

Nobelova nagrada za kemiju za 2017. godinu: krio-elektronska mikroskopija

|| M. Močibob*

Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

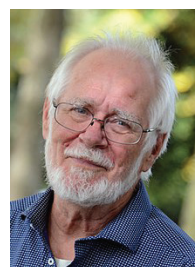
Elektronski mikroskop vjerojatno je jedan od najuniverzalnijih znanstvenih instrumenata koji ima nezamjenjivu ulogu u svim prirodnim znanostima: u fizici i kemiji omogućio je istraživanje strukture materije do atomskih detalja, u biologiji je omogućio vizualizaciju najsitnijih bakterija, virusa, staničnih organela i stanične ultrastrukture poput citoskeleta, ribosoma, čestica peludi i drugo. Nemoguće je pobrojati sve primjene elektronske mikroskopije u fundamentalnim i primijenjenim istraživanjima, u znanosti, ali i u industriji (metalurgija, farmaceutika, poluvodička industrija, itd.). Za današnje vrijeme brzog razvoja tehnologije i znanosti radi se o relativno "staroj tehnologiji": prvi elektronski mikroskop konstruirali su još 1931. godine fizičar Ernst Ruska i inženjer elektrotehnike Max Knoll, a već 1933. godine elektronski mikroskop premašio je rezolucijom optički mikroskop. Prvi komercijalni elektronski mikroskop proizveo je Siemens 1938. godine. Važnost elektronske mikroskopije prepoznata je i od strane Švedske kraljevske akademije i nagrađena Nobelovom nagradom iz fizike 1986. godine. Jedan od laureata bio je i Ernest Ruska koji je nagrađen za svoj pionirski rad i razvoj prvog elektronskog mikroskopa.

Iako je područje biologije bilo jedno od prvih i važnih područja primijenjene elektronske mikroskopije, biološki uzorci su zapravo problematični za izravno promatranje elektronskim mikroskopom: visoki vakuum potreban za rad elektronskog mikroskopa doveo bi do dehidracije bioloških uzoraka, a bombardiranje snopom elektrona do uništenja osjetljivog biološkog materijala. Stoga promatranje bioloških uzoraka pod elektronskim mikroskopom prethodi složena preparacija: fiksiranje prije uklanjanja vode, napanje parama metala poput zlata ili platine, ili natapanje otopinama teških metala poput uranija, osmija, molibdena da bi se biološke strukture učinile vidljivima i povećao kontrast pod elektronskim mikroskopom. Alternativa je napraviti "odljev" biološkog uzorka od kompatibilnog materijala pa gledati njegovu repliku pod elektronskim mikroskopom. Opisani postupci neizostavno narušavaju strukturu bioloških makromolekula, pa iako je moguće vidjeti i vizualizirati stanične strukture i čestice poput ribosoma ili pojedinačnih lanaca DNA i RNA, nije moguće vidjeti njihovu molekulsku strukturu konvencionalnom elektronskom mikroskopijom. Sve do nedavno.

Konvencionalna elektronska mikroskopija je na svojem vrhuncu (prije proboja krio-elektronske mikroskopije, op. a.) omogućila stvaranje modela niske rezolucije (oko 20 Å)¹ ili "omotača" (eng. *envelopes*) biološki važnih makromolekulskih struktura, ali primat u rješavanju makromolekulskih struktura na atomskoj rezoluciji preuzela je rendgenska kristalografija. Tako su na atomskoj rezoluciji ili rezoluciji bliskoj atomskoj riješene strukture virusnih čestica (npr. simian virus 40),² komponente jezgine pore,^{3,4} supramolekulski kompleksi uključeni u fotosintezu^{5,6} i druge vrlo kompleksne stanične supramolekulske tvorevine. Trijumf rendgenske kristalografije u rješavanju makromolekulskih struktura i supramolekulskih kompleksa bila je serija ribosomskih struktura na prijelazu 20. i 21. stoljeća, za što su Thomas A. Steitz, Ada E. Yonath i Venkatraman Ramakrishnan nagrađeni Nobelovom nagradom iz

kemije 2009. godine, ili struktura β -adrenergičnih receptora (Robert J. Lefkowitz i Brian K. Kobilka, Nobelova nagrada iz kemije 2012. godine; vidi: Kem. Ind. 61 (11-12) (2012) 554–556, url: <http://silverstripe.fkit.hr/kui/assets/Uploads/554-556.pdf>).

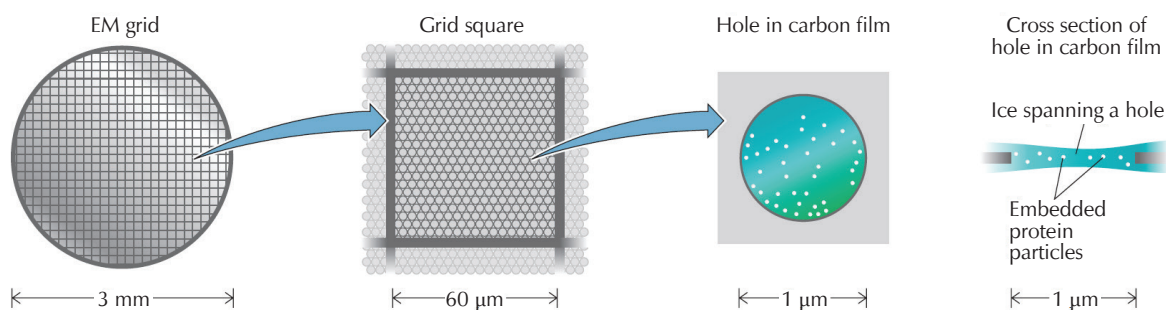
Jedan od ovogodišnjih dobitnika Nobelove nagrade, **Richard Henderson** i njegovi suradnici pokazali su da se elektronskom mikroskopijom mogu dobiti strukture bioloških makromolekula, riješivši strukturu bakteriorodopsina u visokoj rezoluciji.⁷ Radi se o integralnom membranskom proteinu, velikoj skupini proteina koji su notorno problematični za kristalizaciju i strukturnu analizu rendgenskom kristalografijom. Struktura bakteriorodopsina na atomskoj rezoluciji bila je rezultat mukotrpnog rada koji je započeo '70-tih godina 20. stoljeća i kulminirao 1990. godine nakon dugog, postupnog napretka. Struktura je riješena metodom elektronske difrakcije na dvodimenzionalnim kristalima bakteriorodopsina. Iako metoda difrakcije elektrona na dvodimenzionalnim kristalima nije ni danas često primjenjivana metoda, mukotrpno dobivena struktura bakteriorodopsina bila je od fundamentalnog značaja jer je pokazala dvije stvari: da je elektronskom mikroskopijom moguće dobiti strukture biomolekula atomske rezolucije te da elektronska mikroskopija može konkurirati rendgenskoj kristalografiji u strukturnoj analizi bioloških makromolekula.



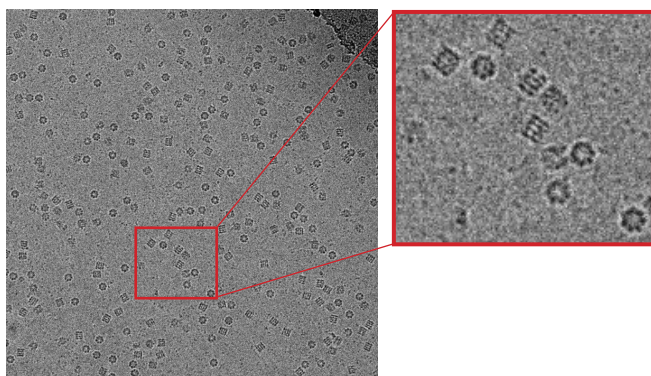
Kao što je već rečeno, za proboj elektronskom mikroskopijom do molekulske razine – kad su u pitanju biološke makromolekule – bilo je potrebno riješiti dva fundamentalna problema: očuvati nativnu strukturu biomolekula i njihovih supramolekulskih tvorevina te ih učiniti "vidljivima" bez dodatnog tretmana ili fiksacije, koja bi takvu strukturu narušila. Prvi problem riješio je drugi dobitnik ovogodišnje Nobelove nagrade iz kemije, **Jacques Dubochet** i njegovi suradnici procesom vitrifikacije. Vitrifikacija je postupak brzog smrzavanja uzorka na temperaturu tekućeg dušika, pri čemu otapalo zadržava amorfnu strukturu bez stvaranja kristalića leda. Kristalizacija vode i stvaranje ledenih kristalića izrazito je nepoželjna jer dovodi do snažne difrakcije zraka elektrona. Zvuči jednostavno, no nije nimalo trivijalno zamrznuti uzorak u tankom filmu, na mrežici koja služi kao nosač uzorka u elektronskom mikroskopu (slika 1). To se postiže tako da se fino raspršeni uzorak nanosi na odgovarajuću mrežicu, koja se uranja u kupelj tekućeg etana, hladenu tekućim dušikom. Od tuda i naziv krio-elektronska mikroskopija, jer uzorak ostaje ohlađen na temperaturu tekućeg dušika prije i tijekom promatranja u elektronskom mikroskopu. U takvim uvjetima, u vitrificiranom otapalu, biološke makromolekule mogu zadržati svoju nativnu strukturu, a smrzavanje donekle rješava i problem oštećenja uzorka pod djelovanjem elektronskog snopa: inelastični sudari i raspršenje elektrona uzrokuje kidanje kemijskih veza, ali dokle god atomi ili dijelovi strukture ostaju na svojem mjestu, to neće bitno narušiti izgled strukture.⁸

* Doc. dr. sc. Marko Močibob
e-pošta: mocibob@chem.pmf.hr





Slika 1 – Priprema uzorka za krio-elektronsku mikroskopiju. Na standardnu mrežicu za elektronski mikroskop nanesen je ugljični film debljine oko 500 Å s rupicama promjera 1 do 2 µm. Ugljični film ima potpurnu ulogu za sloj pufera debljine oko 0,1 µm, u kojem su raspoređene čestice od interesa. Tanak sloj pufera brzo se hladi i smrzava uranjanjem u tekući etan, pri čemu nastaje vitrificirani led. Uzorak na nosaču održava se na temperaturi ispod $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom pohrane i snimanja, da bi se spriječilo nastajanje kristala leda. Preuzeto L. Wang, F. J. Sigworth, *Physiology* 21 (2006) 13–18.

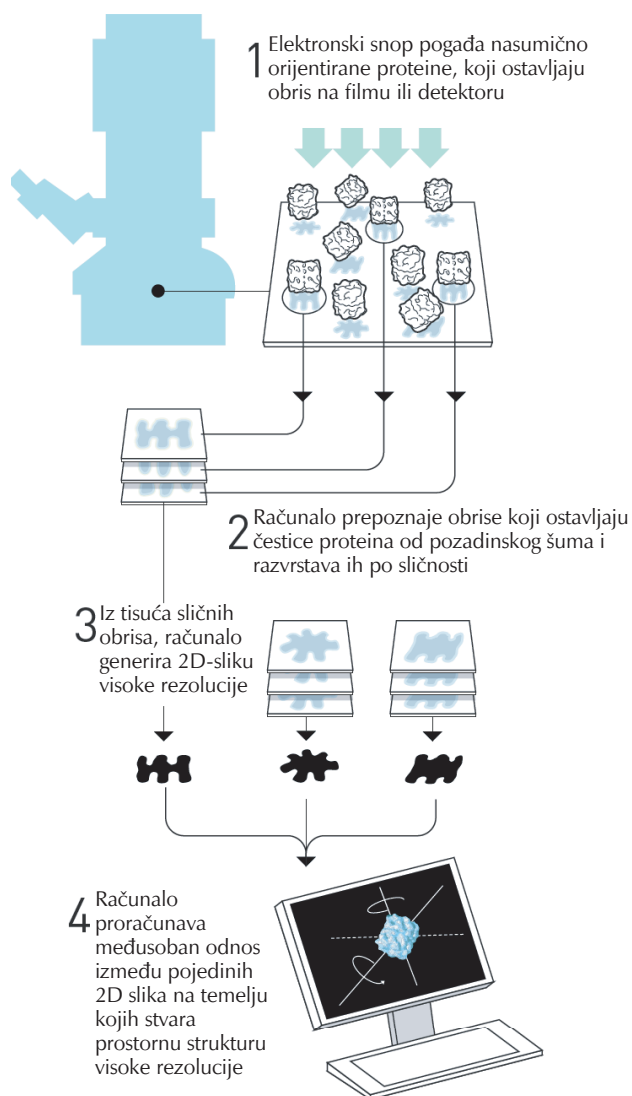


Slika 2 – Krio-EM slika GroEL u amorfnom (vitrificiranom) ledu pri povećanju 50 000 x. Izvor: Wikimedia Commons (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cryoem_groel.jpg).

Ostaje problem opažanja čestica (biomolekula) u vitrificiranom otapalu. Naime, biološke makromolekule izgrađene su pretežno od lakih atoma ugljika, dušika, kisika, vodika i fosfora, i kao takve daju slab kontrast spram vitrificiranog otapala (slika 2). Slika pojedine čestice mutna je, slabog kontrasta i jedva se nazire spram pozadine. Zbog osjetljivosti makromolekulskih struktura jakost snopa elektrona mora se držati na minimumu, što dodatno pogoršava stvar.

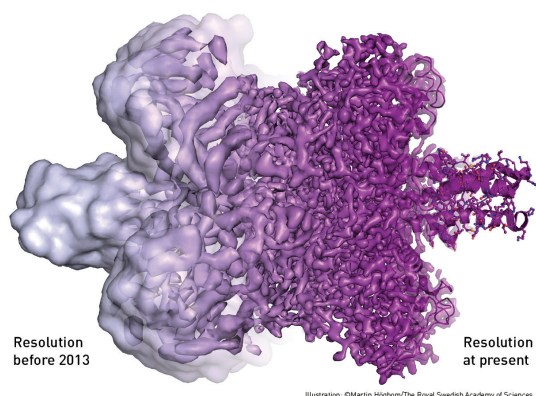


Rješenje je prikupiti iznimno velik broj slika čestica (nekoliko desetaka tisuća) koje se zatim grupiraju, uprosječuju, izoštruju te orijentiraju u prostoru. Metoda se naziva *single particle analysis*, odnosno jednočestična analiza.^{1,8} Naziv je možda zbunjujuć, jer kao što je rečeno metoda se temelji na analizi desetaka tisuća čestica, ali te mikrofotografije (slike 2 i 3) tretiraju se kao projekcija *jedne vrste* čestica, odnosno kao projekcija *istovrsnih* čestice u slučajnoj orijentaciji. Stoga je presudno da uzorak koji se promatra bude čist i homogen, da u uzorku imamo samo jednu vrstu čestica, idealno u jednakoj konformaciji. Današnje metode rekonstrukcije toliko su uznapredovale da čak mogu razlučiti i smjesu dva ili ograničenog broja čestica u različitoj konformaciji. Slika 3 pojednostavljeno prikazuje glavne faze prilično kompleksnog postupka rekonstrukcije 3D-strukture iz pojedinačnih mikrofotografija, a zasluge za razvoj algoritama i računalnih metoda na kojima se temelji pripadaju **Joachimu Franku**, trećem dobitniku Nobelove nagrade iz kemije za 2017. godinu. Konačan rezultat nije statična slika molekule, već trodimenzionalni model molekule čija se rezolucija danas približava i preklapa s rezolucijom rendgenske kristalografije^{9,10} (sve do 2 – 3 Å; slika 4). *Single*



Slika 3 – Rekonstrukcija trodimenzionalne strukture proteina ili biološke molekule krio-elektronskom mikroskopijom. Postupak prikazan na slici naziva se *single particle cryoEM* (krio-elektronska mikroskopija pojedinačne čestice). Prilagođeno iz materijala Švedske kraljevske akademije znanosti.

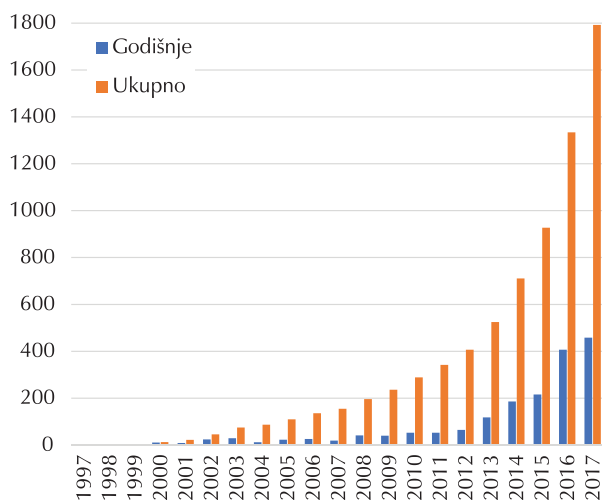
particle krio-elektronska mikroskopija (eng. *Single particle cryo-EM*) danas je dominantna metoda rješavanja prostorne strukture bioloških makromolekula upotrebom elektronske mikroskopije.



Slika 4 – Dramatičan napredak krio-elektronske mikroskopije posljednjih godina na primjeru enzima glutamat-dehidrogenaze, od mapa elektronske gustoće niske rezolucije (lijeva strana) do vizualizacije enzima do atomske rezolucije (1,8 Å). Preuzeto sa stranice www.nobelprize.org (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/fig_ke_en_17_blobology.pdf).

U svega nekoliko godina krio-elektronska mikroskopija nametnula se kao ozbiljna alternativa rendgenskoj kristalografiji u strukturnoj biologiji (slika 5). Ironijom sudbine, u području strukturne analize ribosoma i ribosomskih kompleksa istisnula je rendgensku kristalografiju i prometnula se u glavnu metoda izbora. Krio-EM prigrlili su čak i veterani rendgenske kristalografije poput nobelovca Venki Ramakrishnana,¹¹ ili Nenada Bana (ETH, Zürich), našeg istaknutog znanstvenika iz područja strukturne biologije, suradnika nobelovca Thomasa A. Steitza i jednog od pionira strukturne analize ribosoma rendgenskom kristalografijom. Glavne prednosti krio-elektronske mikroskopije su što ne zahtijeva prethodnu kristalizaciju makromolekule ili makromolekulskog kompleksa radi strukturne analize i što su analizi krio-elektronskom mikroskopijom dostupni uzorci koje je teško prirediti u velikim količinama potrebnim za kristalizaciju (npr. mitohondrijski ribosomi).¹² Dodatni zamah području krio-elektronske mikroskopije dala su dodatna tehnološka unaprjeđenja i inovacije, poput razvoja direktnih detektora elektrona (eng. DDD, *direct electron detector device*), koji su idealni za prikupljanje signala u uvjetima slabog

Porast broja struktura po godinama



Slika 5 – Godišnji porast broja makromolekulskih struktura riješenih elektronskom mikroskopijom. Plavi stupci predstavljaju godišnji prirast dostupnih struktura, a narančasti stupci ukupan broj dostupnih struktura. Podatci za 2017. godinu obuhvaćaju strukture deponirane do 31. listopada 2017. godine, kada je bilo dostupno ukupno 1792 struktura riješenih primjenom elektronske mikroskopije. Izvor: The Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

elektronskog ozračivanja i superiorni konvencionalnim kamera CCD ili CMOS.^{8,9} Nobelovom nagradom za kemiju 2017. godine i formalno je priznat dramatičan razvoj i važnost krio-elektronske mikroskopije na području strukturne biologije i biokemije posljednjih nekoliko godina: od prve atomske strukture bakteriorodopsina do danas (studen 2017. god.) u javnim bazama podataka pohranjeno je približno 1800 struktura, s time da je preko 1000 struktura deponirano od 2015 godine do danas¹³ (slika 5).

Literatura

Materijali o Nobelovim nagradama dostupni na www.nobelprize.org.

1. D. Elmlund, H. Elmlund, Cryogenic Electron Microscopy and Single-Particle Analysis, *Annu. Rev. Biochem.* **84** (2015) 499–517, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034226>.
2. T. Stehle, S. J. Gamblin, Y. Yan, S. C. Harrison, The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution, *Structure* **4** (1996) 165–182, doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00020-2).
3. A. Hoelz, J. S. Glavy, M. Beck, Toward the atomic structure of the nuclear pore complex: when top down meets bottom up, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23** (2016) 624–630, doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3244>.
4. M. Beck, E. Hurt, The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** (2017) 73–89, doi: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>.
5. P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* **411** (2001) 909–917, doi: <https://doi.org/10.1038/35082000>.
6. K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center, *Science* **303** (2004) 1831–1838, doi: <https://doi.org/10.1126/science.1093087>.
7. R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy, *J. Mol. Biol.* **213** (1990) 899–929, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80271-2).
8. Y. Cheng, Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution, *Cell* **161** (2015) 450–457, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.049>.
9. Z. Liu, C. Gutierrez-Vargas, J. Wei, R. A. Grassucci, M. Sun, N. Espina, S. Madison-Antenucci, L. Tong, J. Frank, Determination of the ribosome structure to a resolution of 2.5 Å by single-particle cryo-EM, *Protein Sci.* **26** (2017) 82–92, doi: <https://doi.org/10.1002/pro.3068>.
10. A. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee, D. Matthies, X. Wu, J. L. S. Milne, S. Subramaniam, 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor, *Science* **348** (2015) 1147–1151, doi: <https://doi.org/10.1126/science.aab1576>.
11. E. Callaway, The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology, *Nature* **525** (2015) 172–174, doi: <https://doi.org/10.1038/525172a>.
12. B. J. Greber, P. Bieri, M. Leibundgut, A. Leitner, R. Aebersold, D. Boehringer, N. Ban, The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome, *Science* **348** (2015) 303–308, doi: <https://doi.org/10.1126/science.aaa3872>.
13. URL: <http://pdb101.rcsb.org/learn/flyers-posters-and-calendars/expanding-boundaries-of-complexity-with-3dem> (pri-stupljeno 3. 11. 2017.).