

Das Henne/Ei-Problem der Kryo-Elektronenmikroskopie

Initialstrukturbestimmung kleiner Komplexe mit Kryo-Elektronenmikroskopie

J. Loerke, F. Krupp, C.M.T. Spahn, Institut für medizinische Physik und Biophysik, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Kurzgefasst

- Kryo-Elektronenmikroskopie ermöglicht die Abbildung von Komplexen unter fast nativen Bedingungen
- Die Erzeugung hochaufgelöster Strukturen benötigt ein Startmodell als Vergleichsbasis - bei unbekannt Strukturen müssen welche erzeugt werden!
- Zur Erzeugung von Startmodellen werden durch Klassifizierung typische Partikelansichten gesucht und zu einem vorläufigen 3D Modell kombiniert

Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM, Nobelpreis 2017) ist eine Methode, die Proteinkomplexe in Eis abbildet. Sie hat im Vergleich zu anderen Verfahren den Vorteil, dass die untersuchten Komplexe häufig unter fast physiologischen Bedingungen eingefroren werden und so echte Zustände abgebildet werden können. Die Verbindung von EM und digitaler Bildbearbeitung und eine Revolution auf dem Feld der Detektoren ("direct electron detectors") erlauben die Gewinnung von hochaufgelösten Strukturen, die mit denen aus der Röntgenstrukturanalyse vergleichbar sind.

Die sog. Einzelpartikelanalyse ("single particle method", [1]) basiert auf der Annahme, dass Einzelbilder in amorphem Eis zufällig orientierte Bilder identischer Komplexe zeigen und daher gemittelt werden können. Ähnlich wie bei der Tomographie erlaubt die Kombination von 2-dimensionalen Bildern aus unterschiedlichen Richtungen die Rekonstruktion der 3-dimensionalen Struktur. Da allerdings im Gegensatz zur Tomographie anfangs keine experimentelle Information über die Orientierung und Winkelzuordnung der einzelnen Bilder vorliegt, muss diese erst in einem rechenintensiven iterativen Prozess durch Vergleich mit einer bekannten Struktur erzeugt werden. Bei Komplexen für die jedoch noch keinerlei strukturelle Information vorliegt, ist die Erzeugung eines vorläufigen Startmodells notwendige Voraussetzung, um danach in weiteren Schritten die Struktur des unbekannt Komplexes mit hoher Auflösung berechnen zu können.

Zur Erzeugung eines Startmodells müssen in einem ersten Schritt potentielle Partikel auf dem Probenträger identifiziert werden. Der Kontrast bei Hochleistungsmikroskopen ist typischerweise sehr niedrig,

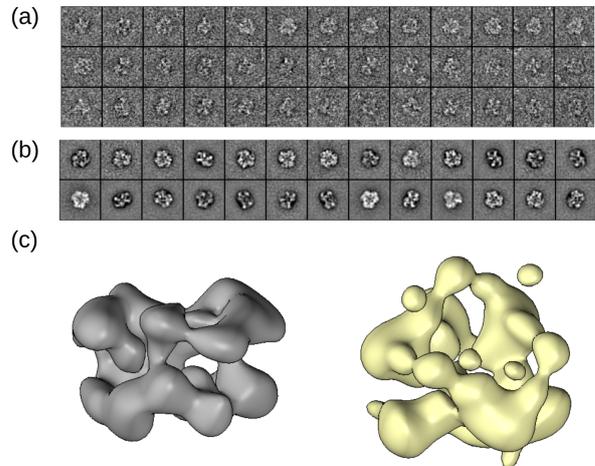


Abbildung 1: Initialstrukturbestimmung am Beispiel von Disproportionating enzyme 2 (DPE2). (a) Einzelpartikel einer negativ kontrastierten Probe die manuell auf Rohbildern identifiziert wurden. (b) Klassenbilder nach Klassifizierung und Orientierungssuche mit ISAC. (c) Zwei mit VIPER generierte Initialmodelle. Der Vergleich mit den Rohbildern und Klassen zeigt die Plausibilität der Startmodelle.

Daher stellt dies einen der schwierigsten und gleichzeitig wichtigsten Schritte dar, da sehr kleine Komplexe nur schwer zu erkennen sind und viele automatische Suchalgorithmen versagen. Um den Kontrast zu erhöhen werden Proben häufig mit Schwermetallsalzen kontrastiert ("negative stain", siehe Abb. 1). Dies verändert zwar häufig die Struktur des untersuchten Komplexes, erhöht aber den Kontrast soweit, dass Partikel deutlich leichter sichtbar sind. Eine niedrig aufgelöste Struktur die mit Hilfe von Kontrastmittel erzeugt wurde dient dann meist als Startmodell für Partikel in amorphem Eis ("kryo" Bedingungen).

Sind mögliche Partikel identifiziert, werden sie zu Einzelbildern ausgeschnitten, zentriert und in einem Klassifizierungsschritt auf Ähnlichkeiten untersucht. Da bei unbekannt Proben keine Information über den gesuchten Komplex vorliegt, werden durch die Klassifizierung selbstähnliche Bilder gruppiert und zu sog. Klassenbildern aufsummiert (siehe Abb. 1 und 2). Detailreiche und definierte Klassenbilder werden meist von häufig auftauchenden Partikelbildern gebildet, die bei einer homogenen Probe mit hoher Wahrscheinlichkeit Projektionsansichten des untersuchten Komplexes darstellen. Einzelbilder die zu schlecht definierten Klassenbildern zugeordnet werden, zeigen typischerweise Verunreinigungen und können daher aus dem Datensatz entfernt werden. Um die Qualität der gewonnenen Klassen zu erhö-

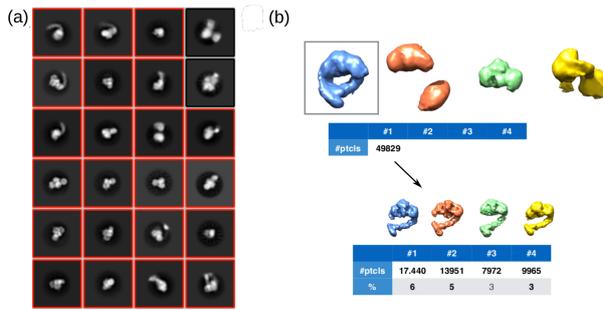


Abbildung 2: Initialstrukturbestimmung am Beispiel einer Cullin4-RING Ligase. (a) Gut definierte Klassenbilder (rot umrandet) werden zur Strukturgenerierung herangezogen, die anderen (rechts oben) verworfen. (b) Vier unabhängige, parallel erzeugte Initialstrukturen (obere Reihe). Die umrandete Struktur wurde weiter raffiniert und in vier Unterzustände aufgetrennt (untere Reihe).

hen wird hier ein spezielles Verfahren (ISAC: iterative stable alignment and clustering [5]) eingesetzt. Sind die Bilder in einer gewonnenen Klasse homogen, ist zu erwarten dass das Ergebnis bei mehreren, zufällig initialisierten Durchläufen reproduzierbar ist und gleiche Orientierungen und Klassenzuordnungen entstehen. Die Klassifizierung wird daher mehrfach parallel und unabhängig voneinander gestartet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Nur mehrfach auftretende, reproduzierbare Zuordnungen und Orientierungen werden dann als "stabile" Klassen bezeichnet und weiterverwendet.

Sind häufig auftretende Partikel mithilfe der Klassifizierung identifiziert worden, werden die gemittelten Bilder zu möglichen 3D Modellen kombiniert. Ähnlich wie bei der Klassifizierung werden parallel mehrere Modelle erzeugt, die in einem iterativen Prozess verfeinert und mithilfe eines genetischen Algorithmus verbessert werden (VIPER [4]). Aus dem Vergleich der parallel erzeugten Startmodelle und aus dem Vergleich mit Einzelpartikelbildern und Klassen können meist plausible und konsistente Startmodelle identifiziert werden. Diese werden als Startpunkte der single-particle-Methode eingesetzt, um in einem iterativen Prozess Einzelpartikelbilder aus kryo-Bedingungen zu einer hochaufgelösten Proteinstruktur zu verfeinern (z.B. mit Relion [6], siehe Abb. 3). In einem hierarchischen Prozess werden fälschlicherweise identifizierte (falsch-positive) Partikel abgetrennt. Um inhärent heterogene Proben in Einzelzustände aufzutrennen werden heterogene Regionen des Komplexes identifiziert und die Partikelbilder hierarchisch klassifiziert um dann separat zu hoher Auflösung raffiniert zu werden.

WWW

https://biophysik.charite.de/forschung/ag_kryo_elektronenmikroskopie

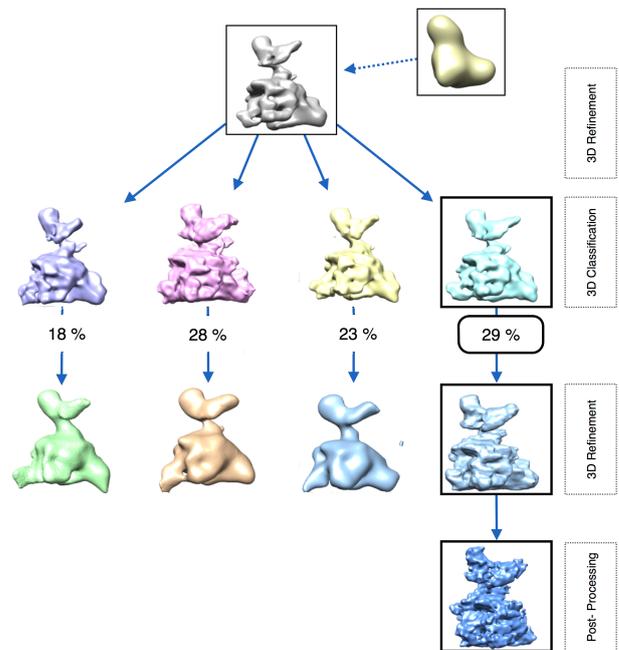


Abbildung 3: Strukturbestimmung eines vollständigen Antiterminationskomplexes. Die mit VIPER generierte Initialstruktur (gelbe Struktur, oben rechts mit gestricheltem Pfeil) wird zur initialen Orientierungssuche benutzt. Durch Raffinierung der Orientierungsparameter entsteht die graue Struktur, die in mehreren Schritten in verschiedene Zustände sortiert wird. Nur die umrandeten Strukturen rechts zeigen den echten Komplex, alle anderen bestehen aus falsch-positiven Partikeln die verworfen werden (nach [2])

Weitere Informationen

- [1] Y. Cheng et al., *Cell* **161** (2015). doi: 10.1016/j.cell.2015.03.050
- [2] N. Said et al., *Nat Microbiol* **2** (2017). doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.62
- [3] F. Krupp et al., *Mol Cell* **74** (2019). doi: 10.1016/j.molcel.2019.01.016
- [4] T. Moriya et al., *J Vis Exp* **123** (2017). doi: 10.3791/55448
- [5] Z. Yang et al., *Structure* **20** (2012). doi: 10.1016/j.str.2011.12.007
- [6] S.H. Scheres, *J Struct Biol* **180** (2012). doi: 10.1016/j.jsb.2012.09.006

Förderung

DFG Sonderforschungsbereiche (SFB) 740 & 958