

De fångade livet i atomdetalj

Jacques Dubochet, Joachim Frank och Richard Henderson belönas med Nobelpriset i kemi 2017 eftersom de har utvecklat en effektiv metod för att ta fram tredimensionella bilder av livets molekyler. Med hjälp av kryoelektronmikroskopi kan forskare nu frysa biomolekyler mitt i deras flyktiga rörelser och avbilda dem i atomär upplösning. Tekniken har tagit biokemin in i en ny era.

En mängd sällsamma och vindlande strukturer av livets molekylära maskiner har under de senaste åren fyllt den vetenskapliga litteraturen. Salmonellabakteriens injektionsnål för att angripa celler; proteiner som orsakar resistens mot cellgifter och antibiotika; molekylkomplex som styr dygnsrytmen; ljusfångande reaktionskomplex från fotosyntesen och en tryckkänslig sensor av den typ som hjälper oss att höra. Det är bara några exempel på de hundratals biomolekyler som nu har avbildats med hjälp av kryoelektronmikroskopi (Bild 1).

När forskare började misstänka att zikaviruset var orsaken till epidemin av hjärnskadade nyfödda barn i Brasilien, var det till kryoelektronmikroskopet man vände sig för att visualisera viruset. Inom loppet av några månader fanns tredimensionella bilder i atomupplösning av viruset och forskarna kunde börja leta efter möjliga mål för läkemedel.

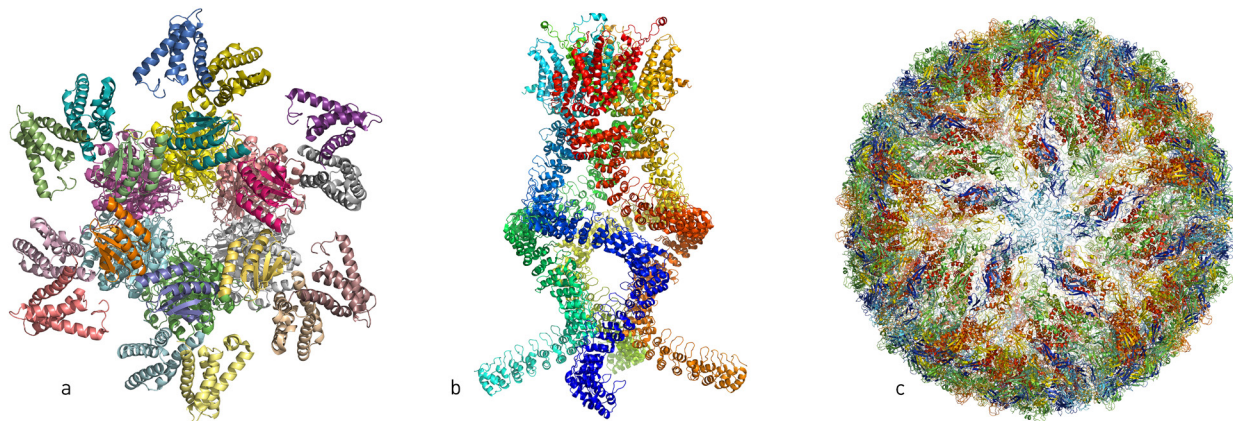


Bild 1. Under de senaste åren har forskare publicerat atomstrukturer för en rad avancerade proteinkomplex. **a.** Ett proteinkomplex som styr dygnsrytmen. **b.** En sensor av den typ som läser av ljudvågor som tryckändringar i örat och hjälper oss att höra. **c.** Zikaviruset.

Jacques Dubochet, Joachim Frank och Richard Henderson har gjort banbrytande upptäckter som möjliggjort utvecklingen av kryoelektronmikroskopi. Metoden har kort sagt tagit biokemin in i en ny era och det är lättare än någonsin att fånga biomolekyler på bild.

Bilder – en viktig nyckel till kunskap

Under 1900-talets första hälft var biomolekyler – proteiner, DNA och RNA – som vita fläckar på biokemins karta. Man visste att de spelade fundamentala roller i cellen, men hade ingen aning om hur de såg ut. Först när forskare i Cambridge under mitten av 1900-talet började belysa kristaller av proteiner med röntgenstrålar, kunde man för första gången visualisera deras slingrande och skruvade strukturer.

I början av 1980-talet kompletterades röntgenkristallografin med kärnmagnetisk resonansspektroskopi (NMR-spektroskopi) av proteiner i fast fas och lösning, som utöver strukturen också kan avslöja hur proteiner rör sig och växelverkar med andra molekyler.

Tack vare de båda metoderna finns numera databaser med tusentals modeller av biomolekyler som används i allt från grundforskning till läkemedelsutveckling. Samtidigt dras de båda metoderna med inneboende begränsningar. NMR i lösning fungerar endast för relativt små proteiner. Röntgenkristallografi kräver att de molekyler som ska studeras tränger ihop sig i välordnade kristaller, som när vatten fryser till is. Bilderna blir som svart-vita porträtt från kamerans barndom – positionen är stelfrusen och avslöjar väldigt lite om proteinets dynamik.

Många molekyler vägrar också att inordna sig i kristaller. Det fick Richard Henderson att på 1970-talet överge röntgenkristallografin. Här börjar berättelsen om 2017 års Nobelpris i kemi.

Problem med kristaller får Henderson att byta spår

Richard Henderson doktorerade vid röntgenkristallografins högberg, Cambridge, Storbritannien. Han använde metoden för att avbilda proteiner, men när han försökte kristallisera ett protein som låg inbäddat i det membran som omger cellen kom motgångarna.

Membranbundna proteiner är knepiga att hantera. När de avlägsnas från sin naturliga miljö i membranet klumpar de oftast ihop sig till en oduglig massa. Det första membranbundna protein som Richard Henderson arbetade med var svårt att få fram i tillräckliga mängder; det andra gick inte att kristallisera. Efter år av misslyckanden vände han sig till det enda alternativ som fanns: elektronmikroskopet.

Eller – det går att diskutera om elektronmikroskopet verkligen var ett alternativ på den här tiden. Transmissionselektronmikroskopi, som är det fullständiga namnet, fungerar ungefär som vanlig mikroskopi, men istället för ljus skickas en stråle av elektroner genom provet. Våglängden för elektroner är mycket kortare än för ljus, därför kan elektronmikroskopet synliggöra mycket små strukturer – till och med enskilda atomer.

Elektronmikroskopets upplösning var alltså rent teoretiskt mer än tillräckligt bra för att Henderson skulle kunna få fram en atomstruktur av ett membranbundet protein, men utifrån ett praktiskt perspektiv var projektet näst intill omöjligt. Redan när elektronmikroskopet uppfanns på 1930-talet stod det klart att det lämpade sig bäst för död materia. Den intensiva elektronstråle som behövs för att få högupplösta bilder bränner sönder biologiska material och om strålen görs svagare förlorar bilden sin kontrast och blir brusig.

Dessutom kräver elektronmikroskopet vakuum, ett tillstånd som biomolekyler trivs dåligt i, eftersom det omgivande vattnet dunstar bort. När biomolekyler blir torrlagda kollapsar de och förlorar sin naturliga struktur, vilket gör bilderna värdelösa.

Det mesta talade alltså för att Richard Henderson skulle misslyckas, men projektet räddades av det speciella protein som han hade valt att studera: bakterierodopsin.

Bäst hittills inte bra nog för Henderson

Bakterierodopsin är ett purpurfärgat protein som ligger inbäddat i en fotosyntetiserande organisms membran, där det fångar energin i solens strålar. Istället för att avlägsna det känsliga proteinet från membranet, som Henderson hade försökt göra tidigare, tog han och hans medarbetare det kompletta purpurfärgade membranet och lade det under elektronmikroskopet. När proteinet

fortfarande var omhuldat av membranet bibehöll det sin struktur. Provets yta täckte de med en glukoslösning som skyddade det från att torka ut i vakuum.

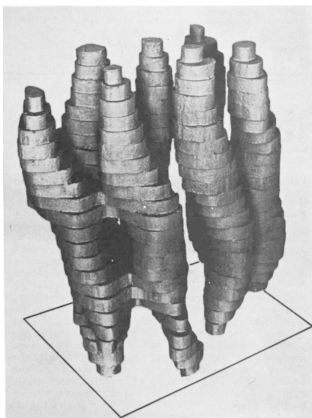


Bild 2. Den första modellen av bakterierodopsin, publicerad 1975. Bild från *Nature* 257: 28-32

Ett stort problem var den skoningslösa elektronstrålen, men här utnyttjade forskarna det faktum att bakterierodopsinmolekylerna ligger tätt packade i organismernas membran. Istället för att bränna på med en full dos elektroner, lät de en svagare stråle flöda genom provet. Bilden blev kontrastlös och det gick inte att urskilja de enskilda molekylerna. Men de utnyttjade det faktum att proteinerna låg regelbundet packade och var orienterade åt samma håll. När alla proteiner spred elektronstrålarna på ett likartat vis kunde de utifrån spridningens mönster räkna fram en mer detaljerad bild – de använde samma slags matematik som vid röntgenkristallografi.

I nästa steg vred forskarna membranet under elektronmikroskopet och tog bilder från många olika vinklar. Utifrån detta kunde man 1975 ta fram en grov tredimensionell modell av bakterierodopsinets struktur (bild 2), som visade hur proteinet slingrade sig sju gånger fram och tillbaka genom membranet.

Det var den bästa bild som någonsin hade tagits av ett protein i ett elektronmikroskop. Många imponerades av upplösningen som var 7 Ångström (0,000007 millimeter), men för Richard Henderson dög inte detta. Han ville nå samma upplösning som röntgenkristallografin gav, ungefär 3 Ångström, och han var övertygad om att elektronmikroskopet hade mer att ge.

Henderson tar fram första bilden i atomupplösning

Under åren som kom förbättrades elektronmikroskopet stegvis. Linserna blev bättre och dessutom utvecklades kryotekniken (vi återkommer till det) där proverna kyls med flytande kväve under mätningarna, vilket skyddar dem från att skadas av elektronstrålen.

Sakta men säkert kunde Richard Henderson lägga in fler detaljer i modellen av bakterierodopsin. För att få de skarpaste bilderna reste han runt till de bästa elektronmikroskopen i världen. De hade alla sina svagheter, men kompletterade varandra. Till slut, 15 år efter att han hade publicerat den första modellen, nådde Henderson den magiska gränsen och kunde år 1990 presentera en struktur av bakterierodopsin i atomupplösning (bild 3).

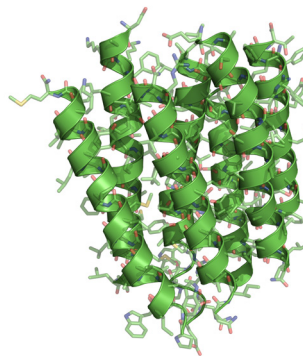
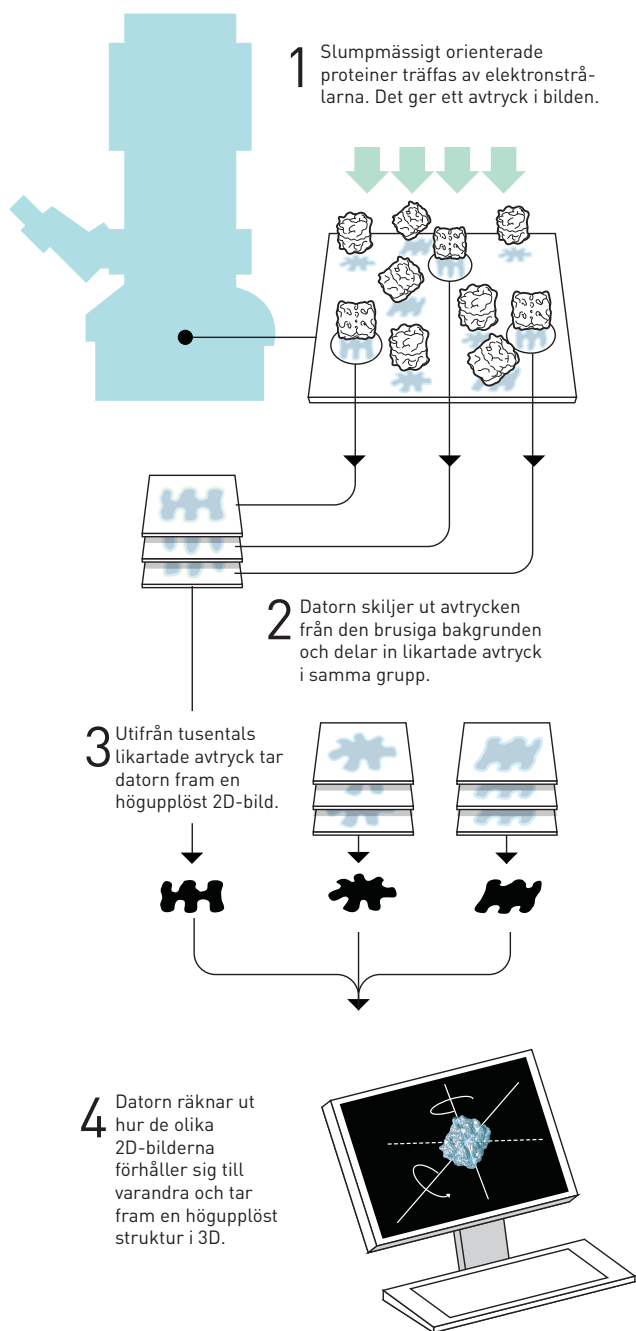


Bild 3. År 1990 presenterade Henderson en struktur i atomupplösning av bakterierodopsin.

Därmed hade han bevisat att kryoelektronmikroskopet kunde ge lika detaljerade bilder som röntgenkristallografi och det var en viktig milstolpe. Beviset byggde dock på ett undantag: att proteinet naturligt packade sig regelbundet i membranet. Få andra proteiner stavar spontant ihop sig på det viset. Frågan var om metoden kunde generaliseras. Skulle man med elektronmikroskopets hjälp kunna ta fram högupplösta 3D-bilder av proteiner som var slumpmässigt utspridda i provet och orienterade åt olika håll? Richard Henderson trodde det, andra ansåg att det var en utopi.

4. FRANKS BILDANALYS FÖR 3D-STRUKTURER



På andra sidan Atlanten, vid New York State Department of Health, hade Joachim Frank under lång tid arbetat för att hitta en lösning på just den frågan. 1975 presenterade han en teoretisk strategi för hur den till synes minimala information som finns i elektronmikroskopets tvådimensionella bild, skulle kunna fogas samman till en högupplöst tredimensionell helhet. Det tog honom över tio år att realisera idén.

Frank filar fram bildanalysen

Joachim Franks strategi (bild 4) byggde på att i en brusig elektronmikroskopibild låta en dator skilja på avtrycken från slumpmässigt spridda proteiner och bakgrunden. Han utvecklade en matematisk metod där datorn kunde identifiera olika mönster som återkom bilden. Sedan sorterade datorn likartade mönster i samma grupp, och slog ihop informationen i dessa bilder till en skarpare medelvärdesbild. På så vis fick han fram en rad högupplösta tvådimensionella bilder som visade ett och samma protein, men utifrån olika vinklar. År 1981 var algoritmerna för detta klara.

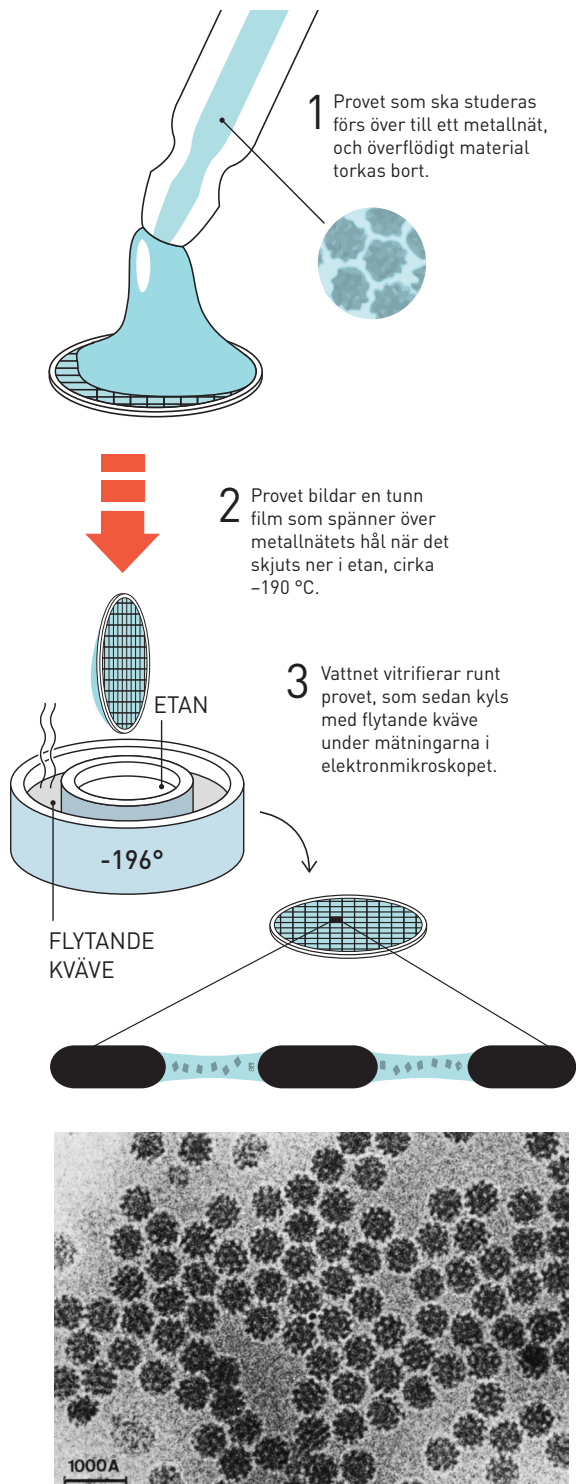
Nästa steg var att matematiskt ta reda på hur de olika tvådimensionella bilderna förhöll sig till varandra och utifrån detta skapa en tredimensionell bild. Den delen av bildanalysen presenterade Frank under mitten av 1980-talet och använde den för att ta fram en modell av ytan av en ribosom, det gigantiska molekylära maskineri som bygger proteiner inuti cellen.

Joachim Franks bildbearbetningsmetod blev fundamental i utvecklingen av kryoelektronmikroskopin. Nu hoppar vi tillbaka några år i tiden. Samtidigt som Frank filade på sina datorprogram, rekryterades Jacques Dubochet 1978 till European Molecular Biology Laboratory i Heidelberg för att lösa ett annat av elektronmikroskopets grundläggande problem: att biologiska prover torkar ut och förstörs när de utsätts för vakuum.

Dubochet gör glas av vatten

Henderson använde 1975 en glukoslösning för att skydda sitt membran från uttorkning, men den metoden fungerade inte för vattenlösliga biomolekyler. Andra forskare hade försökt frysa proverna eftersom is dunstar långsammare än vatten, men iskristallerna störde elektronstrålarna så mycket att bilderna blev oanvändbara.

5. DUBOCHETS VITRIFIERINGSMETOD



1984 fick Dubochet fram de första bilderna av virus omgivna av vitrifierat vatten. Bild från *Nature* 308: 32-36.

Det flyktiga vattnet var ett stort dilemma. Jacques Dubochet såg dock en möjlig lösning: att kyla vattnet så snabbt att det stelnade i sin flytande form och bildade ett glas istället för iskristaller. Ett glas är ett tillsynes fast material, men det flyter egentligen eftersom det råder en oreda bland molekylerna. Jacques Dubochet insåg att om han kunde få vattnet att bilda glas – det kallas också för att vattnet vitrifierar – skulle elektronstrålen spridas på ett jämnt vis och ge en enhetlig bakgrund.

Till en början försökte forskargruppen vitrifiera minimala vattendroppar i flytande kväve vid $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, men framgången kom när de ersatte kvävet med etan som i sin tur var kylt i flytande kväve. Under mikroskopet såg de en droppe som inte liknade något de tidigare hade sett. De antog först att det var etan, men när droppen blev något varmare arrangerade plötsligt molekylerna om sig och formade den tydliga strukturen hos en iskristall. Det var en triumf – framförallt som en del forskare hade menat att det var omöjligt att vitrifiera vattendroppar. Numera tror man att vitriferat vatten är den vanligaste formen av vatten i universum.

Enkel teknik gav kontrast i bilderna

Efter genombrottet 1982 utvecklade Dubochets forskargrupp snabbt grunden till den teknik som används än i dag vid kryoelektronmikroskopi (bild 5). De löste sina biologiska prover – till en början olika former av virus – i vatten. Lösningen fick bilda en tunn film över ett finmaskigt metallnät. Med hjälp av en pilbågsliknande konstruktion sköt de sedan ner nätet i flytande etan så att den tunna vattenfilmen vitrifierade.

År 1984 publicerade Jacques Dubochet de första bilderna av en rad olika virus, runda och sexkantiga, som avtecknar sig i skarp kontrast mot en bakgrund av vitrifierat vatten. I och med detta kunde biologiskt material relativt enkelt prepareras för elektronmikroskopi och snart vallfärdade forskare till Dubochets laboratorium för att lära sig den nya tekniken.

Från blobbologi till revolution

Därmed var de viktigaste pusselbitarna till kryoelektronmikroskopin på plats, men bilderna hade fortfarande otillräcklig upplösning. När Joachim Frank 1991 preparerade ribosomer med hjälp

av Dubochets vitrifieringsmetod och analyserade bilden med sin programvara, fick han fram en 3D-struktur som hade en upplösning på 40 Ångström. Det var ett fantastiskt framsteg för elektronmikroskopin, men bilden visade bara ribosomens konturer. Det såg rent krasst ut som en klump och bilden kom inte ens i närheten av röntgenkristallografins atomära upplösning.

Eftersom kryoelektronmikroskopet sällan kunde visualisera något annat än ett oformligt objekt, på engelska en blob, kallades metoden ibland för "blobology". Stegvis har dock varje skruv och mutter på elektronmikroskopet optimerats. Richard Henderson har envist hängt kvar vid sin vision: att även elektronmikroskopet rutinmässigt ska ge bilder där enskilda atomer syns. Ångström för Ångström har upplösningen förbättrats (bild 6) och år 2013 övervanns det sista tekniska hindret när man började använda en ny sorts elektrondetektor.

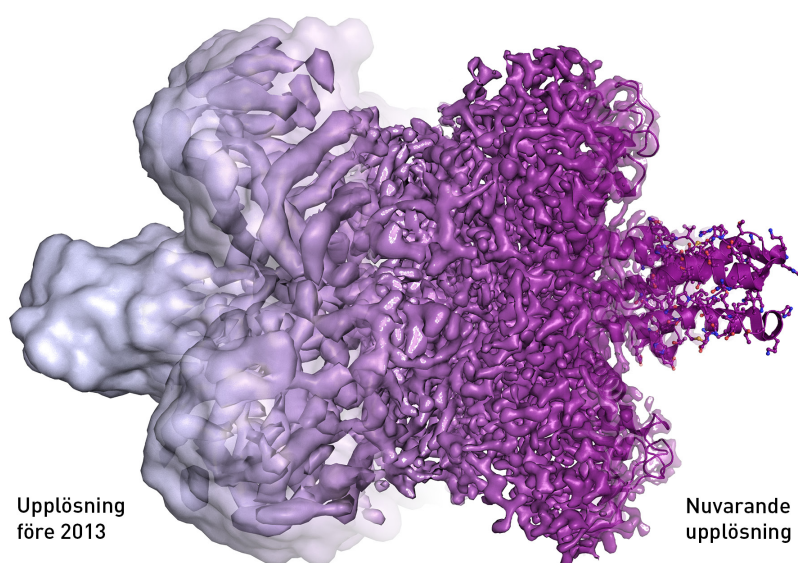


Bild 6. De senaste åren har elektronmikroskopets upplösning radikalt förbättrats, från att mestadels ha visat oformliga klumpar till att idag kunna visualisera proteiner i atomupplösning. Bild: Martin Högbom.

Varje skrymsle i cellen kan utforskas

Nu är drömmen verklighet och vi står inför en explosiv utveckling. Det är flera saker som gör kryoelektronmikroskopet så revolutionerande. Dubochets vitrifieringsmetod är förhållandevis lätt att använda och det krävs minimala mängder prov. Biomolekyler kan genom den snabba kylprocessen frysas mitt i en rörelse och forskare kan ta bildserier som fångar olika delar av ett förlopp. På så vis får de fram "filmer" som visar hur proteiner rör sig och samspelar med andra molekyler.

Med hjälp av kryoelektronmikroskopi är det också lättare än någonsin att avbilda membranbundna proteiner, som ofta fungerar som mål för läkemedel, och stora molekyllära komplex. Små proteiner kan dock inte studeras, men dem kan man visualisera med NMR-spektroskopi eller röntgenkristallografi.

Efter att Joachim Frank 1975 presenterade strategin för sin allmänna bildbearbetningsmetod skrev en forskare att om en sådan metod kunde utvecklas "skulle bara fantasin sätta gränserna."

Nu är vi där. Bara fantasin sätter gränserna. Jacques Dubochet, Joachim Frank och Richard Henderson har genom sin forskning "gjort menskligheten den största nytta." Varje skrymsle av cellen går att fånga i atomdetalj och biokemin står inför en omvälvande tid.

LÄNKAR OCH LÄSTIPS

Mer information om årets priser, bland annat en vetenskaplig bakgrundsartikel på engelska, finns på Kungl. Vetenskapsakademiens webbplats, www.kva.se, och <http://nobelprize.org>. Där kan man också titta på presskonferenser, Nobelföreläsningar och annat videomaterial. Mer information om utställningar och aktiviteter kring Nobelpriset och Ekonomipriset finns på www.nobelmuseum.se.

Artiklar

Dubochet, J. (2016) A Reminiscence about Early Times of Vitreous Water in Electron Cryomicroscopy. *Biophys J.*, 110, 756-757.

Elmes, J. (2016) Interview with Richard Henderson. *Times Higher Education*, www.timeshighereducation.com/people/interview-richard-henderson-university-of-cambridge

Gelfand, A. (2016) The Rise of Cryo-Electron Microscopy, *Biomedical Computation Review*, http://biomedicalcomputationreview.org/sites/default/files/riseofc-e_bcr-spring-2016-web.pdf

Mossman, K. (2007) Profile of Joachim Frank, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 19668-19670.

Wilson, R. och **Gristwood, A.** (2015) Jacques Dubochet. www.embl.de/aboutus/alumni/news/news_2015/20150709_dubochet/

Videoklipp

Serious Science (20 juni 2017) *Electron Cryomicroscopy – Richard Henderson*
www.youtube.com/watch?v=L6U--sYUF9s

Serious Science (22 aug. 2017) *Single-Particle Electron Microscopy - Richard Henderson*
www.youtube.com/watch?v=j_sfs6uwWlc

The Franklin Institute (5 juli 2016) *Joachim Frank – 2014 Laureate of the Franklin Institute in Life Science*
www.youtube.com/watch?v=mtvht8Uyh2s

Kungl. Vetenskapsakademien har beslutat utdela Nobelpriset i kemi 2017 till

JACQUES DUBOCHET

Född 1942 (75 år) i Aigle, Schweiz.
Fil.dr 1973 vid Université de Genève och Universität Basel, Schweiz.
Honorary Professor of Biophysics vid Université de Lausanne, Schweiz.
www.unil.ch/dee/en/home/menuinst/people/honorary-professors/prof-jacques-dubochet.html

JOACHIM FRANK

Född 1940 (77 år) i Siegen, Tyskland.
Fil.dr 1970 vid Technische Universität München, Tyskland. Professor of Biochemistry and Molecular Biophysics and of Biological Sciences vid Columbia University, New York, USA.
<http://franklab.cpmc.columbia.edu/franklab/>

RICHARD HENDERSON

Född 1945 (72 år) i Edinburgh, Skottland. Fil.dr 1969 vid Cambridge University, Storbritannien. Programme Leader vid MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Storbritannien.
www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/rh15/

”för utveckling av kryoelektronmikroskopi för högupplösande strukturbestämning av biomolekyler i lösning”