen zur Klassifizierung und zum Aufsummieren der ähnlichen einzelnen Ansichten zu Klassenbildern (siehe unten: Klassifizierung und multivariate statistische Analyse (MSA))
- SINOGRAMM erstellt Sinogramme (siehe unten: Erstellen von Sinogrammen), mit denen das Programm ...
- ... EULER eine Zuweisung von Raumwinkeln anhand von Referenzen vornimmt (siehe unten: Bestimmung der Eulerwinkel mit dem IMAGIC-Modul EULER).
- TRUE-THREED ist dann in der Lage anhand dieser Winkel eine 3D-Dichtekarte anzulegen, welche als IMAGIC-Datei einer Schnittserie durch das Molekül gespeichert wird (siehe unten: 3D-Rekonstruktion).
- THREED-SURFACE-VIEW berechnet dann anhand eines manuell gewählten Schwellenwertes eine oberflächengerenderte Ansicht des 3D-Objektes (siehe unten: Rendern der 3D-Oberfläche).
- THREED-FORWARD bietet die Möglichkeit Rückprojektionen des 3D-Objektes aus beliebigen Ansichtswinkeln zu berechnen, und somit Referenzen für ein weiteres Alignment oder bessere Winkelbestimmungen vorzunehmen (siehe unten: Rückprojektionen von 3D-Bildern).

1.6.3 Bildnachbearbeitung

Die Bildnachbearbeitung, wie Einfärbung, Vergrößerung und Anordnung zu Stereopaaren erfolgte mit Standardsoftware wie Corel-Photopaint und Paint-Shop Pro. Die Fourier-Transformation zur Analyse von Gitterstrukturen in der geöffneten Wand und in dem geöffneten Gesamtmolekül wurde anhand der Transmissionsbilder (Rückprojektionen) mit Crisp durchgeführt.



1.6.4 Prototyping-Software

Das Prototyping des HtH1 Modells erfolgte bei der Fa. 4D-Concepts in Groß Gerau. Die Ausgabe auf einer Prototyping-Maschine erfolgt mit einer erweiterten Treiber- und Analyse-Software von der Fa. Z-Corporation, Boston, USA. Sie wird vor allem zum Modellieren von Prototypen für die Autoindustrie und produzierende Wirtschaft genutzt. Das Programm verwendet als einziges Standard-Datenformat STL-Dateien. Diese beschreiben die Oberflächenstruktur des zu produzierenden Körpers in vektorieller Form. Das STL-Dateiformat wird in erster Linie von Entwicklungs-Software für 3D-Objekte unterstützt, z.B. CAD-Anwendungen.

1.6.5 Sequenz-Alignment

Die Sequenzen wurden mit ClustalW (1.7) und Swiss-PDB-Viewer aligniert.

1.6.6 Molekulare Modellierung und Fitting

Das molekulare Modellieren wurde parallel mit dem Swiss-PDB-Viewer (lokal) und dem Online Dienst SWISS-MODELL (via Internet) durchgeführt. Das Einpassen der 3D-Sequenz in die 3D-Dichtekarte der 12 Å-Rekonstruktion aus EM-Bildern erfolgte dann wiederum mit Hilfe des Swiss-PDB-Viewers. Die Datenkonvertierung der IMAGIC-Daten erfolgte hierbei über einen Spezialkonverter, den mir die Firma Image Science (Berlin) kurzfristig als IMAGIC-Modul (I-T-X) zur Verfügung stellte.

1.6.7 Datenkonvertierung der benutzten Dateiformate

Es waren mehrere Konvertierungsschritte nötig, um eine 3D-Datei, wie sie von IMAGIC als Resultat der 3D-Rekonstruktion ausgegeben wird, in anderen 3D-Anwendungen (O, IRIS-Explorer, STL-Prototyping-Software) zu verwenden. Als Zwischenkonverter wurden folgende Programme verwendet:

IMAGIC nach IRIS-Explorer

Das Modul „IMPORT-EXPORT“ von IMAGIC ist in der Lage, IMAGIC-3D-Dateien im MRC-Format auszugeben, welche vom IRIS-Explorer gelesen werden können.



IMAGIC nach Mapman

Um die 3D-Daten von IMAGIC in O verwenden zu können, müssen sie erst mittels Mapman weiter konvertiert werden. Dazu lässt man sich vom Modul „IMPORT-EXPORT“ in IMAGIC eine CCP4-Datei ausgeben, die man mit Mapman wiederum lesen kann.

Mapman nach O

Die CCP4-Datei, die mit Mapman gelesen wurde, kann von dort als BRIX-Datei ausgegeben werden. BRIX-Dateien sind von O aus lesbar, genauso wie PDF-Dateien, die eine 3D-Darstellung von Aminosäuresequenzen beinhalten.

IRIS-Explorer nach OpenInventor

Der IRIS-Explorer ist in der Lage, Dateien im IV-Format (OpenInventor, SGI) zu speichern. Dieses Format beinhaltet bereits eine Oberflächen-Darstellung des Körpers. Die Körperoberfläche wird dabei als Komplex triangularer Basisflächen berechnet.

OpenInventor nach STL (Iv2STL)

Iv2STL ist ein Konvertierungsprogramm für SG-Unix, nach dessen Anwendung noch eine weitere Konvertierung STL-ASCII nach STL (binär) nötig war, die von der Firma 4D-Concept (Groß Gerau) durchgeführt wurde.

2 Elektronenmikroskopische Methoden

2.1 Negative Kontrastierung zur Kontrolle von Proben am Zeiss-EM in Mainz

Die negative Kontrastierung bei Raumtemperatur diente zur Kontrolle der Stabilität von Didekameran nach der Isolierung und Probenvorbereitung (Zeiss Elektronenmikroskop, Mainz). Zur negativen Kontrastierung wurde eine HtH1-Probe mit Stabi-



lisierungspuffer auf eine Endkonzentration der Probe von 0,25 mg/mL verdünnt. Von dieser Probe wurden dann 10 μ L auf ein kohlenstoffbeschichtetes, glimmentladenes 200 mesh Kupfer-Grid gegeben. Nach 10 Sekunden wurde das überflüssige Probenvolumen mit Filterpapier abgesaugt. Daraufhin wurde Kontrastmittel (5% Ammoniummolybdat mit 1% Trehalose) aufgetropft und nach 5 Sekunden ebenfalls abgesaugt. Im Anschluss erfolgten 4 Waschschriffe mit Aqua dest. auf die gleiche Weise, um überschüssiges Färbemittel zu entfernen (Harris, 1997; Harris, 1999).

2.2 Negative Kontrastierung zur 3D-Rekonstruktion am Philips CM20 FEG in Marburg

Zur negativen Kontrastierung für die Hochauflösung, wie sie zur 3D-Rekonstruktion nötig ist, wurde wie zur Kontrolle eine HtH1-Probe mit Stabilisierungspuffer auf eine Endkonzentration der Probe von 0,25 mg/mL verdünnt und dann Kontrastmittel (Ammoniummolybdat) zugegeben. Von dieser Probe wurden 5 μ L auf ein kohlenstoffbeschichtetes, glimmentladenes 200 mesh Kupfer-Grid gegeben. Nach 10 bis 20 Sekunden wurde das überschüssige Probenvolumen mit Filterpapier bis zur Trockenheit abgesaugt. Direkt im Anschluss wurde mittels einer Guillotine (Abb. 6) das Kupfer-Grid in flüssiges Ethan überführt und schockgefroren. Von dort wurde es in flüssigen Stickstoff überführt und bis zum Mikroskopieren aufbewahrt (Orlova *et al.*, 1997).

Sehr ähnlich ist auch die Methode, die von Adrian *et al.* (1998) beschrieben wurde.

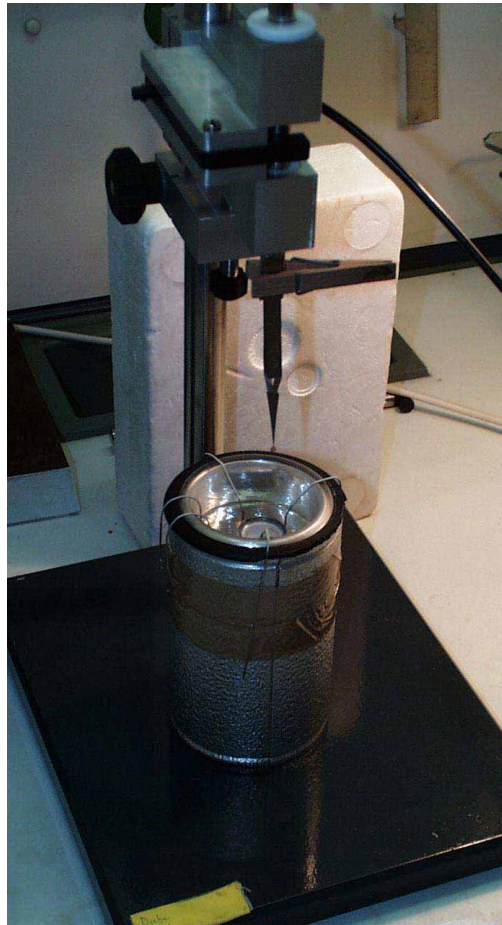


Abb. 6: Guillotine zum Schockgefrieren von EM-Grids bei der Präparation für Kryoelektronenmikroskopie

2.3 Eiseingebettete Präparation (nicht kontrastiert) zur 3D-Rekonstruktion am Philips CM 20 FEG in Marburg

Die Präparation von eiseingebetteten HtH1-Didekameren diente zur Gewinnung des zweiten Datensatzes für die 3D-Rekonstruktion des HtH1 (300 kV Elektronenmikroskop, Marburg).

Durch diese Präparationsmethode konnte die HtH1-Probe schonend kryofixiert werden, indem die Bildung von Eiskristallen vermieden wurde. Statt dessen wurden die



Moleküle in amorphem Eis unter milden Bedingungen eingeschlossen (Adrian *et al.*, 1984; Adrian *et al.*, 1990).

Dieser zweite Datensatz wies eine wesentlich bessere Verteilung der Ansichtswinkel auf, als sie der Datensatz aus der negativen Kontrastierung erlaubte. Bei letzterem bevorzugten die Didekamere nur Lagen, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Aufsichten und reine Seitenansichten erschienen. Bei dem Datensatz aus der Präparation von eiseingebetteten HtH1-Didekameren ließen sich nahezu in allen Freiheitsgraden orientierte Moleküle darstellen (vgl. Ergebnisse). Wie bei der negativen Kontrastierung wurde eine HtH1-Probe mit Stabilisierungspuffer verdünnt. Allerdings lag hier die Endkonzentration der Probe idealerweise beim zwei- bis dreifachen der negativen Kontrastierung: Also bei 0,5 bis 0,8 mg/mL. Von dieser Probe wurden dann 4 μ L auf ein kohlenstoffbeschichtetes, glimmentladenes Kupfer-Grid gegeben. Allerdings wies der Kohlenstofffilm bei dieser Form der Präparation Löcher auf, in denen sich durch Oberflächenspannung dünne Filme der Probenlösung bildeten. Nach 10 bis 20 Sekunden wurde das überschüssige Probenvolumen mit Filterpapier abgesaugt. Direkt im Anschluss wurde mittels einer Guillotine (siehe Abb. 6) das Kupfer-Grid in flüssiges Ethan überführt und schockgefroren (Harris & Adrian, 1999). Von dort wurde es in flüssigen Stickstoff überführt und bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

2.4 Defokusreihen zur Auflösungsverbesserung (Abhängigkeit der Fourier-Schalenkorrelation (FSC) von der CTF)

Die Phasenkontrasttransferfunktion (CTF, siehe Anhang) ist abhängig vom Defokus. Vergleicht man die FSC-Kurve eines Datensatzes, der bei einem konstanten Defokus aufgenommen wurde, mit der zugehörigen CTF, so sieht man, dass die Auflösungsgrenze in etwa bei dem ersten Nulldurchlauf der CTF liegt (Abb. 7). Das liegt daran, dass aufgrund der Lauflänge des Lichtes in diesem Defokus bestimmte Ortsfrequenzen zur Beschreibung des Objektes nicht mehr aufgelöst werden. Abhilfe soll die Aufnahme von Bildern bei mehreren verschiedenen Defokuswerten bringen, die in die 3D-Rekonstruktion eingehen. Auf diese Weise werden Informationslücken, die in der FSC als Beeinträchtigung der tatsächlich aufgelösten Struktur erscheinen, ausgeglichen, indem Nulldurchläufe, welche bei einem einzigen Defokus zum Informationsverlust bei bestimmten Wellenlängen führen, durch Defoki kompensiert werden. Aufgrund der Abhängigkeit CTF vom Defokus, haben Aufnahmen bei anderen Defokuswerten andere Informationslücken. Eine Überlagerung führt also zu einer Kompensation dieser Nulldurchläufe (siehe Ergebnisse: Abb. 17).

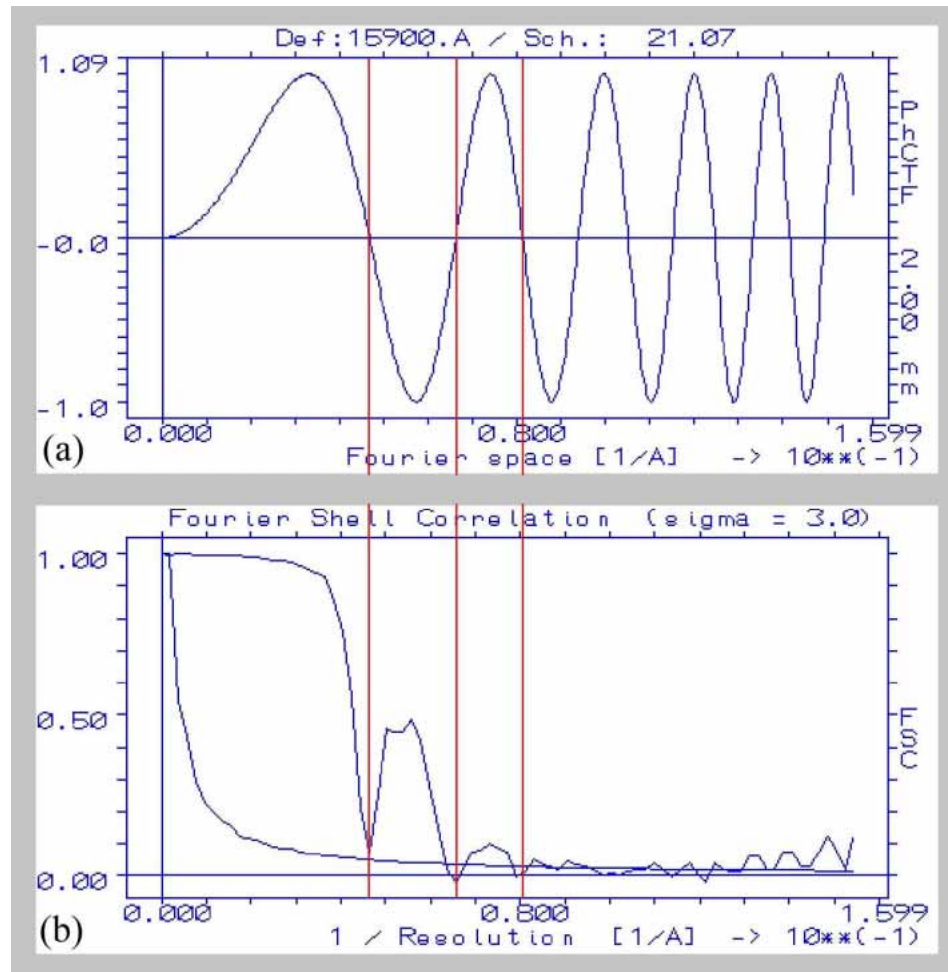


Abb. 7: Vergleich der Kontrasttransferfunktion (a) mit der Fourier-Schalenkorrelation (b) zur Auflösungsbestimmung. Dabei zeigt sich, dass die Auflösungsgrenze durch den zweiten Nulldurchlauf der CTF bestimmt wird. Hier als Beispiel eine Ausgabe von IMAGIC zur FSC von der 3D-Rekonstruktion von Hth1 aus den Bildern bei einem Defokus von 1,0 μm (vgl. Ergebnisse)

3 Methoden zur 3D-Rekonstruktion aus EM-Bildern und Bildbearbeitung

3.1 Kristallographie

Über die Beugungsmuster von Kristallen lassen sich mit Hilfe empirischer und mathematischer Methoden Molekülstrukturen ermitteln. Anwendung findet diese Möglichkeit der 3D-Rekonstruktion in der Röntgenkristallographie, mit deren Hilfe die atomare Auflösung chemischer Verbindungen aufgeklärt werden kann. Die Bestimmung von Röntgenstrukturen ist allerdings durch die Molekülgröße sowie durch die Fähigkeit zur Kristallbildung der zu untersuchenden Substanz beschränkt (Walz & Grigorieff, 1998).

Ebenso wie bei Röntgenbeugungsmustern ist auch die Untersuchung der Elektronenbeugung möglich. Neben den gleichen Einschränkungen wie bei der Röntgenkristallographie hat die Elektronenkristallographie jedoch den Vorteil, dass man die Objekte nicht nur im Beugungsbild, sondern auch im Realbild betrachten kann. Auf diese Weise lassen sich die Proben besser beurteilen als im Beugungsbild. Der Verlust der Phaseninformation im Beugungsmuster ist also im Elektronenmikroskop reversibel, wodurch die Realbildinformation nicht erst berechnet werden muss. Die erreichbare Auflösung dieser Methode liegt bei ca. 3 Å. Eine Analyse von Molekülen größer als 40 Å Durchmesser ist allerdings zur Zeit noch nicht ohne weiteres möglich, da bisher eine Kristallisierung noch nicht gelungen ist. Daher ist die Aufklärung der Quartärstruktur von Riesenproteinen wie HtH1 mit dieser Methode nicht möglich (Harris *et al.*, 1992a; Harris & Holzenburg, 1995; Harris *et al.*, 1992b).

3.2 Kippserienanalyse

Eine andere Möglichkeit, aus elektronenmikroskopischen Bildern eine 3D-Rekonstruktion zu erhalten, orientiert sich an der Computer-Tomographie (CT), bei der Aufnahmen aus bekannten, sich ändernden Winkeln von einem Objekt gemacht werden. Die Aufnahmen eines Objektes in einer Kippwinkelserie führt dann über eine Rückrechnung aus den bekannten Kippwinkeln zu einer 3D-Rekonstruktion des Objektes. Der Nachteil dieser Methode im Elektronenmikroskop ist, dass mehrfach bestrahlt werden muss. Biologische Substanzen reagieren sehr empfindlich auf Elektronenbeschuss. Strahlenschäden werden meist schon bei der ersten Aufnahme verursacht und führen dazu, dass das Objekt bereits nach wenigen Aufnahmen zerstört ist. Wenn die Strahlendosis minimal gehalten wird, so sind die resultierenden

Aufnahmen meist so verrauscht, dass eine Auswertung schwierig bis unmöglich ist (Frank & Rademacher, 1992).

3.3 Immun-Elektronenmikroskopie

Mit dieser Methode lassen sich gezielt Molekülbereiche anhand bekannter Epitope identifizieren. Zum Nachweis bestimmter Domänen in einem Molekül mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie muss eine Probe des Proteins mit einem spezifischen Antikörper oder FAB-Fragment gegen ein Epitop, das spezifisch bei dieser Domäne auftritt, inkubiert werden und der resultierende Immunkomplex elektronenmikroskopisch untersucht werden. Ggf. müssen die Antikörper mit Gold markiert werden, um die Lage am Molekül besser detektieren zu können. Oft tritt bei dieser Methode eine Vernetzung mehrerer Moleküle auf, da die Y-förmigen Antikörper an den Epitopen zweier Moleküle gleichzeitig binden können (Boisset *et al.*, 1995).

3.4 Übersicht zur angularen Einzelpartikelanalyse

Die in diesem Abschnitt angesprochenen Methoden werden weiter unten noch vertieft.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Proteins in amorphem Eis zeigt viele verschiedene, weitgehend zufallsverteilte Orientierungen des gleichen Moleküls mit unbekannter Raumorientierung.

Bei der Computer-Tomographie (CT) wird eine 3D-Rekonstruktion durchgeführt, indem man dadurch, dass man die Lage des Detektors immer kennt, jedem Einzelbild die Raumwinkel wieder zuweist. Wenn man nun eine Methode zur Verfügung hat, den einzelnen Ansichten der zufällig orientierten Moleküle die Raumwinkel zuzuweisen, um die sie gegenüber dem Detektor im Raum gedreht sind, so ist es möglich analog zur Computer-Tomographie (CT) eine 3D-Rekonstruktion durchzuführen. Die „*angulare Reconstitution*“ ermöglicht, dass den verschiedenen Ansichten eines Objektes jeweils die Raumwinkel zugewiesen werden, die seine relative Orientierung zum Betrachter eindeutig beschreiben.

Die Vorgehensweise zur 3D-Rekonstruktion von Makromolekülen aus einer Vielzahl von einzelnen EM-Aufnahmen lässt sich durch ein rekursives Schema beschreiben (Abb. 8). Die hier kurz beschriebenen Schritte werden im folgenden eingehend besprochen:

Ausgehend von einer aufgereinigten Probe HtH1(0,5 mg/mL), bei der eine Fixierung in Eis stattgefunden hat, wurden möglichst hoch aufgelöste EM-Aufnahmen ge-

macht (Vergrößerung: 50.000fach, 200kV), bei denen eine möglichst hohe statistische Verteilung der Raumorientierungen erreicht werden sollte. Diese Bilder wurden hochauflösend eingescannt (Negativ: ca. 6500 x 5000 Pixel bei einer Auflösung 3,2 Å/Pixel). Aus einer geeigneten Auswahl an gleichwertigen Bildern wurden die einzelnen Moleküle ausgeschnitten und in Einzelbildern zu einem Datensatz zusammengesetzt.

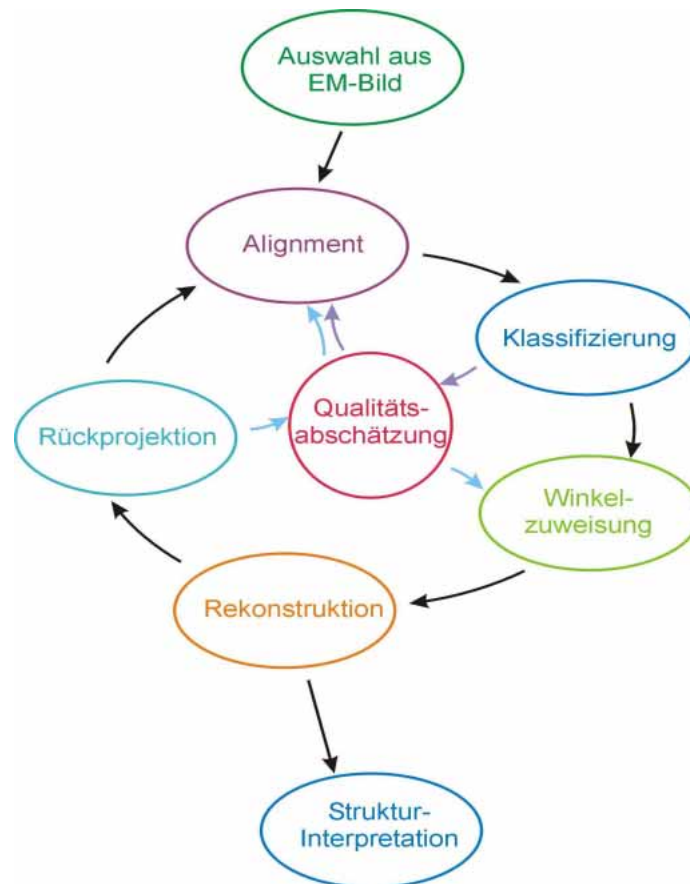


Abb. 8: Übersicht über die Vorgehensweise bei der 3D-Rekonstruktion einzelner HtH1-Moleküle aus EM-Negativen.

Von einer Probe mit gereinigtem Protein (HtH1) wurden kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Bilder wurden gescannt und anschließend wurden die einzelnen Moleküle von Hand ausgewählt, ausgeschnitten und in eine Datenbank als Satz von Einzelbildern gespeichert. Diese Einzelbilder wurden zentriert und durch Drehen so ausgerichtet, dass sie in vergleichbaren Lagen waren (Alignment). Durch mathematischen Vergleich wurden gleiche Ansichten erkannt und aufeinander summiert (Klassifizierung). Dadurch wurden Details der einzelnen Ansichten statistisch verstärkt. Über eine mathematische Methode wurden den Klassenbildern Betrachtungswinkel zu einer virtuellen Referenz zugewiesen (Winkelzuweisung). Mit Hilfe dieser Winkel war die Berechnung einer 3D-Rekonstruktion möglich. Aus einer Serie von Projektionsbildern des errechneten Modells ließen sich neue Referenzen für eine genauere Ausrichtung der Einzelbilder berechnen (Rückprojektionen). An fast allen Stellen ließ ein Vergleich mit vorangegangenen Arbeitsschritten eine Überprüfung der Qualität der durchgeführten Schritte zu (Qualitätsabschätzung).



Durch ein Alignment wurden die einzelnen Bilder verschoben und gedreht, bis eine einheitliche Ausrichtung innerhalb des Datensatzes vorherrschte. Dann konnte durch Klassifizierung versucht werden, einzelne Projektionen des Moleküls zu isolieren. Dabei wurden die einzelnen Bilder des Datensatzes in ihrer Ähnlichkeit miteinander verglichen und entsprechend den Klassen, denen sie zugerechnet wurden, miteinander summiert. Aus den daraus resultierenden Klassensummen wurden nur diejenigen weiter verwendet, die Projektionen des untersuchten Objektes repräsentierten. Diesen Projektionen wurden dann im Verfahren der angularen Rekonstruktion Betrachtungswinkel zugeordnet, um die relative Orientierung der Ansichten untereinander zu beschreiben. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Symmetrie war dann eine erste 3D-Rekonstruktion möglich. Aufgrund der Fehler in der Winkelbestimmung ist diese erste 3D-Rekonstruktion in der Regel noch recht ungenau.

Aus dieser ersten Rekonstruktion ließen sich Rückprojektionen berechnen, welche die Grundlage für eine Qualitätsbeurteilung durch Vergleich mit den Klassensummen der Rekonstruktion waren, aber auch als Referenzen für neue Alignments genutzt werden konnten, da sie eine hohe Ordnung aufwiesen und gut zentriert waren.

Aus der Rekonstruktion konnte eine Interpretation der Struktur des Moleküls durchgeführt werden.

3.5 Auswählen und Extrahieren von Einzelmolekülen vom Negativ

Nach dem Einscannen der Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen in einem PC (6500 x 5000 Pixel mit einer Auflösung von 3 Pixel pro Ångström; mit E-MiL Line Scan Densitometer, Fa. IMAGIC, Berlin, Software: OPTOSCAN: ScanDirector 3.63, Fa. OPTO-TECH GmbH, Hannover), wurden sie im TIF-Format gespeichert und auf ein UNIX-System übertragen (z.B. via FTP). Auf dem UNIX-Rechner wurde mit dem Programm IMAGIC die TIF-Datei in ein IMAGIC-Bild konvertiert.

IMAGIC verwendet eine Dateistruktur, bei der die Bildinformationen, wie Anzahl der Bilder, Größe der Einzelbilder, Bearbeitungsschritte etc., in einer Header-Datei (= *.hed) unabhängig von den Bilddaten (Pixelinformationen) abgespeichert werden, die in einer Image-Datei (= *.img) parallel dazu verwaltet werden.

Ausgehend von einem IMAGIC-Bild ließen sich mit IMAGIC Bereiche aus einem Bild ausschneiden und in einem neuen Datei-Duplett (hed- und img-Datei) als Satz von Einzelbildern speichern. Dazu wählte man im Ansichtsmodus von IMAGIC (DISPLAY) über die Funktion COOS (=Koordinatenauswahl) Punkte aus dem Ausgangsbild aus, die jeweils den Mittelpunkt eines Moleküls repräsentierten. Die aus-



gewählten Koordinaten der Punkte wurden tabellarisch in eine Datei geschrieben, wodurch die Position interessanter Punkte auch für spätere Arbeitsschritte zur Verfügung stand. Über die Funktion CUT-IMAGE erfolgte die Extraktion der Moleküle in den Satz von Einzelbildern des Moleküls, wobei das Programm CUT-IMAGE eine Auswahl von Form und Größe des Ausschnitts zuließ. Die Bildgröße sollte so gewählt werden, dass das Molekül ca. 2/3 des Einzelbildes ausmacht.

Zur Kontrolle der Qualität und Vergleichbarkeit der zu einem Satz gehörenden Einzelbilder wurde eine Fourier-Transformation durchgeführt. Anhand der Verteilung und der Symmetrieeigenschaften der fouriertransformierten Bilder ließen sich Fokussierung, Astigmatismus und Drifts der Graustufen der Bilder beurteilen.

3.6 Der Band-Pass-Filter

Der Band-Pass-Filter diente zum Filtern von Rauschen und Fehlern, sowie zum Normieren der Helligkeitswerte der Einzelbilder (Schatz *et al.*, 1997). Dieser Filterungsprozess erfolgte im Fourierraum, da dort viele mathematische Beschreibungen und Veränderungen wesentlich einfacher und schneller möglich sind. Fouriertransformierte Bilder enthielten jedoch genau die gleichen Informationen wie die ursprünglichen Bilder (Champeney, 1973).

Ein weiterer Vorteil ist, dass einige der auflösungsbegrenzenden Faktoren ganz bestimmten Raumfrequenzen zugeordnet werden konnten (Schatz, 1992). So stammten z.B. niedrige Frequenzen im Fourierraum von weitläufigen Helligkeitsverläufen (Shifts), wie sie durch ungleichmäßiges Ausleuchten beim Scannen der Negative während der Digitalisierung auftraten. Eine weitere Ursache war eine immer vorhandene Ungleichverteilung des Kontrastmittels während der negativen Kontrastierung. Beim Filtern im Fourierraum wurden diese niedrigen Frequenzen rechnerisch unterdrückt. Der Schwellenwert zur Begrenzung der Frequenzen im unteren Bereich sollte so gewählt werden, dass die Frequenzen, die das zu untersuchende Molekül repräsentieren, nicht ebenfalls unterdrückt wurden. Als Faustregel gilt: der Kehrwert der niedrigsten relevanten Frequenz, entspricht dem doppelten des größten Durchmessers des Moleküls. Die hohen Raumfrequenzen repräsentierten das Rauschen in den Bildern. Hier musste bei der Wahl der Filterparameter darauf geachtet werden, dass die unterdrückten Raumfrequenzen nicht bereits Details des Moleküls wiedergaben. In diesem Stadium der Aufarbeitung wurden zunächst die hohen Frequenzen großzügig weggefiltert (ggf. auch mit Verlust von Details), um die Molekülgrenzen besser definieren zu können. Nachträglich wurde ein Teil der unterdrückten Frequenzen durch Bildmittelung wieder kompensiert, um die Details zu verbessern.



3.7 Das Alignment der Einzelbilder

Beim Alignment wird zwischen einem translationalen und einem rotationalen Alignment unterschieden (Abb. 9). Das translationale Alignment dient der Zentrierung der Bilder. Sie ist die Grundvoraussetzung für das rotationale Alignment, bei dem die Moleküle gegen Referenzen ausgerichtet werden.

Das Ausrichten der Einzelbilder erfolgt iterativ (d.h. die Schritte zur Ausrichtung, werden in sich wiederholt, um Verbesserungen der Ausrichtung zu erreichen): Das erste Alignment wird i.d.R. anhand eines Summenbildes aus allen Einzelbildern oder besonders guten, ausgewählten Einzelbildern als Referenz durchgeführt. Mit dem IMAGIC-Kommando AVERAGE-ROTATIONAL wird ein Durchschnittsbild mit einem gemeinsamen Schwerpunkt berechnet. Nun werden mit dem Befehl ALIGN-DIRECT alle Bilder des Datensatzes einzeln translational auf den Schwerpunkt des Durchschnittsbildes (Rotationssummenbildes) hin verschoben. Aus diesen ausgerichteten Bildern wird ein neues Summenbild berechnet und der gemeinsame Schwerpunkt bestimmt. Die voran beschriebenen Schritte werden 4-5 mal wiederholt, da auf diese Art eine maximale Zentrierung der Massen erreicht werden kann.

Da man bei der Untersuchung eines "neuen" Moleküls a priori keine anderen Referenzen hat, erfolgt nach der Ausrichtung direkt eine multivariate statistische Analyse (MSA), an die sich eine erste Klassifizierung anschließt. Ausgehend von den so erhaltenen Klassen lassen sich dann weitere Referenzen wählen, mit denen man zusätzliche Alignments mittels Multi Referenz Alignment (MRA) durchführen kann.

Effektiver lässt sich ein erstes Alignment als MRA durchführen, wenn man bereits Rückprojektionen aus einem vorangegangenen Versuch mit einer etwa vergleichbaren Datenmenge als Referenzen verwenden kann, da diese i.d.R. besser zentriert, bereits ausgerichtet und weniger verrauscht sind. Man kann aber auch einzelne "typische" Ansichten aus dem Datensatz als Referenz verwenden, wenn man den Eindruck hat, dass diese wenig verrauscht und gut zentriert sind (Schatz, 1992). Allerdings müssen diese dann durch den Befehl ROTATE-IMAGE manuell ausgerichtet werden. Für Seitenansichten ist eine senkrechte oder waagrechte Ausrichtung zur Betrachtungsebene am sinnvollsten, da so der Winkel α (siehe Abb. 10, S. 43) wohl definiert ist. Bei radiärsymmetrischen Aufsichten ist außer der Zentrierung keine weitere Umorientierung nötig.

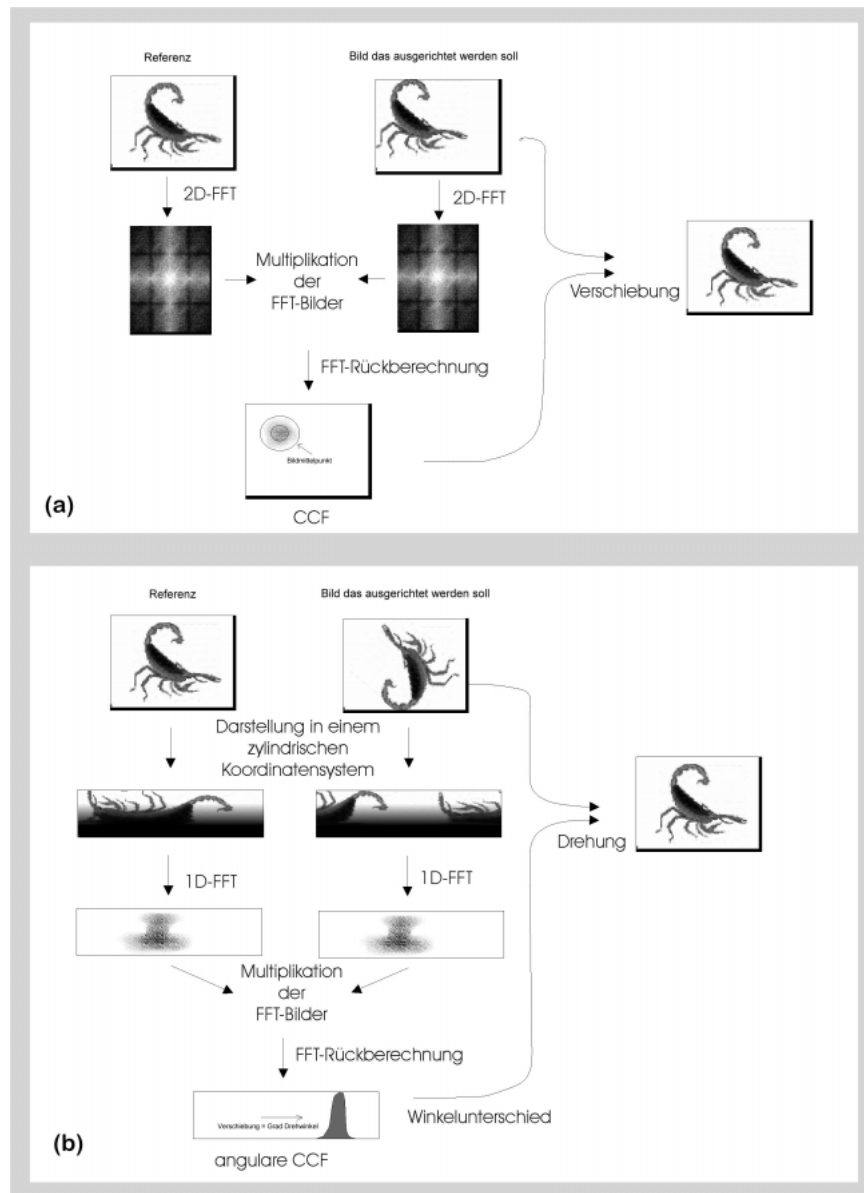


Abb. 9: Schematische Darstellung der Ausrichtungskorrektur eines Objektes gegen eine gleichgestaltliche Referenz (nach IMAGIC-Dokumentation)

- Beim translationalen Alignment wird der Vektor für die Verschiebung des Schwerpunktes eines Objektes zu einer Referenz ermittelt. Wird das Objekt dann entgegen diesem Vektor verschoben, so wird es im Verhältnis zu der Referenz zentriert.
- Bei der Durchführung eines rotationalen Alignments wird für Objekt und Referenz jeder Bildpunkt in ein Polarkoordinatensystem dargestellt. Dabei liegt das Zentrum des Polarkoordinatensystems im Bildmittelpunkt. Trägt man nun die Länge des Vektors als Y-Koordinate und den zugehörigen Winkel als X-Koordinate auf, so erhält man zwei neue Bilder. Eine Drehung des Bildes gegenüber der Referenz entspricht hier einer Translation in der X-Achse.

Vor einem Alignment wurden die Referenzen mit einer engen Maske umgeben, um zu vermeiden, dass Hintergrundeffekte, die zufällig dominierende Strukturen bildeten, nicht ebenfalls die Ausrichtung der Moleküle beeinflussten.

3.7.1 Wahl von Referenzen

Als Referenzen können verschiedene Bilder dienen: deutliche, repräsentative Einzelbilder, Summenbilder oder aber Rückprojektionen vorangegangener Rekonstruktionen. Wichtig ist, dass sich das Signal der verwendeten Referenzen deutlich vom Hintergrund abhebt und dass die Ausrichtung der Referenzen schon einigermaßen stimmt. Gegebenenfalls kann man das Signal/Rauschen Verhältnis durch eine Maskierung der Referenzen verbessern, indem man den Hintergrund auf Null setzt. Damit erreicht man, dass die Varianz des Hintergrundes einen einheitlichen Wert annimmt.

3.7.2 Die Kreuzkorrelationsfunktion (CCF)

Die Berechnungen für das Ausrichten der Bilder werden nicht im Bildraum, sondern im Fourierraum durchgeführt. Man bedient sich hierfür der sogenannten Kreuzkorrelationsfunktion (Saxton & Frank, 1977). Jeder Punkt τ_k des CCF-Bildes ist definiert durch

$$CCF(\tau_k) = \sum_{i=1}^N f(\tau_i)g(\tau_i + \tau_k) = FT^{-1}(FT[f(\tau_i)] \times FT^*[g(\tau_i)])$$

$f(\tau_i)$ und $g(\tau_i)$ = zwei Bilder mit den Bildpunkten $i = 1, \dots, N$ (Gl. 1)

Für die Berechnung der CCF nach Gl. 1 werden die beiden Bilder fouriertransformiert (FT), komplex multipliziert ($FT \times FT^*$) und das Produkt in den Bildraum rücktransformiert (FT^{-1}). Das Maximum im Kreuzkorrelationsbild ist um denselben Verschiebungsvektor $\vec{t}$ verschoben, wie die beiden Bilder. Der Korrelationskoeffizient ergibt sich aus der Höhe des Maximums in der CCF und ist ein Maß für die Qualität der Ausrichtung (Abb. 9a).

Für die Rotationsausrichtung der Bilder werden Bild und Referenz zuvor in Kreiskoordinaten umgewandelt und vergleichbar der CCF eine Drehkorrelationsfunktion berechnet. Aus dem Maximum der Drehkorrelationsfunktion kann der Winkel zwischen auszurichtendem Bild und Referenz ermittelt werden (Abb. 9b). Da die Rota-



tionsausrichtung eine vorherige Translationsausrichtung und *vice versa* voraussetzt, werden beide Ausrichtungen iterativ durchgeführt. Das Verfahren konvergiert gewöhnlich nach zwei bis vier Iterationsschritten.

Translation und Rotation sind aber nur zwei von insgesamt fünf Freiheitsgraden, welche durch die Ausrichtung berücksichtigt werden. Die Moleküle können in dem Einbettungsmedium nicht nur an jedem beliebigen Ort, sondern auch in jeder beliebigen Projektionsrichtung liegen.

3.7.3 Translationales Alignment

Die rechnergestützte Ausrichtung der Einzelbilder erfolgt über eine Fourier-Transformation. Werden zwei identische Bilder im Fourierraum miteinander komplex multipliziert und das Produkt in den Bildraum zurück transformiert, erhält man ein deutliches Maximum im Bildmittelpunkt (Schatz, 1992). Wird nun ein Bild, das zur Referenz verschoben ist, mit einem Referenzbild in dieser Weise verglichen (Abb. 9a), so ergibt sich eine Kreuzkorrelationsfunktion (CCF) (Saxton & Frank, 1977). Sind die Motive der beiden Bilder ähnlich, aber durch einen Verschiebungsvektor $\vec{t}$ gegeneinander verschoben, erscheint ein Maximum im Kreuzkorrelationsbild, das um den gleichen Vektor $\vec{t}$ gegenüber dem Mittelpunkt verschoben ist. Dies wird durch den Computer erfasst und durch Verschieben des Einzelbildes gegen die Referenz ausgeglichen.

3.7.4 Rotationales Alignment

Eine entsprechende Routine ließ sich auch für die Rotationsausrichtung der Einzelbilder durchführen. Zunächst erfolgte die Erstellung von Polarkoordinatenbildern für die Einzelbilder und Referenzen. Dabei liegt das Zentrum des Polarkoordinatensystems im Bildmittelpunkt. Trägt man nun die Länge des Vektors als Y-Koordinate und den zugehörigen Winkel als X-Koordinate auf, erhält man zwei neue Bilder. Eine Drehung des Bildes gegenüber der Referenz entspricht hier einer Translation in der X-Achse. (Abb. 9b). Eine Drehkorrelationsanalyse (RCF oder *angular CCF*) ist demnach nur möglich, wenn bereits ausgerichtete Referenzen zur Verfügung stehen. Als Ergebnis dieser Behandlung aller Einzelbilder gegen gut zentrierte Referenzen erhält man die ausgerichtete Datenmenge.



3.7.5 Multi Referenz Alignment (MRA)

Neben der Drehung und Verschiebung sind in der Ausrichtung auch die verschiedenen Freiheitsgrade des Moleküls zu berücksichtigen. Daher ist es angebracht, neben dem translationalen Alignment und dem rotationalen Alignment auch die Orientierung durch das Heranziehen verschieden gedrehter Referenzen zu korrigieren. Beim MRA werden nur Moleküle ausgerichtet, die mit der entsprechenden Referenz ähnlich sind. Damit wird vermieden, dass z.B. eine Topansicht mit einer Seitenansicht verglichen wird.

3.8 Klassifizierung und multivariate statistische Analyse (MSA)

Ähnliche Bilder werden zur Verbesserung des Signal/Rauschen-Verhältnisses in Klassen aufsummiert. Dazu müssen die verschiedenen Klassen zunächst bestimmt werden.

3.8.1 MSA

Die MSA diene dem Klassifizieren der verschiedenen Projektionen der zuvor ausgerichteten Aufnahmen eines Teilchens. Um die Auflösung zu verbessern, wurden später die einzelnen Aufnahmen jeweils einer Klasse gemittelt. Ein Vergleich auf der Ebene der Originalbilder (Bildebene; Pixel für Pixel vergleichen) wäre aufgrund der Datenmenge unglaublich aufwendig: bei 5000 Teilchen mit einer Bildgröße von 100x100 Pixel entspräche dies ca. 10^{11} Bildpunkten, die miteinander verglichen werden müssten (Schatz, 1992). Um einen Vergleich durch Berechnung mit dem Computer durchzuführen ohne die Kapazitäten an Speicher und Rechenzeit zu überschreiten, war eine Methode nötig, die eine Reduktion der Daten ermöglicht, aber dennoch die Information aus den Bildern erhielt. Diese Möglichkeit bietet die multivariate Statistik (Lebart *et al.*, 1984).

Bei dieser Methode werden die n einzelnen Bilder nicht durch Angabe der Helligkeit in ihren p Pixeln betrachtet wie im Bildraum, sondern als p -dimensionale Punkte, deren Koordinaten durch die Helligkeitsbeträge der einzelnen Pixel in einem multi-dimensionalen Raum = "MSA-Hyperraum" (Schatz, 1992) angegeben werden. Jedes Bild wird also als 1 Punkt in einem n -dimensionalen Raum dargestellt. Betrachtet man nun alle Bilder in diesem MSA-Hyperraum, so liegen ähnliche Bilder nahe beieinander, während unterschiedliche Bilder weit auseinander liegen. Befinden sich also in einem Datensatz nur bestimmte Projektionen, so finden sich die p -dimensionalen Punkte dieser Projektionen in getrennten Wolken im Hyperraum wie-

der. Sind alle möglichen Projektionen statistisch verteilt in der Datenmenge vorhanden, lassen sich keine "Unterwolken" trennen, und die Punkte im Hyperraum bilden eine einzige große längliche Wolke.

Mathematisch lässt sich die Anpassung der Koordinatenachsen an die Bildinformation als Eigenvektor-Eigenwert-Problem auffassen: Für jeden Datensatz aus n Bildern ergibt sich also eine $n \times p$ Matrix X , deren Zeilenvektoren jeweils ein einzelnes Bild charakterisieren (Bildraum). Jede Spalte dieser Matrix kann als Pixelvektor beschrieben werden. Betrachtet man die Matrix X im Pixelraum gemäß der Pixelvektoren, enthält dieser exakt die gleichen Informationen wie der Bildraum (Tab. 1).

Die gesuchten Achsen ermittelt man dann über die Hauptachsentransformation als die Lösung des Matrix-Terms (Lebart *et al.*, 1977):

$$X_t N X M U = U \Lambda \text{ mit } U_t M U = I_p \quad (\text{Gl. 2})$$

X_t = transponierte Matrix von X

I_p = p -dimensionale Einheitsmatrix

M = eine diagonale $p \times p$ Matrix

N = eine diagonale $n \times n$ Matrix

U = Eigenvektormatrix mit den Eigenvektoren $\vec{u}$

Λ = Diagonalmatrix mit Eigenwerten λ

Die Eigenvektoren $\vec{u}$, repräsentieren die Spalten der Eigenvektormatrix U und enthalten genauso wie die Ausgangsbilder p Elemente und daher Bildcharakter. Sie werden daher auch als Eigenbilder bezeichnet. Die Koordinaten der verschiedenen Bilder können also als Projektionen der Bilder auf die Eigenvektoren $\vec{u}$ berechnet werden:

$$C_{\text{img}} = N X M U \quad (\text{Gl. 3})$$

Tab. 1: Darstellung eines Datensatzes in einer Matrix:

Jede Zeile repräsentiert ein vollständiges Einzelbild, jede Spalte enthält die Grauwerte des Pixels i für alle Bilder.

Bilder ->
| Pixel
V

$p(1,1)$	$p(1,2)$	...	$P(1,k)$
$p(2,1)$	$p(2,2)$	...	$P(2,k)$
$p(3,1)$	$p(3,2)$	...	$P(3,k)$
...	...	...	...
$p(x,1)$	$p(x,2)$	...	$P(x,k)$

Es wurde durch das Programm IMAGIC eine Hauptachsentransformation des multi-dimensionalen Datensatzes durchgeführt, indem über eine Eigenvektor-Eigenwert-Analyse wie in Gl. 2 nur die wichtigsten Achsen zur Beschreibung der Wolken im MSA-Hyperraum herangezogen wurden (maximal 69). Die Drehung des Koordinatensystems wird immer so durchgeführt, dass die erste Achse in Richtung der größten Varianz des Datensatzes zeigt. Dadurch beschreibt die erste Achse immer den Hauptunterschied der Bilder im gesamten Datensatz. Die weiteren Achsen beschreiben mit abnehmender Wichtigkeit die weiteren Unterschiede der einzelnen Bilder. Somit ist ein Vergleich vermittels der relevanten Dimensionen zur Beschreibung der Ähnlichkeiten zwischen den ursprünglichen Einzelbildern möglich. Diese Dimensionen machen nur noch einen Bruchteil der ursprünglichen Datenmenge aus, wodurch das Ziel der Datenreduktion erreicht wurde (Van Heel & Frank, 1981).

3.8.2 Was sind Klassen?

Bilder, die im MSA-Hyperraum nahe beieinander lagen, also ähnliche Bilder, wurden in Klassen zusammengefasst. Dabei wurde versucht, die Varianz zwischen verschiedenen Klassen möglichst groß zu halten. Die Bilder innerhalb einer Klasse sollten dagegen eine möglichst geringe Varianz haben. Sie wurden dann summiert und als Durchschnittsbilder (= Klassensummen) in einem eigenen Datensatz abgelegt. Die besten Klassensummen wurden dann als statistisch verbesserte einzelne Ansichten (siehe Abb. 10, S. 43) des untersuchten Moleküls angesehen und bilde-



ten die Grundlage für die 3D-Rekonstruktion. Bilder, die keiner Klasse sinnvoll zugeordnet werden konnten, wurden in wenigen "Waste-Klassen" gesammelt und konnten aus dem Datensatz eliminiert werden. Die Klassifizierung konnte durch die Wahl geeigneter Referenzen wesentlich beeinflusst werden. Als Referenzen können Klassensummen vorangegangener Klassifizierungen ebenso verwendet werden wie Rückprojektionen aus vorangegangenen 3D-Rekonstruktionen. Die Rückprojektionen wurden nur als Referenzen für Alignments verwendet. Zur Klassifizierung wurden nur die Bilder aus dem originalen, gefilterten Datensatz verwendet. Daher konnten auch Rückprojektionen eines fremden Datensatzes als Referenzen verwendet werden, ohne die Daten zu verändern, welche die Grundlage der Klassensummenbilder sind. Die Rekonstruktion erfolgte ausschließlich aufgrund der Rohdaten, nachdem diese im Alignment gedreht und ausgerichtet wurden.

3.8.3 Anzahl der Klassen für die Klassifizierung festlegen

Die Anzahl der Klassen richtet sich prinzipiell nach der Anzahl der möglichen Orientierungen im Datensatz. Allgemein geht man von ca. 10 Einzelbildern pro Klasse im Mittel aus. Das entspricht also etwa 1/10 Klassen ausgehend von der Anzahl der Bilder.

3.8.4 Beurteilungskriterien der Klassen

Um die Klassen auf Ihre Güte hin zu untersuchen, wurden die Betrachtungsbedingungen absolut gesetzt, d.h. die Grauwerte im Betrachtungsmodus wurden normiert. So erkannte ich auf Anhieb, welche Klassen ein vergleichbares Signal/Rauschen-Verhältnis aufweisen. I.d.R. setzen sich diese Klassen auch aus ähnlich vielen Einzelbildern zusammen. Zudem erkennt man in den Klassenbildern, ob die Moleküle, die durch sie repräsentiert werden, intakt oder defekt sind.

3.8.5 Bildmittelung

Da die Bilder, die in einer Klasse stehen, theoretisch jeweils die gleiche Bildinformation enthalten, repräsentieren sie jeweils eine verrauschte Ansicht einer bestimmten Projektionsrichtung des Moleküls. Der einzige Unterschied zwischen den Bildern einer Klasse ist demnach das statistische Hintergrundrauschen. Durch das Aufsummieren der Einzelbilder wird also die Bildinformation jeweils verstärkt, während sich das Rauschen heraus mittelt. Dies ist möglich, weil sich die Strukturinformation



des Moleküls jeweils an der gleichen Stelle im Bild befindet, während sich das Rauschen statistisch verteilt, also im mittleren Bereich keine Schwerpunkte bildet. Praktisch nimmt also bei der Summenbildung das Signal für echte Strukturen sehr stark zu, während das Signal für Rauscheffekte nur sehr schwach zunimmt. Das Rauschen im Signal/Rauschen-Verhältnis S^2/N^2 wird dabei für n Bilder um einen Faktor $1/n$ reduziert (Frank & Ali-Ali, 1975).

3.9 *Angulare Reconstitution* (Winkelzuweisung)

3.9.1 Serie bekannter Eulerwinkel (*Anchor Set*)

Als Eulerwinkel werden die drei Raumwinkel bezeichnet, welche die Orientierung eines Objektes im Raum beschreiben. D.h. die Ansicht jedes Objektes kann im Raum durch 3 Winkel beschrieben werden: In einem klassischen 3D Koordinatensystem wird auf einer Fläche, die durch die rechtwinklig aufeinander stehenden X- und Y-Achsen aufgespannt ist, die Z-Achse definiert, welche wiederum zu beiden ersteren Achsen senkrecht steht. Der Raumwinkel α gibt die Drehung in der Bildebene wieder. Die Raumwinkel β und γ beschreiben die möglichen Drehwinkel um die Raumachsen Y und Z (siehe Abb. 10). Ein *Achorset* (das sind Ansichten mit α , β und γ) wird benötigt um die Projektionsansichten für die Referenzen festzulegen. Zur Bestimmung der Eulerwinkel in einem neuen Satz von Klassenbildern werden Referenzbilder zum Vergleich benötigt, deren Orientierung bekannt sind.

3.9.2 Auswirkung von Symmetrieeigenschaften

Bei der Berücksichtigung von Symmetrien wiederholen sich Ansichten. So sind bei einem Objekt mit einer C2-Symmetrie die Ansichten aller Winkel γ $[180, 360] = [0, 180]$. Das bedeutet, man erhält aus einem Transmissionsbild des Objektes die doppelte (verrauschte) Information über die Ansicht. Bei einer D2-Symmetrie des Objektes kommt dazu noch, dass die Ansichten aller Winkel β $[90, 180] = [0, 90]$ sind ($[180, 360]$ für β sind bereits durch die o.a. C2-Symmetrie abgedeckt). In diesem Fall erhält man schon die vierfache Information über das Objekt aus einem Bild. Bei der Festlegung eines *Anchorsets* bedeutet das, dass man nur noch die Winkel $\beta = [0, 90]$ und $\gamma = [0, 180]$ abdecken muss. Wenn man bereits beim rotationalen Alignment die Z-Achse normiert hat, also alle Ansichten in Nord-Süd-Richtung ausgerichtet hat, so ist generell $\alpha = 0$ ($= 180$).

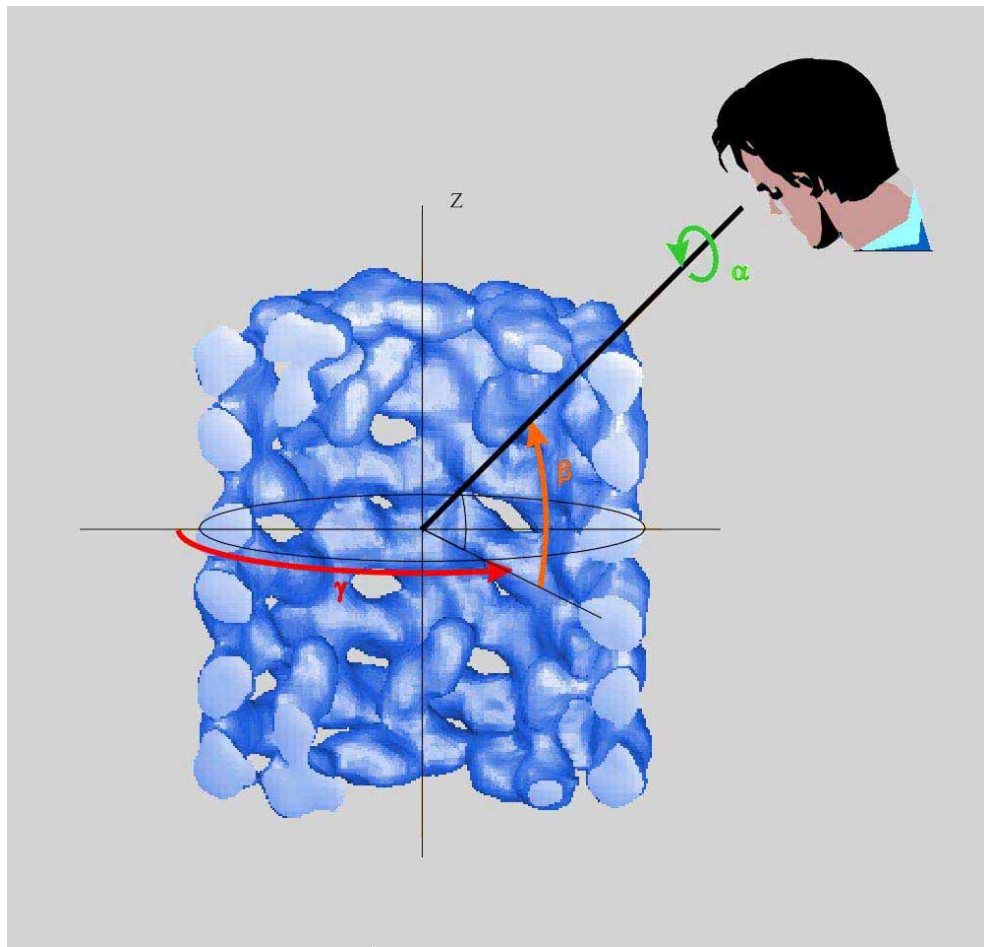


Abb. 10: Darstellung der Raumwinkel zur Betrachtung eines dreidimensionalen Körpers.

Die Z-Achse wird als vertikale Achse durch das zu betrachtende Molekül definiert. Der Winkel α gibt die Drehung des Objektes in der Bildebene wieder und wird bereits beim rotationalen Alignment ausgeglichen, indem die Z-Achse in Nord-Süd-Richtung ausgerichtet wird. Der Winkel β gibt den Kippwinkel des Moleküls zur Bildebene wieder, während der Winkel γ die Drehung des Objektes um die Z-Achse beschreibt.

Bei einer D5-Symmetrie wiederholen sich im Nord- sowie Südsegment jeweils fünf Wiederholungseinheiten (z.B. Didekamer), woraus sich für jede dieser Untereinheiten eine Segmentgröße von $\beta=90^\circ$ und $\gamma=72^\circ$ ergibt.

Bei einer C5-Symmetrie wiederholen sich nur fünf Wiederholungseinheiten über die gesamte Molekülhöhe (z.B. Dekamer), woraus sich für jede dieser Untereinheiten eine Segmentgröße von $\beta=180^\circ$ und $\gamma=72^\circ$ ergibt.

3.9.3 Erstellen von Sinogrammen

Durch die Methode der “*Angulare Reconstitution*” (Van Heel, 1987) werden die räumlichen Orientierungen der einzelnen Klassensummen relativ zueinander bestimmt. Im Fourierraum stellt jedes 2D-Projektionsbild eines 3D-Objektes einen zentralen Schnitt durch das Zentrum der dreidimensionalen Fourier-Transformation des 3D-Objektes dar. Dieser Sachverhalt wird als Projektionstheorem bezeichnet (Crowther *et al.*, 1970). Wenn also zwei verschiedene Projektionen des gleichen Objektes vorliegen, hat man auch zwei verschiedene zentrale Schnitte im Fourierraum, die eine gemeinsame Schnittlinie besitzen (Abb. 11).

Zwei Projektionsbilder eines 3D-Objektes haben also immer eine ein-dimensionale Projektion (= *common line*) im Bildraum gemeinsam. Die “*common line*” im Fourierraum beschreibt demnach eine räumliche Zuordnung im Bildraum. Die Zuordnung ist allerdings nicht eindeutig, da noch ein Freiheitsgrad (Drehung der “*common line*” um die eigene Achse) offen ist. Legt man nun eine dritte Projektion in dieses Arrangement, kann man jeweils eine neue “*common line*” zwischen der dritten und den ersten beiden Projektionen bestimmen. Damit ist die dreidimensionale Anordnung im Fourierraum als starres Gebilde festgelegt und somit auch die Zuordnung der drei Molekülansichten zueinander im Bildraum.

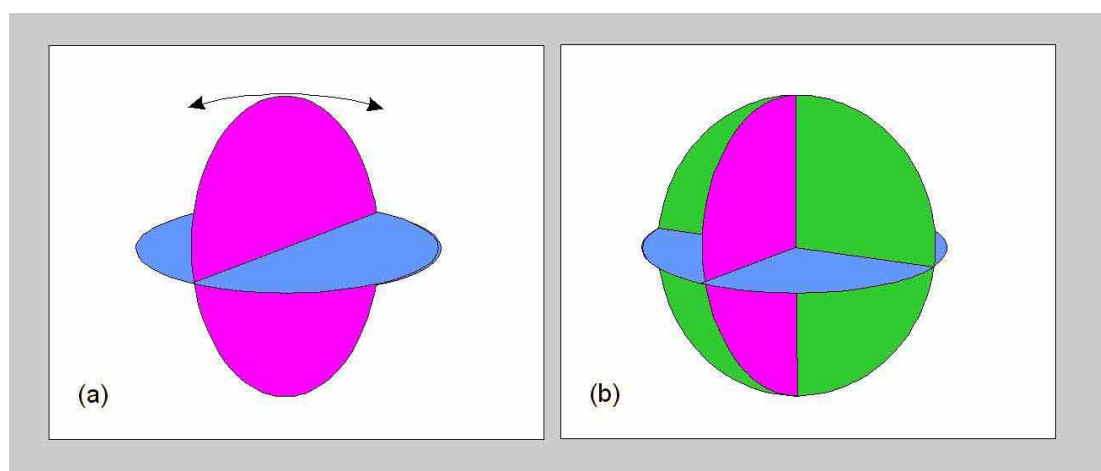


Abb. 11: Verhältnis verschiedener zweidimensionaler Projektionen des gleichen Objektes im Fourierraum: (nach (Schatz, 1992))

- (a) Zwei Projektionen eines gemeinsamen 3D-Objektes entsprechen zwei “zentralen Schnitten” durch den Fourierraum. Beide Schnitte haben eine gemeinsame Schnittlinie, - die “*common line*” -, um die sie kippbar sind. Somit ist die endgültige räumliche Zuweisung noch nicht bestimmt.
- (b) Bei Einfügen einer dritten Projektion erhält man zwei weitere “*common lines*”, wodurch die relative räumliche Anordnung - mit Ausnahme der Händigkeit - determiniert ist.

3.9.4 Bestimmung der Eulerwinkel mit dem IMAGIC-Modul EULER

Für das IMAGIC Unterprogramm EULER, das die Raumwinkel bestimmt, werden zunächst mit dem Programm SINOGRAMM in der 2D-Projektion die Grauwerte für alle Linien durch den Bildmittelpunkt berechnet und als Folge von Linien in einem Bild (=Sinogramm) dargestellt (Abb. 12). Die Sinogramme zweier Projektionen eines Objektes müssen also jeweils eine gleiche Linie, - die "*common line*" -, besitzen, nach der dann die Schnittlinie der Projektionen festgelegt wird (Abb. 11a). Dies geschieht in einer "*sinogramm correlation*" (Schatz *et al.*, 1997; Van Heel, 1987; Van Heel, 1992), welche ein Bild liefert, dessen Maximum die "*common line*" bestimmt. Damit erhält man aus dem Vergleich der Sinogrammkorrelationen dreier Klassensummenbilder deren räumliche Zuordnung. Um die Winkel weiterer Projektionsbilder zu berechnen, werden diese nach dem gleichen Verfahren ermittelt. Bei klaren Projektionen oder unverrauschten Bildern sind diese Zuordnungen eindeutig, so dass drei Bilder genügen (Abb. 11b). Meist treten jedoch bei den Klassensummenbildern aus EM-Aufnahmen Probleme auf, weshalb zusätzliche Algorithmen im Modul EULER nötig sind, um die Winkel zu bestimmen. Die Händigkeit des Objektes lässt sich aus den Projektionen jedoch nicht direkt ableiten. Dazu sind andere Verfahren oder Vergleiche mit Bildern z.B. aus einem Reflexionsverfahren nötig.

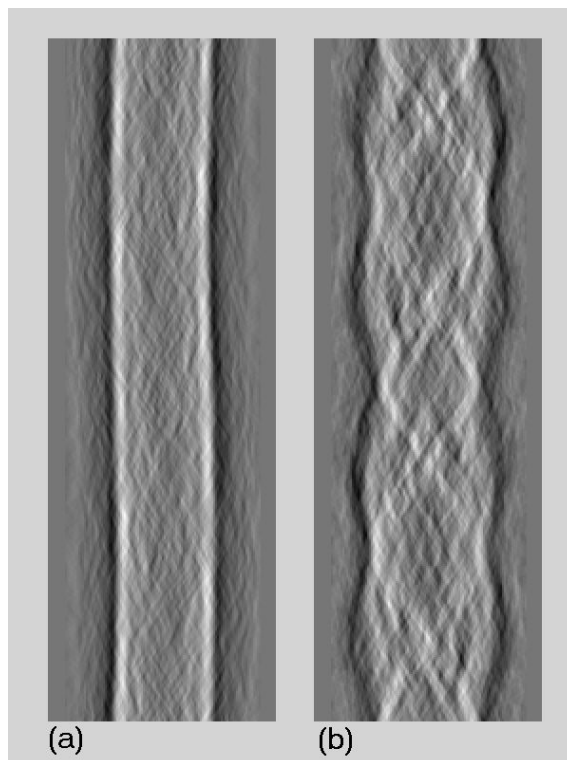


Abb. 12: Sinogramme sind eine spezielle Darstellungsform einer gegebenen 2D-Projektion eines 3D-Objektes. Dabei werden in der 2D-Projektion die Grauwerte aller Linien durch den Bildmittelpunkt (0° - 180°) jeweils gegen den zugehörigen Winkel aufgetragen.

- (a) Sinogramm einer Molekülaufsicht (*Top-View*): der kreisrunde Wandzylinder erscheint als gerade, klare Linie, also nahezu durchgehend, während in der Mitte eine Schlangenlinie erkennbar ist, die den etwas unregelmäßigen Aufbau des Kragens widerspiegelt.
- (b) Sinogramm einer Seitenansicht (*Side-View*): Die Rechteckform des Didekamers wird durch die Drehung zu einer Schlangenlinie.



3.10 Rückprojektionen von 3D-Bildern

Falls man eine 3D-Schnittserie von einem Molekül hat, ist es möglich davon Projektionen zu berechnen, die wiedergeben, wie das Molekül im TEM-Bild erscheinen würde. Man erzeugt also Transmissionsansichten des Moleküls. Diese können herangezogen werden, um z.B. Symmetrieeigenschaften zu überprüfen, die Auswahl der Klassen zu bewerten oder aber Referenzbilder für die MSA oder für die Eulerwinkelberechnung zu erzeugen. Rückprojektionen haben in der Regel den Vorteil, dass sie ein sehr starkes Signal liefern und dadurch für ein Alignment besonders effektive Referenzen ergeben können. Bei der Bestimmung der Eulerwinkel eines Klassensatzes werden Rückprojektionen mit bekannten Eulerwinkeln erstellt und zum Vergleich mit den neuen Klassen verwendet.

Die Rückprojektionen enthalten wie die ursprünglichen Transmissionsbilder die gesamte 3D-Strukturinformation des abgebildeten Objektes, nicht wie andere 2D-Bilder nur zweidimensionale Informationen. Die dritte Dimension ist im Helligkeitswert jedes Pixels der Bilder vorhanden, da wie bei einem Röntgenbild, auf jedes Pixel die Summe aller Schichten der 3D-Struktur in Projektionsrichtung übertragen wird. Zur Auswertung von Computer-Tomogrammen (CT) in der Medizin werden Röntgenaufnahmen in definierten Winkeln verwendet, um eine 3D-Rekonstruktion eines Patienten durchzuführen.

3.11 3D-Rekonstruktion

Die eigentliche Berechnung der 3D-Struktur geschieht im IMAGIC-Modul TRUE-THREED. Hier werden die Klassensummen gemäß dem ihnen zugewiesenen Winkel rückprojiziert. Aus diesen Rückprojektionen wird, wie in der CT, eine 3D-Rekonstruktion der Strukturen durchgeführt. In der angularen Rekonstruktion, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sind die Ansichtswinkel nicht - wie bei der CT - bekannt, sondern müssen wie oben beschrieben ermittelt werden. Wichtig für die Qualität der Rekonstruktion ist, dass eine exakte Ausrichtung der Klassenbilder gegenüber dem 3D-Körper besteht, weil nur so die Eulerwinkel genau berechnet werden können. Hier wird deutlich, dass bereits das vorangehende Alignment einen großen Einfluss auf die Qualität des Ergebnisses hat. Denn wenn die Einzelbilder nicht bereits gut ausgerichtet sind, dann schleppt sich dieses Problem weiter in die Klassenbilder und schließlich in die Winkelbestimmung. Um dies zu korrigieren, kann man iterativ vorgehen, indem man die gewonnene 3D-Struktur wieder rückprojiziert und erneut als Referenz für ein MRA verwendet, neu klassifiziert, Winkel bestimmt und 3D-rekonstruiert. So erhält man eine immer bessere Rekonstruktion, bis



sie bei den vorgegebenen Parametern nicht mehr zu verbessern ist. Die Rekonstruktion der Bilder zu einem 3D-Arrangement geschieht anhand der berechneten Winkel aus den einzelnen Projektionen: Es wird im Fourierraum ein Abbild des 3D-Objektes berechnet, das durch Rücktransformation in einer tomographischen Schnittserie (= 3D-Map) durch das Objekt dargestellt wird. Dabei werden Graustufen verwendet, um die berechneten Massen darzustellen, wodurch die Objektgrenzen verschwimmen können. Es ergeben sich zunächst also keine scharfen Grenzen des Objektes, sondern ein diffuser Rand, dessen Abgrenzung mit der Umgebung verschwimmt. Dieser Randeffect resultiert aus den Unschärfen der EM-Aufnahmen und aus einer ungenauen relativen Positionierung bei der Winkelbestimmung der zugrunde gelegten Klassensummenbilder. Je besser eine 3D-Rekonstruktion wird, desto schärfer lassen sich die Massekonturen und somit die Abgrenzungen des Objektes gegenüber der Umgebung erkennen. Die Objektkonturen lassen sich mit Hilfe eines Schwellenwertes bestimmen, der festlegt, welcher Graustufenwert noch zu dem Objekt gerechnet wird und ab welchem Wert ein Voxel (=Raumpixel) zum Hintergrund zählt, also nicht zum rekonstruierten Objekt. Die Güte der Rekonstruktion lässt sich im Endeffekt anhand mehrerer Parameter feststellen. Zunächst wird statistisch ausgewertet, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Klassensummenbilder mit den ihnen zugeordneten Eulerwinkel-Projektionen des rekonstruierten Objekts übereinstimmen. Aus dem Mittel der so gewonnen Fehlerquote wird ein Gesamtfehler berechnet, der eine Aussage über das Verhältnis zwischen der Rekonstruktion und den verwendeten Klassensummenbildern macht. Des weiteren kann man bereits im Vorfeld das Signal/Rauschen-Verhältnis der Klassensummenbilder betrachten, das abhängig vom vorangehenden Alignment um so besser ist, je genauer die Molekülstrukturen übereinander liegen, sich also verstärken. Als letztes muss man die Auflösung der 3D-Rekonstruktion bestimmen, um zu sehen, ob die iterative Optimierung der vorher beschriebenen Parameter auch zu einer Verbesserung der Auflösung geführt hat.

3.11.1 Verbesserung des Signal/Rauschen-Verhältnisses

Die Signalstärke ist ein zusätzliches Maß für die Qualität der 3D-Rekonstruktion: Je stärker einzelne Strukturdetails durch hohe Signalintensität hervorgehoben werden, desto besser heben sich Details vom Hintergrund ab.

Dies spielt vor allem bei der Wahl von Referenzen eine wichtige Rolle. Der Signalunterschied zwischen Hintergrund und Molekül indiziert also die Güte der Detaildarstellung und somit die Verlässlichkeit der Zuordnung von Strukturelementen.



Praktisch lässt sich die Signalstärke anhand der Quantität der Grauwerte in der 3D-Dichtekarte bestimmen: je deutlicher einzelne Strukturelemente hervorgehoben werden, desto größer ist der Bereich verwendeter absoluter Grauwerte in der Rekonstruktion. Diese Information relativiert sich allerdings in der Darstellung der Schnittserie, lässt sich aber für den Datensatz aus der IMAGIC-Datei bestimmen.

I.d.R. nimmt die Signalstärke also mit Verbesserung der Auflösung während der iterativen 3D-Rekonstruktion zu.

In Tab. 3 (Ergebnisse) ist dargestellt, wie sich im Laufe der Rekonstruktion das Signal veränderte.

Die Verbesserung des Signal/Rauschen-Verhältnisses ist in erster Linie eine Folge des Alignments, wie es bereits oben beschrieben wurde. Allerdings ist eine Optimierung nicht nur von der Wahl der Referenzen, sondern auch von den richtigen Filterparametern abhängig. Um das Alignment effektiv zu gestalten, muss die Ausrichtung der Strukturen immer anhand der Merkmale erfolgen, welche die Orientierung am stärksten beeinflussen. Bei der Kreuzkorrelation erfolgt dies durch die Bestimmung der max. 69 wichtigsten Dimensionen. Das ist zwar eine enorme Einschränkung (vorher hatte man mehr als 26.000 Dimensionen), die aber bewusst hingenommen wird. Die dabei verlorene Information spielt jedoch für die Bestimmung der Ähnlichkeiten zwischen zwei Bildern keine Rolle. Um diese Dimensionen sinnvoll bestimmen zu können, dürfen keine Effekte als wichtig erachtet werden, die mit dem eigentlichen Molekül überhaupt nichts zu tun haben: so wie Shifts in der Grauwertverteilung oder hohe Rauschfrequenzen. Diese werden beim Band-Pass-Filtern i.d.R. entfernt. Allerdings gibt es teilweise auch bei den Frequenzen, die nicht gefiltert wurden, Effekte, welche die Ausrichtung beeinflussen können. In diesem Fall müssen entweder die entsprechenden Klassen aus dem Datensatz genommen werden, der nachher zur 3D-Rekonstruktion verwendet wird, oder die Filterparameter für die Bilder, ggf. auch für die Referenzen, müssen anders gewählt werden.

3.11.2 Bestimmung der Auflösung durch Fourier-Schalenkorrelation (FSC)

Bei der Fourier-Schalenkorrelation (FSC) (Harauz & Van Heel, 1986) werden zwei willkürlich gewählte Datensätze aus der ursprünglichen Datenmenge für zwei völlig unabhängige, getrennte 3D-Rekonstruktionen verwendet. In der Regel nimmt man jeweils den halben Datensatz für jede Rekonstruktion. Beide Rekonstruktionen werden 3dimensional fouriertransformiert. Durch die Fourier-Transformation werden die niedrigen Raumfrequenzen in das Zentrum projiziert. Sie repräsentieren die großen Abstände, also grobe Strukturelemente. Die hohen Raumfrequenzen werden dagegen, abhängig von der Wellenlänge, vom Zentrum entfernter abgebildet. Vergleicht



man nun mit immer zunehmendem Radius (S) Schale für Schale die beiden resultierenden Fouriertransformierten der 3D-Rekonstruktionen miteinander und trägt die Ähnlichkeit gegen den Durchmesser der Schalen auf, so erhält man die Korrelationskurve $FSC(S)$ (Gl. 4), die bei der Auflösungsgrenze die Schwellenwertkurve (die 3σ -Kurve) schneidet. Da der Fourierraum reziproke Ausmaße zum Realraum besitzt, resultiert eine Kurve, bei der $1/\text{\AA}$ aufgetragen wird.

$$FSC(S) = \frac{\sum_{R=S} F_1(R) F_2^*(R)}{\sqrt{\sum_{R=S} |F_1(R)|^2 \sum_{R=S} |F_2(R)|^2}} \quad (\text{Gl. 4})$$

$F_1(R)$ = 3D Fourierkomponente aus dem 1. Datensatz

$F_2(R)$ = 3D Fourierkomponente aus dem 2. Datensatz

Die 3σ -Kurve ergibt sich, wenn man die Signalstärke in Abhängigkeit von der Anzahl der Fourierkomponenten (n) betrachtet: $1/\sqrt{n}$ ($=1\sigma$) stellt den Wert für reines Rauschen dar. Der Wert $3/\sqrt{n}$ ($=3\sigma$) dagegen wird in der Statistik als Grenzwert für signifikante Übereinstimmung bewertet. Somit wird der Schalenradius, bei dem die FSC-Kurve die 3σ -Kurve schneidet, als Auflösungsgrenze der gesamten 3D-Struktur definiert.

Wie bereits in den elektronenmikroskopischen Methoden erläutert, ist die FSC abhängig von der CTF. Durch geeignete Wahl verschiedener Defokuswerte in beiden verglichenen Datensätzen lässt sich also das Fehlen des Signals, das Signalähnlichkeit im Bereich der Nulldurchgänge der CTF für einen einzelnen Defokuswert unterdrückt (an dieser Stelle existiert kein Kontrast, also ist das Signal = 0 und entspricht 1σ), kompensieren.

3.12 Rendern der 3D-Oberfläche

Zur Visualisierung der 3D-Struktur lassen sich u.a. mit dem IMAGIC-Modul THREED-SEXY Oberflächenansichten des Moleküls rendern. Wesentlich dabei ist, festzulegen, welche Signalstärke noch zur Molekülmasse gerechnet wird und wel-



che Signalstärke zur Umgebung gehört. Dabei kann man einen Schwellenwert definieren, der das Molekylvolumen vom Hintergrund abgrenzt.

3.12.1 Wahl des Schwellenwertes (*Threshold*)

Bei der Auswahl des Schwellenwertes macht es ab einer Auflösung von ca. 50 Å Sinn, sich an der resultierenden mittleren Molekülmasse zu orientieren. IMAGIC gibt nach einer Oberflächenberechnung auch die Molekülmasse aus, die aus dem resultierenden Molekylvolumen und der mittleren Proteindichte berechnet wird. Hierzu muss der Maßstab der Vergrößerung (Å/Pixel) exakt bekannt sein.

3.12.2 Spielen mit dem Schwellenwert: Bestimmen von Masseschwerpunkten

Je ungenauer eine Rekonstruktion ist, desto mehr verschwimmen die Masseschwerpunkte, die den eigentlichen Strukturen zu Grunde liegen. Man hat in diesem Fall keine scharfe Grenze zwischen dem Molekül und seiner Umgebung, sondern einen Graustufenbereich, der die Oberfläche des Moleküls verwischt. In diesem Fall lassen sich dennoch einige Strukturelemente, die unterhalb der berechneten Auflösungsgrenze liegen, darstellen. Dazu kann man den Schwellenwert so wählen, dass man bewusst auf Teile des Moleküls verzichtet und nur Masseschwerpunkte hervorhebt, indem man einen höheren Schwellenwert wählt, der nur besonders starke Signale zulässt. In der vorliegenden Arbeit reicht die Auflösung von 12 Å noch nicht aus, um auf diese Weise Sekundärstrukturelemente zu visualisieren; denkbar wäre dies aber mit einer Auflösung von 7-9 Å.

4 Prototyping und Modellbau

Nachdem die 3D-Rekonstruktion mit der für die Ausgangsdaten maximal möglichen Auflösung durchgeführt worden war, wurde eine Methode gesucht, die über die 3D-Visualisierung auf dem Bildschirm hinausging. Damit sollte erreicht werden, dass auch Strukturen, die man aus der Bildschirmdarstellung nicht leicht erkennt, besser erfasst werden können. Es boten sich generell mehrere Möglichkeiten an, um eine 3D-Modellierung zu schaffen:



- Schichtweiser Aufbau eines Modells (z.B. aus Holz) anhand der 3D-Map, die von IMAGIC verwendet wird. Durch IMAGIC-Module ist es möglich, diese MAP durch einen Schwellenwertfilter als Zweifarbpixelgrafik zu prozessieren und als eine Serie von Tif-Bildern auszugeben.
- 3D-Fräsen mit Hilfe von CNC-Maschinen, Dabei ist jedoch die Ausstattung der Maschinen mit einem 3dimensional beweglichen Kopf nötig, außerdem sind Teile im Inneren des Moleküls vermutlich nicht durch den Fräskopf erreichbar.
- Die Stereolithographie, bei der schichtweise Kunststoff mittels Laser in einer Flüssigkeit ausgehärtet wird, benötigt ein Datenformat, das auf Vektordaten basiert. Dies resultiert aus den Hauptanwendungsgebieten der Stereolithographie, welche in erster Linie zur Fertigung von Prototypen aus CAD-entworfenen Körpern dient. Das Verfahren hat den Nachteil, dass es einerseits sehr teuer ist, andererseits, dass jede freischwebende Struktur im Modell während des Bauprozesses unterbrückt werden muss, damit die Strukturelemente während der Bauphase an Ihrer Stelle bleiben. Die Unterbrückungen müssen anschließend wieder manuell entfernt werden.
- Das rapid Prototyping-Verfahren, bei dem der Modellkörper innerhalb eines Pulverbettes fixiert aufgebaut wird, wurde schließlich zur Modellierung gewählt (Firma 4D-Concept, Groß Gerau). Dieses Verfahren ist vergleichsweise günstig und benötigt keine artifiziellen Unterbauten. Die Dateistruktur der 3D-Daten, die zur Fertigung benötigt wird, ist allerdings die gleiche wie bei der Stereolithographie. Somit war eine umfangreiche Suche nach Konvertierungsmöglichkeiten nötig.

5 Molekulares Modellieren

Voraussetzung zum Modellieren von Proteinstrukturen im Raum ist die bekannte Raumstruktur eines möglichst ähnlichen Proteins. Diese kann dann als Vorlage genutzt werden, um die Raumstruktur eines Moleküls zu berechnen, von dem die Aminosäuresequenz bekannt ist. Die bisher beste Methode zur Ermittlung von Raumstrukturen auf atomarer Ebene ist die Röntgenkristallographie. Die Methode ermöglicht die Zuweisung von Raumkoordinaten für alle Atome in einem Molekül. Diese Daten werden i.d.R. in weltweiten Datenbanken als Brookhaven PDB-Dateien veröffentlicht. Je ähnlicher sich die Primärstrukturen von der Röntgenstrukturvorlage als Referenz und dem zu modellierenden Molekül sind, umso besser stehen die Chancen, dass die modellierte Molekülstruktur der Realität nahe kommt.



5.1 Vergleich der Primärstrukturen

Um eine geeignete Vergleichsstruktur zu finden, wird gewöhnlich eine Brookhaven-datenbank im Internet nach Sequenzen durchsucht, die mit der Sequenz der zu modellierenden Proteinstruktur eine hohe Übereinstimmung zeigt. Diese Arbeit entfiel hier, da die Ähnlichkeit unter funktionellen Domänen der Molluskenhämocyanine bereits bekannt war (Keller *et al.*, 1999). Die 3D-Struktur aus Röntgendaten war von der funktionellen Domäne g aus *Octopus* verfügbar (Cuff *et al.*, 1998).

5.2 Modellierung der Sequenz anhand einer Referenz

Einige Programme beinhalten das Anpassen (*fitting*) einer Aminosäuresequenz an eine bekannte 3D-Struktur aus einer PDB-Datei als Standardoption. Führend dabei sind: Modella4, Swiss-Modell, WhatIf und einige andere Produkte, die teils kostenlos über Internet, teilweise auch kostenpflichtig angeboten werden. Hier wurde mit einer Shareware-Version von Swiss-PDB-Viewer 3.51 (siehe oben: Software) gearbeitet, weil dieses Programm im weltweiten Wettbewerb zusammen mit Modella4 die besten Ergebnisse liefert und einerseits jeweils in seiner neusten Version frei erhältlich ist und zusätzlich in der Lage ist, X-PLOR-Dichtekarten einzulesen, die von IMAGIC exportiert werden können (hier danke ich Dr. Ralf Schmitt von Image-Science für die unkomplizierte Bereitstellung des Konverters).

Die Modellierung über die Funktion „*Magic-fit with Options*“ im Swiss-PDB-Viewer 3.51 lieferte das gleiche Ergebnis wie eine Modellierungsanfrage unter Angabe von Primärstruktur des anzugleichenden Moleküls und der PDB-Referenz an Swiss-Modell via Internet.

5.3 Minimierung der Energie

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der durch *Fitting* erhaltenen Struktur ist eine empirische Energieminimierung im Modell. Eine Energieminimierung verschob die Lage der Aminosäuren bei der vorliegenden Struktur nur in einem maximalen Größenbereich von weniger als 1 Å (siehe Ergebnisse). Die nachfolgenden Versuche, die 3D-Struktur der funktionellen Domäne HtH1-g in die 12 Å aufgelöste Dichtekarte



aus der 3D-Rekonstruktion einzupassen, wurden mit dem energieminierten Fitting-Produkt durchgeführt.

5.4 Überprüfung der Plausibilität des Modells nach Ramachandran

Der Ramachandran-Plot (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigt die Psi-Phi Ausrichtung vom Molekülen auf. Die Winkel Psi und Phi sind die Drehwinkel um die Bindungsarme des Alpha-Kohlenstoffatoms in einer Peptidbindung. Dabei wird der Winkel Psi gegen Phi in einem Koordinatensystem aufgetragen. In dem Ramachandran-Diagramm sind bestimmte Winkelkombinationen bestimmten Strukturen zuordenbar; z.B. müssen Psi und Phi einen besonderen Raumwinkel gemeinsam aufspannen, damit eine Aminosäuresequenz eine Alphahelix bilden kann. Andere Psi-Phi-Kombinationen sind aus sterischen Gründen im Molekül verboten. Man kann auf diese Weise die Lage von Sekundärstrukturen bestimmen (Voet, 1995).

Im Ramachandran-Plot kann man sofort sehen, wenn Aminosäuren verbotene Psi-Phi Kombinationen aufweisen, also z.B. „passend gemacht“ wurden, um die Tertiärstruktur anzugleichen. Somit gibt der Ramachandran-Plot eine Möglichkeit zur Beurteilung der Güte des Modells.

5.5 Einpassen einer 3D-Tertiärstruktur in eine 3D-Dichtekarte

Um eine über molekulares Modellieren gewonnene 3D-Struktur in eine Dichtekarte einer Auflösung einzupassen, die schlechter als die Auflösung von Sekundärstrukturelementen (Alphahelices: ca. 8 Å, Betafaltblattstrukturen: ca. 6 Å) ist, berechnet man zunächst die Oberfläche der einzupassenden Struktur, hier die funktionelle Domäne HtH1-g. Diese kann man dann versuchen durch Rotation und Translation im Raum mit dem Bereich der Dichtewolke in Übereinstimmung zu bringen. Als äußerst nützliches Werkzeug dabei hat sich eine Stereovorrichtung erwiesen, die aber bei dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

C Ergebnisse

1 Isolierung von HtH1-Didekameran und Reinheits- bzw. Stabilitätskontrolle

HtH1-Didekamere wurden aus der Hämolymphe von *Haliotis* nach Standardverfahren isoliert (siehe Material und Methoden sowie Keller *et al.*, 1999).

1.1 Elektronenmikroskopische Kontrolle

Um zu überprüfen, ob die HtH1-Moleküle quantitativ als Didekamere vorlagen, wurde ein Aliquot mit Ammoniummolybdat negativ kontrastiert. Die mit dem Zeiss-TEM durchgeführten Aufnahmen (Abb. 13) zeigten, dass HtH1 in der Probe als intakte Didekamere vorlag. Es waren weder Schäden an den Didekameran festzustellen, noch befanden sich Abbauprodukte in der Probe. Zugleich wurde damit gezeigt, dass die eingesetzte Charge des Stabilisierungspuffers die Anforderungen erfüllte (vgl. Material und Methoden). Mit dieser Puffercharge wurde anschließend die Präparation der HtH1-Didekamere für die Kryoelektronenmikroskopie durchgeführt.

1.2 SDS-PAGE

Eine SDS-PAGE der HtH1-Probe diente zur Kontrolle, ob die Untereinheiten des HtH1 in der untersuchten Probe intakt waren oder ob eine potentielle Proteolyse zu erkennen war. Im SDS-Gel würde sich diese durch zusätzliche, schneller wandernde Banden zeigen. Die Kontrolle zeigte jedoch nichts dergleichen (Abb. 13b).

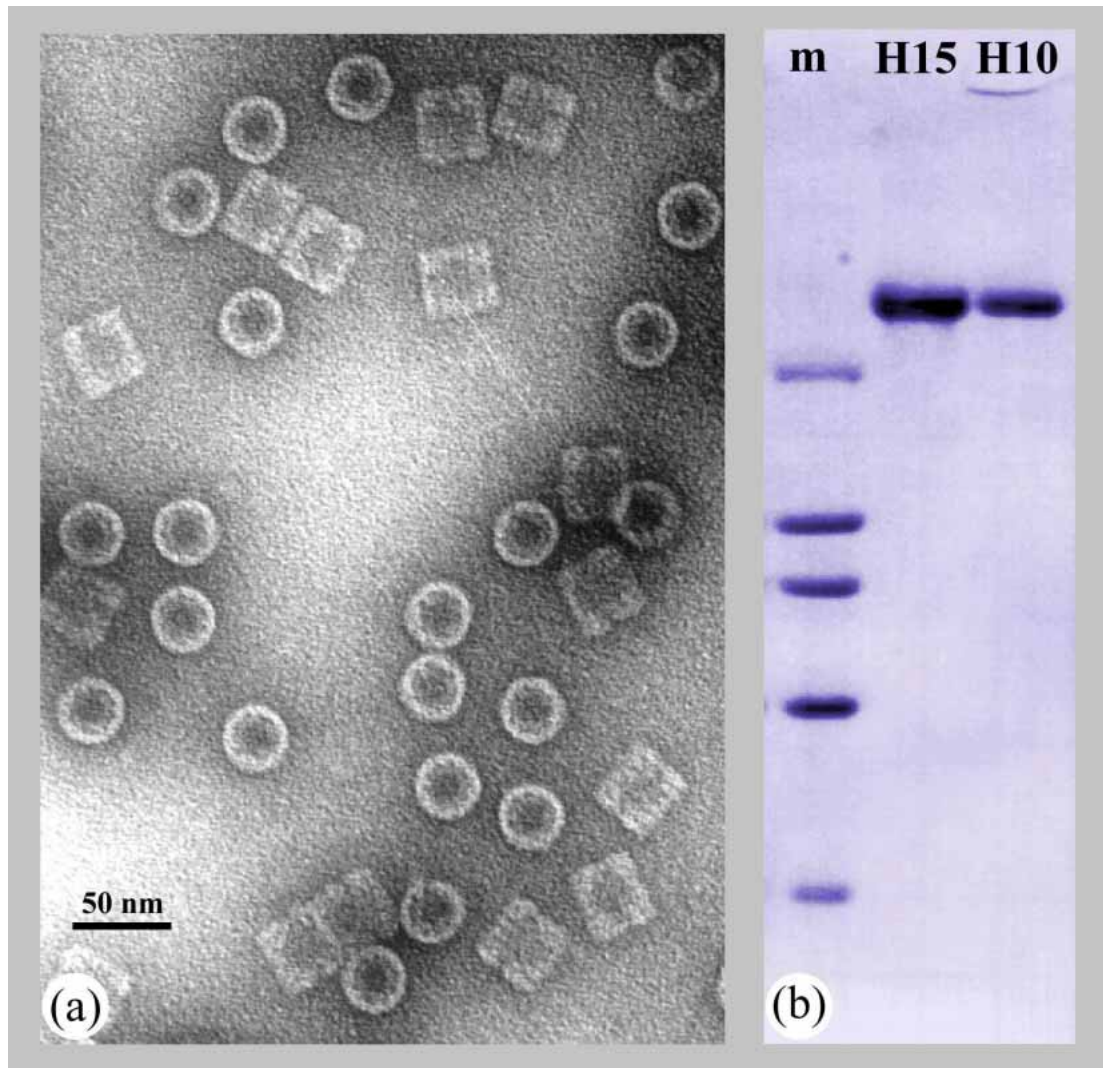


Abb. 13: Kontrolle der HtH1-Probe auf Unversehrtheit und Reinheit:

- (a) EM-Aufnahme negativ kontrastierter HtH1-Moleküle bei einer Endvergrößerung von 150.000fach
- (b) 5 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Kontrolle, ob die Untereinheiten des HtH1 intakt sind. Aufgetragen wurden von links nach rechts: **m**: Marker mit Banden bei 205 kDa (oben), 116 kDa, 96 kDa, 66 kDa und 45 kDa (unten); **H15**: HtH1, 15 mg/mL; **H10**: HtH1, 10 mg/mL

2 Vorversuche mit schwermetallkontrastiertem HtH1

Zu Beginn meiner Arbeit führte ich eine Einzelpartikelanalyse anhand von negativ kontrastierten kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen durch (mikroskopiert von Dr. Prakash Dube am Philips CM20 Elektronenmikroskop in Marburg).

Zur Durchführung der Einzelpartikelanalyse wählte ich 16.000 elektronenmikroskopische Einzelaufnahmen des HtH1 von Hand aus und habe sie dann mit Hilfe des Softwarepaketes IMAGIC-5 gefiltert und klassifiziert. Es ließ sich mit diesem Datenmaterial jedoch lediglich eine Auflösung um 25 Å erzielen (Abb. 14a). Die Methode der negativen Kontrastierung hatte hier den Nachteil, dass nur Seitenansichten und Aufsichten des Moleküls in dem Datensatz zu finden waren (Abb. 14b). Bei dieser Methode wird die Probe auf einer Karbonschicht aufgebracht (vgl. Material und Methoden). Dies führt dazu, dass durch Oberflächeneffekte die Moleküle die Auf- und die Seitenlage bevorzugen, da bei diesen der Kontakt großer Moleküloberflächen mit der Karbonfilmfläche gegeben ist. Die resultierende Winkelverteilung ist in Abb. 14b dargestellt. Aufgrund der wenigen verfügbaren verschiedenen Ansichtswinkel lag die Auflösung deutlich unter den Erwartungen die anhand der Bildqualität aus dem 200 kV Philips-Elektronenmikroskop (Abb. 14c, d).

(Abbildung nächste Seite)

Abb. 14: Vorversuche mit Daten aus Aufnahmen negativ kontrastierter HtH1-Moleküle. Die Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV am Philips CM20 in Marburg gemacht.

- (a) Die beste erreichte Auflösung wurde anhand der Fourier Schalen Korrelation mit 25 Å ermittelt.
- (b) Die Winkelverteilung der 50 Klassen eines Datensatzes aus 16.000 Einzelbildern
- (c) Stereo-Oberflächenansicht der 3D-Rekonstruktion aus negativ kontrastierten EM-Aufnahmen. Da die Informationen in dem Bild nicht auf 25 Å gefiltert sind, sieht man Details, die weit unterhalb der errechneten Auflösung liegen (vgl. Diskussion)
- (d) Stereo-Oberflächenansicht des geöffneten HtH1-Moleküls. Auch hier sind Details aufgelöst, die unterhalb der graphisch bestimmten Auflösung liegen. Teilweise resultieren „schwebende Satelliten“ aus Rauschen oder nicht genau ausgerichteten Strukturelementen.
- (e) Rekonstruktion aus der negativ kontrastierten Probe, die auf 25 Å gefiltert wurde: Details, die nach der Fourier Schalen Korrelation unterhalb der Auflösungsgrenze liegen, wurden herausgefiltert. Diskrepanzen des grundsätzlichen Aufbaus zu der Rekonstruktion der Hauptversuche sind eine Folge der ungünstigen Verteilung der verfügbaren Eulerwinkel.

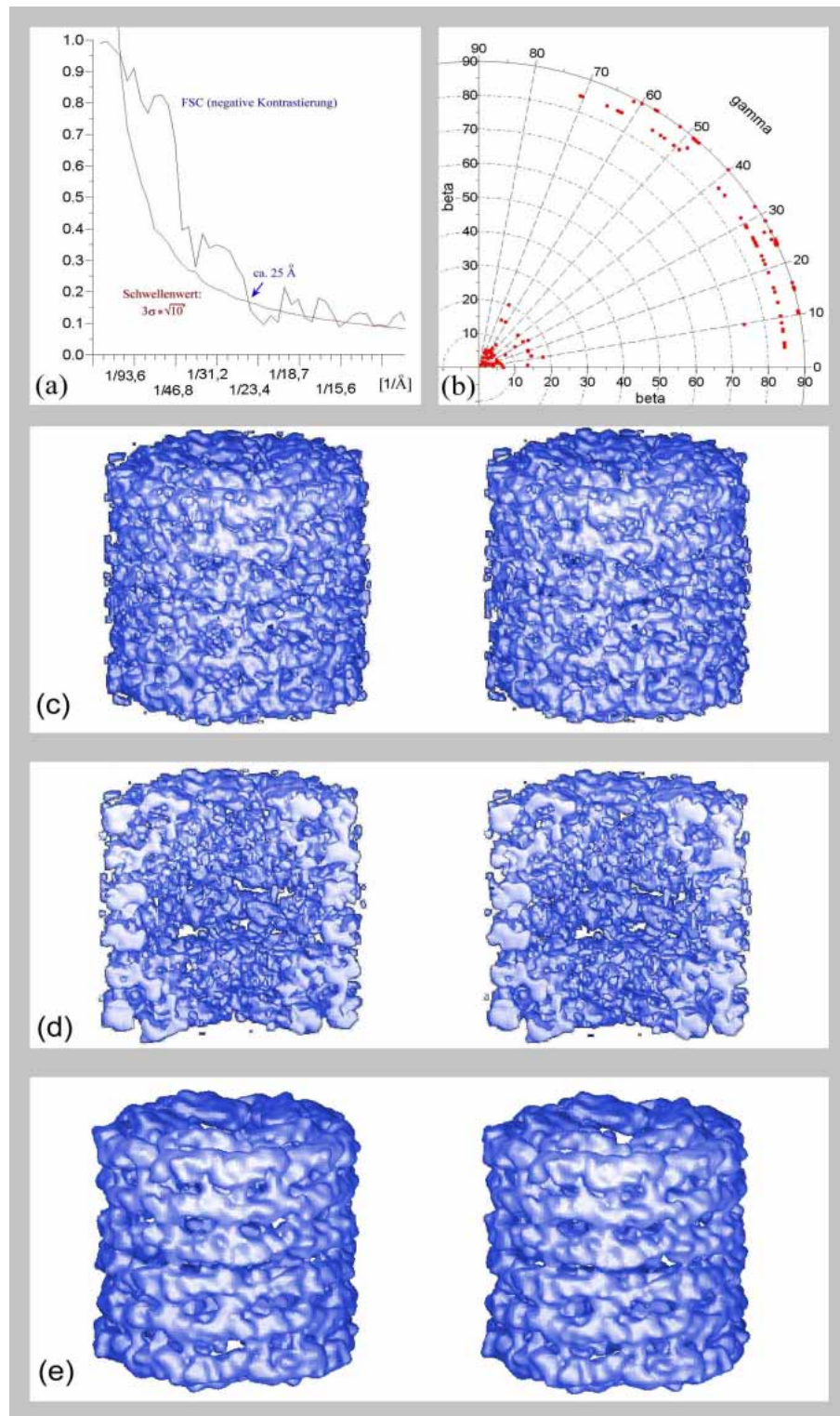


Abb. 14: [Legende vorherige Seite](#)

3 Hauptversuche mit unkontrastiertem HtH1

3.1 Aufnahmen am Philips CM20 FEG von HtH1 in glasartigem Eis

Es war zu erwarten, dass die Auflösung noch wesentlich zu verbessern wäre, indem man die Minima der Kontrasttransferfunktion durch Aufnahmen des Moleküls bei verschiedenen Defokuseinstellungen kompensiert (vgl. Material und Methoden). Dr. Prakash Dube erstellte für mich Aufnahmen eiseingebetteter, nicht kontrastierter HtH1-Moleküle in drei verschiedenen Defokuswerten. Die Methode, das HtH1 ohne Kontrastmittel nicht auf einer Karbonschicht sondern in einen Eisfilm zu präparieren führte dazu, dass eine bevorzugte Orientierung wie bei der negativen Kontrastierung nicht vorkam, sondern die Moleküle in den Aufnahmen in allen möglichen räumlichen Winkellorientierungen zu finden waren. Es waren auch keine Oberflächeneffekte oder Abflachungen zu beobachten wie in der Arbeit von Orlova *et al.* (1997) bei negativ kontrastierten Molekülen auf einer Karbonschicht.

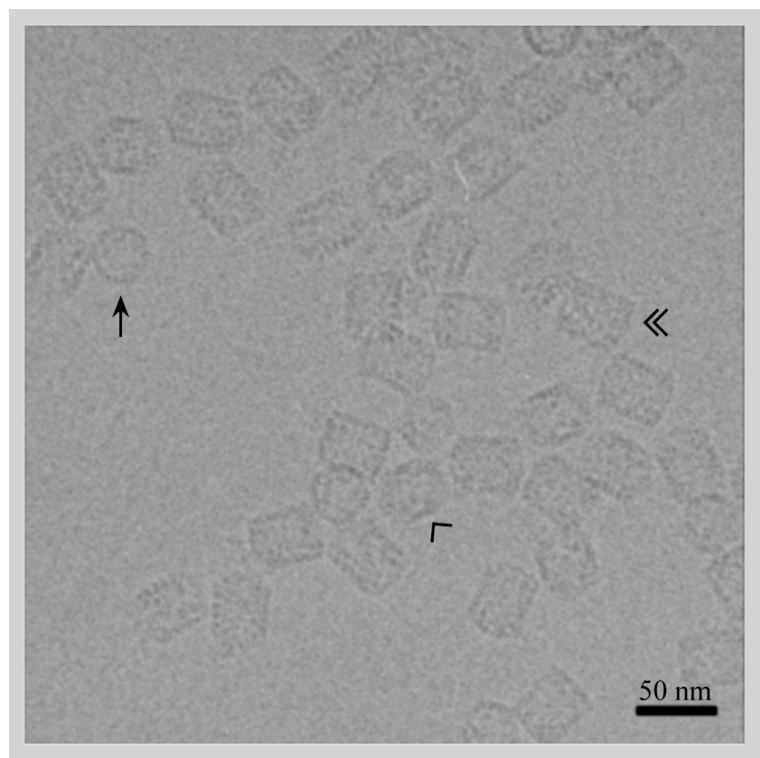
Ein Ausschnitt aus einem der kryoelektronenmikroskopischen Bilder ist in Abb. 15 dargestellt.

Der Fokus wurde jeweils in einem Randbereich des Lochs im Grid eingestellt, und die Aufnahmen wurden dann zur Schonung der Proben vor zu hoher Strahlenbelastung blind geschossen.

Abb. 15: In glasartiges Eis eingebettete HtH1-Didekamere aufgenommen im Philips CM20 Elektronenmikroskop.

Solche Aufnahmen wurden zur 3D-Rekonstruktion herangezogen (Defokuswert: $1,5\mu\text{m}$ $\Delta f/160\text{kV}$, $c=1.0\text{ mg/mL}$, in Niedrigsalzpufferlösung).

Auf dem Bild lassen sich HtH1-Moleküle in den verschiedensten Raumorientierungen erkennen (vgl. auch Abb. 16). Die Pfeile indizieren: Pfeil = Aufsicht, $\ll$ = Seitenansicht und $\angle$ = Schrägwinkelansicht.



Erst nach Entwicklung der Negative war daher eine qualitative Beurteilung möglich. Dabei zeigte sich, dass neben den Seitenansichten und Aufsichten, die fast ausschließlich bei den negativ kontrastierten Aufnahmen vorkamen, auch wie erwartet gedrehte Ansichten (*tilted*) zu finden waren.

3.2 Anzahl der selektierten Molekülbilder bei den verschiedenen Defokuswerten

Zur Durchführung der 3D-Rekonstruktion nach vorangegangener Bildverarbeitung mit Hilfe des Softwarepakets IMAGIC 5 wurde letztlich ein Datensatz von 9735 Einzelbildern bei verschiedenen Defokuseinstellungen gebildet (Tab. 2).

Etwa die Hälfte der Aufnahmen wurde bei einem Defokuswert von 1,5 μm gemacht, während die Aufnahmen bei den anderen beiden Defokuswerten (2,0 μm und 2,8 μm) jeweils ca. $\frac{1}{4}$ der Gesamtbilder ausmachten. Zunächst wurden für eine erste Rekonstruktion nur Klassen aus der Aufnahmenserie bei einem Defokuswert von 1,5 μm verwendet. Diese ergab zwar analog zu den negativ kontrastierten Molekülen (vgl. oben: Vorversuche) eine Rekonstruktion mit vielen aufgelösten Details (persönliche Schätzung: bis unter 8 Å), führte aber ebenso bei einer Auflösungsbestimmung mittels der Fourier Schalenkorrelation nur zu einer graphischen Auflösungsgrenze von bestenfalls 16,5 Å (vgl. unten: Bestimmung der Auflösung der 3D-Rekonstruktion, Abb. 17a, schwarze Kurve).

Tab. 2: Anzahl der selektierten Molekülbilder und der resultierenden ausgewählten Klassen bei verschiedenen Defokuswerten

Defokuswert	Anzahl der Einzelansichten (gesamt)	Anzahl der ursprünglichen Klassen	Anzahl der Klassen (endgültig verwendet)
1,5 μm	4947	ca. 500	235
2,0 μm	2554	ca. 250	124
2,8 μm	2234	ca. 220	147
gesamt	9735	-	506

Die Wahl weiterer Bildserien bei verschiedenen weiteren Defokuswerte diene der Verbesserung der bestimmbaren Auflösung, da sich Detailinformationen (Informationenlücken im Bereich der Nulldurchläufe bei der Kontrasttransferfunktion), die bei der 3D-Rekonstruktion bei einem einzelnen Defokuswert auftreten, dadurch wegfallen (vgl. Material und Methoden: Defokusreihen zur Auflösungsverbesserung; Abb. 7). Somit können die entstandenen Informationslücken durch die Informationen bei anderen Defokuswerten kompensiert werden (vgl. unten: Bestimmung der Auflösung der 3D-Rekonstruktion). Um diese Verbesserung praktisch zu erreichen, war es nicht mehr nötig, mehr als die Hälfte der bisher untersuchten Moleküle jeweils bei den anderen Defokuswerten (2,0 μm und 2,8 μm) zusätzlich auszuwählen und zu der 3D-Rekonstruktion mitzuverwenden, da die Hauptinformation aus den Bildern bei 1,5 μm Defokus stammt.

3.3 Anzahl der Klassen zur Rekonstruktion

Zunächst wurden bei den verschiedenen Defokuswerten jeweils Klassen mit durchschnittlich 10 Einzelbildern pro Klasse gebildet. Das bedeutet, dass zunächst ca. 10% Klassensummenbilder (= Summenbilder aus den Einzelbildern einer Klasse, im Folgenden als Klassenbilder bezeichnet) gegenüber den Einzelbildern gebildet wurden. Diesen Klassenbildern wurden dann anhand von Referenzen aus den Vorversuchen Raumwinkel zugeordnet, und anhand derer wurde eine erste 3D-Rekonstruktion (jeweils bei einem Defokuswert) durchgeführt. Innerhalb der einzelnen Datensätze (Defokus abhängig) wurde die Bestimmung der Raumwinkel für die Klassenbilder in jeweils 2-5 Runden optimiert.

Aus den resultierenden Fehlerwerten und durch Vergleich der Klassenbilder mit Rückprojektionen der 3D-Rekonstruktion wurden dann, unter Berücksichtigung der Unterschiedlichkeit der zugewiesenen Raumwinkel, ca. 50% der Klassenbilder ausgewählt und zur endgültigen 3D-Rekonstruktion verwendet, wodurch auch ca. 50% der ursprünglich selektierten Molekülbilder direkt in die Rekonstruktion eingingen.

3.4 Winkelverteilung der Klassen im Datensatz

Bei der Analyse der in Eis eingebetteten Moleküle zeigen diese zahlreiche unterschiedliche Orientierungen, wie aus Abb. 16 zu entnehmen ist. Projiziert man unter Berücksichtigung der Symmetriebedingungen (hier D5-Symmetrie), so lässt sich die Winkelverteilung graphisch wie in Abb. 16. darstellen.

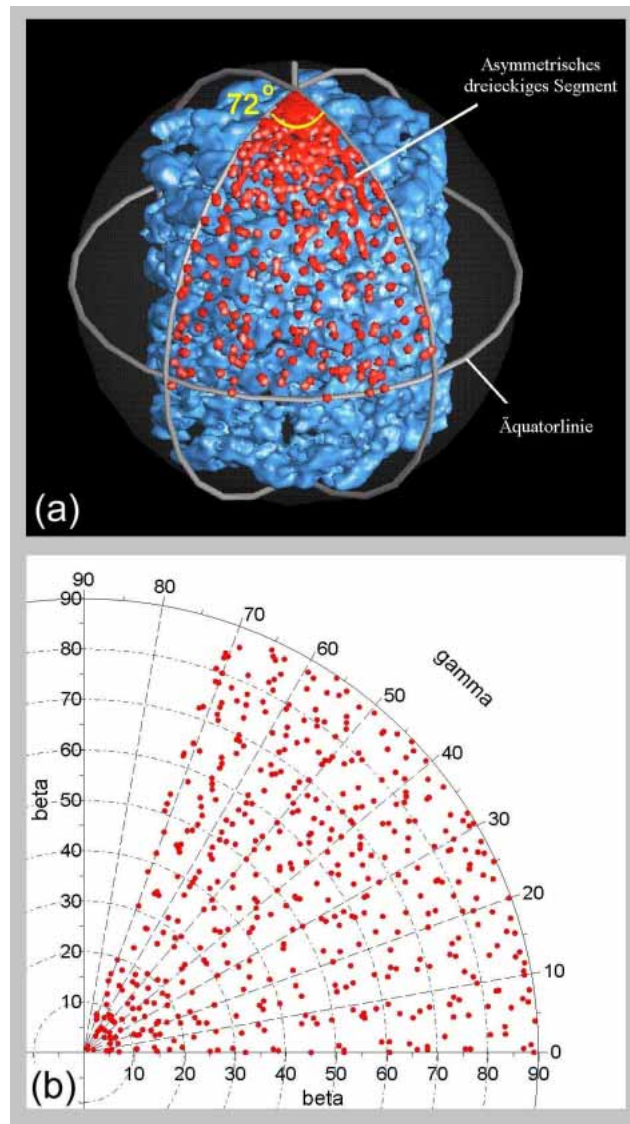


Abb. 16: Verteilung der Ansichtswinkel im Datensatz zur 3D-Rekonstruktion von HtH1. Dargestellt sind hier die Eulerwinkel der Klassensummenbilder, die zur Rekonstruktion verwendet wurden.

- (a) Das asymmetrische dreieckige Segment entspricht 1/10 der Oberfläche der um das Molekül angeordneten virtuellen Kugel, welche die verschiedenen möglichen Standorte zur Betrachtung des Moleküls bei konstantem Abstand vom Molekülmittelpunkt repräsentiert. Bei Annahme einer D5-Symmetrie lassen sich auch die übrigen 9 Segmente der Kugel auf diese Fläche projizieren.
- (b) Verteilung der Raumwinkel Beta (β) und Gamma (γ) innerhalb des Segmentes, das aus der D5-Symmetrie resultiert. In diesem Graphen lassen sich die Winkel direkt ablesen.

4 3D-Rekonstruktion des HtH1-Didekamers

Bisher waren 3D-Rekonstruktionen von Molluskenhämocyaninen aus EM-Aufnahmen immer auf Auflösungen jenseits der 15 Å limitiert. Dies war wohl vor allem eine Folge der verfügbaren Ansichtswinkel, da aufgrund von Oberflächeneffekten bei den meisten Präparationsmethoden Aufsichten und Seitenansichten bevorzugt auftreten. Dies ist auch bei der veröffentlichten 3D-Struktur von KLH1 der Fall (Orlova *et al.*, 1997).

Durch die Kryoelektronenmikroskopie von Molekülen, welche in glasartigem Eis eingebettet waren, standen bei dieser Arbeit eine Vielzahl von Ansichtswinkeln zur Verfügung.

Ein weiteres Problem bei der Aufbereitung der Daten ist es geeignete Filterparameter für ein optimales Alignment der Einzelbilder zu finden. Dazu müssen einerseits die Molekülbilder durch geeignete Hoch- und Tiefpassfilter so behandelt werden, dass die Struktureigenschaften, die für ein bestmögliches Alignment nötig sind, aus den Substrukturen hervorgehoben werden, andererseits aber keine Informationen verloren gehen, die später benötigt werden, um Details in der 3D-Rekonstruktion hervorzuheben.

Mit einem Trick ließ sich ein Alignment, das mit gröberen Strukturdaten durchgeführt worden war, mit den Details aus den weniger scharf gefilterten Rohdaten nachvollziehen, wodurch eine wesentlich bessere Ausrichtung der Molekülbilder möglich war. Die resultierenden Klassen enthielten dann Details, die sonst das Alignment gestört hätten, da sie nur durch die Klassensummiierung, nicht aber in den Einzelbildern zutage treten.

Durch zusätzliches Filtern von Referenzen für das Alignment ließen sich ferner aus den gleichen Gründen wie o.a. noch bessere Ausrichtungen der Einzelbilder erzielen. Dies war die Voraussetzung für eine optimale Zuweisung der Eulerwinkel für die 3D-Rekonstruktion.

4.1 Signal-Stärke Analyse

Nach einem ersten Alignment, als die Strukturelemente noch nicht exakt ausgerichtet waren, verwischten Kanten dieser Strukturbereichen wie bei einem leicht verwackelten Foto. Je exakter das Alignment die Strukturen ausrichtete, desto schärfer wurden die Abgrenzungen am Rand des Strukturelementes, und desto höher wurde die Summe der auf einen Punkt abgebildeten, einzelnen, ein Signal repräsentieren-

den Grauwerte andererseits. Tab. 3 zeigt, wie sich die Signalstärke während der Rekonstruktion veränderte.

Tab. 3: Veränderung der Signalstärke ($=\Delta$ -Grauwert) während der 3D-Rekonstruktion

Rekonstruktions-Schritt	Min. Grauwert	Max. Grauwert	Δ -Grauwert
Erste Rekonstruktion (ca. 29 Å)	-0,0623	0,0744	0,1667
Entgültige Rekonstruktion (12 Å)	-0,3052	+0,3816	0,6868

4.2 Bestimmung der Auflösung der 3D-Rekonstruktion

Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion wurde durch den Funktionsverlauf der Fourier Schalen Korrelation ermittelt (Harauz & Van Heel, 1986). Theoretisch liegt diese Auflösungsgrenze beim Doppelten der Größe eines Pixels. (In der vorliegenden Arbeit entspricht ein Pixel der HtH1-Rekonstruktion 3,2 Å, d.h. die Grenze der Auflösung lag theoretisch bei max. 6,4 Å.) Da die Unschärfe der EM-Bilder, auf denen die Rekonstruktion beruhte, durch das Alignment und die Klassensummiierung nicht vollständig bereinigt werden konnte, musste die Qualität der Auflösung durch ein geeignetes Verfahren überprüft werden. Dabei wurden bei der FSC zwei 3D-Berechnungen aus jeweils der Hälfte der Datenmasse miteinander verglichen. Als Ausgangsmaterial wurde dabei jeweils die Hälfte der ursprünglichen Klassen (jeweils 253 Klassensummenbilder) verwendet (vgl. Diskussion). Als Schwellenwertfunktion wurde $3\sigma \times \sqrt{10}$ ($\sim 9,5\sigma$) verwendet, wie von Orlova *et al.* (1997) beschrieben. Dort, wo die resultierende Kurve dieses Vergleichs die Schwellenwertkurve erstmals schnitt, wurde die Grenze der Auflösung in Å abgelesen. Wie aus Abb. 17 ersichtlich ist, ließ sich für die vorliegende Rekonstruktion des HtH1-Didekamers der Schnittpunkt der Gesamtkurve (hier sind alle 506 Klassen eingegangen) für die Rekonstruktion aus allen drei Defokuswerten mit der 3Sigma-Kurve bei ca. 12 Å ablesen.

Ebenfalls in der Abbildung dargestellt sind die FSC-Kurven, die sich aus der Analyse der Rekonstruktionen jeweils bei den verschiedenen Defokuswerten ergaben. Die resultierende FSC-Gesamtkurve ist durch Korrelation zweier 3D-Rekonstruktionen aus allen Klassen entstanden. Dennoch kann man hier sehen, dass die Summe der drei FSC-Einzelkurven, die jeweils bei einzelnen Defokusbe-

dingungen ermittelt wurden, in etwa den gleichen Verlauf nehmen würde wie die resultierende Gesamtkurve.

Würde man einen von Böttcher *et al.* (1997) beschriebenen Schwellenwert von konstant 0,5 verwenden, würde sich die Auflösung der Rekonstruktion auf ca. 17 Å verschlechtern, was jedoch die sichtbaren Details in der 3D-Dichtekarte nicht erklären würde (vgl. Diskussion)

Mit einer Auflösung von 12 Å ist das HtH1 Modell die bisher beste 3D-Rekonstruktion eines Mollusken-Hämocyanins, welche aus EM-Bildern ermittelt wurde.

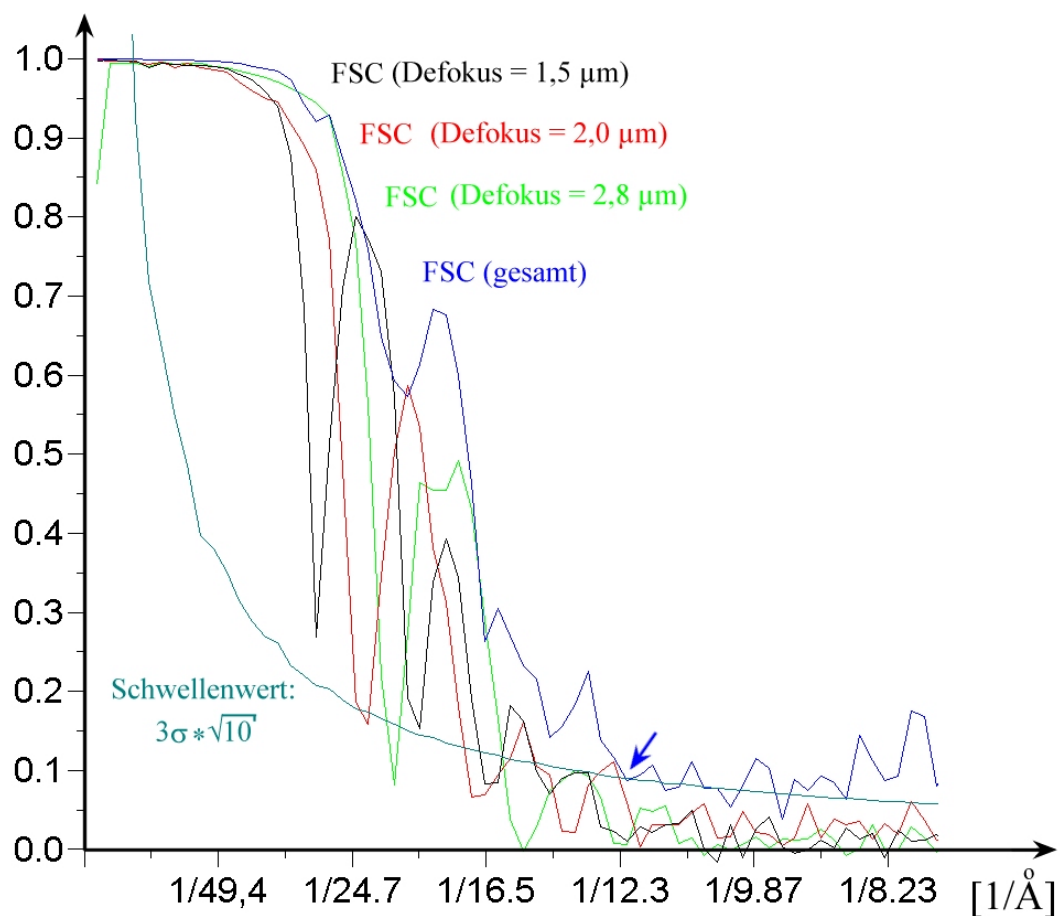


Abb. 17: Bestimmung der Auflösung der HtH1-Rekonstruktion anhand der Fourier Schalen Korrelation.

Die erzielte Auflösung (12 Å) lässt sich aus dem Schnittpunkt der FSC-Kurve (gesamt) mit der Schwellenwertkurve ablesen (Pfeil).

4.3 Verifizierung der Symmetrievoraussetzungen für die Rekonstruktion

Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder und der bisher bekannten Struktureigenschaften von Molluskenhämocyaninen konnten Symmetrien ausgeschlossen werden, die keine 5fach-Achse als Symmetriemöglichkeit zuließen, (z.B. C4, D4, C6, D6, C8 oder D8); (vgl. Diskussion).

Zur Disposition stehen hier die Symmetrien C5, D5, C10 und D10. Eine Rekonstruktion auf Grundlage einer D10-Symmetrie lässt sich aus technischen Gründen (warum weiß ich nicht) mit der IMAGIC 5-Software nicht durchführen, die Symmetrie ist verboten. Aus der Beobachtung heraus, dass HtH1-Didekamere in zwei identische Dekamere zerlegbar sind, liegt den Schluss nahe, dass eine Rekonstruktion auf Basis einer D5- oder D10-Symmetrie sinnvoll ist. Da eine D10-symmetrische Rekonstruktion jedoch nicht möglich war, eine C10-Symmetrie aber de facto die Möglichkeit eines D10-symmetrischen Körpers beinhaltet und zum Vergleich der Qualität der C10-symmetrischen Rekonstruktion eine C5-symmetrische herangezogen werden kann, wurden alle drei 3D-Rekonstruktionen durchgeführt.

Zur Bestimmung realitätsnaher Symmetrieeigenschaften wurden im Vorfeld der 3D-Rekonstruktion die ersten guten Klassen (d.h. ausgewählte Klassen, denen sich gut Ansichtswinkel zuweisen lassen und die visuell gut ausgerichtet erscheinen) verwendet. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden dann mit dem endgültigen Datensatz diese Berechnungen erneut durchgeführt, um die Wahl der Symmetrieeigenschaften zu untermauern, die für das endgültige Rekonstruktionsverfahren herangezogen wurden.

Im folgenden sind die Rekonstruktionsergebnisse für eine C5-Symmetrie, eine C10-Symmetrie und eine D5-Symmetrie im einzelnen aufgeführt.

4.3.1 C5-Symmetrie

Bei der Euleranalyse der C5-Symmetrie werden fünf identische Segmente längs aus dem Molekül geschnitten, wie beim Aufschneiden eines Kuchens. Da jedes dieser Segmente die gleiche Struktur hat, wie die anderen, erhält man durch die Analyse aller fünf Segmente die fünffache Information des ursprüngliche Datensatzes: Von ursprünglich 9735 Ansichten, die Strukturdaten lieferten, lassen sich nun ca. 48.600 Ansichten des Moleküls betrachten. Die Auflösung, die durch diese Rekonstruktion erreicht wurde, lag bei ca. 15 Å (Abb. 18a). Sie konnte vor allem genutzt werden, um die Orientierung der beiden Dekamere im Didekamer zu überprüfen (vgl. dazu auch Abb. 22).

Die Auflösungsverschlechterung um numerisch nur 3 Å gegenüber der D5-symmetrischen Rekonstruktion zeigt hier anschaulich, welch ein Detailverlust damit verbunden ist. Dies geht aus einem direkten Vergleich der Güte der 3D-Oberflächenbilder bei gleicher Orientierung aus der D5-symmetrischen (Abb. 25a und b) und der C5-symmetrischen (Abb. 18c und d) 3D-Rekonstruktion hervor.

4.3.2 C10-Symmetrie

Analog zur C5-Symmetrie lässt sich auch eine C10-Symmetrie berechnen, wobei aber vorausgesetzt wird, das Didekamer bestehe aus 10 identischen Wiederholungseinheiten (*repeating units*). Diese Möglichkeit liegt zwar aufgrund des dekameren Aufbaus des Moleküls vordergründig auf der Hand, war aber bei den älteren Rekonstruktionen von Molluskenhämocyaninen (z.B. Dube *et al.*, 1995; Lamy *et al.*, 1998; Mouche *et al.*, 1999; Orlova *et al.*, 1997) als nicht zutreffend eingestuft worden. Dennoch wurde auch diese Möglichkeit untersucht. Die Rückprojektionen, die aus der C10-Rekonstruktion resultierten, zeigten jedoch signifikante Abweichungen von den Originalklassenbildern (Abb. 19, 21). Die Auflösung entsprach mit 15 Å jener der C5-Symmetrie (Abb. 19a). Gegen eine C10-Symmetrie sprach auch, dass die C5-symmetrische Rekonstruktion keine Hinweise auf eine 10fach Symmetrie lieferte. Damit war gezeigt, dass eine C10-Symmetrie aufgrund ihrer niedrigeren Auflösung (in Bezug auf die Erwartung) und der mangelnden Qualität ihrer Rückprojektionen das Molekül nicht realitätsnah wiedergibt. (siehe Diskussion)

4.3.3 D5-Symmetrie

Die D5-Symmetrie, hat gegenüber der C5-Symmetrie den Vorteil, dass bei der gleichen Anzahl von Bildern die doppelte Menge an Bildinformationen genutzt werden kann (siehe oben).

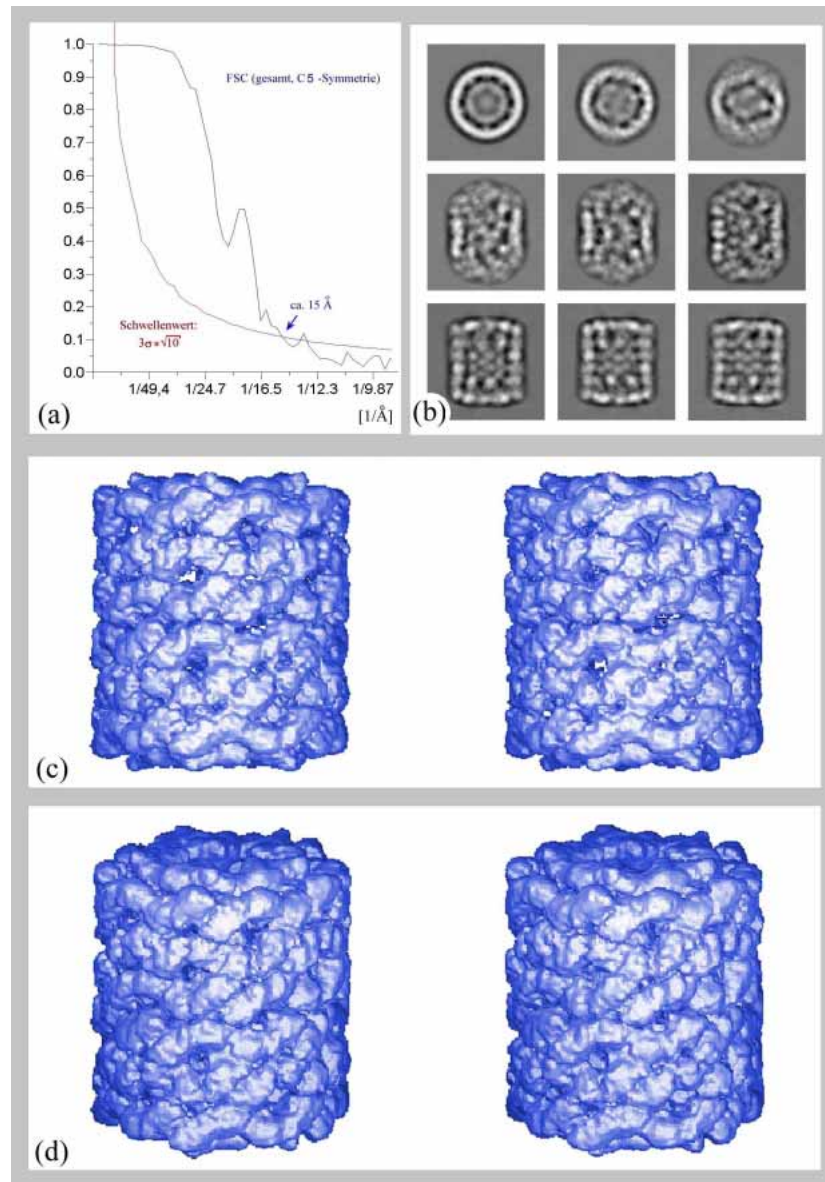


Abb. 18: Übersicht über die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion unter Verwendung der C5-Symmetrie.

- (a) FSC, die Kurve schneidet den Schwellenwert bei ca. 15 Å.
- (b) Rückprojektionen des C5-symmetrisch Rekonstruierten HtH1-Moleküls.
- (c) und (d) Die Oberflächenansichten einer 3D-Rekonstruktion, die mit einer C5-Symmetrie berechnet wurde (β in (d) = 74°). Aus dieser Rekonstruktion lässt sich ableiten, dass eine Rekonstruktion mit einer D5-Symmetrie sinnvoll ist, weil die Dekamere identisch erscheinen, obwohl dies durch die C5-Symmetrie nicht vorausgesetzt wird.

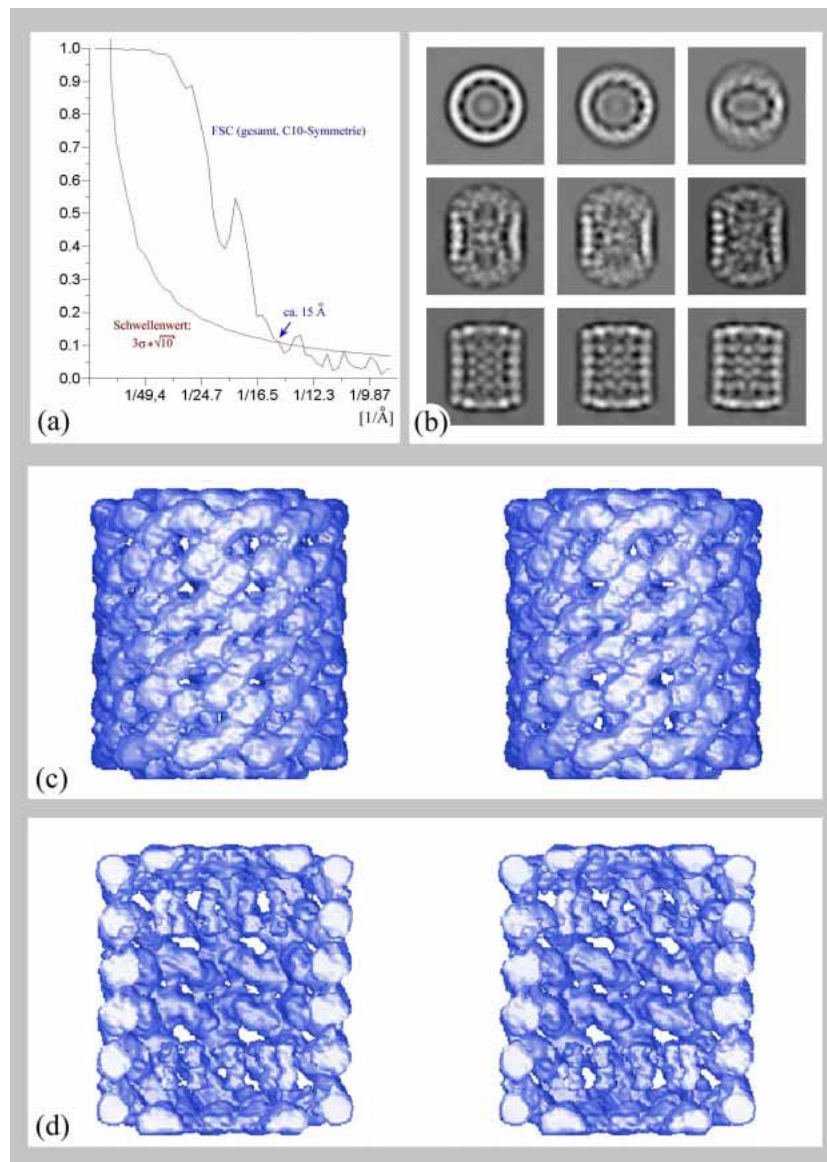


Abb. 19: 3D-Rekonstruktion von HtH1, die mit einer C10-Symmetrie berechnet wurde, wobei der Schwellenwert gemäß der berechneten Molekülmasse angeglichen wurde.

- (a) FSC zur Bestimmung der Auflösung der C10-symmetrischen Rekonstruktion (15 Å),
- (b) Rückprojektionen der C10-Rekonstruktion.
- (c) Außenansicht: die Wand besteht aus 10 gleichen, helikal angeordneten Elementen bei einer rechnerischen Auflösung von ca. 15 Å.
- (d) Längsschnitt durch die Rekonstruktion zur Innenansicht, wobei der Kragenkomplex als 10 einzelne Massen erscheint.

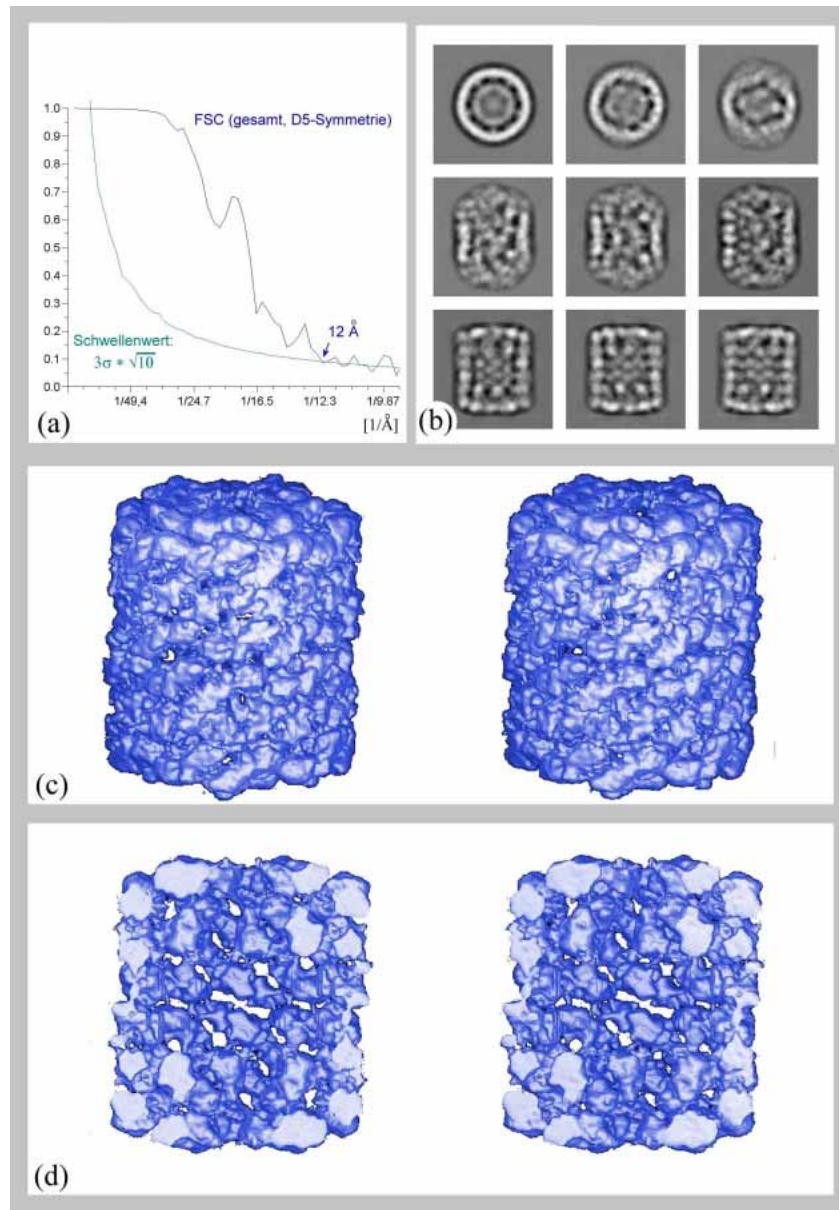


Abb. 20: 3D-Rekonstruktion von HtH1, die mit einer D5-Symmetrie berechnet wurde, wobei der Schwellenwert gemäß der berechneten Molekülmasse angeglichen wurde.

- (a) FSC zur Bestimmung der Auflösung der D5-symmetrischen Rekonstruktion (12 Å),
- (b) Rückprojektionen der D5-Rekonstruktion.
- (c) Außenansicht: Die Wand besteht aus 10 gleichen, helikal angeordneten Elementen bei einer rechnerischen Auflösung von ca. 12 Å.
- (d) Längsschnitt durch die Rekonstruktion zur Innenansicht, wobei der Kragenkomplex als 5 einzelne Massen erscheint.

Wie schon aus den Untersuchungen am Hämocyanin anderer Mollusken zu erwarten war, zeigte sich auch beim HtH1, dass die D5-Symmetrie das Didekamer am besten beschreibt. In diesem Fall können also jeweils die Dekamere in je fünf Segmente unterteilt werden, so dass für das Didekamer auch hier die zehnfache Menge an Ansichten zur Verfügung steht.

Alle weiteren Untersuchungen wurden daher mit der D5-Symmetrie Analyse durchgeführt. Diese hatte gegenüber der C5-Symmetrie den Vorteil, dass doppelt so viele Ansichten für die 3D-Rekonstruktion verwendet werden konnten, also ca. 97.000 Ansichten. Somit war auch die Auflösung von 12 Å möglich.

4.3.4 Zusammenfassung der Symmetrieuntersuchungen

Die bereits für andere Molluskenhämocyanine abgeleitete D5-Symmetrie (z.B. Dube *et al.*, 1995; Lamy *et al.*, 1998; Orlova *et al.*, 1997), ließ sich auch bei der 3D-Rekonstruktion des HtH1 bestätigen. Die C5-Rekonstruktion führte zu akzeptablen, wenn auch schwächeren Ergebnissen. Die FSC der C10-Rekonstruktion brachte erstaunlicherweise eine ähnliche Auflösung zustande wie die C5-symmetrische Rekonstruktion. Diese Möglichkeit wird jedoch durch die signifikante Zunahme des Fehlers (Tab. 4) sowie die deutlichen Abweichungen in den Rückprojektionen gegenüber den Originalklassenbildern (Abb. 21) widerlegt.

Tab. 4: Übersicht der Kriterien, die zur Beurteilung der Qualität der Rekonstruktionen, bei verschiedenen Symmetrievoraussetzungen herangezogen wurden. Der angegebene Fehler ist ein Wert, den IMAGIC 5 aus der Übereinstimmung der verschiedenen beteiligten Klassenbilder zur resultierenden 3D-Rekonstruktion berechnet und ausgibt. Zur Berechnung und dem zustande kommen dieses Fehlers sind keine Angaben in der Dokumentation von IMAGIC gemacht.

Symmetrie	Signalstärke [absolut]	Visuelle Übereinstim- mung der Rückprojektio- nen mit Originalklassen	Fehler [%]	Max. Auflösung [Å] (aus FSC)
C5	0,7031	Gut	17,16	15
C10	0,4864	Unzureichend	26,37	15
D5	0,6868	Sehr gut	17,37	12

Dagegen zeigte die 3D-Rekonstruktion unter Zugrundelegen einer C5-Symmetrie recht deutlich, dass hier eine D5-Symmetrie vorliegt (Abb. 21), die dann auch für die endgültige Rekonstruktion verwendet wurde, da die beiden identischen Dekamere mit der dem Kragenkomplex abgewandten Seite aufeinander sitzen.

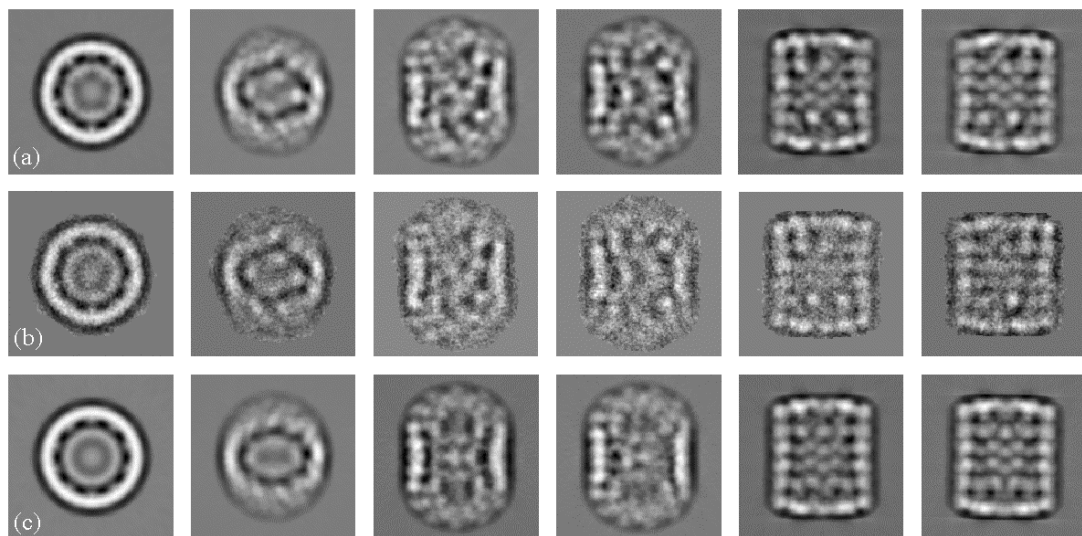


Abb. 21: Falsifizierung einer C10-Symmetrie anhand von Rückprojektionen der C10-symmetrischen 3D-Rekonstruktion.

Vergleich der Rückprojektionen einer D5-symmetrischen-Rekonstruktion (Reihe a) mit Klassenbildern, welche die EM-Aufnahmen repräsentieren (Reihe b) und Rückprojektionen einer C10-symmetrischen-Rekonstruktion (Reihe c). Dabei zeigen die Reihen a und b eine wesentlich höhere Übereinstimmung als die Reihen b und c. Dadurch wird die Annahme einer 5fach-Symmetrie sowohl des Dekamers als auch des Didekamers bestätigt.

4.4 Anordnung der Dekamere im Didekamer

Wie die Untersuchungen der C5-Symmetrie zeigten, haben die beiden Dekamere eine bestimmten Orientierung zueinander (siehe oben).

Dies wird durch den Vergleich der Originalklassen mit Rückprojektionen der D5-symmetrischen 3D-Rekonstruktion belegt (Abb. 22). Wenn nämlich ein Dekamer im Didekamer gegenüber dem Ausgangszustand (Abb. 22a) um 36° gedreht wurde änderten sich dadurch die Symmetrie-Eigenschaften im Didekamer (Abb. 22b).

Der Vergleich von Rückprojektionen der originalen und der um 36° verdrehten Dekamere mit einer Seitenansicht der Originalklasse, kann zugleich als Bestätigung der 5fach-Symmetrie gegenüber einer 10fach-Symmetrie im Dekamer dienen, da im letzten Fall keine Unterschiede zwischen den Rückprojektionen zu sehen wären.

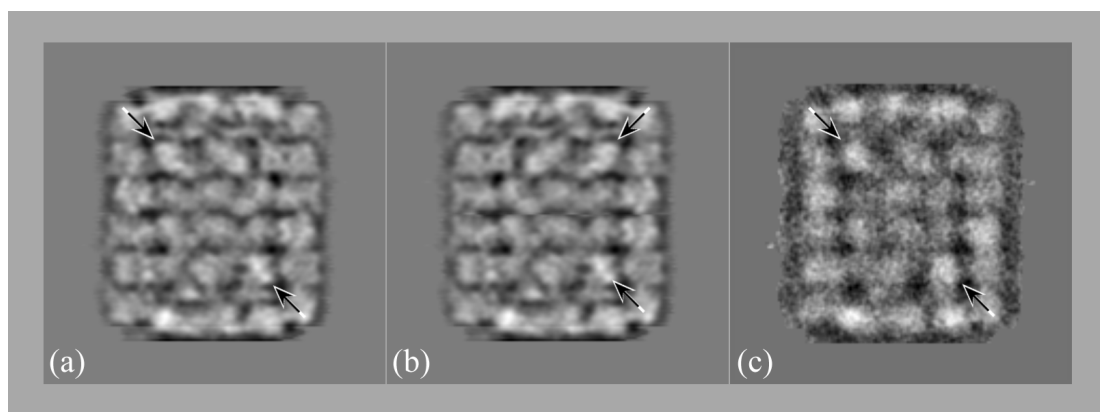


Abb. 22: Die Orientierung der Dekamere zueinander im Didekamer ist nur in einer Position möglich:

(a) Rückprojektion der 3D-Rekonstruktion; (b) Rückprojektion, bei der ein Dekamer um 36° gedreht ist; man beachte die Änderung der Symmetrieeigenschaften im Didekamer (Pfeile). (c) Eine Originalklasse der Seitenansicht im EM-Bild belegt, dass nur (a) zulässig ist.

(Eulerwinkel: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 4^\circ$.)

4.5 3D-Schnittserie

Die 3D-Rekonstruktion von HtH1 ergab eine 3D-Dichtekarte (= 3D-Schnittserie) des Moleküls, bei der die im Raum ermittelten Masseschwerpunkte gemäß ihrer Intensität als mehr oder weniger intensiv gefärbte Voxel (= räumliche Pixel) in einer – den Raum beschreibenden – Schnittfolge durch das Molekül aufgetragen sind. Ein Pixel innerhalb jedes dieser Bilder entspricht einer Ausdehnung von $3,2 \text{ \AA} \times 3,2 \text{ \AA}$. Jedes Einzelbild in dieser Serie entspricht dabei einer Ausdehnung des 3D-Bildes von einem Pixel in z-Richtung.

In der ersten Reihe der 3D-Dichtekarte des HtH1-Dekamers (= $\frac{1}{2}$ Didekamer) in Abb. 23 ist zu sehen, wie der obere Bereich des Kragenkomplexes (*Collar*) zuerst geschnitten wird. Erst im letzten Bild dieser Reihe sieht man die ersten Andeutungen der Zylinderwand. Der Kragen ragt also deutlich über die Wand hinaus (vgl. unten: Die Oberflächen-Seitenansicht des HtH1-Didekamers). In der zweiten Reihe ist dann zu erkennen, wie sich die Wand formiert. Der Übergang vom *Collar* in den *Arc*-Bereich (der untere Teil des Kragenkomplexes, siehe unten) ist dann in der dritten Reihe zu sehen. Die folgenden vier Reihen zeigen Schnitte durch die Zylinderwand und den *Arc*. Die letzten drei Reihen der Dichtekarte des Dekamers zeigen dann nur noch die Wand.

Betrachtet man in der Schnittserie nur die Wand, so ist in der fünften und der achten Reihe jeweils eine starke Ausdünnung der Massen zu erkennen. Hier wirkt das Dekamer jeweils eingeschnürt. In manchen Arbeiten (z.B. Orlova *et al.*, 1997) wurden die drei durch die Einschnürungen getrennten Wülste als *tiers* bezeichnet. Die Wand im Zentrum des mittleren (2.) *tier* (in dieser Arbeit auch Schicht oder Wandzug genannt) weist eine hohe innermolekulare Symmetrie auf (= sechste Reihe der Dichtekarte). Tatsächlich lassen sich in der ganzen Dichtekarte im Wandbereich Symmetrien erkennen, die jedoch durch Anwesenheit des Kragenkomplexes leicht übersehen werden.

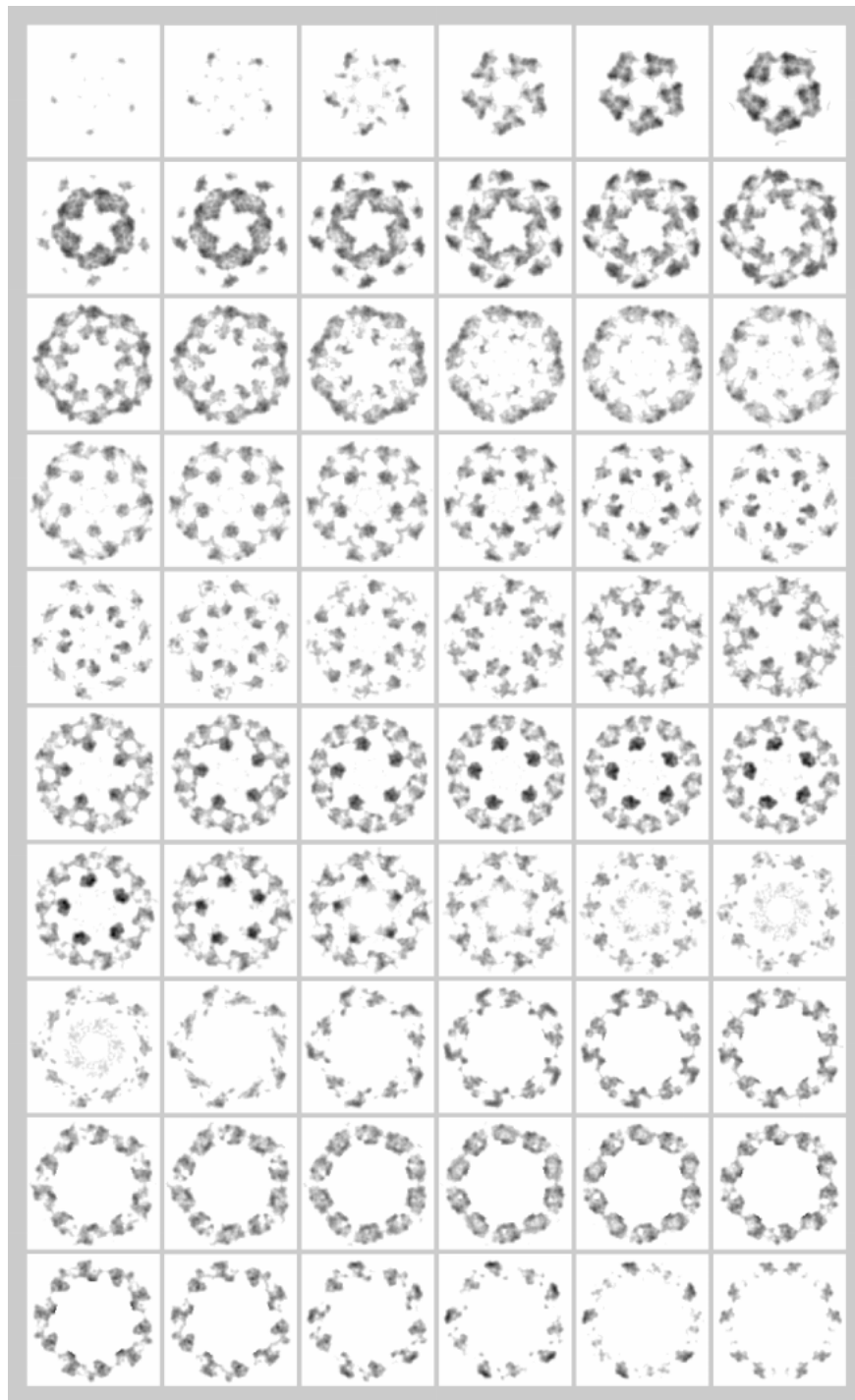


Abb. 23: Schnittserie durch ein HtH1-Dekamer mit Verteilung der Dichte (Auflösung: 12 Å). Die verschiedenen Dichtewerte werden durch die Intensität repräsentiert.

Die Farbintensität der Voxel bestimmt die Signalintensität der Struktur. Für die Bestimmung der 3D-Oberfläche wird später ein Schwellenwert angegeben, welcher die Intensitätsgrenze festlegt, ab wann ein Voxel zur Darstellung der Oberflächenansicht hinzugezogen, und bis wann er ignoriert wird.

Die Dichtekarte lässt viele Strukturdetails erkennen, die in der 15 Å-Rekonstruktion des KLH1 (Orlova *et al.*, 1997) nicht zu sehen sind.

4.6 Die Seitenansicht des HtH1-Didekamers bei verschiedenen Schwellenwerten für die Oberflächenberechnung

Zur Berechnung (*rendern*) der Oberflächenansicht der HtH1 Rekonstruktion anhand der Dichtekarte konnte der dafür gewählte Schwellenwert das Erscheinungsbild des Moleküls deutlich beeinflussen. Bei Annahme einer molekularen Dichte von $0,83 \text{ Da}/\text{\AA}^3$ ließ sich ein Zusammenhang zwischen gewähltem Schwellenwert und resultierender Masse für das Molekül ermitteln. In Abb. 24 ist die Oberflächendarstellung des HtH1-Dimers bei verschiedenen Schwellenwerten gezeigt. Im Folgenden wurden alle Oberflächendarstellungen mit dem Schwellenwert, der mit einer Masse von 8 MDa korreliert, berechnet. Dieser wurde auch jeweils zum Export von Daten zur Darstellung in anderen Programmen und zur Fertigung eines soliden Modells verwendet (siehe unten).

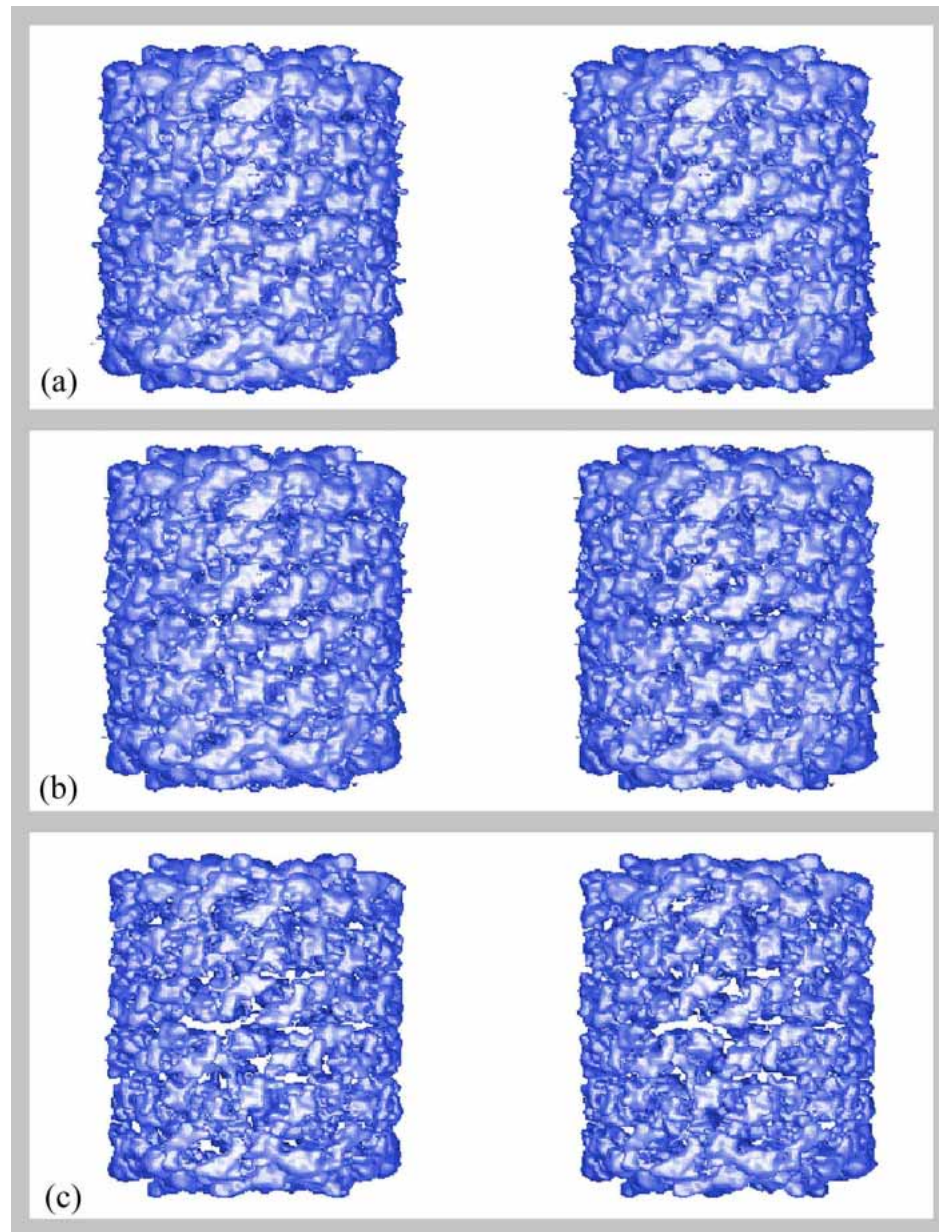


Abb. 24: Oberflächengerenderte Stereoansichten des HtH1-Didekamers bei verschiedenen Schwellenwerten für die Oberflächenbegrenzung.

- (a) entspricht einer Masse von 8 MDa,
- (b) entspricht einer Masse von 6,8 MDa und
- (c) entspricht einer Masse von 4,0 MDa

4.7 Symmetrieeigenschaften im HtH1-Didekamer

Wenn man die Stereoabbildungen der 3D-Ansichten der kompletten Didekamere leicht nach vorne geneigt betrachtet, hat man einen besseren Überblick über die Quartärstruktur des 8 MDa Hohlzylinders (Abb. 25a). Aus dieser Perspektive lassen sich jedoch die Symmetrieeigenschaften des Moleküls nur schwer erkennen. Betrachtet man das HtH1-Didekamer dagegen direkt von vorne ($\beta=90^\circ$) und dreht es um die zentrale Achse (in γ -Richtung), bis man eine 2fache Punktsymmetrie im Zentrum des Moleküls erkennt - dies ist der Fall bei $\gamma=0^\circ$ (Abb. 25b) und $\gamma=36^\circ$ (nicht gezeigt) -, kann man die paarige Anordnung der Dekamere gut erkennen. Diese sitzen in der Ebene des Symmetriemittelpunktes um 180° gegeneinander verdreht aufeinander.

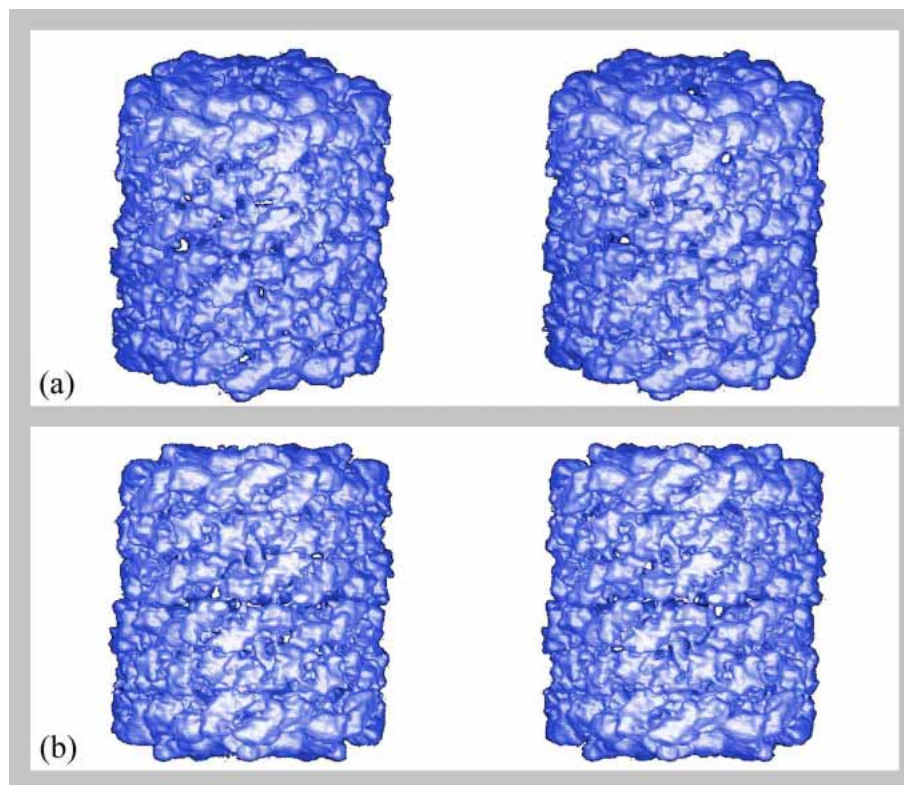


Abb. 25: Stereoansichten bei einem Schwellenwert, der mit der Molekülmasse des HtH1 korreliert, welche aus der Aminosäuresequenz ermittelt wurde (8 MDa):

- (a) Perspektivische Ansicht des HtH1-Didekamers
- (b) Ansicht $\beta=90^\circ$ auf die 5fach-Achse, wobei das Molekül solange um diese gedreht wurde, bis eine klare 2fach-Symmetrie im Zentrum zu erkennen war.

4.8 Symmetrieeigenschaften im aufgeschnittenen HtH1-Didekamer

Ein medianer Längsschnitt durch die HtH1-Rekonstruktion, lässt die interne Struktur erkennen (Abb. 26). So lassen sich hier *Collar* und *Arc* deutlich unterscheiden.

Im geöffneten Didekamer lassen sich die gleichen Symmetriemerkmale erkennen wie im geschlossenen (vgl. Abb. 25b), wenn das Molekül wiederum in der 2fach-Symmetrieebene angeordnet ist (Abb. 26). Man sieht an den Schnittflächen deutlich, wie sich die Symmetrie in dieser Schnittebene auswirkt. Dieser Effekt geht verloren, wenn das Molekül aus dieser Ebene herausgedreht wird (hier nicht gezeigt).

Der *Arc* wird dabei pro Dekamer aus 10 Massen gebildet, die jeweils zu 5 Paaren angeordnet sind (vgl. auch Abb. 23). Der *Arc* führt dann in einer leichten Diagonaldrehung, die der diagonalen Anordnung der Wand entgegenläuft, von der Verbindung mit dem mittleren Wandzug (*tier*) in Richtung *Collar*.

Der *Collar* bildet einen in sich offenbar stabilen Ring, der an keiner Stelle unterbrochen ist.

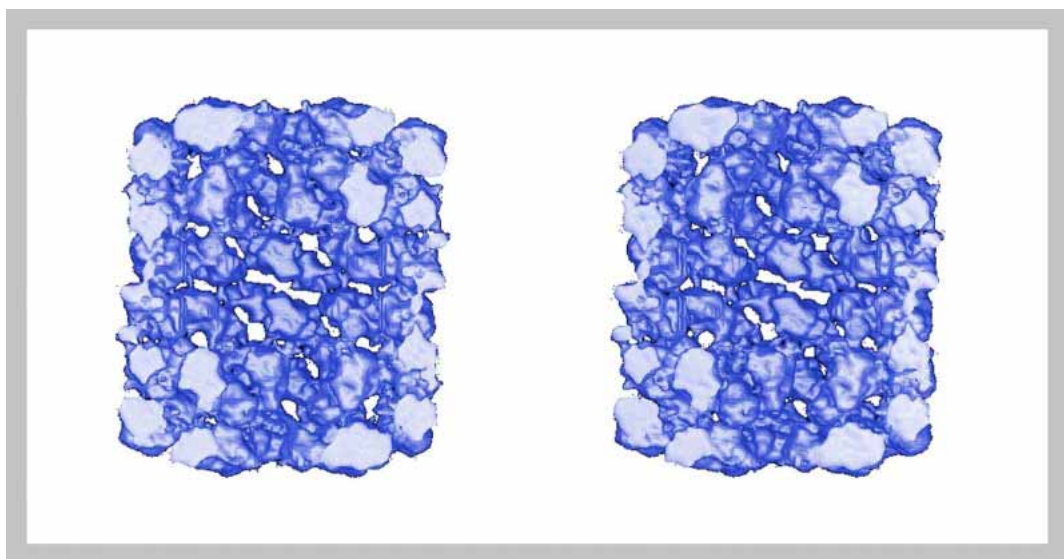


Abb. 26: Längsschnitt durch das HtH1-Didekamer entlang der 5fach-Achse:

Stereoansicht bei einem Schwellenwert, der mit der Molekülmasse des HtH1 korreliert, welche aus der Aminosäuresequenz ermittelt wurde (8 MDa).

4.9 Auflösung funktioneller Domänen im HtH1-Didekamer

Das HtH1-Didekamer untergliedert sich in zwei Dekamere aus je 80 etwa gleich großen Massen, von denen 20 den Kragenkomplex und 60 die Zylinderwand bilden (Abb. 25, 26).

Aufgrund der vorliegenden biochemischen und molekularbiologischen Daten (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 2000; Lieb *et al.*, 1999) in Verbindung mit der hier sichtbaren 3D-Struktur ist klar, dass jede dieser Massen einer funktionellen Domäne (*functional unit*, FU) entspricht. Jeweils zwei paarig angeordnete funktionelle Domänen bilden eine „morphologische Einheit“ (vgl. Diskussion). Wie in Abb. 27 markiert ist, gibt es in der Molekülwand drei Motive, die sich im Zylinder wiederholen und die drei verschiedenen morphologischen Einheiten entsprechen.

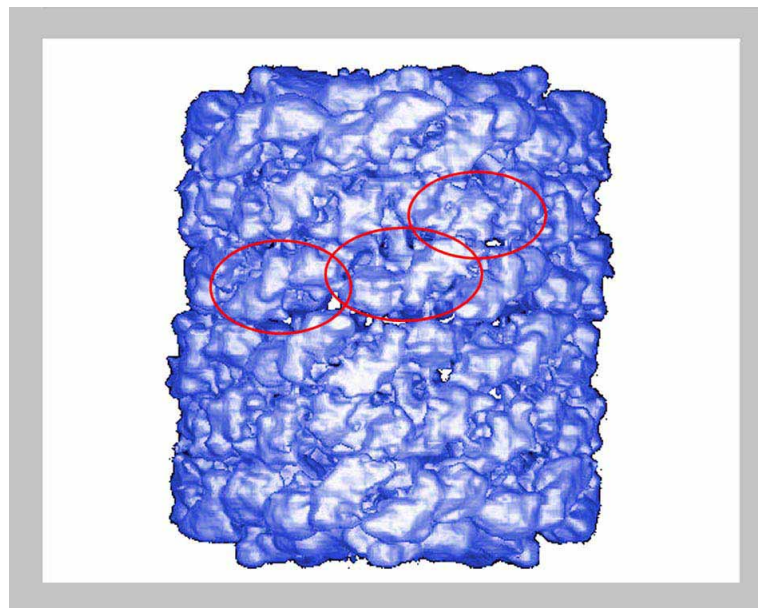


Abb. 27: 12 Å Rekonstruktion des HtH1 Didekamers:

Markiert sind die drei verschiedenen morphologischen Einheiten, die in der Wand des Didekamers gefunden wurden. Diese 3 Motive kehren immer wieder. Eine morphologische Einheit besteht aus zwei funktionellen Domänen.

5 Das HtH1-Dekamer

Betrachtet man das HtH1-Dekamer, von außen entlang der 5fach-Symmetrie Achse, blickt man auf den äußeren Kragenbereich (Abb. 28, 29a). Der *Collar*, der den äußeren Ring des Kragenkomplexes bildet, lässt sich bei der vorliegenden Auflösung nicht exakt in 10 funktionelle Domänen untergliedern, besteht aber eindeutig aus fünf morphologischen Einheiten. Diese scheinen aus jeweils zwei etwas voluminöseren funktionellen Domänen gebildet zu werden, die man als jeweils antiparallel liegende L-förmige Massen beschreiben kann.

Der Blick von der offenen Seite entlang der 5fach Achse (Abb. 29b) in das Dekamer zeigt den *Arc*. Dieser lässt sich auch aus dieser Perspektive als 10 Massen (funktionelle Domänen) beschreiben, die jeweils paarig angeordnet sind.

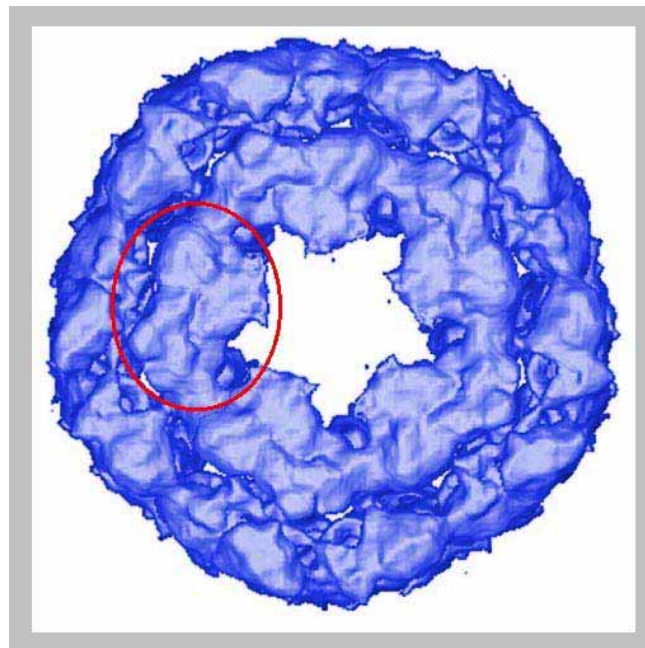


Abb. 28: Der Collar des HtH1 von oben betrachtet:

Die hervorgehobene morphologische Einheit zeigt, wie die L-förmigen funktionellen Domänen im *Collar*-Bereich des Kragenkomplexes angeordnet.

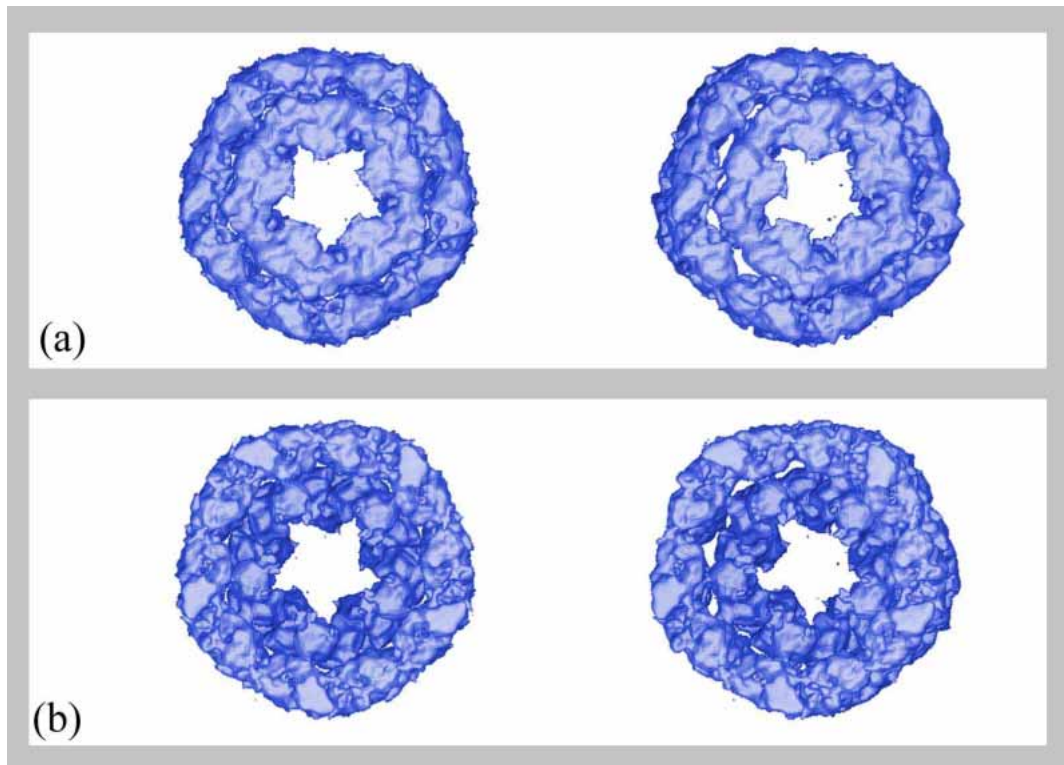


Abb. 29: Stereobilder des HtH1-Dekamers
 (a) Aufsicht auf die durch den Kragenkomplex verengte Seite
 (b) Aufsicht auf die offene Seite

6 Das ausgerollte HtH1-Didekamer

Zur genaueren Betrachtung des HtH1-Didekamers wurde die Dichtekarte radial um die Mittelachse in ein neues Koordinatensystem überführt (vgl. mit der Technik zur Erstellung von Sinogrammen in Material und Methoden). So erhielt ich eine Projektion der zylindrischen Wand in eine Ebene. Aus dieser resultierenden Dichtekarte wurde eine Oberflächenansicht berechnet; diese zeigt das ausgerollte Molekül (Abb. 30 bis Abb. 32).

6.1 Das gesamte HtH1-Didekamer geöffnet und ausgerollt

In Abb. 30a, b ist eine Oberflächenansicht des ausgerollten HtH1-Moleküls von innen und von außen zu sehen. Das ausgerollte HtH1-Didekamer zeigt die kleine Furche (kleine Pfeile in Abb. 30a) und die große Furche (große Pfeile in Abb. 30a). Bei Betrachten der Innenansicht des ausgerollten HtH1-Moleküls (Abb. 30b) lassen sich *Collar* und *Arc* des Kragenkomplexes erkennen, welche allerdings aufgrund der Nähe zum Mittelpunkt beim mathematischen Ausrollen etwas verzerrt erscheinen. Im Gegensatz zum längs geschnittenen HtH1-Didekamer (Abb. 26) lässt sich auf diese Methode ein besserer Eindruck des inneren Aufbaus des Moleküls gewinnen, und es lassen sich Aussagen über den Aufbau des Moleküls machen: So scheint es, dass die Verbindungen zwischen den diagonal im Molekül angeordneten Massen in der großen Furche wesentlich stabiler und enger sind, als in der kleinen Furche. Eine Fourier-Analyse (Abb. 30d) des Transmissionsbildes (Abb. 30c) aus dem ausgerollten Molekül zeigt ein sehr komplexes Muster, dass sich nicht deuten lässt. Es sind zu viele Reflexe mit Informationen darin enthalten, um ein einziges regelmäßiges Gitter in dem ausgerollten Molekül erkennen zu lassen. Allerdings weist die Anordnung auf den ersten Blick auf mehrere, regelmäßige, sehr komplexe Gitter hin, die sich überlagern (Symmetrie der Reflexe des Fourier-Transform-Bildes) und in dem sich helikale Anteile befinden (längliche Form der Gitterpunkte).

6.2 Die Wand des HtH1-Didekamers geöffnet und ausgerollt

Die ausgerollte Wand des HtH1-Didekamers (Abb. 31) nach digitaler Entfernung des Kragenkomplexes zeigt ebenfalls die kleine Furche (kleine Pfeile in Abb. 31a) und die große Furche (großen Pfeile in Abb. 31a).

In der Transmissionsansicht lassen sich in der Wand Schatten erkennen, die jeweils in der Mitte der morphologischen Einheiten ein Loch bilden (Pfeile in Abb. 31c). Diese Löcher sind durch die ganze Wand leicht diagonal angeordnet und scheinen einen durchgängigen Kanal zu bilden (vgl. Diskussion).

Der Versuch einer Einordnung der Gitterpunkte in der Gitterstruktur der Fourier-Analyse der Wand mit dem Programm Crisp ließ auch hier keine eindeutige Zuordnung von Abständen der Reflexe zu. Jedenfalls war es nicht möglich eine morphologische Einheit als Gitterkonstante zu deuten, sondern es machte sehr viel mehr Sinn, eine Struktur aus sechs morphologischen Einheiten anzugeben, welche diagonal um die große Furche als p2-Kristallstruktur angeordnet waren. Dafür spricht zusätzlich, dass die Verbindungen innerhalb der großen Furche wesentlich ausge-

prägender sind, als innerhalb der kleinen Furche (vgl. unten, Extraktion des Untereinheitendimers).

6.3 Der Kragenkomplex des HtH1-Didekamers geöffnet und ausgerollt

Wie bereits beschrieben unterteilt sich der Kragenkomplex (Abb. 32) in einen im Dekamer zentral angesetzten *Arc* und einen peripher im Dekamers orientierten *Collar* (siehe oben: 5. Das HtH1-Dekamer). Zieht man die Sequenzdaten des HtH1 heran (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 2000; Lieb *et al.*, 1999) so besteht die dem *Arc* zugeordnete funktionelle Domäne HtH1-g aus 403 Aminosäuren und die dem *Collar* zugerechnete Domäne HtH1-h dagegen aus 511 Aminosäuren (Lieb *et al.*, 2000).

Zudem scheint beim *Collar* eher eine Ausrichtung in die Horizontale gegeben zu sein, während der *Arc* eher vertikal ausgerichtet ist.

Aus der Transmissionsansicht und ihrer Fourier Transformierten lassen sich keine weiteren Informationen gewinnen.

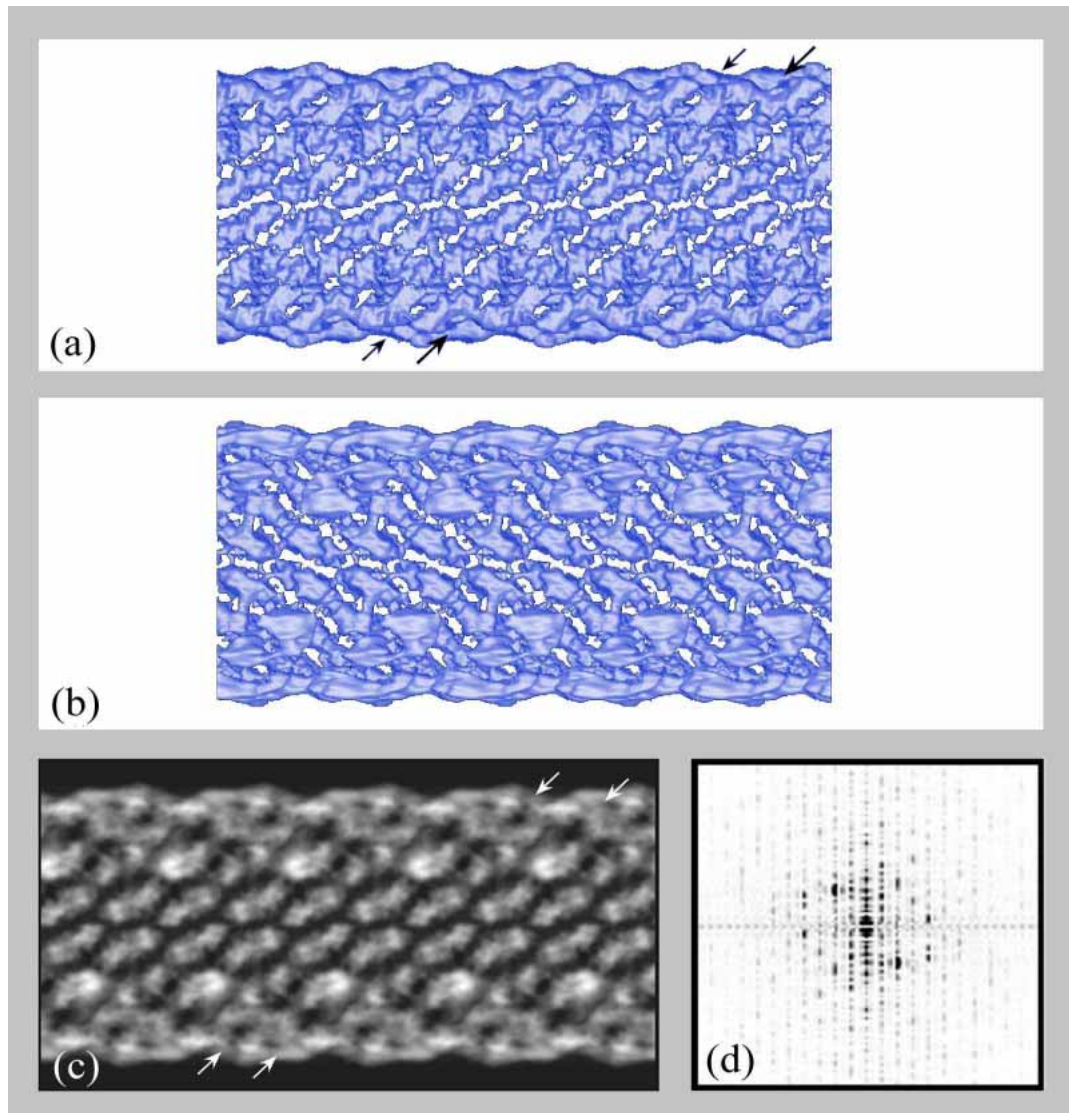


Abb. 30: Oberflächenansicht des geöffneten und ausgerollten Didekamers. Die kleinen Pfeile in (a) und (c) zeigen dabei die kleine Furche, die großen Pfeile die große Furche, welche bereits anhand der KLH1-Rekonstruktion beschrieben wurden (Orlova *et al.*, 1997).

- (a) Außenansicht des ausgerollten HtH1-Didekamers
- (b) Innenansicht mit *Collar* und *Arc*
- (c) Transmissionsansicht des geöffneten HtH1-Didekamers
- (d) FT-Analyse der Gitterstruktur aus der Transmissionsansicht, die Zuordnung eines Gitterindex ist nicht möglich. Die komplexe aber regelmäßige Anordnung der Reflexe lässt auf sich überlagernde Gitter schließen, während die längliche Form einiger Reflexe helikale Strukturelemente andeutet.

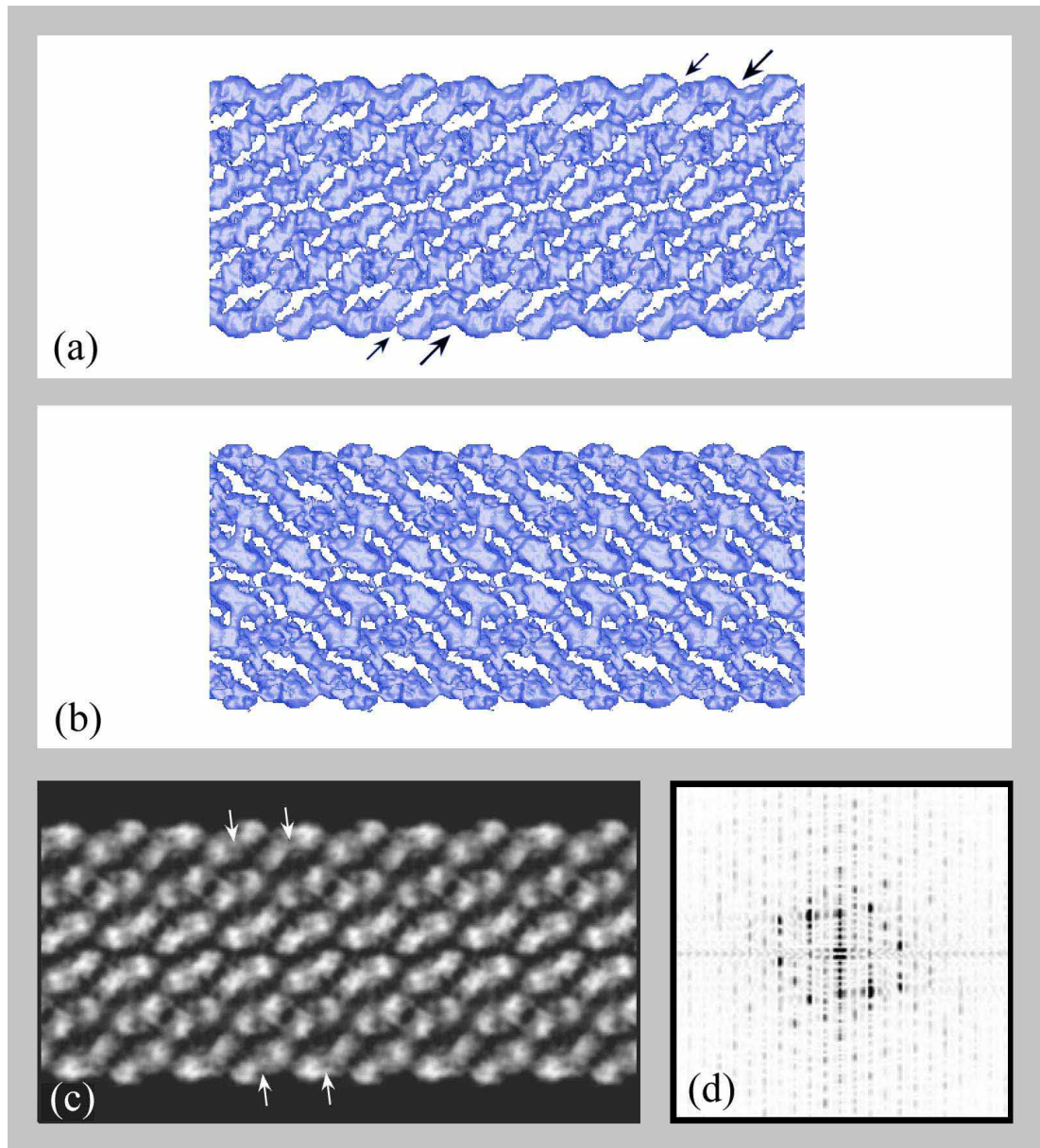


Abb. 31: Oberflächenansicht der geöffneten und ausgerollten Zylinderwand des Didekamers. Die kleinen Pfeile in (a) zeigen dabei die kleine Furche, die großen Pfeile die große Furche. Die Pfeile in (c) zeigen durchgehende Kanäle oder Poren durch die Molekülwand.

- (a) Außenansicht der Wand des ausgerollten HtH1-Didekamers
- (b) Innenansicht ohne *Collar* und *Arc*, welche digital entfernt wurden
- (c) Transmissionsansicht der geöffneten Wand des HtH1-Didekamers
- (d) FT-Analyse der Gitterstruktur der Transmissionsansicht

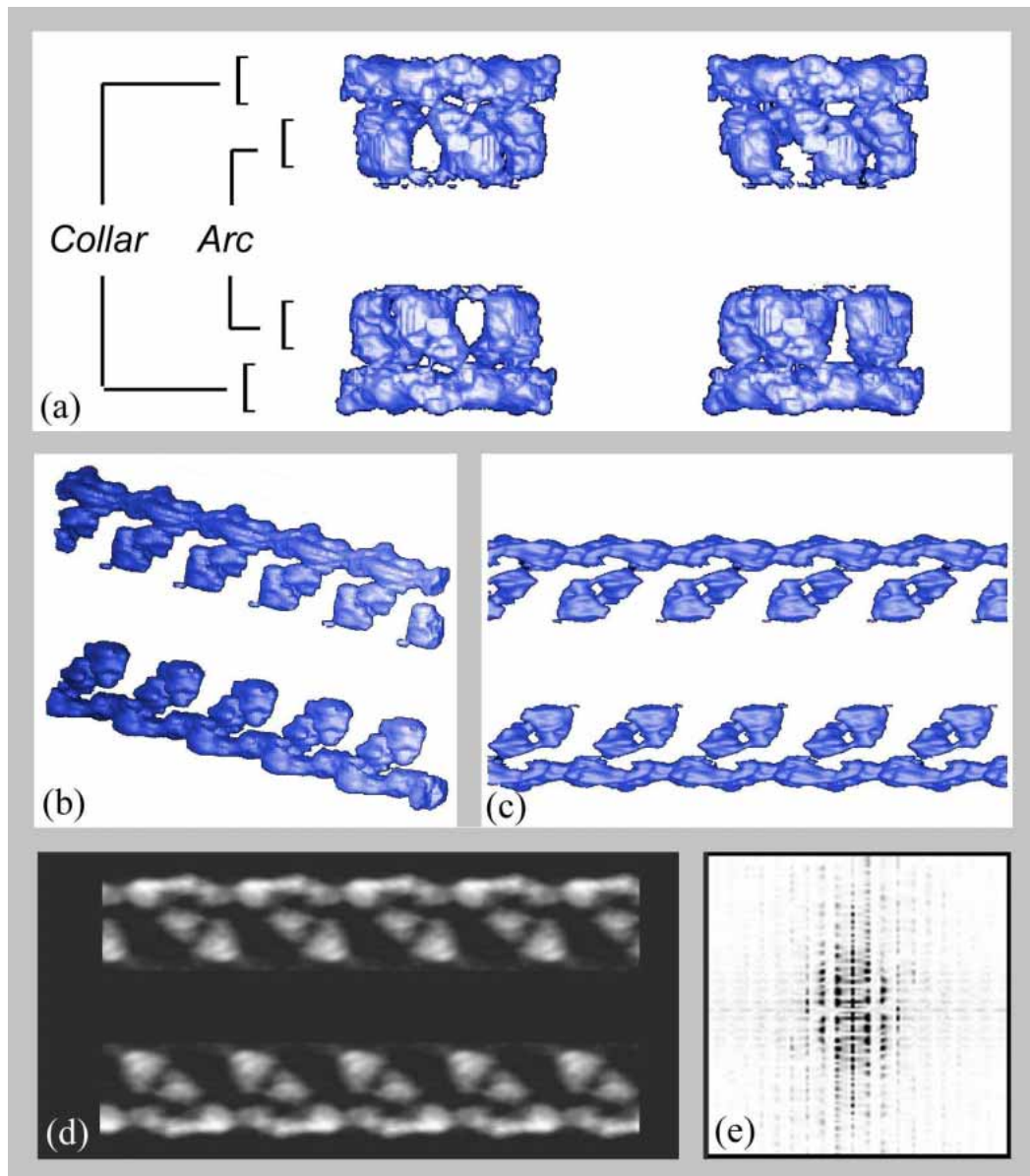


Abb. 32: Oberflächenansicht des Kragenkomplexes des Didekamers. Der Schwellenwert ist so gewählt wie bei der 8 MDa Ansicht des Didekamers. Der Kragenkomplex wurde digital durch Anlegen einer Maske aus der Rekonstruktion ausgeschnitten.

- (a) Stereoansicht des isolierten Kragenkomplexes
- (b) perspektivische Innenansicht des geöffneten und ausgerollten Kragenkomplexes
- (c) Innenansicht des geöffneten und ausgerollten Kragenkomplexes
- (d) Transmissionsansicht des geöffneten und ausgerollten Kragenkomplexes des HtH1-Didekamers mit (e) einer FT-Analyse der Gitterstruktur. Die hohe Komplexität der Reflexe lässt keine strukturelle Deutung zu.

7 Das Untereinheitendimer

7.1 Extraktion des HtH1-Untereinheitendimers

Betrachtet man die Schnittserie (Dichtekarte) durch ein Dekamer (Abb. 23), so lassen sich durch die einzelnen Schichten kompakte Abschnitte von Kragenkomplex und Wand verfolgen, die sich aufgrund weit geringerer Dichteverbindungen vom Rest des Moleküls abgrenzen lassen. Aufgrund der 5fach Symmetrie handelt es sich dabei jeweils um ein Fünftel des Gesamtumfangs des zylindrischen Moleküls.

Schneidet man nun Schicht für Schicht dieses Fünftel jeweils zwischen Verbindungen von sehr geringer Dichte aus, dann erhält man als Extraktionsergebnis eine Dichtekarte von genau einem Fünftel des Dekamers (Abb. 33). Die Oberflächenberechnung zeigt, dass es sich bei der resultierenden Struktur um etwas handelt, das so ähnlich auch bei Dissoziationsversuchen im Elektronenmikroskop als stabiles Zwischenprodukt beobachtet wurde: Das Untereinheitendimer (Siezen & Van Bruggen, 1974; Van Breemen *et al.*, 1977; Wichertjes *et al.*, 1986).



Abb. 33: Schnittserie durch das isolierte Untereinheitendimer:

Die einzelnen Bilder repräsentieren jeweils Schnitte von 3.2 Å Schichtdicke durch das Untereinheitendimer. Das Untereinheitendimer ist diagonal im Raum angeordnet, der durch die Schnittserie beschrieben wird.

Das Untereinheitendimer hat bei gleichgewähltem Schwellenwert mit 0,8 MDa genau 1/10tel der Masse des Didekamers, was zeigt, dass die Verbindungsstellen, an denen die Schnitte innerhalb der einzelnen Schichten erfolgte, gut definierbar waren. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine willkürliche Wahl eine so deutliche Übereinstimmung ergeben hätte, ist sehr gering.

7.2 Strukturelle Beschreibung des HtH1- Untereinheitendimers

In Abb. 34a ist eine Stereoansicht des Untereinheitendimers in der gleichen Orientierung zu sehen, wie es in der Wand des HtH1 liegt, wenn man direkt von der Seite auf den Zylinder sieht. Hier kann man deutlich die o.a. morphologischen Einheiten sehen, welche sich jeweils aus zwei funktionellen Domänen zusammensetzen. In der Mitte der diagonal angeordneten, wandständigen morphologischen Einheiten verläuft die große Furche (vgl. Abb. 30 und 31). Dreht man das Untereinheitendimer so, dass man von oben auf das Untereinheitendimer blickt (Abb. 34b), dann kann man erkennen, dass ein Loch innerhalb einer morphologischen Einheit die beiden funktionellen Domänen trennt (Pfeil). Dieses Loch konnte bereits bei der Analyse der ausgerollten Wand des Didekamers beobachtet werden (siehe oben). Von unten betrachtet, lassen sich gut die Verbindungsstellen zwischen *Arc* und Zylinderwand erkennen (Pfeile in Abb. 34c). Dabei sieht man, dass jede *Arc*-Domäne jeweils mit einer bestimmten Stelle im Zentrum des Untereinheitendimers an der Zylinderwand verbunden ist, wobei die Anordnung von Wand und *Arc* symmetrisch erscheint (vgl. Diskussion). Die Verbindungen zwischen *Arc*, bzw. Außenwand und *Collar* sind nicht so einfach zu definieren (Abb. 34d). Vor allem die asymmetrische Anordnung des *Collars* im Vergleich zum restlichen Aufbau des Untereinheitendimers wirft noch Fragen auf (vgl. Diskussion).

7.3 Lage des Untereinheitendimers im HtH1-Didekamer

Das Untereinheitendimer ist als schrägliegendes Wandfragment in fünf Kopien in die Zylinderwand des Dekamers eingebaut. Die einzelnen Sektionen des Untereinheitendimers sind in Abb. 35 blau eingefärbt über diejenigen des Dekamers gelegt. Zudem ist eine Oberflächendarstellung eingefügt, die das Untereinheitendimer im Didekamer hervorhebt, wobei die Wandbereiche des Untereinheitendimers dunkelblau, die Kragenbereiche hellblau eingefärbt sind. Dabei lässt sich die Schräglage in der Wand sich auch durch die verschiedenen Schnittebenen als rechtshändige helikale Organisation nachvollziehen. Die geringste Dichte innerhalb der Zylinderwand war immer zwischen zwei Untereinheitendimeren, also im Bereich der diagonal ver-

laufenden kleinen Furche festzustellen (vgl. Abb. 30 und 31). Die große Furche verläuft wie oben beschrieben innerhalb des Untereinheitendimers.

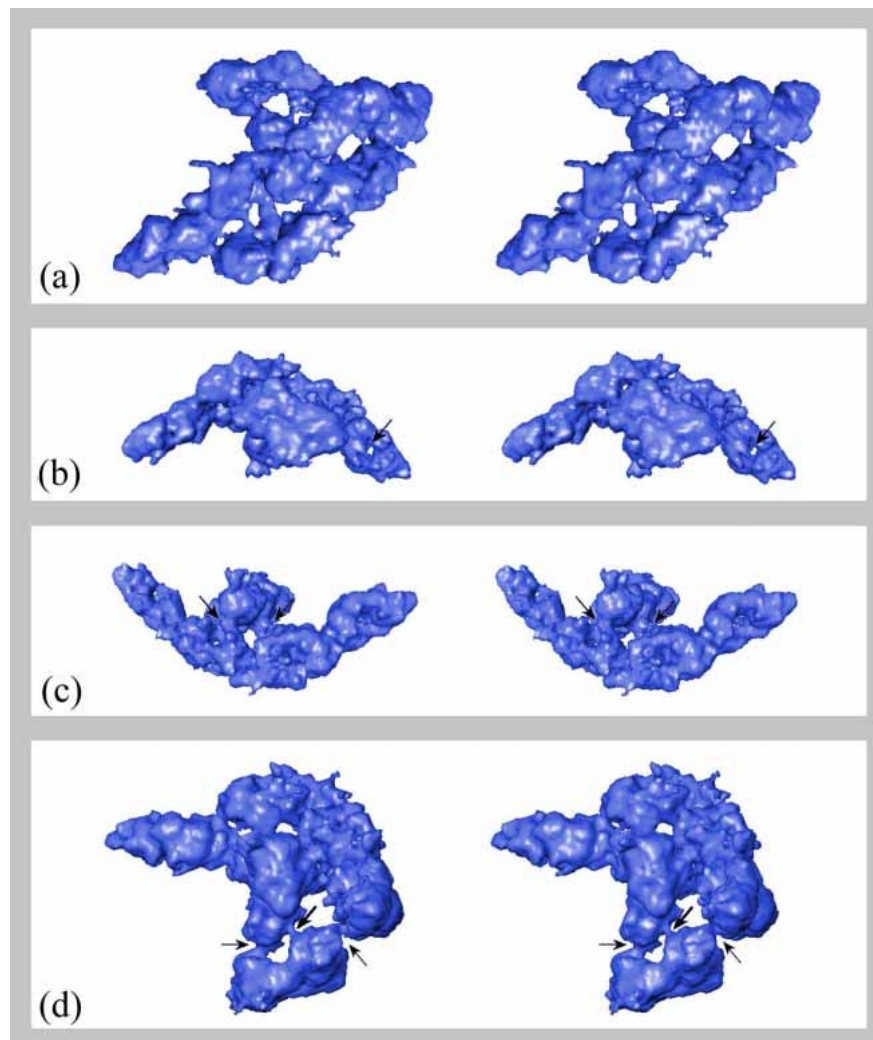


Abb. 34: Stereoansichten des isolierten Untereinheitendimers aus verschiedenen Ansichtswinkeln

- (a) Ansicht von außen
- (b) Ansicht von oben; jeweils ein Domänenpaar ist so angeordnet, dass ein Loch dazwischen entsteht (Pfeil).
- (c) Ansicht von unten; die Verbindungsstellen zwischen *Arc* und Wand sind markiert (Pfeile)
- (d) Ansicht von Innen; hier sind Verbindungen zwischen *Collar* und *Arc* bzw. Zylinderwand erkennbar (Pfeile).

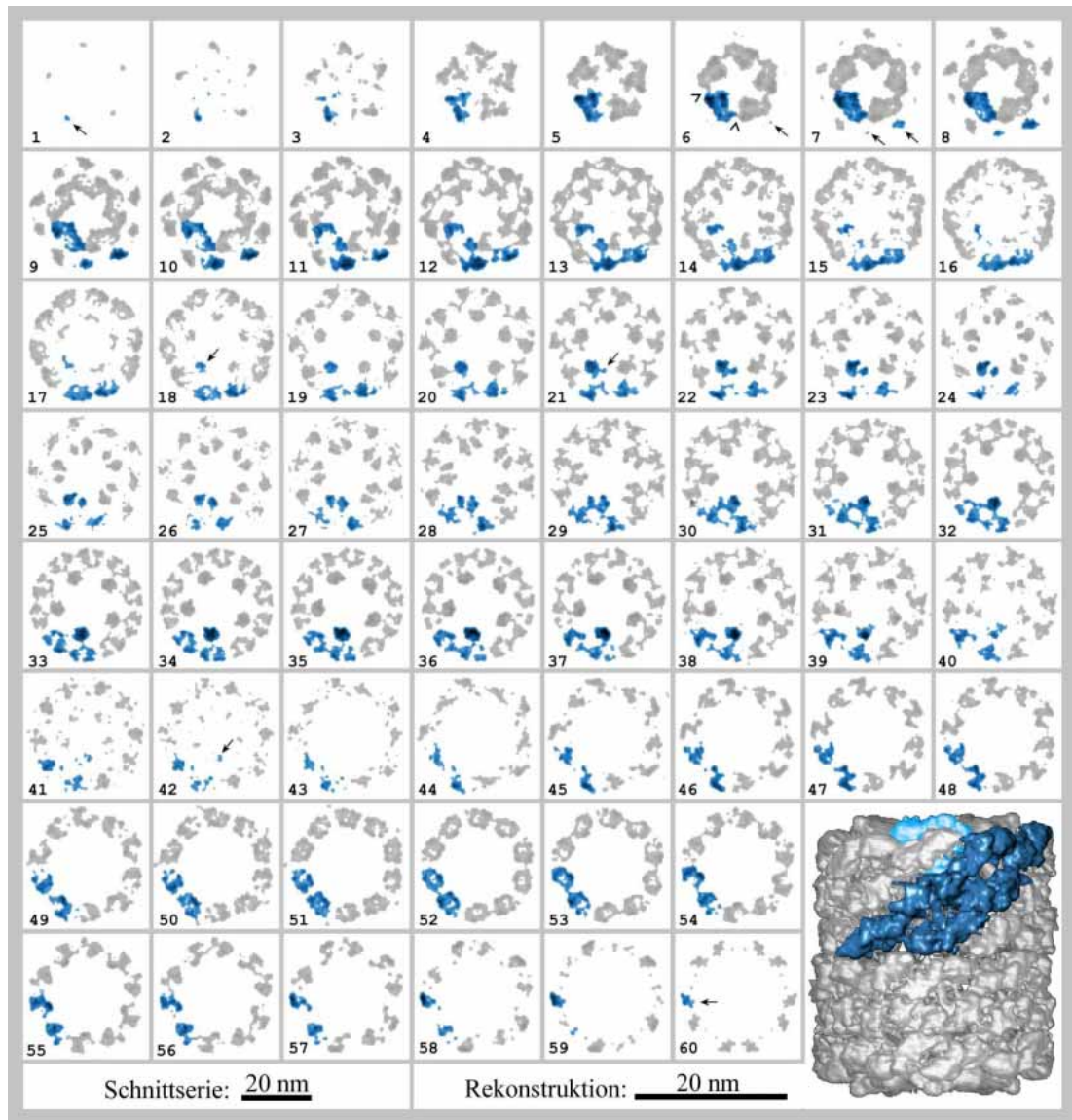


Abb. 35: Orientierung des Untereinheitendimers im HtH1-Didekamer:

Hier sind die Schnittserien von Dekamer (vgl. Abb. 23) und Untereinheitendimer (vgl. Abb. 33) übereinandergelegt: in (6) erkennt man die dichtearmen Bereiche, in denen das Untereinheitendimer im *Collar* unterbrochen ist. In (6) und (7) zeigen die Pfeile den Beginn der angeschnittenen Wand. In Bild 8 beginnt, durch einen Pfeil markiert, der Übergang von *Collar* in den *Arc*. In (42) markiert der Pfeil den letzten Anschnitt des *Arc*. In (60) ist schließlich die letzte Sektion der Wandsegmente zu sehen.

Das Insert zeigt, wie das Untereinheitendimer in einer Oberflächenansicht im Didekamer angeordnet ist.

8 Das solide Modell des HtH1-Didekamers

Die Möglichkeit, anstelle eines virtuellen Bildes ein echtes Modell zu besitzen und es drehen, wenden und betasten zu können ist „Begreifen“ im wörtlichen Sinn.

8.1 Beschreibung des Modells

Das Modell eines HtH1-Didekamers (Abb. 36), das mit einer Auflösung von 12 Å mittels *rapid prototyping* hergestellt wurde, ist ca. 18 cm hoch und hat einen Durchmesser von ca. 16,5 cm. Der tatsächliche Vergrößerungsfaktor beträgt also 5×10^7 fach, was einer Relation von $10 \text{ Å} = 0,5 \text{ cm}$ entspricht. Somit kann man überschlagen, dass die Unschärfe im Modell aufgrund der Auflösungsgrenze bei ca. 6 mm liegt. Dies ist bei der Betrachtung von Symmetrieeigenschaften innerhalb der *repeating unit*, sowie bei den absoluten Außenmaßen der funktionellen Domänen zu beachten, da durch diese Unschärfe Verbindungen zwischen funktionellen Domänen unter Umständen zu dick oder - im anderen Extrem - gar nicht erscheinen könnten. Die beiden Dekamere sind nicht fest miteinander verbunden. Der *Collar* steht etwas über den Rand der Zylinderwand heraus, ist sehr kompakt und bricht sehr leicht als Ganzes ab. Es lassen sich nur sehr schwer Grenzen für zwei L-förmige funktionelle Domänen ausmachen, die sehr eng aneinanderliegend antiparallele Dimere bilden. Zwischen der Zylinderwand und dem *Collar* ist pro *repeating unit* nur eine recht schwache Verbindung zu erkennen, während zwischen dem *Arc* und dem *Collar* eine schwache und eine deutlich ausgeprägte Verbindung erkennbar ist.

Der *Arc* lässt sich pro *repeating unit* in zwei deutlich getrennte funktionelle Domänen gliedern, von denen jede eine Verbindung zur Zylinderwand hat.

Innerhalb der Wand liegen pro *repeating unit* jeweils zwei diagonal (helikal) angeordnete Ketten aus 6 funktionellen Domänen. Man kann im intakten Modell 12 Massen (funktionelle Domänen) pro *repeating unit* des Dekamers zählen, welche jeweils in Paaren zusammengelagert sind. Alternierend sind immer zwei der diagonalen Sechserketten sehr kompakt und dann wieder sehr locker miteinander verbunden.

Die Massen der einzelnen funktionellen Domänen sind im Rahmen der Auflösungsgrenze nahezu gleich. Nur die Massen der funktionellen Domänen des *Collars* wirken voluminöser.

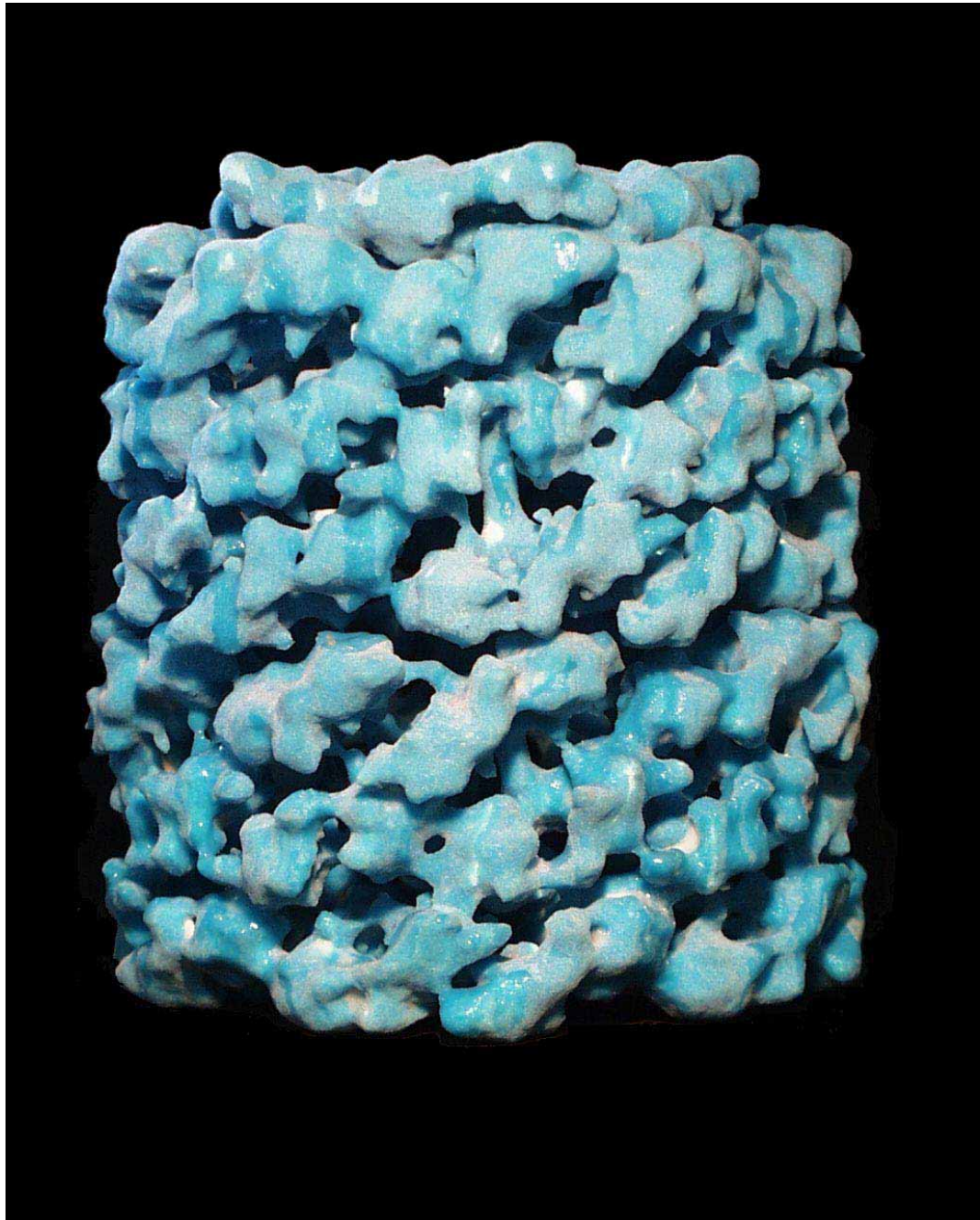


Abb. 36: Modell des HtH1-Didekamers bei einem massekorrelierendem Schwellenwert von 8 MDa. Erstellt wurde das Modell mittels *rapid prototyping* anhand des Datensatzes aus IMAGIC

8.2 Sollbruchstellen im Modell des HtH1-Dekamers

Das Modell des Dekamers lässt sich leicht in die fünf Untereinheitendimere zerbrechen, nur dass dabei der *Collar*, der einen in sich sehr stabilen Ring bildet, als Ganzes abbricht. Abb. 37 zeigt ein zerbrochenes Dekamer-Modell, von dem ein Rest aus drei Dimeren sowie dem *Collar*-Ring und ein herausgebrochenes Untereinheitendimer zu sehen ist.

Diese spezifischen Sollbruchstellen im Modell passen zu den Ergebnissen der manuellen Extraktion des Untereinheitendimers aus der 3D-Dichtekarte des Dekamers (siehe Abb. 35).

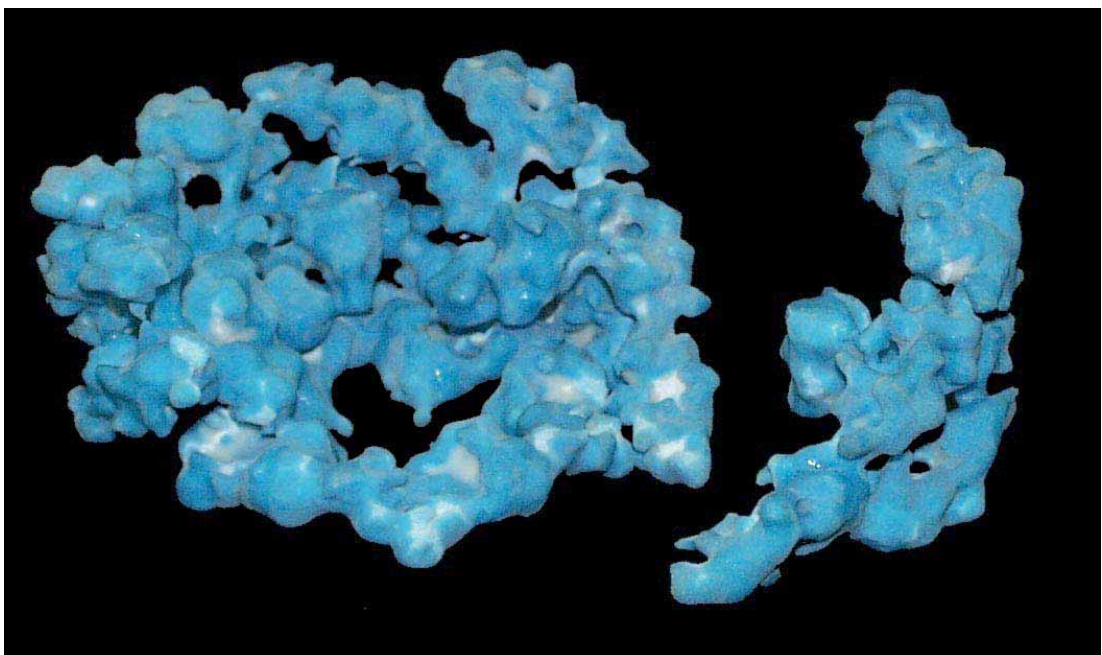


Abb. 37: Zerbrochenes Modell des HtH1-Dekamers.

Das Modell des Dekamers ist sehr leicht in 5 gleichgroße Stücke und den *Collar* zu zerbrechen, da immer zwischen zwei recht kompakt verbundenen Wandstücken relativ schwache Verbindungsstellen (=Sollbruchstellen) liegen. Links ist ein Rest aus drei Dimeren und dem *Collar*, rechts ein herausgebrochenes Untereinheitendimer zu sehen.

Betrachtet man das Modell des Untereinheitendimers (Abb. 38) lassen sich die einzelnen morphologischen Einheiten noch klarer ausmachen als in der 3D-Bildschirmdarstellung. Allerdings führt der Herstellungsprozess beim Modellbau hin und wieder dazu, dass feine Strukturelemente verloren gehen oder leicht abbrachen.

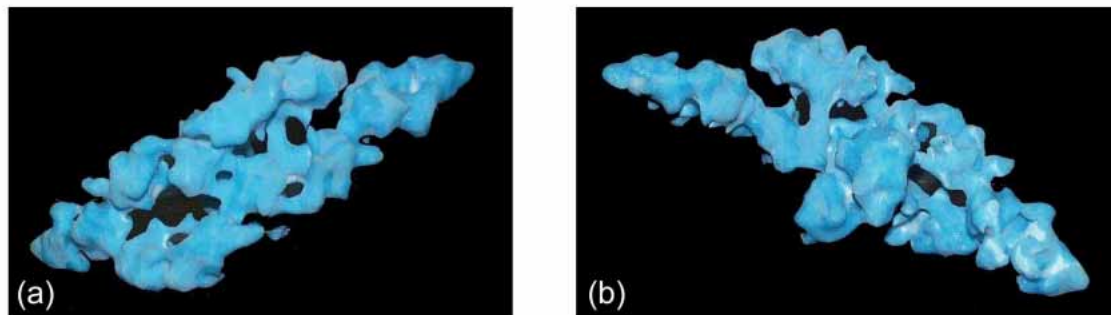


Abb. 38: Modell des HtH1-Dimers ohne das *Collar*-Segment.

- (a) Außenansicht, wie das Untereinheitendimer im Dekamer angeordnet ist,
- (b) Innenansicht

9 Molekulares Modellieren der funktionellen Domäne HtH1-g

9.1 Vorhersage der 3D-Struktur von HtH1-g

Die komplette Primärstruktur des HtH1 ist bekannt (Lieb *et al.*, 2000) und zusätzlich die Primärstruktur des Hämocyanins aus *Octopus* (Miller *et al.*, 1998), sowie die Röntgenstruktur der funktionellen Domäne OdH-g aus *Octopus* (Cuff *et al.*, 1998). Letztere bildet bei *Octopus* den Zentralkragen (Lamy *et al.*, 1987; Lamy *et al.*, 1998; Lang & van Holde, 1990; Miller *et al.*, 1998). Aufgrund der publizierten Sequenz-Alignments und anderer Daten ist davon auszugehen, dass sich OdH-g und HtH1-g strukturell entsprechen und somit HtH1-g den *Arc* bildet (siehe Lieb *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Überlegungen bzw. Daten wurde nun im Rahmen meiner Arbeit versucht, eine 3D-Struktur des HtH1-g molekular zu modellieren und diese anschließend in den *Arc* der HtH1-Rekonstruktion einzupassen.

Im ersten Schritt wurden die Sequenzen von den OdH-g und HtH1-g miteinander verglichen (Abb. 39). Daraufhin wurde die räumliche Ausrichtung der Proteinstruktur der Sequenz von HtH1-g anhand der bekannten Röntgendaten des OdH mit Hilfe des PDB-Viewers (Firma Swiss-Modell) berechnet (Abb. 40). Dann wurde die Qualität dieser Strukturvorhersage anhand eines Ramachandran-Plots überprüft (Abb. 41). Schließlich wurde eine Energieminimierung der gefundenen Strukturvor-

hersage berechnet, um eine zusätzlich die Plausibilität der gefundenen Struktur zu untermauern (Abb. 42).

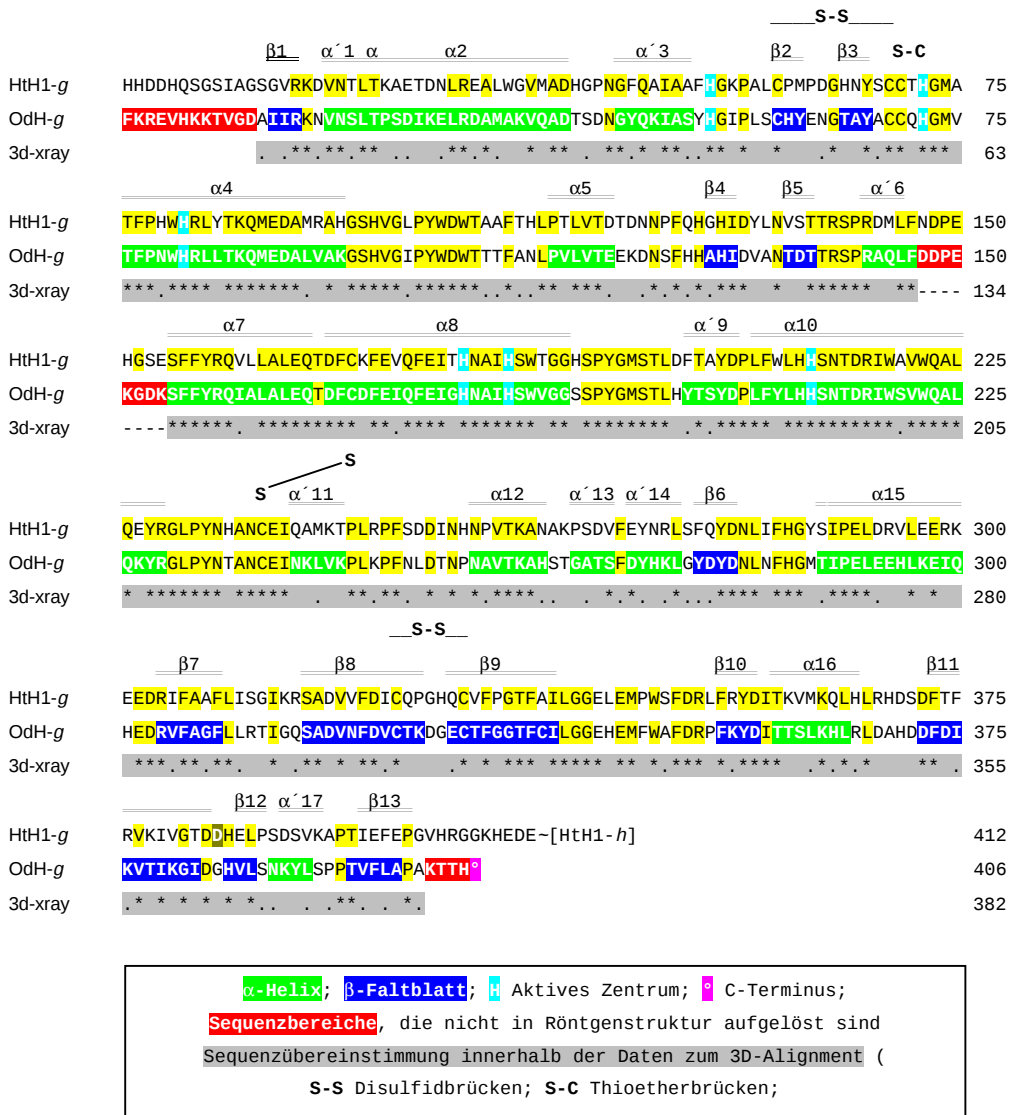


Abb. 39: Vergleich der Aminosäuresequenzen von HtH1-g (Keller *et al.*, 1999) und OdH-g (Miller *et al.* 1998). Das Ergebnis entspricht völlig den Alignments von Keller *et al.* (1999) und Lieb *et al.* (1999, 2000)

Der Sequenzbereich von OdH1-g-Sequenz, der in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst ist, ist rot unterlegt und bei der Strukturvorhersage nicht berücksichtigt worden. Der grau unterlegte Bereich, der mit „3d-xray“ gekennzeichnet ist, zeigt die Übereinstimmung der Sequenzen, wie sie für das molekulare Modellieren verwendet wurden.

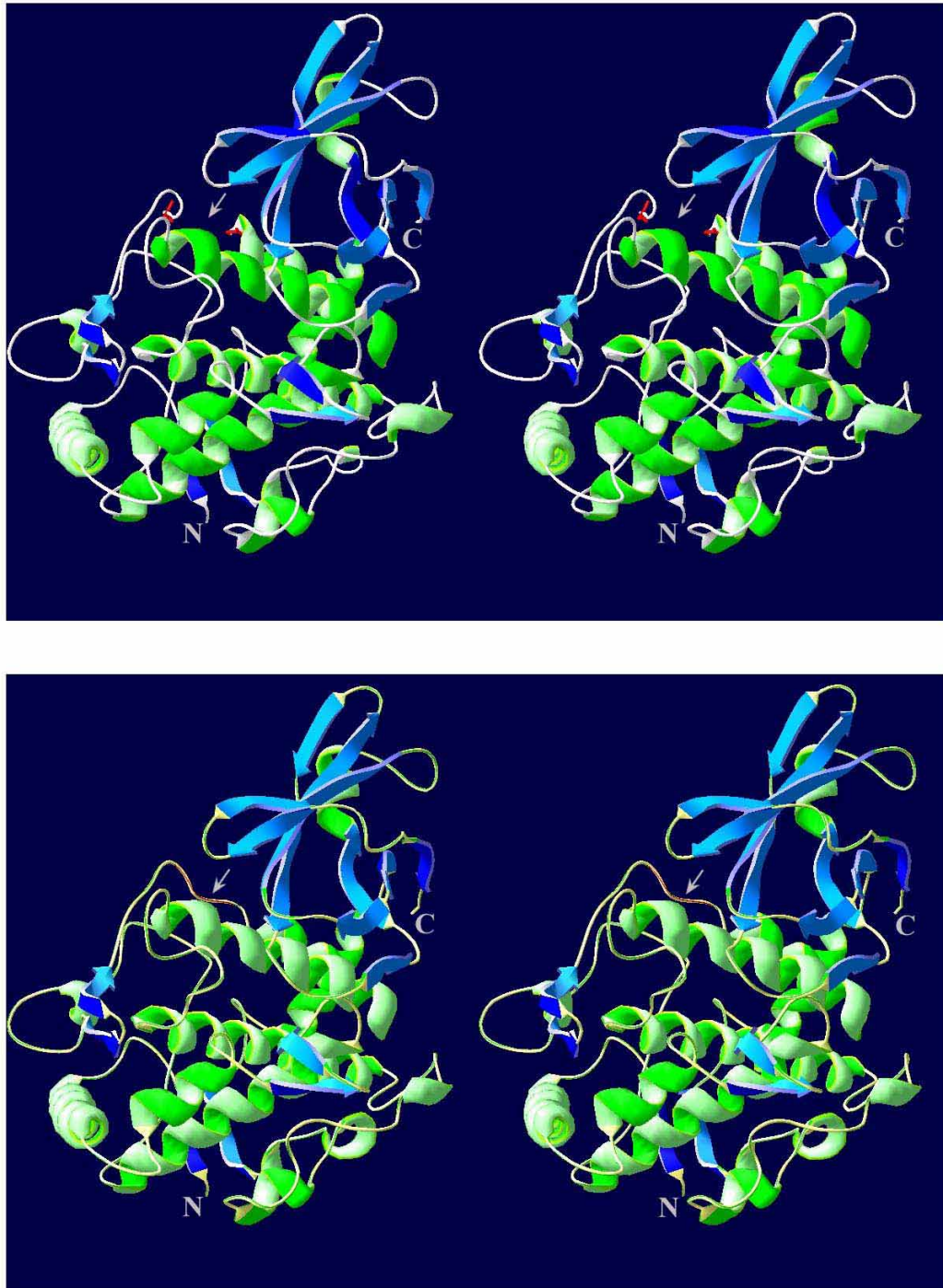


Abb. 40: Legende nächste Seite

(Abbildung auf vorheriger Seite)

Abb. 40: 3D-Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domäne g von *Octopus* und *Haliotis*

- (a) OdH-g aus der Röntgenstrukturdatenbank (Cuff *et al.*, 1998). Bei (->) fehlt eine Sequenz von 8 Aminosäuren vor $\alpha 7$ (siehe Abb. 39, **rot**), wodurch auch die Helix $\alpha 6$ nicht richtig aufgelöst ist.
- (b) HtH1-g, vorhergesagt mittels Swiss-Modell (Guex & Peitsch, 1997; Peitsch, 1995; Peitsch, 1996) aufgrund des Alignments in Abb. 39.. Bei (->) wurden die dem nicht aufgelösten Sequenzbereich aus den Röntgenstrukturdaten entsprechenden 8 Aminosäuren weggelassen und durch eine künstliche Brücke ersetzt.

In Abb. 40 sind die original 3D-Struktur von OdH-g (Abb. 40a) und die anhand des Alignments in Abb. 39 berechnete 3D-Struktur von HtH1 (Abb. 40b) als Stereoansichten dargestellt. In den Bildern sind jeweils das N-terminale und das C-terminale Ende markiert, so dass der komplette Verlauf der Polypeptidkette nachvollziehbar ist. Bei der Röntgenstruktur aus *Octopus* wurde ein Bereich von 8 Aminosäuren nicht aufgelöst (vgl. Abb. 39); dieser ist in der Abbildung als Lücke rot markiert (Pfeil in Abb. 40a). Dieses Segment aus 8 Aminosäuren wurde in der alignierten HtH1-Sequenz weggelassen. Daraus ergibt sich ein Strukturfehler, der von Swiss-Modell auch während der Modellierung festgestellt und in der Log-Datei festgehalten wurde (rot mit Pfeil markiert bei Abb. 40b).

Der Ramachandran-Plot wurde zur Überprüfung der Plausibilität der vorhergesagten 3D-Struktur von HtH1-g verwendet (Abb. 41). Im Plot werden die Winkel Psi und Phi aufgetragen, welche die Drehung aus der Ebene um die beiden Bindungsarme des Kohlenstoffatoms in einer Peptidbindung beschreiben. Es sind dabei für Aminosäuren, deren Rest größer als ein Wasserstoffatom ist, bestimmte Psi-Phi-Bereiche verboten, da die Aminosäurereste sich in diesen sterisch behindern würden. Dabei zeigte sich, dass nur drei nicht-Glycine (Kreuzchen im Plot) außerhalb der erlaubten Bereiche liegen. Auch bei Röntgenstrukturen findet man im Ramachandran-Plot bis zu 10% der nicht-Glycin-Aminosäuren außerhalb des theoretisch erlaubten Bereichs (Voet, 1995).

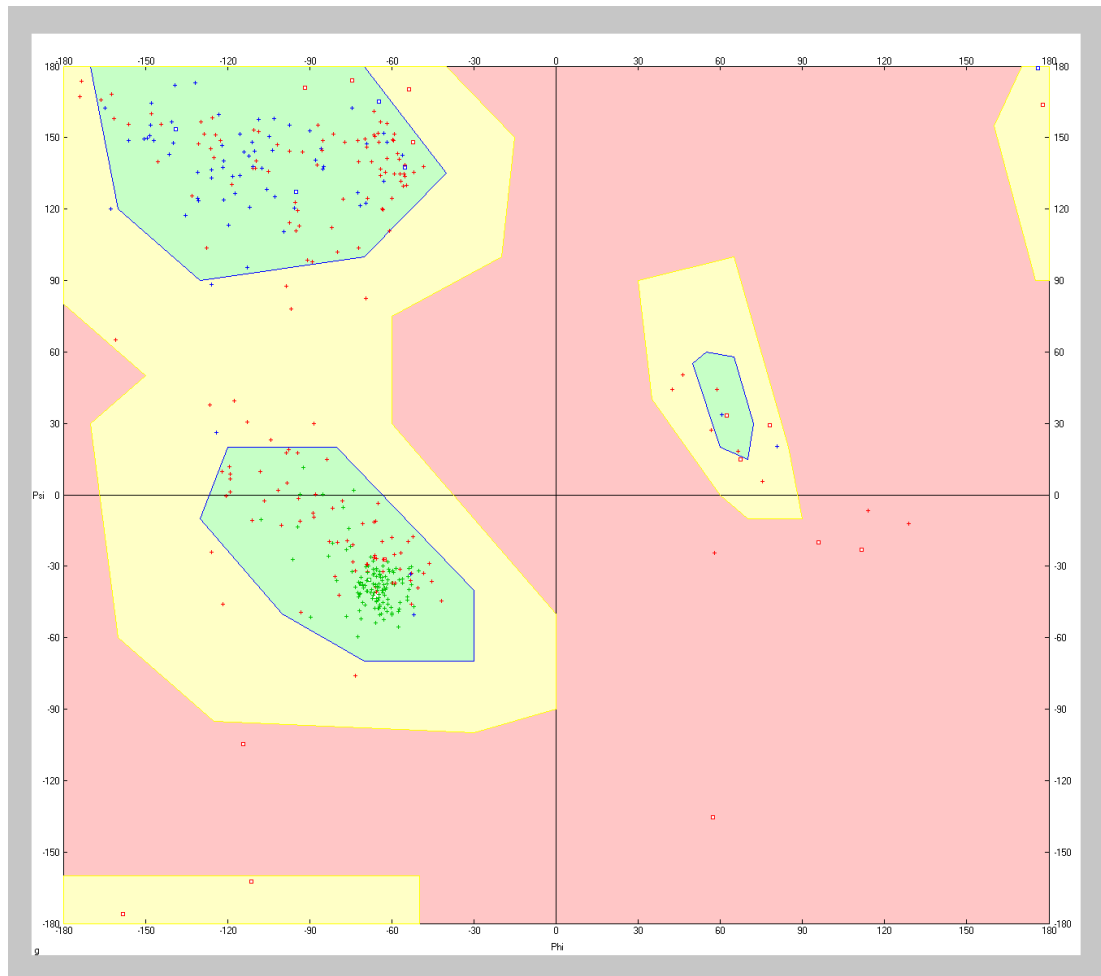


Abb. 41: Ramachandran-Plot: die roten Bereiche sind „verbotene“ Abbildungsbereiche für Aminosäuren außer Glycin. In der Graphik sind Glycine als Kästchen, andere Aminosäuren als Kreuzchen markiert.

Der Ramachandran-Plot ist eine Möglichkeit, die Plausibilität einer Proteinstruktur zu bestimmen, da in dem Plot sterisch nicht mögliche Anordnungen einzelner Aminosäuren in einer Proteinstruktur zutage treten (siehe Text).

Die Energieminimierung wurde als zusätzliche Methode der Plausibilitätsprüfung der vorhergesagten 3D-Struktur von HtH1-g verwendet. Die Berechnung hat nur minimale sterische Änderungen im Molekülhabitus bewirkt (Abb. 42a): die Energie wurde rechnerisch durch Änderung der Bindungswinkel in der Polypeptidkette von ca. –14000 kJ/mol auf ca. –17000 kJ/mol verbessert, woraufhin sich die äußere Erscheinung des Moleküls nur unwesentlich veränderte (Abb. 42a). Auch der

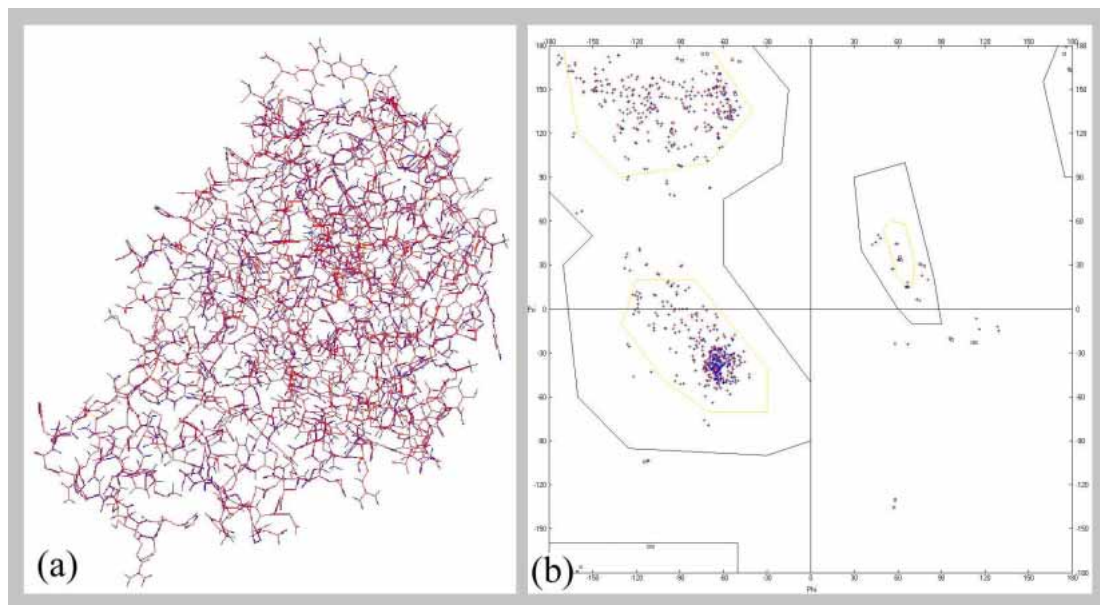


Abb. 42: Folgen der rechnerischen Energieminimierung:

- (a) Darstellung von HtH1-g vor der Energieminimierung (rot) und HtH1-g nach der Energieminimierung (blau) mit Seitenketten
- (b) Ramachandran-Plot vor (rot) und nach (blau) der Energieminimierung.

Ramachandran-Plot (Abb. 42b) zeigt, dass sich zwar die Winkel sehr vieler Bindungen zur Energieminimierung ändern, jedoch dabei das Gesamtmolekül in seiner räumlichen Ausdehnung nicht abwandelt. Dies belegt, dass die vorhergesagte HtH1-g Struktur, die zwar künstlich berechnet ist, in Ihrer räumlichen Ausdehnung jedoch so stimmig ist, dass sie für die im folgenden beschriebenen Einpassungsversuche hinreichend genau modelliert ist.

9.2 Einpassen der vorhergesagten HtH1-g Struktur in die Masse des Arc

Die Abb. 43 zeigt Stereobilder, wie die funktionelle Domäne g anhand ihrer berechneten Moleküloberfläche (ausgehend von den Van-der-Waalsradien der einzelnen Aminosäuren) in die EM-Rekonstruktion des Untereinheitendimers eingepasst wurde. Die Ansicht in Abb. 43 und Abb. 44 ist so gewählt, dass sie ähnlich der Symmetrieebene aus Abb. 45a orientiert ist.

Allerdings erscheinen die Symmetrieeigenschaften bei Auflösung der Sekundärstruktur Abb. 44c nicht mehr so klar. Die Abb. 44 zeigt das Domänenendimer HtH1-g eingepasst in die Masse des *Arc*.

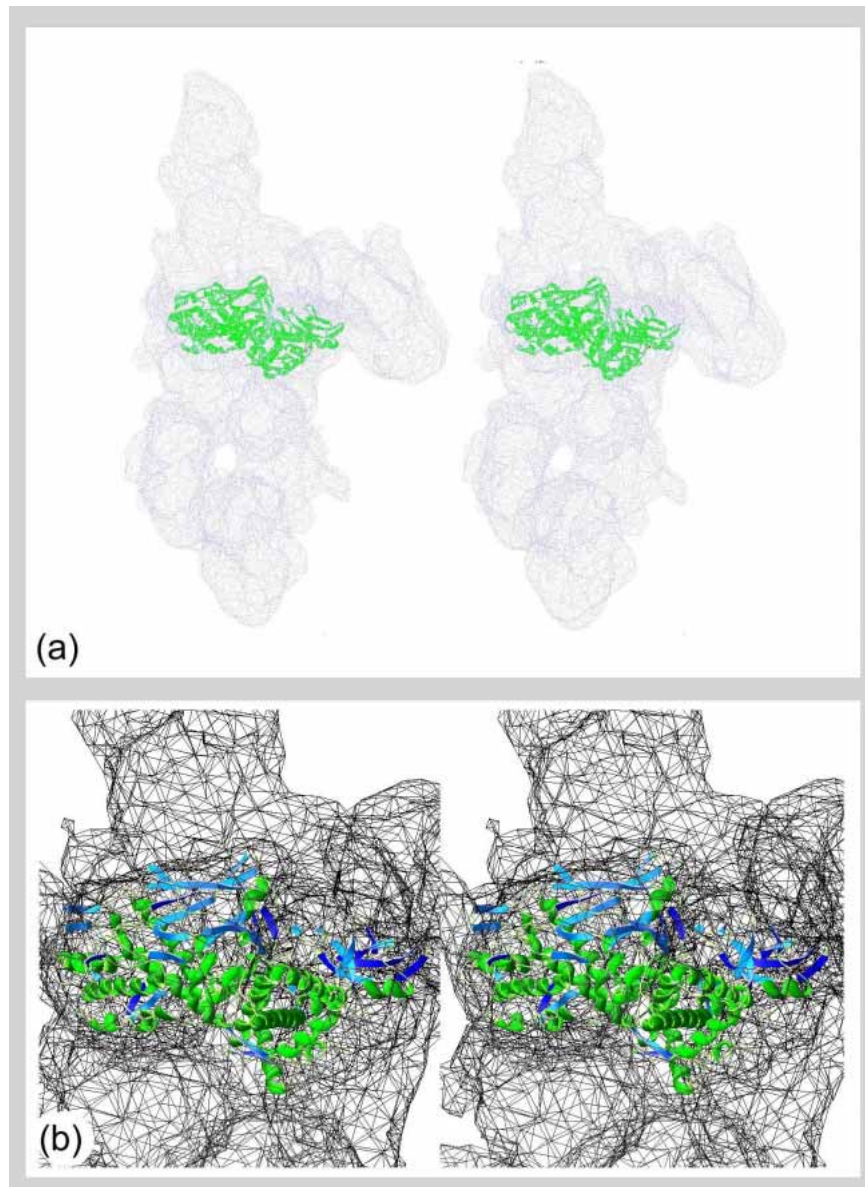


Abb. 43: Fitting der alignierten Domäne g in die Masse des *Arc* aus der 3D-Rekonstruktion :

- (a) Übersicht, wie die Orientierung im Untereinheitendimer ist
- (b) Vergrößerung des *Arc*

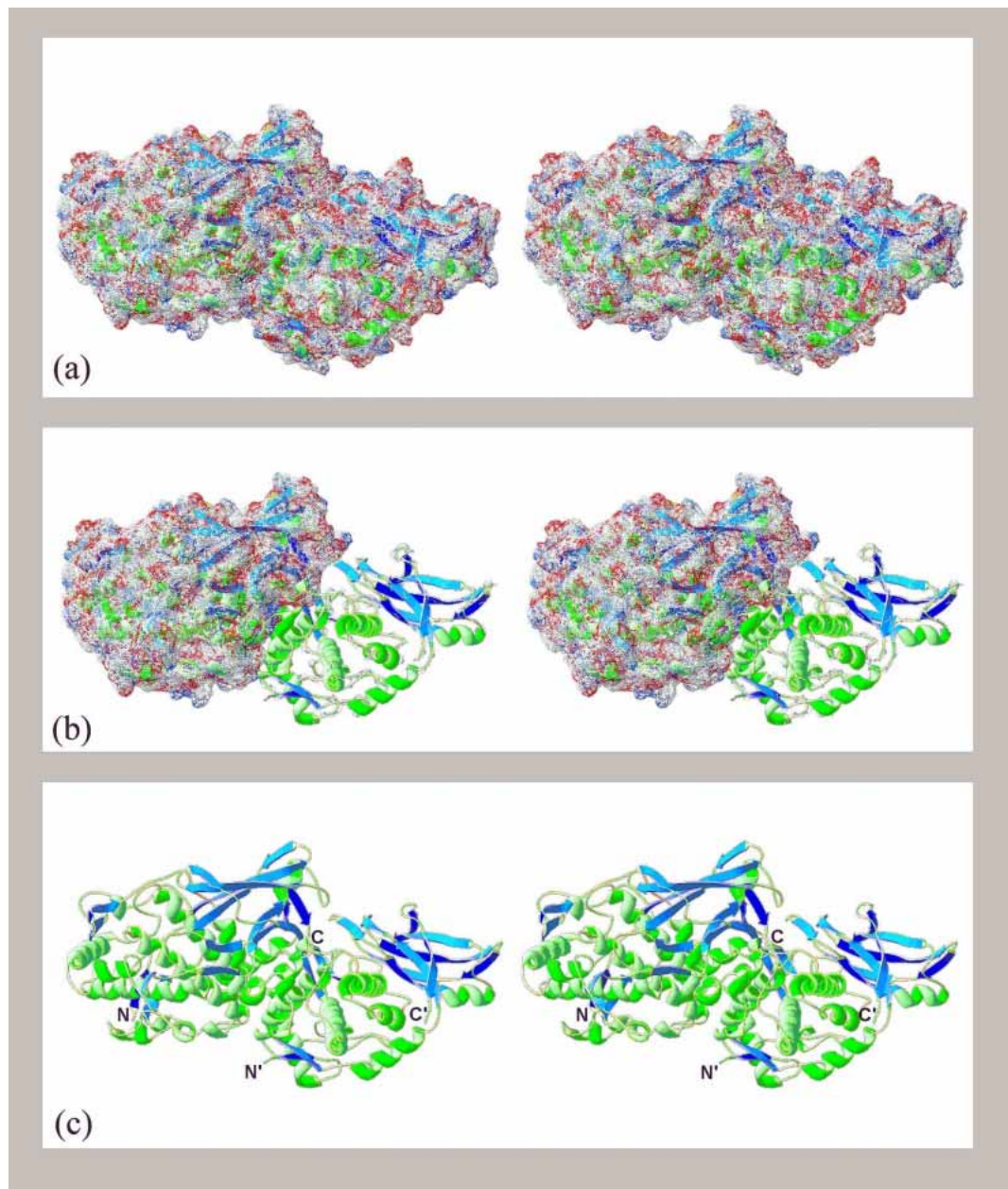


Abb. 44: Anordnung von zwei Kopien der funktionellen Domänen HtH1-g als Homodimer:

- (a) Oberflächenansicht
- (b) Domäne g in Oberflächenansicht, Domäne g' in Sekundärstrukturansicht
- (c) Sekundärstrukturansicht, die N- und C-Termini für die beiden funktionellen Domänen g und g' sind gekennzeichnet

D Diskussion

1 Stand der Forschung

Bei der Aufklärung von Details der Quartärstruktur des KLH als Vertreter des Hämocyanins mariner Schnecken wurde zunächst durch 2D-Kristallisation und dann durch Einzelpartikelanalyse aus kryofixierten EM-Bildern Rekonstruktionen mit einer Auflösung von 40-45 Å erreicht (Dube *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1992b). Als bisher bestes Modell eines Molluskenhämocyanins wurde schließlich eine 3D-Rekonstruktion des KLH1-Didekamers in 15 Å Detailauflösung vorgelegt (Orlova *et al.*, 1997).

Die für das HtH1-Didekamer im Rahmen dieser Arbeit erreichte 3D-Rekonstruktion zeigt im Prinzip eine ähnliche Struktur wie die Rekonstruktionen anderer Molluskenhämocyanine. Das Hämocyanin von *O. dofleini* weicht jedoch im Aufbau der Kragenregion stark vom Hämocyanin der Schnecken ab (Lambert *et al.*, 1994a); zudem besitzt diese Rekonstruktion lediglich eine Auflösung von 40 Å. Demgegenüber zeigt das Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* deutliche strukturelle Übereinstimmungen mit KLH und HtH, allerdings steht auch dort lediglich eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von 40 Å zur Verfügung (Lambert, 1995). Zu dem Verlauf der Polypeptidkette innerhalb eines Dekamers und somit die räumliche Anordnung der Untereinheit lagen zu Beginn meiner Arbeit noch keine klaren Ergebnisse vor (Lamy *et al.*, 1998).

Ein Versuch, die röntgenkristallographisch gewonnene Struktur zweier Kopien der funktionellen Domäne g von *O. dofleini* Hämocyanin (Cuff *et al.*, 1998) in die elektronenmikroskopisch ermittelte 3D-Rekonstruktion der Gesamtstruktur von *Benthocopus* Hämocyanin einzupassen, lieferte wegen einer Auflösung von nur 26 Å ebenfalls keine klaren Ergebnisse (Mouche *et al.*, 1999).

2 Verfahrensweise bei der 3D-Rekonstruktion und der Auflösungsbestimmung

Die Rekonstruktion des HtH1-Didekamers wurde anhand der Einzelpartikelanalyse zunächst aus drei (bis auf den gewählten Defokus identisch) gewonnenen Datensätzen von Einzelbildern, getrennt für verschiedene Defoki, durchgeführt. Die resultierenden, entgültigen Klassenbilder aller drei Datensätze wurden miteinander ver-

glichen und dann gemeinsam zu einer resultierenden 3D-Gesamtrekonstruktion herangezogen. Die Alignments der Einzelbilder erfolgte also je nach Defokus getrennt, damit keine Strukturdetails, die bei den jeweiligen Defokus im „Lückenbereich“ liegen (vgl. Ergebnisse: Anzahl der selektierten Molekülbilder bei den verschiedenen Defokuswerten), die Ausrichtung verfälschten.

Die Symmetrieeigenschaften des Moleküls (D5) waren aufgrund der Tatsache, dass das Didekamer in zwei identische Dekamere zerfällt und aufgrund der Beobachtung der Fünfstrahligkeit von Dekameren in EM-Aufnahmen anzunehmen. Um jedoch auszuschließen, dass eine vorgegebene D5-Symmetrie die Rekonstruktion artifiziell beeinträchtigt und um eine theoretische Zehnstrahligkeit eines Dekamers zu berücksichtigen, wurden Berechnungen mit anderen Symmetrievoraussetzungen durchgeführt. Diese Versuche bestätigten die vermutete D5-Symmetrie des HtH1-Didekamers, da andere Symmetrien eine Rekonstruktion ergaben, deren Rückprojektionen nicht mit den EM-Bildern übereinstimmten.

Zur Bestimmung der Auflösungsgrenze mittels FSC wurde jeweils die Hälfte der untersuchten Klassenbilder verwendet. Diese Methode ergibt bei mehr als 100 verwendeten Klassen für die 3D-Rekonstruktion nahezu eine identische FSC-Kurve und eine immense Zeitersparnis gegenüber einer Verwendung der Einzelbilder und erneuter Klassifizierung mit anschließender FSC-Analyse. Bei der endgültigen 3D-Rekonstruktion wurden mehr als 500 Klassen durch FSC miteinander verglichen.

3 Darstellung des HtH1-Didekamers

Es wurde eine 3D-Rekonstruktion des 8 MDa Molluskenhämocyanins HtH1 bei einer Auflösung von 12 Å vorgestellt. Diese wurde aus einer Menge von 9735 kryoelektronenmikroskopischer Einzelbilder von unkontrastierten in glasartigem Eis eingebetteten Molekülen gewonnen. Die ausgewählten Moleküle repräsentierten nahezu alle möglichen Raumorientierungen, wodurch eine große Menge (506) verschiedener Klassensummen produziert werden konnte. Für die Oberflächendarstellungen des Moleküls wurde der Schwellenwert so gewählt, dass er mit 8 MDa bei der Masse lag, die sich aus der bekannten Aminosäuresequenz errechnet (Lieb *et al.*, 2000). Das 3D-Bild wurde mit einem Schärfefilter so behandelt, dass Details, die unter einer Auflösung von 12 Å lagen, geglättet und nicht mehr dargestellt wurden. Dennoch lassen sich in der Molekülwand Details ausmachen, die unterhalb der theoretischen Auflösungsgrenze liegen. Diese sind in Abhängigkeit von den gewählten Schwellenwertparametern auch noch zu erkennen, wenn eine Glättung auf ca. 25 Å durchgeführt wurde. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Strukturen nicht artifi-

ziell sind und nicht durch den Schärfefilter beeinflusst wurden. Die so gefundenen Strukturdetails gehen deutlich über die 15 Å Rekonstruktion des KLH1 (Orlova *et al.*, 1997) hinaus, so dass sich die Lage des Untereinheitendimers innerhalb des Dekamers bestimmen ließ.

4 Abmessungen der Quartärstruktur des HtH1

Schon lange kennt man aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen den zylindrischen Aufbau von Molluskenhämocyaninen (Fernandez-Moran *et al.*, 1966) und den dreischichtigen Aufbau der porösen Wand. Dieser Aufbau könnte den Transport von Sauerstoff an die aktiven Zentren der funktionellen Domänen begünstigen. Das zentrale Loch zwischen jeweils zwei paarig angeordneten funktionellen Domänen könnte diesen physiologisch relevanten Transportprozess noch begünstigen, da hiermit die Diffusion von Sauerstoff an die Kupferzentren erleichtert wird. Die Außenmaße des HtH1 Didekamers, die aus der 3D-Rekonstruktion resultieren sind 351 Å x 375 Å (Durchmesser x Höhe). Die Wand des Dekamers ist in drei Schichten (*tiers*) unterteilt, die äußerlich betrachtet wie drei gestapelte Ringe erscheinen, welche durch Löcher unterbrochen sind.

Die Löcher in der Molekülwand haben einen Durchmesser von bis zu 35 Å; die Löcher, die zwischen Domänendimeren gefunden werden (vgl. unten) haben immerhin noch einen Durchmesser von ca. 15 Å. Letztere bilden ein lineares Kanalsystem, das sich längs durch die gesamte Zylinderwand zieht (siehe Abb. 31). Ein Sauerstoffmolekül in Lösung hat einen Durchmesser von max. 2,8 Å (ausgehend vom doppelten des Ionenradius $r_{O^{2-}} = 1,4$ Å nach Jander & Blasius (1988) und kann somit sehr leicht durch Diffusion an die Kupferzentren der verschiedenen funktionellen Domänen gelangen. Der Kragenkomplex verschließt den Hohlzylinder an der engsten Stelle auf einen Durchmesser von ca. 75 Å. Somit ist eine Durchströmung des Zylinders mit Wasser (aus der Hämolymphe) entlang der Längsachse des Zylinders sehr leicht möglich (der Durchmesser eines Wassermoleküls beträgt ca. 2,5 Å). Der Hohlzylinder hat ein mit wassergefülltes Innenvolumen von $1,23 \cdot 10^8$ Å³, wohingegen sein Gesamtvolumen (Protein und Wasser) $1,32 \cdot 10^8$ Å³ beträgt. Das Volumen an reiner Proteinmasse macht also $0,09 \cdot 10^8$ Å³ aus. Daraus lässt sich für das wassergefüllte HtH1 eine spezifische Dichte von 0,68 Da/Å³ berechnen. Der Theoriewert für die spezifische Dichte wasserlöslicher Proteine liegt bei ca. 0,72 Da/Å³ (= 1,2 g/L, Dr. Hermann Hartmann, persönliche Mitteilung). Der reine Proteinanteil bei der 3D-Rekonstruktion des HtH1 wurde mit einer spezifischen Dichte von 0,83 Da/Å³ angenommen.

5 Isolierung des Untereinheitendimers aus dem Didekamer

Es wurde schon in vorangehenden Arbeiten über eine antiparallele Anordnung der beiden Untereinheiten im Untereinheitendimer diskutiert (Lamy *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1990; Orlova *et al.*, 1997).

Zu der hier vorgestellten Isolierung des Untereinheitendimers führte zunächst die Verfolgung von besonders dichtearmen Verbindungen innerhalb der Zylinderwand in der 3D-Dichtekarte des Dekamers. Dabei ließ sich ein Muster erkennen: Egal ob man von oben nach unten oder von unten nach oben durch die Wand des Dekamers von Schicht zu Schicht weiterging, ließen sich die gleichen Strukturen erkennen (siehe Abb. 35), einmal rechtshändig, im anderen Fall linkshändig. Dies ließ den Schluss auf eine Symmetrie im Wandbereich zu, also ein gegenläufiges Motiv. Die Extraktion dieser Struktur ergab dann tatsächlich innerhalb des Untereinheitendimers im Wandbereich eine gegenläufige 2fach-Symmetrie (siehe unten). Diese wurde bei der 3D-Rekonstruktion nicht vorgegeben, kann also nicht als Rekonstruktionsartefakt auftreten, wie dies zum Beispiel eine vorgegebene D5-Symmetrie für die Struktur des ganzen Didekamers hätte bewirken können (was jedoch durch die Versuche mit C5- und C10-symmetrischen Rekonstruktionen ebenfalls ausgeschlossen werden konnte).

Betrachtet man nun den strukturellen Aufbau des Untereinheitendimers (siehe Abb. 34b), so zeigt sich, dass die morphologischen Einheiten immer aus paarig angeordneten funktionellen Domänendimeren bestehen, jeweils durch ein zentrales Loch voneinander separiert bzw. über zwei „Arme“ miteinander verbunden. Diese Anordnung kann bereits in der 15 Å Rekonstruktion des KLH1 (Orlova *et al.*, 1997) erahnt werden, findet aber erst mit der hier vorgelegten 12 Å-Rekonstruktion eine klare Bestätigung.

6 Intramolekulare Symmetriebetrachtungen am HtH1-Dimer

Die wandständigen sechs funktionellen Domänen der beiden Untereinheiten sind im Untereinheitendimer eindeutig antiparallel angeordnet (Abb. 45a). Die klare 2fach-Symmetrie herrscht zwischen jeweils drei morphologischen Einheiten (= Domänen-Dimere) vor, die jeweils von einer außenständigen Schicht (*tier*) des Dekamers zur zentralen Schicht im Symmetriezentrum angeordnet sind. Allerdings lässt sich keine eindeutige Zuordnung der Verbindung zwischen dem *Arc* und einer bestimmten funktionellen Wanddomäne festmachen, sondern nur bestätigen, dass der *Arc* je-

weils mit einer morphologischen Einheit der Zentralschicht im Dekamer in Kontakt steht (siehe Abb. 34c).

Die paarige Anordnung der *Arc*-Domänen zeigt aus einem bestimmten Blickwinkel ebenfalls eine hohe 2fach Symmetrie. Dreht man das Molekül entlang der durch die beiden Pfeile in Abb. 45b angedeuteten Ebene um 180° , lassen sich scheinbar beide *Arc*-Domänen zur Deckung bringen.

Warum die Anordnung der *Collar*-Domänen, die einen Bruch in die Symmetriebetrachtungen bringt, sich dann einseitig in eine Richtung orientiert, lässt sich mit der 12 Å-Rekonstruktion des Didekamers nicht eindeutig klären. Gegenüber allen anderen funktionellen Domänen des HtH1 verfügt die funktionelle Domäne HtH1-h mit 501 Aminosäuren über eine ca. 95 Aminosäuren längere Polypeptidkette (Keller *et al.*, 1999). Diese zusätzlichen Aminosäuren bilden jedoch einen C-terminalen „Schwanz“ und nicht etwa eine verlängerte Linkerregion zwischen g und h. Dies würde zu einer erhöhten Flexibilität in der räumlichen Anordnung verhelfen. Wenn der Bereich zwischen einer der beiden *Arc*-Domänen und dem *Collar* sehr flexibel wäre und sich daher im EM-Bild nicht als eindeutige Dichtestruktur abbilden ließe, würde dies erklären, warum an dieser Stelle in der 3D-Rekonstruktion keine eindeutige, direkte Verbindung erkennbar ist (siehe Abb. 34d). Andererseits würde es erklären, weshalb die Auflösung im *Collar*-Bereich schlechter zu sein scheint als in den restlichen Molekülbereichen (*Arc* und Wand), wenn die *Collar*-Domänen generell aufgrund einer flexiblen Verbindung in der statistischen Klassenbildung während der Bildverarbeitung die Strukturschwerpunkte in diesem Bereich „verwackeln“.

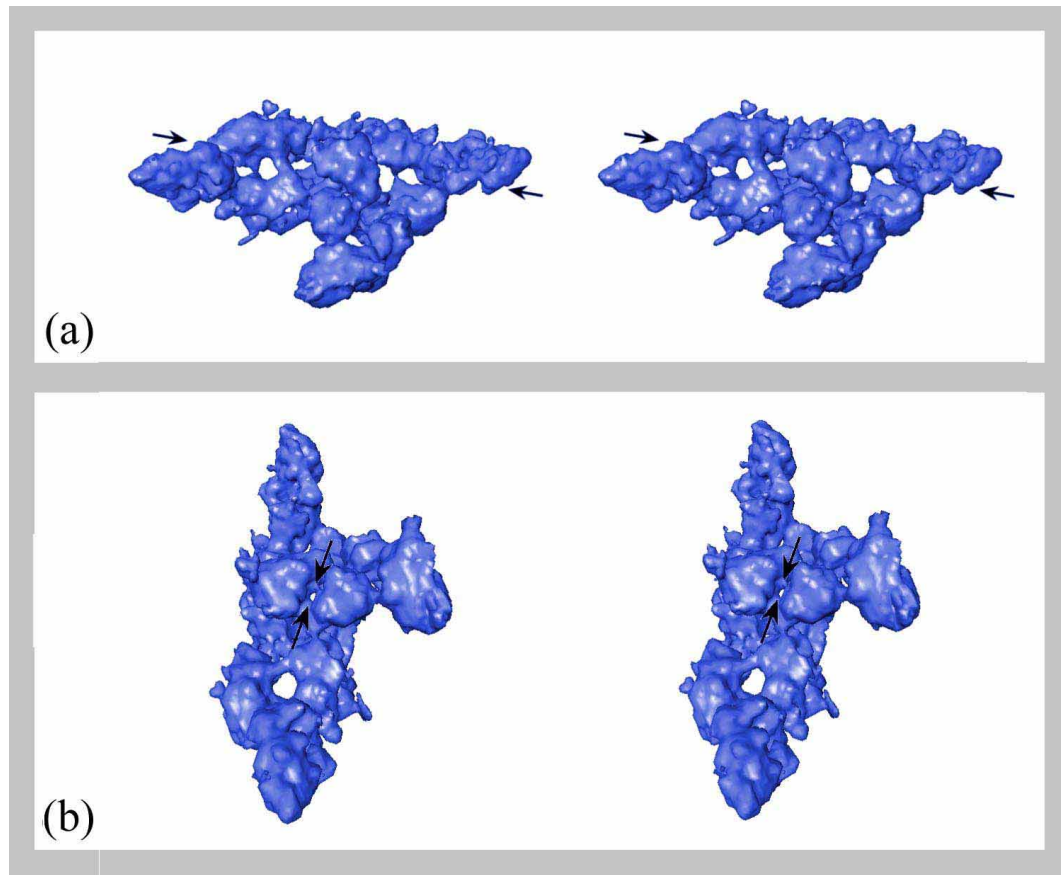


Abb. 45: Untereinheitendimer in Stereoansicht:

- (a) Symmetriebetrachtung im Untereinheitendimer des HtH1
- (b) Der Betrachtungswinkel ist so gewählt, dass die *Arc*-Domänen in einer 2fach-Symmetrie erscheinen

7 Anordnung der beiden Untereinheiten im Untereinheitendimer

Die Einfärbung des Untereinheitendimers von HtH1 in Abb. 46 zeigt die beiden einzigen noch plausiblen Anordnungen für das Monomer im Dimer. In erster Linie basieren die resultierenden Anordnungsmöglichkeiten aus der möglichen Organisation der funktionellen Domänen im Untereinheitendimer (siehe unten). Langgestreckte Drei-Domänen-Fragmente, wie sie bei (Dainese *et al.*, 2000) als proteolytische Spaltprodukte beschrieben werden, lassen sich in Abb. 46a-a' als Fragment (cde)

oder (def) erkennen, oder aber in Abb. 46b-b' als (abc) oder (def) in einer vergleichbaren Form finden.

8 Die Anordnung der funktionellen Domänen im Untereinheitendimer

Die bisher detaillierteste Untersuchung, anhand von immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen den Verlauf der Untereinheiten im Dekamer zu bestimmen, wurde beim Hämocyanin aus *Sepia* unternommen. Dabei wurden 80 mögliche Anordnungen für den Verlauf der Sequenz der funktionellen Domänen (abcdefgh) im Dekamer veranschlagt (Lamy *et al.*, 1998). Da jedoch, wie die vorliegende 3D-Rekonstruktion zugrundelegt, die morphologischen Einheiten aus Domänendimeren gebildet werden und weiterhin die gefundene Struktur des oben beschriebenen Untereinheitendimers die einzige plausible Substruktur für einen C5-symmetrischen Dekameraufbau bildet, bleiben nur zwei mögliche Anordnungen für die 16 funktionellen Domänen im Untereinheitendimer (Abb. 46).

Für diese Anordnungen spricht, dass die Abstände zwischen den funktionellen Domänen recht kurz sind, denn die Linkerregion der einzelnen funktionellen Domänen würde keine längeren Abstände zulassen (Keller *et al.*, 1999; Lieb *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1998). Zudem wurde bereits gezeigt, dass der Zentralkragen beim Hämocyanin aus *O. dofleini* durch die funktionelle Domäne OdH-g gebildet wird (Van Holde & Miller, 1995), während für KLH1 die funktionellen Domänen g und h als *Arc*- und *Collar*-Domänen beschrieben wurden (Lieb *et al.*, 2000; Orlova *et al.*, 1997). Untermauert wird dies durch Ergebnisse aus der Immun-Elektronenmikroskopie an KLH2, bei denen monoklonale anti-KLH2-h Antikörper spezifisch an der äußeren Kragenregion des KLH2 andockten (Gebauer & Markl, 1999). Und schließlich passt der deutliche Größenunterschied zwischen den funktionellen Domänen g und h aus den Sequenzdaten dazu, dass der *Collar* offensichtlich wesentlich mehr Masse besitzt als der *Arc* und damit die C-terminale Domäne h darstellt. Die Domänen a-f bilden, wie in Abb. 46a, a' gezeigt, innerhalb des Untereinheitendimers Heterodimere (ab, cd, ef), während die funktionellen Domänen g und h Homodimere (gg, hh) bilden. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die funktionellen Domänen f, wenn diese zentral im Untereinheitendimer angeordnet sind (Abb. 46b, b') ein Homodimer bilden.

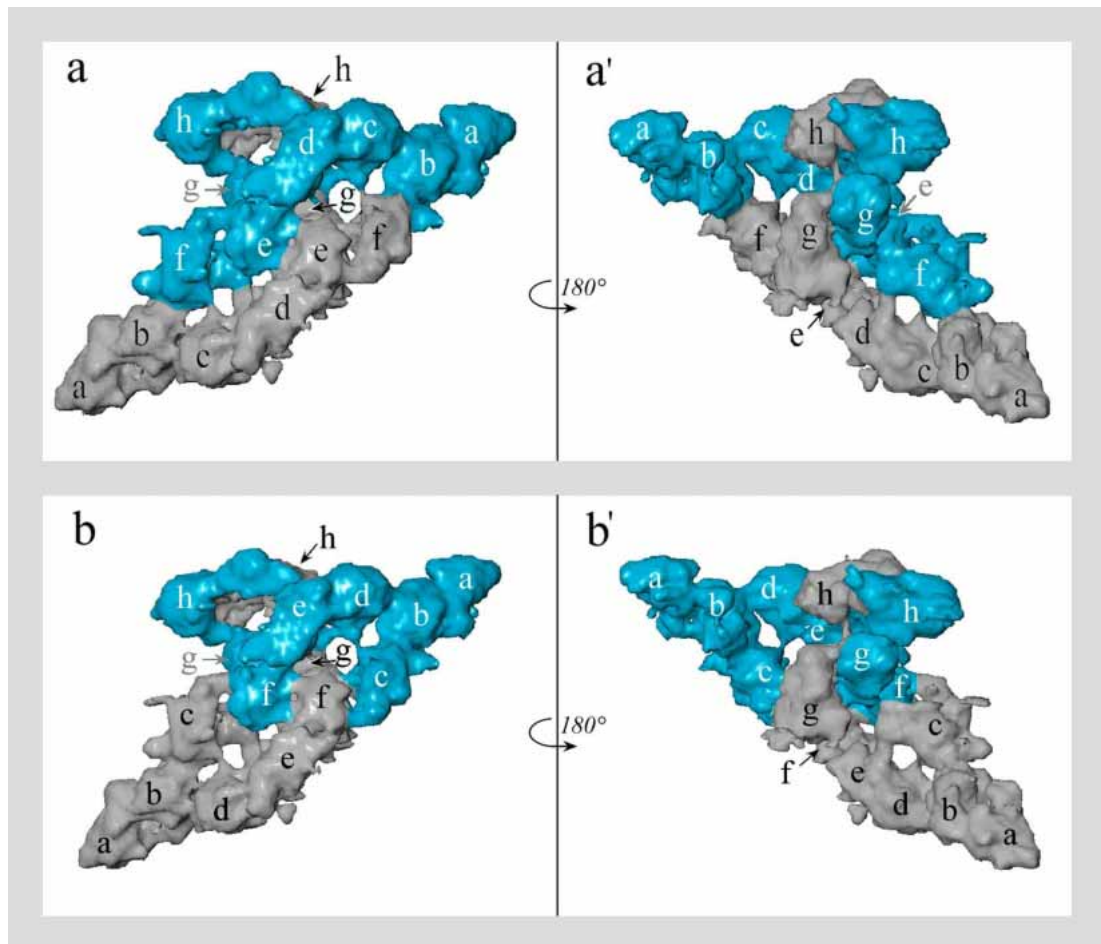


Abb. 46: Zwei mögliche Anordnungen der beiden Untereinheiten im HtH1-Untereinheitendimer

Die beiden denkbaren Möglichkeiten zur Organisation der funktionellen Domänen (abcde fgh), unter Berücksichtigung von proteolytischen Spaltungsversuchen und Erkenntnissen, die anhand von Immun-Elektronenmikroskopie gewonnen wurden (Gebauer & Markl, 1999; Harris & Markl, 1999; Lamy *et al.*, 1998). (a) und (b) zeigen das Untereinheitendimer von der Wandseite her, während es in (a') und (b') von der Innenseite des Dekamer-Zylinders her betrachtet wird.

Die Anordnung aus Abb. 46a, a' ist die wahrscheinlichere, da sie weit besser durch die Immun-Elektronenmikroskopie gestützt wird, die an KLH durchgeführt wurde (Harris & Markl, 1999). Bei dieser wurde die funktionelle Domäne c als randständig charakterisiert. Außerdem spricht für das Modell in Abb. 46a, a' die klare Abgrenzung der morphologischen Einheiten in Dimere funktioneller Domänen, die auch in der Transmissionsansicht der ausgerollten HtH1-Wand (vgl. Abb. 31c) zu erkennen ist. Für die zweite Darstellung sprechen vor allem proteolytische Spaltungsversuche, bei denen neben anderen, kleineren Spaltprodukten ein Drei-Domänen-Fragment (abc) auftritt (Söhnngen *et al.*, 1997). Auch neuste Untersuchungen (Dainese *et al.*, 2000) stoßen immer wieder auf dieses Motiv.

9 Einpassen der vorhergesagten 3D-Struktur von HtH1-g in den Arc

Parallel zu dieser Arbeit haben Mouche *et al.*, 1999 versucht, Röntgenstrukturdaten von OdH-g (Cuff *et al.*, 1998) mit Dichtekarten von *Sepia* Hemocyanin aus der Elektronenmikroskopie zu vergleichen. Der Tatsache Rechnung tragend, dass die funktionelle Domäne HtH1-g der funktionellen Domäne OdH-g sehr ähnlich ist, wurde in dieser Arbeit anhand der funktionellen Domäne HtH1-g gezeigt, dass bei einer Auflösung von 12 Å der Dichteverteilung, wie sie aus der 3D-Rekonstruktion aus EM-Bildern resultiert, das Einpassen einzelner funktioneller Domänen in den Arc-Bereich möglich ist (Abb. 43).

In der Kristallstruktur sind die OdH-g Moleküle zu Dimeren angeordnet (Cuff *et al.*, 1998). Die beiden Arc-Domänen sind jedoch aufgrund der asymmetrischen Anordnung des *Collars* in Bezug auf die Orientierung des Untereinheitendimers im nativen Zustand des Hämocyaninmoleküls (Dekamer) nicht so zueinander angeordnet wie in der Röntgenkristallstruktur, die auf einer kristallinen Gitterbildung beruht. Der künstliche Kristall, in dem das OdH-g Untereinheitendimer für die Röntgenstruktur die grundlegende Struktur darstellt (Cuff *et al.*, 1998), Fig. 8), zeigt nicht die gleichen morphologischen Merkmale, wie sie für die Anordnung des Arc im HtH1-Dekamer gefunden werden:

- Zwischen den beiden Arc-Domänen befindet sich ein Hohlraum, der bei dem OdH-g Untereinheitendimer in der Röntgenstruktur nicht zu erkennen ist.
- Die N-Termini der beiden Arc-Domänen müssen zur zentralen Schicht (*tier*) der Zylinderwand an zwei verschiedenen Stellen orientiert sein (vgl. Abb. 34c), während sie in Orientierung wie der Kristallstruktur nicht schlüssig in den Arc eingepasst werden können.

- Die C-Termini der beiden *Arc*-Domänen müssen asymmetrisch zum restlichen Untereinheitendimer Richtung *Collar* orientiert sein (vgl. Abb. 34d), während sie in der Kristallstruktur symmetrisch um ca. 90° verdreht sind.
- Die Anordnung der beiden *Arc*-Domänen scheint dennoch eine 2fach-Symmetrie aufzuweisen (vgl. Abb. 45b).

Um jedoch auch funktionelle Domänen im Wandbereich des Moleküls mit einiger Zuverlässigkeit einpassen zu können, ist es nötig, von einer wandständigen funktionellen Domäne eine Röntgenstruktur zu besitzen. Damit könnte man sehen, inwieweit ihr prinzipieller Aufbau von der Tertiärstruktur des *Arc*-Bereichs abweicht.

Aus der Ausrichtung der eingepassten HtH1-Strukturen in den *Arc* lässt sich keine der beiden zuvor diskutierten Anordnungen der funktionellen Domänen im Untereinheitendimer favorisieren, da durch eine Linkerregion von HtH1-f nach HtH1-g von lediglich 3 Aminosäuren beide in Abb. 46 postulierten Anordnungen möglich sind.

10 Ausblick

Die endgültige Klärung der Anordnung der funktionellen Domänen erfordert weiterführende immun-elektronenmikroskopische Untersuchungen oder eine weitere drastische Verbesserung der Auflösung, damit Sekundärstrukturelemente aufgelöst werden.

Die Grenze von 12 Å konnte auch durch eine erneute Präparation und eine Neuberechnung mit 30.000 Einzelbildern nicht verbessert werden. Dies spricht für Strukturbewegungen, die über einen Bereich von eben diesen 12 Å stattfinden. Dies könnte mit molekularen Bewegungen bei der Oxygenierung/Desoxygenierung zusammenhängen. Um diese zu unterbinden muss die Oxi- und die Desoxiform getrennt präpariert und untersucht werden.

Zudem wäre es hilfreich, das Untereinheitendimer zu stabilisieren, zu isolieren und nach kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu rekonstruieren.

E Zusammenfassung

Die Quartärstruktur des respiratorischen Proteins Hämocyanin (Isoform HtH1) aus der marinen Schnecke *Haliotis tuberculata* wurde mittels Kryoelektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion untersucht. Das Molekül ist zylinderförmig, hat einen Durchmesser von ca. 35 nm und besteht aus einer Zylinderwand und einem internen Kragenkomplex. Dieser wiederum besteht aus einem *Collar* und einem *Arc*.

Die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von in glasartigem Eis fixierten HtH1-Molekülen brachte eine enorme Verbesserung der Anzahl der zur Verfügung stehenden Ansichtswinkel gegenüber den negativkontrastierten Molekülen, die auf Karbonfilm präpariert waren.

Die 3D-Rekonstruktion des HtH1 mittels Aufnahmen bei drei verschiedenen Defokuswerten verbesserte die Auflösung noch einmal deutlich gegenüber den Rekonstruktionen, die aus Aufnahmen bei einem festen Defokuswert gemacht wurden, und zwar auf 12 Å. Das Molekül besitzt eine D5-Symmetrie.

Aus dieser bisher genauesten Rekonstruktion eines Molluskenhämocyanins aus EM-Bildern ließen sich folgende neue Strukturdetails ableiten:

- Ein Untereinheitendimer konnte als *Repeating Unit* im Dekamer des HtH1 beschrieben werden.
- Das Untereinheitendimer konnte aus der 3D-Dichtekarte isoliert werden. Es besteht eindeutig aus 16 Massen, die funktionellen Domänen entsprechen. Zwei dieser Massen bilden den Collar, zwei den Arc und 12 das Wandsegment.
- Die gegenläufige Anordnung der beiden Untereinheiten innerhalb dieses Untereinheitendimers konnten bestätigt und auf zwei Möglichkeiten eingeschränkt werden.
- Die Zahl der alternativen Anordnungen der 16 funktionellen Domänen (HtH1-a bis HtH1-h) im Untereinheitendimer konnten von 80 auf 2 eingeengt werden.
- Es konnte über molekulares Modellieren mithilfe einer publizierten Kristallstruktur eine 3D-Struktur fastatomarer Auflösung der funktionellen Domäne HtH1-g berechnet werden.
- Die funktionelle Domäne HtH1-g konnte als Domänenpaar plausibel in die 3D-Dichtekarte des Untereinheitendimers eingepasst werden, und zwar in die beiden Massen des *Arc*.



Aus der elektronenmikroskopisch gewonnenen Dichtekarte wurde mit Hilfe des „*Rapid Prototyping*“-Verfahrens ein solides Modell des HtH1-Didekamers angefertigt, mit dessen Hilfe die Strukturen besser zu „begreifen“ sind und dessen „Sollbruchstücke“ das Untereinheitendimer repräsentieren.

Insgesamt leistet die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Schritt zum Verständnis der Quartärstruktur der Molluskenhämocyane.

F Literatur

- Adrian, M., Dubrochet, J., Lepault, J. & McDowall, A. W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32-36.
- Adrian, M., Ten Heggeler Bordier, B., Wahli, W., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. & Dubochet, J. (1990). Direct visualisation of supercoiled DNA molecules in solution. *Embo J.* **9**, 4551-4554.
- Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S. D. & Harris, J. R. (1998). Cryo-negative staining. *Micron* **29**, 145-160.
- Aguirre, A. (1988). Abalone culture: a perspective from Mexico. In *West coast mollusc culture, Proc. Workshop* (Amidei, R., ed.), pp. 65-67. Pacific Sea Grant College program.
- Ainslie, R. (1980a). Haemocyanin concentrations in field populations of three species of southern Australian abalone. *Austral. J. Mar. Freshw. Res.* **31**(5), 627-633.
- Ainslie, R. C. (1980b). The quantitative role of haemocyanin in the respiration of abalone (genus *Haliotis*). *J. Exptl. Zool.* **211**(1), 87-99.
- Albrecht, U. & Markl, J. (1995). Porenzellen als möglicher Ort der Hämocyanin-Biosynthese in der marinen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*. In *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* (Pfannenstiel, H.-D., ed.), Vol. 88.1, pp. 156. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Kaiserslautern.
- Asano, Y. & Tada, T. (1989). Generation of T cell repertoire. Two distinct mechanisms for generation of T suppressor cells, T helper cells, and T augmenting cells. *J. Immunol.* **142**, 365-373.
- Bichler, K. H., Kleinknecht, S. & Strohmaier, W. L. (1990). Immune status and immune therapy of renal cell carcinoma. *Urol. Int.* **45**, 269-283.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). Protein Cristallography. Academic Press, New York.
- Boisset, N., Penczek, P., Taveau, J. C., Lamy, J. & Frank, J. (1995). Three-dimensional reconstruction of *Androctonus australis* hemocyanin labeled with a monoclonal Fab fragment. *J Struct Biol* **115**(1), 16-29.
- Bonaventura, C., Bonaventura, J., Miller, K. I. & Van Holde, K. E. (1981). Hemocyanin of the chambered Nautilus: structure-function relationship. *Arch. Biochem. Biophys.* **211**, 589-598.

- Böttcher, B., Wyner, S. A. & Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**, 88-91.
- Brouwer, M., Ryan, M., Bonaventura, J. & Bonaventura, C. (1978). Functional and structural properties of *Murex fulvescens* hemocyanin: isolation of two different subunits required for reassociation of a molluscan hemocyanin. *Biochemistry* **17**(14), 2810-2815.
- Calmorin, M. A. (1994). Sagassum as feed to caged cultures of abalones. *SICEN Newsletter* **5**(1), 4.
- Catalano, D. A. (1995). Abalone source for pearls. *Nat. Jeweller* **39**(19), 2b & 80.
- Champeney, D. C. (1973). Fourier transforms and their physical applications. Academic Press (Press, A., Ed.), New York.
- Chan, H. M. & Weeks, J. M. (1992). The subunit structural composition of amphipod haemocyanin (Crustacea, Amphipoda, Talitridae). *Comp. Biochem. Physiol.* **1B**(4), 567-572.
- Crofts, D. R. (1929). *Haliotis* L.M.B.C. Memoirs on typical British marine plants and animals (Johnstone, J. & Daniel, R. J., Eds.), 29, University Press, Liverpool.
- Crowther, R. A., DeRosier, D. J. & Klug, A. (1970). The reconstruction of a three dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proc. Roy. Soc.* **A**(317), 319-340.
- Cuff, M. & Hendrickson, W. A. (1996). *International Conference on: Supramolecular organization and functional regulation of Invertebrate dioxygen binding proteins, Padua, Italien.*
- Cuff, M. E., Miller, K. I., Van Holde, K. E. & Hendrickson, W. A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- Dainese, E., Svergun, D., Belramini, M., Di Muro, P. & Salvato, B. (2000). Low-Resolution Structure of the Proteolytic Fragments of the *Rapana venosa* Hemocyanin in Solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 154-162.
- Dawson, A. & Wood, E. J. (1983). Isolation of oxygen-binding domains of *Lymnaea stagnalis* hemocyanin. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins*. (Wood, E. J., ed.), Vol. Suppl. 1, pp. 135. Life Chem. Rep.
- De Lacaze-Duthiers, H. (1859). Memoire sur le systeme nerveux de l'Haliotide. *Ann. Sci. Nat. Zool., Ser. 4 T.* **12**.

-
- Decker, H. & Rimke, T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* **273**(40), 25889-92.
- Denizot, F. & Golstein, P. (1981). Specific cooperative induction by KLH or invertebrate hemolymph of mouse polyclonal T cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* **58**, 333-344.
- Drexel, R., Schneider, H.-J., Sigmund, S., Linzen, B., Gielens, C., Lontie, R., Preaux, G., Lottspeich, F. & Henschen, A. (1986). Partial primary structure of the *Helix pomatia* β_C -hemocyanin functional unit D. In *Invertebrate oxygen carriers* (Linzen, B., ed.), pp. 255-258. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Drexel, R., Sigmund, S., Schneider, H. J., Linzen, B., Gielens, C., Preaux, G., Lontie, R., Kellermann, J. & Lottspeich, F. (1987). Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol Chem Hoppe Seyler* **368**(6), 617-35 issn: 0177-3593.
- Dube, P., Orlova, E. V., Zemlin, F., Van Heel, M., Harris, J. R. & Markl, J. (1995). Three dimensional structure of keyhole limpet hemocyanin by cryoelectron microscopy and angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **115**(3), 226-232.
- Ellerton, H. D., Ellerton, N. F. & Robinson, H. (1983). Hemocyanin, a current perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **41**, 143-248.
- Ellerton, H. D. & Lankovsky, T. (1983). Structure of the hemocyanin from the paua (abalone) *Haliotis iris*. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982* (Wood, E. J., ed.), Vol. Supplement 1, pp. 129-132. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, London, New York.
- Fernandez-Moran, H., Van Bruggen, E. F. J. & Ohtsuki, M. (1966). Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **16**, 191-207.
- Flamm, J. & Bucher, A. (1991). Adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy in primary superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol.* **67**, 70-73.
- Flamm, J., Bucher, A., Hörtl, W. & Albrecht, W. (1990). Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial. *J. Urol.* **144**, 260-263.
- Flamm, J., Donner, G., Bucher, A., Hörtl, W., Albrecht, W. & Havelec, L. (1994). Topical immunotherapy (KLH) vs chemotherapy (Ethoglucid) in prevention of
-

- recurrence of superficial bladder cancer. A prospective randomized study. *Urologe* **A33**, 138-143.
- Flassch, J. P. & Aveline, C. (1984). Production de jeune ormeaux a la station experimentale d'Argenton. *Rapp. Sci. Tech. C. N. E. X. O.* **50**, 68.
- Fleure, H. J. (1902). On the relations of the kidneys in *Haliotis tuberculata*. *Q. J. M. S.* **46**, 77-97.
- Fleure, H. J. (1904). Zur Anatomie und Phylogenie von *Haliotis*. *Jen. Zeitschr.* **39**, 245-316.
- Frank, J. & Ali-Ali, J. (1975). Signal-to-Noise ratio of electron micrographs obtained by cross-correlation. *Nature* **256**, 376-379.
- Frank, J. & Rademacher, M. (1992). Three-dimensional reconstruction of single particles negatively stained or in vitreous ice. *Ultramicroscopy* **46**(241-262).
- Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J., Vereijken, J. M., Soeter, N. M., Bak, H. J. & Beintema, J. J. (1984). 3.2 Å Structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Nature* **309**, 23-29.
- Gebauer, W. & Harris, J. R. (1999). Controlled cleavage of KLH1 and KLH2 by V8 protease from *Staphylococcus aureus*. Reassociation, electrophoretic and transmission electron microscopy study of peptide fragments. *Eur. J. Biochem.* **262**, 166-175.
- Gebauer, W. & Markl, J. (1999). Identification of four distinct subunit types in the unique 6 x 6 hemocyanin of the centipede *Scutigera coleoptrata*. *Naturwissenschaften* **86**(9), 445-7.
- Gebauer, W., Harris, R., Heid, H., Söling, M., Hillenbrand, R., Söhngen, S., Wegener-Strake, A. & Markl, J. (1994). Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH 1 and KLH 2. *Zoology* **98**(1), 51-68.
- Gebauer, W., Ensslin, A. & Markl, J. (1997). Biochemische Untersuchungen am Hämocyanin der Meeresschnecke *Rapana thomasiana*. In *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* (Zissler, D., ed.), Vol. 90.1, pp. 61. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Mainz.
- Gebauer, W., Stoeva, S., Voelter, W., Dainese, E., Salvato, B., Beltramini, M. & Markl, J. (1999). Hemocyanin Subunit Organization of the Gastropod *Rapana thomasiana*. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**(1), 128-134.

-
- Gebauer, W., Harris, J. R., Geisthardt, G. & Markl, J. (2000). Keyhole Limpet Hemocyanin Type 2 (KLH2): Detection and Immunolocalization of a Labile Functional Unit h. *J. Struct. Biol.*, in press.
- Gielens, C., Bosman, F., Preaux, G. & Lontie, R. (1983). Structural studies by limited proteolysis of the haemocyanin of *Sepia officinalis*. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins*. (Wood, E. J., ed.), Vol. Suppl. 1, pp. 121-124. Life Chem. Rep.
- Gielens, C., Benoy, C., Preaux, G. & Lontie, R. (1986). Presence of only seven functional units in the polypeptide chain of the haemocyanin of the cephalopod *Octopus vulgaris*. In *Invertebrate Oxygen Carriers*. (B., L., ed.), pp. 223-226. Springer, Heidelberg.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Hahn, K. O. (1989). Artificial induction of spawning and fertilization. In *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*, pp. 53-70. CRC Press, Boca Rota, Florida, USA.
- Harauz, G. & Van Heel, M. (1986). Exact filters for general geometry three-dimensional reconstruction. *Optik* **73**, 146-156.
- Harris, J. R. (1997). Negative staining and cryoelectron microscopy. RMS Microscopy Handbook, 35, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.
- Harris, J. R. (1999). Negative staining of thinly spread biological particulates. *Methods Mol. Biol.* (Press., H., Ed.), 117, Hajibagheri, A. M. N., Ed.
- Harris, J. R. & Adrian, M. (1999). Preparation of thin-film frozen-hydrated/vitrified biological specimens for cryoelectron microscopy. *Methods Mol. Biol.* (Press., H., Ed.), 117, Hajibagheri, A. M. N., Ed.
- Harris, J. R. & Holzenburg, A. (1995). Human Erythrocyte Catalase: 2-D Crystal Nucleation And Production Of Multiple Crystal Forms. *J. Struct. Biol.* **115**, 102-112.
- Harris, J. R. & Markl, J. (1992). Electron microscopy of a double helical tubular filament in keyhole limpet (*Megathura crenulata*) hemolymph. *Cell Tissue Res.* **269**(3), 411-20 issn: 0302-766x.
- Harris, J. R. & Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* **30**(6), 597-623.
-

-
- Harris, J. R., Engelhardt, H., Volker, S. & Holzenburg, A. (1992a). Electron Microscopy of Human Erythrocyte Catalase: new 2-D Crystal Forms. *J. Struct. Biol.* **111**, 22-33.
- Harris, R., Cejka, Z., Wegener-Strake, A., Gebauer, W. & Markl, J. (1992b). Two-dimensional crystallization, transmission electron microscopy and image processing of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Micron Microsc. Acta* **23**(3), 287-301.
- Harris, J. R., Gebauer, W. & Markl, J. (1993). Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*): a parallel subunit model. *J. Struct. Biol.* **111**, 96-104.
- Harris, J. R., Gebauer, W. & Markl, J. (1995a). Keyhole limpet haemocyanin: negative staining in the presence of trehalose. *Micron* **26**(1), 25-33.
- Harris, J. R., Gebauer, W., Sohngen, S. M. & Markl, J. (1995b). Keyhole limpet haemocyanin (KLH): purification of intact KLH1 through selective dissociation of KLH2. *Micron* **26**(3), 201-212.
- Harris, J. R., Gebauer, W. & Markl, J. (1996). *Supramolecular organization and functional regulation of invertebrate dioxygen binding proteins, Padova, Italy.*
- Harris, J. R., Gebauer, W., Guderian, F. U. M. & Markl, J. (1997a). Keyhole limpet hemocyanin (KLH), I: reassociation from *Immucothel*[®] followed by separation of KLH1 and KLH2. *Micron* **28**(1), 31-41.
- Harris, J. R., Gebauer, W., Söhngen, S. M. & Markl, J. (1997b). Keyhole limpet hemocyanin (KLH), II: characteristic reassociation properties of purified KLH1 and KLH2. *Micron* **28**(1), 43-56.
- Haszprunar, G. (1988). On the origin and evolution of the major gastropod groups, with special reference to the streptoneura. *J. Moll. Stud.* **54**, 367-441.
- Hazes, B., Magnus, K. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K. H. & Hol, W. G. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* **2**(4), 597-619.
- Helling, F., Shang, A., Calves, M., Zhang, S., Ren, S., Yu, R. K., Oettgen, H. F. & Livingston, P. O. (1994). GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res.* **54**(1), 197-203.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Downing, K. H., Lepault, J. & Zemlin, F. (1986). Structure of purple membrane from halobacterium Halobrium: recording,
-

- measurement and evaluation of electron microscopy at 3.5 Å resolution. *Ultramicroscopy* **19**, 147-178.
- Hersh, E. M. & Dyre, S. E. (1974). Cells binding the antigene keyhole limpet hemocyanin in the peripheral blood and in the lymphocyte cultures of non-immune and immunized human subjects. *Clin. Exp. Immunol.* **17**, 299-309.
- Herskovits, T. T. (1988). Mini review: Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 597-611.
- Hickmann, C. S. (1988). Archaeogastropod evolution, phylogeny and systematics: a reevaluation. *Malacol. Rev. suppl.* **4**, 17-34.
- Huber, M., Hintermann, G. & Lerch, K. (1985). Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry* **24**(22), 6038-44.
- Idakieva, K., Severov, S., Svendsen, I., Genov, N., Stoeva, S., Beltramini, M., Tognon, G., Di Muro, P. & Salvato, B. (1993). Structural properties of *Rapana thomasiana grosse* hemocyanin: isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of two different dissociation products. *Comp. Biochem. Physiol.* **106 B**, 53-59.
- Jaenicke, E., Decker, H., Gebauer, W., Markl, J. & Burmester, T. (1999). Identification, structure, and properties of hemocyanins from Diplopod myriapoda. *J Biol Chem* **274**(41), 29071-4.
- Jander, G. & Blasius, E. (1988). Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. 12., neubearbeitete Auflage edit, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Jurincic, C. D., Engelmann, U., Gasch, J. & Klippel, K. F. (1988). Immunotherapy in bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin - a randomized study. *J. Urol.* **139**, 723-726.
- Jurincic-Winkler, C., Klippel, K. F., Beuth, J. & Markl, J. (1995a). Der Stellenwert von KLH in der Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. *Onkologie* **18**(Sonderheft 1), 41-50.
- Jurincic-Winkler, C., Klippel, K. F., Beuth, J. & Markl, J. (1995b). Value of keyhole limpet hemocyanin in prevention of superficial bladder cancer recurrence. *Onkologie* **18**(Supplement), 41-50.
- Keller, H. (1998). Zur Molekularstruktur und Biosynthese des Hämocyanins der marinen Schnecke *Haliotis tuberculata*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität.

-
- Keller, H., Lieb, B., Altenhain, B., Gebauer, D., Richter, S., Stricker, S. & Markl, J. (1999). Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1) Organization of the ~400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g, and h. *Eur. J. Biochem.* **264**, 27-38.
- Kleinknecht, S., Bichler, K. H. & Strohmaier, W. L. (1992a). Immune modulating effects of low doses of cyclophosphamide and keyhole limpet hemocyanin on peripheral blood immune parameters in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol. Int.* **48**, 1-8.
- Kleinknecht, S., Bichler, K. H. & Strohmaier, W. L. (1992b). Postoperative long-term course of peripheral blood immune parameters and immunomodulating effects of keyhole limpet hemocyanin in patients with nonmetastatic renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* **21**, 315-322.
- Kurtz, K. M. (1992). Molecular structure/function relationships of hemerythrins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**, 151-171.
- Lambert, O., Boisset, N., Penczek, P., Lamy, J., Taveau, J.-C., Frank, J. & Lamy, J. N. (1994a). Quaternary structure of *Octopus vulgaris* hemocyanin: three-dimensional reconstruction from frozen-hydrated specimens and intramolecular location of functional units Ove and Ovb. *J. Mol. Biol.* **238**, 75-87.
- Lambert, O., Boisset, N., Taveau, J. C. & Lamy, J. N. (1994b). Three dimensional reconstruction from a frozen hydrated specimen of the chiton *Lepidochiton* sp hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **244**(5), 640-647.
- Lambert, O., Boisset, N., Taveau, J.-Ch., Préaux, G., and Lamy, J. N. (1995). Three-dimensional Reconstruction Of The α_D And β_C -Hemocyanins Of *Helix pomatia* From Frozen-Hydrated Specimens. *J. Mol. Biol.* **248**, 431-448.
- Lambert, O., Boisset, N., Taveau, J. C. & Lamy, J. N. (1995a). Three dimensional reconstruction of *Sepia officinalis* hemocyanin from frozen hydrated specimens. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**(2), 950-959.
- Lambert, O., Taveau, J. C., Boisset, N. & Lamy, J. N. (1995b). Three dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen hydrated specimens. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**(1), 231-243.
- Lamm, D. L., De Haven, J. J., Riggs, D. R., Delgra, C. & Burrell, R. (1993). Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of murine bladder cancer. *Urol. Res.* **21**(1), 33-37.
-

-
- Lamy, J., Lamy, J. N., Leclerc, M. & Compin, S. (1986). Preliminary results on the structure of *Octopus dofleini* hemocyanin. In *Invertebrate Oxygen Carriers*. (Lenzen, B., ed.), pp. 231-234. Springer, Heidelberg.
- Lamy, J., Leclerc, J., Sizaret, P.-Y., Lamy, J., Miller, J., McParland & Van Holde, K. E. (1987). *Octopus dofleini* hemocyanin: structure of the seven-domain polypeptide chain. *Biochemistry* **26**, 3509-3518.
- Lamy, J., Giелens, C., Lambert, O., Taveau, J. C., Motta, G., Loncke, P., De Geest, N., Preaux, G. & Lamy, J. (1993). Further approaches to the quaternary structure of *Octopus* hemocyanin: a model based on immunoelectron microscopy and image processing. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 17-29.
- Lamy, J., You, V., Taveau, J.-C., Boisset, N. & Lamy, J. N. (1998). Intramolecular Localization of the Functional Units of *Sepia officinalis* Hemocyanin by Immunoelectron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **284**, 1051-1074.
- Lang, W. H. (1988). cDNA cloning of the *Octopus dofleini* hemocyanin: sequence of the carboxyl-terminal domain. *Biochemistry* **27**(19), 7276-82 issn: 0006-2960.
- Lang, W. H. & van Holde, K. E. (1990). cDNA cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin. In *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Preaux, G. & Lontie, R., eds.), pp. 135-140. Leuven University Press, Leuven.
- Lang, W. H. & van Holde, K. E. (1991). Cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin cDNA: derived sequences of functional units Ode and Odf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**(1), 244-8 issn: 0027-8424.
- Lebart, L., Morineau, A. & Tabard, N. (1977). *Techniques de la description statistique*, Dunod, Paris.
- Lebart, L., Morineau, A. & Warwick, K. (1984). *Multivariate descriptive statistical analysis* (Wiley, Ed.), New York.
- Lebel, J. M., Giard, W., Favrel, P. & Boucaud-Camou, E. (1996). Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell* **86**(1), 67-72.
- Leighton, D. L. (1989). Abalone (genus *Haliotis*) mariculture on the North American Pacific coast. *Fish. Bull. U.S.* **87**, 689-702.
- Lieb, B., Altenhein, B., Lehnert, R., Gebauer, W. & Markl, J. (1999). Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h. *Eur J Biochem* **265**(1), 134-44.
-

-
- Lieb, B., Altenhain, B. & Markl, J. (2000). The Sequence of a Gastropod Hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J. Biol. Chem.* **275**(8), 5675-5681.
- Lindberg, D. R. (1992). Evolution, distribution and systematics of haliotidae. In *Abalone of the world: Biology, fisheries and culture* (Shepherd, S. A., Tegner, M. J. & Guzman del Proo, S. A., eds.), pp. chap. 6. Blackwell Scientific, Oxford.
- Linnaeus, C. (1740). *Systema naturae*. II edit.
- Lips, D., Gielen, C., Preaux, G. & Lontie, R. (1981). Evidence for two types of polypeptide chains in the hemocyanin of *Buccinum undatum*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **90 B**, 128.
- Lontie, R. (1983). Components, functional units and active sites of *Helix pomatia* hemocyanin. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982* (Wood, E. J., ed.), Vol. Supplement 1, pp. 109-120. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, London, New York.
- Maier, B., Rzepka, R. & Melchers, I. (1989). Frequencies and interactions of regulatory T cells. I. The balance between help and suppression regulates the primary immune response to keyhole limpet hemocyanin in vitro. *Immunobiology* **179**, 68-85.
- Mangum, C. P. (1983). Oxygen transport in the blood. In *The biology of Crustacea* (Mantel, L. H., ed.), Vol. 5, pp. 373-429. Academic Press, New York.
- Mangum, C. P. (1992). Physiological function of the hemerythrins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**, 173-192.
- Mangum, C. P., Miller, K. I., Scott, S. L., Van Holde, K. E. & Morse, M. P. (1987). Bivalve hemocyanins - structural, functional and phylogenetic relationships. *Biol. Bull.* **173**, 205-221.
- Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* **171**, 90-115.
- Markl, J. (1987). Der Immunmodulator Hämocyanin - ein multigener allosterischer Proteinkomplex. In *Welche Chancen hat die Tumorimmunologie heute?* (Klippel, K. E. & Harzmann, R., eds.), pp. 73-86. SMV, München.
- Markl, J. (1996). Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Chemie In Unserer Zeit* **30**(1), 6-18.
- Markl, J. & Decker, H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In *Blood and Tissue Oxygen Carriers* (Mangum, C. P., ed.), Vol. 13, pp. 325-376. 16 vols. Springer Verlag, Berlin.
-

-
- Markl, J., Wegener-Strake, A. & Savel-Niemann, A. (1990). Neues zur Struktur des Keyhole-Limpet-Hämocyanins (KLH). In *Immucothel Workshop* (Kurth, K. H., ed.), pp. 7-24. Walter Druck, Stuttgart.
- Markl, J., Savel-Niemann, A., Wegener-Strake, A., Süling, M., Schneider, A., Gebauer, W. & Harris, R. (1991). The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften* **78**, 512-514.
- Marquand, E. D. (1903). Imperforate *Haliotis tuberculata*. *J. Conch.* **11**, 48.
- Meissner, U. (1998). Computergestützte 3D-Rekonstruktion (25 Å) der Quartärstruktur des Molluskenhämocyanins KLH2 aus EM-Bildern. Diplomarbeit, J. Gutenberg-Universität, Mainz.
- Meissner, U., Dube, P., Harris, J. R., Stark, H. & Markl, J. (2000). Structure of a Molluscan Hemocyanin Didecamer (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) at 12 Å Resolution by Cryoelectron Microscopy. *J. Mol. Biol.*, in Press.
- Mellema, J. E. & Klug, A. (1972). Quaternary structure of gastropod hemocyanin. *Nature* **239**, 145-150.
- Miller, K. I. & Van Holde, K. E. (1982). The structure of *Octopus dofleini* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* **73 B**, 1013-1018.
- Miller, K. I., Schabtach, E. & Van Holde, K. E. (1990). Arrangement of subunits and domains within the *Octopus dofleini* hemocyanin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1496-1500.
- Miller, K. I., Cuff, M. E., Lang, W. F., Varga-Weisz, P., Field, K. G. & Van Holde, K. E. (1998). Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* **278**, 827-842.
- Morse, M. P., Meyhöfer, E., Otto, J. J. & Kuzirian, A. M. (1986). Hemocyanin - respiratory protein in bivalve molluscs. *Science* **231**, 1302-1304.
- Mouche, F., Boisset, N., Lamy, N., Zal, F. & Lamy, J. N. (1999). Structural Comparison of Cephalopod Hemocyanins: Phylogenetic Significance. *J. Struct. Biol.* **127**, 199-212.
- Nakahara, A., Suzuki, S. & Kino, J. (1983). Tyrosinase activity of squid hemocyanin. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982* (Wood, E. J., ed.), Vol. Supplement 1, pp. 319-322. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, London, New York.
- Olson, C. A., Chute, R. & Chadlawada, N. R. (1974). Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J. Urol.* **111**, 173-176.
-



-
- Orlova, E. V., Dube, P., Harris, J. R., Beckmann, E., Zemlin, F., Markl, J. & Van Heel, M. (1997). Structure of Keyhole Limpet Hemocyanin Type 1 (KLH) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstruction. *J. Mol. Biol.* **271**, 417-437.
- Owen, B., Disalvo, L., Eberte, E. & Fonck, E. (1984). Culture of the California red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson (1822) in Chile. *Veliger* **27**, 101-105.
- Palfreyman, J.-W., Aitcheson, T. C. & Taylor, P. (1984). Guidelines for the production of polypeptides as immunogens. *J. Immunol. Meth.* **75**, 383-393.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* **13**, 658-660.
- Peitsch, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274-279.
- Pilson, M. E. Q. (1965). Variation of hemocyanin concentration in the blood of four species of *Haliotis*. *Biol. Bull.* **128**, 459-472.
- Pilz, I., Walder, K. & Siezen, R. (1974). Small angle X-ray scattering studies of 1/10 size and 1/20 size molecules of *Helix pomatia* α -hemocyanin. *Z. Naturforsch.* **29 C**, 116-121.
- Preaux, G., Gielens, C., Verschueren, L. J. & Lontie, R. (1981). Immunological comparison of the hemocyanins of *Helix pomatia* and of the proteolytic fragments of the β_C component. In *Invertebrate Oxygen Binding Proteins*. (Lamy, J. & Lamy, J., eds.), pp. 197-205. Dekker, New York.
- Preaux, G., Gielens, C. & Lontie, R. (1983). Immunological comparison of the functional units of β_C -haemocyanin of *Helix pomatia*. In *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins. Life Chem. Rep.* (Wood, E. J., ed.), Vol. Suppl. 1., pp. 125-128.
- Preaux, G., Gielens, C., Witters, R. & Lontie, R. (1988). The structure of molluscan hemocyanins and their homology with tyrosinases. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **97**(11-12), 1037-1044.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-437.
- Ryan, M., Terwilliger, N. B., Terwilliger, R. C. & Schabtach, E. (1985). Chiton hemocyanin structure. *Comp. Biochem. Physiol.* **80 B**, 647-656.
- Salvato, B. & Beltrami, M. (1990). Hemocyanin molecular architecture: structure and reactivity of the binuclear copper active site. *Life Chem. Rep.* **8**, 1-47.
-

-
- Saxton, W. O. & Frank, J. (1977). Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation. *Ultramicroscopy* **2**, 219-227.
- Schatz, M. (1992). Invariante Klassifizierung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Makromolekülen. Deutsche Hochschulschriften, 454, Verlag Hänsel-Hohenhauser, Egelsbach, Köln, New York.
- Schatz, M., Orlova, E., Dube, P., Stark, H., Zemlin, F. & Van Heel, M. (1997). Angular reconstruction in 3D electron microscopy: Practical and technical aspects. *IMAGIC Datenblatt*.
- Sheehy, D. & Vik, S. (1981). Aquaculture: developments in East Asia. *Water Spectrum* **Fall (1981)**, 26-37.
- Siezen, R. J. & Van Bruggen, E. F. J. (1974). Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia* α -hemocyanin: quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **90**, 77-89.
- Slattery, M. (1987). Settlement and metamorphosis of red abalone (*Haliotis rufescens*) larvae: A critical examination of mucus, diatoms, and gamma-aminobutyric acid (GABA) as inductive substrates. MS Thesis, San Jose State University.
- Smith, E. A. (1888). Abnormal growth in a species of *Haliotis*. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **6**(1), 419.
- Söhngen, S. M., Stahmann, A., Harris, J. R., Müller, S. A., Engel, A. & Markl, J. (1997). Mass determination, subunit organisation and control of oligomerisation states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Eur. J. Biochem* **248**, 602-614.
- Stark, H. (1996). Kryo-Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchung an 70S Ribosomen in funktionellen Zuständen der Proteinbiosynthese. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Stephenson, T. A. (1924). Notes on *Haliotis tuberculata*. *Marine Biol. Assoc., Plymouth* **13 No. 2**, 480-495.
- Stoeva, S., Rachev, R., Severov, S., Voelter, W. & Genov, N. (1995). Carbohydrate content and monosaccharide composition of *Rapana thomasi* (Gastropoda) hemocyanin and its structural subunits. Comparison with gastropodan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* **B110**(No. 4), 761-765.
- Stoeva, S., Idakieva, K., Rachev, R., Voelter, W. & Genov, N. (1997a). Amino-terminal oxygen-binding functional unit of the *Rapana thomasi* (gastropod) hemocyanin: carbohydrate content, Monosaccharide composition.
-

- on and amino acid sequence studies. *Comp. Biochem. Physiol.* **B117**(No. 1), 101-107.
- Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N. & Dolashka, P. (1997b). Domain structure of the *Rapana thomasiana* (gastropod) hemocyanin. *GIT Special "Prof. Bayer" 1997*, 75-79.
- Stoeva, S., Schütz, J., Gebauer, W., Hundsdörfer, T., Manz, C., Markl, J. & Voelter, W. (1999). Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochim. Biophys. Acta* **1435**, 94-109.
- Swammerdam, J. (1669). *Historia insectorum generalis ofte algemene verhandeling van de bloedeloose dierkens. Uetrecht: van Deunen.*
- Tegner, M. J. & Butler, R. (1985). The survival and mortality of seeded and native red abalones, *Haliotis rufescens*, on the Palos Verdes Peninsula. *Calif. Fish. Game* **71**, 150-163.
- Terwilliger, N. B. (1992). Molecular structure of the extracellular heme proteins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**, 193-229.
- Terwilliger, N. B., Terwilliger, R. C., Meyhofer, E. & Morse, M. P. (1988). Bivalve hemocyanins -- a comparison with other molluscan hemocyanins. *Comp Biochem Physiol B* **89**(1), 189-95.
- Tillier, S., Masselot, M., Philippe, H. & Tillier, A. (1992). Phylogenie moleculaire des Gastropoda (Mollusca) fondee sur la sequenage partiel de l'ARN ribosomique 28S. *C. R. Acad. Sci. III* **314**, 79-85.
- Top, A., Gielens, C., Witters, R., Van Beeumen, J. & Preaux, G. (1990). Partial amino-acid sequence and location of the carbohydrate chain in functional unit f of *Sepia officinalis* hemocyanin. In *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Preaux, G. & Lontie, R., eds.), pp. 119-123. Leuven University Press, Leuven.
- Totzauer, R. J. (1905). Nieren- und Gonadenverhältnisse von *Haliotis*. *Jena. Z. Naturw.* **39**, 525-550.
- Trapido-Rosenthal, H. G. & Morse, D. E. (1986). Regulation of receptor-mediated settlement and metamorphosis in larvae of a gastropod mollusc (*Haliotis rufescens*). *Bull. Mar. Sci.* **39**, 383-392.
- Uglow, R. F. (1969a). Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. I. Studies on adult *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **30**, 1083-1090.

-
- Uglow, R. F. (1969b). Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. II. The effect of imposed feeding on *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **31**, 957-967.
- Vacquier, V. D. & Youn-Ho, L. (1993). Abalone sperm lysin: Unusual mode of evolution of a gamete recognition protein. *Zygote* **1**, 1-16.
- Van Breemen, J. F. L., Schuurhuis, G. J. & Van Bruggen, E. F. J. (1977). Morphology of *Helix pomatia* hemocyanin and its subunits. In *Structure and Function of Haemocyanin*. (Bannister, J. V., ed.), pp. 122-127. Springer, Berlin.
- Van Bruggen, E. F. J., Wiebenga, E. H. & Gruber, M. (1962a). Structure and properties of hemocyanins. II. Electron micrographs of the hemocyanin of *Sepia officinalis*, *Octopus vulgaris* and *Cancer pagurus*. *J. Mol. Biol.* **4**, 8-9.
- Van Bruggen, E. F. J., Wiebenga, E. H. & Gruber, M. (1962b). Structure and properties of hemocyanins. I. Electron micrographs of hemocyanin and apohemocyanin from *Helix pomatia* at different pH values. *J. Mol. Biol.* **4**, 1-7.
- Van Bruggen, E. F. J., Schutter, W. G., Van Breemen, J. F., Bijlholt, M. M. C. & Wichertjes, T. (1981). Arthropodan and molluscan hemocyanins. In *Electron microscopy of proteins*. (Harris, J. R., ed.), pp. 2-38. Academic Press New York, New York.
- Van den Biggelaar, J. A. M. (1993). Cleavage pattern in embryos of *Haliotis tuberculata* (Archaeogastropoda) and gastropod phylogeny. *J. Morphol.* **216**, 121-139.
- Van Heel, M. (1987). Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D-reconstruction. *Ultramicroscopy* **21**, 111-124.
- Van Heel, M. & Frank, J. (1981). Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* **6**, 187-194.
- Van Heel, M., Winkler, H., Orlova, E., and Schatz, M. (1992). Structure Analysis Of ICE-Embedded Single Particles. *Scanning Microsc. Suppl.* **6**, 23-42.
- Van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R. & Schatz, M. (1996). A New Generation Of The IMAGIC Image Processing System. *J. Struct. Biol.* **116**, 17-24.
- Van Holde, K. E. & Miller, K. I. (1982). Haemocyanins. *Q. Rev. Biophys.* **15**, 1-129.
- Van Holde, K. E. & Miller, K. I. (1995). Hemocyanins. *Adv Protein Chem*(47), 1-81
issn: 0065-3233.
-

-
- Van Holde, K. E., Miller, K. I. & Lang, W. H. (1992). Molluscan hemocyanins: structure and function. In *Blood and Tissue Oxygen Carriers* (Mangum, C. P., ed.), Vol. 13, pp. 257-300. 16 vols. Springer Verlag, Berlin.
- Van Kuik, J. A., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. G. (1990). Carbohydrate analysis of hemocyanins. In *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Preaux, G. & Lontie, R., eds.), pp. 157-163. Leuven University Press, Leuven.
- Verschuieren, L. J., De Sadeleer, J., Gielens, C. & Lontie, R. (1981). Plasminolysis of the two polypeptide chains of α -hemocyanin of *Helix pomatia*. In *Invertebrate oxygen-binding proteins*. (Lamy, J. L., J., ed.), pp. 285-293. Marcel Dekker, New York.
- Vinogradov, S. N. (1985). The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocrucorins). *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 1-15.
- Voet, D. (1995). Biochemistry. Seceond Edition edit, Wiley & Son, New York.
- Walz, T. & Grigorieff, N. (1998). Electron Crystallography of Two-Dimensional Crystas of Membrane Proteins. *J. Struct. Biol.* **121**, 142-161.
- Ward, K. M. (1981). Helper activity of T-Lymphocytes which have been stimulated by keyhole limpet hemocyanin in vitro. *Immunology* **43**, 111-116.
- Wichertjes, T., Gielens, C., Schutter, W. G., Preaux, G., Lontie, R. & Van Bruggen, E. F. J. (1986). The quaternary structure of *Sepia officinalis* hemocyanin. *Bi-ochim. Biophys. Acta* **872**, 183-194.
- Wichertjes, T., Gielens, C., Loncke, P., Preaux, G. & Van Bruggen, E. F. J. (1990). Comparative electron microscopy of the haemacyanins of the cephalopods *Sepla officinalis* and *Octopus vulgaris*. In *Invertebrate Dioxygen Carriers*. (Preaux, G. & Lontie, R., eds.), pp. 289-294. Leuven University Press Leuven, Leuven.
- Xin, X., Gielens, C., Witters, R. & Preaux, G. (1990). Amino-acid sequence of functional unit g from the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*. In *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Preaux, G. & Lontie, R., eds.), pp. 113-117. Leuven University Press, Leuven.
- Zatta, P. (1984). Zinc transport in the haemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *J. mar. Biol. Ass. UK* **64**, 801-807.
- Zemlin, F., Beckman, E. & van der Mast, K. (1996). A 200 kV electron microscope with Schottky field emitter and a helium cooled superconductive objective lens. *Ultramicroscopy* **63**, 227-238.
-

G Anhang

1 Fourier-Transformation

1.1 Herleitung der 1D-Fourier-Transformation

Die Fourier-Transformation (FT) ist eine Methode, die im Rahmen dieser Arbeit einen wesentlichen Stellenwert einnimmt. Eine funktionelle Rolle spielt die FT während des Abbildungsvorgangs im Elektronenmikroskop: Die Beugungsbilder, die als Zwischenbilder im Strahlengang des Elektronenmikroskops entstehen, sind Fouriertransformierte des Bildes. Zudem werden viele Operationen der Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion anhand der Fouriertransformierten der untersuchten Bilder vorgenommen (Champeney, 1973; Schatz, 1992). Die Bedeutung der Fourier-Transformation in der Bildverarbeitung ist vor allem darum so wichtig, weil mit geeigneten Algorithmen im Computer mit Paaren Fouriertransformierter, wie in Gl. 10 und Gl. 12, wesentlich schneller gerechnet werden kann, als mit den Sinus- und Kosinus-Termen in Gl. 5. Es müssen mathematisch vier Axiome erfüllt sein, damit eine Fourier-Transformation möglich ist: Verschiebbarkeit der Funktion, eine Unabhängigkeit von der Reihenfolge der Operationen ($A \circ (B \circ C) = (A \circ B) \circ C$), es muss ein neutrales Element geben und es muss ein inverses Element vorhanden sein. Dies gilt z.B. für Funktionen in denen Kosinus und Sinus miteinander verbunden sind, wenn gilt $\theta \in [-\pi, \pi]$, . Diese nennt man Fourier-Reihen:

$$f(\theta) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + a'_n \sin(n\theta) \quad (\text{Gl. 5})$$

n = ganze Zahl $[0, \infty]$,

a_n, a'_n legen die Eigenschaften der Funktion fest, indem sie Real- und der Imaginärteil bestimmen. In der Elektronenmikroskopie sind sie die Gewichtungsfaktoren der Raumfrequenzen.

Diese lassen sich auch als komplexe Exponentialterme ausdrücken:

$$f(\theta) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{in\theta} \quad (\text{Gl. 6})$$

$n = \text{ganze Zahl } [-\infty, \infty]$

Zur Berechnung von b_n in Gl. 6 kann man sich folgendes Gleichungssystem zu Hilfe nehmen:

$$\begin{aligned} \int_{-\pi}^{\pi} e^{in\theta} e^{-im\theta} d\theta &= \\ \int_{-\pi}^{\pi} e^{i(n-m)\theta} d\theta &= \\ [i(n-m)]^{-1} (e^{i(n-m)\pi} - e^{-i(n-m)\pi}) &= \\ \left[\frac{2}{n-m} \right] \sin(n-m)\pi &= \end{aligned} \quad (\text{Gl. 7})$$

mit den möglichen Lösungen:
$$\begin{aligned} 0 & (n \neq m) \\ 2\pi & (n = m) \end{aligned}$$

Wenn also die Lösung von Gl. 7 2π ist, also $n = m$ ist, so gilt:

$$b_m = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} d\theta \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{in\theta} e^{-im\theta} \quad (\text{Gl. 8})$$

Wenn $\theta = \pi$ ist, dann kann man eine neuen Variablen einführen. Es gilt: $x = L/2$. Dadurch schreibt sich der Term aus Gl. 8 unter der Bedingung, dass $dx = (L/2\pi)d\theta$ ist als:

$$\begin{aligned} f(x) &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{2\pi i n x / L} \\ b_n &= \frac{1}{L} \int_{-1,2}^{1,2} e^{-2\pi i n x / L} f(x) dx \end{aligned} \quad (\text{Gl. 9})$$

Zur Durchführung einer Fourier-Transformation in einer Dimension werden in der ursprünglichen Funktion $f(x)$ die beschreibenden Koeffizienten b_n durch eine Funktion und die Summierung durch ein Integral ersetzt. Eine neue Variable mit $S = 2\pi n/L$, sowie eine neue Funktion $g(S) = Lb_n$ werden definiert. So wird der Ausdruck für b_n transformiert und es ergibt sich:

$$g(S) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i S x} f(x) dx \quad (\text{Gl. 10})$$

Bei $L \rightarrow \infty$ gilt:

$$f(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} [g(S)/L] e^{2\pi i S x} \quad (\text{Gl. 11})$$

Ausgehend von der Annahme, dass $2\pi/L$ in der Summe in Gl. 11 dS in einem Integral entspricht, führt zu:

$$f(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} g(S) e^{2\pi i S x} dS \quad (\text{Gl. 12})$$

Gl. 10 und Gl. 12 beschreiben ein Paar Fouriertransformierter, wobei, wenn x eine Strecke ist, S eine reziproke Strecke darstellt.

1.2 Beziehung zwischen Fourierraum und Bildraum

Es besteht eine äquivalente Beziehung zwischen dem Fourierraum und Bildraum. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zustände des Bildraums und der Fouriertransformierten dieses Raums verwendet: Im Realraum haben wir zunächst die EM-Aufnahmen, welche eine 2D-Projektion des 3D-Objektes darstellen. Zur Bestimmung der Winkel werden dann Sinogramme erstellt, welche wiederum 1D-Projektionen des 2D-Objektes darstellen. Die 3D-Rekonstruktion ergibt dann eine 3D-Dichteverteilung des Objektes, welche das 3D-Objekt selbst beschreibt. Im Fourierraum lässt sich zu jeder dieser Darstellungen ein Äquivalent beschreiben. So erhält man aus der 1dimensionalen Fourier-Transformation (FT-1D) der Sinogramme die „*common line*“, welche gleichzeitig durch eine Extraktion des 2D-Schnittes durch die 3D-Fouriertransformation erreicht werden kann. Der 2D-Schnitt durch die 3D-Fouriertransformation wiederum ist eine FT-2D der 2D-Projektion des 3D-Objektes und gleichzeitig eine Extraktion aus der FT-3D Projektion des 3D-Objektes.

2 Die Kontrastübertragungsfunktion (CTF)

2.1 Kontrastentstehung

Der Gegensatz von Hell und Dunkel in einem Bild wird als Kontrast bezeichnet. In der Elektronenmikroskopie entsteht Kontrast entweder durch eine Phasenverschiebung oder durch die Änderung der Amplitude eintreffender Elektronenwellen. Damit setzt sich der Kontrast in elektronenmikroskopischen Aufnahmen immer aus Phasen- und Amplitudenkontrast zusammen. Werden allerdings sehr dünne Objekte aufgenommen, so wird der Kontrast fast ausschließlich durch den Phasenkontrast bestimmt, und der Amplitudenkontrast tritt in den Hintergrund. Mathematisch lässt sich der Kontrast K in Abhängigkeit der größten Intensität $I_{\max}$ und der kleinsten Intensität $I_{\min}$ wie folgt beschreiben:

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (\text{Gl. 13})$$

Das innere Potential eines Objektes ist der vorübergehende Energiegewinn, den Elektronen beim Eindringen in ein Objekt dazugewinnen und beim Verlassen des Objektes wieder abgeben. Wenn eine ebene Elektronenwellenfront in ein ebenes Objekt eindringt, so wird die Wellenfront durch Phasenverschiebung δ , die auf den verschiedenen inneren Potentialen beruht, verzerrt. Bei biologischen Objekten ist die Phasenverschiebung i.d.R. viel kleiner als die Wellenlänge der Elektronen ($\delta \ll \lambda$). Im Elektronenmikroskop wird der Phasenkontrast anhand der Phasendifferenz durch die Wellenlängen der Elektronen einerseits und durch Geräteparameter andererseits beeinflusst:

$$\delta = \left(\frac{C_{\delta} \times \sigma^4}{\lambda} + \frac{2 \times \Delta z \times \sigma^2}{\lambda} \right) \quad (\text{Gl. 14})$$

Hierbei beschreibt δ die Phasenverschiebung in Abhängigkeit der Elektronenwellenlänge λ , des Öffnungsfehlers C_{δ} (oder sphärische Abberation), des Streuwinkels σ und der Defokussierung Δz . Anschaulich lässt sich das aus Abb. 47 entnehmen.

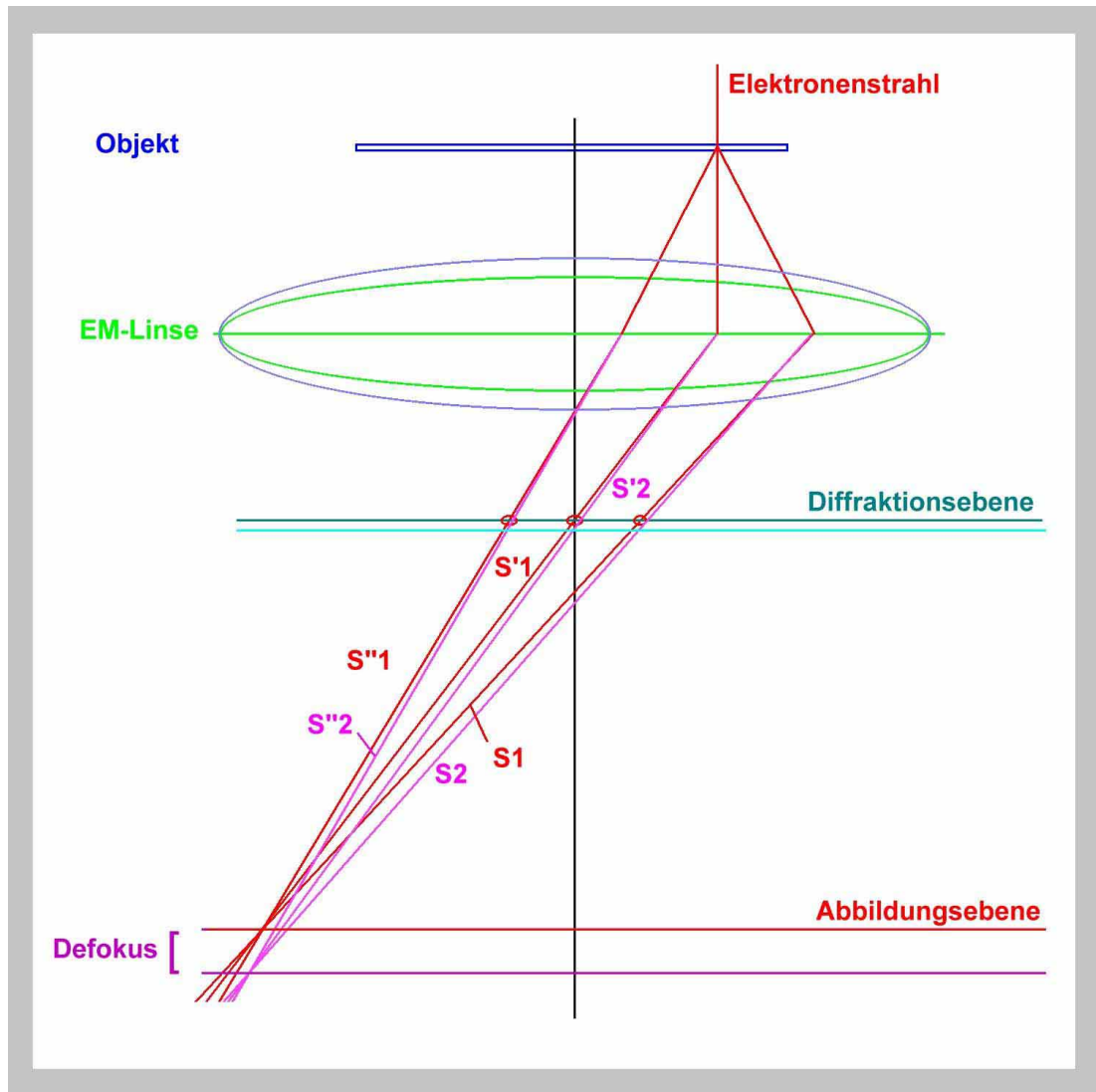


Abb. 47: Entstehung von Interferenzen durch verschiedene Lauflängen (Phasenverschiebung) des Lichtes bei verschiedenen Defokussierungen:

Durch Veränderung der Linse lässt sich die Fokusebene verändern. S_1 (S'_1 , S''_1) ist die Strecke von der Ablenkung des Strahls in der Linsenspule zu dem Punkt in der Abbildungsebene bei genauer Fokussierung. S_2 (S'_2 , S''_2) ist die entsprechende Strecke bei einer Defokussierung. Dadurch dass sich die Strecke zwischen der Ablenkung des Strahls in der Linsenspule und dem Punkt in der Abbildungsebene, bei unterschiedlichen Defokussstrecken ändert, variiert auch der Zustand der Phase (bei gleicher Wellenlänge) beim Abbilden des Objektes.

2.2 Phasenkontrastübertragungsfunktion

Über die Fourier-Transformation (s.o.) lassen sich auch die kompliziertesten Strukturen als Summe von Summen oder Integralen mehrerer reiner Sinus- und Kosinusgitter darstellen (s.o., Fourier-Transformation). Ein Bild setzt sich aus unterschiedlich stark repräsentierten Raumfrequenzanteilen zusammen. Der Streuwinkel σ aus Gl. 14 ist den Raumfrequenzen proportional, so dass auch die Phasenverschiebung raumfrequenzabhängig ist.

Aufgrund der Phasenverschiebung kommt es zu destruktiven und konstruktiven Interferenzen. Diese führen im Bild zu Kontrastumkehrungen. Diese werden durch eine Funktion des Öffnungsfehlers der zu übertragenden Raumfrequenz und der Defokussierung beschrieben. Am Siemensstern kann man die Phasenkontrastübertragungsfunktion (PCTF) sichtbar machen (siehe Abb. 48). Die Raumfrequenzabhängigkeit der Phasenverschiebung kann durch die PCTF mathematisch beschrieben werden:

$$PCTF = \sin 2\pi \left(\frac{R^4}{4} - \frac{\Delta \times R^2}{2} \right) \quad (\text{Gl. 15})$$

Die Werte R und Δ für Gl. 15 sind normiert und beinhalten bereits den Öffnungsfehler C_δ und die Elektronenwellenlänge λ :

$$\Delta = \frac{\Delta z}{\sqrt{C_\delta \lambda}} \quad (\text{Gl. 16})$$

und

$$R = r \cdot \sqrt[4]{C_\delta \lambda^3} \quad (\text{Gl. 17})$$

Ein Beispiel für die PCTF bei starken Defokusunterschieden lässt sich anhand der Abb. 48 zeigen. Dargestellt ist hier die Kontrastübertragungsfunktion bei verschiedenen Defokuswerten und ihre Auswirkung auf die Aufnahme eines Siemenssterns. Der berechnete Siemensstern (Abb. 48c) wird durch die PCTF abhängig vom Defo-

kus verändert abgebildet: Als Beispiel hier ein Defokus von $\sqrt{C_o\lambda}$ (Abb. 48a, d) und $10 \times \sqrt{C_o\lambda}$ (Abb. 48b, e).

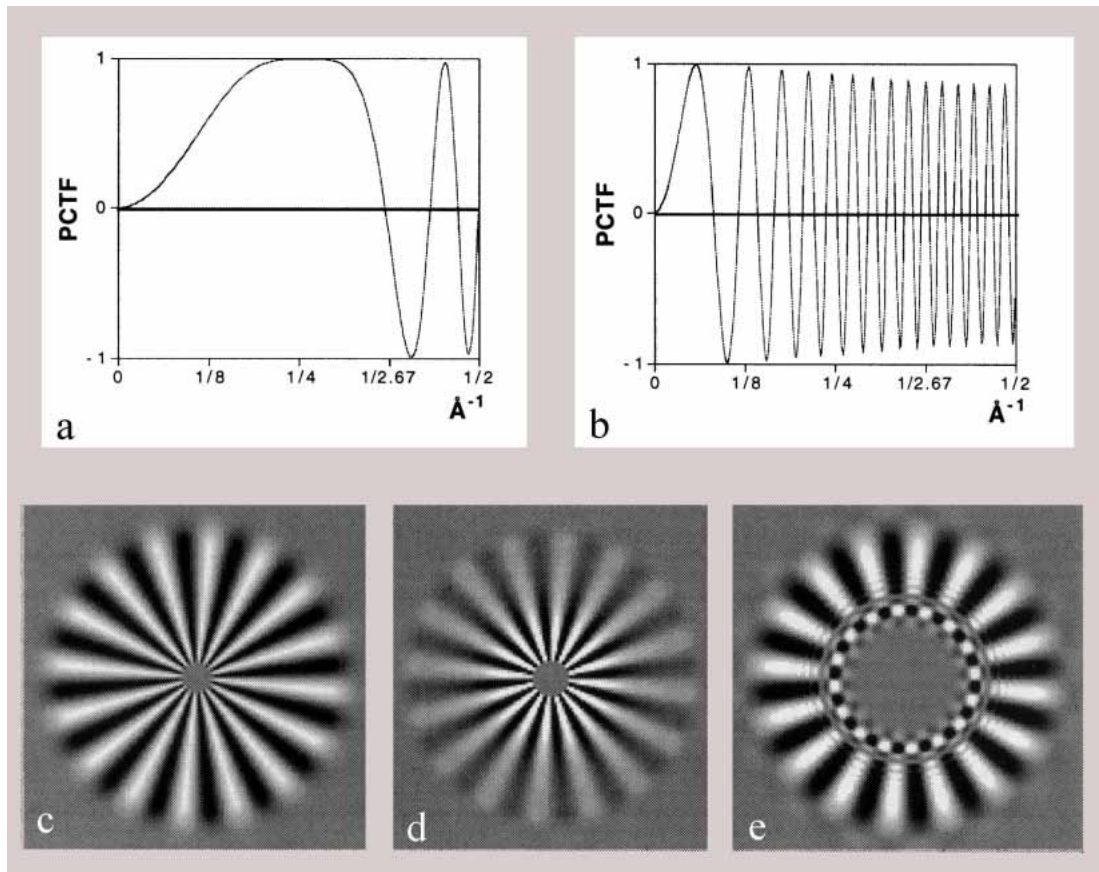


Abb. 48: PCTF von SOPHIE (*Superconducting Objective in a Philips Electron microscope*, (Zemlin *et al.*, 1996)) bei verschiedenen Defokuswerten (a, b) und deren Einfluss auf die Abbildung eines Objektes (c, d, e nach (Stark, 1996))

2.3 Abhängigkeit der CTF vom Fokus

Die CTF kann bei biologischen Objekten in Näherung der PCTF gleichgesetzt werden. Durch die Wahl des Defokus kann im Voraus bestimmt werden, mit welcher CTF eine Objektstruktur in das Bild übertragen wird. Bei Bildern, die nah am Fokus aufgenommen werden, ist der positive Übertragungsbereich der PCTF eines Elektronenmikroskops sehr groß, was zur Folge hat, dass der erste Nulldurchgang der

Funktion zu höheren Ortsfrequenzen hin verschoben ist. Bei biologischen Objekten wird der Kontrast, der ohnehin schon sehr gering ist, weil diese sehr groß sind, in der Nähe des Fokus minimal.

Um die Objekte nachher überhaupt vom Hintergrund abzuheben, muss von vornherein in einem relativ starken Defokus gearbeitet werden. Projiziert man die CTF in den positiven Bereich der Kurve, indem man die Absolutwerte nimmt, so erhält man eine Kurve, die nur noch von Nullstellen unterbrochen ist.

Nimm man nun Bilder mit verschiedenen Defokuswerten auf, so ergeben sich verschiedene CTF mit unterschiedlichen Nullstellen. Durch Summierung der verschiedenen CTF zu einer resultierenden Funktion lassen sich somit die ursprünglichen Nulldurchgänge überlagern, und die resultierende Kurve kann Ortsfrequenzen bis zu einer wesentlich höheren Frequenz auflösen.

Lebenslauf

Name: Ulrich Meißner
Geburtsdatum: 3.3.1969
Geburtsort: Mainz
Familienstand: verheiratet, eine Tochter
Nationalität: deutsch
Adresse: Brunnenberg 8
 65307 Bad Schwalbach



-
- 1979 - 1984** Gesamtschule, gymnasialer Zweig, Bad Schwalbach
1984 - 1985 Gerhart Hauptmann-Gymnasium, Wiesbaden
1985 - 1988 Oberstufengymnasium West, Wiesbaden
1988 **Abitur**
- Jul-Okt **1988** **Industriepraktikum:** Schott Glaswerke, Mainz
Glasaufschlüsse, anorganische Analytik, AAS
- 1988 - 1989** **Grundwehrdienst:** 5. Panzerdivision (Stab)
- 1989 - 1994** **Studium des Ingenieurwesens Fachrichtung Chemie** (Diplom)
 an der Fachhochschule Fresenius, Wiesbaden
1994 Diplomarbeit am Bundesgesundheitsamt:
„Untersuchungen zur Eisenaufnahme durch Bakterien, insbesondere durch Salmonellen aus Polycarboxylaten“
Diplom „Dipl.-Ing (FH)“
- Jul-Okt **1990** **Industriepraktikum:** Graeger-Sekt, Hochheim
Weinanalytik, qualitative und quantitative Untersuchung von organischen und anorganischen Weinhaltstoffen
-

-
- Jun-Sep **1992** **Wissenschaftliche Arbeit:** Institut Fresenius/Universität Dresden, Dresden
Umweltanalytik, Untersuchung von Elbesickerwasser und Uferfiltraten mittels GC-MS, dabei: Einrichtung einer SPE-GC-MS-Anlage
- Sep-Dez **1993** **Studienarbeit:** Institut für Meereskunde, Universität Kiel
Meeresbotanische Planktonuntersuchungen im Bezug auf Eisenmetabolismus von Algen / AAS, ICP, Biotests, Autoradiographie
- Aug-Nov **1994** **Industriepraktikum:** VARTA Batterie AG, Kelkheim
Verfahrenstechnische Aufgabenstellungen, wie: Optimierung von Walzelektroden, Umrüstung von EDV-Anlagen
- 1994 - 1998** **Studium der Biologie** (Diplom)
 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- 1997** Diplomarbeit am Institut für Zoologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
„Computergestützte 3D-Rekonstruktion (25 Å) der Quartärstruktur des Mollusken- Hämocyanins KLH2 aus EM-Bildern“
- 1998** **Diplom** „Dipl.-Biol.“
- Aug-Sep **1997** **Hospitation:** Wolfson Laboratories bei Prof. Marin van Heel am Imperial College of Science, Technology and Medicine, London
Techniken zur 3D-Rekonstruktion von Proteinstrukturen
- Aug-Sep **1999** **CNE-Sommerschule:** Hochschule Zittau / Görlitz
Certificated Novell Engeneer-Workshop zu NetWare 5
- 1998 - 2000** Anfertigung der Dissertation am Institut für Zoologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
-