

Elektronenmikroskopische 3D-Strukturbestimmung makromolekularer Komplexe

Holger Stark

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Kryo-Elektronenmikroskopie – Wieso, weshalb, warum ...?

► In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass einzeln agierende Proteine im normalen „Alltag“ einer Zelle eher die Ausnahme als die Regel darstellen. Mehr als zwei Drittel aller Proteine agieren in makromolekularen Komplexen, bestehend aus im Mittel zwölf einzelnen Proteinen^[1]. Die Funktionsweise solch makromolekularer „Maschinen“ verstehen zu lernen, ist eine große Herausforderung in der Biologie. Das Beispiel des bakteriellen Ribosoms hat eindrucksvoll gezeigt, dass trotz aller technischer Schwierigkeiten selbst hochaufgelöste, röntgenkristallographische Strukturbestimmungen großer makromolekularer Komplexe möglich sind^[2]. Im Vergleich zum Ribosom sind jedoch die meisten makromolekularen Komplexe nur in deutlich geringerer Konzentration in der Zelle zu finden, wodurch die Aufreinigung ausreichender Probenmengen erschwert

wird. Zusätzliche Probleme, wie eine ausgeprägte strukturelle Dynamik dieser „Maschinen“ in Verbindung mit der aufwändigen Probenisolation, lassen die routinemäßige Bestimmung röntgenkristallographischer Strukturen somit eher unwahrscheinlich erscheinen. Als Alternative zur röntgenkristallographischen Strukturbestimmung bietet sich in vielen Fällen die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) an. Bei dieser hier vorgestellten Einzelpartikelmethode werden aus mehreren Tausend elektronenmikroskopischen Projektionsbildern eines makromolekularen Komplexes, dessen dreidimensionale Struktur mit Hilfe computergestützter Bildverarbeitungs-Methoden rekonstruiert (Abb. 1). Die erforderliche Probenmenge ist dabei um 2–3 Größenordnungen geringer als üblicherweise in der Röntgenkristallographie benötigt wird. Der vielleicht größte Vorteil der Kryo-EM ist zudem, dass die aufwändige Kristallisation der Makromoleküle entfällt. Instru-

mentelle Entwicklungen und verbesserte computergestützte Bildverarbeitungs-Methoden haben zudem dazu beigetragen, die Auflösung kryo-elektronenmikroskopisch ermittelter 3D-Strukturen im Laufe der letzten Jahre kontinuierlich zu verbessern. Diese liegen momentan in einem Bereich von ca. 6–30 Å^[3–5] und selbst weitere Auflösungsverbesserungen liegen technisch noch im Bereich des Möglichen^[6, 7].

Historie

Das erste Elektronenmikroskop wurde 1931 von Ernst Ruska entwickelt^[8], wofür dieser 1986 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Einige instrumentelle Entwicklungsstufen später gelang seinem Bruder Hermann Ruska die erstmalige Visualisierung von Viren^[9]. Die erste quantitative Arbeit zur Rekonstruktion der 3D-Struktur eines Virus aus elektronenmikroskopischen Projektionsbildern von de Rosier und Klug erschien erst im Jahre 1966^[10] und eröffnete den weiteren Weg zur kontinuierlichen Verbesserung der Strukturbestimmungstechnik. In den darauffolgenden Jahren waren es die Kombination aus computergestützten Verfahren^[6, 11, 12], die Entwicklung der Kryo-Präparation^[13] und die stetige Verbesserung der Mikroskope, aus denen sich die leistungsstarke Methode der Einzelpartikel-Kryo-EM für die dreidimensionale Strukturanalyse großer Makromoleküle entwickelt hat.

Grundlagen der Einzelpartikelmethode

Das grundlegende Prinzip der Einzelpartikel-Kryo-EM ähnelt der Computer-Tomographie, wie sie im medizinischen Bereich angewandt wird. Beiden Methoden ist gemein, dass die Struktur eines dreidimensionalen Objekts aus zweidimensionalen Projektionsbildern rekonstruiert wird. Einer der Hauptunterschiede zwischen Computer-Tomographie und Kryo-Elektronenmikroskopie ist jedoch der große Rauschanteil in kryo-elektronenmikroskopischen Rohbildern (Abb. 1, 2). Zudem sind die Winkelbeziehungen von Projektionsbildern einzelner Moleküle durch deren willkürliche Anordnung im Präparat unbekannt und müssen *a posteriori* berechnet werden^[12]. Prinzipiell handelt es sich beim Elektronenmikroskop um ein nahezu ideales Instrument zur Erstellung von zweidimensionalen Projektionsbildern. Die Information über die dritte Dimension im Objekt geht dabei nicht vollständig verloren, sondern bleibt im Projektionsbild als Bildpunkte mit unterschiedlicher Helligkeit erhalten. Vereinfacht ausgedrückt, wird der elektronenmikroskopische Projektionsprozess zur Berechnung

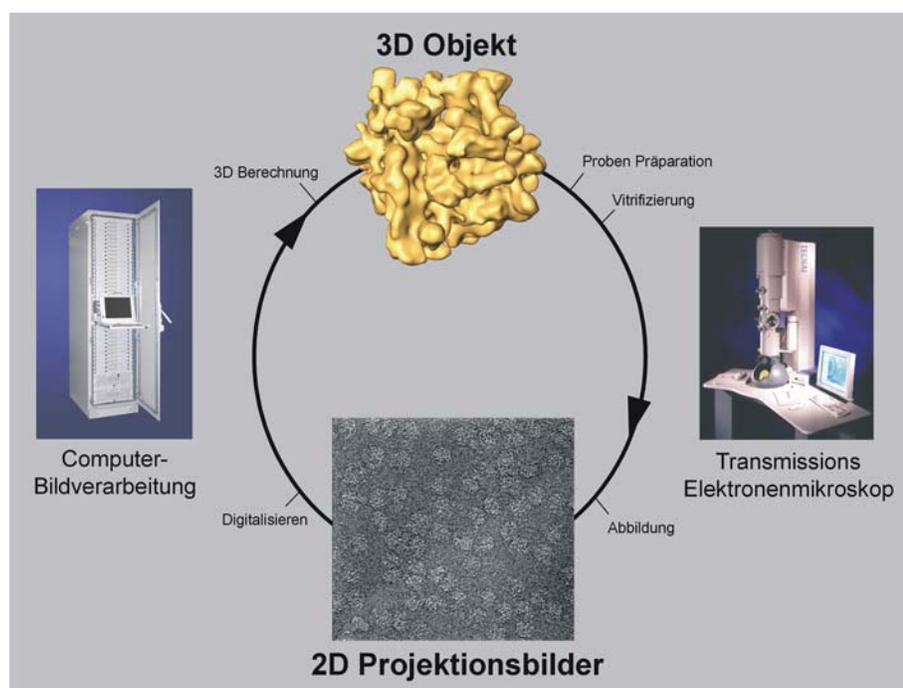


Abb. 1: Schematische Darstellung der 3D-Strukturbestimmung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie. In vitrifiziertem Eis eingebettete Proben werden im Elektronenmikroskop bei tiefer Temperatur abgebildet und anschließend die dreidimensionale Struktur des Objektes mit computergestützter Bildverarbeitung rekonstruiert.

der dreidimensionalen Struktur im Computer wieder rückgängig gemacht, und somit die dreidimensionale Struktur des Objektes rekonstruiert (Abb. 1). Die Information im Projektionsbild wird dabei unter dem entsprechenden Projektionswinkel in den 3D Raum einprojiziert. Insgesamt wird so eine dreidimensionale Dichteverteilung des Proteinkomplexes berechnet, die den Blick ins Innere und damit den Aufbau der makromolekularen Komplexe ermöglicht. Der eigentliche Gewinn dieser zyklischen Operation aus elektronenmikroskopischer Projektion und computergestützter „Back“-Projektion liegt in der heute erreichbaren hohen Vergrößerung/Auflösung moderner Elektronenmikroskope und ermöglicht so das Erreichen von zum Teil sehr hochauflösenden 3D Strukturen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen biologischer Makromoleküle sind notorisch verrauscht und verlangen dem ungewohnten Betrachter einige Vorstellungskraft ab, was die Eignung derartigen Bildmaterials für die Berechnung von 3D Strukturen betrifft. Dem hohen Rauschanteil der Bilder begegnet man in der Praxis damit, dass mit einer Vielzahl einzelner Bilder (5.000–100.000) gearbeitet wird. Die Einzelbilder werden zueinander ausgerichtet, um mit verschiedenen Verfahren wiederkehrende Muster in den Bildern zu erkennen^[11]. Diese Methoden werden eingesetzt, um Moleküle, die unter gleichen Projektionswinkeln abgebildet wurden, zu erkennen, zu klassifizieren und zu mitteln. Durch das Mitteln von 5–30 einzelner verrauschter Bilder des gleichen Objektes, steigt das Signal im Bild schneller als das zufällig verteilte Rauschen. Die gemittelten Bilder – so genannte Klassensummen – zeigen daher die verschiedenen „Ansichten“ des Moleküls mit stark verbessertem Signal zu Rauschen Verhältnis (Abb. 2). Diese Klassensummen werden anschließend eingesetzt, um deren noch unbekannte Winkelbeziehung zu berechnen (angular reconstitution^[12]). Eine erste 3D Struktur des Objektes kann dann für eine bessere Ausrichtung der Rohbilder oder der verbesserten Genauigkeit der relativen Winkelbestimmung eingesetzt werden, was wiederum zu einer Verbesserung der berechneten 3D Struktur führt. Dieser iterative Charakter der Bildverarbeitung führt letztlich zur Berechnung einer stabilen 3D Struktur mit möglichst kleinem Fehler.

Strukturen – Beispiele

Eine Besonderheit der Methode ist die schnelle Art der Probenpräparation. Gewöhnlich werden die Proben in einer dünnen, nur einige 100 Å dicken Schicht aus schockgefrorenem Puffer, präpariert (Vitrifi-

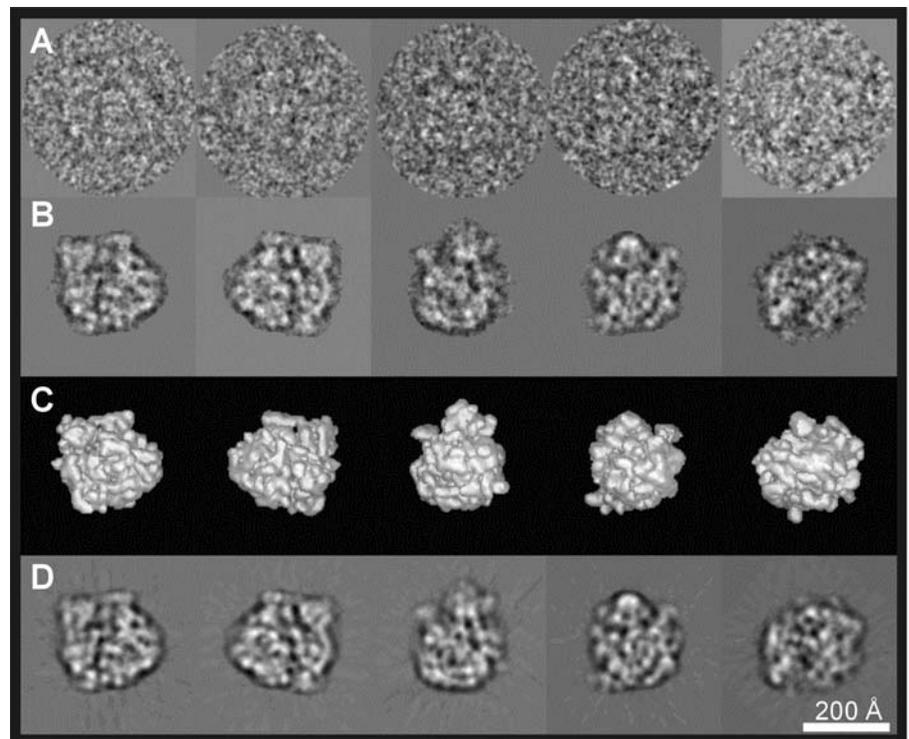


Abb. 2: Galerie der einzelnen Bildverarbeitungsschritte. (A) Stark verrauschte Rohbilder von 70S Ribosomen aus *E. coli*. (B) Verbesserung des Signal zu Rauschen Verhältnisses durch Mittelung von jeweils 10–20 Einzelbilder. (C) Oberflächenansichten der 3D Struktur des Ribosoms entsprechend der Projektionsrichtung der Rohbilder. (D) Rückprojektion der 3D Struktur in Richtung der Projektionsrichtung.

zierung). Da die Herstellung einer Probe für die Elektronenmikroskopie auf diese Art und Weise nur wenige Sekunden dauert, können auch relativ instabile makromolekulare Komplexe (z.B. in funktionell definierten Stadien) sehr schnell präpariert und der Strukturuntersuchung zugänglich gemacht werden. Als Beispiel sei hier das Ribosom genannt. Die hochauflösenden Strukturen ribosomaler Untereinheiten wurden mit Hilfe der Röntgenkristallographie bestimmt^[2]. Funktionelle Zwischenstadien des Ribosoms während der Translation konnten bislang jedoch ausschließlich mit elektronenmikroskopischen Methoden bestimmt werden. Die funktionell höchst relevanten Bindungsstellen der Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G wurden so beispielweise lokalisiert^[14, 15] (Abb. 3).

Das Spleißosom und seine Komponenten, die so genannten snRNPs, sind weitere Beispiele für makromolekulare Komplexe, deren Strukturen zur Zeit ausschließlich mit der Methode der Kryo-EM untersucht werden können. Strukturen des U1 snRNP^[16], des Proteinkomplexes SF3b^[17] und des spleißosomalen B Komplex^[18] konnten mit dieser Methode bislang bestimmt werden (Abb. 3). Befindet sich die erreichte Auflösung im Bereich von ~10 Å, können bereits einige Proteine mit bekannter Struktur im Gesamtkomplex direkt lokalisiert werden. Sind zudem weitere strukturelle und bio-

chemische Daten über die Komplexe vorhanden, lassen sich unter Berücksichtigung aller verfügbaren Daten, die komplizierten 3D-Puzzle der Zusammensetzung der Komplexe zumindest teilweise lösen. Auf diese Art und Weise wurde zum Beispiel die Anordnung von Proteinen und RNA im U1 snRNP bestimmt^[16] (Abb. 3).

Die Dynamik makromolekularer Komplexe erschwert die dreidimensionale Strukturbestimmung in erheblicher Weise. Im Bereich der Röntgenkristallographie können konformationelle Flexibilitäten bei der Kristallisation sehr hinderlich sein oder diese komplett verhindern. Eine inhomogene Mischung von im Elektronenmikroskop abgebildeten Makromolekülen erschwert ebenfalls die Strukturbestimmung mittels Kryo-EM. Im Allgemeinen gilt, dass inhomogene Proben zu relativ schlecht aufgelösten 3D Strukturen führen. Strukturell schlecht definierte Bereiche resultieren in einem „Aus-schmieren“ der 3D Dichte, was letztlich eine Limitierung der Auflösung zur Folge hat. Diese „Problemzonen“ können jedoch, wie am Beispiel des Spleißosoms^[18] gezeigt werden konnte, über Bildverarbeitungsmethoden lokalisiert werden und bieten somit die Möglichkeit, selbst bei niedriger Auflösung noch wichtige Information über den Aufbau und die Dynamik des untersuchten Komplexes zu gewinnen.

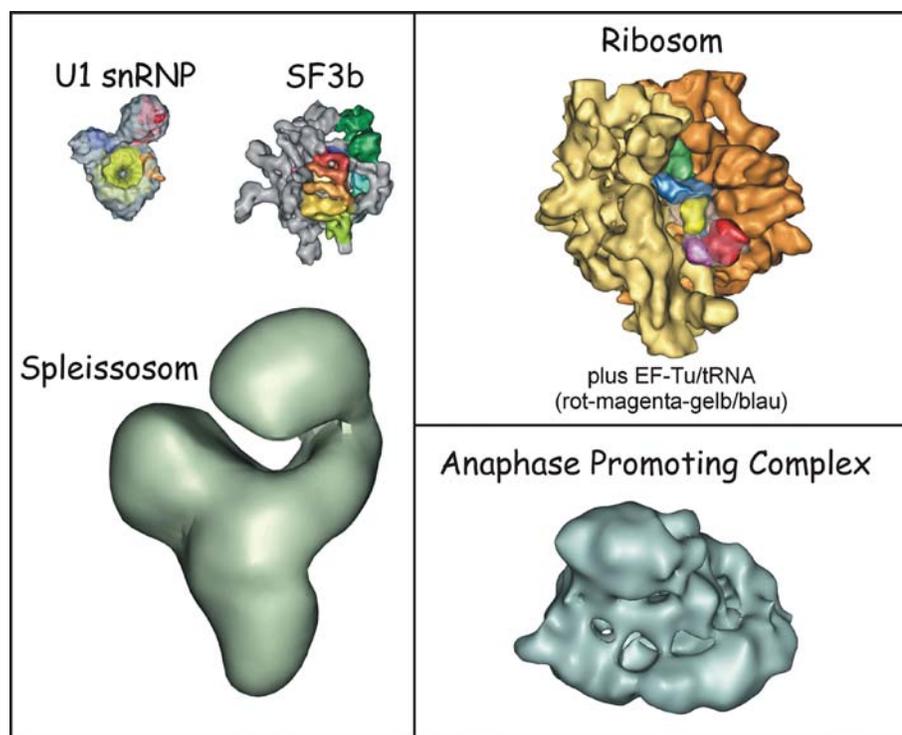


Abb. 3: Beispiele für Kryo-EM 3D Strukturen von snRNPs^[6,7] und Spleißosom^[8], 70S Ribosom^[9] und des Anaphase Promoting Complex^[19]. Farbig hervorgehobene Bereiche in den Abbildungen können bestimmten Proteinen/RNA in den Komplexen zugeordnet werden.

Limitierungen und Perspektiven

Die Methode der Einzelpartikel-Kryo-EM ermöglicht selbst dann die Strukturbestimmung großer makromolekularer Komplexe, wenn diese nur in geringen Mengen aufgereinigt werden können. In vielen Fällen ist die Auflösung der Strukturen durch die strukturelle und konformationelle Inhomogenität der Proben limitiert. Eine theoretisch mögliche Verbesserung der Auflösung auf <5 Å erfordert daher hervorragende Probenqualität von Makromolekülen, die sich alle in demselben funktionellen und strukturellen Zustand befinden. Dies ist in der Praxis kaum zu erreichen, weshalb die meisten Strukturen von Makromolekülen auch in absehbarer Zukunft noch in ihrer Auflösung limitiert sein dürften. Erst wenn es gelingt die Bilder einer inhomogenen Probe im Computer in homogenere Subpopulationen aufzutrennen, bestünde die Möglichkeit, die momentan erreichbaren Auflösungen weiter zu verbessern. Dafür bedarf es sowohl einer deutlich höheren Partikelstatistik, als auch neuer Bildverarbeitungsmethoden, die eine derartige *in silico* Aufreinigung der Makromoleküle bewerkstelligen können. Sollte diese Auftrennung funktionieren, würde die Einzelpartikel-Kryo-EM damit nicht nur prinzipiell höhere Auflösungen, sondern auch Untersuchungen der Dynamik von makromolekularen Komplexen ermöglichen.

Genau diese Einblicke in die konformationelle Umwandlung makromolekularer Maschinen während des Funktionszyklus werden benötigt, um Aufbau und Funktion auf molekularer Ebene verstehen zu können. Die strukturelle Untersuchung makromolekularer „Maschinen“ wird somit eine zentrale Fragestellung in der Biologie der nächsten Jahrzehnte bleiben.

Literatur

- [1] Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., et al. (2002): Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147.
- [2] Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.
- [3] Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jiang, W., Dougherty, M., Jakana, J., Dong, G., Lu, G., and Chiu, W. (2001): Electron cryomicroscopy and bioinformatics suggest protein fold models for rice dwarf virus. *Nat Struct Biol* 8, 868–873.
- [4] Bottcher, B., Wynne, S. A., and Crowther, R. A. (1997): Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386, 88–91.
- [5] Stark, H. (2002): Three-dimensional Electron Cryomicroscopy of Ribosomes. *Current Protein and Peptide Science* 3.

[6] van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E. V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M., and Patwardhan, A. (2000): Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys* 33, 307–369.

[7] Henderson, R. (1995): The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q Rev Biophys* 28, 171–193.

[8] Knoll, M., and Ruska, E. (1932): Das Elektronenmikroskop. *Z Physik* 78, 318–339.

[9] von Borries, B., Ruska, E., and Ruska, H. (1938): Bakterien und Virus in übermikroskopischer Aufnahme. *Klin Wochenschr* 1938, 921–925.

[10] Klug, A., and De Rosier, D. J. (1966): Optical filtering of electron micrographs: reconstruction of one-sided images. *Nature* 212, 29–32.

[11] Frank, J., and van Heel, M. (1982): Correspondence analysis of aligned images of biological particles. *J Mol Biol* 161, 134–137.

[12] van Heel, M. (1987): Angular reconstitution: A posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* 21, 95–100.

[13] Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowell, A. W. (1984): Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308, 32–36.

[14] Stark, H., Rodnina, M. V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., and van Heel, M. (1997): Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. *Nature* 389, 403–406.

[15] Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1998): Visualization of elongation factor G on the Escherichia coli 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6134–6138.

[16] Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R., and Kastner, B. (2001): Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 409, 539–542.

[17] Golas, M. M., Sander, B., Will, C. L., Luhrmann, R., and Stark, H. (2003): Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science* 300, 980–984.

[18] Boehringer, D., Makarov, E. M., Sander, B., Makarova, O. V., Kastner, B., Luhrmann, R., and Stark, H. (2004): Three-dimensional structure of a pre-catalytic human spliceosomal complex B. *Nat Struct Mol Biol* 11, 463–468.

[19] Gieffers, C., Dube, P., Harris, J. R., Stark, H., and Peters, J. M. (2001): Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Mol Cell* 7, 907–913.

Korrespondenzadresse:

Dr. Holger Stark
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11
D-37077 Göttingen
Tel.: 0551-201 1305
Fax: 0551-201 1197
hstark1@gwdg.de
www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/103/