

Titel der Bachelorarbeit

Bachelorarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science

vorgelegt von
Markus Stabrin
geboren in Hamburg

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund
Geschrieben am Lehrstuhl für Experimentelle Physik I
Fakultät Physik
Technische Universität Dortmund
2014

1. Gutachter : Prof. Dr. Metin Tolan
2. Gutachter : Prof. Dr. Stefan Raunser

Datum des Einreichens der Arbeit: 09.07.2014

Kurzfassung

Hier folgt eine kurze Zusammenfassung des Inhalts und der Ergebnisse der Arbeit in deutscher Sprache.

Abstract

A brief summary of the content and the results of the thesis is given here in english.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen und Messvorbereitung	2
2.1 Hämocyanin	2
2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	3
2.3 Probenpräparation für die negative Kontrastierung	6
2.4 Kryopräparation	7
2.5 Einzelpartikelanalyse	7
3 Auswertungsmethodik	8
4 Ergebnisse	9
5 Zusammenfassung und Ausblick	10
Quellenverzeichnis	10

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskop	3
2.2	Beispiel der Kontrast Transfer Funktion	5

Tabellenverzeichnis

Kapitel 1

Einleitung

Hier folgt eine kurze Einleitung in die Thematik.

Hier folgt eine kurze Einleitung in die Thematik.

Die Einleitung muss kurz sein, damit die vorgegebene Gesamtlänge der Arbeit von 25 Seiten nicht überschritten wird. Die Beschränkung der Seitenzahl sollte man ernst nehmen, da überschreitung zu Abzügen in der Note führen kann. Selbstverständlich kann jede(r) für sich eine Version der Arbeit mit beliebig vielen und langen Anhängen und Methodenkapiteln erstellen. Das ist dann aber Privatvergnügen; die einzureichende und zu beurteilende Arbeit muss der Längenbeschränkung genügen. Um der Längenbeschränkung zu genügen, darf auch nicht an der Schriftgröße, dem Zeilenabstand oder dem Satzspiegel (bedruckte Fläche der Seite) manipuliert werden.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen und Messvorbereitung

2.1 Hämocyanin

(Abbildung)

Mit einer Größe von 3-8 MDa gehören Hämocyanine zu den größten bekannten Proteinen der Natur (Habe im Evolution of Hämocyanin structure gesucht, aber nichts über die Größe direkt gefunden). Diese transportieren sowohl den Sauerstoff von marinen lebenden wirbellosen Tieren als auch einiger Spinnenarten. Sie liegen ohne an Blutzellen gebunden zu sein direkt in der Hämolymphe dieser Tierarten vor. In den aktiven Zentren bindet der Sauerstoff an Kupfer und oxidiert diesen von Cu(I) zu Cu(II). Dieses emittiert, durch Kupfer-Peroxo-Komplexbildung mit dem Sauerstoff, Lichtquanten im sichtbaren Wellenlängenbereich von 480-420 nm. (<http://www.chemie-unterricht.de/dc2/komplexe/farbe.html>)(<http://archimed.uni-mainz.de/pub/2001/0109/diss.pdf>) Damit sind Lebewesen mit Hämocyaninen Blaublüter.

Hämocyanine besitzen mit einem Radius von ca. 35 nm und einer Höhe von ca. 15 nm eine hohlzylindrische Struktur (Quelle Paper von Julian). Sie bestehen aus 10 strukturell ähnlichen Untereinheiten, und sind somit Decamere (Oligomere bestehend aus 10 Untereinheiten) (Quelle Paper Julian). Jede Untereinheit besteht weiterhin aus sieben bis acht funktionellen Einheiten (FE), die artspezifisch sind. Das Hämocyanin des *Sepia Officinalis* (*gemeiner Tintenfisch*), das in dieser Arbeit untersucht wird, besteht beispielsweise aus acht dieser FEs (benannt N' term-a-b-c-d-d'-e-f-g-C' term) (Quelle Paper von Julian). Jede FE ist ca. 50 kDa schwer, wodurch das gesamte Protein ein Gewicht von ca. 4 MDa besitzt.

Die FEs FE-a, FE-b, FE-c, FE-d, FE-e und FE-f sind bei allen bekannten Hämocyaninen vorhanden. Dabei ähnelt sich deren Architektur und es liegt nahe, dass sich diese FEs vor der Aufspaltung der einzelnen Arten entwickelt haben. Daher ist anzunehmen, dass diese in der Struktur dieselben Positionen besetzen und somit dieselbe Rolle beim Bilden der Quartärstruktur ihres Proteins spielen, obwohl dies noch nicht direkt gezeigt werden konnte (Habe die Paper gesucht aber nicht gefunden, waren das die, die du mir

noch schicken wolltest?). FE-d' hingegen entwickelte sich vor etwa 740 Millionen Jahren durch eine Duplizierung der FE-d.

Geometrisch betrachtet besteht der Hohlzylinder aus zwei kovalent miteinander verbundenen Bereichen, der äußeren Wand und dem inneren Kragen. Die Wand ist charakteristisch für alle Hämocyane und setzt sich aus den oben beschriebenen FEs a,b,c,d,e und f zusammen. Der Kragen hingegen ist bei jeder Hämocyaninart anders aufgebaut und besteht beim *Sepia Officinalis* aus FE-d' und FE-g.

Da die Funktionsweise von Proteinen durch ihre Quartärstruktur festgelegt ist, ist es notwendig eine Strukturanalyse durchzuführen. Eine Möglichkeit wäre die hochauflösende Kristallographie, doch lassen sich besonders große Proteine nur sehr schwer kristallisieren. Zudem liegen diese nicht mehr in ihrer nativen Konformation vor, wie es in Lösung der Fall ist. Daher bietet sich die Kryotransmissionselektronenmikroskopie an, welche eine Hochauflösung der Struktur ermöglicht.

2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Prinzip der Bildentstehung bei einem Transmissionselektronenmikroskop ist dem eines Lichtmikroskops sehr ähnlich: Ein Elektronenstrahl erzeugt eine Projektion der Probe im Realraum. Im Vergleich zum Lichtmikroskop werden jedoch keine optischen, sondern elektrische Linsen verwendet. Ein schematischer Aufbau der verwendeten Mikroskope ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die dazugehörigen technischen Daten können der Tabelle (Tabellen ref hier einfügen) entnommen werden.

Als Elektronenquelle wird je nach Mikroskop entweder ein LaB₆-Kristall (Lanthanhexaborid) oder eine Feldemissionsquelle genutzt. Bei der Feldemission ($\Delta E = 0.6-1.2 \text{ eV}$) ist ein schmaleres Energiespektrum der Elektronen zu beobachten als beim LaB₆-Kristall ($\Delta E = 1.5-3 \text{ eV}$), wodurch ein höheres Auflösungsvermögen ermöglicht wird. Nach dem Beschleunigen der Elektronen werden diese mithilfe von elektronischen Linsen auf die Probe und anschließend auf die Kamera fokussiert. Diese Linsen bestehen aus Spulen, die Magnetfelder erzeugen. Die bewegten Elektronen werden von diesen durch die Lorentz-Kraft

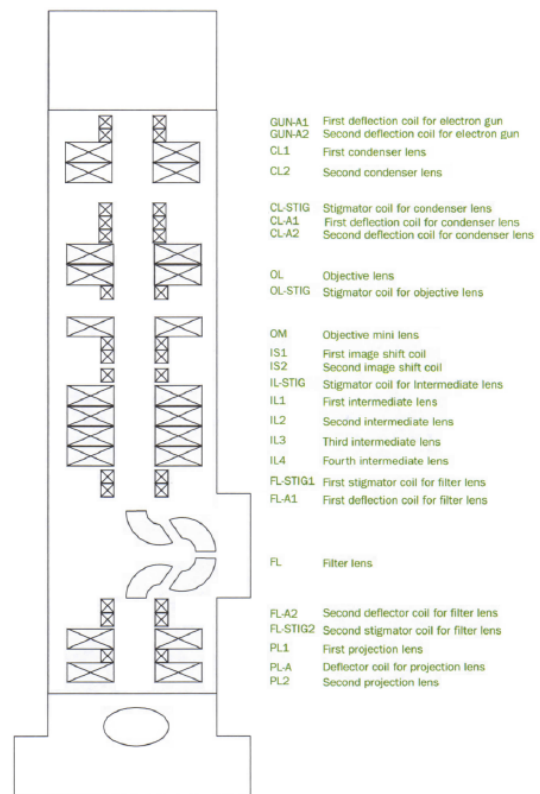


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. (Quelle Benutzerhandbuch, JEOL Ltd.)

abgelenkt ohne deren Energie zu beeinflussen (Nur die senkrechte Komponente der Kraft wirkt auf die Elektronen). Um Wechselwirkungen der Elektronen mit anderer Materie als der Probe zu verhindern, ist das gesamte Spulensystem evakuiert. Abschließend wird das Transmissionsbild im Objektsystem vergrößert und auf einem Fluoreszenzschirm abgebildet oder direkt mit einer Kamera oder einem Photofilm detektiert. Abhängig von der Intensität erzeugt dieser ein Bild mit Graustufen. Je dunkler der Bildpunkt ist, umso größer ist die Intensität.

Damit auf dem Bild Strukturen erkennbar werden, muss ein ausgeprägter Amplitudenkontrast zwischen Probe und Lösung vorhanden sein. Eine Schwierigkeit tritt dabei bereits dadurch auf, dass die Elektronendosis bei biologischen Proben nicht zu groß gewählt werden darf um Schäden zu vermeiden. Der Amplitudenkontrast kann sowohl durch Teilchen- als auch durch Welleneigenschaften der Elektronen entstehen. Bei der Betrachtung als Teilchen ergibt sich der Kontrast durch Streueffekte. Dafür dürfen die Ordnungszahlen der Elemente in der Probe und der Lösung nicht in derselben Größenordnung sein. Dies ist auf die Wechselwirkung der Elektronen an Atomkernen zurückzuführen. An großen Kernen werden diese vermehrt elastisch gestreut, während an kleinen Kernen bevorzugt inelastische Streuung auftritt. Erstere führt zu einer Richtungsänderung der Elektronen. Mithilfe einer Blende werden diese aus dem Elektronenstrahl entfernt.

Die inelastisch gestreuten Elektronen tragen jedoch nur zum Rauschen im Bild bei und tragen keine Information. Der Amplitudenkontrast kommt dementsprechend durch die geringere Intensität bei Elementen größerer Ordnungszahl zustande.

Befinden sich nun die Elemente der Probe und der Lösung in derselben Größenordnung, werden an beiden etwa gleich viele Elektronen elastisch gestreut und es ist kein Kontrast zu erkennen. Wird das Elektron jedoch als Welle betrachtet kann eine andere Art von Kontrast hergeleitet werden. Wenn elektromagnetische Wellen mit Materie wechselwirken, kommt es zu einer Phasenverschiebung. Dies führt wiederum zu Interferenzerscheinungen zwischen den gebeugten und den ungebeugten Elektronen und wird als Phasenkontrast bezeichnet. Die Verschiebung wird durch die Gleichung (2.1)(Quelle) beschrieben.

$$\gamma(k, \Delta z) = \frac{\pi}{2} (\lambda^3 C_s k^4 - 2\lambda \Delta z k^2). \quad (2.1)$$

Dabei ist Δz der Unterfokus, C_s die mikroskopspezifische sphärischen Aberrationskonstante, λ die Wellenlänge der Elektronen und k der reziproke Abstand vom Bildmittelpunkt im Frequenzraum. Biologische Proben führen nur zu einem schwachen Phasenkontrast, weshalb der Unterfokus relativ hoch gewählt werden muss. Zur Rückrechnung auf den Amplitudenkontrast wird die Kontrast Transfer Funktion (KTF, Gleichung (2.2), Quelle) verwendet, die sowohl Anteile von Phasen-, als auch Amplitudenkontrast beinhaltet. Sie ist die Fouriertransformierte der Punktspreizfunktion, die angibt, wie ein punktförmiges Objekt durch das System dargestellt wird.

$$\text{KTF}(\gamma(k, \Delta z)) = \sqrt{1 - A^2 \sin[\gamma(k, \Delta z)]} - A \cos[\gamma(k, \Delta z)]. \quad (2.2)$$

Ein Beispiel für eine KTF ist in Abbildung ?? dargestellt. Die Funktion alterniert zwischen $+1$ und -1 , wobei die Nullstellen vom Unterfokus abhängen. An den Nullstellen gibt es keinen Kontrast und das Bild enthält keine Informationen bei den entsprechenden Frequenzen. Es ist daher wichtig während der Bildaufnahme verschiedene Defokuswerte zu wählen, um möglichst alle Frequenzen im gesamten Fourierraum abzudecken. Die Funktion wird durch eine einhüllende Funktion gedämpft und ist auf Störungen (Drift, Energieaufspaltung im Strahl usw.) zurückzuführen. Beschrieben wird diese dabei durch den Exponentialkoeffizienten (B-Faktor) der approximierten Gaußfunktion.

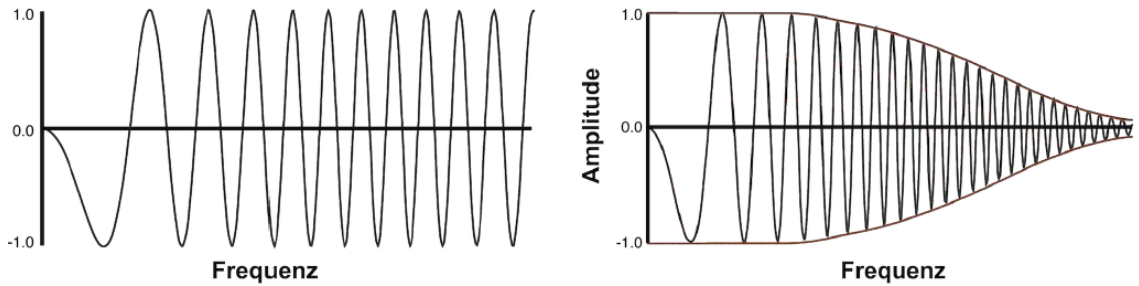


Abbildung 2.2: Beispiel einer Kontrast Transfer Funktion. Links ist der theoretische, rechts ist der reale Verlauf dargestellt. Der reale Verlauf wird von einer dämpfenden Funktion eingehüllt. (Quelle Behrmann, 2012)

Für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops gilt: Zwei Gegenstände können nicht voneinander getrennt dargestellt werden, wenn das Objekt kleiner ist, als die Wellenlänge der eingesetzten Strahlung. Bei Elektronen, die mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV beschleunigt werden, liegt diese bei $\lambda = 0.02 \text{ \AA}$. Die wichtigsten begrenzenden Faktoren für die Auflösungsgrenze sind das Abbe-Kriterium, Abbildungsfehler und die Pixelgröße des Photochips. Das Abbe-Kriterium ergibt sich aus der Gleichung (2.3) (Quelle).

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin(\alpha)} \quad (2.3)$$

Es ist abhängig von der Brechzahl n des Mediums zwischen Objektiv und Probe und dem halben Öffnungswinkel des Objektivs (Quelle). Abbildungsfehler, wie die sphärische Aberration, führen zu Anteilen in der Kontrast Transfer Funktion (Gleichung (2.2)). Bei höheren Frequenzen führt der geringer werdende Abstand zwischen zwei Nulldurchgängen dazu, dass das Signal nicht mehr fehlerfrei ausgewertet werden kann. Auch ein Driften der Probe während der Aufnahme führt zu einer Abschwächung des Signals. Zudem spielt die Pixelgröße A_{px} des Photochips eine Rolle, das Abtasttheorem (Quelle) besagt, dass die maximale Auflösung dem doppelten Wert der Pixelgröße entspricht. Eine Fouriertransformation überträgt die Bildinformation in den Frequenzraum, in dem die Intensität bei verschiedenen Frequenzen f_s (spatial frequency). Die Frequenz der maximalen Auflösung wird als Nyquist-Frequenz bezeichnet. Es wird meist die Einheit

der absoluten Frequenz f_a verwendet, die eine Verbindung zwischen der Pixelgröße und der Frequenz durch Gleichung (2.4) erstellt.

$$f_a = A_{px}/f_s \quad (2.4)$$

Es ist zu erkennen, dass dieser Wert nicht kleiner als 0.5 werden sollte, da dies der Nyquist Frequenz entspricht und eine höhere Auflösung nicht möglich ist.

2.3 Probenpräparation für die negative Kontrastierung

Um Proben mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersuchen zu können, müssen zunächst ein paar Vorbereitungen getroffen werden. Die Probe muss strukturerhaltend auf dem Probenträger fixiert werden, damit diese sich nicht bewegen kann. Dies hat zudem der Vorteil, dass die Probe nicht in das Vakuum des Mikroskops evaporieren kann. Zudem muss ein Kontrast vorhanden sein, um Strukturen der Probe erkennen zu können.

Die Methode der negativen Kontrastierung ist eine Möglichkeit zum erfüllen dieser Anforderungen. Dabei wird die Probe zusammen mit einer Schwermetalllösung (0.75 % Uranylformiat) auf einem Probenträger aufgetragen. Dieser ist ein (größe hier einfügen) großes, rundes Kupfergitter (G2400C, Plano GmbH). Die Probe wird zur Verarbeitung in einem Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt (TRIS 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM). Nach der Benetzung mit einem Polymerfilm wird das Gitter mit Kohlenstoff bedampft, auf dem die Probe später haften wird. Das Gitter wird in ein Plasma eingebracht, das aus beschleunigten geladenen und ungeladenen Atomen und Molekülen besteht. Durch die Wechselwirkung entstehen Ionen auf der Oberfläche und diese wird polarisiert. Dies ist notwendig, da die Schwermetall- und Probenlösung hydrophil (polar) ist und die Probe ansonsten nicht haftet. Nach dem Auftragen der Probe wird diese gewaschen, mit der Schwermetalllösung benetzt und anschließend luftgetrocknet.

Die negative Kontrastierung ist eine gute Möglichkeit zur Kontrastverstärkung in einem Transmissionselektronenmikroskop bei Proben, die primär aus leichten Elementen aufgebaut sind. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben streuen größere Atomkerne im Vergleich vermehrt elastisch, während kleinere vermehrt inelastisch streuen. Biologische Proben bestehen aus leichten Elementen (Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff etc.), während Schwermetalle schwere Elemente beinhalten. Der auftretende Intensitätsunterschied führt in dem erzeugten Bild zu einem Amplitudenkontrast. Da an der Lösung und nicht an der Probe gestreut worden ist, wird diese Methode als negative Kontrastierung bezeichnet.

Die Nachteile der negativen Kontrastierung wirken sich negativ auf die Auflösung aus. Durch das Trocknen der Probe kann es zu Deformationen der nativen Konformation und Artefakten der Kontrastlösung kommen. Dies führt besonders bei großen Molekülen zu deutlichen Fehlern in der Rekonstruktion. Auch gibt es Probleme bei inneren Strukturen. Die Schwermetalle kommen nicht in die Proteine und an diesen Stellen ist der Kontrast kaum bis gar nicht vorhanden.

2.4 Kryopräparation

Hämocyanine gehören zu den größten Proteinen der Natur und sind daher besonders anfällig für Rekonstruktionsfehler bei der negativen Kontrastierung. Bei der Kryopräparation wird die Probe in amorphem, vitrifiziertem Eis schockgefroren. Damit erfüllt diese Methode die Anforderungen aus Kapitel 2.3. Da die Probe in Lösung gefriert und nicht getrocknet wird, verbleibt diese in ihrer nativen Konformation. Für den Vitrifizierungsvorgang ist das Gerät *Cryo Plunge 3* verwendet worden. Ein Gefrieren ohne Bildung von Eiskristallen ist mit flüssigem Stickstoff nicht möglich, da der Leidenfrost-Effekt ein langsames Gefrieren bedingt. Daher findet das eigentliche Vitrifizieren in einem mit Ethan gefüllten Behälter statt, der mit Stickstoff gekühlt wird.

Biologische Proben bestehen wie Wasser aus leichten Elementen und streuen bevorzugt inelastisch. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, sind keine Strukturen bei einem Amplitudenkontrast etwa gleich großer Elemente zu erkennen. Daher ist es besonders wichtig auf den Phasenkontrast nach Gleichung (2.2) zu nutzen.

Der Probenträger ist ein etwa (größe hier einfügen) großes Metallgitter (z.B. Quantifoil R2/1 Cu-300, Plano GmbH.). Dieses ist bereits mit einem Kohlenstofffilm überzogen, in dem in regelmäßigen Abständen industriell Löcher geätzt worden sind (<http://www.cp-download.de/plano11/Kapitel-1.pdf>). Die Oberfläche des Gitters wird, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, durch ein Plasma polarisiert. Zum Auftragen der Probe wird das Gitter in eine Pinzette eingespannt und in das Gerät gehängt. Durch eine sich seitlich befindende Öffnung wird nun die Probe auf das Gitter aufgetragen. Das Gerät übernimmt den Ablösch- und Gefriervorgang vollautomatisch. Vom Probenträger wird die Probenlösung mit Filterpapier fast vollkommen entfernt, sodass nur noch ein dünner Film übrig bleibt. Anschließend wird das Gitter in den mit flüssigem Ethan gefüllten Behälter fallen gelassen. Dabei ist es wichtig, dass die Luftfeuchtigkeit erhöht ist. Dadurch wird ein Verdunsten während des Fallens verringert. Abschließend kommt das Gitter direkt in die sich in flüssigem Stickstoff befindliche Probenaufbewahrungsbox und dies wird wiederum bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5 Einzelpartikelanalyse

Kapitel 3

Auswertungsmethodik

Kapitel 4

Ergebnisse

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Hier sollen die Ergebnisse zusammengefasst und weiterführende Untersuchungen diskutiert werden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel "Titel der Bachelorarbeit" selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Belehrung

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden (§ 63 Abs. 5 Hochschulgesetz - HG -).

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt wird mit Freiheitsstrafe bis zu 3 Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

Die Technische Universität Dortmund wird ggf. elektronische Vergleichswerkzeuge (wie z.B. die Software "turnitin") zur Überprüfung von Ordnungswidrigkeiten in Prüfungsverfahren nutzen.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum

Unterschrift