



## 25 Jahre Elektronenmikroskopie

# Von der „Blobology“ zur atomaren Auflösung der Kryo-Elektronenmikroskopie

HOLGER STARK

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, GÖTTINGEN

**It took almost a century to develop electron microscopy into a powerful method for high-resolution structure determination of proteins. Technical improvements in microscopy, detector technology, and image processing software contributed to the exponential growth of high-resolution structures of protein complexes determined by cryo-electron microscopy in recent years. We now succeeded in breaking another resolution barrier in cryo-electron microscopy and for the first time in achieving true atomic resolution, where single atoms in the protein can indeed be visualized individually. These improvements in cryo-EM indicate that the method will continue to gain importance, not only as a method for structure determination but also in the development of new drugs in pharmaceutical research.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1480-5

© Der Autor 2020

■ Vor rund 90 Jahren trat die Elektronenmikroskopie an, um das Auflösungslimit der Lichtmikroskopie zu überwinden. Neue biologische Techniken kommen heutzutage mit rasanter Macht und Geschwindigkeit und werden oft ebenso effizient innerhalb weniger Jahre von der nächsten Entwicklung schon wieder abgelöst. In der heutigen Kurzlebigkeit moderner wissenschaftlicher Techniken erscheint die Entwicklungsgeschichte der Elektronenmikroskopie daher fast wie eine kleine Ewigkeit. Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) zur Strukturbestimmung von Proteinen startete erst in den letzten Jahren ihre große Blütezeit und entwickelt sich von einem Auflösungsrekord zum nächsten.

Alles begann mit dem Bau des ersten Elektronenmikroskops durch den späteren Nobelpreisträger Ernst Ruska (s. Kasten). Eine Euphorie war zu diesem Zeitpunkt nicht zu spüren, und es herrschte großer allgemeiner Zweifel an der neuen Technik unter Physikern wie Biologen. Seine Entwicklungen konnte Ruska damals nur aufgrund eines positiven Gutachtens des Mediziners und Direktors der Charité Richard Siebeck durchführen. Dieses Gutachten enthielt einen sehr

weitsichtigen Satz: „Sollten sich die Möglichkeiten der mikroskopischen Auflösung über die angenommene Größe etwa bis zum 100-Fachen steigern, so sind die wissenschaftlichen Folgen gar nicht abzusehen.“ Er sollte damit Recht behalten. Selbst in Zeiten der hochauflösenden Lichtmikroskopie hat die Elektronenmikroskopie bis heute ein um etwa zwei Größenordnungen höheres Auflösungsvermögen.

### Entwicklung der Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Tatsache, dass man damals im Elektronenmikroskop metallische Proben im Hochvakuum unter dem Elektronenstrahl ver-

dampfen konnte, weckte wenig Hoffnung auf eine vernünftige Anwendbarkeit in der Biologie. Erst durch die Entwicklung einiger praktischer Tricks gelang es im Laufe der Jahrzehnte, die Mikroskope so weiterzuentwickeln, dass man sie erfolgreich für die Strukturbiologie einsetzen konnte. Die grundlegende Idee: Sehr dünne Proben können vom Elektronenstrahl durchstrahlt werden, ohne direkt zu Asche zu verbrennen, und gekühlte Proben überleben ebenfalls länger unter dem Elektronenstrahl als bei Raumtemperatur. Das war die Geburtsstunde der Kryo-Elektronenmikroskopie. Jacques Dubochet entwickelte eine neue Präparationsmethode [1]. Er schaffte es, einzelne Moleküle in einem dünnen Eisfilm aus schockgefrorenem vitrifiziertem Eis einzubetten und diese in einem mit Flüssigstickstoff gekühlten Halter im Elektronenmikroskop abzubilden. Damit hatten sich gleich mehrere Bedenken in Luft aufgelöst. Die Moleküle und Eisschichten waren so dünn, dass die Abbildung erfolgen konnte, ohne die Moleküle direkt zu Asche zu verbrennen. Die Einbettung in einer amorphen Eisschicht verhinderte zusätzlich das Austrocknen der biologischen Proben im Hochvakuum des Elektronenmikroskops. Mit einem einzigen praktischen Trick waren somit alle fundamentalen Bedenken der ersten Kritiker der Elektronenmikroskopie aus dem Weg geräumt.

### Vom elektronenmikroskopischen Bild zur 3D-Struktur

Um Strukturbiologie zu betreiben, fehlte jetzt nur noch ein Werkzeug, wie man aus den

*„Dabei stießen wir bei namhaften Biologen, aber auch bei Physikern auf eine ablehnende Haltung, die sich auf zwei Einwände stützte. Sie bezweifelten sowohl Sinn und Wert des verfolgten Zieles, sublichtmikroskopische Strukturen in den Präparaten abzubilden, als auch die Möglichkeit, dieses Ziel mit einem Elektronenmikroskop zu erreichen.“*

**Ernst Ruska**



**Ernst Ruska (1906–1988)**

Elektroingenieur und Erfinder des Elektronenmikroskops. Baute das erste Elektronenmikroskop (1934) im Alter von 27 Jahren. Für seine Entwicklung erhielt er 52 Jahre später den Nobelpreis für Physik (1986). Seinem Bruder Helmut Ruska gelang es, zum ersten Mal unter Einsatz des Elektronenmikroskops Viren abzubilden.

sehr verrauschten Projektionsbildern des Elektronenmikroskops eine dreidimensionale Struktur der Makromoleküle berechnen kann. Die ersten Softwarewerkzeuge zur Bildmittelung, Klassifizierung der Bilder und dreidimensionalen Rekonstruktion wurden hauptsächlich in den 80er-Jahren von Joachim Frank und Marin van Heel entwickelt [2]. In derselben Zeit gelang es damit, bereits erste 3D-Strukturen von Makromolekülen bei allerdings noch bescheidener Auflösung zu bestimmen [2-4]. Aufgrund der noch recht groben Auflösung im Bereich von einigen Nanometern wurde daher die neue strukturblogische Methode gerne auch mal als „Blobology“ bezeichnet. Es sollte weitere knapp zwei Jahrzehnte dauern, bis sich das fundamental änderte.

Von entscheidender Bedeutung für den heutigen Erfolg der Kryo-EM-Technik waren Weiterentwicklungen der Elektronenmikroskop-Hardware, der computergestützten Software zur Verarbeitung der Bilder und – gerne in der Betrachtung vernachlässigt – die enorme Steigerung der verfügbaren Rechen-

leistung durch moderne Computer und Grafikkarten. Heutzutage werden Hochleistungs-Kryo-Elektronenmikroskope komplett vom Computer gesteuert und machen selbstständig Aufnahmen, zum Teil über mehrere Tage am gleichen Präparat. Die computergestützte Bildverarbeitungssoftware ist heute auf einem Niveau, dass selbst Neueinsteigern erlaubt, innerhalb kürzester Zeit dreidimensionale Strukturen von Makromolekülen zu berechnen.

### **Resolution revolution**

Über mehrere Dekaden hinweg waren Filmplatten das dominierende Medium der Bildaufzeichnung in der Elektronenmikroskopie. Mit der Entwicklung neuartiger direkter Detektoren für Elektronen im letzten Jahrzehnt wurde der Film innerhalb kürzester Zeit abgelöst und eine neue Ära in der Kryo-Elektronenmikroskopie eingeleitet. Erstmals war die Bildqualität besser als mit Film, und die Aufzeichnung eines Bilds als eine Sequenz von Einzelbildern erlaubte die Entwicklung von Bildkorrektursoftware, wodurch

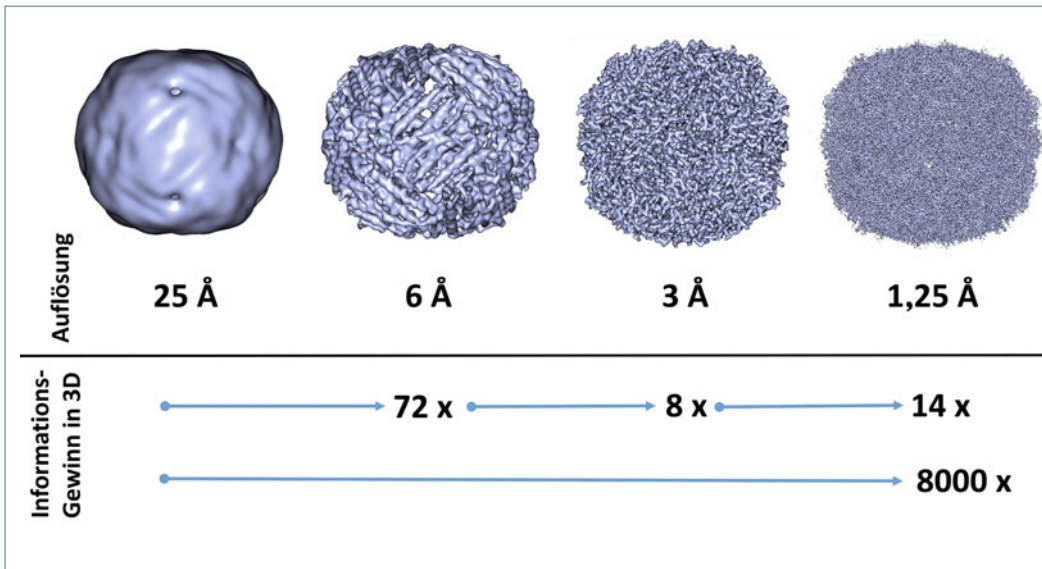
die Ausbeute an hochaufgelösten Bildern dramatisch gesteigert werden konnte. Diese Entwicklung führte in den letzten zehn Jahren zu einer ständigen Verbesserung der Auflösung der berechneten Strukturen und zu einem exponentiellen Output an dreidimensionalen Strukturen makromolekularer Komplexe bei Auflösungen besser als vier Ångstrom, für die man nun atomare Modelle bauen konnte. Die Entwicklungen in der Kryo-EM wurden nun als *resolution revolution* [5] deklariert und mündeten ebenfalls in der Auszeichnung von drei Pionieren der Elektronenmikroskopie (Jacques Dubochet, Joachim Frank und Richard Henderson) mit dem Nobelpreis für Chemie 2017.

### **Immer höhere Auflösung**

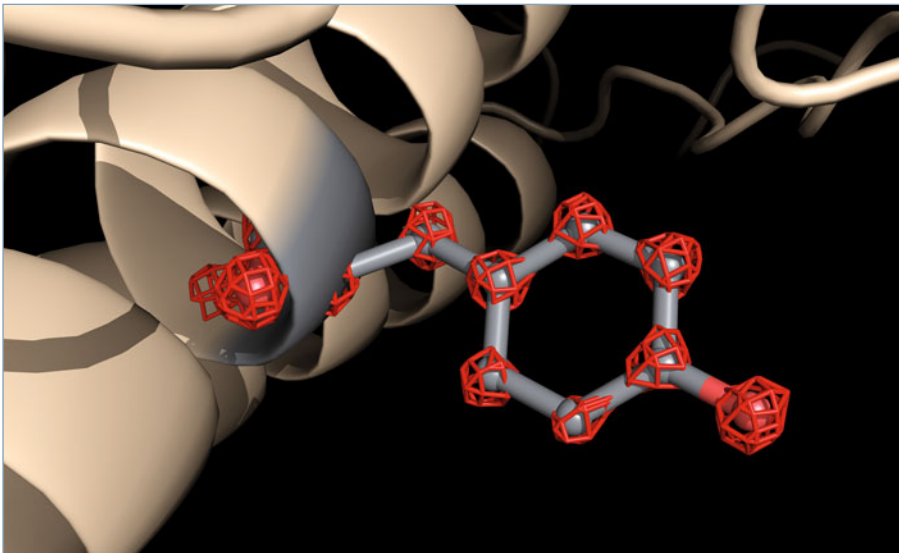
Innerhalb der letzten fünf Jahre wurden auch die Auflösungsgrenzen der Kryo-EM immer weiter verschoben. Die 3-Ångstrom-Barriere durchbrach Niels Fischer zum ersten Mal 2015 mit einer Struktur des 70S-Ribosoms aus *Escherichia coli* [6]. Dabei wurde erstmalig eine Auflösung erreicht, die es ermög-

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



◀ **Abb. 1:** Auflösungsverbesserung in der Elektronenmikroskopie. Gezeigt sind die 3D-Strukturen von Apoferritin bei unterschiedlicher Auflösung, wie sie sich auch über Jahrzehnte verbessert hat. Da es sich um dreidimensionale Strukturen handelt, wächst der Informationsgehalt nicht linear, sondern kubisch. Eine Struktur bei 1,25 Å Auflösung hat damit einen 8.000fach höheren Informationsgehalt als eine 25-Å-Struktur, wie sie vor 30 Jahren möglich gewesen wäre. Selbst die Verbesserung von einer 3-Å-Auflösung nach 1,25 Å bedeutet noch einen 14fachen Informationsgewinn.



▲ **Abb. 2:** Atomare Auflösung. Ein einzelnes Tyrosin aus der Apoferritin Struktur bei 1,25 Å Auflösung. Die hochaufgelöste Struktur zeigt die einzelnen Atome der Tyrosinseitenkette als Gitternetzstrukturen (rot). Einzelne Atome können bei dieser Auflösung eindeutig getrennt voneinander visualisiert werden.

lichte, strukturell gebundene Wassermoleküle und Ionen sichtbar zu machen. Bis 2019 wurde der Auflösungsrekord weiter verbessert auf 1,52 Ångstrom für eine Struktur von Apoferritin [7] – ein Proteinkomplex, der mittlerweile weltweit eingesetzt wird, um das Auflösungsvermögen von Elektronenmikroskopie-Hardware und Bildverarbeitungssoftware zu testen.

### Wofür braucht man noch bessere Elektronenmikroskope?

Betrachtet man die derzeitigen Verbesserungen, stellt sich daher die Frage: Was ist in Zukunft noch möglich und wo liegt das Limit der erreichbaren Auflösung? Zu diesem

Zweck bauten wir in Zusammenarbeit mit Thermo Fisher (Eindhoven) und CEOS GmbH (Heidelberg) einen neuen Mikroskop-Prototyp, den wir mit zusätzlicher Hardware zur Verbesserung der optischen Eigenschaften ausstatteten. Ein Monochromator verkleinert die chromatischen Fehler im Bild und ein sphärischer Aberrationskorrektor minimiert weitere auflösungslimitierende Aberrationen (optische Fehler) im Bild.

Mit diesem neuartigen Mikroskop gelang es uns kürzlich, den Auflösungsweltrekord in der Kryo-Elektronenmikroskopie weiter zu verbessern [8]. Die 3D-Struktur des Eisenspeicherproteins Apoferritin berechneten wir nun aus circa einer Million Bilder bei

einer nominellen Auflösung von 1,15 Ångstrom. Bei dieser Auflösung können wir nun erstmalig einzelne Atome im Protein direkt sichtbar machen (**Abb. 1, Abb. 2**). Die Auflösung ist ebenfalls ausreichend für die Visualisierung von Dichten, die man einzelnen Wasserstoffatomen zuordnen kann.

### Wofür werden solche Auflösungen benötigt?

Im Bereich einer Auflösung von 3,5 Ångstrom und besser kann man bereits sehr zuverlässige atomare Modelle von Proteinen erstellen. Dies gelingt, weil man größere Aminosäureseitenketten in der berechneten Dichtekarte erkennen kann. Beim Erstellen eines atomaren Modells handelt man sich dann von einer großen Aminosäure zur anderen. Man erstellt also ein atomares Modell, ohne die Atome selbst sehen zu können, indem man auf die bekannten chemischen Geometrien und Eigenschaften von Aminosäuren und Peptidbindungen zurückgreift.

Diese Modelle bilden die Grundstruktur eines Proteins bereits sehr gut ab; einige wichtige Details bleiben jedoch verborgen. Für die katalytische Aktivität von Enzymen werden beispielsweise Geometrien benötigt, die abweichend von der Norm sind. Will man verstehen, wie katalytische Mechanismen in Proteinen funktionieren, muss man die einzelnen Atome direkt sehen können, um vom Standard abweichende chemische Bindungen als solche interpretieren zu können [9]. Diese Informationen sind ebenfalls von großer Bedeutung bei der Wirkstoffsuche im medizinischen Bereich. Für die zielgerichtete Entwicklung neuer Medikamente ist es von zentraler Bedeutung, den genauen enzymatischen

Mechanismus und die exakte Lage aller Atome eines Proteins zu kennen, einschließlich der gebundenen Wassermoleküle und Ionen. Mit jedem Zehntel eines Ångstroms an verbesserter Auflösung tun sich im Hinblick auf Genauigkeit und Interpretierbarkeit von Proteinstrukturen neue Welten auf.

### Wo sind die Grenzen der Kryo-EM?

Aufgrund der sehr kleinen Wellenlänge von Elektronen handelt es sich bei der Kryo-EM im Gegensatz zur Lichtmikroskopie um keine diffraktionslimitierte Technik. Für eine perfekte Probe sind die realen erreichbaren Auflösungen durch die Elektronenoptik limitiert und in der Praxis auch durch die enorme Statistik an benötigten Bildern zur Berechnung einer 3D-Struktur. Aus praktischen Gründen wäre es selbst mit unserem jetzigen, hoch optimierten Mikroskop unmöglich, 3D-Strukturen mit einer Auflösung unter einem Ångstrom zu berechnen. Die Aufnahmezeiten am Mikroskop und die Rechenzeiten wären zu lang, um mit den erforderlichen zig Millionen Bildern zu arbeiten. Die Kryo-EM entwickelt sich allerdings immer noch sehr schnell, und auch unser Mikroskop kann optisch noch weiter verbessert werden. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass neue Methoden in der computergestützten Bildverarbeitung Einzug halten werden und so in naher Zukunft auch Auflösungen unter einem Ångstrom wahrscheinlich werden.

Die Realität ist jedoch, dass die auflösungslimitierenden Aspekte nicht ausschließlich in der Elektronenmikroskopie-Hardware liegen, sondern vielmehr in der Qualität der Proteinkomplexe selbst. Für die meisten strukturbioologischen Fragestellungen wird auch in Zukunft die biochemische Präparation der Probe im Vordergrund stehen. Nicht derjenige mit dem besten Elektronenmikroskop macht das Rennen, sondern derjenige mit der besten Probenqualität. ■

### Literatur

- [1] Adrian M, Dubochet J, Lepault, J, McDowell AW (1984) Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308:32–36
- [2] Boekema, E.J., and van Heel, M. (1988). Molecular shape of *Lumbricus terrestris* erythrocrucorin studied by electron microscopy and image analysis. *Biochim Biophys Acta* 957, 370–379.
- [3] Stark H, Mueller F, Orlova et al. (1995) The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* 3:815–821

- [4] Verschoor A, Frank J, Radermacher M et al. (1984) Three-dimensional reconstruction of the 30 S ribosomal subunit from randomly oriented particles. *J Mol Biol* 178:677–698
- [5] Kuhlbrandt W (2014) Biochemistry. The resolution revolution. *Science* 343:1443–1444
- [6] Fischer N, Neumann P, Konevega AL et al. (2015) Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature* 520:567–570
- [7] Kato T, Makino F, Nakane T et al. (2019) The 1.54 Å resolution structure of apoferritin by CRYOARM300 with Cold-FEG. *Microsc Microanal Suppl* 2:998–999
- [8] Yip KM, Fischer N, Paknia E et al. (2020) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
- [9] Ludtke S, Neumann P, Erixon KM Et al. (2013) Sub-ångstrom-resolution crystallography reveals physical distortions that enhance reactivity of a covalent enzymatic intermediate. *Nat Chem* 5:762–767

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Holger Stark  
Abteilung Strukturelle Dynamik  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11  
D-37077 Göttingen  
hstark1@gwdg.de

### AUTOR



#### Holger Stark

1988–1994

Biochemiestudium und 1994–1996 Promotion an der FU Berlin. 1997–1998 Postdoc im Labor von Prof. Dr. M. van Heel am Imperial College in London, UK. 1998–1999 Arbeitsgruppenleiter am

Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung an der Universität Marburg. 2000–2007 Arbeitsgruppenleiter am Max-Planck-Institut (MPI) für biophysikalische Chemie in Göttingen. 2007–2015 Professor für Molekulare Kryo-Elektronenmikroskopie an der Universität Göttingen und Arbeitsgruppenleiter am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2015 Direktor am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen und Honorarprofessor der Universität Göttingen.

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer