

Proteine in Eis

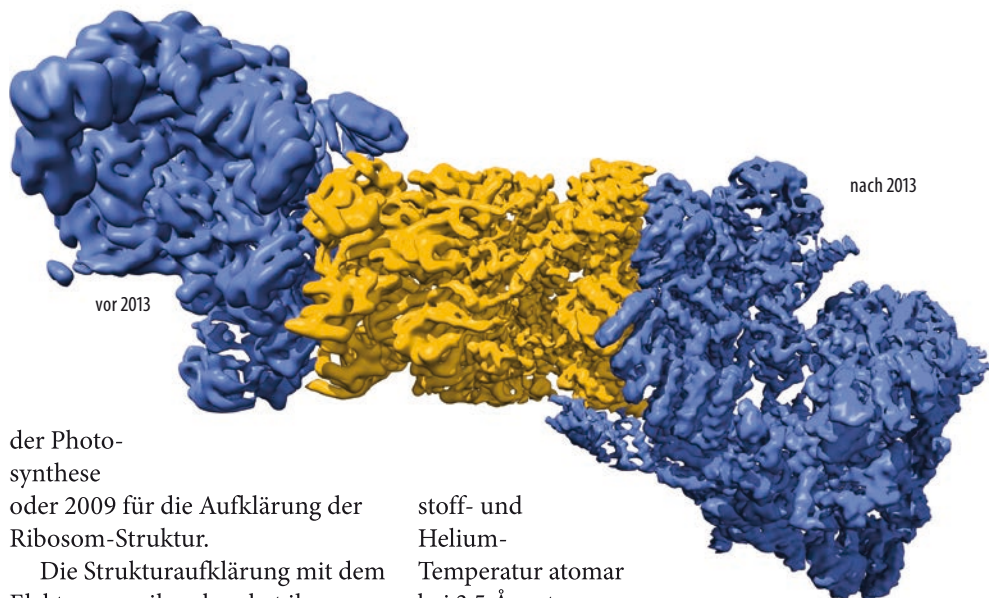
Der Chemie-Nobelpreis würdigt Entwicklungen der Kryo-Elektronenmikroskopie für die Proteinstrukturanalyse.

Jürgen Plitzko

Der Nobelpreis für Chemie geht zu gleichen Teilen an Joachim Frank, Jacques Dubochet und Richard Henderson für ihre Arbeiten zur Kryo-Elektronenmikroskopie an Biomolekülen in Lösung. Diese Methode erlaubt es, mit Transmissions-Elektronen-Mikroskopen (TEM) makromolekulare Komplexe und Proteine in wässriger Umgebung mit atomarer Auflösung abzubilden.

Die Chemie-Nobelpreisträger sind von Haus aus Physiker, die sich durch ihre Arbeit für ein biophysikalisches Verfahren verdient gemacht haben: Richard Henderson bewies, dass Hochauflösung an Biomolekülen möglich ist. Jacques Dubochet entwickelte eine Kryo-Präparationsmethode, mit der sich Biomoleküle tiefgefroren in wässriger Umgebung im Elektronenmikroskop untersuchen lassen. Joachim Frank leistete wichtige methodische Beiträge in der elektronenmikroskopischen Bildverarbeitung für die Einzelpartikelanalyse. Diese Pionierarbeiten liegen über 30 Jahre zurück. Seitdem hat sich die Strukturforschung mit dem Elektronenmikroskop weiterentwickelt. Der Durchbruch gelang vor etwa vier Jahren. Hier möchte ich die Hintergründe und Vorgeschichte dieser Erfolge auch aus persönlicher Perspektive beleuchten.

Die Strukturaufklärung von Biomolekülen ist eine klassische Domäne der über hundert Jahre alten Röntgen-Kristallographie. In den 1950er-Jahren war ihre Geburtsstunde mit der Aufklärung der Struktur der DNA sowie der von Haemoglobin und Myoglobin, die 1962 zu zwei Nobelpreisen führte. Weitere Nobelpreise mit Bezug zu den diesjährigen Preisträgern folgten, etwa 1988 für die Erforschung des Reaktionszentrums



der Photosynthese oder 2009 für die Aufklärung der Ribosom-Struktur.

Die Strukturaufklärung mit dem Elektronenmikroskop hat ihren Anfang in der Analyse von zweidimensionalen Proteinkristallen. Richard Henderson benutzte diese Art der Strukturbestimmung für Bakteriorhodopsin, ein integrales Membranprotein, das Grundlage für die Photosynthese bei Archaeen ist. Zusammen mit Nigel Unwin gelang es ihm 1975, die Struktur von Rhodopsin mit einer Auflösung von 7 Ångström abzubilden [1]. Um den 2D-Kristall für die Untersuchungen im Hochvakuum des TEMs zu stabilisieren, verwendeten sie Glucose als nichtflüchtigen Wasserersatz. Bereits ein Jahr zuvor hatten Ken Taylor und Bob Glaeser in Berkeley erste Experimente an 2D-Proteinkristallen (Katalase) unter Verwendung konstanter Probenkühlung durchgeführt [2]. Strenggenommen stammte also die erste hochaufgelöste Struktur von Bakteriorhodopsin von Nigel und Richard nicht von Biomolekülen in Lösung oder aus der Kryo-EM, sondern wurde bei Raumtemperatur entschlüsselt. Erst Jahre später konnte Richard Henderson mit Kollegen aus Cambridge, Berlin und Berkeley einen 2D-Kristall von Bakteriorhodopsin bei Stick-

stoff- und Helium-Temperatur atomar bei 3,5 Ångström auflösen [3]. Diese Arbeit war ein erster wichtiger Schritt zur Strukturaufklärung von Proteinen mit dem Elektronenmikroskop. Bald war aber klar, dass sich nur wenige Proteine in eine zweidimensionale kristalline Ordnung „zwingen“ lassen und dass eine breite Anwendung dieses Verfahrens eher unwahrscheinlich ist.

Die Arbeit von Unwin und Henderson fand in zwei Nobelpreisen Erwähnung: 1982 bei Aaron Klug und 1988 bei Hartmut Michel, Johann Deisenhofer und Robert Huber, die für ihre Beiträge zum Reaktionszentrum der Photosynthese (einschließlich Bakteriorhodopsin) geehrt wurden. Ursprünglich brachte Hartmut Michel besagtes Rhodopsin in den 1970er-Jahren als 2D-Kristall nach Cambridge, um zusammen mit Henderson erste EM-Studien durchzuführen.

2004 begegnete ich Richard Henderson zum ersten Mal in Cambridge. Er hatte Wolfgang Baumeister, seit 1988 Direktor am MPI für Biochemie, eingeladen, der mich gebeten hatte, ihn zu begleiten. Anlass des Treffens waren Gespräche über die künftige Entwick-

Dieses zusammengesetzte Bild des 26S Proteasomes zeigt, wie sich die Auflösung in der Kryo-EM verbessert hat. Die „Blob“-ähnliche Darstellung links [19] repräsentiert den Stand der Technik vor 2013. Rechts sind detaillierte Strukturinformationen sichtbar [20].

Prof. Dr. Jürgen Plitzko, Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried



Der „Eismann“ Jacques (links) hört auf einem Meeting 2009 gespannt Richards Ausführungen zu „Elektronen-Angler“ Richard (Mitte) tischt sein bestes „Ang-



lerlatein“ auf, zu dem Joachim (rechts), der Sommelier, den besten Weißwein serviert. Das Foto zeigt ihn bei einem Meeting 2008.



1) Zu den Partnern zählen das Rutherford Appleton Laboratory (Didcot bei Oxford), die Max-Planck-Gesellschaft mit den Abteilungen von Wolfgang Baumeister (Martinsried) und Werner Kühlbrandt (Frankfurt) sowie die Firma FEI (Eindhoven).

2) Dieses EU-finanzierte „Network of Excellence in three-dimensional electron microscopy (3DEM)“ begann 2004 und endete 2009.

lung neuer Detektoren, die Elektronen direkt registrieren können. Richards Idee war, eine Initiative zu gründen, um das Projekt finanziell und akademisch zu unterstützen. Seitdem besteht das Konsortium unter seiner Federführung.¹⁾

Genau diese Art der Detektoren hat die „Resolution Revolution“ in der Kryo-EM ausgelöst [4]. Sie erlaubt es heute, atomar aufgelöste Strukturen von Proteinkomplexen dreidimensional abzubilden und zu entschlüsseln. Die „klassische“ Bildaufzeichnung auf fotografischen Filmen oder mit digitalen Kameras erfolgt durch Konversion des Signals der Elektronen in Licht, d. h. indirekt. Die „zerstörerische“ Kraft der schnellen Elektronen erforderte dieses Vorgehen, verringerte aber das Auflösungsvermögen erheblich, und vor allem die Registrierempfindlichkeit. Lange galt es als unwahrscheinlich, eine Lösung für die Strahlenschädigung zu finden. Doch mit zunehmender Miniaturisierung in der Chip- und in CMOS-Technologie und mit zunehmender Prozessor- und Rechenleistung schien es möglich, das Elektronensignal direkt nachzuweisen.

Das Geheimnis der heutigen direkten Elektronen-Detektoren liegt im CMOS-Pixeldesign, das durch eine hohe Strahlungsbeständigkeit und Auslesegeschwindigkeiten von bis zu 1000 Bildern pro Sekunde charakterisiert ist. Letzteres erlaubt es, Proben- und Strahlbewegungen zu korrigieren und einzelne auf-

treffende Elektronen zu zählen, was unmittelbar zur Signalverstärkung und Bildverbesserung führt [5].

2004 traf ich auch Jacques Dubochet zum ersten Mal, der mit uns Partner in einem EU-Projekt war.²⁾ Zu der Zeit gab es erneut Anstrengungen, die Kryo-Elektronenmikroskopie bei Helium-Temperatur zu testen. Auch unsere Martinsrieder Gruppe beteiligte sich, und ich fand in Dubochet einen erfahrenen und kritischen Ansprechpartner und Lehrmeister. Bereits in den 1960er-Jahren gab es die Idee, Helium-Kühlung einzusetzen, um die Strahlenschädigung hinauszuzögern. Humberto Fernández-Morán, einer der Vorreiter, prägte den Begriff „Cryo-Electron Microscope“ [6]. In den 1970/80er-Jahren setzte Siemens die Helium-Kühlung in Mikroskopen um. Jacques Dubochet, zu dieser Zeit am EMBL in Heidelberg (unter der Leitung von Sir John Kendrew), und Erwin Knapik, Doktorand bei der Siemens AG München, begaben sich auf die Suche nach diesem „Kryo-Protektionsfaktor“. 1980 veröffentlichten sie ihr Ergebnis: eine etwa 100-fach reduzierte Strahlenschädigung bei 4 K gegenüber Raumtemperatur [7]. Dieser „Befund“ ließ sich jedoch nicht bestätigen, und 1982 erschien in Nature die korrigierende Stellungnahme „Cryo-EM: Fading Hopes“ [8].

Wie konnte es dazu kommen? Um die dosisabhängige Strahlenschädigung zu bestimmen,

beobachtet man die Intensitätsabnahme der Beugungsreflexe eines definierten Kristallbereichs. Doch dabei kam es unbemerkt zu einer Probenbewegung, d. h. zur Bestrahlung wechselnder Bereiche, und damit zu einer verfälscht hohen Protektionsfaktor. Wie wir heute wissen, ist dieser bei 4 K viel geringer und die Kühlung mit flüssigem Stickstoff viel praktikabler [9].

Erfolgreicher Kälteeinbruch

1972 zeigte Don Parsons, dass vollständig hydratisierte Katalase-Kristalle selbst bei Raumtemperatur Elektronen zu hoher Auflösung beugen [10]. Er verwendete eine „Klimakammer“, um das Wasser im Mikroskop zu erhalten. Taylor und Glaeser wiederholten dieses Experiment 1974 mit einer gefrorenen Katalase-Probe und einem Kryohalter [2]. Sie erzielten die gleiche Auflösung mit einem viel praktischeren Aufbau. Zudem zeigten sie 1976, wie man erfolgreich gefrorene Proben herstellen und unter Kryobedingungen untersuchen kann [11]. Jacques Dubochet ließ sich davon inspirieren. Zusammen mit Alasdair McDowell entwickelte er einen Apparat zum kontrollierten Einfrieren biologischer Proben.

1981 war die Geburtsstunde des „Plunge-Freezings“, des schnellen Einfrierens und der Konversion von flüssigem Wasser in festes, aber amorphes Eis, dem Vitrifizieren

[12]. Dies war der Beginn der Kryo-EM, wie wir sie heute kennen, der Untersuchung von vitrifizierten biologischen Proben bei konstanter Probenkühlung mit dem TEM. Jacques und Alasdair versuchten, ihre wegweisende Präparationsmethode bei Nature zu publizieren, doch ohne Erfolg. Wohl ein unglücklicher Umstand, denn kurze Zeit später erschien in Nature ein Artikel von Erwin Mayer und Peter Brüggeler aus Innsbruck über die Vitrifizierung von Wasser [13].

Erst kürzlich hat Jacques seine Geschichte in einem sehr lebendigen Vortrag in Lausanne erzählt. Ich hatte die Ehre, mit meinem anschließenden Vortrag den Bogen zur heutigen Kryo-EM zu spannen. Jacques erzählte mir, dass er sich demnächst mit Erwin Knapek in München treffen werde, um an gemeinsamen Memoiren zu arbeiten.

Mitteln mit Methode

Joachim Franks Promotion führte ihn ans ehemalige Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München, heute Teil des MPI für Biochemie in Martinsried. Seine Doktorarbeit fertigte er in der Abteilung Strukturforschung von Walter Hoppe an. Hoppe (1917 - 1986) war Kristallograph und ein Wegbereiter der 3D-Strukturforschung mit dem Elektronenmikroskop [14]. Mit seiner Gruppe entwickelte er die ersten Methoden zur Strukturaufklärung nicht-periodischer Objekte. Zwar hat Walter Hoppe keinen Nobelpreis bekommen, aber zwei seiner Doktoranden: Robert Huber 1988 und jetzt Joachim Frank. Zu Hoppes Zeit befand sich die Rekonstruktion molekularer Strukturen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von zufällig orientierten „einzelnen Partikeln“ in den Kinderschuhen [15]. Meist waren es rein konzeptionelle Überlegungen, und es gab unterschiedliche Auffassungen über die Vorgehensweise, so zur „tolerierbaren“ Elektronendosis oder über das Konzept des Mittels von Partikeln. In den folgenden Jahrzehnten entwickelte sich die Einzel-

partikelanalyse dank des „Arbeitspferdes“ Ribosom weiter [16].

Genau diese Arbeiten am Ribosom waren es, die mich mit Joachim in Kontakt gebracht haben. Während einer Diskussion am NIH in Bethesda im Sommer 2005, an der auch Joachim und Tom Steitz teilnahmen, sah letzterer die Zukunft der Strukturaufklärung mit der Kryo-EM eher skeptisch. Zwar war zu jener Zeit Subnanometer-Auflösung in der Einzelpartikelanalyse üblich. Meist blieb die Auflösung aber hinter dem zurück, was für den Aufbau atomarer Modelle nötig ist. Dennoch war die Kryo-EM sehr dienlich: Im Fall des Ribosoms erwies sich die Kryo-EM-Struktur der 50S-Untereinheit als Schlüssel zur Lösung des Phasenproblems für die Röntgen-Strukturbestimmung [17]. Ein wichtiger Beitrag, der beim Chemie-Nobelpreis 2009 Erwähnung fand.

Verschiedene technologische und methodische Fortschritte, z. B. modernere Elektronenmikroskope, bessere Elektronen-Detektoren und leistungsfähigere Software haben in jüngster Zeit zum Quantensprung in der Kryo-EM und nun zum Nobelpreis geführt – eine Anerkennung für den ganzen Bereich.

Die erfolgreiche Strukturaufklärung zahlreicher Proteinkomplexe in den letzten vier Jahren zeigt den Erfolg der Methode. Darunter der Proteinkomplex, der die innere Uhr steuert [18], ein Komplex, der Proteine abbaut (das 26S Proteasom, Abb. auf Seite 33) [20], oder das Zika-Virus [21]. Zwar zählt die Kryo-EM noch nicht zu den Hochdurchsatzmethoden, doch sinken die Anforderungen hinsichtlich Benutzererfahrung und Messzeit immer weiter. Inzwischen entstehen nach dem Vorbild der „Beamlines“ in der Proteinkristallographie die ersten vergleichbaren Kryo-EM-Anlagen. Natürlich besteht Raum für weitere Verbesserungen. Die jüngste Entwicklung der Volta-Phasenplatte ist ein gutes Beispiel dafür [22]. Der deutliche Phasenkontrast führt zur Verbesserung der Auswahl und Klassifizierung der einzelnen Partikel und ermöglicht die Strukturaufklärung sehr kleiner Proteine.³⁾

Die Strukturaufklärung von isolierten Makromolekülen mit Kryo-EM (also *ex situ*) ist heute etabliert. Ihre biologische Funktion üben Proteine aber im komplexen Milieu der Zelle und in Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen aus. Das spannende Potenzial der Kryo-EM liegt daher in der 3D-Analyse biologischer Strukturen *in situ* mit der Kryo-Elektronentomographie [24]. Diese Methode schließt die Lücke zwischen molekularer und zytologischer Strukturforschung.

Literatur

- [1] R. Henderson und P. N. Unwin, Nature **257**, 28 (1975)
- [2] K. A. Taylor und R. M. Glaeser, Science **186**, 1036 (1974)
- [3] R. Henderson et al., J. Mol. Biol. **213**, 899 (1990)
- [4] W. Kuhlbrandt, Science **343**, 1443 (2014)
- [5] X. Li et al., Nat Meth. **10**, 584 (2013)
- [6] H. Fernández-Morán, PNAS **56**, 801 (1966)
- [7] E. Knapek und J. Dubochet, J. Mol. Biol. **141**, 147 (1980)
- [8] P. Newmark, Nature **299**, 386 (1982)
- [9] H. Stark et al., Ultramicroscopy **63**, 75 (1996)
- [10] V. R. Matricardi et al., Science **177**, 268 (1972)
- [11] K. A. Taylor und R. M. Glaeser, J. Ultrastruct. Res. **55**, 448 (1976)
- [12] J. Dubochet und A. W. McDowell, J. Microsc. **124**, 3 (1981)
- [13] P. Brüggeler und E. Mayer, Nature **288**, 569 (1980)
- [14] W. Hoppe et al., Z. Naturforsch. A **31**, 645 (1976)
- [15] J. Frank und M. van Heel, J. Mol. Biol. **161**, 134 (1982)
- [16] J. Frank et al., Science **214**, 1353 (1981)
- [17] N. Ban et al., Cell **93**, 1105 (1998)
- [18] J. Snijder et al., Science **335**, 1181 (2017)
- [19] F. Beck et al., PNAS **109**, 14870 (2012)
- [20] M. Wehmer et al., PNAS **114**, 1305 (2017)
- [21] D. Sirohi et al., Science **352**, 467 (2016)
- [22] R. Danev et al., PNAS **111**, 15635 (2014)
- [23] M. Khoshouei et al., J. Mol. Biol. **429**, 2611 (2017)
- [24] M. Beck und W. Baumeister, Trends in Cell Biology **26**, 825 (2016)

3) Eine Rückschau- und Zusammenfassung dieser Ergebnisse haben wir anlässlich des 100. Geburtstag von Sir John Kendrew verfasst [23].

DER AUTOR

Jürgen Plitzko promovierte am MPI für Metallforschung in Stuttgart. Er war Postdoc am LLNL (USA) und am MPI für Biochemie. 2012 wurde er Professor an der Universität Utrecht (NL). Seit 2016 ist er Gruppenleiter am MPI für Biochemie und beschäftigt sich mit der Entwicklung der Kryo-EM, insbesondere der Tomographie.

