

Einzelpartikel-3D-Elektronenmikroskopie

Analyse heterogener Proteinkomplexe

NATHALIE BRAUN, SEVIL WEINKAUF

ZENTRUM FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE, FAKULTÄT FÜR CHEMIE, TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Transmissionselektronenmikroskopie in Kombination mit Bildverarbeitungs- und Rekonstruktionstechniken ermöglicht es, 3D-Strukturinformation von singulären Biomakromolekülen zu erhalten. Die Methodik erlaubt die Analyse der molekularen Architektur von dynamischen, heterogenen Proteinkomplexen.

Transmission electron microscopy combined with image processing and reconstruction techniques provides 3D structure information on single biomacromolecules. The method allows structure analysis of the molecular architecture of dynamic, heterogeneous protein complexes.

■ In der heutigen Postgenom-Ära stehen Fragen über die Struktur und Funktion von Proteinkomplexen, die wichtige Operationen wie Proteinsynthese, -faltung und -transport durchführen, im Vordergrund. Solche „molekulare Maschinen“ stellen durch ihren komplexen Aufbau, ihre Größe, Flexibilität und Heterogenität echte Herausforderungen für die klassischen Strukturermittlungsmethoden dar. Hier leistet die molekulare Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) einen unverzichtbaren Beitrag, da sie

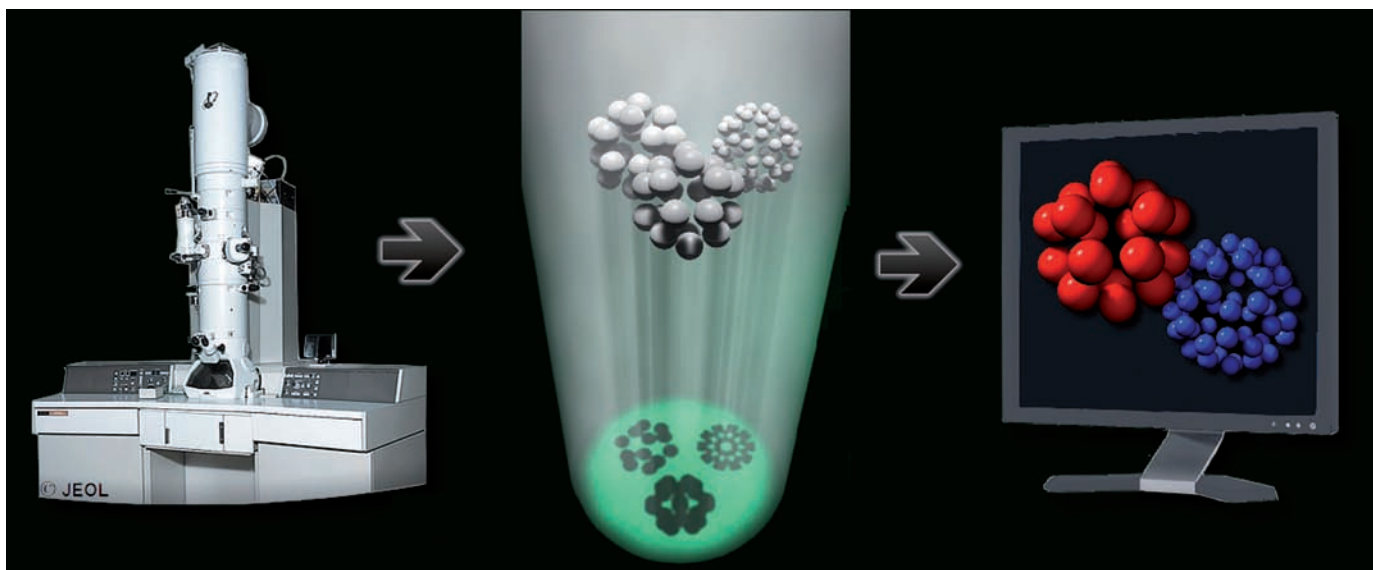
3D-Strukturinformation von Einzelpartikeln liefert. Wir verfügen heute über Präparationstechniken und Instrumente, die es erlauben, solche Proteinkomplexe unter Erhaltung ihrer nativen Struktur weitgehend zerstörungsfrei abzubilden. Diese Abbildungen stellen zwar „verrauschte“ 2D-Projektionen dar, der Einsatz von Bildverarbeitungs- und 3D-Rekonstruktionstechniken ermöglicht aber daraus detaillierte 3D-Strukturmodelle zu berechnen (3D-EM) (Abb. 1).

3D-EM-Strukturanalyse makromolekularer Komplexe

Für die Beobachtung im TEM werden die Proteinkomplexe zunächst „fixiert“. Idealerweise geschieht dies durch sehr schnelles Einfrieren der Lösungen, die die Einzelmoleküle enthalten. Die vitrifizierten Proben werden dann in einem speziellen TEM bei Flüssig-Helium-Temperatur beobachtet (Kryo-EM)^[1]. Diese Vorgehensweise führt zur Erhaltung nativer Strukturen und zur Verringerung von Strahlenschäden. Da aber die gerätetechnischen Voraussetzungen für die Kryo-EM nicht immer gegeben sind, wird in der Praxis häufig auf die Methode der Negativkontrastierung zurückgegriffen: Die Proteinkomplexe werden nach Adsorption auf einem Träger in ein Schwermetallsalz eingebettet und in einem konventionellen TEM beobachtet. Dabei wird die Struktur durch die „Schwermetallhülle“ kontrastiert und soweit konserviert, dass die Strukturinformation bei moderater Auflösung erhalten werden kann.

Um aus den Aufnahmen einzelner Proteinkomplexe eine 3D-Strukturinformation gewinnen zu können, wird digitale Bildverarbeitung^[2] in folgenden Etappen eingesetzt:

Etappe 1: Extraktion der Einzelmoleküle. Die Identifizierung der Einzelmoleküle auf



▲ Abb. 1: Im Transmissionselektronenmikroskop (links) erstellte 2D-Projektionen einer heterogenen Molekülpopulation (Mitte) und die zugehörigen 3D-Modelle (rechts).

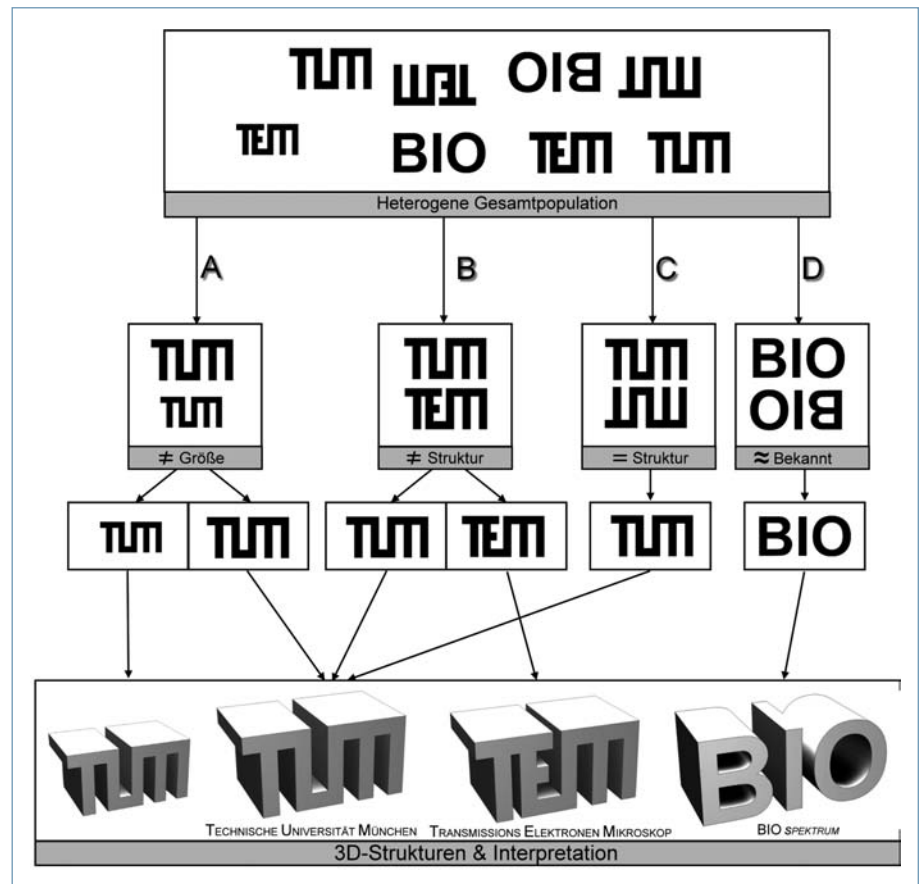
digitalisierten Aufnahmen erfolgt vollautomatisch durch Mustererkennungsalgorithmen oder manuell durch den Experimentator. Die Molekülbilder werden dann aus der Gesamtaufnahme extrahiert, in kleineren Rahmen optimal zentriert, normiert und Bandpass gefiltert.

Etappe 2: Mittelung analoger Einzelmolekülbilder. Jede elektronenmikroskopische Aufnahme enthält einen Rauschanteil, der z. B. aus Elektronenquelle, Filmmaterial usw. stammen kann. Bei Proteinkomplexen kommt erschwerend hinzu, dass diese äußerst strahlungsempfindlich sind und nur bei geringen Elektronendosen abgebildet werden können, was zu Aufnahmen mit einem noch höheren Rauschanteil führt. Werden jedoch viele (je nach Objekt einige tausend bis hunderttausend) gleichartige Projektionen eines Proteinkomplexes überlagert (Bildmittelung), so kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Voraussetzung ist, dass nur gleiche Molekülsichten, also Projektionen unter dem gleichen Raumwinkel, überlagert werden. Daher werden vor der Mittelung Klassifizierungsalgorithmen eingesetzt, um gleichartige Molekülprojektionen zu identifizieren und diese in Klassen zusammenzufassen.

Etappe 3: 3D-Rekonstruktion. Jedes Klassenmittelungsbild stellt eine 2D-Projektion des untersuchten 3D-Proteinkomplexes unter einem bestimmten Raumwinkel dar. Nach Charakterisierung der zugehörigen Projektionsrichtungen können sie mittels 3D-Rekonstruktionstechniken zu einem 3D-Modell kombiniert und dieses anschließend iterativ verbessert werden.

Trennung heterogener Datensätze via Bildverarbeitung

Bei homogenen Proteinkomplexen führt die oben skizzierte Vorgehensweise kombiniert mit Kryo-EM zu 3D-Modellen bei submolekularer Auflösung. Dynamische Proteinkomplexe liegen aber meist in strukturell unterschiedlichen Zuständen vor. In diesem Fall müssen strukturell identische Moleküle in Subpopulationen zusammengefasst werden, die jede für sich nur noch Projektionsbilder eines Proteinkomplexes enthalten. Dafür gibt es kein Patentrezept, da die Klassifizierungsmethode stark von den spezifischen Unterschieden zwischen den einzelnen Subpopulationen abhängt. Zielführend ist der Vergleich der vorläufig erstellten Klassenmittelungsbilder (Etappe 2) nach folgenden Auswahlkriterien (**Abb. 2**):



▲ **Abb. 2:** Flussdiagramm zur Trennung heterogener Datensätze. Unterscheidungskriterien: **A**, Größe; **B**, Struktur; **C**, unterschiedliche Projektionen; **D**, Ähnlichkeit zu bekannten, homologen Strukturen. Unten: zugehörige 3D-Modelle.

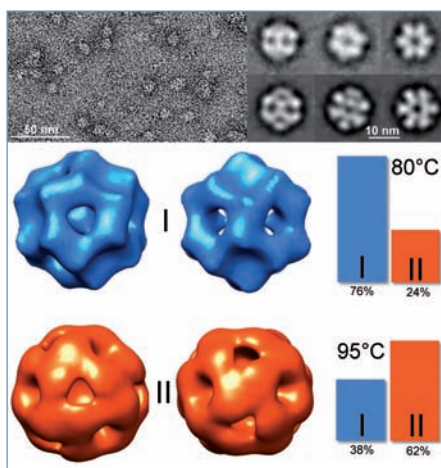
- Gibt es Mittelungsbilder, das heißt 2D-Projektionen, die sich zwar strukturell ähnlich sind, aber nicht vom gleichen 3D-Objekt herrühren können? Sei es aufgrund geringfügiger Größenunterschiede (**Abb. 2A**) oder aufgrund struktureller Differenzen in einzelnen Teilbereichen (**Abb. 2B**). Diese Bilder werden dann unterschiedlichen Teilpopulationen zugeordnet.
- Gibt es Mittelungsbilder, die eindeutig als 2D-Projektionen des gleichen 3D-Objekts identifiziert werden können (**Abb. 2C**)? Falls ja, werden die zugehörigen Einzelpartikelbilder einer getrennten Teilpopulation zugeordnet.
- Existieren Mittelungsbilder, die den Projektionen eines schon bekannten 3D-Objekts ähneln (**Abb. 2D**)? Auch in diesem Fall wird eine gesonderte Teilpopulation erstellt.

Die aufmerksame Durchsicht der vorhandenen Projektionsbilder durch Beantwortung obiger Fragen ermöglicht nun eine Aufteilung der Gesamtpopulation. Eine Erstellung vor-

läufiger 3D-Modelle erfolgt dann innerhalb der Teilpopulationen. Die Einzelbilder des Gesamtdatensatzes werden in einem „Multi-modellvergleich“ mit den Rückprojektionen dieser vorläufigen Modelle verglichen und bei guter Übereinstimmung dem zugehörigen Modell, bei schlechter Übereinstimmung einer weiteren separaten Klasse zugeordnet. Durch iterative Verbesserungen und Ergänzungen der 3D-Modelle erhält man schließlich die finalen 3D-Strukturen der vorhandenen Objekte.

Beispiel: kleine Hitzeschockproteine – Lebensretter unter Stressbedingungen

Die kleinen Hitzeschockproteine (sHsps), eine ubiquitäre Subfamilie der molekularen Chaperone, bewirken die Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen unter Stressbedingungen wie z. B. unter Hitzeschock, indem sie die Aggregation von entfaltenen Proteinen unterdrücken. Ein Erkennungsmerkmal aller sHsps ist die Assemblierung zu großen, polydispersen, aus 12–42 Untereinheiten beste-



▲ **Abb. 3:** TEM-Aufnahme von negativkontrastierten Hsp20.2-Partikeln mit repräsentativen Klassenmittelungen. Unten: 3D-Modelle der kleinen (blau, I) und großen (rot, II) Populationen von Hsp20.2 sowie deren Verteilungen bei 80 °C (physiologische Temperatur) und 95 °C (Hitzeschocktemperatur).

essanterweise moduliert die Verteilung der Moleküle zwischen den Populationen temperaturabhängig: Während bei der physiologischen Temperatur von *A. fulgidus* (80 °C) die kleineren Oligomere dominieren, überwiegen bei Hitzeschocktemperatur (95 °C) die größeren (**Abb. 3**). Diese temperaturabhängige Veränderung der Verteilung deutet auf unterschiedliche Funktionen der beiden Populationen hin. Die Dominanz der großen Partikel bei Hitzeschocktemperaturen mit dem gleichzeitigen Anstieg der Chaperonaktivität unterstützt die Annahme, dass die großen Moleküle eine Konformation hoher Chaperonaktivität darstellen. Die Befunde spiegeln die große Flexibilität der oligomeren Anordnung der sHsps wieder, was auch bei anderen sHsps nachgewiesen werden konnte. Diese Flexibilität und die dadurch bedingte Polydispersität tragen möglicherweise zu der Funktionalität und zu den „umschaltbaren“ Chaperoneigenschaften der sHsps bei.

henden Oligomeren, die bisher strukturell unzureichend charakterisiert sind. Ursache dafür ist unter anderem ihre häufig stark ausgeprägte strukturelle Inhomogenität. Bekannt ist lediglich, dass sie meist Hohlkugeln oder fassähnliche Strukturen bilden.

Ein Ziel unserer Arbeiten ist, mittels 3D-EM Gemeinsamkeiten bzw. Variationen in den strukturellen Aufbauprinzipien verschiedener sHsps zu identifizieren und diese mit funktionellen Aspekten zu korrelieren. Neuerdings ist es uns bei Hsp20.2 aus dem Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus* durch den Einsatz der oben genannten Auswahlkriterien gelungen, die dem Proteinkomplex inherente Heterogenität näher zu charakterisieren und mit funktionellen Aspekten in Zusammenhang zu stellen^[3]. Nach unserer 3D-Analyse bildet Hsp20.2 zwei unterschiedliche Populationen von sphärischen, symmetrischen Oligomeren aus 24 Untereinheiten (Strukturen I und II mit Durchmessern von 10,5 bzw. 12 nm). Inter-

Danksagung

Die Forschung unserer Arbeitsgruppe wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und den Exzellenzcluster „Center for Integrated Protein Science Munich“ (CIPSM) unterstützt. ■

Literatur

- [1] Zhou, Z. H. (2008): Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 218–228.
- [2] Thuman-Commike, P. A. (2001): Single particle macromolecular structure determination via electron microscopy. *FEBS Lett.* 505: 199–205.
- [3] Haslbeck, M., Kastenmüller, A., Buchner, J., Weinkauff, S., Braun, N. (2008): Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* 378: 362–374.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sevil Weinkauff
Fakultät für Chemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4
D-85748 Garching
Tel.: 089-289-13517
Fax: 089-289-13521
sevil.weinkauff@ch.tum.de

AUTOREN



Sevil Weinkauff

Chemiestudium. 1989 Promotion und 1995 Habilitation, Technische Universität München. 1997 Professur für Membranstrukturforschung, Friedrich-Schiller-Universität Jena. Seit 1998 Professur für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München.



Nathalie Braun

Physikstudium. Ludwig-Maximilians-Universität München. 1995 Promotion, Technische Universität München. Seit 2003 Leitung der Bildverarbeitungsgruppe am Zentrum für Elektronenmikroskopie, Technische Universität München.