



Biophysikalisches Praktikum
Institut für Biophysik
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Elektronenmikroskopie - Einzelpartikelanalyse

Lasse Sprankel & Julian Reitz, Stand 24.02.2021

Anja Seybert & Julian Reitz, Stand 29.11.2021

Motivation

Am Ende des 19. bzw. zum Beginn des 20. Jahrhunderts standen Wissenschaftler vor dem Problem, dass sie die Limitationen der klassischen Lichtmikroskopie erreicht hatten. Auch wenn heutige Lichtmikroskope technisch gesehen mit Sicherheit ausgefeilter sind, so ist die entscheidende Limitation physikalischer Natur. Bereits 1873 erkannte Abbe, dass die Auflösung der Lichtmikroskopie einer natürlichen Beschränkung unterliegt, welche mit der berühmten Abbe-Formel (Gleichung 1) beschrieben werden kann, wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts, n der Brechungsindex zwischen Objektiv und Objekt und α der maximale halbe Öffnungswinkel zwischen einem Objektpunkt und dem Objektiv ist. Das Produkt $n \sin \alpha$ wird auch numerische Apertur (NA) genannt.

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1)$$

Bei einem Mikroskopobjektiv ist der maximale halbe Aperturwinkel α auf 90° beschränkt. Die numerische Apertur NA kann also nicht größer als n werden. Der Brechungsindex der heute in der Lichtmikroskopie verwendeten Materialien kann aus praktischen Gründen nicht wesentlich über $n = 1,5$ gesteigert werden. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist also maßgeblich abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts (Cremer, 2011). Bei der Verwendung von sichtbarem Licht wäre die kleinstmögliche Wellenlänge ca. 420 nm (blaues Licht) und das zugehörige Auflösungsvermögen läge bei $d = 140$ nm. Objekte die dichter beieinander liegen lassen sich im Lichtmikroskop nicht als separate Objekte erkennen.

Durch die Entdeckung des Welle-Teilchen-Dualismus erkannten Forscher, dass die Verwendung eines Elektronenstrahls anstelle von Licht dieses Limit deutlich reduzieren könnte. Durch den von Louis de Broglie postulierten Zusammenhang zwischen der Wellenlänge eines Teilchens und seinem Impuls (Gleichung 2), kann die Wellenlänge von Elektronen ermittelt werden. Da die Elektronen in einem Elektronenmikroskop auf einen wesentlichen Anteil der Lichtgeschwindigkeit beschleunigt werden, müssten für die Berechnung der Wellenlänge eigentlich relativistische Effekte berücksichtigt werden. Darauf wird an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen.

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (2)$$

Bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV beträgt die Wellenlänge eines Elektrons $\lambda \approx 0,01$ nm und das zugehörige Auflösungsvermögen d läge bei unter einem Å, wodurch Aufnahmen mit atomarer

Auflösung möglich wären (Cremer, 2011). Heutige Elektronenmikroskope (EMs) arbeiten sogar mit deutlich höheren Beschleunigungsspannungen (200 kV bis 300 kV). Dies hat aber andere Gründe und die tatsächlich erzielte Auflösung ist meist durch andere Faktoren limitiert und erreicht nicht die theoretisch physikalisch möglichen Werte. In den Materialwissenschaften konnte zuletzt eine Auflösung von $0,45 \text{ \AA}$ erzielt werden (Sawada, Shimura, Hosokawa, Shibata & Ikuhara, 2015). Im Bereich der Strukturbiologie liegt der aktuelle Auflösungsrekord in der Nähe von $1,2 \text{ \AA}$ (Nakane et al., 2020). Bei einer so hohen Auflösung lassen sich alle Atome eines Proteins als individuelle Signale anhand ihrer Elektronendichte erkennen.

Das erste funktionale Elektronenmikroskop wurde 1931 von Ernst Ruska und Max Knoll entwickelt, wofür Ruska 1986 den Physik-Nobelpreis erhielt (Ruska, 1932). Dadurch revolutionierte sich die biologische Forschung, da erstmals Viren und Zellbestandteile wie der Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien in hoher Auflösung sichtbar gemacht werden konnten. Weitere technische und methodische Entwicklungen sorgten dafür, dass Elektronenmikroskopie heutzutage dazu verwendet werden kann um die Struktur von Proteinen mit (quasi-)atomarer Auflösung zu bestimmen. Für diese Entwicklungen erhielten Jacques Dubochet, Richard Henderson und Joachim Frank 2017 den Chemie-Nobelpreis.

Die Bedeutung dieser Entwicklungen zeigt sich, wenn man die Statistiken der Proteindatenbank PDB (<https://www.rcsb.org/>) betrachtet. In Abbildung 1a lässt sich erkennen, dass die Gesamtzahl der mit EM gelösten Strukturen noch nicht an die von Kernmagnetischer-Resonanz (nuclear magnetic resonance; NMR) oder insbesondere Röntgenkristallographie heranreicht. Der Blick auf die jährlich hinzukommenden Strukturen in Abbildung 1b zeigt jedoch, dass sich hier eine deutliche Trendwende abzeichnet.

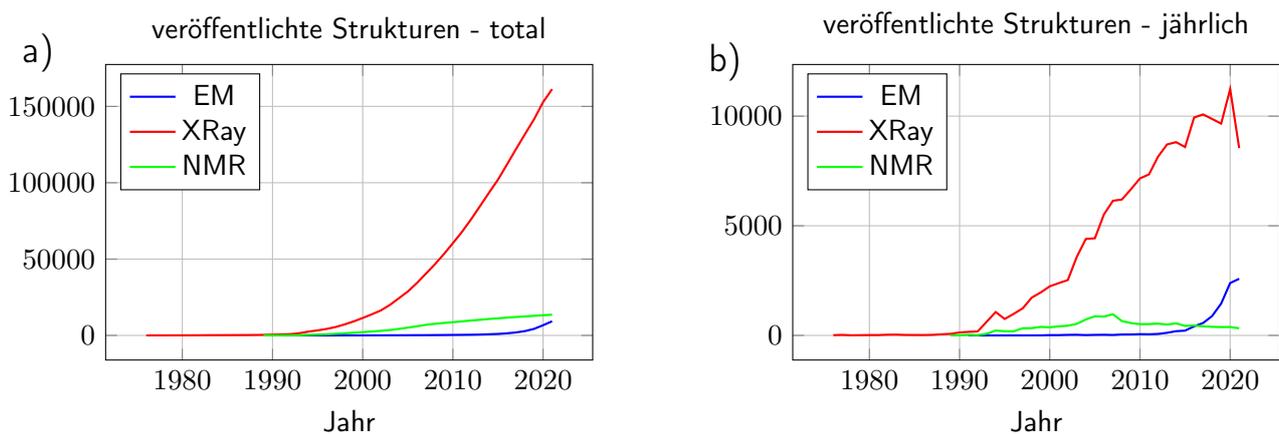


Abbildung 1: Anzahl der (a) insgesamt und (b) jährlich veröffentlichten Strukturen in der Proteindatenbank PDB

Röntgenkristallographie leidet seit jeher unter der Limitierung, dass das zu untersuchende Protein für die Strukturbestimmung kristallisiert werden muss. Mit diesem Aspekt werden Sie sich im Praktikumsversuch *Proteinkristallisation* beschäftigen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass routinemäßig die höchsten Auflösungen erzielt werden. NMR-Untersuchungen haben den großen Vorteil, dass hiermit dynamische Prozesse untersucht werden können. Allerdings eignet sich diese Methode nur für relativ kleine Proteine. Die Strukturbestimmung mit EM hat als einzige Limitation, dass die Proteine nicht zu klein sein dürfen, da sie sonst nicht sichtbar sind. Aktuell liegt dieses Limit im Bereich von 50 kDa bis 100 kDa. Allerdings gibt es neue Ansätze um diese Grenze immer weiter zu verringern (Liu, Huynh & Yeates, 2019).

Für die meisten der mit EM gelösten Strukturen in der PDB wurde eine sogenannte Einzelpartikelanalyse durchgeführt. Für diesen Versuch werden Sie dies exemplarisch mit dem Protein β -Galactosidase durchführen. Der Versuch findet an zwei Tagen statt und ist auch inhaltlich in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden Sie die Proteinprobe für das Elektronenmikroskop vorbereiten und Daten aufnehmen. Im zweiten Teil werden Sie die aufgenommenen Daten prozessieren um eine 3D-Struktur des Proteins zu rekonstruieren.

Teil I

Probenpräparation und Datenaufnahme am Elektronenmikroskop

1 Grundlagen

In der vorangehenden Beschreibung der Motivation für diesen Versuch wurde darauf eingegangen, warum Elektronenmikroskope (quasi-)atomare Auflösungen erreichen können und welche Bedeutung dies für die biologische Forschung hat. In diesem Kapitel werden wir auf die wichtigsten Grundlagen eines Elektronenmikroskops und deren Bedeutung für diesen Versuch eingehen.

1.1 Aufbau eines Elektronenmikroskops

Bei Elektronenmikroskopen unterscheidet man zwei wichtige Bauweisen. Rasterelektronenmikroskope (scanning electron microscope; SEM) bestrahlen mit einem dünnen Elektronenstrahl die Oberfläche eines Objekts. Abhängig von der Beschaffenheit der Oberfläche interagiert der Elektronenstrahl auf unterschiedliche Weise mit dessen Atomen und verliert dabei Energie. Dadurch entstehen unter anderem Wärme, sekundäre Elektronen mit niedriger Energie, rückgestreute Elektronen mit hoher Energie und Röntgenstrahlen. Bei klassischen SEMs werden die sekundären Elektronen detektiert. Die Oberfläche des Objekts wird mit dem Elektronenstrahl gerastert und aus der Intensität der detektierten Signale wird ein Bild generiert.

Transmissionselektronenmikroskope (TEM) durchstrahlen mit den Elektronen das Objekt, weshalb dieses sehr dünn sein muss. Wie zuvor beim SEM interagiert der Elektronenstrahl mit dem Objekt, wodurch es zu unterschiedlichen Effekten kommt, welche wiederum abhängig von der Beschaffenheit des Objekts sind. Zum einen kommt es zu den gleichen Effekten wie schon beim SEM. Zum anderen kann der Elektronenstrahl die Probe durchstrahlen, da diese entsprechend dünn ist. Dabei kann der Elektronenstrahl die Probe passieren ohne mit dieser zu interagieren, oder er wird (in)elastisch gestreut. Die aus der Probe austretenden Elektronen werden detektiert und erzeugen so ein Bild des Objekts. Da in diesem Versuch nur mit einem Transmissionselektronenmikroskop gearbeitet wird, wird im Folgenden auch nur genauer auf dieses eingegangen. Ein schematischer Aufbau eines TEMs ist in Abbildung 2 dargestellt.

An der Elektronenquelle werden die Elektronen aus einer Wolfram- oder LaB_6 -Kathode durch hohe Spannung extrahiert (thermionisch oder Feldemission) und mit einer Anode beschleunigt. Das darauffolgende Kondensor-Linsensystem bündelt den divergierenden Elektronenstrahl sodass dieser möglichst parallel die Probe bestrahlt. Das Objektiv-Linsensystem fokussiert den Elektronenstrahl nachdem dieser die Probe passiert hat. Das abschließende Projektions-Linsensystem erweitert den Elektronenstrahl auf die Detektionsebene. Die Detektion der Elektronen erfolgt entweder durch einen phosphoreszierenden Schirm, früher durch spezielle Filme, oder heutzutage durch Kameras, in welchen die Elektronen zuerst in ein optisches Signal überführt (charge coupled device; CCD), oder direkt detektiert (direct detecting device; DDD) werden (Rose, 2008; Egerton, 2005). Erst die Entwicklung dieser direkten Elektronendetektoren erlaubte die Strukturbestimmung von Proteinen mittels EM mit hoher Auflösung und führte zu der sogenannten *resolution revolution* (Kühlbrandt, 2014).

Bei der Bildentstehung in einem EM unterscheidet man zwischen Amplituden- und Phasenkontrast. Der schematische Strahlengang für diese beiden Kontrastarten ist in Abbildung 3 dargestellt. Wenn der

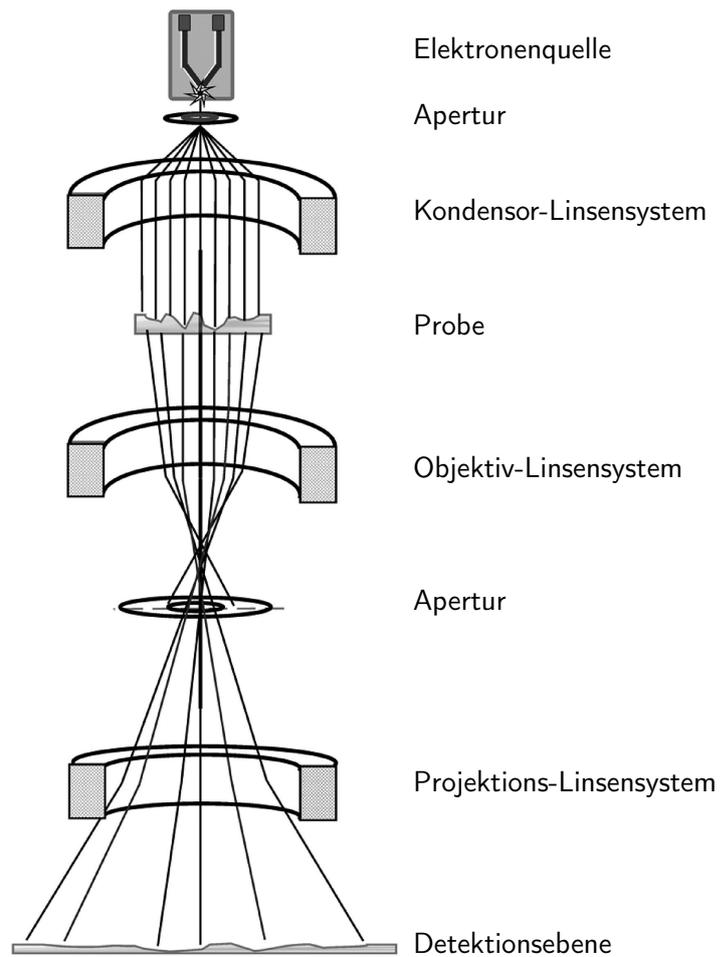


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (Orlova & Saibil, 2011)

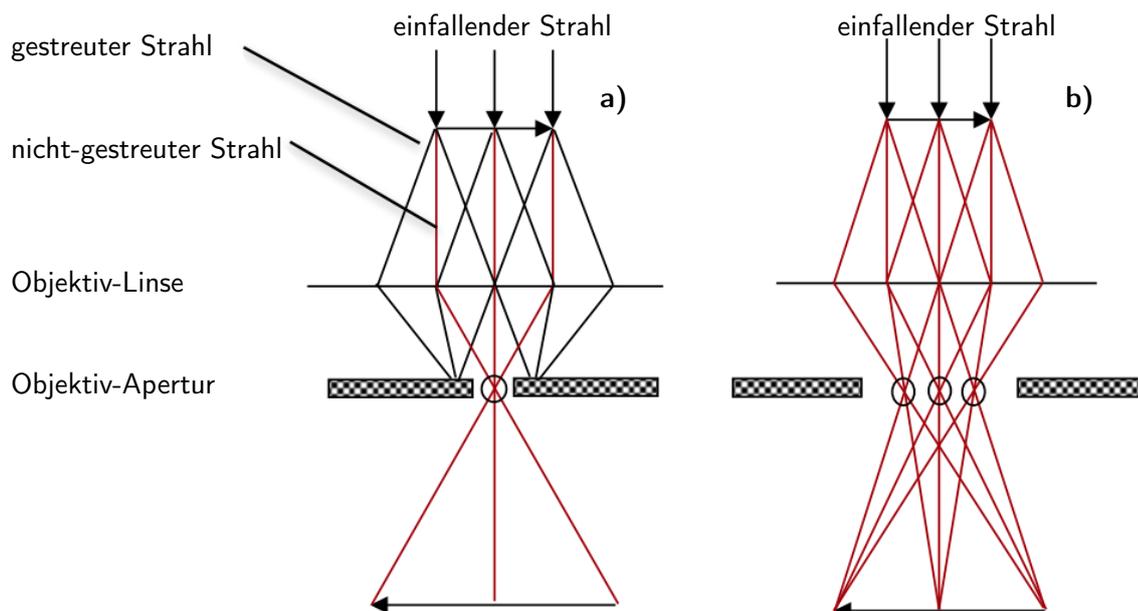


Abbildung 3: Schematischer Strahlengang bei der Bildentstehung durch (a) Amplitudenkontrast und (b) Phasenkontrast (Bhushnan, 2017)

Elektronenstrahl die Probe passiert, so sind für die Kontrastgebung zwei Aspekte entscheidend. Ein Teil der Elektronen passiert die Probe ohne gestreut zu werden und ein anderer Teil wird an der Probe (um genau zu sein an den Atomkernen) gestreut. Der Streuwinkel der Elektronen ist dabei umso größer, je größer und geladener der Atomkern ist. Befinden sich in der Probe große Atomkerne (in der Regel Schwermetalle), so wird der Elektronenstrahl so stark abgelenkt, dass der gestreute Elektronenstrahl durch eine Apertur von dem nicht-gestreuten Strahl getrennt werden kann (Abb. 3a). Abhängig davon, wie viele Atomkerne sich an einer Stelle in der Probe befinden, verändert sich dadurch die Intensität des detektierten Strahls, weswegen man von Amplitudenkontrast spricht. Befinden sich in der Probe allerdings nur vglw. kleine Atomkerne (was bei biologischen Proben in der Regel der Fall ist), so ist der Streuwinkel zu gering um die Strahlen durch eine Apertur zu trennen. In diesem Fall werden der nicht-gestreute und der gestreute Strahl durch die Objektivlinse wieder zusammengeführt. Da der gestreute Strahl eine höhere Wegdifferenz hat, existiert zwischen den Strahlen ein Phasenversatz. Der Phasenversatz kann jedoch durch die Detektoren (wie auch durch das menschliche Auge) nicht wahrgenommen werden. Die konstruktive/destruktive Interferenz zwischen Primärstrahl und gestreutem Strahl in der Bildebene (vgl. Abb. 3b) führt nur zu geringen Amplitudenunterschieden. Phasenplatten, die in der Lichtmikroskopie etabliert sind und den Phasenversatz gezielt verstärken, sind für die Elektronenmikroskopie noch nicht zuverlässig technisch umgesetzt. Daher wird in der Elektronenmikroskopie der Phasenunterschied durch eine Defokussierung der Objektivlinse verstärkt (vertiefende Theorie hierzu finden Sie in Franken, Grünewald, Boekema und Stuart (2020), siehe besonders hier Abbildung 6). Die Auswirkung der Defokussierung auf die Übertragungsfunktion des Mikroskops wird Ihnen im Versuch demonstriert.

Im Gegensatz zu den Linsen von Lichtmikroskopen, handelt es sich bei den Linsen von Elektronenmikroskopen nicht um geschliffene Glaslinsen, sondern um elektromagnetische Linsen, welche den Elektronenstrahl durch präzise Magnetfelder ablenken. Diese magnetischen Linsen arbeiten weitaus weniger *perfekt* als optische Linsen, weshalb es bei Elektronenmikroskopen zu asymmetrischen Verzerrungen des Elektronenstrahls kommt, welche als Astigmatismus bekannt sind. Daher verfügen Elektronenmikroskope außerdem über sogenannte Stigmatoren, welche durch schwache elektrische oder magnetische Quadrupol-Felder diesen Astigmatismus ausgleichen bzw. korrigieren können (Rose, 2008).

Für den Betrieb eines Elektronenmikroskops muss im Inneren ein Hochvakuum erzeugt werden. Hierfür gibt es zwei Hauptgründe. Zum einen würden anwesende Gasmoleküle dazu führen, dass es zwischen der Anode und der Kathode in der Elektronenquelle zu einem Lichtbogen kommen würde, wodurch die Elektronenquelle beschädigt würde. Zum anderen würde der Elektronenstrahl an Gasmolekülen stark gestreut werden, wodurch es unmöglich wäre ihn adäquat zu fokussieren etc. Dieser Umstand spielt eine entscheidende Rolle bei der Probenpräparation für Elektronenmikroskope, worauf im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

1.2 Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie

Am Ende des vorausgehenden Kapitels wurde darauf eingegangen, dass im inneren eines EMs für den Betrieb ein Hochvakuum erzeugt werden muss. Gerade für biologische Proben stellt dies ein großes Problem dar, da diese natürlicherweise einen hohen Wasseranteil haben. Damit die biologischen Proben nicht durch das Vakuum beschädigt werden, müssen sie daher vorher dehydriert oder anders stabilisiert werden. Für die Transmissionselektronenmikroskopie unterscheidet man dabei grundsätzlich zwischen zwei Varianten der Probenvorbereitung: dem negative staining (Abb. 4a) und dem plunge freezing (Abb. 4b).

Bei beiden Verfahren wird die Probe auf ein EM-Grid aufgetragen, welches man mit einem Objektträger der Lichtmikroskopie vergleichen kann. Typische EM-Grids bestehen aus Kupfer oder Gold, haben einen

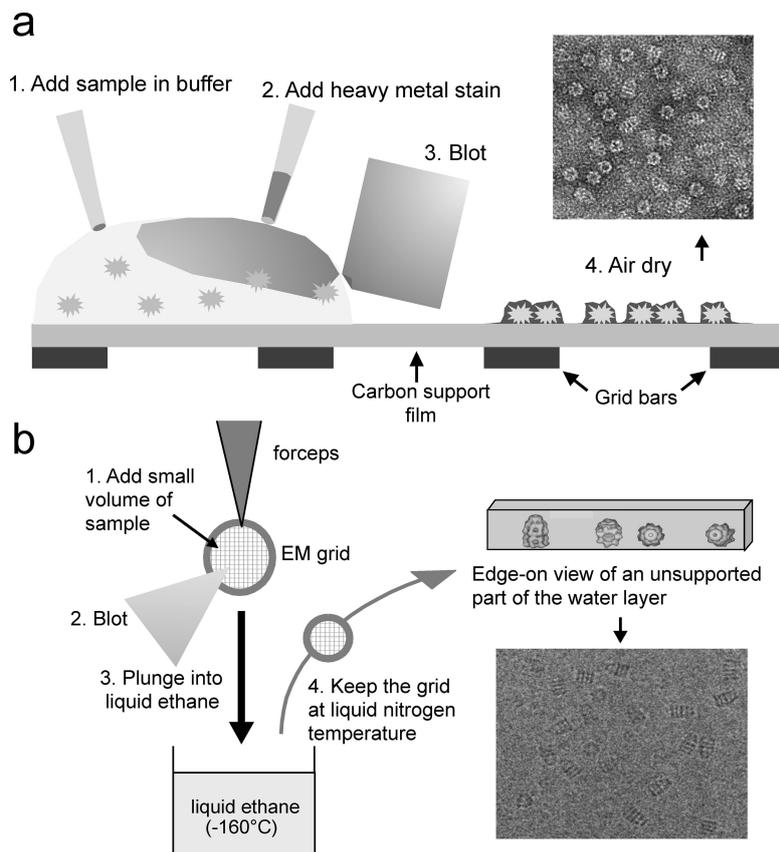


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Probenpräparation für Elektronenmikroskopie mittels (a) negative staining und (b) plunge freezing (Orlova & Saibil, 2011)

Durchmesser von 3 mm und sind wenige nm dick. Das Grid ist in ein Gittermuster aufgeteilt, wobei man unterscheidet, wie viele dieser Squares sich auf dem Grid befinden (angegeben wird dies in *Mesh* = Anzahl der Squares pro Inch). Auf diesen Squares wird ein Film aufgetragen, welcher typischerweise eine periodische Anordnung von Löchern, oder eine ungleichmäßigen Wabenstruktur (*lacey*) aufweist. Manchmal wird auf diese Grids zusätzlich ein dünner Carbon-Film (~ 5 nm) oder eine \pm einatomige Schicht Graphenoxid aufgetragen.

Beim negative staining werden die biologischen Proben mit einer Schwermetallsalz-Lösung (häufig Uranylacetat oder Uranylformiat) eingebettet. Die Schwermetalle lagern sich als gleichmäßiger Film auf der Gridoberfläche ab. Auf der Probe selbst lagern sich dabei nur wenige Schwermetalle ab. Neben der Probe lagern sich hingegen sehr viel mehr Schwermetalle ab. Da der Elektronenstrahl an den Atomkernen der Schwermetalle sehr stark abgelenkt wird, erfolgt die Bildgebung in diesem Fall durch Amplitudenkontrast (vgl. Kapitel 1.1 und Abb. 3a). Da sich auf der Probe nur wenige Schwermetalle ablagern wird der Elektronenstrahl hier weniger abgelenkt als in der Umgebung, weshalb das detektierte Signal stärker ist und die Probe im Elektronenmikroskop weiß erscheint. Ein Nebeneffekt des negative stainings ist, dass eine chemische Fixierung der Probe stattfindet, wodurch es meist zu staining Artefakten kommt und die biologischen Strukturen in der Probe können unter Umständen denaturieren. Da das Signal bei negative stain Proben aus der Streuung an den Atomkernen der Schwermetalle resultiert, und die deutlich kleineren Atomkerne der biologischen Probe dabei praktisch keine Rolle spielen, ist auch die Auflösung dieses Verfahrens auf ca. 10 \AA bis 20 \AA limitiert (Scarff, Fuller, Thompson & Iadaza, 2018). Meist wird die Methode des negative stain daher nur noch für einen initialen screen verwendet. Obwohl keine hohen Auflösungen erreicht werden können, eignet sich die Methode sehr gut um einen schnellen Eindruck der Probenqualität und -konzentration zu erhalten.

Um hochauflösende Strukturen aufzuklären werden die Proben in einem Kryogen wie z.B. flüssigem Ethan eingefroren (Abb. 4b). Das Einfrieren findet dabei so schnell statt, dass die Wassermoleküle sich nicht in klassischen Eiskristallen anordnen können, sondern eine Konservierung des Zustands, wie er in der flüssigen Phase vorlag, stattfindet. Durch diesen Prozess (Vitrifizierung) wird die Probe daher in einem sogenannten *near-native-state* fixiert. Da bei dieser Präparation auch nicht mit Schwermetallen gearbeitet wird, erfolgt die Bildgebung durch Phasenkontrast (vgl. Kapitel 1.1 und Abb. 3b). Der deutliche Vorteil ist, dass so die Streuung des Elektronenstrahls an den Atomkernen der biologischen Probe abgebildet wird, weswegen mit diesem Verfahren deutlich höhere Auflösungen erzielt werden können. Diese Methode ist allerdings auch sehr viel aufwendiger. So muss beispielsweise das Grid, nachdem es gefroren wurde, konstant auf unter $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt werden. Sämtliche folgende Arbeitsschritte wie das Laden des Grids in das Mikroskop erfolgen daher in Flüssigstickstoff. Aus diesem Grund werden wir uns in diesem Praktikum lediglich mit negative stain beschäftigen.

2 Vorbereitung auf den Versuch

1. Was sind die Vor- und Nachteile von Elektronen und Photonen bei der Mikroskopie. Wie bewerten Sie die Idee Neutronen für die Mikroskopie zu verwenden?
2. Nennen Sie die drei wesentlichen Linsensysteme eines Elektronenmikroskops und erklären Sie kurz deren Funktion.
3. Recherchieren und erklären Sie die Anwendungsgebiete und Vorteile von Energiefiltern bei der Elektronenmikroskopie.
4. Welche Beschleunigungsspannungen kommen bei der transmissions Elektronenmikroskopie von biologischen Proben typischerweise zum Einsatz? Welche Wellenlänge haben die Elektronen bei diesen Beschleunigungsspannungen unter Berücksichtigung relativistischer Effekte?
5. Warum ist es nicht möglich Zellen ohne eine spezielle Präparation in einem Elektronenmikroskop zu betrachten? Welche Techniken kommen zum Einsatz um dieses Problem zu lösen? Nennen Sie Vor- und Nachteile.
6. Was versteht man unter *glow discharging* und warum kommt dieses Verfahren bei der Präparation von Proben für das Elektronenmikroskop zum Einsatz?

3 Durchführung

An diesem Praktikumstag werden Sie aufgereinigte β -Galactosidase mit negative staining für das Elektronenmikroskop präparieren und anschließend mit Ihrem Betreuer am Elektronenmikroskop Daten aufnehmen. Da die negative stain Präparation nur wenig Zeit in Anspruch nimmt werden Sie Grids mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen anfertigen, um sich die Unterschiede im Elektronenmikroskop zu betrachten und eine geeignete Konzentration für die Datenaufnahme zu finden.

Wichtige Informationen

Für das negative staining verwenden Sie eine Uranylacetat-Lösung. Uran ist radioaktiv und zerfällt vorwiegend unter Aussendung von Alphastrahlen, die besonders biologisch wirksam sind. Die Reichweite der Alpha-Strahlung von Uran beträgt in Luft wenige Zentimeter und in Körpergewebe je nach

Dichte wenige Millimeter bis Bruchteile von Millimetern. Sie wird bereits durch Kleidung effektiv abgeschirmt und stellt bei intakter Haut keine Gefahr bei einer Strahlenbelastung von Außen dar. Wir verwenden zur Herstellung der Uranylacetat-Lösung ein Salz, das aus abgereichertem Uran ^{238}U hergestellt wurde und dessen Anteil an radioaktivem ^{235}U (natürlicherweise 0,7%-Anteil) weiter reduziert wurde. Die spezifische Gesamtaktivität des im Versuch verwendeten Uranylacetat-Dihydrat beträgt $14,2 \text{ kBq g}^{-1}$. Sie werden im Versuch mit je $50 \mu\text{l}$ Aliquots einer bereits für Sie hergestellten Lösung arbeiten (1% w/v in H_2O).

Uranylacetat ist nicht nur radioaktiv, sondern auch äußerst giftig, gesundheitsschädlich und umweltgefährdend. Beim Umgang mit dieser Lösung ist daher besonders vorsichtig vorzugehen.

Die Durchführung des negative staining kann immer nur von einer Person durchgeführt werden. Das staining darf ausschließlich in dem dafür vorgesehenen Bereich durchgeführt werden und keine Pipetten, Pinzetten oder anderes aus dem staining Bereich darf außerhalb des Bereiches gelagert werden. Weiterhin ist darauf zu achten, dass die Person die das staining durchführt, mit den Handschuhen nichts berührt was außerhalb des staining Bereiches gelagert ist.

1. Verdünnen Sie die Proteinlösung in dem bereitgestellten Puffer, sodass Sie eine finale Konzentration von 1 mg/ml , $0,5 \text{ mg/ml}$ und $0,1 \text{ mg/ml}$ haben.
2. Jeder Studierende stained insgesamt 3 Grids mit den oben aufgeführten Proteinkonzentrationen.
3. Glow dischargen Sie zusammen mit Ihrem Betreuer die Grids für 30 s.
4. Schneiden Sie ein etwa Handflächen großes Stück Parafilm ab und legen Sie es in den staining Bereich.
5. Pipettieren Sie pro Grid drei $20 \mu\text{l}$ Tropfen destilliertes Wasser und zwei $20 \mu\text{l}$ Tropfen 1% Uranylacetat auf den Parafilm.
6. Nehmen Sie nun mit einer Pinzette ein Grid auf. Fassen Sie das Grid dabei so weit wie möglich am Rand des Grids an ohne es jedoch fallen zu lassen.
7. Pipettieren Sie $3,5 \mu\text{l}$ auf die obere Seite des Grids und warten Sie für 30 s bis 60 s.
8. Entfernen Sie die Flüssigkeit mit Hilfe eines Filterpapiers (Blotten).
9. Berühren Sie mit der Grid Oberfläche vorsichtig den ersten Tropfen Wasser. Blotten Sie direkt mit Hilfe des Filterpapiers und wiederholen Sie den Vorgang mit dem zweiten und dritten Tropfen Wasser.
10. Wiederholen sie diesen Vorgang ein weiteres Mal für den ersten Tropfen Uranylacetat.
11. Berühren Sie nun mit der Gridoberfläche den zweiten Tropfen Uranylacetat und warten Sie für 20 s. Blotten Sie anschließend das Grid mit Hilfe von Filterpapier und lassen Sie es für ca. 5 min trocknen.
12. Entfernen Sie jegliche verbleibende Flüssigkeit zwischen den Pinzetten-Beinen mit einem Filterpapierzuscchnitt und legen Sie das Grid vorsichtig auf die bereitgestellten Matten ab.
13. Das nachfolgende Proben screening und die Datenaufnahme werden Sie mit Ihrem Betreuer zusammen durchführen. Auf den folgenden Seiten finden Sie Abbildungen und Erklärungen der wichtigsten Bedienelemente des Mikroskops und der verwendeten Software.

In Abbildung 5 sehen Sie das vollständige Interface mit dem das Mikroskop gesteuert und überwacht werden kann. Wichtige Aspekte sind dabei hervorgehoben und in Abbildung 6 vergrößert dargestellt.

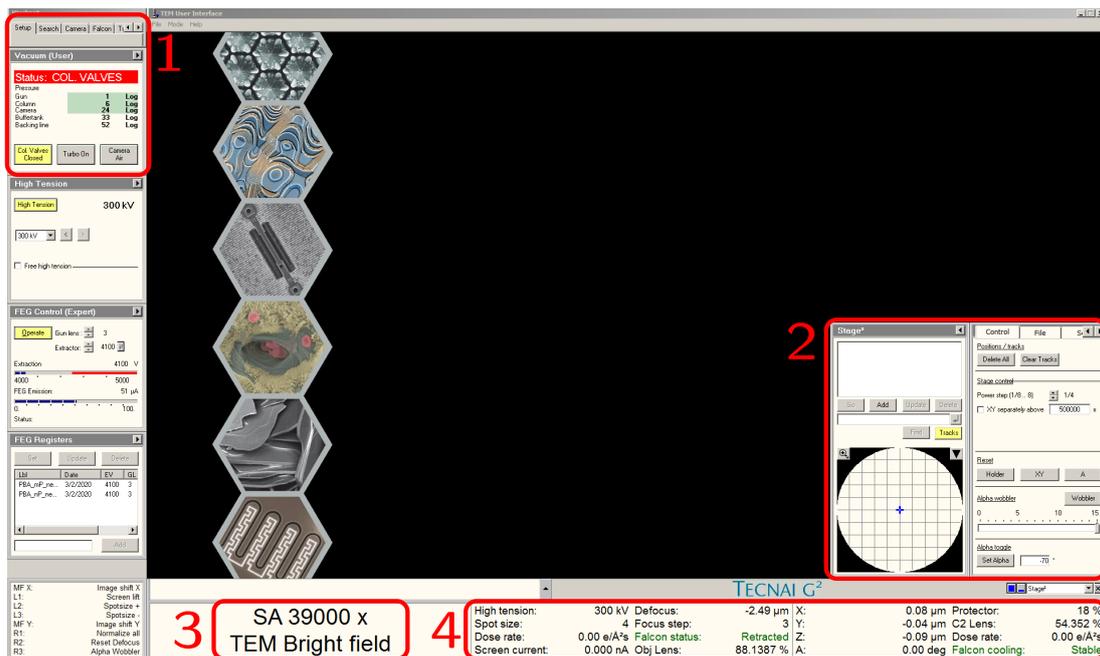


Abbildung 5: Überblick über die Steuerungssoftware des Elektronenmikroskops

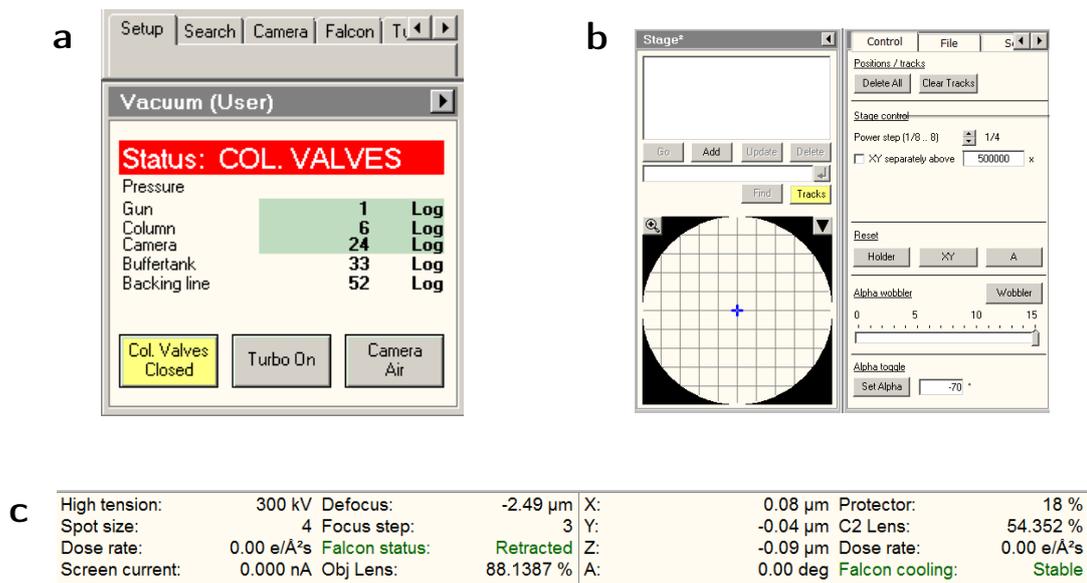


Abbildung 6: Überblick über die wichtigsten Komponenten der Steuerungssoftware des Mikroskops. a) Druckanzeigen und Kontrolle der Column Valves, b) Position und Einstellungen der Stage, c) wichtige Mikroskopeinstellungen

Abbildung 6a (1 in Abb. 5) zeigt den Status der Column Valves und eine Übersicht über die Drücke, die in dem Mikroskop herrschen (beachten Sie, dass es sich um logarithmische Angaben handelt). Die Column Valves sind Ventile, die die Gun vom Rest des Mikroskops trennen. Da die Gun besonders empfindlich gegenüber Einbrüchen des Vakuums ist, sollten die Column Valves daher nur geöffnet werden, wenn alle anderen Drücke in einem akzeptablen Bereich liegen. Die Druckangaben sind dann besonders wichtig, wenn Sie eine neue Probe in das Mikroskop geladen haben. Dabei wird es immer zu einem geringfügigen Einbruch des Vakuums kommen. Bevor Sie die Column Valves wieder öffnen können, muss der Druck in der Säule

(Column) niedriger als 10 Log sein.

Abbildung 6b (2 in Abb. 5) zeigt die aktuelle Position der Stage und erlaubt diesbezügliche Einstellungen. Der in Abbildung 5 mit 3 markierte Bereich zeigt Ihnen die aktuelle Vergrößerung des Mikroskops. Abbildung 6c (4 in Abb. 5) zeigt wichtige Parameter des Mikroskops. Die wichtigsten davon werden kurz erläutert:

- Spot size: Dieser Wert beeinflusst wie stark der Strahl zu Beginn fokussiert wird und regelt dadurch, wie viele Elektronen auf die Probe geleitet werden. (kleinerer Wert → mehr Elektronen)
- Defocus: gibt an, wie weit die Probe von der Fokusebene entfernt ist (Dieser Wert muss gut eingestellt werden, da der Benutzer ihn unabhängig von der tatsächlichen Position auf 0 setzen kann.)
- X,Y, Z, A: Hiermit wird die Position und die Neigung der Stage (und damit auch der Probe) angegeben.

Um die wichtigen Parameter des Mikroskops wie Spot size, Defocus, Stage Position usw. zu verändern, verwendet man zwei Bedienpaneele. Diese sind in Abbildung 7 dargestellt. Die wichtigsten Komponenten werden in der folgenden Auflistung erklärt:

- Multifunction X/Y: Die Multifunction Knöpfe werden ausschließlich für das Alignment des Mikroskops verwendet. Im Praktikum werden wir hiermit den beam shift und die pivot points alignieren.
- Intensity: Hierdurch kann eingestellt werden, in welchem Durchmesser der Strahl auf die Probe trifft (illumination area). Da die Gesamtzahl der Elektronen, die auf die Probe trifft, durch die Spot size bestimmt wird, verändern Sie dadurch auch die Intensität des Strahls (kleinerer Strahl → intensiverer Strahl)
- Magnification: Hiermit kann die Vergrößerung des Mikroskops eingestellt werden.
- Focus: Dieser Drehknopf besteht eigentlich aus zwei Knöpfen. Mit dem oberen können Sie den Focus (Defocus) einstellen. Der untere ermöglicht zu steuern, wie fein oder grob der obere Knopf arbeitet (focus step).
- Z axis: Mit diesen beiden Knöpfen kann die Stage nach oben oder nach unten bewegt werden. Ziel ist es, die Position so einzustellen, dass sich die Probe in der *euzentrischen Höhe* befindet. Ist die Probe euzentrisch, verändert sich der sichtbare Ausschnitt der Probe nicht, wenn die Stage gekippt wird. Zudem ist die euzentrische Höhe diejenige Referenzhöhe, auf die alle Linsen des Mikroskops optimal durch uns justiert (aligniert) sind.
- Joystick: Mit dem Joystick kann die Stage in der xy-Ebene bewegt werden, wodurch eingestellt werden kann, welcher Teil der Probe von dem Elektronenstrahl abgebildet wird.
- L1-L3 / R1-R3: Die Funktion dieser Knöpfe kann vom Benutzer frei belegt werden. Dadurch kann zum Beispiel die Spot size verändert werden. Im Praktikum werden Sie häufig L1 benötigen, da dadurch der Fluscreen gehoben bzw. gesenkt wird. Durch R3 wird der alpha wobbler aktiviert. In diesem Modus kippt die Stage zwischen -15° und 15° hin und her. Diese Funktion werden wir nutzen, um die euzentrische Höhe grob einzustellen.

Einige mechanische Einstellungen des Mikroskops müssen per Hand vorgenommen werden. Abbildung 8 zeigt das Elektronenmikroskop. Für den Versuch von höchster Relevanz ist die Objektivblende (Objektivapertur). Die Blende kann mittels des mechanischen Hebels aus dem Strahlengang bewegt werden. Dies ist



Abbildung 7: Bedienpulte die zur Steuerung des Mikroskops verwendet werden. a) linkes Bedienpult und b) rechtes Bedienpult

notwendig für kleine Vergrößerungen (LM-Modus; \leq ca. 2000x), da sonst das Bildfeld begrenzt wird. Die Größe der Apertur muss an das Experiment angepasst werden. An unserem Mikroskop stehen Objektivblenden mit Durchmessern von 10 μm , 20 μm , 40 μm und 100 μm zur Verfügung. Kleinere Objektivblenden bieten mehr Amplitudenkontrast (vgl. Abb. 3a), begrenzen jedoch die Auflösung. Dies wird ihnen experimentell in

fouriertransformierten Bildern demonstriert werden. Diese Zentrierung der Blende muss eingestellt werden.

Über der Objektivblende befindet sich die Blende des zweiten Kondensorlinsensystems (C2). Die C2-Blende (an unserem Mikroskop 50 μm , 70 μm , 100 μm und 150 μm verfügbar) bestimmt entscheidend die Beleuchtung und muss ebenfalls vor der Bildaufnahme zentriert werden. Die oberste Blende (Blende des ersten Kondensorlinsensystems (C1)) soll nicht von dem Nutzer verstellt werden. Die unterste Blende (SA, selective area) kann zur Kontrastgebung im LM-Modus verwendet werden.

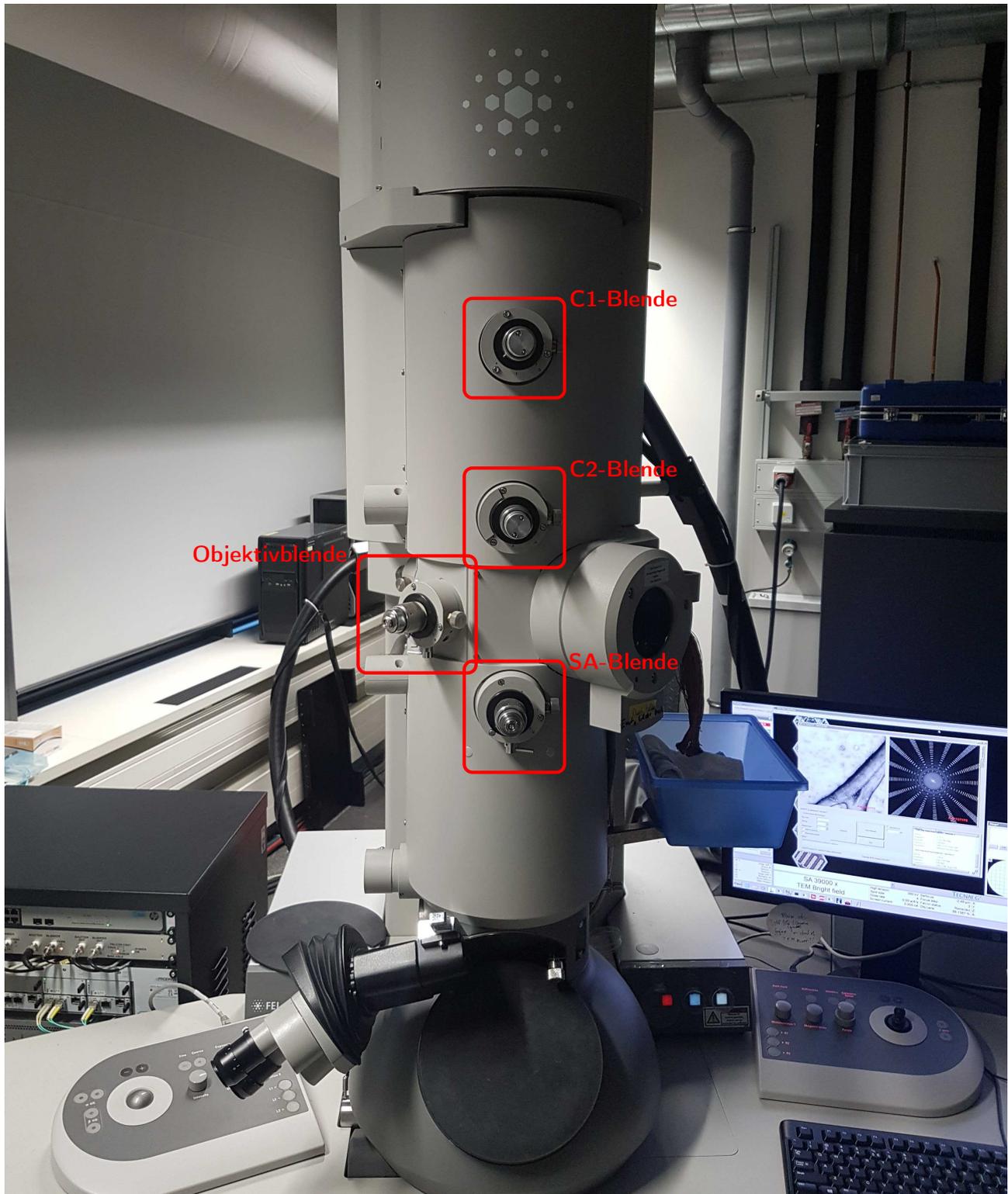


Abbildung 8: F30 Elektronenmikroskop; markiert sind die einzelnen Blenden des Mikroskops

Teil II

Datenprozessierung

4 Grundlagen

Im ersten Teil dieses Praktikumsversuchs haben Sie eine Probe von β -Galactosidase für das Elektronenmikroskop präpariert und Bilder von den Proteinen aufgenommen. In diesem Teil werden Sie die aufgenommenen Daten prozessieren um daraus eine Struktur des Proteins zu rekonstruieren.

Wichtige Informationen

Aufgrund der Covid-19 Situation können wir Ihnen keinen Computer-Arbeitsplatz in unseren Büros zur Verfügung stellen. Sie werden die Prozessierung in unserem Seminarraum an Laptops durchführen und sich für die Berechnungen mit unseren Hochleistungsrechnern verbinden.

Sollten Sie nicht die Möglichkeit haben für diesen Versuchsteil einen eigenen Laptop mitzubringen, so teilen Sie uns dies bitte schnellstmöglich mit, damit wir Ihnen für diesen Tag einen Laptop zur Verfügung stellen können.

Wenn Sie die Datenprozessierung an Ihrem eigenen Laptop durchführen möchten, dann stellen Sie bitte sicher, dass Sie die folgenden Programme installiert haben (Wenn Sie nicht Windows verwenden, dann kontaktieren Sie uns, damit wir absprechen können welche Software Sie sonst benötigen.):

1. Pulse Secure (beziehbar über Microsoft Store)
2. PuTTY
3. Xming
4. ChimeraX

Bei der Einzelpartikelanalyse wird erst einmal davon ausgegangen, dass die Proteine zufällig orientiert auf dem Grid liegen. In den aufgenommenen Daten finden sich also Projektionsbilder des Proteins (welche wir ab jetzt Partikel nennen werden) aus allen möglichen Projektionsrichtungen. Die Hauptaufgabe der Datenprozessierung ist es, die Position dieser Partikel auf den aufgenommenen Bildern zu bestimmen und die Projektionsrichtung für jeden einzelnen Partikel zu ermitteln. Mit diesen Informationen ist es dann möglich das ursprüngliche Objekt aus seinen Projektionsbildern zu rekonstruieren. Der prinzipielle Ablauf dieses Vorgehens ist in Abbildung 9 dargestellt. Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte eingegangen.

4.1 Datenimport / Bewegungskorrektur

Für die Prozessierung der Daten wird in diesem Versuch das Programm RELION (**RE**gularised **L**ikelihood **O**ptimisation) verwendet (Scheres, 2012). Der Punkt Datenimport ist offensichtlich trivial. Das Programm muss lediglich darüber informiert werden, wo die Daten zu finden sind, die prozessiert werden sollen.

Die Bewegungs-Korrektur der Daten hat in der heutigen Einzelpartikelanalyse eine große Bedeutung. Da dieser Schritt für den Praktikumsversuch allerdings nicht relevant ist, soll an dieser Stelle nur kurz darauf eingegangen werden. Während der Aufnahme eines Bildes im Elektronenmikroskop interagiert der Elektronenstrahl mit der Probe. Diese Interaktion führt unter anderem dazu, dass sich die Probe während der Aufnahme bewegt. Diese Bewegung während der Aufnahme sorgt für eine Bewegungsunschärfe der Bilder und stellt somit eine erhebliche Limitation der erreichbaren Auflösung dar. Die in Kapitel 1.1 erwähnte *resolution revolution* resultierte daraus, dass es gelang diese Bewegungsunschärfe zu korrigieren. Moderne

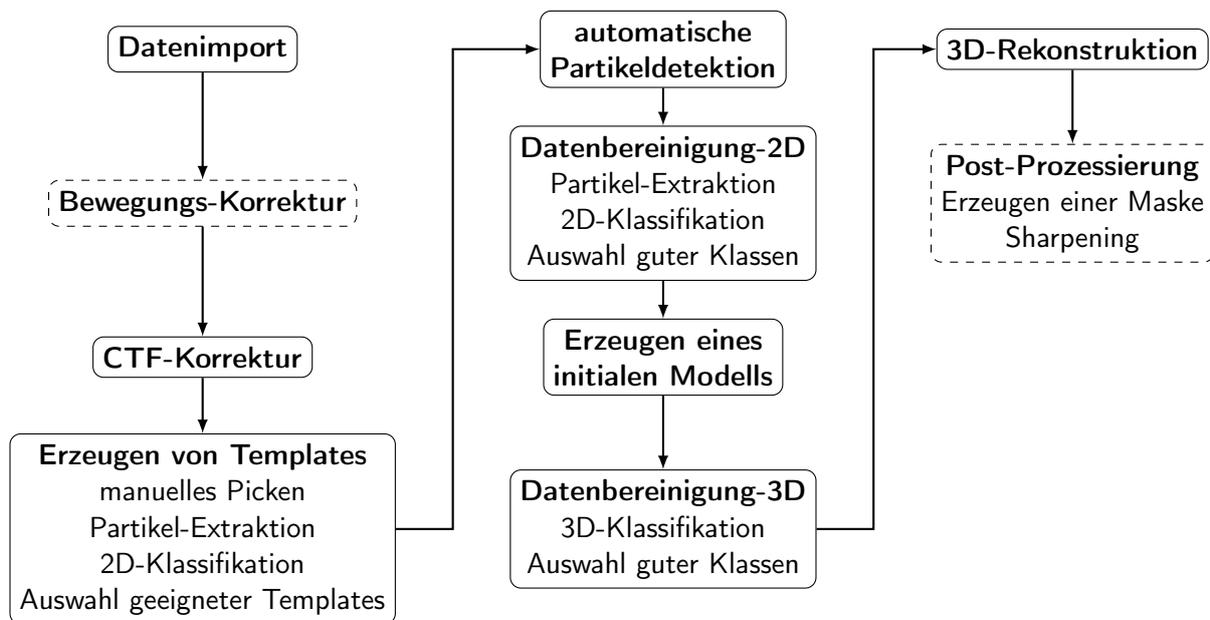


Abbildung 9: Prinzipieller Ablauf der Datenprozessierung bei einer Einzelpartikelanalyse von EM-Daten

Direkte-Elektronendetektoren sind in der Lage mit hoher Geschwindigkeit Bilder hintereinander aufzunehmen. Anstatt also während der Belichtungszeit ein Bild aufzunehmen, wird stattdessen eine ganze Serie von sehr kurzen Einzelbildern (ca. 0,2s) aufgenommen. Die Bewegungsunschärfe innerhalb jedes Einzelbildes kann dadurch auf ein Minimum reduziert werden. Bei der Bewegungskorrektur wird der Versatz zwischen den Einzelbildern einer Serienaufnahme ermittelt und korrigiert, bevor die Einzelbilder wieder zu einem Bild aufsummiert werden. Da die erreichbare Auflösung in diesem Versuch aber ohnehin dadurch limitiert ist, dass negative stain Daten aufgenommen werden, spielt die Bewegungskorrektur keine bedeutende Rolle.

4.2 CTF-Korrektur

In Kapitel 1.1 wurde bereits erwähnt, dass die elektromagnetischen Linsen in einem EM alles andere als perfekt arbeiten. Dieser Umstand führt dazu, dass nicht alle Informationen der Probe von einem Elektronenmikroskop gleich gut auf der Detektionsebene abgebildet werden. Berechnet man die Fourier-Transformation eines EM-Bildes lässt sich dies sehr deutlich daran erkennen, dass manche Bildfrequenzen sehr gut und andere sehr schlecht übertragen werden. Diese charakteristischen Muster werden auch Thon-Ringe genannt und sind beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt.

Diese Ringmuster beschreiben eine zweidimensionale gedämpfte Oszillation. Die Funktion die diese Oszillation beschreibt wird *contrast-transfer-function* (CTF) genannt. Bei der Prozessierung von EM-Daten ist es entscheidend diese CTF präzise zu bestimmen um den Effekt, dass nicht alle Bildfrequenzen gleich gut übertragen wurden, zu korrigieren. Die entscheidenden Parameter bei der Bestimmung der CTF sind der Defocus und der Astigmatismus. Je weiter entfernt vom Fokus die Bilder aufgenommen wurden, desto schneller oszilliert die CTF. Astigmatismus sorgt dafür, dass das CTF-Signal elliptisch ist (vgl. Abb. 10).

4.3 Manuelle / automatische Detektion von Partikeln

Gerade bei großen Datensätzen würde es viel zu viel Zeit in Anspruch nehmen alle Partikel manuell zu selektieren (picken). Es gibt daher Algorithmen, mit denen dies automatisch erfolgt. Im einfachsten Fall kann hierfür ein Gaus-Blob verwendet werden. Der Algorithmus versucht dann zu ermitteln, welche Teile

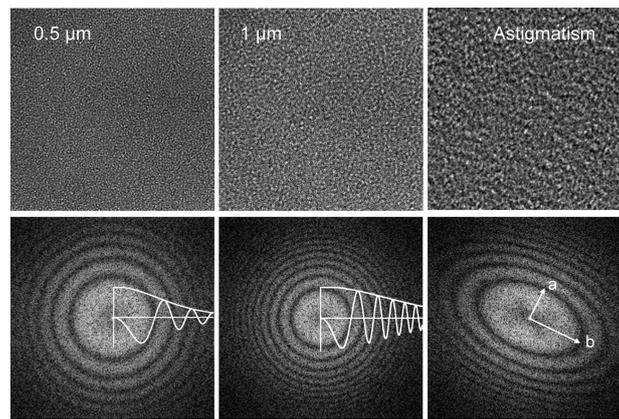


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Bilder und ihre Fourier-Transformationen bei unterschiedlichen Defoci und bei Fehlen/Vorliegen von Astigmatismus (Orlova & Saibil, 2011)

des Bildes gut mit diesem Blob korrelieren. Bei sehr guten Daten und relativ globulären Proteinen kann dies gut funktionieren. Es kann jedoch auch sein, dass dieser Algorithmus viele Partikel nicht pickt und viele falsch-positive Partikel pickt.

Eine etwas robustere Vorgehensweise verwendet daher Templates, welche aus manuell gepickten Partikeln generiert wurden. Der Algorithmus muss dann nur die Positionen auf den Bildern finden, welche den Templates ähnlich sehen. Hierfür werden manuell einige hundert Partikel gepickt, extrahiert und 2D-Klassifiziert. Bei einer 2D-Klassifikation werden die Partikel miteinander verglichen und es werden Gruppen von Partikeln gesucht, welche durch Translation und Rotation miteinander in Deckung gebracht werden können. Im Anschluss werden diese Gruppen aufsummiert, wodurch Bilder mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis entstehen. Dann werden die besten dieser 2D-Klassen für das automatische Partikel-Picken ausgewählt.

4.4 Datenbereinigung

Auch der Autopicking-Algorithmus mit Templates macht Fehler und pickt falsch-positive Partikel. Diese müssen aus dem Datensatz eliminiert werden. Im ersten Schritt werden die automatisch gepickten Partikel hierfür wieder extrahiert und 2D-Klassifiziert. Das Ergebnis sind idealerweise Klassen mit sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis welche Projektionen des Proteins widerspiegeln. Neben diesen guten Klassen wird es auch schlechte Klassen geben, welche aus falsch-positiven oder schlechten Partikeln bestehen und an dieser Stelle aus dem Datensatz eliminiert werden. Der auf diese Weise bereinigte Datensatz eignet sich dann für die 3D-Rekonstruktion. Es kann jedoch auch sein, dass nicht alle Partikel Projektionen von ein und der selben 3D-Struktur sind. Diese strukturelle Heterogenität kann daraus resultieren, dass das Protein in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, oder, dass z.B. einige Proteine noch einen zusätzlichen Faktor gebunden haben, während dies bei anderen nicht der Fall ist. Um diese strukturelle Heterogenität aufzulösen kann eine 3D-Klassifikation durchgeführt werden. Im Wesentlichen ähnelt dieser Schritt der 2D-Klassifikation mit der Ausnahme, dass nun für die Partikel außerdem ermittelt werden muss, welche Projektionsrichtung des Proteins sie repräsentieren. Um dies verlässlich machen zu können benötigt der Algorithmus daher eine 3D-Referenz um berechnete Projektionen dieser Referenz mit den Partikeln zu vergleichen. So eine 3D-Referenz kann im Idealfall aus den 2D-Daten *de novo* ermittelt werden. Der zugrundeliegende Algorithmus wird *stochastic gradient descent* (SGD) genannt. Die mathematischen Hintergründe dieses Algorithmus sind komplex. Im Wesentlichen ist SGD ein Optimierungs-Algorithmus welcher nach einem Minimum sucht und dabei versucht lokale Minima zu umgehen.

Wurde mit SGD eine gute 3D-Referenz ermittelt, kann durch die 3D-Klassifikation die strukturelle

Heterogenität aufgelöst werden. Dabei kann es sein, dass sich 3D-Klassen von *kaputten* Partikeln ergeben, bei welchen es so aussieht als fehlten Bestandteile des Proteins, und/oder es kann sein, dass sich mehr als eine gute 3D-Klasse ergibt, welche das Protein in unterschiedlichen Konformationen zeigt. Dieser bereinigte und/oder separierte Datensatz kann dann für die finalen Rekonstruktionen verwendet werden.

4.5 3D-Rekonstruktion und Post-Prozessierung

Der 3D-refinement Algorithmus ist das Herzstück von RELION. Der Algorithmus aligniert alle Partikel zu der Referenz, rekonstruiert eine Struktur und verfeinert diese Struktur iterativ. Während dieses Prozesses ermittelt der Algorithmus automatisch die aktuelle Auflösung der Struktur und gleicht die Sampling-Rate daran an, um die beste Kombination von Geschwindigkeit und Präzision zu gewährleisten. Der Algorithmus erkennt automatisch wenn er konvergiert hat und rekonstruiert die finale Struktur.

Zur Berechnung der Auflösung von EM-Strukturen wird eine sogenannte Fourier-Shell-Correlation (FSC) berechnet. Hierfür wird der Datensatz in zwei Hälften geteilt und es werden zwei unabhängige Strukturen rekonstruiert. Anschließend wird berechnet, wie gut die Fourier-Signale diese Strukturen korrelieren. Bei niedrigen Frequenzen (grobe Strukturen) wird die Korrelation sehr gut sein und dann bei höheren Frequenzen immer schlechter werden. Das aktuell gängige (und häufig sehr kontrovers diskutierte) Verfahren um die Auflösung zu bestimmen ist es, zu ermitteln bei welcher Frequenz/Auflösung die Korrelation schlechter als 0,143 wird.

Allerdings muss man bedenken, dass die Box, in der sich die rekonstruierte Struktur befindet, nicht vollständig mit der Proteinstruktur ausgefüllt ist. Der Rest der Box ist im Endeffekt mit zufälligem Rauschen gefüllt, welches logischerweise schlecht korreliert. Um die tatsächliche Auflösung des Proteins zu ermitteln, erzeugt man daher eine Maske, welche eng an der rekonstruierten Struktur anliegt, und führt die FSC-Berechnung nur für die Daten innerhalb der Maske durch. Neben dieser Maskierung findet während der sogenannten Post-Prozessierung auch noch eine B-Faktor Korrektur statt, welche als *sharpening* bezeichnet wird. In Abbildung 10 konnten Sie sehen, dass das CTF-Signal gedämpft ist und dass die hohen Frequenzen vom Mikroskop schlechter übertragen wurden als die niedrigen. Allerdings sind es gerade die hohen Frequenzen, welche besonders detaillierte Informationen der Struktur tragen. Beim sharpening wird daher der Abfall des CTF-Signals linear gefittet und die hohen Frequenzen werden in ihrer Intensität so verstärkt, dass alle Frequenzen in etwa die gleiche Intensität haben. Beide Aspekte der Post-Prozessierung spielen jedoch erst bei vglw. guten Auflösungen eine Rolle, welche mit dem Praktikumsversuch nicht erreicht werden können, weswegen dieser Schritt auch nicht durchgeführt wird.

5 Vorbereitung auf den Versuch

1. Wie ist der Zusammenhang zwischen der Pixelgröße eines Bildes und der theoretisch maximalen Auflösung der Informationen die aus diesem Bild generiert werden können?
2. Welchen Aspekt der Fourier-Transformation eines Bildes können Sie in einem Power-Spektrum nicht direkt beobachten? Können Sie dennoch Aussagen über diese *fehlenden* Informationen machen?
3. Was versteht man unter einem Hoch-, Tief- und Bandpass Filter? Erklären Sie kurz deren Bedeutung für die Bildverarbeitung.
4. Warum ist es für die Rekonstruktion von hochauflösenden Strukturen mittels Einzelpartikelanalyse wichtig, dass nicht alle Daten bei dem selben oder sehr ähnlichem Defocus aufgenommen wurden?

6 Durchführung

Da einige der Berechnungen von RELION ausgesprochen rechenintensiv sind, ist es notwendig, diese entweder auf Rechen-Clustern, oder auf speziellen Computern mit hochleistungs-Grafikkarten durchzuführen. Sobald Sie sich über VPN mit unserem Netzwerk verbunden haben, können Sie diese Computer mit Putty (oder einer anderen Linux-Shell) über SSH fernsteuern.

Verbindung zu GPU-Rechnern herstellen und RELION starten

Jeder von Ihnen wird eine eigene GPU-Maschine verwenden. Die folgende Liste zeigt Ihnen welche Maschinen in unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen und nennt Ihnen die IP-Adresse die Sie zum Herstellen der Verbindung brauchen. Sprechen Sie mit dem Betreuer welche Maschine aktuell frei ist und von Ihnen verwendet werden kann.

<u>GPU-Rechner</u>	<u>IP-Adresse</u>
android	10.10.12.144
vulcan	10.10.12.146
borg	10.10.12.149
romulan	10.10.12.151
klingson	10.10.12.153

Öffnen Sie Putty (oder eine andere Linux-Shell) und tragen Sie die IP-Adresse des Rechners ein den Sie verwenden sollen. Achten Sie darauf, dass Sie die Unterstützung für X11-Verbindungen aktivieren. Als Benutzername und Passwort verwenden sie 'student1' bzw. 'student2'. Um in einer shell das Arbeitsverzeichnis zu ändern verwenden Sie den Befehl 'cd' (change directory). Schreiben Sie 'cd /home/student1/PBP/SPA' (bzw. student2) und bestätigen Sie die Eingabe. Sobald Sie sich in diesem Ordner befinden, können Sie mit dem Befehl 'relion' die grafische Oberfläche des Programms öffnen.

Eine Übersicht der grafischen Oberfläche von RELION ist in Abbildung 11 dargestellt. Die wichtigsten Komponenten sind dort markiert und werden im Folgenden erklärt:

1. Liste der verfügbaren Jobs:

- Immer wenn Sie einen neuen Job starten wollen, wählen Sie den entsprechenden Eintrag in dieser Liste.

2. Alias-Feld:

- Wenn Sie einen neuen Job anlegen, dann sollten Sie ihm in diesem Feld einen Namen geben!

3. Display-Feld:

- Mit diesem Feld können Sie den relevanten Input/Output und das Logfile von jedem abgeschlossenen Job anzeigen.

4. Job-Übersicht:

- Diese Felder zeigen Ihnen die abgeschlossenen und aktuell laufenden Jobs an. Wenn Sie einen Job anklicken sehen Sie den zugehörigen Input/Output. Die beiden unteren Felder geben Informationen bzgl. des Fortschritts eines Jobs und evtl. auftretenden Fehlern. Zugriff auf relevanten Input/Output und das Logfile erhalten Sie über Feld # 3.

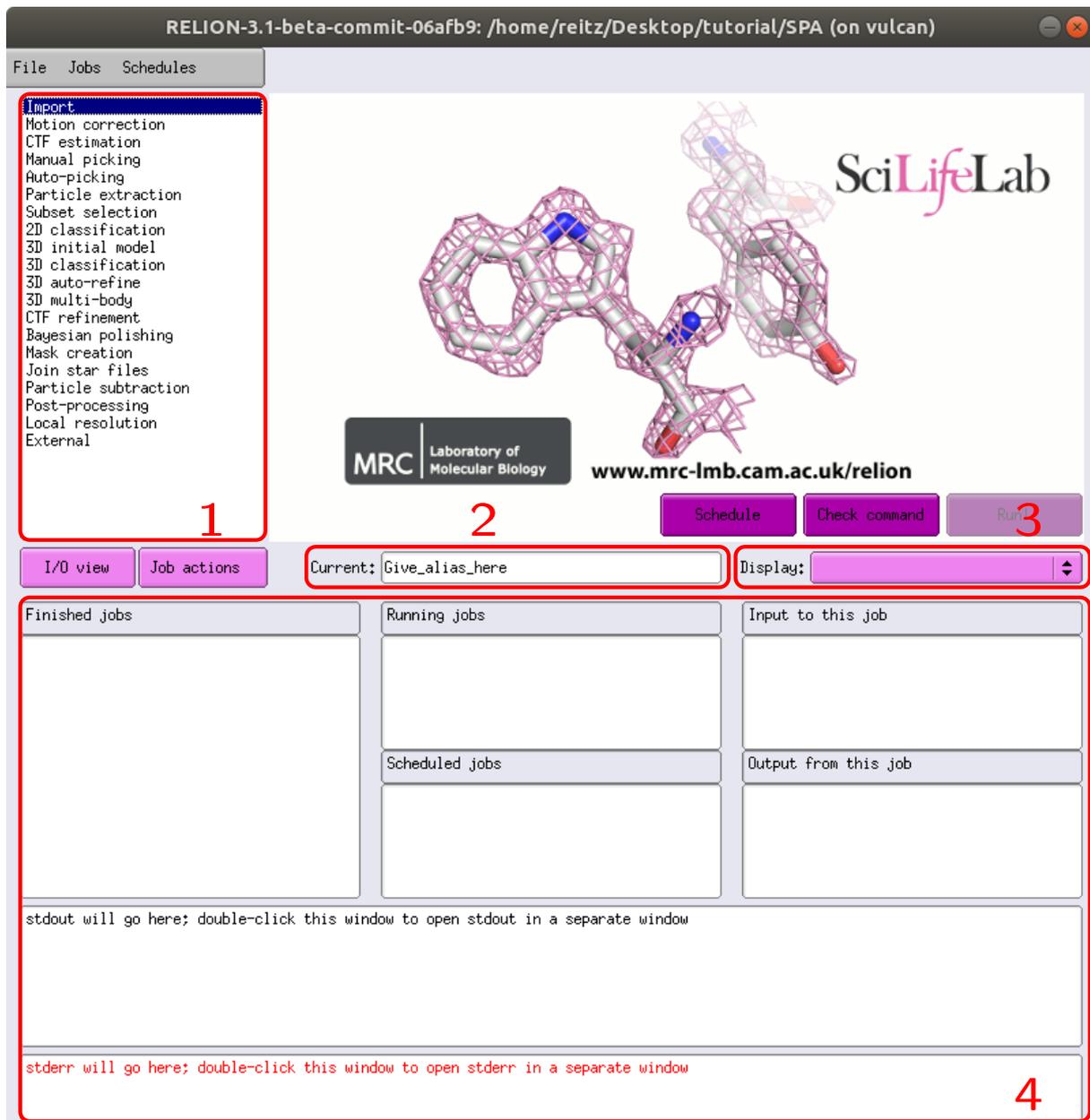


Abbildung 11: Grafische Benutzeroberfläche von RELION 3.1

Wichtige Informationen!

- Dieses Script wird Ihnen vorgeben welche Einstellungen Sie für die unterschiedlichen Jobs zu setzen haben. Input-Felder, die in diesem Script nicht erwähnt werden, müssen nicht beachtet werden und die Standardeinstellungen sollten nicht geändert werden.
- Immer wenn Sie einen neuen Job starten, sollten Sie in dem Alias-Feld (Feld #2) einen passenden Namen vergeben! Andernfalls werden Ihre Jobs job001, job002, job003, ... benannt und Sie verlieren vermutlich den Überblick. RELION benennt Jobs auf folgende Weise: Job-Typ/Alias; es ist daher nicht nötig einem Import-Job ein Alias wie 'Import' zu geben. Das Alias sollte vielmehr helfen zwischen unterschiedlichen Import-Jobs zu unterscheiden (e.g. Import/images; Import/reference).
- Sobald Sie alle notwendigen Einstellungen gemacht haben, starten Sie einen Job mit dem 'Run!'-Button.

- Wenn Sie das Gefühl haben, dass ein Job fertig ist, er aber noch in der Liste der laufenden Jobs angezeigt wird, versuchen Sie ihn anzuklicken. Wenn er wirklich fertig ist, sollte er dadurch in die Liste der fertigen Jobs verschoben werden.
- Die meisten Jobs erzeugen ein Logfile, welches interessante Informationen enthält. Wählen Sie einen Job in der Liste der fertigen Jobs aus und nutzen Sie das 'Display:' drop-down Menü (Feld #3) um das Logfile zu öffnen.
- Im Verlauf der Prozessierung wird es notwendig sein, dass Sie Befehle in der Shell ausführen. Die Shell erlaubt Ihnen Eingaben mit der 'Tab'-Taste Ihrer Tastatur automatisch zu vervollständigen.
Bsp.: Sie möchten das Programm 'relion_image_handler' ausführen. Sie starten die Eingabe mit 'relion_im' und drücken die 'Tab'-Taste. Die Shell wird den Eintrag vervollständigen, da es kein anderes Programm gibt, welches zu der initialen Eingabe passt. Dieses Prinzip funktioniert auch um einen Pfad zu vervollständigen wenn Sie mit dem 'cd'-Befehl zu einem anderen Ordner wechseln.

6.1 Datenimport und CTF-Korrektur

Importieren der Bilder

Starten Sie einen 'Import' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- Movies/mics-Tab:
 - Raw input files: Micrographs/*.mrc
 - Are these multi-frame movies?: No
 - Pixel size: 2.464
 - Spherical aberration: 1.4

CTF der Bilder ermitteln

Starten Sie einen 'CTF estimation' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input micrographs STAR file: Klicken Sie auf 'Browse' und wählen Sie die micrographs.star Datei des vorherigen Import-Jobs.
 - Use micrograph without dose-weighting: No
- CTFFIND-4.1-Tab:
 - Use CTFFIND-4.1: Yes
 - CTFFIND-4.1 executable: Suchen Sie nach der Datei und navigieren Sie in der Ordnerhierarchie zweimal nach oben (../), wählen Sie den Ordner 'ctffind4' und darin die Datei 'ctffind'.

- FFT box size: 1024
- Defocus step size: 100
- Running-Tab:
 - Number of MPI procs: 12

6.2 Partikel manuell generieren

Manuelles Picken der Partikel

Starten Sie einen 'Manual picking' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input micrographs: Klicken sie auf Browse und wählen Sie die micrographs_ctf.star Datei des vorherigen CtfFind jobs.
- Display-Tab:
 - Particle diameter (A): 250
 - Scale for micrographs: 0.2 (oder passen Sie den Wert an Ihren Monitor an)

Sobald Sie den Job gestartet haben öffnet sich eine Liste mit den verschiedenen Bildern. Klicken sie auf 'pick' neben einem der Bilder und beginnen Sie Partikel zu markieren. Wenn Sie eine gepickte Position wieder löschen wollen, klicken sie mit dem Mausrad darauf. Markieren Sie ungefähr 30 Partikel und speichern Sie Ihre Auswahl mit einem Rechtsklick auf das Bild → 'Save STAR with coordinates'!

Picken Sie insgesamt ungefähr 400 Partikel. Versuchen Sie auf den meisten Bildern zu picken und versuchen Sie unterschiedliche Blickwinkel der Partikel zu picken! Sobald Sie damit fertig sind können Sie die Liste einfach schließen.

Manuell gepickte Partikel extrahieren

Starten Sie einen 'Particle extraction' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - micrograph STAR file: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die micrographs_ctf.star Datei des CtfFind Jobs.
 - Input coordinates: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die coords_suffix_manualpick.star Datei des vorherigen ManualPick Jobs.
- Extract-tab:
 - Particle box size: 220
 - Invert contrast?: No
 - Diameter background circle: -1

6.3 Generieren von Templates für die automatische Partikel-Detektion

2D Klassifikation zur Generierung von Templates für das Auto-Picking

Starten Sie einen '2D classification' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input images STAR file: Klicken sie auf Browse und wählen Sie die particles.star Datei des vorherigen Extract jobs.
- CTF-Tab:
 - Ignore CTF until first peak?: Yes
- Optimisation-Tab:
 - Number of classes: 8
 - Mask diameter: 300
- Compute-Tab:
 - Pre-read all particles into RAM: Yes
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-Tab:
 - Number of MPI procs: 9
 - Number of threads: 4

Sobald der Job fertig ist müssen Sie die generierten 2D-Klassen inspizieren und diejenigen auswählen, die sich als Templates für das Auto-Picking eignen.

Auswahl guter 2D-Klassen als Templates für das Auto-Picking

Starten Sie einen 'Subset selection' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Select classes from model.star: suchen Sie nach der run_it025_model.star Datei des vorherigen Class2D jobs

Stellen Sie sicher, dass in dem Dialog der sich öffnet 'Max. nr. images:' auf -1 gesetzt ist und drücken Sie 'Display'. Selektieren Sie jetzt in etwa 5 gute Klassen. Gut bedeutet, dass Sie guten Kontrast haben, keine Artefakte in der Umgebung aufweisen und nicht verschmiert aussehen. Versuchen Sie so viele verschiedene Blickwinkel wie möglich auszuwählen. Fragen Sie den Betreuer nach Hilfe wenn Sie sich nicht sicher sind!

Speichern Sie Ihre Auswahl mit einem Rechtsklick → Save selected classes

6.4 Partikel automatisch generieren

Automatisches Picken der Partikel mithilfe der generierten Templates

Starten Sie einen 'Auto-Picking' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input micrographs for autopick: Suchen sie nach der micrographs_ctf.star Datei des CtfFind Jobs.
 - 2D references: Suchen Sie nach den selektierten 2D-Klassen des vorherigen Select Jobs.
- References-Tab:
 - References have inverted contrast?: No
 - Ignore CTFs until first peak?: Yes
- autopicking-Tab:
 - Picking threshold: 0.5
 - Minimum inter-particle distance: 110
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-Tab:
 - Number of MPI procs: 4

Sobald das Picking fertig ist, selektieren Sie den Job in der Liste der fertigen Jobs. In dem Display-Feld (#3 / mittig-rechts in der RELION GUI) wählen Sie 'out: coords_suffix_autopick.star'. Dadurch öffnet sich eine ähnliche Liste wie Sie sie während dem manual Picking hatten. Sie können diese Liste nutzen, um die Ergebnisse des Auto-Pickings zu inspizieren. Der Großteil aller Partikel sollte nun auf jedem Bild markiert sein. Sind Sie zufrieden mit den Ergebnissen? Wenn Sie den Eindruck haben, dass zu viele/wenige Partikel gepickt wurden, dann starten Sie einen zweiten Auto-Picking Job und verändern Sie den threshold dementsprechend.

Automatisch gepickte Partikel extrahieren

Starten Sie einen 'Particle extraction' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - micrograph STAR file: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die micrographs_ctf.star Datei des CtfFind Jobs.
 - Input coordinates: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die coords_suffix_autopick.star Datei des vorherigen AutoPick Jobs.
- Extract-tab:
 - Particle box size: 220
 - Invert contrast?: No

6.5 Datenbereinigung 2D

2D Klassifikation um schlechte Partikel nach dem Auto-Picking zu entfernen

Starten Sie einen '2D classification' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input images STAR file: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die particles.star Datei des vorherigen Extract Jobs.
- CTF-Tab:
 - Ignore CTFs until first peak?: Yes
- Optimisation-Tab:
 - Number of classes: 35
 - Mask diameter: 300
- Compute-Tab:
 - Pre-read all particles into RAM: Yes
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-Tab:
 - Number of MPI procs: 9
 - Number of threads: 4

Sobald der Job fertig ist inspizieren Sie die Ergebnisse und entfernen Sie die Klassen mit schlechten Partikeln.

Auswahl von guten 2D-Klassen um schlechte Partikel zu entfernen

Starten Sie einen 'Subset selection' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Select classes from model.star: Suchen Sie nach der run_it025_model.star Datei des vorherigen Class2D Jobs.

Klicken Sie in dem geöffneten Dialog 'Sort images' on 'rlnClassDistribution' und 'Reverse sort' und stellen Sie sicher, dass 'Max. nr. images' und 'Max nr selected parts per class' auf -1 gesetzt sind und dass 'Nr. columns' in der Gegend von 5 bis 10 ist und drücken Sie 'Display'. Wählen Sie jetzt alle guten Klassen. Sie müssten sehen können, dass alle Klassen im oberen Bereich gut sind. Ab einem gewissen Punkt sehen Sie, dass die Klassen schlechter werden. Markieren Sie alle Klassen oberhalb dieses Punkts (wenn Sie einen Rechtsklick machen gibt es die Option 'Select all classes above') und alle einzelnen guten Klassen bzw. deselektieren Sie einzelne schlechte Klassen. Speichern Sie Ihre Auswahl mit einem Rechtsklick → 'Save selected classes'

6.6 Datenbereinigung 3D

Generierung einer 3D Referenz aus den Daten

Starten Sie einen '3D initial model' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input images STAR file: Suchen Sie nach der particles.star Datei des vorherigen Select Jobs.
- CTF-Tab:
 - Ignore CTFs until first peak?: Yes
- Optimization-Tab:
 - Number of classes: 1
 - Mask diameter: 300
- SGD-tab:
 - Number of initial iterations: 25
 - Number of in-between iterations: 100
 - Number of final iterations: 25
- Compute-tab:
 - Pre-read all particles into RAM: Yes
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-tab:
 - Number of MPI procs: 9
 - Number of threads: 4

Dieser Job dauert relativ lange. Nutzen Sie die Zeit für eine Pause und/oder diskutieren Sie mit dem Betreuer offene Fragen. Sobald der Job fertig ist, müssen Sie untersuchen, ob das Ergebnis akzeptabel ist. Starten Sie das Programm 'ChimeraX' und öffnen Sie die Datei 'run_it300_class001.mrc' des vorherigen InitialModel Jobs. Untersuchen Sie das Volumen und versuchen Sie die Frage zu beantworten, ob diese Struktur zu Projektionen führen kann, die Sie beim Picken und bei den 2D-Klassifikationen gesehen haben. Sollte dies der Fall sein, haben Sie ein gutes initiales Modell. Falls nicht, sprechen Sie mit dem Betreuer. Sollte ihr Modell wirklich nicht gut genug sein, wird er Ihnen ein geeignetes zur Verfügung stellen.

3D-Klassifikation um strukturelle Heterogenität aufzulösen

Starten Sie einen '3D classification' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input images STAR file: Klicken Sie auf Browse und wählen Sie die particles.star Datei des letzten Select Jobs

- Reference map: Suchen Sie nach Ihrem initialen Modell oder verwenden Sie die Referenz die Sie vom Betreuer erhalten haben
- Reference-tab:
 - Ref. map is on absolute greyscale: Yes
 - Initial low-pass filter: 50
- CTF-tab:
 - Has reference been CTF-corrected: Yes
- Optimisation-tab:
 - Number of classes: 4
 - Number of iterations: 35
 - Mask diameter: 300
- Compute-tab:
 - Pre-read all particles into RAM: Yes
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-tab:
 - Number of MPI procs: 9
 - Number of threads: 4

Das Ergebnis dieses Jobs sind vier density maps (`run_it035_class00X.mrc`), welche Sie wieder in ChimeraX betrachten können. Nachdem die Klassen in ChimeraX geöffnet wurden, sind diese alle überlagert und sie können vermutlich nicht viel erkennen. Je nachdem wie Sie die Klassen geöffnet haben, haben diese nun die IDs 1-4 oder 1.1-1.4. Geben Sie folgenden Befehl in der Kommandozeile von ChimeraX ein: `'tile #1 #2 #3 #4'` bzw. `'tile #1'`. Jetzt können Sie die Strukturen gut vergleichen. Erkennen Sie Unterschiede? Sie können den Threshold und die Farbe der Maps im 'Volume Viewer' verändern. Wenn Sie den Eindruck haben, dass einzelne oder mehrere Klassen schlecht sind, dann können Sie diese aus dem Datensatz entfernen, indem Sie in RELION einen neuen 'Subset selection' Job mit der `'run_it035_model.star'` starten. Wählen Sie dann nur die Klassen aus, die Sie behalten möchten.

6.7 Berücksichtigung von Symmetrie

Viele Proteine weisen Symmetrie auf, da sie aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind (homo-multimers). Die Tatsache, dass ein Protein aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist, bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass das Protein auch symmetrisch ist. Es könnte genauso gut sein, dass einige Untereinheiten in einem anderen Zustand / einer anderen Konformation vorliegen als die anderen. Wenn ein Protein symmetrisch ist, dann kann es jedoch einen massiven Einfluss auf die Rekonstruktion von Strukturen aus EM-Daten haben, wenn man diese Information ausnutzt. Ein Beispiel: Wenn ein Protein eine C3-Symmetrie hat, dann bedeutet dies, dass drei identische Untereinheiten um eine Rotationsachse herum angeordnet sind. Nutzt man diese Information für die Rekonstruktion, so muss der Algorithmus nur die Struktur einer dieser Untereinheiten lösen, kann dafür aber die Informationen von allen verfügbaren Untereinheiten verwenden. Effektiv

steht dem Algorithmus in diesem Fall also die dreifache Menge an Partikeln zur Verfügung. Andererseits kann es auch zu schlechteren Strukturen führen, wenn Sie eine Symmetrie angeben, die nicht wirklich vorhanden ist und der Algorithmus versucht unterschiedliche Strukturen in eine einzige zu 'quetschen'.

Es ist daher äußerst wichtig, etwas Zeit zu investieren um sich mit der Suche nach Symmetrie zu beschäftigen. Schauen Sie sich ihre beste 3D-Klasse an und versuchen Sie zu erkennen, ob irgendeine Symmetrie vorliegt. Sprechen Sie auch mit den Betreuern darüber.

Vorbereitung der Daten auf die Anwendung von Symmetrie

Wenn Sie denken, dass Sie eine Symmetrie gefunden haben und diese bei der Berechnung Ihrer finalen Rekonstruktion berücksichtigen möchten, dann ist es notwendig die Referenz entsprechend dieser Symmetrie auszurichten. RELION stellt hierfür ein simples Script zur Verfügung.

Öffnen Sie eine neue shell und navigieren Sie ('cd') zu dem Ordner der 3D-Klassifikation. Bsp.:

```
cd SPA/Class3D/jobXXX/
```

Dann können sie das Script 'relion_align_symmetry' verwenden, um Ihre beste 3D-Klasse auszurichten. (Je nachdem welche Symmetrie Sie verwenden möchten, müssen Sie den Parameter 'C2' in dem Beispiel verändern.) Bsp.:

```
relion_align_symmetry --i run_it035_class00X.mrc --o aligned.mrc --sym C2
```

Nachdem die Referenz zu der gewählten Symmetrie orientiert wurde, müssen Sie diese wieder in RELION importieren. Starten Sie einen neuen 'Import' job und nutzen Sie die folgenden Parameter:

- Movies/mics-Tab:
 - Import raw movies/micrographs: No
- Others-Tab:
 - Import other node types: Yes
 - Input file: Suchen Sie die orientierte Referenz. Wenn Sie dem Beispiel gefolgt sind, heißt die Datei 'aligned.mrc' und sollte in dem Ordner der 3D-Klassifikation liegen.
 - Node type: 3D reference (.mrc)

6.8 3D-Refinement

3D auto-refinement zur Rekonstruktion der finalen Struktur

Starten Sie einen '3D auto refine' Job, indem Sie auf den entsprechenden Eintrag in der Liste der verfügbaren Jobs klicken. Nutzen Sie die folgenden Einstellungen:

- I/O-Tab:
 - Input images STAR file: suchen Sie nach einer der folgenden Dateien:
 - * alle 3D-Klassen nutzen: run_it035_data.star von dem Class3D Job

- * selektierte 3D-Klassen nutzen: particles.star von dem letzten select job
- Reference map: suchen Sie nach einer der folgenden Dateien:
 - * Refinement ohne Symmetrie: Ihre beste 3D-Klasse; run_it035_class00X.mrc von dem Class3D Job
 - * Refinement mit Symmetrie: die importierte ausgerichtete Referenz
- Reference-Tab:
 - Ref. map is on absolute greyscale: Yes
 - Initial low-pass filter: 50
 - Symmetry: Falls Sie keine Symmetrie gefunden haben oder glauben, dass das Protein keine echte Symmetrie hat, nutzen Sie 'C1'. Andernfalls nutzen Sie die Symmetrie die Sie mit den Betreuern besprochen haben und die Sie für die Orientierung der Referenz verwendet haben.
- CTF-Tab:
 - Has reference been CTF-corrected: Yes
- Optimisation-Tab:
 - Mask diameter: 300
- Compute-Tab:
 - Pre-read all particles into RAM: Yes
 - Use GPU acceleration: Yes
- Running-Tab:
 - Number of MPI procs: 9
 - Number of threads: 4

Sobald der Job fertig ist, schauen Sie sich die Struktur in ChimeraX an (run_class001.mrc). Nutzen Sie den Regler im 'Volume Viewer' um den Threshold zu ändern. Welche Auflösung hat RELION für die Struktur angegeben?

Versuchen Sie die PDB Struktur des Proteins in die Map zu fitten (Befehl 'open 3i3e'). Wie Sie sehen werden, sind Struktur und Map nicht richtig ausgerichtet. Um die Struktur in die Map zu fitten, verwenden Sie den folgenden Befehl: 'fitmap #X inMap #Y search 1' (X ist die ID der PDB Struktur und Y die der Map). Nun sollten Struktur und Map gut aligniert sein. Falls der Fit fehlschlägt, versuchen Sie den search-Wert auf 2 zu erhöhen.

In einigen Fällen kann es passieren, dass es nicht möglich ist die PDB und die Map zu alignieren. Der Grund dafür ist, dass es sein kann, dass RELION die Struktur gespiegelt rekonstruiert hat. Um dies verständlich zu machen: Halten Sie ihre Hände so nebeneinander, dass die Daumen beide nach links oder rechts zeigen. Wenn Sie jetzt durch die beiden Hände projizieren würden, so würden die Projektionsbilder identisch aussehen. Wenn Sie ein 3D-Objekt aus 2D-Projektionen rekonstruieren, kann es daher passieren, dass das 3D-Objekt gespiegelt rekonstruiert wird (rechte Hand statt linker). RELION hat ein simples Script, um dieses Problem zu lösen. Öffnen Sie eine shell und navigieren Sie zu dem Ordner des 3D-Refinement

jobs. Führen Sie dann den folgenden Befehl aus, öffnen Sie die gespiegelte Map in ChimeraX und alignieren Sie die PDB zu der gespiegelten Map.

```
relion_image_handler --i run_class001.mrc --o mirrored.mrc --invert_hand
```

Durch den mehr oder weniger perfekten Fit können Sie vermutlich nicht mehr viel von der PDB-Struktur sehen. Nutzen Sie den Befehl 'transparency 50', um die Transparenz der Map auf 50% einzustellen. Nun sollten Sie die Qualität des Fits von PDB und Map gut sehen können.

Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1), 413–468. Zugriff unter <https://doi.org/10.1007/BF02956173>
- Bhushnan, S. (2017). Basics and progress of single particle reconstructions with cryo-EM (3DEM). Zugriff 28. Oktober 2020 unter https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/courses/embo2017/slides/EMBO_cryoEM_1_Bhushan.pdf
- Cremer, C. (2011). Lokalisationsmikroskopie - Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. *Phys Unserer Zeit*, 1(42), 21–29. doi:<https://doi.org/10.1002/piuz.201101251>
- Egerton, R. F. (2005). *Physical principles of electron microscopy*. New York: Springer.
- Franken, L. E., Grünewald, K., Boekema, E. J. & Stuart, M. C. A. (2020). A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter: Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments. *Small*, 16(14), 1906198. doi:10.1002/sml.201906198
- Kühlbrandt, W. (2014). The Resolution Revolution. *Science*, 343(6178), 1443–1444. doi:10.1126/science.1251652
- Liu, Y., Huynh, D. T. & Yeates, T. O. (2019). A 3.8 Å resolution cryo-EM structure of a small protein bound to an imaging scaffold. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-09836-0
- Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M. G. E., . . . Scheres, S. H. W. (2020). Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*. doi:10.1038/s41586-020-2829-0
- Orlova, E. V. & Saibil, H. R. (2011). Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. *Chemical Reviews*, 111(12), 7710–7748. doi:10.1021/cr100353t
- Rose, H. H. (2008). Optics of high-performance electron microscopes. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(1). doi:<https://doi.org/10.1088/0031-8949/9/1/014107>
- Ruska, E. (1932). Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78, 318–339.
- Sawada, H., Shimura, N., Hosokawa, F., Shibata, N. & Ikuhara, Y. (2015). Resolving 45-pm-separated Si–Si atomic columns with an aberration-corrected STEM. *Microscopy*, 64(3), 213–217.
- Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F. & Iadaza, M. G. (2018). Variations on Negative Stain Electron Microscopy Methods: Tools for Tackling Challenging Systems. *Journal of Visualized Experiments*, (132). doi:10.3791/57199
- Scheres, S. H. W. (2012). A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination. *Journal of Molecular Biology*, 415(2), 406–418. doi:10.1016/j.jmb.2011.11.010