

Elektronenmikroskopie an Alzheimer - Fibrillen

Neue Möglichkeiten der Strukturaufklärung



Marcus Fändrich, D. Phil. Habil., Leiter der AG „Proteinfaltung und Aggregation“ Max-Planck Forschungsstelle Enzymologie der Protein Faltung und Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg



Prof. Nikolaus Grigorieff, Ph.D., Leiter der AG „Hochauflösende Elektronenmikroskopie“, Brandeis University and Howard Hughes Medical Institute



Dr. rer. nat. Carsten Sachse, Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG „Proteinfaltung und Aggregation“, Max-Planck Forschungsstelle ‚Enzymologie der Protein Faltung‘ und Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg und Brandeis University



Amyloidfibrillen sind fadenförmige Eiweißablagerungen, die im Gehirn von Alzheimerpatienten auftreten. Durch Verwendung verbesserter, computergestützter Verfahren zur Bearbeitung elektronenmikroskopischer Aufnahmen gelang es nun erstmals, bei Alzheimer-Amyloidfibrillen strukturelle Details mit einer Auflösung von unter 1 nm darzustellen. Langfristig könnten diese Methoden auch zu neuen medikamentösen Strategien führen.

Amyloidfibrillen in der Alzheimerschen Krankheit

Amyloidfibrillen sind fadenförmige Zusammenlagerungen von Eiweißketten. Das strukturelle Rückgrad dieser Fibrillen besteht aus einem bestimmten Typus von β -Faltblattstruktur, welche man als „Cross- β Struktur“ bezeichnet. Im menschlichen Körper treten Amyloidfibrillen im Zuge der Alterung oder bei bestimmten Krankheiten auf, wie z.B. bei der Alzheimerschen Krankheit. Alzheimer-Amyloidfibrillen werden von dem A β Peptid gebildet. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten lagern sich diese A β -Amyloidfibrillen dann miteinander verklumpt als sogenannte Amyloidplaques ab. Zwar ist die Krankheitsrelevanz von

A β noch immer umstritten, doch geht man davon aus, dass die von A β gebildeten Fibrillen oder deren unmittelbare strukturelle Vorläufer für den Krankheitsbeginn entscheidend sind [1].

Trotz großen medizinischen Interesses fehlen aber bis zum jetzigen Zeitpunkt befriedigende Therapiemöglichkeiten - nicht zuletzt deswegen, weil die grundlegenden molekularen Mechanismen dieser Demenzkrankheit und die daran beteiligten molekularen Strukturen nur ungenügend verstanden sind. Präzisere strukturelle Informationen über die von A β gebildeten Strukturen sind somit ein Schlüssel zu möglichen neuen Behandlungsansätzen.

Aufklärung der Amyloidstruktur mittels Elektron-Kryo-Mikroskopie

Obwohl Amyloidfibrillen bereits seit den 1950-er Jahren mittels Elektronenmikroskopie (EM) sichtbar gemacht werden können [2], stellt die Aufklärung ihrer Struktur im atomaren Detail noch immer eine technische Herausforderung dar. Ein Grund hierfür liegt in dem Umstand, dass die klassischen Methoden der Strukturbestimmung bei Proteinen, wie die Röntgenkristallographie und Kernresonanzspektroskopie (NMR), zwar

Detailinformationen über Amyloidfibrillen liefern konnten, zur Aufklärung der gesamten Fibrillenstruktur aber bislang nicht geeignet sind. Vor diesem Hintergrund wurde ein methodisch anderer Ansatz gewählt, in welchem durch eine gezielte Kombination von Elektronen-Kryo-Mikroskopie (Kryo-EM) und weiterentwickelter Verfahren zur computergestützten Bildbearbeitung die Amyloidstruktur aufgeklärt werden soll. Dadurch gelang es bei einer Alzheimer-Amyloidfibrille nun erstmals, eine Auflösung von unter 1 nm zu erreichen [3].

Für Kryo-EM werden die Amyloidfibrillen zunächst in Eis schockgefroren. Dieses Verfahren verhindert, dass die abgebildete Fibrillenstruktur deformiert wird. Von diesen in Eis eingebetteten Fibrillen werden dann elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, aus welchen im Computer die dreidimensionale Fibrillenstruktur berechnet werden kann (Abb. 2). Für diese Verfahren ist es von Vorteil, dass Amyloidfibrillen im Prinzip relativ symmetrisch gebaut sind. Aus früheren Arbeiten ist nämlich bekannt, dass Kryo-EM bei hoher struktureller Ordnung oder Symmetrie, wie sie etwa in den 2D-Kristallen von Bacteriorhodopsin oder in einem viralen Kapsid herrscht, Auflösungen im atomaren Be-

reich erzielen kann [4]. Leider weichen aber viele biologische Moleküle aufgrund ihrer Flexibilität von einer ideal geordneten Struktur ab. Durch Weiterentwicklung entsprechender Computerprogramme gelang es uns aber, diese Abweichungen teilweise zu kompensieren. Im Gegensatz zu traditionellen, beugungsbasierten Verfahren der Strukturbestimmung ist es also nun möglich, auch die Struktur von weniger starren Strukturen, wie etwa der einer Amyloidfibrille, zu bestimmen. Eine erste Anwendung dieser Technik lieferte beim Tabak-Mosaik-Virus eine Auflösung von 4.5 Å [5], welches eine der höchsten, mit Kryo-EM bislang erzielten Auflösungen darstellt.

Struktur der untersuchten Alzheimer Amyloidfibrille

Die im Falle der Alzheimer-Amyloidfibrille erhaltene Struktur ist eine Doppelhelix, bestehend aus zwei identischen und linkshändig umeinander gewundenen Einzelsträngen (den sogenannten Protofilamenten). Die Fibrille ist polar, und ihre helikale Ganghöhe beträgt 280 nm. Die Fibrillen sind 19 nm

breit. Im Gegensatz zu früheren Meinungen, die von einer tubulären Fibrillenstruktur und einem ringförmigen Fibrillen-Querschnitt ausgingen, ist der tatsächlich gefundene Querschnitt annähernd propellerförmig. Dabei steuert jedes Protofilament ein „Propellerblatt“ bei (Abb. 3). Im Querschnitt zeigt jedes Propellerblatt eine fast U-förmige Struktur. Die beiden Protofilamente berühren sich im Zentrum der Fibrille mit ihren U-Bögen. Die beiden (ungleich langen) Schenkel eines jeden „U“s liegen nebeneinander, d.h. jedes Protofilament besteht aus zwei gepaarten β -Faltblattregionen. Diese Anordnung ähnelt dem zuvor beschriebenen Reißverschluss (Steric Zipper)-Motiv, welches man aus Röntgenbeugungsstudien an Modellpeptiden kennt [6]. Diese Region stellt somit den Kern der Alzheimer-Amyloidfibrille dar und besitzt mutmaßlich auch eine entscheidende Bedeutung beim Entstehungsprozess dieser krankhaften Aggregate.

Danksagung

Einen besonderen Dank möchten wir an Chen Xu rich-

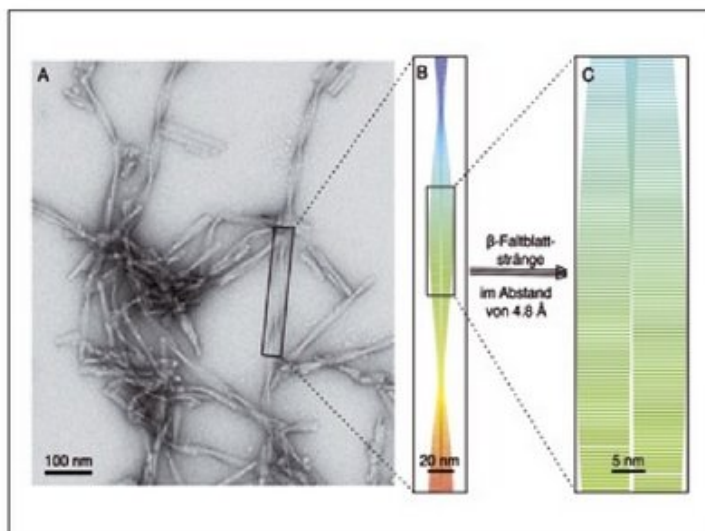


Abb. 1: Die verschiedenen Größenordnungen einer Amyloidfibrille: von der elektronenmikroskopischen Aufnahme zu einem Modell.

A) Fibrillenpräparation abgebildet durch Negativkontrastfärbung im Elektronenmikroskop.

B) Modell einer Fibrille.

C) Zoom auf das Fibrillenmodell mit der Cross- β Struktur, welche ausschließlich aus β -Faltblättern besteht.

Verpassen Sie nie wieder ...
... Phänomene in lebenden Zellen

A1-R

verbindet Geschwindigkeit
mit hoher Empfindlichkeit



Konfokale Laserscanning
Mikroskopie

Molekulare Interaktion
Spektrales Imaging
Zelluläre Dynamik
Strukturelle Details



interessiert? Tel. +49 211 94 14 0
mikroskope.messtechnik@nikon.de · www.nikoninstruments.eu

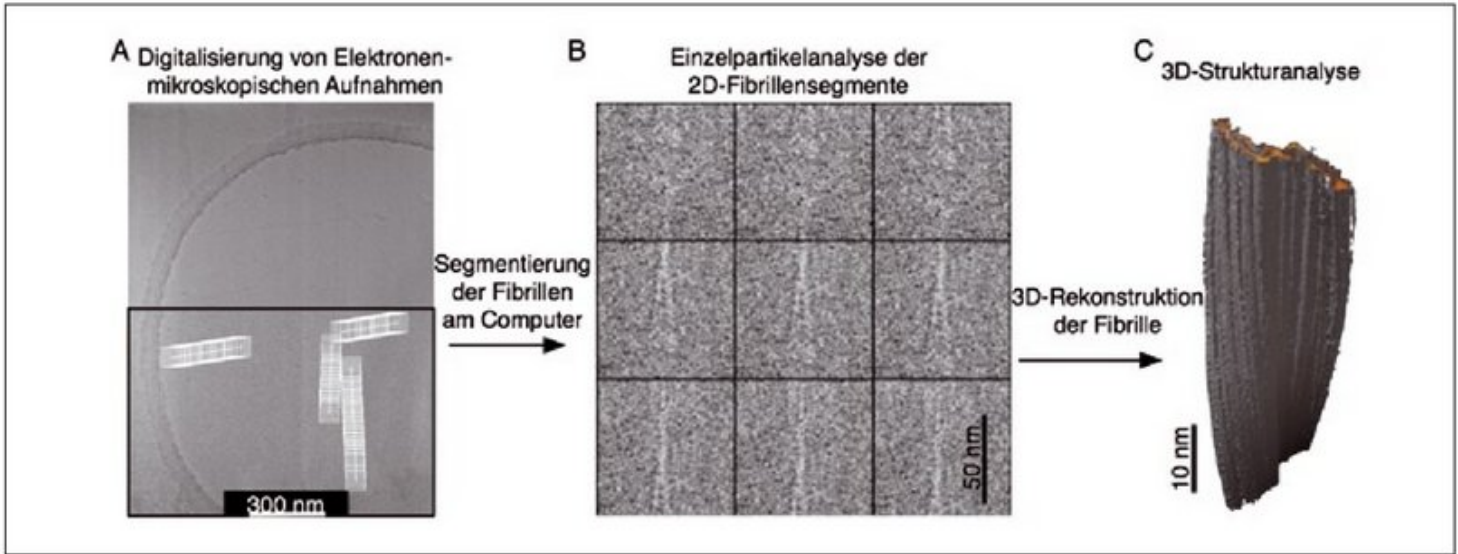


Abb. 2: Kryo-EM: Elektronenmikroskopie und computergestützte Bildbearbeitung. A) Die Fibrillen werden aus den digitalisierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgeschnitten und B) der Einzelpartikelanalyse unterzogen. C) Die 2D-Fibrillensegmente werden dann mit Hilfe der helikalen Symmetrie zu einer dreidimensionalen Struktur rekonstruiert. Diese 3D-Rekonstruktion kann dann mit Hilfe einer atomaren Struktur analysiert und interpretiert werden.

ten, der maßgeblich in der Anfangsphase des Projektes beteiligt war. Die beschriebenen Arbeiten wurden durch das BioFuture-Programm vom BMBF und vom NIH gefördert. C.S. wird jetzt durch eine EMBO Long-term Fellowship unterstützt. Die Autoren danken D. Thal (Universität Ulm) für das in Abbildung 3 gezeigte Bild eines Amyloidplaques.

Referenzen

- [1] Mattson M.: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639 (2004)
- [2] Cohen A. und Calkins E.: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202-1203 (1959)
- [3] Sachse C. et al.: Paired beta-sheet structure of an Aβ(1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7462-7466 (2008)
- [4] Henderson R. et al.: Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of molecular biology* 213, 899-929 (1990)
- [5] Sachse C. et al.: High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *Journal of molecular biology* 371, 812-835 (2007)
- [6] Sawaya M.R. et al.: Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457 (2007)

Autoren:

Dr. rer. nat. Carsten Sachse, Max-Planck Forschungsstelle, Enzymologie der Protein Faltung und Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg und Brandeis University und MRC-LMB Cambridge

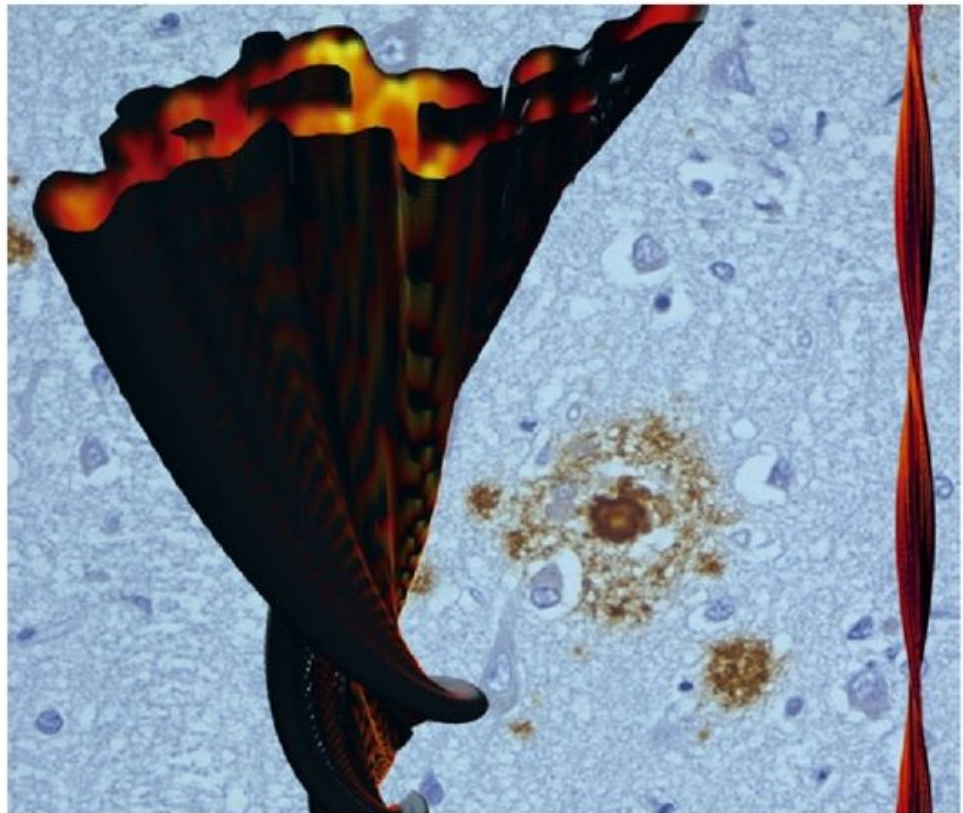


Abb. 3: Vordergrund: Seitenansicht und Querschnittsaufsicht einer Alzheimer-Amyloidfibrille (rot). Hintergrund: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Gehirnschnitts mit Alzheimer-Amyloidplaques (braun), welche aus Amyloidfibrillen bestehen.

Prof. Nikolaus Grigorieff, Ph.D., Rosenstiel Basic Medical Sciences Research Center and Howard Hughes Medical Institute, Brandeis University, Waltham, MA. U.S.A.

Marcus Fändrich, D.Phil. Habil., Max-Planck Forschungsstelle Enzymologie der Protein Faltung und Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Kontakt

Dr. Marcus Fändrich
 Max-Planck Forschungsstelle Enzymologie der Protein Faltung
 Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
 Tel.: 0345/5524970
 Fax.: 0345/5527282
 fandrich@enzyme-halle.mpg.de