

Kryo-Elektronenmikroskopie

Eiskalte Schnappschüsse von Biomolekülen

CLAIRE ORTMANN DE PERCIN NORTHUMBERLAND | CARSTEN SACHSE

Die Kryo-Elektronenmikroskopie liefert höchstauflösende Einsichten in die Organisation der Moleküle des Lebens. Dadurch hat sie die strukturbiologische Grundlagenforschung im letzten Jahrzehnt revolutioniert.

Praktisch alle Prozesse des Lebens werden von biologischen Makromolekülen ausgeführt, die chemisch gesehen aus Proteinen, Ribonukleinsäuren (RNS/RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNS/DNA) bestehen. Diese grundlegenden Einheiten des Lebens zu erforschen und

deren chemische Raumstruktur aufzulösen, ist die Aufgabe der Strukturbiologie. Sie fußt auf der prinzipiellen Annahme, dass die Strukturen des Lebens dessen Funktionen definieren. Die Entdeckung der DNA-Struktur konnte zum Beispiel direkt aufklären, wie Erbinformation gespeichert, gelagert und weitergegeben wird (siehe „Die DNA in der Strukturbiologie“ auf S. 120).

Die ersten Proteinstrukturen (siehe „Die Grundstrukturen von Proteinen“ auf S. 122) in nahatomarer Auflösung wurden von John Kendrew und Max Perutz mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt, wofür ihnen 1962 der Nobelpreis in Chemie verliehen wurde. Heute setzt die Strukturbiologie verschiedene Methoden von Röntgenkristallographie über Kernspinresonanzspektroskopie bis hin zur Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) ein. Bis in die 2010er-Jahre waren vor allem Röntgenkristallographie und Kernspinresonanzspektroskopie die Methoden der Wahl zur Strukturaufklärung von Biomolekülen. Derzeit erhält die Methode der Kryo-EM große wissenschaftliche Aufmerksamkeit, da sie erst im letzten Jahrzehnt durch technologische Fortschritte die Analysemöglichkeiten von biologischen Makromolekülen entscheidend erweitert hat. 2017 wurden Jacques Dubochet, Joachim Franck und Richard Henderson für die Entwicklung der Kryo-EM zur hochauflösenden Strukturaufklärung mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.

Die Grundprinzipien

Die Methode der Kryo-EM (Abbildung 1) bezeichnet eine Variante der Elektronenmikroskopie, die gefrorene biologische Proben bei sehr niedrigen Temperaturen (kryos: griech. kalt) untersucht, typischerweise gekühlt durch flüssigen Stickstoff bei -196°C . Am schematischen Aufbau eines Elektronenmikroskops (Abbildung 2) lässt sich der Weg des Elektronenstrahls von der Quelle über die Probe bis zum Detektor nachvollziehen. Das erste Elektronenmikroskop wurde in den 1930er-Jahren von Ernst Ruska in Berlin gebaut (siehe „Meilensteine der Kryo-Elektronenmikroskopie-Entwicklung“, Tabelle 1).

Zunächst wird der Elektronenstrahl in einer Elektronenkanone erzeugt und über die Kondenserlinsen auf die Probe gerichtet. Auf der Probe wird der Elektronenstrahl durch das zu untersuchende Objekt charakteristisch abgelenkt. Manche dieser Elektronen streuen durch die Wech-



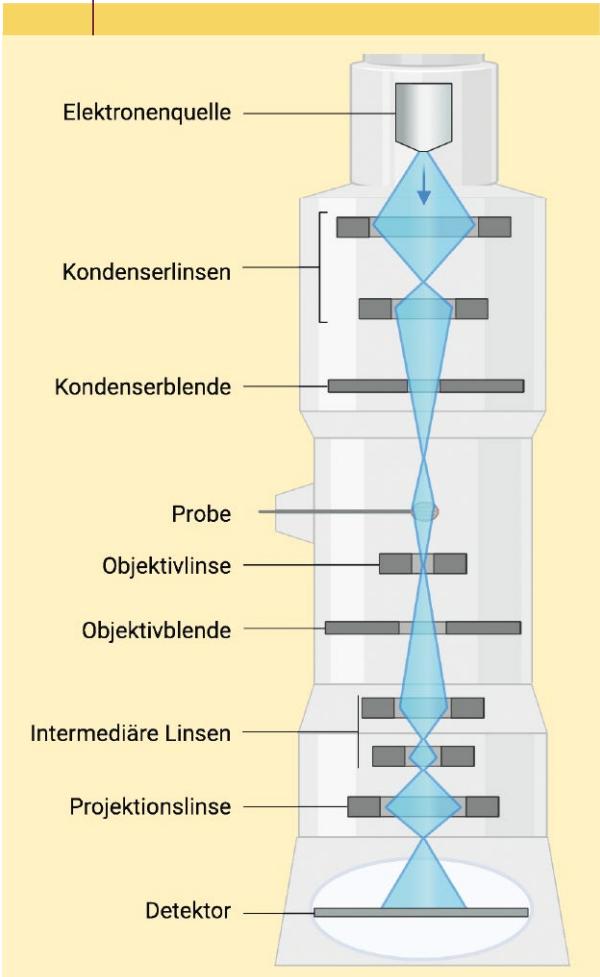
Abb. 1 Das Kryo-Elektronenmikroskop Titan Krios G4 ist etwa 3 m hoch. Im Inneren wird die Probe in einer Kryo-Box durch Flüssigstickstoff gekühlt und vor Kontamination geschützt. Zudem ist es gegen mechanische und elektromagnetische Störungen aufwendig isoliert. Eingesetzt wird es für biologische Strukturuntersuchungen am Ernst-Ruska-Centrum im Forschungszentrum Jülich (Foto: R.-U. Limbach, FZ Jülich).

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

TAB. 1 HISTORISCHE MEILENSTEINE

1931	Ernst Ruska und Max Knoll entwickeln das erste Elektronenmikroskop.
1938	Helmut Ruska und Kollegen studieren die ersten biologischen Strukturen mit einem Elektronenmikroskop: Tabak-Mosaikvirus, die Bakterien <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Escherichia coli</i> .
1968	David DeRosier und Aron Klug rekonstruieren die erste 3D-Struktur von Bakteriophagen aus elektronenmikroskopischen Bildern.
1981	Joachim Frank und Marin van Heel nutzen computergestützte Bildverarbeitung zur Analyse von elektronenmikroskopischen Aufnahmen biologischer Makromoleküle.
1984	Jacques Dubochet entwickelt eine Methode zum schnellen Einfrieren wässriger Proben als dünner Film, der transparent für den Elektronenstahl wird.
1990	Richard Henderson erzeugt das erste atomare Modell von Bakteriorhodopsin auf der Grundlage kryogener Elektronenkrystallographie.
1997	Erste Subnanometer-Auflösung von Hepatitis-B-Viren durch Anwendung der Feld-Emissions-Elektronenkathode (FEG) als Elektronenquelle in biologischer Kryo-EM.
2007–2008	Die ersten Strukturen hochgeordneter Viren werden mit Einzelpartikel-Kryo-EM bei nah-atomarer Auflösung bestimmt.
Ab 2010	Vollautomatisierte Probentauscher und Bildaufnahmen setzen sich durch.
2011–2013	Die Einführung direkter Elektronendetektoren steigert die Aufnahmequalität der Bilder deutlich.
2017	Jacques Dubochet, Joachim Franck und Richard Henderson erhalten den Chemie-Nobelpreis für die Entwicklung der biologischen Kryo-EM.

ABB. 2 KRYO-ELEKTRONENMIKROSKOP



Schematischer Aufbau eines Kryo-Elektronenmikroskops, das die Probe bei -180°C gekühlt untersucht. Der Elektronenstrahl entsteht in der Elektronenquelle und wird durch die Kondenserlinsen auf die Probe gerichtet. Dort wird der Strahl am biologischen Objekt gestreut, durch die Objektivlinsen als Bild eingefangen und schließlich auf einem Detektor digital aufgenommen.

selwirkung mit der Probe elastisch oder inelastisch, während andere Primärelektronen gar nicht mit der Probe wechselwirken, sondern diese unverändert passieren. Die Objektivlinse refokussiert die von der Probe gestreuten Elektronen bereits zu einem Bild.

In der Bildentstehung unterscheidet man zwischen Amplituden- und Phasenkontrast des Objektes. Da biologische Proben in gefrorener wässriger Umgebung zu weiten Teilen aus leichten Atomen wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Phosphor bestehen, ist der Beitrag des Phasenkontrastes zur Bildgebung wesentlich maßgebender ($> 90\%$) als der Amplitudenkontrast. Phasenkontrast entsteht durch die Streuung der Atome in der Probe, die zu Phasenverschiebungen der Elektronen führen und mit den ungestreuten transmittierten Elektronen interferieren. Ein Energiefilter kann optional inelastisch gestreute

Elektronen, die eine geringere Energie besitzen und deshalb nicht zum Bild beitragen, entfernen. Die Projektionslinse und intermediäre Linsen vergrößern das resultierende Bild, bevor die bildgebenden Elektronen auf den Detektor treffen und dort digital ausgelesen werden.

Viele dieser Schritte sind ähnlich bekannt von der Lichtmikroskopie, allerdings mit drei wichtigen Unterschieden. Erstens liegt die Wellenlänge, die maßgeblich die Auflösung des Mikroskops bestimmt, bei Elektronen im Bereich von Pikometern, nicht von Hunderten Nanometern wie beim sichtbaren Licht. Zweitens sind die Linsen des Elektronenmikroskops elektromagnetische Linsen, die den Strahl im magnetischen Feld bündeln. Drittens befindet sich der optische Pfad bei der Elektronenmikroskopie in einer vakuumisierten Elektronensäule, um die Streuung der Elektronen an Luftmolekülen zu vermeiden.

Die ersten Aufnahmen von biologischen Objekten erzeugte Helmut Ruska, der Bruder des Erfinders Ernst Ruska, gemeinsam mit Kollegen. Damit konnten diese Forscher zum ersten Mal die Formen von Bakterien und Viren visualisieren, die bis dahin der Lichtmikroskopie verborgen geblieben waren. Solche elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Viren, Bakterien und menschlichen Zellen sind mittlerweile längst Bestandteil der Biologielehrbücher und prägen bis heute unser fundamentales Verständnis der strukturellen Organisation des Lebens.

Besonderheiten der biologischen Elektronenmikroskopie

Einen wichtigen Unterschied zur Elektronenmikroskopie, wie sie in der Physik üblich ist, stellt die besondere Herstellung von biologischen Proben dar. Da der Elektronenstrahl sehr intensiv mit Materie wechselwirkt, gibt es grundsätzlich hohe Anforderungen an elektronenmikroskopische Proben. Gefrorene biologische Proben sollten eine Schichtdicke von 300 nm nicht überschreiten, da der Elektronenstrahl sonst den Detektor nicht erreicht. Klassischerweise werden in der Kryo-EM dünne Eisfilme direkt durch Schockgefrieren von wässrigen Lösungen in -180 °C kaltem

flüssigem Ethan hergestellt. Im Fall von dickeren biologischen Objekten, wie Zellen, werden diese nach dem Schockgefrieren mit einer Ionenstrahlanlage gedünnt (Abbildung 3 rechts).

Für die klassische Einzelpartikel-Kryo-EM wird die zu untersuchende Proteinstruktur vor dem Gefriervorgang von anderen Komponenten biochemisch gereinigt und anschließend in einem dünnen Eisfilm eingefroren (Abbildung 3 links). Hierfür kann das zu analysierende Protein in Bakterienzellen in hoher Stückzahl produziert werden. Die Zellen schließt man dann auf und trennt das Protein meist mit flüssigchromatographischen Methoden von den anderen Zellkomponenten. Sobald ein gewisser Reinheitsgrad nachgewiesen werden kann, bringt man lediglich die lösliche Proteinprobe auf den Probenträger in kleinen Volumina von wenigen Mikrolitern auf.

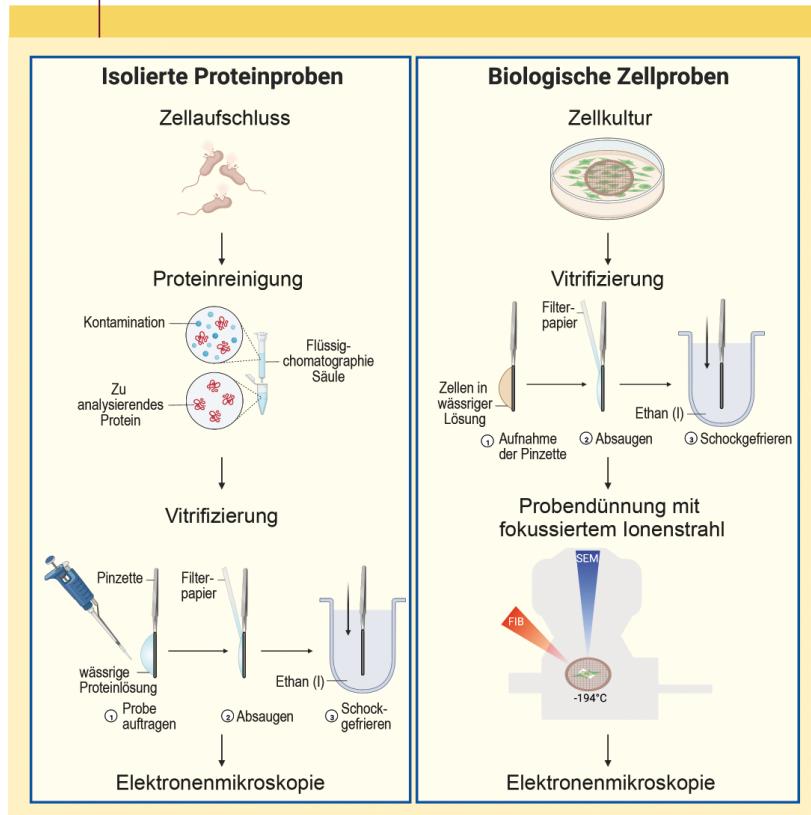
Das ist ein entscheidender Vorteil, denn bei der Röntgenkristallographie etwa müssen deutlich größere Mengen an Proteinkomplexen aufwendig in Kristallen gezüchtet werden, was für viele Proteine deutlich schwieriger zu erreichen ist und sogar ihre Struktur (Konformation) verändern kann (siehe auch „Physik in unserer Zeit“ 2022, 53(5), 228“). Die wässrige Kryo-EM-Probe wird dann durch Absaugen mit einem Filterpapier zu einem Film gedünnt. Danach wird der Probenträger, das sogenannte EM-Grid, schnellstmöglich in flüssiges Ethan eingeschlossen. In diesem Prozess wird Ethan oder ein Ethan-Propan-Gemisch genutzt, um die Probe blitzartig abzukühlen, sodass sich keine herkömmlichen Eiskristalle bilden können.

Die dadurch entstandene 20–80 nm dünne Schicht besteht aus amorphem Eis, das auch als vitrifiziert (lat. gläsern) bezeichnet wird. Die gefrorene Probe ist flüssigem Wasser physikalisch sehr ähnlich, bleibt im Vakuum stabil und ist gleichzeitig für den Elektronenstrahl transparent. Die Proteinmoleküle sind dabei in ihrem nativen, also der natürlichen Umgebung entsprechenden, nicht denaturierten Faltungszustand konserviert und vollständig hydratisiert. Diese Präparationsart hat Jacques Dubochet in den 1980er-Jahren entwickelt und maßgeblich vorangetrieben.

Anstatt die zu analysierende Struktur biochemisch zu isolieren, wird sie bei der zellulären Kryo-Elektronenmikroskopie in ihrer nativen Umgebung belassen und die gesamte Zelle vitrifiziert. Eine typische menschliche Zelle ist meist einige Mikrometer dick. Um für den Elektronenstrahl transparent zu werden, muss sie mit einer Ionenstrahlanlage zu einer weniger als 300 nm dicken Lamelle gedünnt werden. Diese stellt dann ein dünnes, durchsichtiges Fenster der Zelle dar, das weniger als 0,5 % des zellulären Volumens ausmacht [1].

Ein zweiter Unterschied zur physikalischen Elektronenmikroskopie ist die Empfindlichkeit biologischer Proben gegenüber Strahlenschäden. Bei elektronenmikroskopischen Messungen treten die inelastischen Wechselwirkungen mit der Probe wesentlich häufiger auf als die bildgebenden elastischen (3:1) [2]. Die bei den inelastischen Streuereignissen

ABB. 3 | PROBENPRÄPARATION



Schematische Darstellung der zwei verbreitetsten Probenvorberarbeitungsmethoden in der biologischen Kryo-EM. Bei beiden Arbeitsabläufen nutzt man das Schockgefrieren im flüssigen Ethan. Links: Vitrifizierung von wässriger isolierten Proteinlösungen durch Absaugen und Schockfrieren. Rechts: Vitrifizierung von Zellproben mit anschließender Dünning in einer fokussierten Ionenstrahlanlage (FIB-SEM).

freiwerdende Energie bricht die kovalenten Bindungen auf und schädigt chemische Strukturen dauerhaft. Im Verlauf dieser Prozesse entstehen in der Probe sowohl Wärme als auch Ladungsunterschiede [3]. Aus diesem Grund ist die Elektronendosis, die biologische Proben vertragen können, um viele Größenordnungen niedriger als die von typischen materialwissenschaftlichen Proben wie Goldatomen, die im Vergleich als nahezu dosisresistent betrachtet werden können.

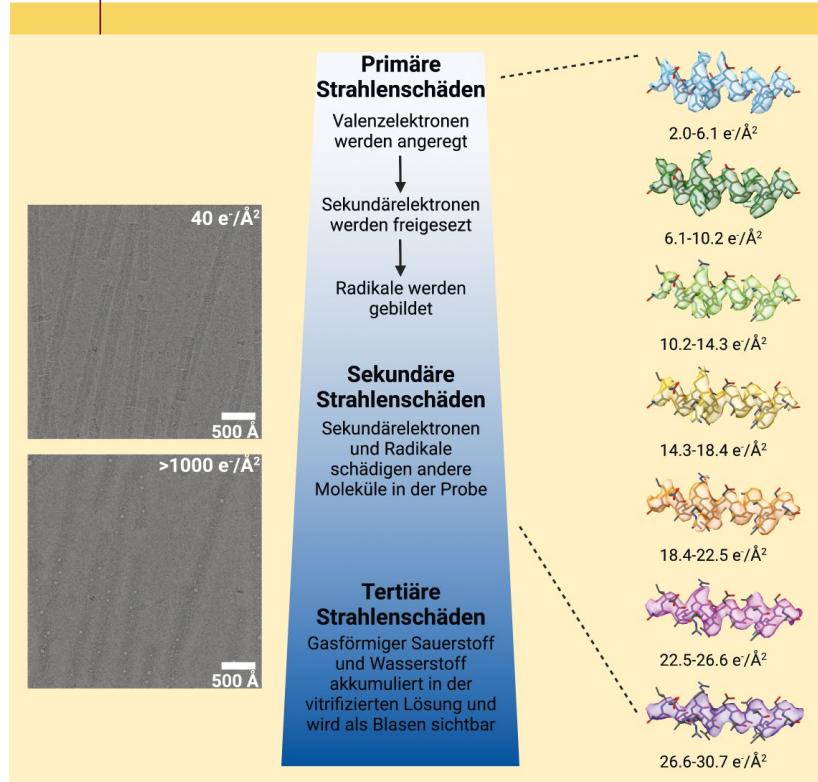
Die Strahlenschäden in biologischen Proben lassen sich beobachten und in drei Arten einteilen (Abbildung 4) [4]. Primärschäden entstehen initial durch die Anregung von Valenzelektronen, sodass kovalente Bindungen zwischen Atomen aufbrechen, Sekundärelektronen freigesetzt werden und sich Radikale ausbilden können. Sekundäre Strahlenschäden werden dann von freigewordenen Sekundärelektronen und den entstandenen Radikalen hervorgerufen. Sowohl Primärschäden als auch Sekundärschäden lassen sich in den Rohbildern nicht identifizieren. Tertiäre Strahlenschäden entstehen durch die Akkumulation der Sekundärereignisse, und schließlich lässt sich das Austreten von umgewandeltem gasförmigem Sauerstoff und Wasserstoff als Blasen im elektronenmikroskopischen Bild erkennen [2]. Bei Dosen von mehr als $100\,000\text{ e}^-/\text{nm}^2$ ($1000\text{ e}^-/\text{\AA}^2$) zerfällt die Probe schließlich und lässt sich nicht mehr untersuchen.

Aus diesem Grund wird eine typische Kryo-Probe lediglich mit bis zu maximal $8000\text{ e}^-/\text{nm}^2$ ($80\text{ e}^-/\text{\AA}^2$) belichtet. Selbst zu Beginn der Aufnahme bei $0\text{--}3000\text{ e}^-/\text{nm}^2$ ($0\text{--}30\text{ e}^-/\text{\AA}^2$) lassen sich bereits deutliche Strahlenschäden in den berechneten EM-Strukturen der Moleküle erkennen. So gehen zuerst die Signale im hochauflösenden Bereich verloren, die zum Beispiel die Atome der Seitenketten der Proteinkette abbilden, während die Hauptkettenatome noch deutlich erkennbar stabil bleiben. Diese Anfälligkeit der biologischen Proben in Bezug auf Strahlenschäden macht die Kryo-EM technisch so anspruchsvoll, da hier im Vergleich zu materialwissenschaftlichen Proben nahezu „im Dunkeln“ abgebildet werden muss. Entsprechend stark verrauscht sind die resultierenden Aufnahmen, weil sie auf relativ schwachen Signalen beruhen.

Daraus folgt als dritte Herausforderung im Vergleich zur physikalischen Anwendung die dreidimensionale Bildrekonstruktion der elektronenmikroskopischen Projektionen. Aufgrund der verrauschten Bilder beschränkt sich die strukturelle Interpretation von Einzelbildern lediglich auf große Moleküle und grobe Strukturmerkmale wie Dimension und Form. Trotzdem ermöglicht die native Molekülkonservierung auch eine genaue Übertragung von Detailinformation, wenngleich sehr stark abgeschwächt. Darüber hinaus wird das Signal durch die gesamte Probendicke in Form einer Projektion aufaddiert, was eine direkte Interpretation in aller Regel kompliziert macht.

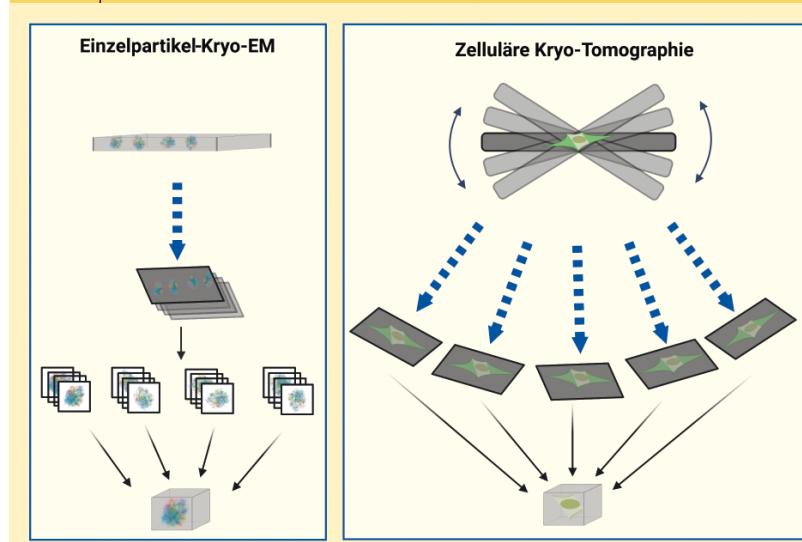
Die biologische Kryo-EM bietet hier allerdings den Vorteil, dass man mit Hilfe von vielen verschiedenen 2D-Projektionen im Computer die dazugehörige 3D-Struktur „zu-

ABB. 4 | STRAHLENSCHÄDEN



Strahlenschäden von biologischen Proben in der Kryo-Elektronenmikroskopie. Links: Mikrographen einer Kryo-Probe des Tabak-Mosaik-Virus mit einer Dosis von 4000 und mehr als $100\,000\text{ e}^-/\text{nm}^2$ ($80\text{ e}^-/\text{\AA}^2$). Mitte: Typische Strahlenschäden, die während des Belichtens auftreten. Rechts: Mit Beginn der Belichtung lassen sich bereits lokale Strahlenschäden in der errechneten elektronenmikroskopischen Struktur erkennen.

ABB. 5 | 3D-BILDREKONSTRUKTION



Schematische Darstellung der beiden wichtigsten Kryo-EM-Messmethoden. Links: In der Einzelpartikel-Kryo-EM werden von jedem Bereich der Probe viele Bilder von identischen Molekülen aufgenommen. Rechts: In zellulärer Kryo-Tomographie hingegen wird der selbe Bereich der Probe aus verschiedenen Winkeln gemessen.

rückrechnen“ kann. Die gleiche Strategie verfolgt man sowohl in der Einzelpartikel-Kryo-EM als auch in der zellulären Kryo-Tomographie, allerdings auf verschiedene Art und Weise. Bei der Einzelpartikel-Kryo-EM werden viele Bilder von identischen Molekülen oder Partikeln planar aufgenommen und dann im Computer dreidimensional zusammengesetzt. Bei der Kryo-Tomographie hingegen wird die selbe Probe unter verschiedenen Ansichtswinkeln betrachtet und anschließend im Computer in 3D kombiniert (Abbildung 5 rechts).

Einzelpartikel-Kryo-EM

In der Einzelpartikel-Kryo-EM werden Tausende von isolierten Partikeln auf einmal belichtet und abgebildet. Jede einzelne Aufnahme zeigt viele quasi-identische Partikel in verschiedenen zufälligen Orientierungen eingebettet im Eis (Abbildung 6, oberes Bild). Die Orientierung eines jeden Partikels wird anhand der drei Eulerschen Winkel ψ , ϕ und θ und deren Position in x und y bestimmt. Partikel mit der

gleichen Orientierung werden in gemeinsame Klassen sortiert (Abbildung 6, zweites Bild von oben), was aufgrund der Signalmittelung zusätzliche, hochauflöste Details im Vergleich zu den Einzelbildern zeigt. Indem man zehntausende 2D-Einzelpartikel-Projektionen mit ihren zugehörigen Orientierungen sammelt und bekannte Bildaberrationen korrigiert, kann man sie im Computer in ein 3D-Volumen „zurückprojizieren“. Die entstandene 3D-Bild-Rekonstruktion entspricht dann der sogenannten EM-Dichte beziehungsweise dem dreidimensionalen Coulomb-Potential, also der elektrostatischen DichteVerteilung, die durch die Atomkerne und dazugehörigen Elektronen des isolierten Moleküls hervorgerufen wird (Abbildung 6, drittes Bild von oben). Joachim Frank etablierte in den 1980er- und 1990er-Jahren die Grundlagen dieser computerbasierten Bildverarbeitung der Einzelpartikel-Kryo-EM (Tabelle 1).

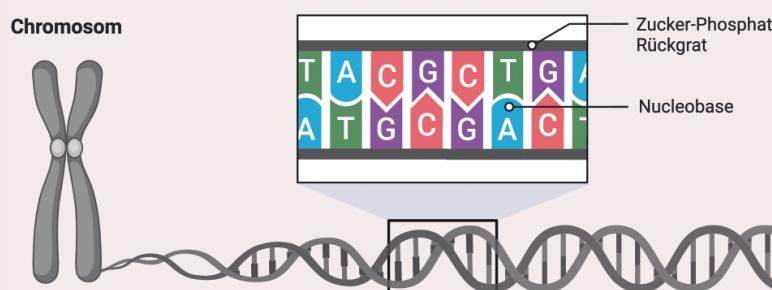
In diese EM-Dichtekarte lässt sich nun ein atomares Modell manuell einbauen. Dabei versucht man zuerst, die bekannten Bausteine der Hauptketten der Proteine oder der RNA in die Karte einzupassen. Je nach Auflösung des Datensatzes können anschließend die Seitenketten der Aminosäuren in die Karte modelliert werden. Die Proteinprimärstruktur, also die Sequenz der Aminosäuren oder die Reihenfolge der Basen in RNA oder DNA, wurde meist durch andere Methoden wie Massenspektrometrie oder DNA/RNA-Sequenzierung bereits im Vorfeld ermittelt und steht in Datenbanken oft zur Verfügung.

Wenn das Molekül, in unserem hier gezeigten Beispiel ein Ribosom, also ein Komplex aus mehreren Proteinen und RNA (siehe „Die Grundstrukturen von Proteinen“ auf S. 122 sowie Physik in unserer Zeit 2011, 42(1), 30) vollständig modelliert ist (Abbildung 6 unten), lässt sich anhand der EM-Dichte nun erkennen, ob andere, gegebenenfalls unbekannte, Moleküle am Ribosom gebunden sind. So konnte man zum Beispiel schon aufklären, wie niedermolekulare Antibiotika-Verbindungen an das Ribosom eines Krankheitserregers gebunden sind und dessen Funktionsweise stören [5]. Die erste hochauflöste Struktur, die auf Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt wurde und den Bau eines atomaren Proteinmodells ermöglichte, gelang Richard Henderson 1994 mit Bakteriorhodopsin. Das Bakteriorhodopsinmolekül ermöglicht es Halobakterien, Energie aus Licht zu gewinnen, durch sogenannte Phototrophie.

Zelluläre Kryo-Tomographie

Die zelluläre Kryo-Tomographie hingegen bildet eine Region der Zelle, die im fokussierten Ionenstrahl gedünnt wurde, unter verschiedenen Winkeln ab, meist in Neigungen zwischen $+60^\circ$ und -60° in 2° bis 3° -Schritten. Aus diesen Bildern wird mittels Rückprojektion das 3D-Volumen des Tomogramms berechnet [6]. Das visualisierte Blickfeld in der zellulären Kryo-Tomographie ist oft größer als bei der Einzelpartikel-Kryo-EM, weil in ersterer bei einer geringeren Vergrößerung gemessen werden kann. Das Kryo-Tomogramm hat dann auch eine niedrigere Auflösung

DIE DNA IN DER STRUKTURBIOLOGIE

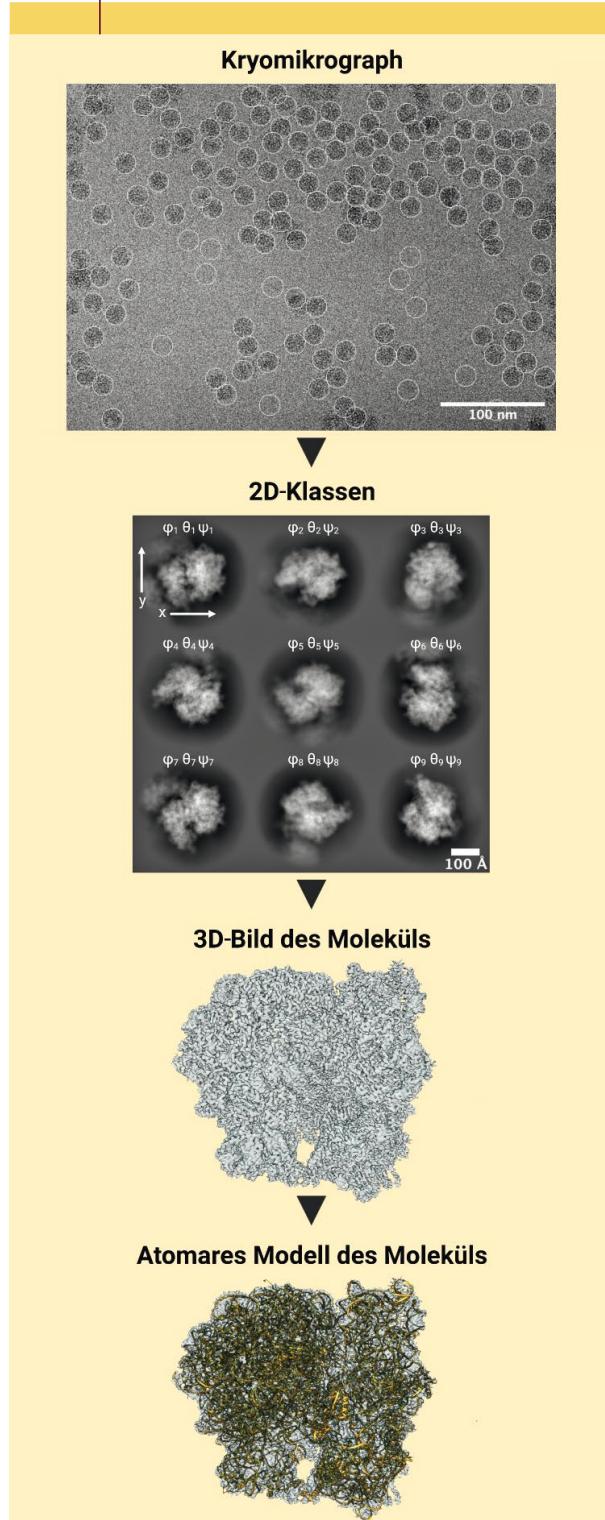


Aufbau einer DNA.

Die DNA (dt. Desoxyribonukleinsäure) als Träger des genetischen Materials und die RNA (dt. Ribonukleinsäure) bestehen aus vier verschiedenen Nukleobase-Bausteinen, die zusammen mit einem Zucker-Phosphat die vier Nukleotid-Grundeinheiten bilden. Im langkettigen Nukleinsäure-Molekül sind die Nukleotide über das Zucker-Phosphatrückgrat verknüpft (Abbildung). Die Nukleotide der RNA unterscheiden sich von denen in der DNA durch das Fehlen eines Sauerstoffatoms an der sogenannten Ribose-Zuckereinheit. Diese minimale chemische Veränderung hat weitreichende Folgen für die superhelikale Struktur dieser langkettigen Moleküle. Während die DNA in Form der kompakten Doppelhelix vor allem als Informationsträger dient, besitzt RNA viel mehr strukturelle Flexibilität. RNA kann unter anderem eine instabilere Form

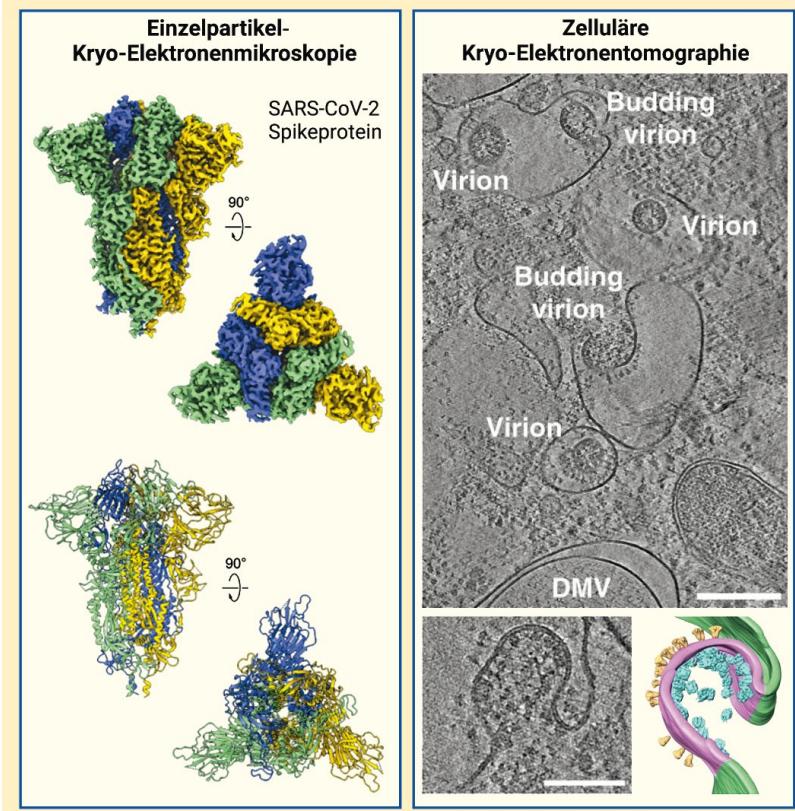
der Boten-RNA (mRNA) bilden und je nach Struktur sogar katalytische Funktionen übernehmen [5]. 1953 konnten Rosalind Franklin und Maurice Wilkins die charakteristische Struktur der DNA-Doppelhelix mit Röntgenbeugung abbilden. Für das darauf basierende chemische Modell der dreidimensionalen DNA-Raumstruktur erhielten Francis Crick und James Watson 1962 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin, gemeinsam mit Wilkins. Mit dem Wissen um die Struktur von DNA konnte man sofort verstehen, wie diese repliziert, also ihre eigenen Kopien anlegt. Diese Struktur legte den Grundstein für die moderne DNA-basierte Molekularbiologie und ermöglichte viele biotechnologische Entwicklungen, zum Beispiel gezielte Krebstherapien und letztlich auch die mRNA-Impfungen gegen COVID-19.

ABB. 6 | DATENPROZESSIERUNG



Hauptschritte der Datenprozessierung in der Einzelpartikel-Kryo-EM. In den Mikroskopie-Bildern werden die Partikel ausgewählt und werden in Klassen eingeteilt, basierend auf ihrer Orientierung. Mit den klassifizierten Partikeln wird ein Volumen errechnet. In diese EM-Dichtekarte wird das atomare Modell des Moleküls im Computer gebaut und verfeinert. Das hier gezeigte Modell stammt aus einer Protein-Datenbank (PDB ID: 6O9J).

ABB. 7 | BEISPIELE



Beispiele für den Einsatz der Kryo-EM-Strukturaufklärung während der COVID-19-Pandemie. Links: Die Einzelpartikel-Kryo-EM-Struktur des SARS-CoV-2-Spike-Proteins (Darstellung reproduziert aus [9]). Rechts: Kryo-Tomographie einer mit SARS-CoV-2 infizierten Zelle. DMV: Doppelte Membranvesikel sind Kompartimente der viralen Replikation, Virion: vollständiges infektiöses Viruspartikel, Budding Virion: Viruspartikel, das aus dem Zellkompartiment der Replikation ausgeschleust wird (Darstellung reproduziert aus [7]).

als eine typische Einzelpartikel-Kryo-EM-Struktur, weil die aufgenommenen Zellstrukturen nicht identisch sind und daher nicht tausendfach gemittelt werden können. Je nach Zusammensetzung des Tomogramms kann man allerdings wiederkehrende Moleküle auch in Subvolumen extrahieren, mitteln und so ähnlich hohe Auflösungen wie in der Einzelpartikel-Kryo-EM erzielen. Die Kryo-Tomographie-Methode hat den Vorteil, dass man die biologischen Strukturen *in situ*, in ihrem natürlichen zellulären Kontext, visualisieren kann, ohne die Proteine isolieren zu müssen.

Trotz ihrer Unterschiede und Ähnlichkeiten sind Einzelpartikel-Kryo-EM und zelluläre Kryo-Tomographie komplementäre experimentelle Ansätze, die biologische Fragen in verschiedenen Maßstäben und Genauigkeit adressieren können. Während der COVID-19-Pandemie konnte die Kryo-EM schnell wichtige Beiträge zur Strukturaufklärung des SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) liefern. Zum einen wurde mit Hilfe der Einzelpartikel-Kryo-EM das Spikeprotein der verschiedenen Virus-Varianten mehrfach bestimmt, auch SARS-CoV-2-infizierte Zellen wurden direkt durch

DIE GRUNDSTRUKTUREN VON PROTEINEN



Struktur und räumlicher Aufbau von Proteinen.

Die Proteine sind die Hauptkatalysatoren der Zelle und werden nach dem in der DNA festgelegten Bauplan hergestellt. Chemisch gesehen bestehen sie aus einer Kette von 50 bis zu mehreren tausend Aminosäuren, die durch sogenannte Peptidbindungen verknüpft sind. Mit Hilfe von lediglich 21 Aminosäurebausteinen wird die charakteristische Sequenz eines Proteins, die sogenannte Primärstruktur (Abbildung links), zusammengesetzt. Die Sekundärstruktur (Abbildung Mitte links) entsteht durch chemische Stabilisierung entlang der Peptidkette, die durch charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen strukturelle Grundmotive von Proteinen bilden, wie α -Helices und β -Faltblätter. Die Anordnung der Sekundärstruktur-

elemente im dreidimensionalen Raum wird als Tertiärstruktur bezeichnet (Abbildung Mitte rechts). Damit entstehen gefaltete Domänen, die sich durch verschiedene Arten von Aminosäurekontakte im Raum stabilisieren und zusammenlagern, auch wenn sie eigentlich entlang der Peptidkette weit entfernt voneinander liegen [5]. Einzelne Proteine können sich weiter in hochorganisierten Quartärstrukturen (Abbildung rechts) zusammenfinden, welche die Grundlage für makromolekulare Proteinkomplexe bilden. Viele Proteinkomplexe der Zelle arbeiten als molekulare Maschinen, wie das Ribosom. Es wird auch als Proteinfabrik der Zelle bezeichnet, da es die Proteine der Zelle aus den Aminosäurebausteinen zusammensetzt.

Kryo-Tomographie betrachtet, um den Infektionsweg in der Zelle zu verfolgen (Abbildung 7) [7–9]. Auf diesem Weg konnten verschiedene Lebensstadien von SARS-CoV-2 in der Wirtszelle genau abgebildet werden: Die Viren vervielfältigen sich in sogenannten Doppelmembranvesikeln (DMVs), bauen sich danach in der Zelle zu intakten Virenpartikeln (Virionen) zusammen, die dann die Zelle verlassen können (Budding Virions).

Diese Beispiele zeigen, wie die Technologie der Kryo-EM zum Erkenntnisgewinn beitrug und damit auch Impf- und Medikationsstrategien direkt unterstützte. Prinzipiell eignet sich die Einzelpartikel-Kryo-EM besser für die höchste atomare Auflösung bis nahe an 0,1 nm (1 Å) und Kryo-Tomographie hingegen für eine reduzierte Auflösung im Nanometerbereich (1–5 nm), dafür aber wie geschildert im nativen und komplexen Kontext der biologischen Zelle.

Gegenwart und Zukunft

Die Einzelpartikel-Kryo-EM stellt die derzeit populärste Technik in der EM-basierten Strukturbiolegie dar, die regelmäßig neue und viele wichtige biologische Strukturen im

Detail zeigt und damit zur sogenannten Auflösungsrevolution führte [10]. Vorher waren solche Auflösungen lediglich Ausnahmefällen vorbehalten, zum Beispiel hochgeordnete Virenstrukturen. Populär in der Forschung wurde die Kryo-EM vor allem durch die Einführung von direkten Elektronendetektoren und verbesserten Computerprogrammen, die große Mengen an Bilddaten automatisiert zur Strukturbestimmung verarbeiten können.

Eine entscheidende Entwicklung in diesem Zusammenhang war die kontinuierliche Optimierung und konsequente Automatisierung der Elektronenmikroskope, die inzwischen die Aufnahme von bis zu 10 000 Bildern innerhalb 24 Stunden ermöglichen. Diese Produktivitätssteigerung ermöglichte es 2022 weltweit, zirka 10 000 biologische Strukturen mit Hilfe der Einzelpartikel-Kryo-EM aufzulösen. Auch wenn die Technik damit auf dem Weg ist, die Anzahl der vorliegenden Röntgenkristallstrukturen zu übertreffen, ist das volle Potenzial der Elektronenmikroskopie in der Strukturbiolegie immer noch nicht ausgeschöpft. Der Auflösungsrekord in der Biologie erreicht derzeit bei bestimmten Testproteinen beachtliche 0,12 nm [11, 12]. In der materialwissenschaftlichen EM liegt die höchstmögliche Auflösung derzeit bei weniger als 0,02 nm [13]. Hierbei kommt Raster-Transmissionselektronenmikroskopie zum Einsatz, die auch für biologische Proben durchaus vielversprechende Einsatzmöglichkeiten erwartet lässt [14].

Darüber hinaus stellt die Methode der Kryo-Tomographie eine sehr große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten für die molekulare Visualisierung des Zellkontexts zur Verfügung. Auch wenn an Modellproben wie dem Ribosom bereits *in situ* nahatomare Auflösungen erzielt wurden, müssen die beteiligten Methoden noch verbessert werden, um routinemäßig einsetzbar zu sein. Hierbei werden sowohl verbesserte hardware- als auch softwaregestützte Verfahren einen wichtigen Beitrag leisten, um die Probenvorbereitung zu optimieren und damit auch die Vielzahl an Proben aus Organismen, Geweben und Zellen bei elektronenmikroskopischer Höchstauflösung unter Kryobedingungen zugänglich zu machen.

Die hohe Komplexität des Zellinneren erfordert weitreichende computergestützte Verfahren, um die vielfach überlagerten elektronenmikroskopischen Graubilder mit Hilfe von Molekülstrukturen aus Datenbanken oder Voraussagen bestmöglich zu interpretieren und im Rahmen einer virtuellen Zelle zu integrieren. Die zellulären Moleküllandschaften, die maßgeblich auf den Ergebnissen der modernen Kryo-EM basieren, werden künftig eine zentrale Grundlage für die Erforschung von Krankheiten und für die biotechnologischen Entwicklungen in den Lebenswissenschaften bilden.

Zusammenfassung

Heute nimmt die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) eine zentrale Stellung als Werkzeug der Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen ein. Die Funktionsweise dieser

Abbildungstechnik basiert auf einem breiten Spektrum von sowohl physikalischen, chemischen als auch biologischen Grundlagen. Entscheidend ist das schnelle Einfrieren, Vitrifizieren, biologischer Proben. In diesem glasartigen Zustand lassen sich Biomoleküle, zum Beispiel Proteine oder RNA, in ihrem nativen, der Lebensfunktion entsprechenden Zustand hochauflöst abbilden. Eine Reihe von technologischen Fortschritten im Bereich von Instrumentation und Bildverarbeitung ermöglichen exemplarisch die gezielte Erforschung der strukturellen Grundlagen der SARS-CoV-2-Infektion mit Hilfe der modernen Kryo-EM.

Stichwörter

Strukturbiologie, Elektronenmikroskopie, Einzelpartikel-Kryo-Elektronenmikroskopie, Kryo-Tomographie, Bildverarbeitung, SARS-CoV-2.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei den Mitarbeitern des Ernst-Ruska-Centrums für die Unterstützung beim Aufbau der Kryo-EM am Forschungszentrum Jülich, sowie der Helmholtz-Gemeinschaft und dem BMBF für die finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten und elektronenmikroskopischen Infrastruktur. Besonderer Dank gilt Dr. Daniel Mann für die Bereitstellung der TMV-Probe aus Abbildung 4 und des Ribosomen-Datensatzes aus Abbildung 6. Die Abteilung des Ernst-Ruska-Centrum 3 ist am COVIPA-Helmholtz-Konsortium zur Erforschung der COVID-19-Pandemie beteiligt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL. Abbildungen wurden mit BioRender.com erstellt.

Literatur

- [1] M. Turk, W. Baumeister, *FEBS Lett.* **2020**, 594, 3243.
- [2] L. A. Baker, J. L. Rubinstein, *Radiation Damage in Electron Cryo-microscopy*, in: *Methods in Enzymology*, (Hrsg.: G. J. Jensen), *Cryo-EM Part A Sample Preparation and Data Collection*, Vol. 481, Academic Press, Amsterdam 2010, S. 371.

- [3] D. T. Grubb, *J. Mater. Sci.* **1974**, 9, 1715.
- [4] S. A. Fromm et al., *J. Struct. Biol.* **2015**, 189, 87.
- [5] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Ed., , W. H. Freeman, New York 2005, S. 1066.
- [6] V. Lucić, F. Förster, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, 74, 833.
- [7] S. Klein et al., *Nat. Commun.* **2020**, 11, 5885.
- [8] Z. Ke et al., *Nature* **2020**, 588, 498.
- [9] C. Xu et al., *Sci. Adv.* **2021**, 7, eabe5575.
- [10] W. Kühlbrandt, *Science* **2014**, 343, 1443.
- [11] K. M. Yip et al., *Nature* **2020**, 587, 157.
- [12] T. Nakane et al., *Nature* **2020**, 587, 152.
- [13] Z. Chen, *Science* **2021**, 372, 826.
- [14] I. Lazic, C. Sachse, *Nat. Methods* **2022**, 19, 1179.

Die Autoren



Claire Ortmann de Percin Northumberland studierte an der University of Glasgow und der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Seit 2020 führt sie ihre Promotion über Autophagie-Strukturen in Hefezellen in der Gruppe von Prof. Dr. Carsten Sachse am Forschungszentrum Jülich durch.



Carsten Sachse arbeitete bereits während seiner Promotion von 2004–2007 an der Brandeis Universität (Waltham, USA) und am FLI Leibniz Institut für Altersforschung Jena mit Kryo-Elektronenmikroskopie. Postdoc am MRC Laboratory of Molecular Biology (Cambridge, GB). 2010 wurde er unabhängiger Gruppenleiter am EMBL Heidelberg. Seit 2018 ist er Direktor am Ernst-Ruska-Centrum des Forschungszentrum Jülich und Professor an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Anschrift

Prof. Dr. Carsten Sachse, Ernst Ruska-Centrum für Mikroskopie und Spektroskopie mit Elektronen, ER-C-3/Strukturbiologie, Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Deutschland.
c.ortmann@fz-juelich.de, c.sachse@fz-juelich.de