

Kryogenní elektronová mikroskopie aneb Nobelova cena za chemii v roce 2017

Roman Kouřil

Katedra Biofyziky (<http://biofyzika.upol.cz>)

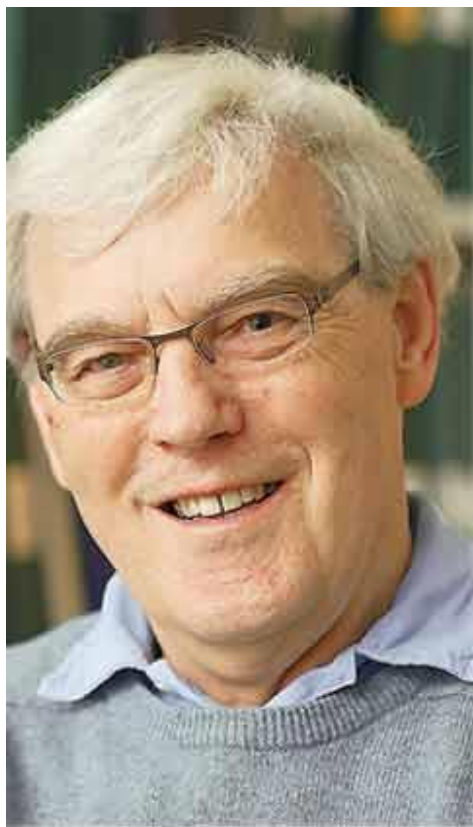
Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc



Nobelova cena za chemii v roce 2017

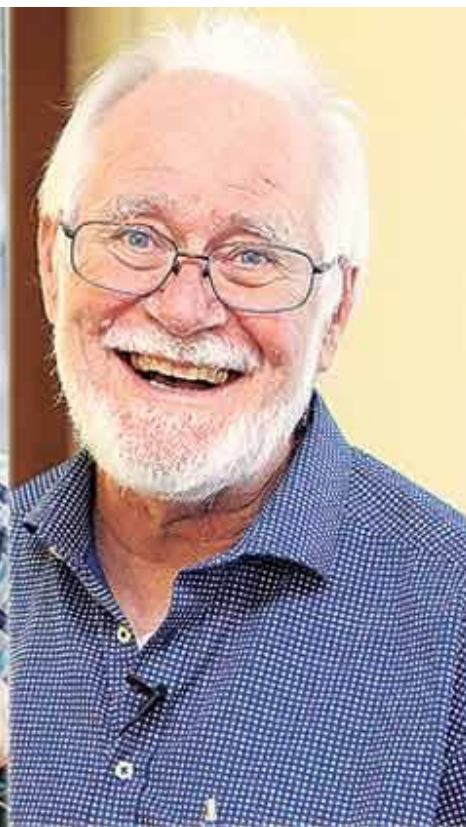
Vývoj kryogenní elektronové mikroskopie



Richard Henderson



Joachim Frank



Jacques Dubochet

Současná metoda **kryogenní elektronové mikroskopie** umožňuje zjištění **struktury biologických makromolekul** při vysokém rozlišení bez nutnosti jejich krystalizace, jak je tomu u rentgenové strukturní analýzy.

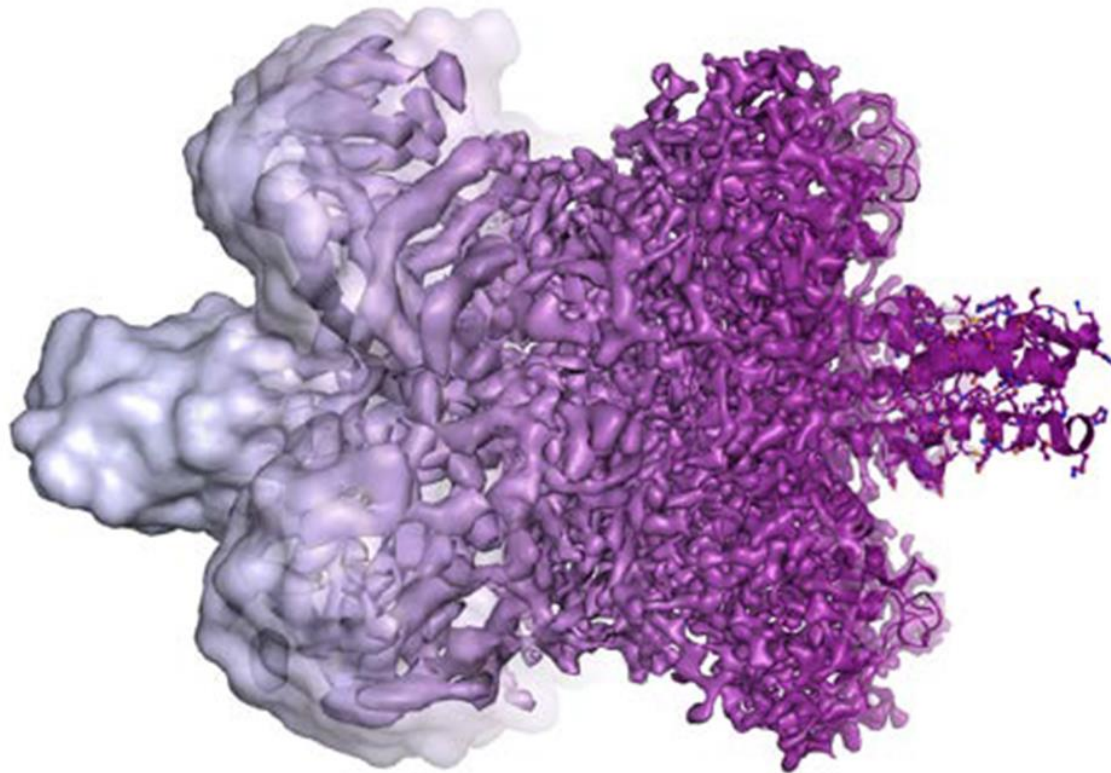


Vývoj rozlišení kryogenní elektronové mikroskopie (EM)

1990



2013



Vývoj rozlišení kryogenní elektronové mikroskopie od roku 1990 do roku 2013 prezentován na 3D struktuře enzymu glutamátdehydrogenázy.

Vývoj nového typu detektorů sehrál klíčovou roli v dosažení atomárního rozlišení při 1.8 Å.

Autor: Martin Högbom/Stockholm University

Cesta od „blobology“ ke kryogenní EM s vysokým rozlišením byla ale dlouhá ...

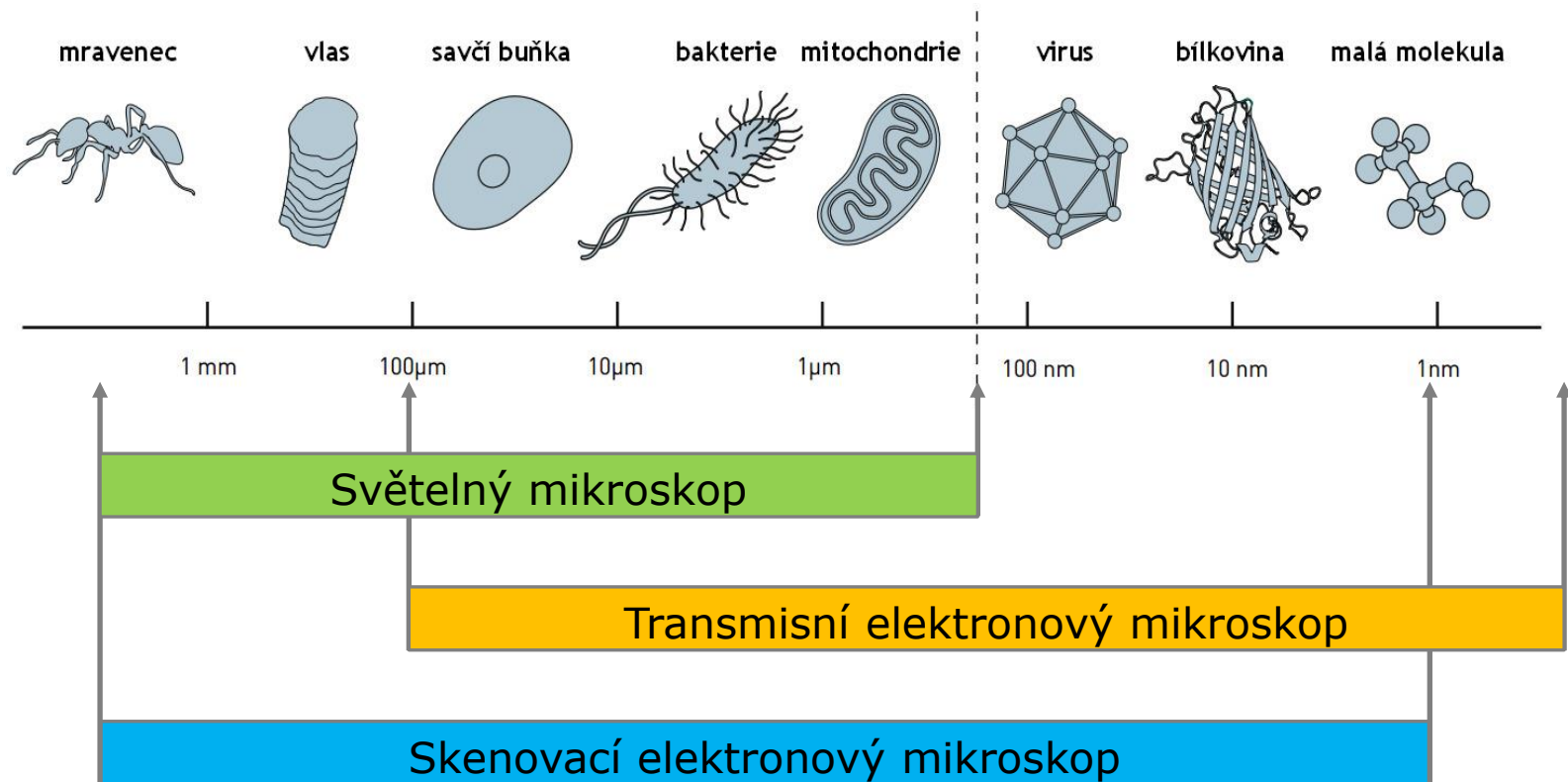
Před 90-ti lety ...

Potenciál rozlišení EM

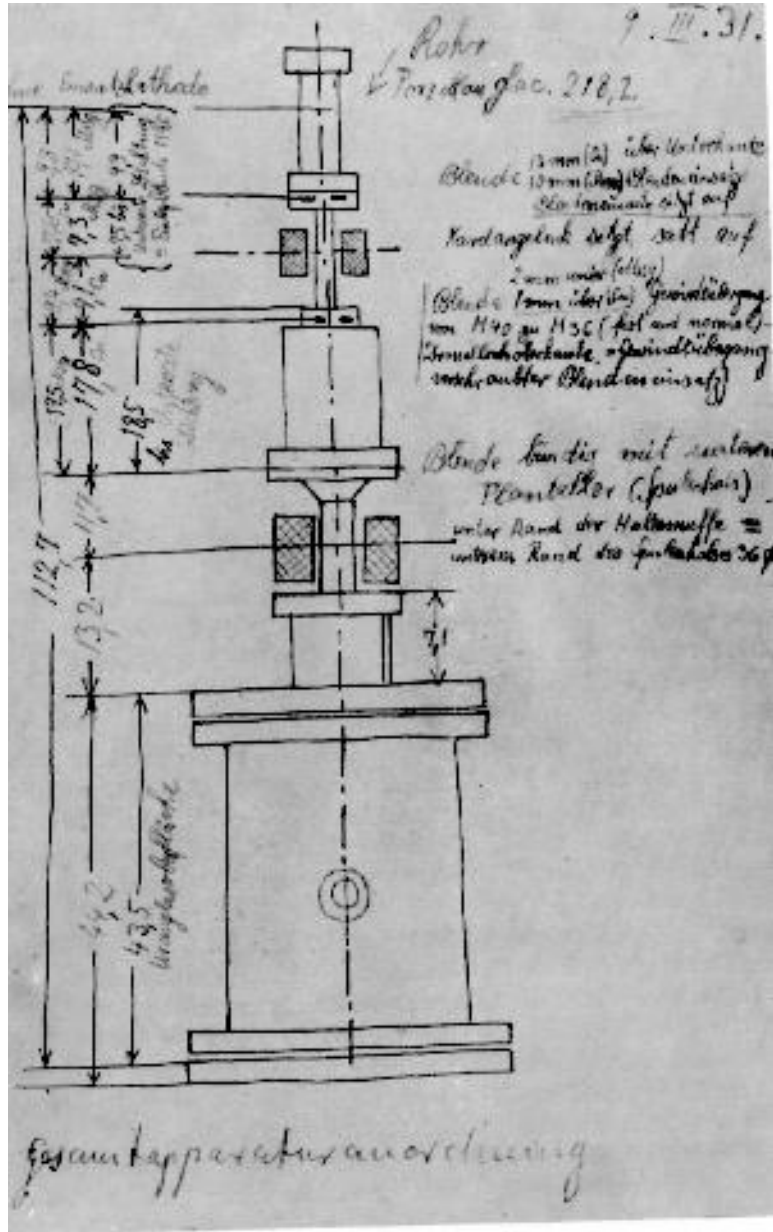
Rayleighovo rozlišovací kritérium: $d = \frac{0.61 \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$

- světelná mikroskopie **je limitovaná vlnovou** délkou světla
- EM **není vlnovou délkou limitovaná:**

např. pro urychlovací napětí $U=100000$ V platí: $\lambda = \frac{1.226}{\sqrt{U}} [nm] \Rightarrow \lambda = 0.0038$ nm



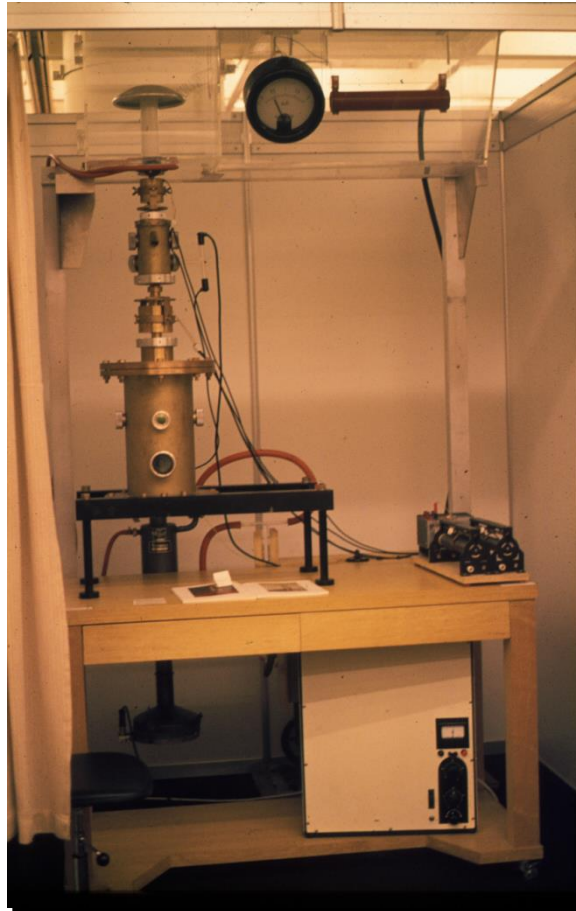
Konstrukce prvního transmisního EM



Konstrukce prvního transmisního elektronového mikroskopu: Ernst Ruska a Max Knoll (9.3. 1931)

Ernst Ruska získal Nobelovu cenu za fyziku v roce 1986 za vývoj elektronového mikroskopu.

Máme první elektronový mikroskop! Ale ...



Replika prvního elektronového mikroskopu

Počáteční skepse

... fajn, ale **EM nelze použít** pro studium biologických objektů kvůli **destrukci vzorku** způsobené **bombardováním elektrony**

Řešení: nutný vývoj nových metod přípravy vzorku a technicky zdokonalovat EM

Jak eliminovat radiační poškození vzorku?

Použití nízké intenzity elektronového svazku



menší radiační
poškození vzorku

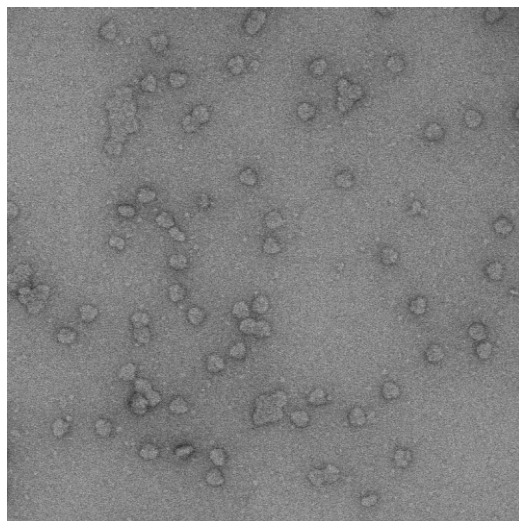
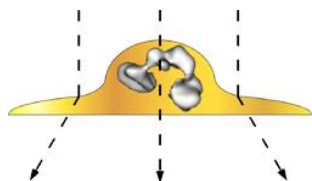


nízký kontrast
vzorku ve snímku

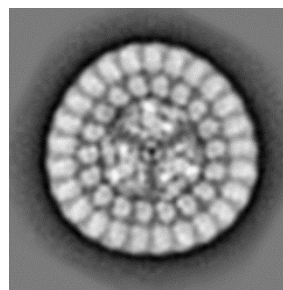
Zvýšení kontrastu metodou „negative staining“



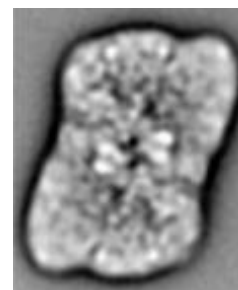
kontrastování vzorku pomocí roztoku
soli těžkého kovu (uranyl acetát)



omezené rozlišení ($10\text{\AA} - 20\text{\AA}$)
2D projekce, výjimečně 3D struktura



Fotosystém I



Fotosystém II



Komplex I

**Metoda „negative staining“ není vhodná pro určení
3D struktury s vysokým rozlišením $< 10\text{\AA}$**

Jak eliminovat radiační poškození vzorku?

Potvrzení hypotézy

- snímkování vzorku při nízké teplotě snižuje radiační poškození
- vznik **kryogenní mikroskopie!**

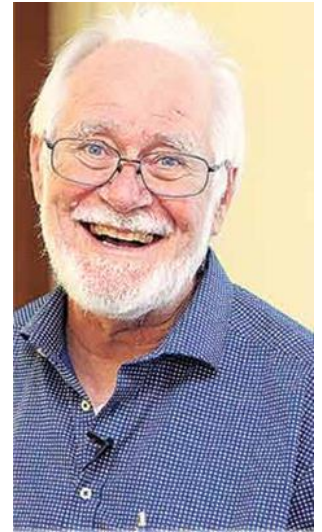


Jak správně zmrazit kapalný vzorek s biologickým materiálem?

- nutné zabránit formování krystalků ledu $\Rightarrow$ v EM se zobrazí jako temné objekty $\Rightarrow$ znehodnocují vzorek



- zmrazení vzorku musí být velmi rychlé $\Rightarrow$ vznikne amorfní led



Jacques Dubochet

V jakém médiu vzorek zmrazit?

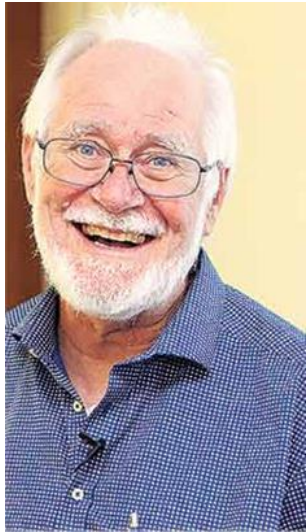
Kapalný dusík

- neumožňuje rychlé zmražení – vznikají krystalky ledu
- blízké hodnoty teploty tání ($-210\text{ }^{\circ}\text{C}$) a varu ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)

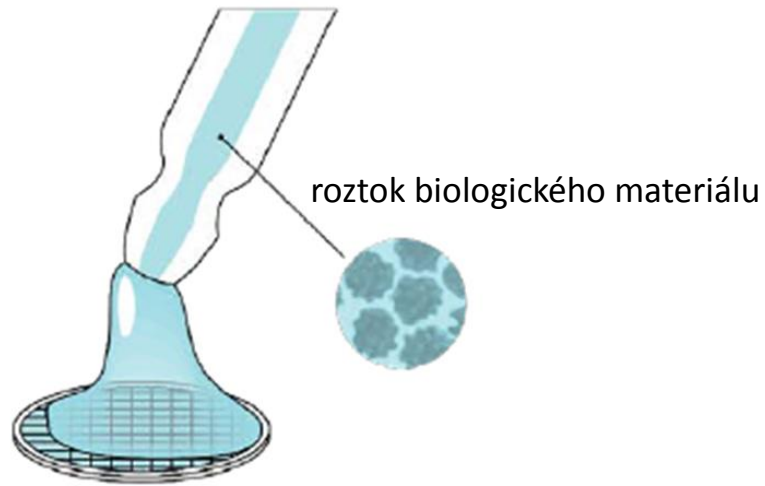
Kapalný etan

- vhodnější médium - teplota tání: $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$; teplota varu: $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$
- rychlé zmražení zabrání tvorbě krystalků ledu $\Rightarrow$ voda zmrzne v amorfním stavu

Jak rychle zmrazení vzorku zrealizovat?

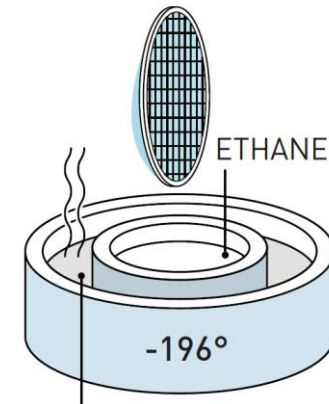


Jacques Dubochet

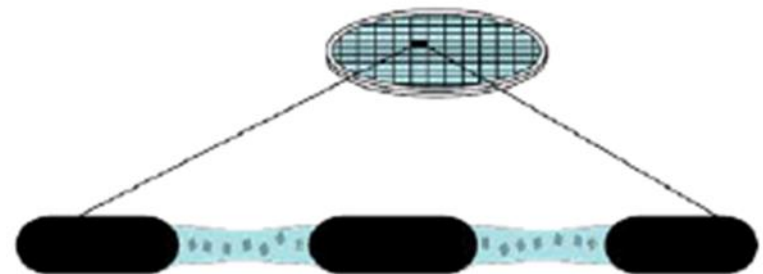


nosič vzorku - měděná síťka

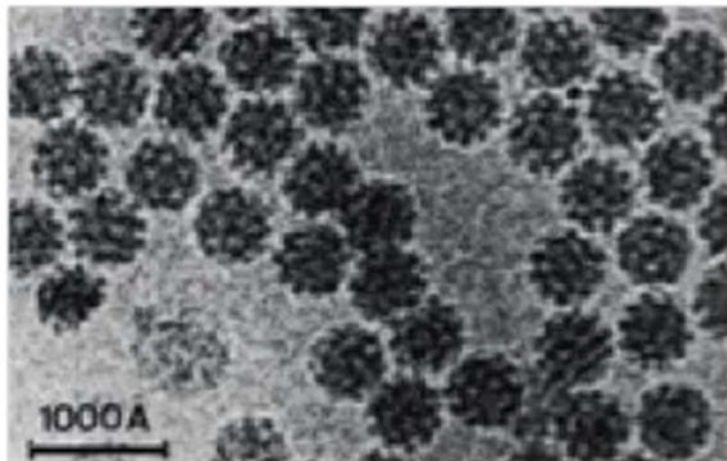
měděná síťka s kapkou vzorku



kapalný dusík

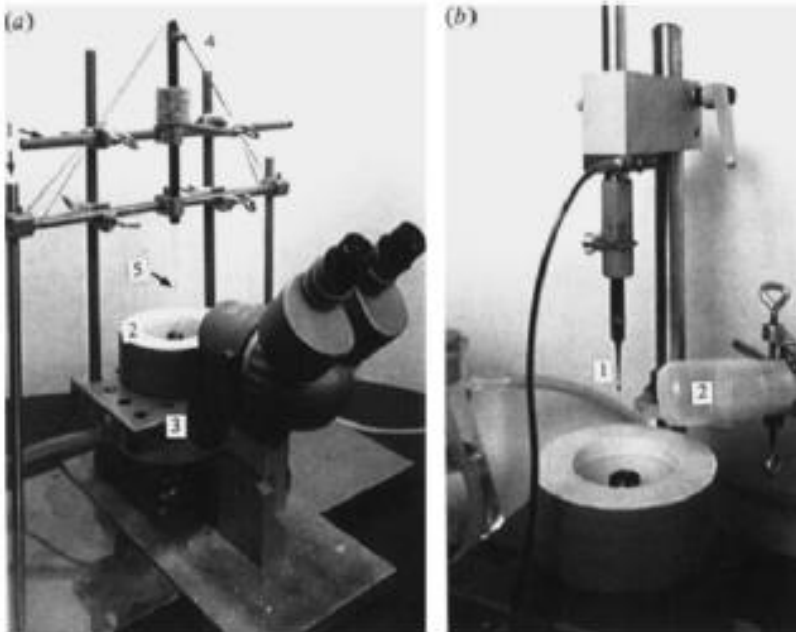


ideální tloušťka vrstvy ledu



Aparatura pro rychlé zmražení vzorku

Původní verze jednoduché aparatury



Dubochet et al. (1988)

Současná aparatura - Vitrobot



Dubochet a firma FEI

Zmražení vzorku pomocí Vitrobotu (FEI)

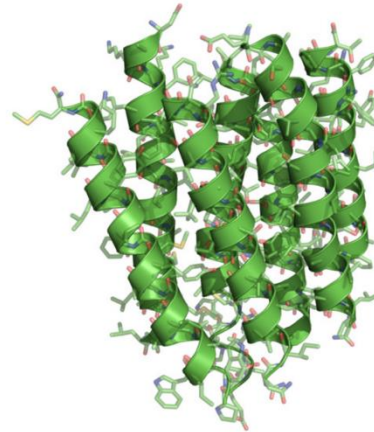


Aplikace kryogenní EM pro studium biologických vzorků



Richard Henderson

jako první prokázal **potenciál kryogenní EM** analýzou struktury bakteriorodopsinu při rozlišení 3.5 Å



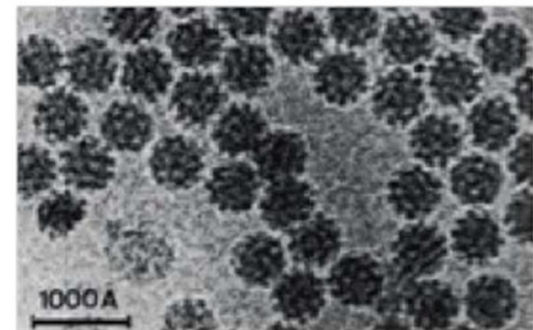
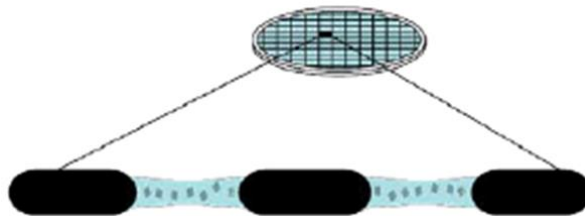
Henderson a kol. (1990) JMB 213



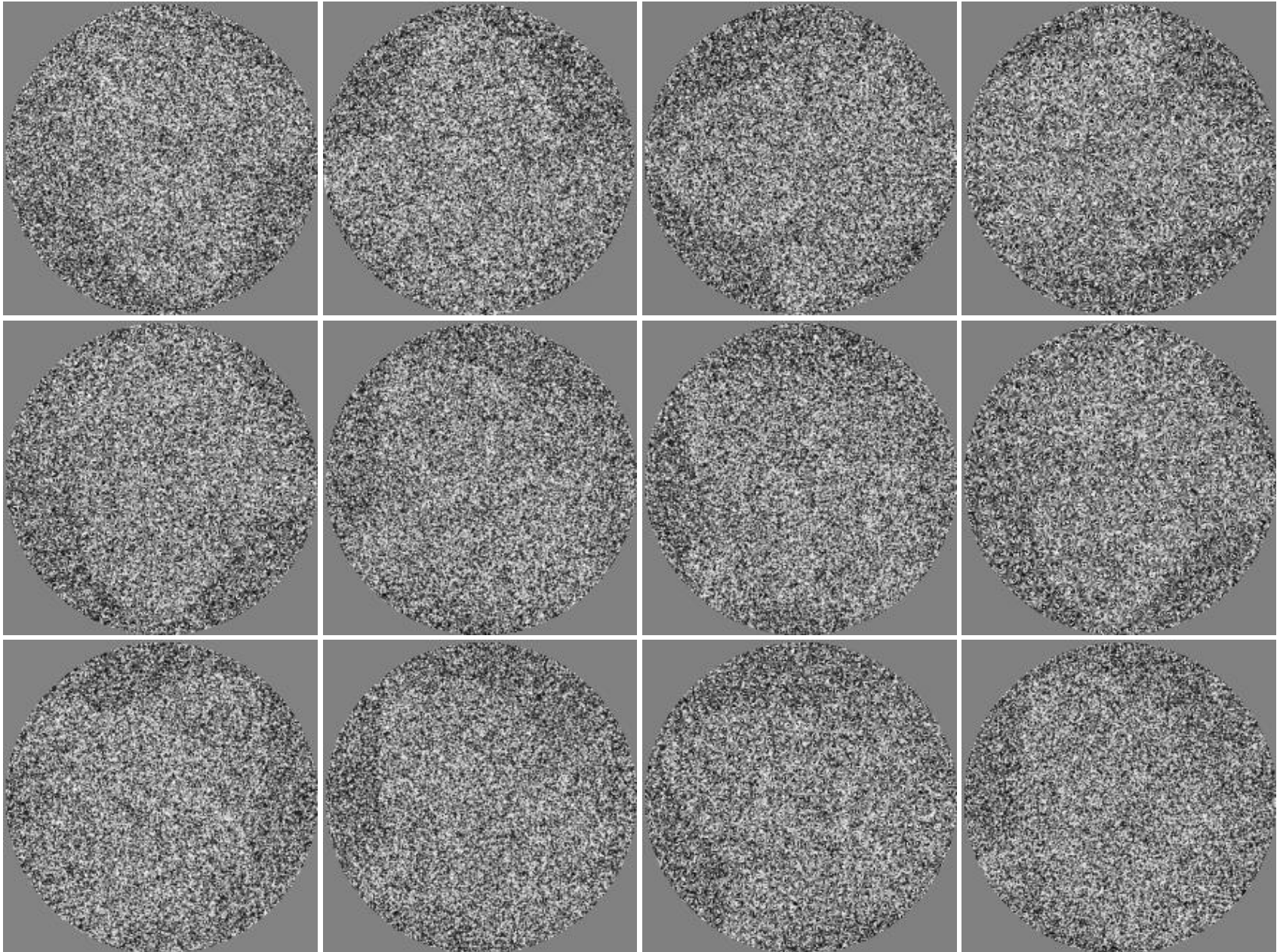
Joachim Frank

podílel se na dalším rozvoji kryogenní EM vývojem softwaru pro analýzu individuálních projekcí („single particle analysis“) a rekonstrukce 3D struktury

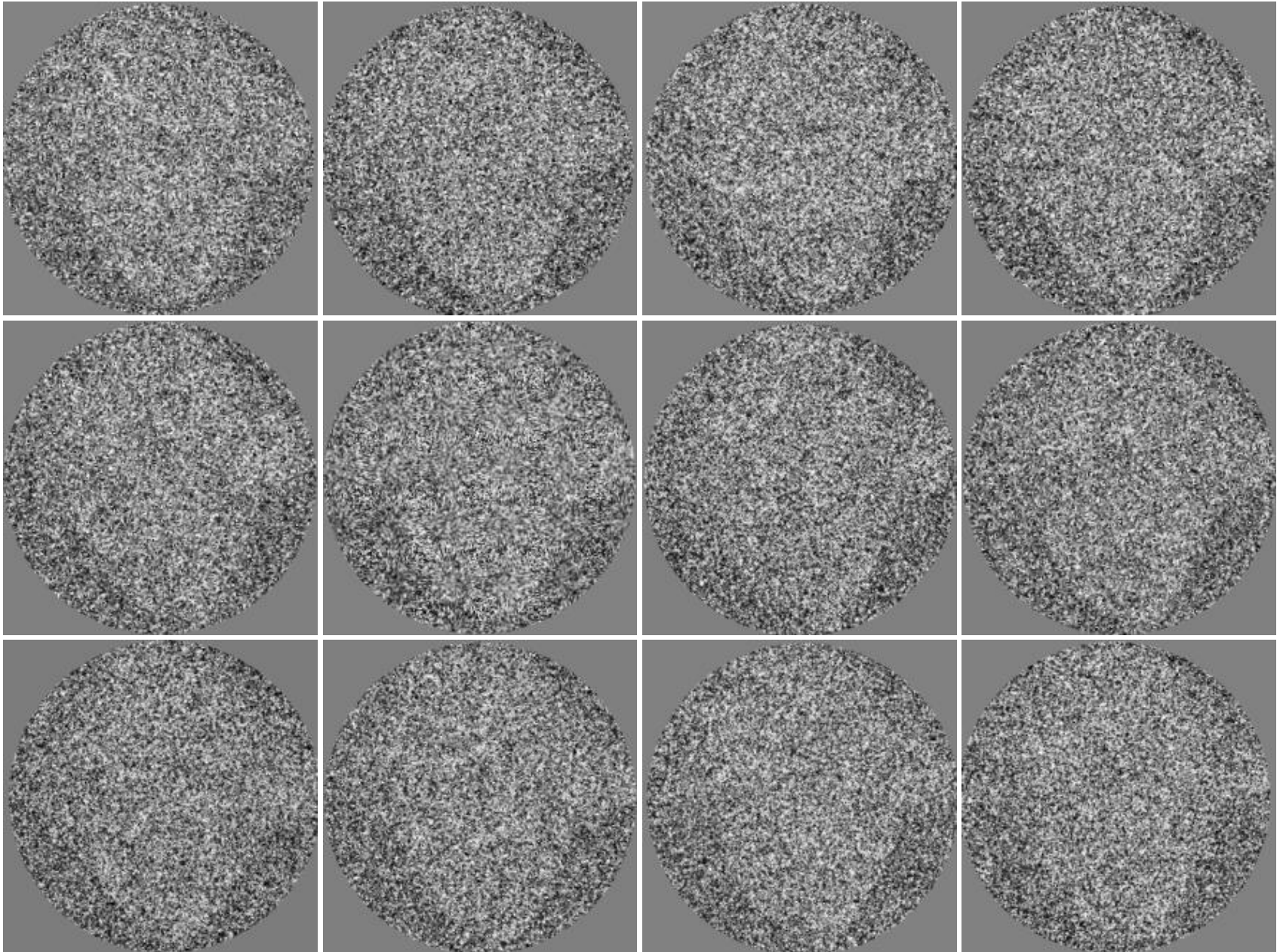
Proteinové komplexy mají **náhodnou orientaci** $\Rightarrow$ **sloučení projekcí o dané orientaci** $\Rightarrow$ **obrazová analýza** a **průměrování projekcí** $\Rightarrow$ **3D rekonstrukce**



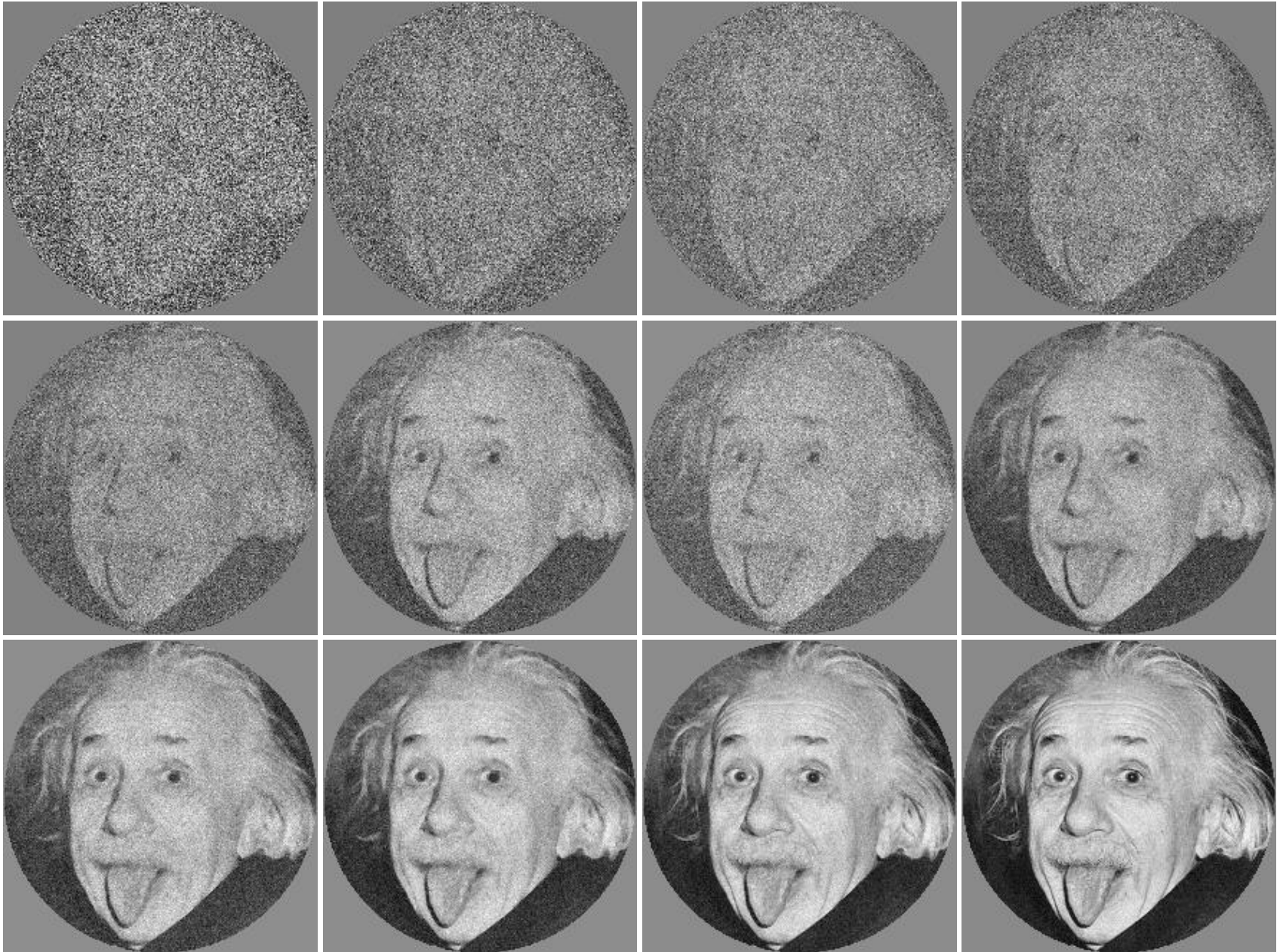
Obrazová analýza „zašuměných“ projekcí: srovnání projekcí



Obrazová analýza „zašuměných“ projekcí: srovnání projekcí



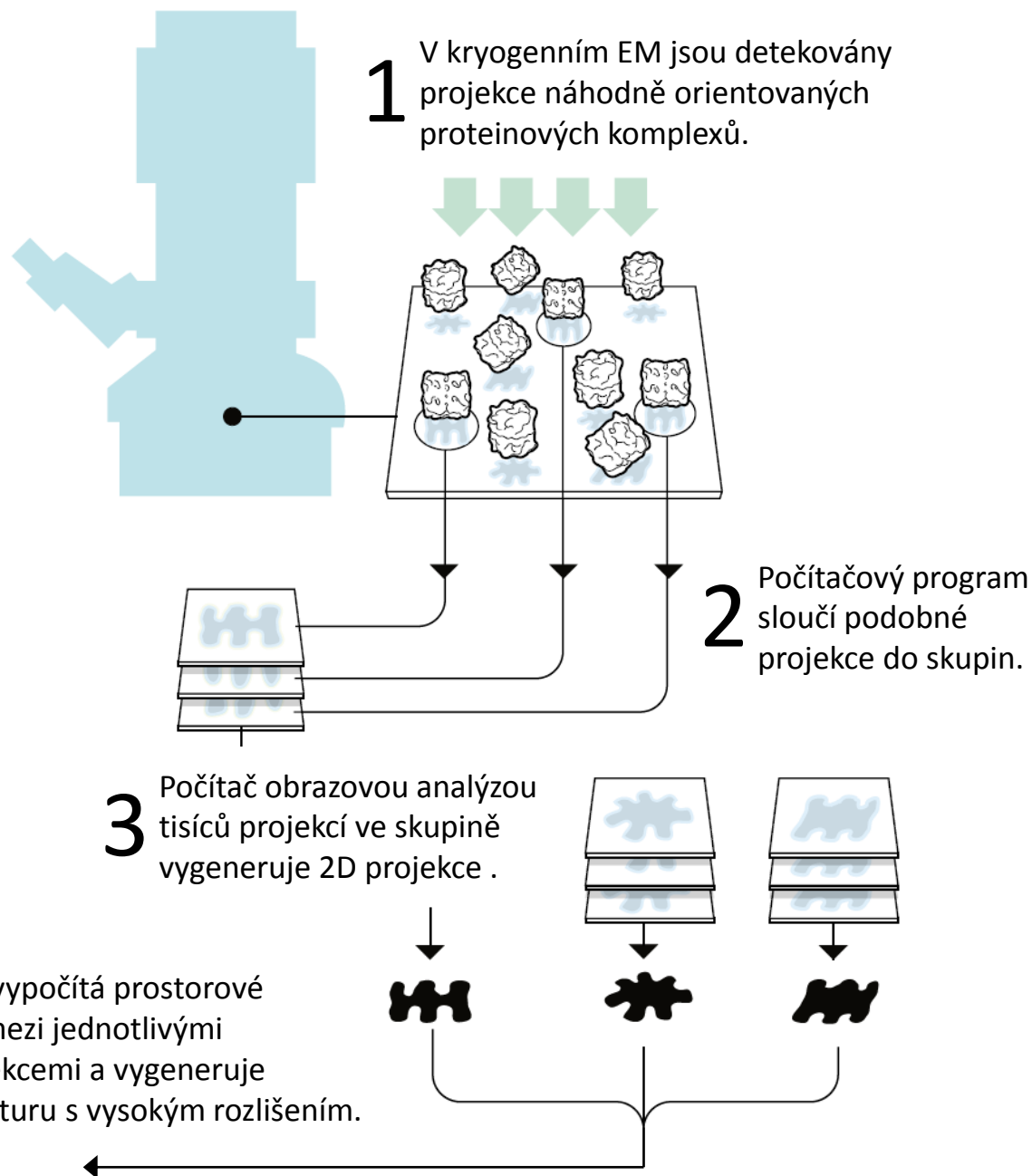
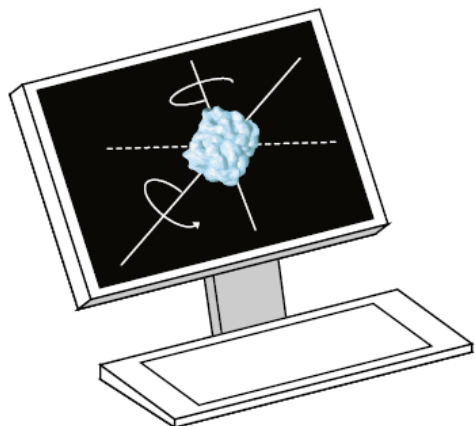
Obrazová analýza „zašuměných“ projekcí: průměrování projekcí



Kryogenní EM, obrazová analýza a 3D rekonstrukce

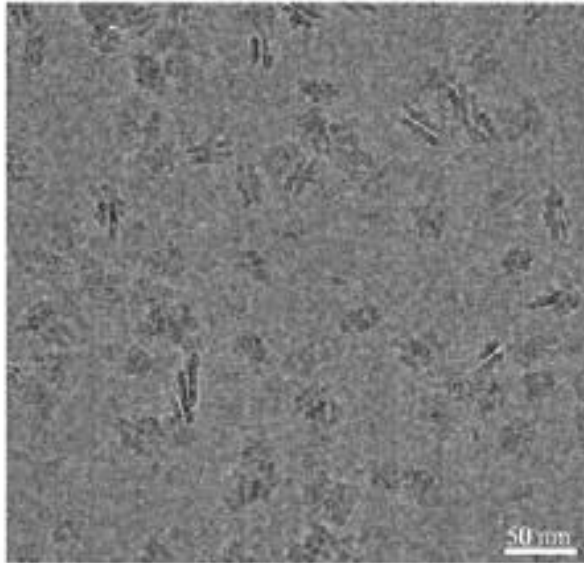


Joachim Frank

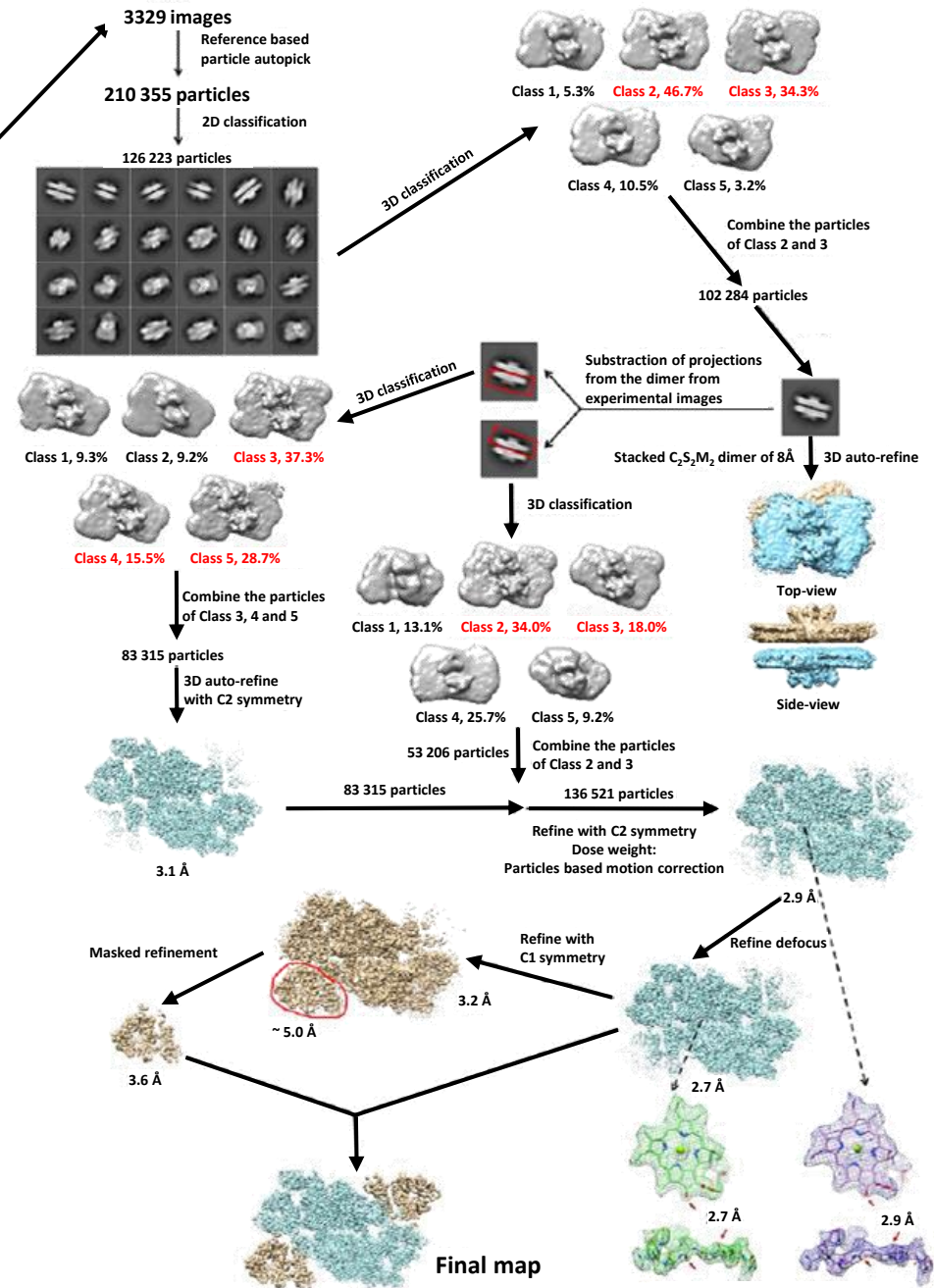


Kryogenní EM, obrazová analýza a 3D rekonstrukce

3329 snímků Fotosystému II



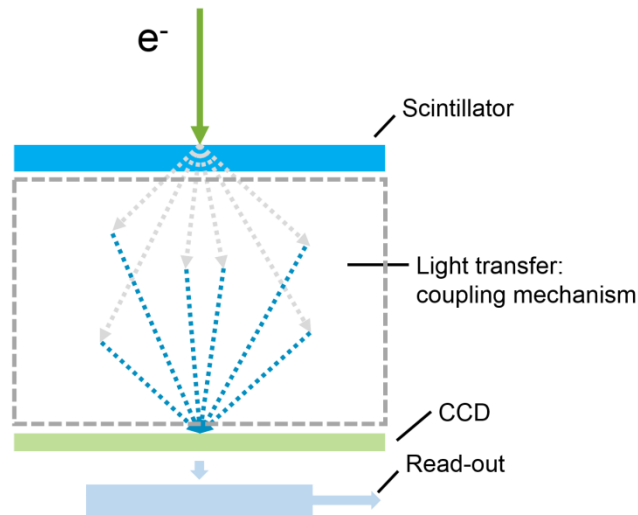
Su a kol. (2017) Science 357



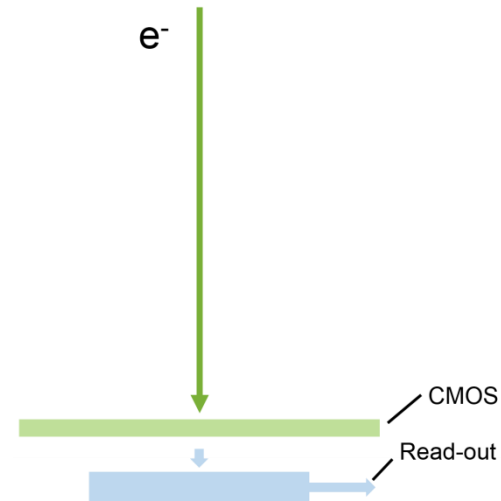
Vývoj kryogenní EM

- zdokonalení vyhodnocovacích programů a nárůst výkonu počítačů
- vývoj nových detektorů
- přímé detektory elektronů způsobily doslova revoluci v kryogenní EM

CCD/CMOS s vláknovou optikou



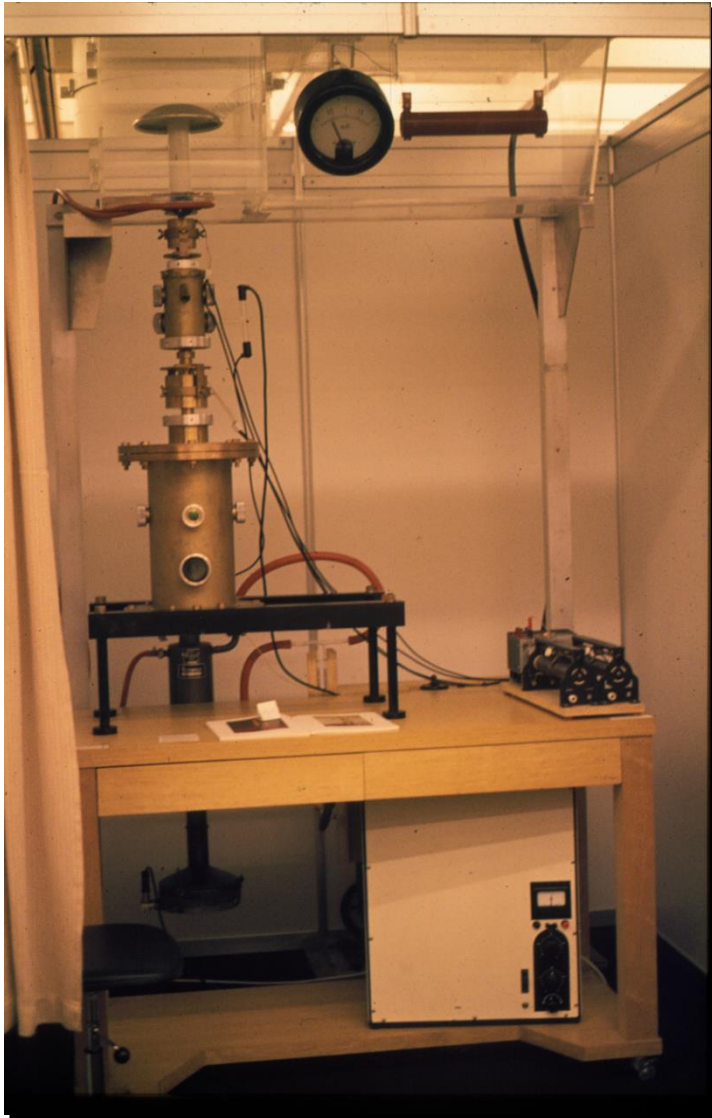
Přímý detektor



- nejnovější přímý detektor s rozlišením 24 MPx
- umožňuje záznam až 1500 snímků/sec $\Rightarrow$ snímkování ve video modu
- eliminace „driftu“ vzorku umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení

Vývoj kryogenní EM

Replika prvního EM



Elektronové mikroskopy současnosti



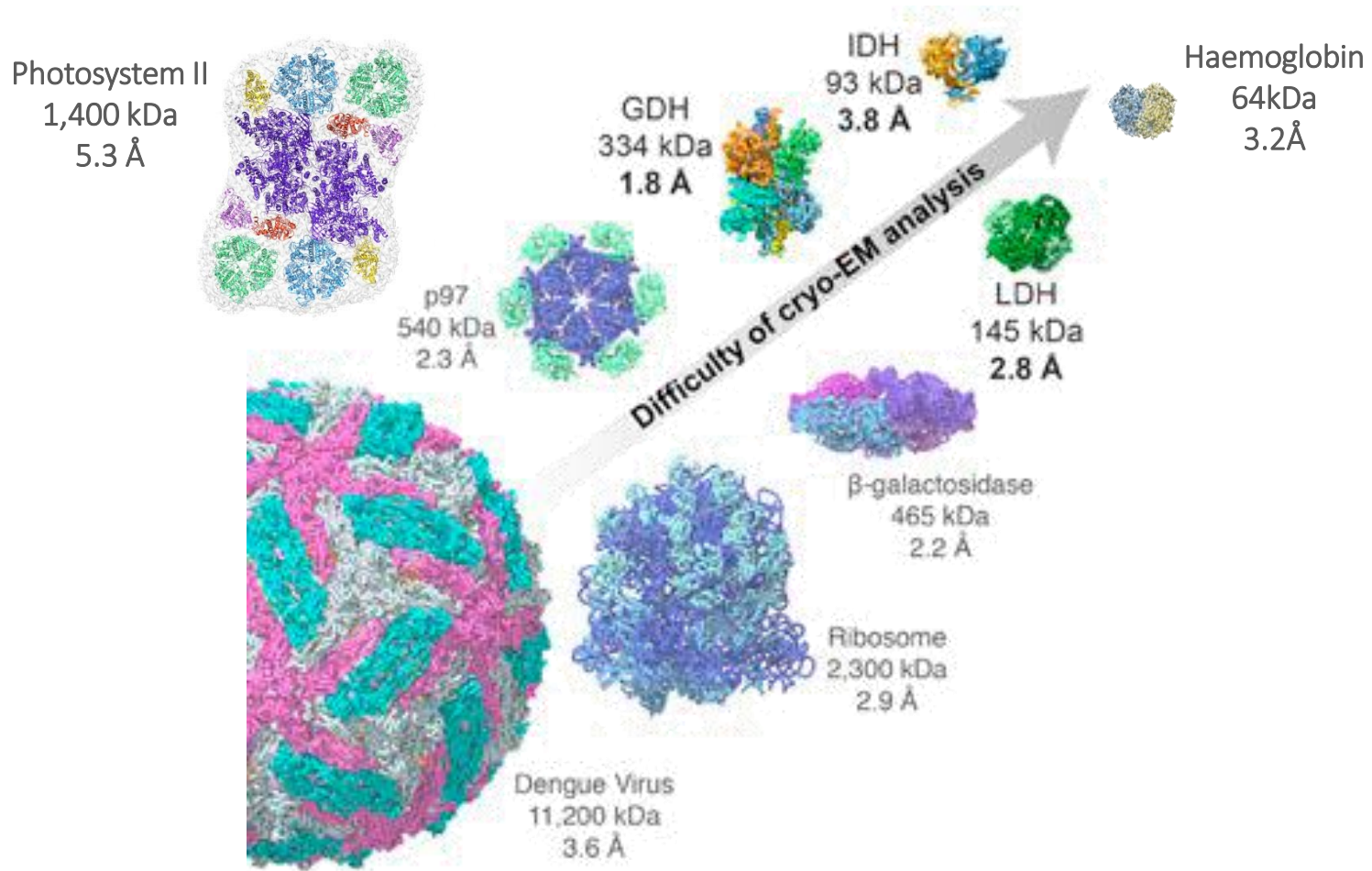
Titan Krios (FEI)



Konstrukce každé součástky TEM výsledkem dlouhodobého vývoje

Vývoj kryogenní EM

Aplikace kryogenní EM při studiu struktury široké škály proteinových komplexů



Laureáti Nobelovy ceny za chemii v roce 2017, Richard Henderson, Joachim Frank a Jacques Dubochet, sehráli klíčovou roli v rozvoji této metody.

Princip elektronové tomografie: výpočet 3D struktury z 2D projekcí



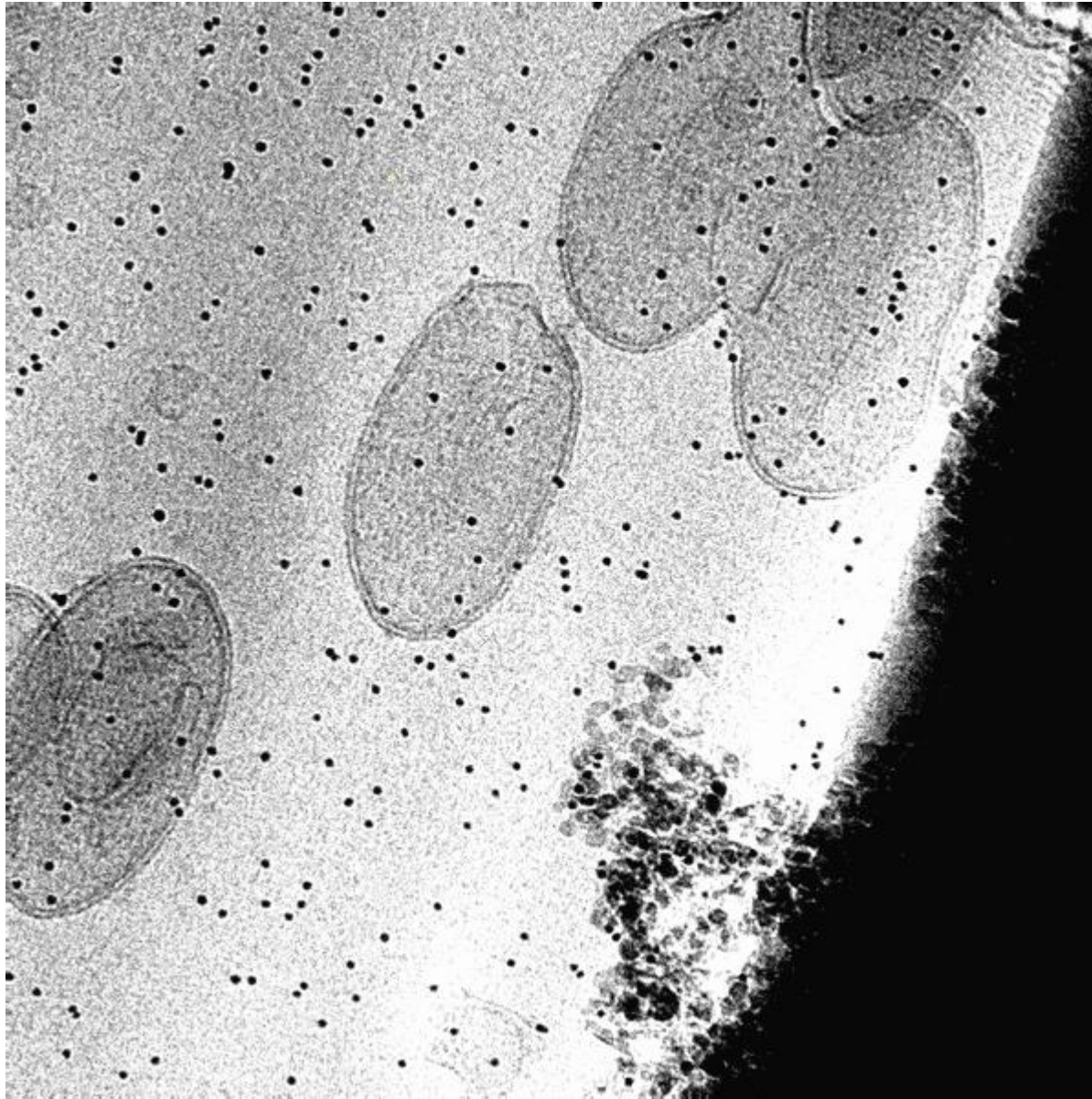
Nahrání tomografické série 2D
projekcí 3D objektu



3D objekt je vypočítán z 2D projekcí
pomocí metody zpětné projekce

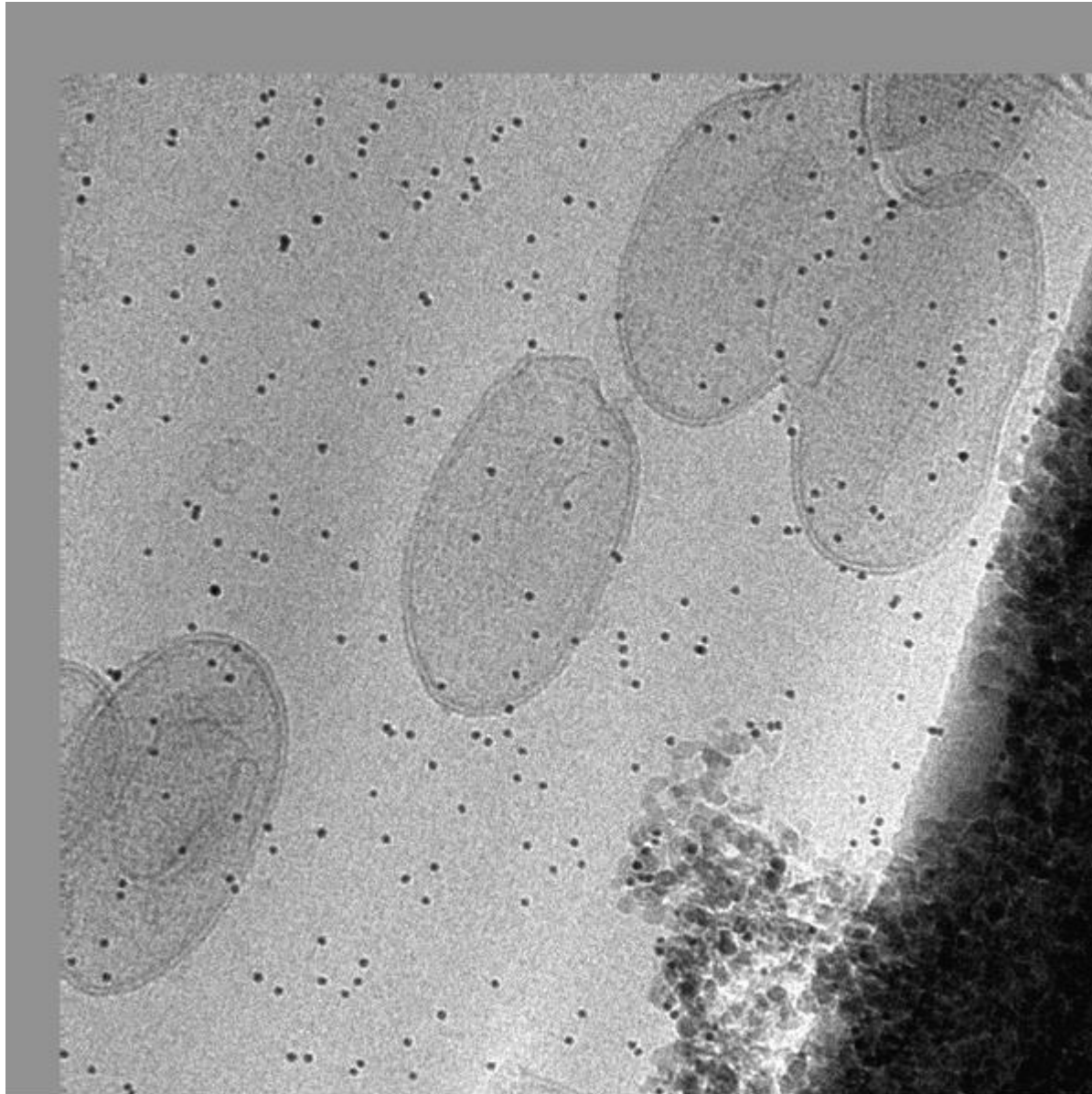
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Záznam série snímků s postupně nakláněným vzorkem



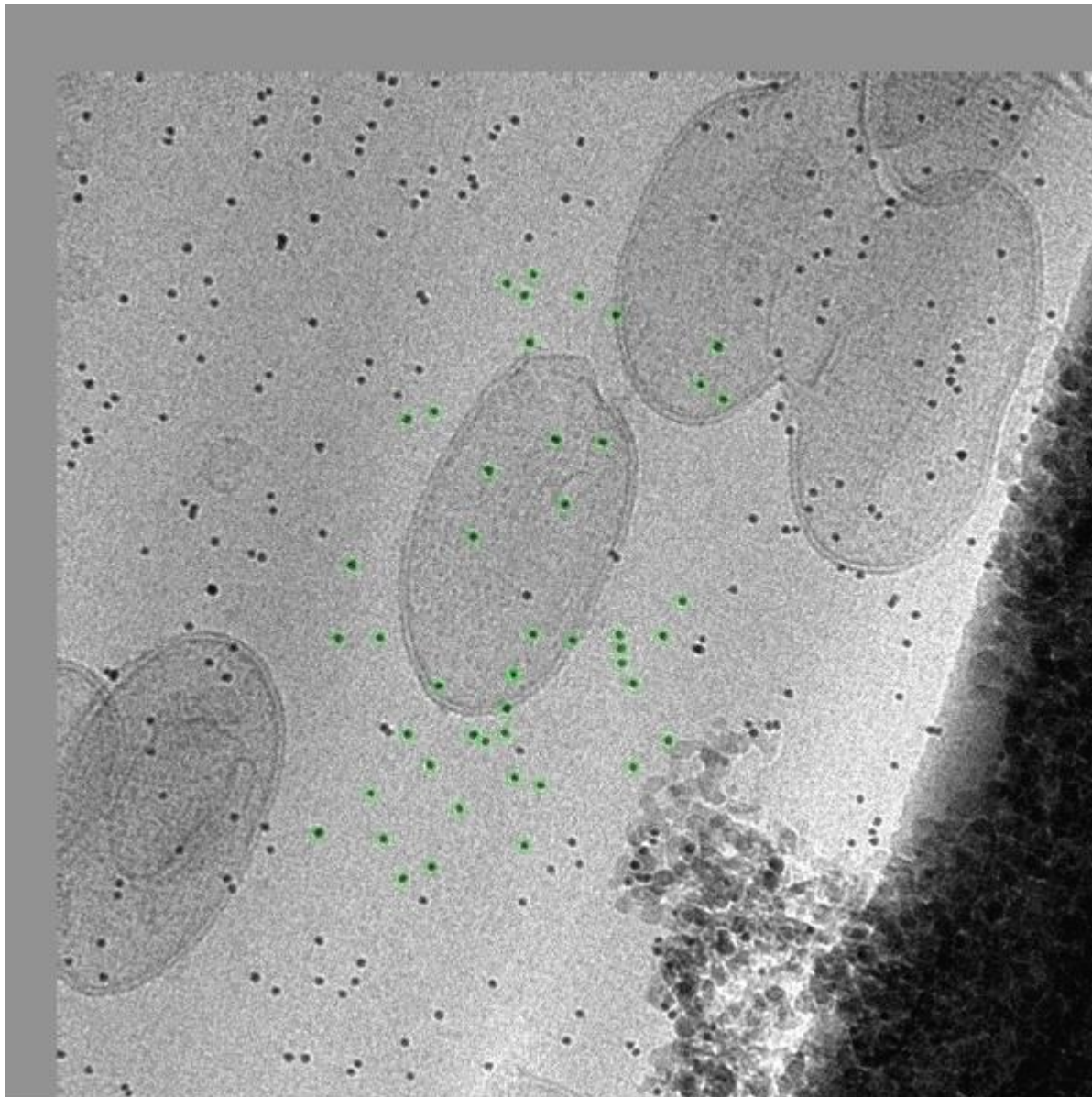
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Srovnání série snímků pomocí vzájemné korelace



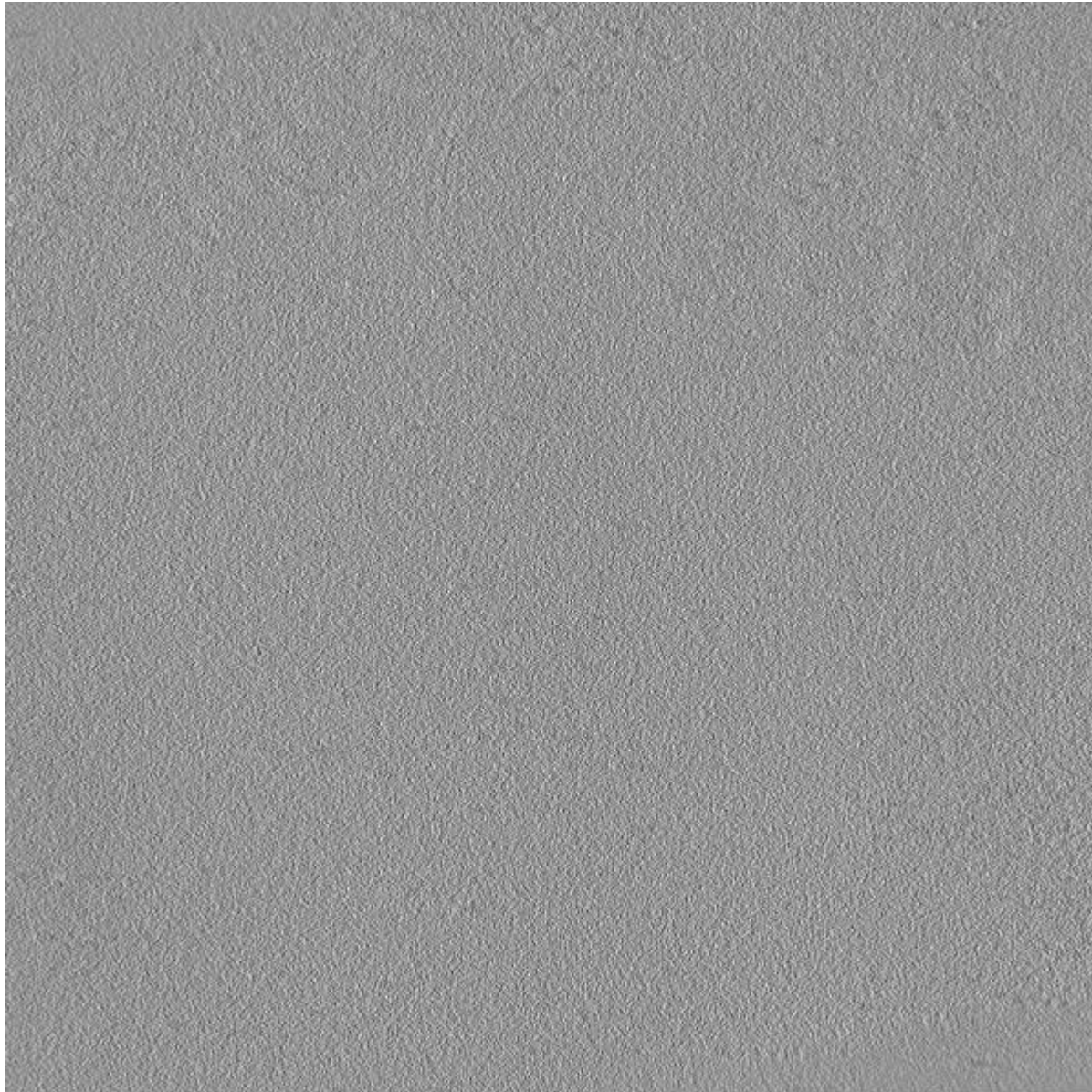
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Srovnání série snímků pomocí pozice zlatých nanočástic



Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Rekonstrukce tomogramu

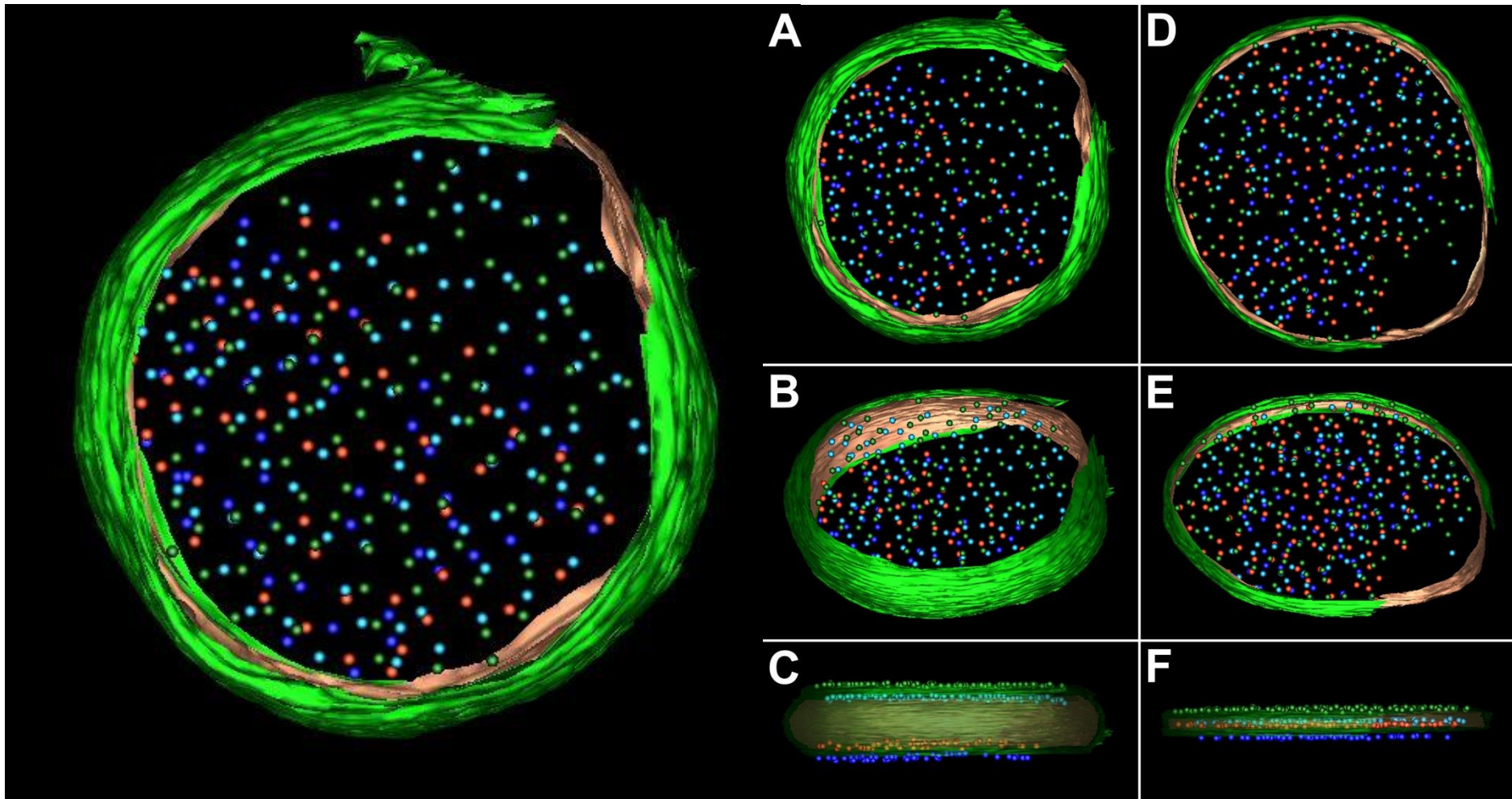


Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Rekonstrukce a vizualizace tomogramu

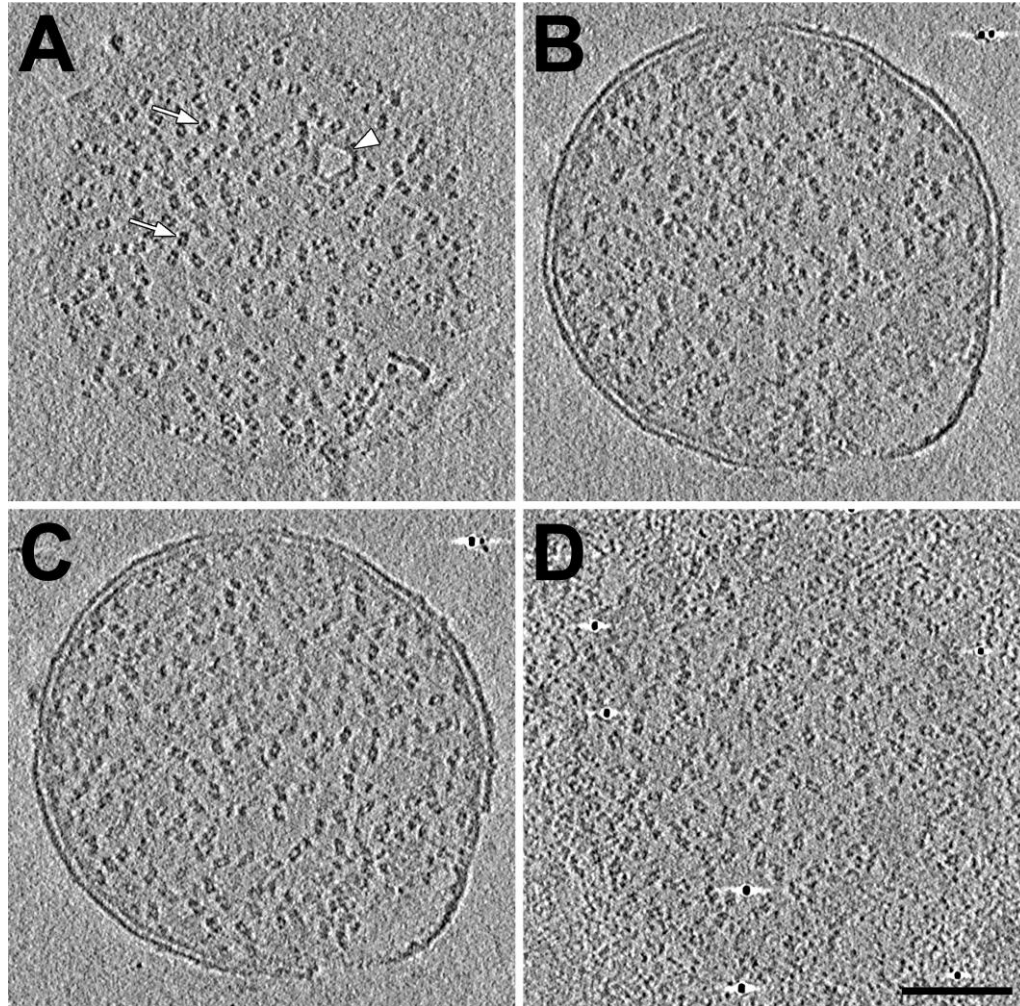


Modely granální membrány



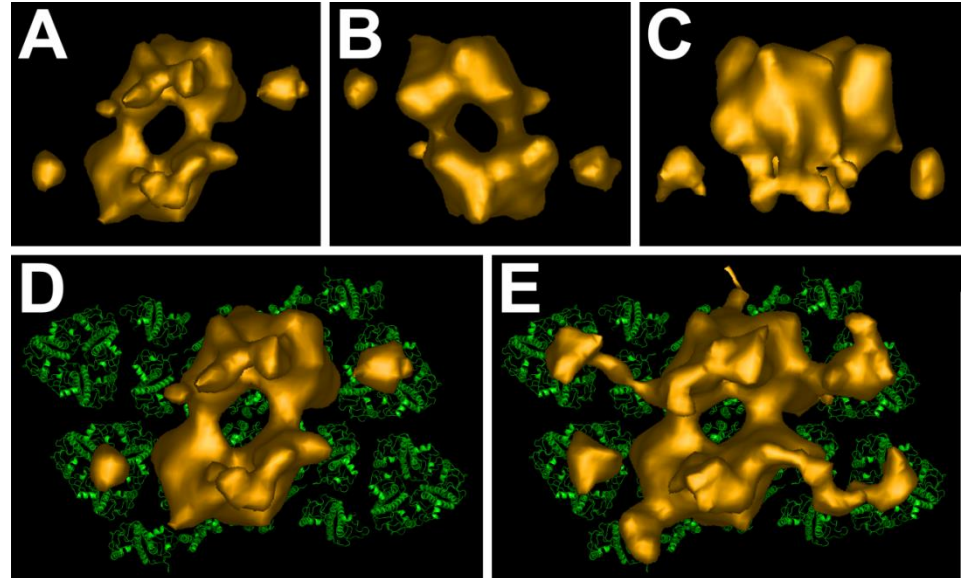
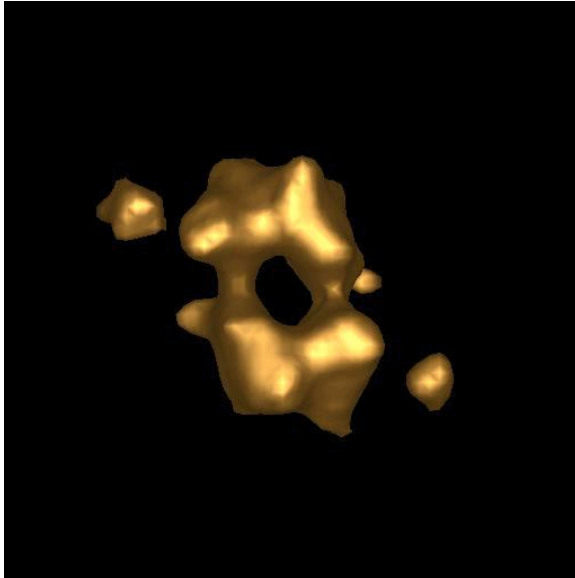
Tomografie odhaluje strukturu granální membrány a pozici fotosystémů II

Tomografické řezy granální membrány



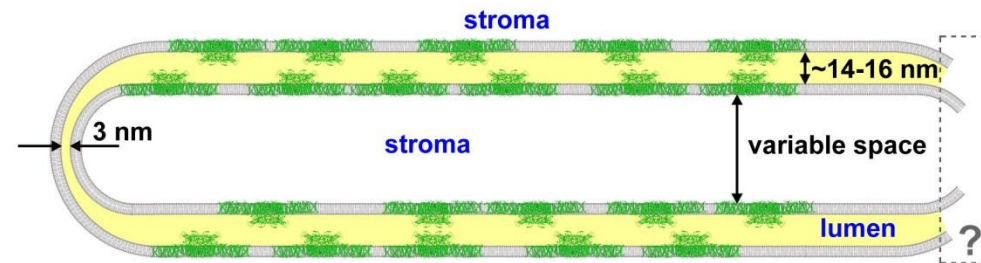
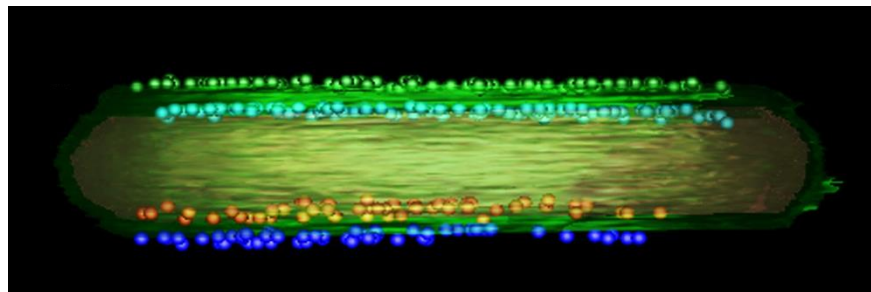
- 3D analýza PSII komplexů $\Rightarrow$ orientace PSII komplexů v membráně

3D analýza PSII komplexů



3D model PSII core complexu – analýza 100 sub-objevů

Model granální membrány



Kouřil a kol. (2011) BBA

Děkuji za pozornost!