Pozsgai Imre

A krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus

FIZIKA FELSŐFOKON

TYPOTEX

 © Pozsgai Imre

Előszó

A könyvben gyakran fordulnak elő zárójeles kifejezések, amelyek célja, hogy könnyítsék az olvasást. Alkalmazásuk a következő esetekben fordul elő:

– A (NAGYBETŰ SZÁM) formátum az idézett irodalomra vonatkozik. Ezek egy része folyóiratokban fellelhető cikk, ekkor a „NAGYBETŰ” az első szerző nevét, a „SZÁM” szó a cikk megjelenésének évét jelenti. Amikor a „NAGYBETŰ” intézményekre, cégekre vonatkozik, akkor az évszám hiányzik, mert a cégek az esetek túlnyomó többségében nem közölnek évszámot. A harmadik lehetőség az, hogy a „NAGYBETŰ” a YouTube-ra vagy a Wikipediára utal, ekkor az évszám hiányát az információnak az internetről való letöltési ideje helyettesíti. A könyv mindegyik fejezetéhez külön irodalomjegyzék tartozik.

– A (kisbetűs zárójeles angol kifejezés) célja az, hogy az interneten utána lehessen keresni a szóban forgó témának angol nyelven. Másrészt számos olyan angol kifejezéssel találkozunk, amelynek eddig nem volt magyar megfelelője. Ilyenkor az angol kifejezés kapcsolatot létesít az angol és a magyar szakirodalom között.

A gyakrabban előforduló rövidítések angol és magyar kifejtése a könyv végén megtalálható.

Jó szórakozást!

A szerző

I. fejezet. A krio-elektronmikroszkópiáról dióhéjban

A krio-elektronmikroszkópia címszó alatt biológiai minták nagyon alacsony hőmérsékletű, nagy felbontású, transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatait fogjuk tárgyalni. A „nagyon alacsony hőmérsékletek” kifejezés a cseppfolyós nitrogén forráspontja (-196 ^{o}C) körüli hőmérsékletekre vonatkozik. Innen származik a krio- előtag a mikroszkópia elnevezésében, bár az eredeti görög „kriosz” csak jéghideget jelent. A legmagasabb hőmérséklet, amit a vizsgálandó minta elérhet, -140 ^{o}C körül van, mert ennél magasabb hőmérsékleten az amorf állapotú jég kristályosba megy át, és ez károsítja a minta szerkezetét. A vizsgálatok célja háromdimenziós rekonstrukció készítése az elektronmikroszkópos képekből, tekintettel arra, hogy a biológiai minták funkciójukat három dimenzióban fejtik ki, (például a fehérjék feltekeredés után). További cél, hogy a krio-elektronmikroszkópia (továbbiakban krio-EM) szerkezeti információt nyújtson a szerkezetbiológusoknak, ami alapjául szolgálhat az adott makromolekula vagy sejt működésének megértéséhez. Ez a törekvés szorosan összefügg a szerkezeti biológia azon elvével, hogy a szerkezet meghatározza a működést. Sok, különböző szög alatt készített elektronmikroszkópos kép szükséges ahhoz, hogy belőlük háromdimenziós objektumot lehessen rekonstruálni.

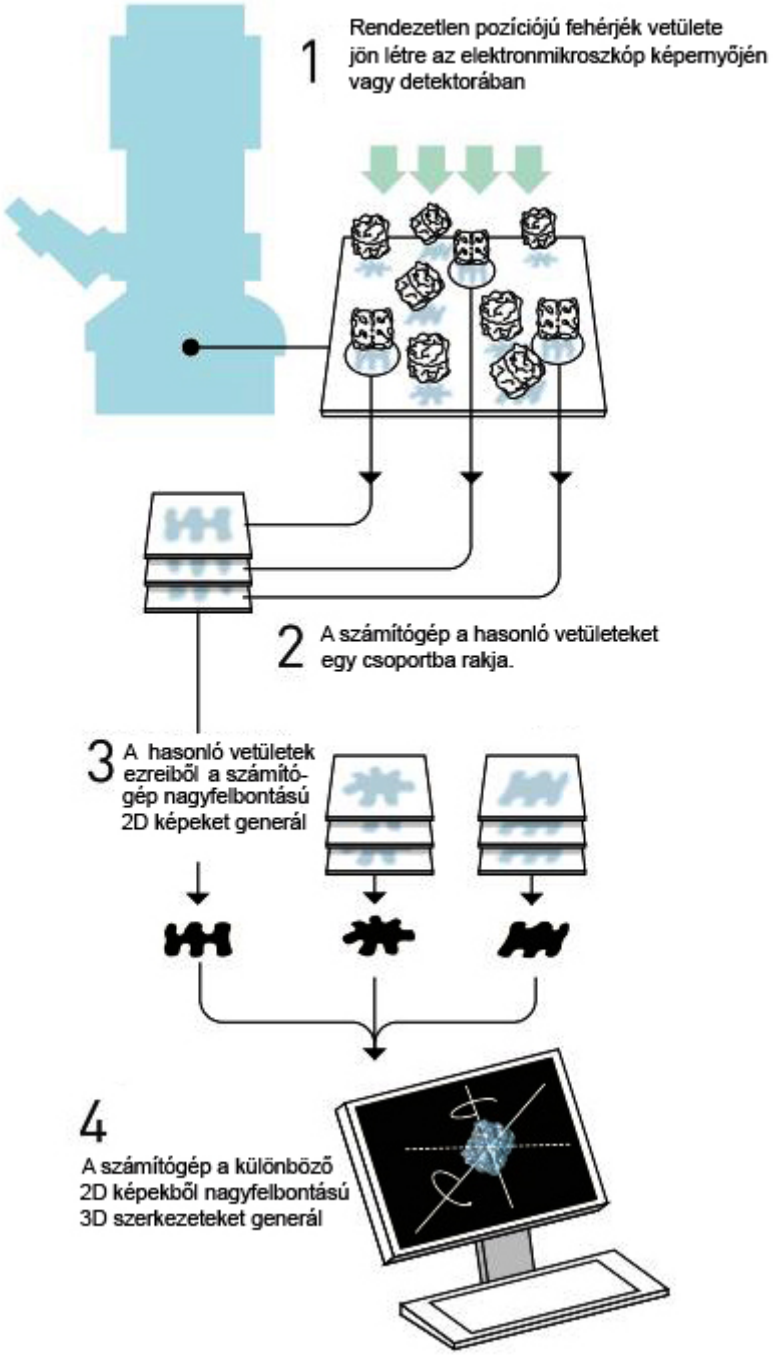
Két módszert fogunk részletesen tárgyalni: az egyedi részecskék analízisét és a krio-elektrontomográfiát.

Az egyedi részecskék analízise (angolul Single Particle Analysis, röviden SPA) az elnevezéstől eltérően nem egyetlen részecske vizsgálatát jelenti, hanem sok azonos tulajdonságú részecskéét. A kétdimenziós elektronmikroszkópos felvételekből rekonstruálják a háromdimenziós objektumot. Biokémiai minta-előkészítéssel igyekeznek elérni, hogy csak azonos tulajdonságú részecskék fordulhassanak elő a mintában. A módszer tökéletesítése révén az is megengedetté vált, hogy azonos tulajdonságú molekulák konformációs változatai is előfordulhassanak. A biológiai makromolekulák dinamikus szerkezetváltozásai nyomon követhetők az SPA-val, ami növeli az esélyt, hogy a szerkezetből a működésre lehessen következtetéseket levonni.

A minták (pl. fehérjék) oldat formájában kerülnek fel a mintatartó mikrostélyra. Bár közel natív állapotban őrződnek meg a gyors fagyasztás folyamán, a vizsgálat *in vitro* jellegű, mert a vizsgált makromolekulák környezetükből kiszakítva vannak jelen.

Az egyedi részecskék analízise nem tételez fel kristályos mintaszerkezetet, és többek között ez az, ami a krio-elektronmikroszkópia létjogosultságát indokolja a röntgenkrisztallográfia mellett a biológiai makromolekulák vizsgálatában. Fontos továbbá, hogy az egyedi részecskék mikroszkópos vizsgálata szimmetrikus mintaszerkezetet sem tételez fel. Ha a mintában mégis

vannak szimmetriatulajdonságok, akkor azok megkönnyítik a vizsgálatot: sokkal kevesebb képet kell készíteni a szimmetriák miatt.



1.1. ábra. Az egyedi részecskék krio-elektronmikroszkópos analíziséhez (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 1)

Az 1.1. ábra szerint a hasonló, de zajos és kis kontrasztú elektronmikroszkópos képeket a számítógép egy csoportba rakja. A csoporton belül a képek összegzésével és átlagolásával növeli a kontrasztot. Az eltérő csoportok eltérő orientációban felfekvő részecskéknek felelnek meg. Ezekből a különböző orientációjú kétdimenziós képekből generálja a számítógép a

háromdimenziós objektumot. Az itt nagy vonalakban felvázolt 3D rekonstrukciót részletesebben tárgyaljuk a IV. fejezetben.

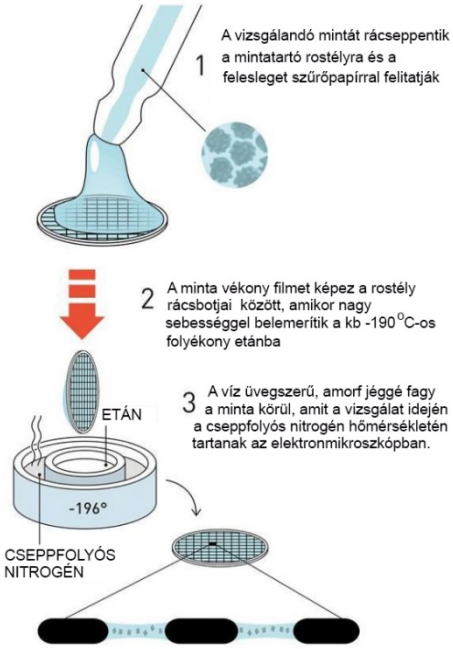
A krio-elektrontomográfiában (angolul cryo-electron tomography, a továbbiakban krio-ET) kevés vagy egyetlen biológiai objektum áll rendelkezésre. Ekkor a mintatartó döntésével lehet elérni, hogy különböző irányú vetületeket készítsünk az objektumról az elektronmikroszkópban, és ezekből rekonstruáljuk a 3D objektumot.

Ehhez hasonló vizsgálatról hétköznapjainkban is többet lehet hallani a kórházi röntgen komputer-tomográfia (CT) révén. Esetünkben nem röntgen-, hanem elektronsugárral végzik a vizsgálatot a krio-elektronmikroszkópon belül, és nem makro-, hanem mikro-objektumokon. A krio-ET műszaki feltételei azonosak az egyedi részecskék analízisével. A minta kristályossága itt sem követelmény.

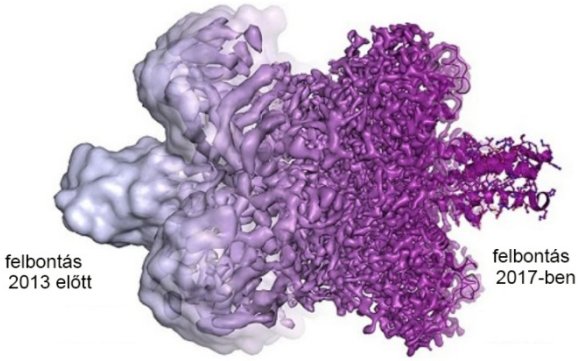
A krio-ET-vel heterogén mintákat, nagyobb szerkezeti egységeket vizsgálnak, mint SPA-val, például sejteket, sejtszervecskéket, szöveteket. A vizsgálat sok esetben *in vivo*-nak tekinthető, mivel a vizsgált egységeket nem szakítják ki természetes környezetükből. (A krio-ET-t részletesen az V. fejezetben tárgyaljuk.)

A krio-EM kulcsfontosságú vonása a minta olyan ultragyors merítéses fagyasztása, hogy közel natív állapotban maradjon meg, víztartalma amorf jég formájába fagyjon meg (1.2. ábra). A másik fontos tényező pedig a direkt elektrondetektorok (Direct Electron Detectors, DED) kifejlesztése volt. Ez a detektortípus nem állít elő az elektronokból fényt, majd a fényből ismét elektronokat, mint az addig használatos CCD-kamerák, hanem közvetlenül detektálja az elektronokat. Jelentősen javította a képekben a jel/zaj viszonyt a korábbi detektortípusokhoz képest, és ezáltal hozzájárult a felbontóképesség javulásához.

A krio-EM, mint a röntgenkrisztallográfia lehetséges alternatívája, különösen népszerűvé vált a direkt elektrondetektorok 2013 utáni elterjedését követően. A fehérjék szerkezetét az elmúlt 60 évben röntgensugarakkal tanulmányozták, amihez a fehérjéket ki kell kristályosítani. Azonban sok fehérje nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható. Ez motiválta a krio-elektronmikroszkópos fejlesztéseket, tekintettel arra, hogy a krio-EM-hez nem szükséges, hogy a vizsgálandó minta kristályos legyen.



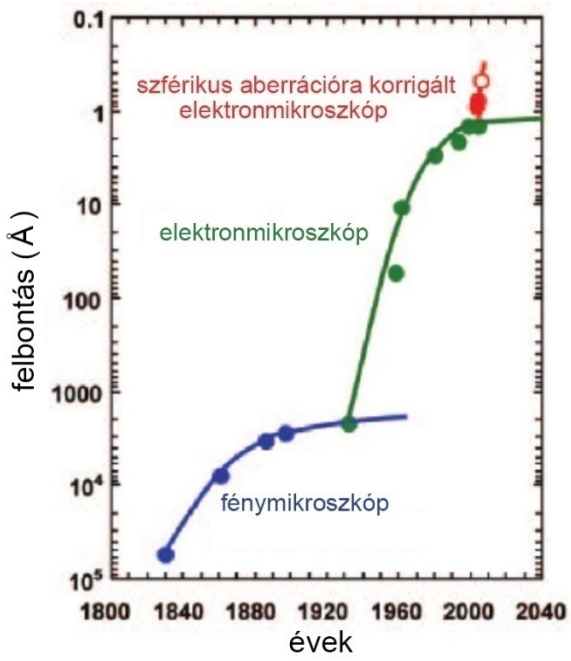
1.2. ábra. Az ultragyors merítéses fagyasztás (angolul plunge freezing) sémája. (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 2)



1.3. ábra. A direkt elektrondetektor által hozott felbontásjavulás. (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 3)

Sokszor idézik az irodalomban Richard Feynman Nobel-díjas fizikus „There is plenty of room at the bottom” című előadását (FEYNMAN 1959). Ha ennek idézése valahol időszerű, akkor ez az a hely. Azt mondja a fizikus Feynman a biológusok nevében: „Sajnálatos módon a jelenlegi mikroszkópok egy kicsit túl durván képeznek le. Csinálj egy százszor jobb mikroszkópot, és a biológia sok problémája sokkal könnyebben megoldható lesz.” A jelenlegi 0,5Å-ös rekordfelbontással nem száz-, hanem csak hússzoros javulást értek el az akkori értékhez képest, de ez a fejlődés is rendkívüli hatással volt a biológiai tudományokra.

A mikroszkópok felbontásának fejlődését ábrázoló görbét (1.4. ábra) éppen attól a H. Rose-tól idézzük, aki a szferikus aberráció korrigálásával hozzájárult ahhoz, hogy a jelen kor transzmissziós elektronmikroszkópja képes legyen a 0,5Å felbontásra.



1.4. ábra. A mikroszkópok felbontásának javulása az évek függvényében. Az üres piros kör még jóslásnak számított a közlemény megjelenése idején. (ROSE 1994). A fénymikroszkópra vonatkozó kék görbe pedig ma már kiegészítésre szorul, mert jelenleg a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópokkal az ábrából leolvasható 200Å felbontás helyett már 20Å-nél is jobb felbontás érhető el.

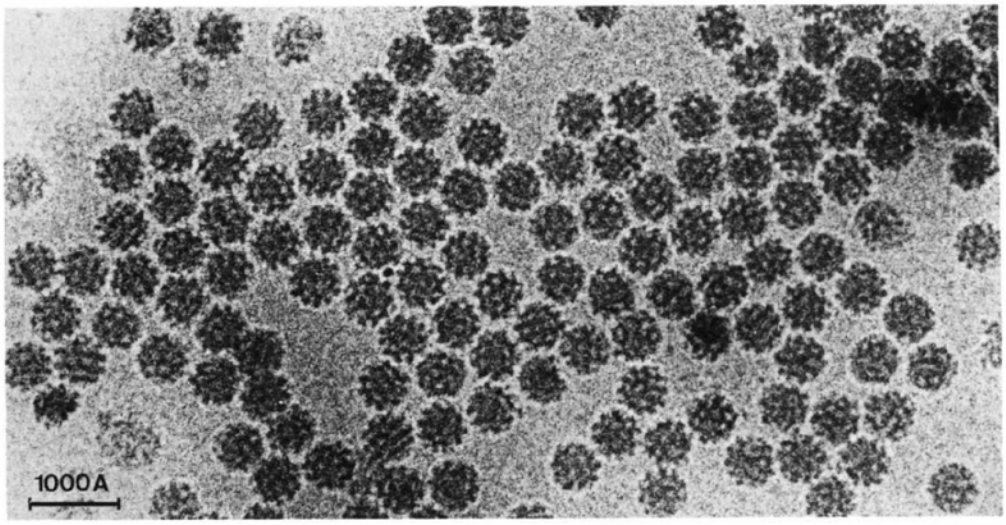
Anyagtudományi mintákon sokkal jobb felbontást lehet elérni, mint biológiai mintákon, mert a biológiai minták az elektronnyaláb alatt sugárkárosodást szenvednek, másrészt elveszítik víztartalmukat (dehidratálódnak) az elektronmikroszkóp vákuumának hatására.
A sugárkárosodás különösen a nagy nagyításoknál játszik szerepet, mert ekkor nagy áramsűrűséggel kell dolgozni, hogy elfogadható kontrasztú képet kapjunk. A minta fagyasztása sokáig nem oldotta meg a biológiai mintáknak a vákuumban bekövetkező vízvesztési problémáját. Ugyanis fagyasztáskor a vizsgálandó mintában keletkező kristályos jég (a hangsúly a kristályoson van) ugyanúgy tönkreteszi a mintát, mint a víztartalom elvesztése. Ez már az 1940-es években ismert volt (LUYET 1940).

Nobel-díjat érő felfedezés (2017 kémiai Nobel-díj) volt, amikor Dubochet megtalálta annak a módját, hogyan kell biológiai mintát úgy preparálni, hogy az közel natív, hidratált állapotban megmaradjon az elektronmikroszkópos vizsgálat alatt (DUBOCHET 1982, ADRIAN és DUBOCHET 1984). A minták fagyasztása az első pillanatra természetesnek tűnik, de ha

hozzátesszük, hogy 1 μm amorf jég létrehozásához a víz fagyasztási sebessége ~10^6 °C/másodperc körül kell hogy legyen, akkor „elhűl” az ember (DUBOCHET 1988). A minta ultragyors, merítéses fagyasztása folyékony etánban (angolul plunge freezing) azt eredményezi, hogy a minta víztartalma amorf jég formájában fagy meg. Szokás ezt a jégmódosulatot üvegszerű jégnek is nevezni (vitreous ice), utalva az üveg amorf szerkezetére, és a vitrifikálás kifejezés ezt a gyors fagyasztási folyamatot jelöli.

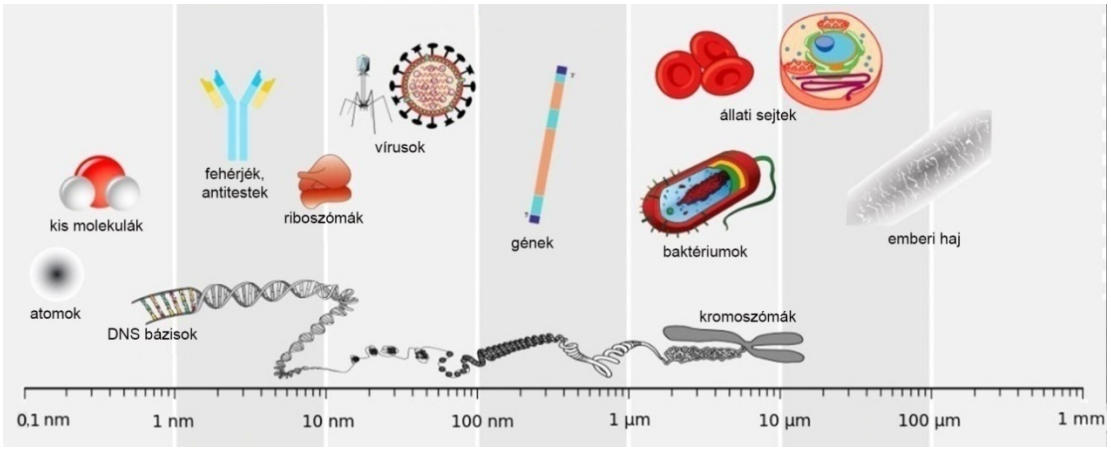
Taylor és Glaeser volt az első, aki fagyasztott, hidratált mintákat vizsgált elektronmikroszkópban (TAYLOR és GLAESER 1974 és 1976). A vizsgált kataláz kristály védőrétegek között volt beágyazva (C+SiO a minta alatt és felett), így nem károsodott. A szerzők tévesen nem az amorf jégnek, hanem a védőrétegeknek tulajdonították a minta jó minőségének megmaradását. Dubochet hivatkozik Taylor és Glaeser vizsgálataira (DUBOCHET 1984, 2018), hogy nagy hatással voltak a munkájára, de az elismerés, a Nobel-díj, Dubochet-nak jutott ki. Az első ultragyors merítéses fagyasztással készült felvételek (1.5. ábra) egy új korszak kezdetét jelentették a biológiai minták preparálásában.

A 2017-es kémiai Nobel-díj a krio-elektronmikroszkópia kifejlesztéséért és az oldatban lévő biomolekulák nagy felbontású szerkezet-meghatározásáért (Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson) ráirányította a világ figyelmét arra, hogy itt valami nagyon jelentős dologról van szó. Dubochet a mintapreparálást, Frank a háromdimenziós elektronmikroszkópiát fejlesztette, Henderson pedig a biológiai minták elektronmikroszkópos szerkezetvizsgálatának élharcosa volt a kezdetektől fogva, és az ún. direkt elektrondetektor kifejlesztésében is tevékenyen részt vett.



1.5. ábra. Semliki forest vírus elektronmikroszkópos képe. Gyorsítófeszültség 80kV, elektronoptikai nagyítás 15 000×, teljes elektrondózis 10 $e^-/Å^2$. (Megj. Semliki forest Uganda nemzeti parkja). (ADRIAN és DUBOCHET 1984)

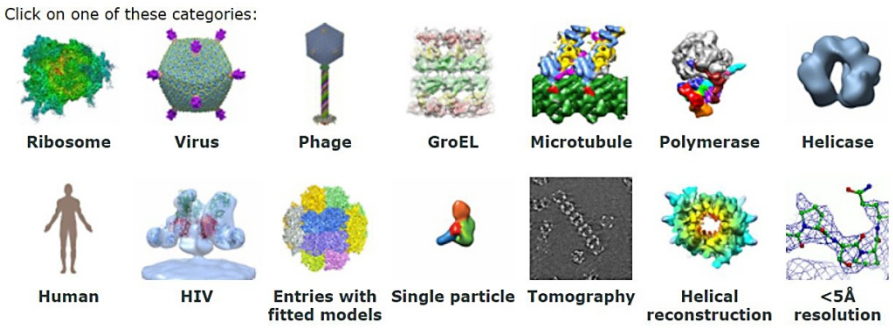
Lehet-e véletlen, hogy az emberiség a baktériumok elleni küzdelmet eddig sikeresebben folytatta, mint a vírusok ellen? Nem. A vírusok sokkal kisebbek, mint a baktériumok. A vírusok többségének mérete 20–300 nm között van, a baktériumoké az 1–10 µm tartományba esik (1.6. ábra). Amit nem látunk, az ellen nehezebb harcolni. Továbbá nem elég látni, hanem elég nagy felbontásban kell látni ahhoz, hogy hasznos információt nyerhessünk egy objektumról.



1.6. ábra. A méretskála szemléltetése biológiai objektumokkal (WIKIPEDIA)

Lehet-e gyakorlati haszna a krio-elektronmikroszkópiának? Igen! A 2019-es koronavírus-járvány idején a kórokozó SARS-CoV-2 vírus szerkezetét az esetek túlnyomó többségében krio-EM-mel vizsgálták. A krio-EM a gyógyszeriparnak fontos segédeszköze. A fehérjék és a potenciális hatóanyagok kölcsönhatásának vizsgálata jelentős szerepet tölt be a gyógyszerfejlesztésben. Az orvostudomány számára pedig elengedhetetlen, hogy értsük a fehérjék működését; ehhez pedig ismerni kell a szerkezetüket.

A krio-EM alkalmazási sokféleségét jól érzékelteti az Elektronmikroszkópos Adatbank internetes nyitólapjának ábrája, amit a gyorskereséshez készítettek (1.7. ábra):



1.7. ábra. Az Elektronmikroszkópos Adatbank (EMDB) internetes nyitólapja

https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/

Bár manapság csúcsteljesítményű elektronmikroszkópokkal már a 2-3 Å méretű atomok is láthatók, sajnos a 0,5 Å körüli felbontás biológiai minták esetében még nem realizálható. (Apoferritinen érték el eddig a legjobb felbontást, 1,25 Å-t. (NAKANE 2020, YIP 2020)). A biológiai mintáknál az említett két hatás, az elektronnyaláb okozta sugárkárosodás, valamint az elektronmikroszkóp vákuumának dehidratáló hatása erős korlátokat szab a felbontóképességnek.

Kézenfekvő, hogy a mintát az elektronmikroszkópban a lehető legkisebb intenzitású sugárral vizsgálják, ezzel minimálisra csökkentve a sugárkárosodást. A krio-EM előtt már ismerték az alacsony dózisú elektronmikroszkópiát, de az alacsony intenzitású besugárzáskor kontrasztszegény (kisebb mint 1% kontrasztú) képeket nyertek. Manapság már jobbak a detektorok, és alacsony dózisú besugárzáskor is jobb kontrasztú képet adnak az említett 1%-nál. A konvencionális elektronmikroszkópiában a kontraszt növelésére a biológiai mintákat nehézfémek sóoldatával festik meg (pl. uranil-acetát vagy ozmium-tetroxid). A háttér a hozzáadott nehézfémektől sötét lesz, a vizsgálandó minta világos, és látványosan szép képeket lehet kapni. Ennek az ún. negatív festésnek hátránya, hogy kb. 15 Å-ös felbontásnál jobbat nem lehet elérni vele a festék szemcsemérete miatt, és ez elégtelen a biológiai makromolekulák szerkezetének nagy felbontású meghatározásához. (A nagy felbontás említésekor az első közelítésben gondoljunk 4 Å-nél jobb felbontásra (MALHOTRA 2019), később pontosítjuk a felbontás fogalmát és az elérhető értékeket is.)

Biológiai mintákon a felbontóképességet 35 Å-ről 3,5 Å-re javítani 30 évbe tellett (DUBOCHET 2016). A negatív festésű mintákat a krio-EM vizsgálatokat megelőzően is használják információgyűjtésre, mert a negatív festés a kis felbontású információkat kontrasztosabban adja, mint a krio-EM.

Hangsúlyozni kell, hogy ultragyors merítéses fagyasztáskor a vizsgálandó biológiai minta közel natív, hidratált állapotban marad meg. Ezt kísérletileg is ellenőrizték: sok esetben a fagyasztott objektumok a jég felolvasztása után is szaporodásra voltak képesek.

Az első sikeres molekuláris szerkezetmeghatározás elektronmikroszkópos mérésekből kristályos(!) mintákon, bíbor membránon (bakteriorodopszin) és kataláz mintákon történt (UNWIN 1975 és HENDERSON 1975). Az előbbieken 7Å, az utóbbiakon 9Å felbontást értek el. A minták festés nélküliek, szobahőmérsékletűek voltak, cukoroldattal átitatva. A beszáradt cukor szolgált a minta szerkezetének stabilizálására. Az alacsony dózisú felvételeken szabad szemmel molekulák nem voltak láthatók, csak a kristályszerkezetben meglévő periodicitásoknak volt köszönhető, hogy az „átlagos” molekulához szükséges információk kinyerhetők voltak. Henderson csak 1990-ben tudott a ultragyors hűtés alkalmazásával a

bakteriorodopszin 7 Å-ös felbontásából a 3,5 Å felbontásáig eljutni (HENDERSON 1990). Ekkor már a fehérje oldalláncain lévő aminosavak is interpretálhatók voltak a rekonstruált modellben. A történethez hozzátartozik, hogy Henderson csak akkor fordult az elektronmikroszkópia felé, amikor kiderült, hogy a feladatot röntgen-krisztallográfiával nem tudja megoldani.

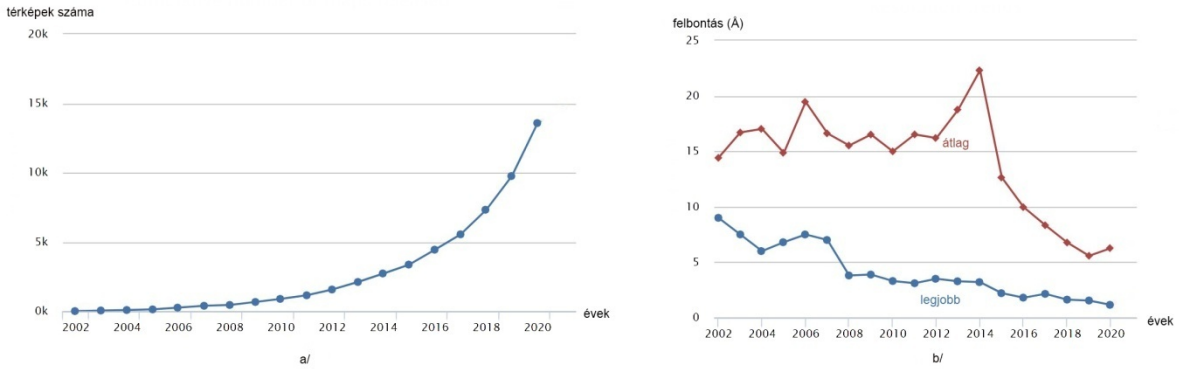
A krio-EM-mel kristályos minták is vizsgálhatók, de itt csak futólag emlékezünk meg a kétdimenziós elektronkrisztallográfiáról (2D electron crystallography) és a háromdimenziós mikrokristályok elekrondiffrakciójáról (angolul microED).

A kétdimenziós elektronkrisztallográfia közel áll a röntgenkrisztallográfiához, de mégis különbözik tőle. A legfőbb különbség abban foglalható össze, hogy az elektronsugárnak az anyaggal való kölcsönhatása 100 000-szer vagy 1 000 000-szor erősebb, mint a röntgensugaraké. Következésképpen elektronsugárral olyan kis mintákon is lehet jól értékelhető diffrakciós képet készíteni, amelyeken röntgensugarakkal nem lehetséges. A „kétdimenziós” jelző a vizsgált minta vékonyságára utal, amely monoréteg vastagságú. A kristályos minta periodicitása megkönnyíti, hogy ne kelljen olyan sok felvételt készíteni a szerkezet rekonstruálásához, mint a nemkristályos egyedi részecskék analízisekor. Ezért nem véletlen, hogy az első sikeres elektronmikroszkópos molekuláris szerkezetrekonstrukció periodikus szerkezetű mintákon történt.

A háromdimenziós elektronkrisztallográfiaban (más néven mikrokristály elektrondiffrakció micro-ED) a „háromdimenziós” jelző a vizsgálandó kristály méretére vonatkozik, és azt mutatja, hogy nem szükséges, hogy monorétegeket vizsgáljunk. A mikrokristály elektrondiffrakció nem tévesztendő össze a transzmissziós elektronmikroszkópiából ismert mikrodiffrakcióval, amelyben a „mikro-” előtag a vizsgált terület kis méretére utal.

A költségek igen magasak: egy krio-EM ~10 millió dollárba kerül, kb. ugyanennyibe kerül az infrastruktúra kiépítése (magas, stabil épület), és a napi működési költsége ~10 ezer dollárt tesz ki. Vinothkumar és Henderson a krio-elektronmikroszkópia gyors elterjedésének érdekében azt szorgalmazza, hogy a gyártók fejlesszenek ki sokkal olcsóbb 100 kV-os krio-EM-eket a drága 300 kV gyorsítófeszültségű krio-elektronmikroszkópok helyett (VINOTHKUMAR és HENDERSON 2016).

A krio-EM új és nagyon gyorsan fejlődő terület: 2013-tól kezdődően a krio-EM-ben végbement egy „felbontási forradalom” (angolul jól hangzó resolution revolution, KÜHLBRANDT 2014), ami nagyobbrészt az ún. direkt elektrondetektor kifejlesztésének tulajdonítható (1.8.ábra).



1.8. ábra. a/ Az Elektronmikroszkópos Adatbankba (Electron Microscopy Data Bank, EMDB) került, feltérképezett szerkezetek kumulatív száma, b/ a legjobb és átlagos felbontás az esztendők függvényében. (EMDB 2021)

Az új detektortípus elterjedésével jelentősen megnőtt az Elektronmikroszkópos Adatbankba bekerült krio-EM szerkezetmeghatározások száma (1.8.a/ ábra), ezzel párhuzamosan javult a krio-EM felbontóképessége is (1.8.b/ ábra). (A kisebb érték jobb felbontást jelent. A sűrűségtérkép IV.2.4. pont.)

Bár a téma eddigi ismertetése meglehetősen rövid, de nem minden tanulság nélküli. Vegyük észre, hogy amikor Klug vagy Henderson a kitűzött célt nem érte el az addig művelt röntgenkrisztallográfiával, nyitottak voltak egy új módszer megtanulására. Bámulatos kitartással hosszú éveken át küzdöttek a probléma megoldásáért. Amikor Henderson elektronmikroszkópja Cambridge-ben nem volt elég jó, akkor bakteriorodopszin mintáival a Svájcban dolgozó Dubochet-t látogatta meg, majd Zeitlert a berlini Fritz-Haber-Institute-ban és végül az amerikai Berkley-ben dolgozó Downingot és Glaesert. (HENDERSON Nobel-előadásának a videója.) Ez a kooperációs készség szintén tanulsága ennek a rövid áttekintésnek.

A krio-EM-ről számos jól megírt összefoglaló cikk jelent meg (BAI 2015, CHENG 2015A, CHENG 2015B, CHENG 2015C, HENDERSON 2015, NOGALES 2015, PASSMORE 2016, SKINIOTIS 2016, VINOTHKUMAR 2016, WU 2016, MARTYNOWYCZ 2018, MURATA 2018, QUENTIN 2018, SATO 2018, LYUMKIS 2019).

Irodalom

ADRIAN, M., DUBOCHET, J. et al. (1984): Cryo-electron microscopy of viruses, *Nature* 308, 32–36.

BAI, X. et al. (2015): How cryo-EM is revolutionizing structural biology, *Trends in Biochemical Sciences* 1–9, http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005.

CHENG, Y. (2015 C): Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution, *Cell* 161, 450–455.
CHENG, Y. et al. (2015 A): A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy, *Cell* 161, 438–448.
CHENG, Y. et al. (2015 B): A Supplement http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.050
DUBOCHET, J. (2016): A Reminiscene about Early Times of Vitreous Water in Electron Cryomicroscopy, *Biophysical Journal* 110, 756–757.
DUBOCHET, J (2017) Nobel-lecture-slides, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/dubochet-lecture-slides.pdf
DUBOCHET, J. (2018): On the Development of Electron Cryo-Microscopy (Nobel-lecture), *Angewandte Chemie International Edition* 57 (34), https://doi.org/10.1002/anie.201804280
DUBOCHET, J. et al. (1982): Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *Journal of Microscopy* 128, (3), 219–237.
DUBOCHET, J. et al. (1988): Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Quarterly Review of Biophysics* 21, (2) 129–228.
FEYNMAN, R. P. (1959): There is plenty of room at the bottom, http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html
HENDERSON, R. (2015): Overview and future of single particele electron cryomicroscopy, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581, 19–24.
HENDERSON, R. and UNWIN, P.N.T. (1975): Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature* 257, (5521) 28–32.
HENDERSON, R. et al. (1990): Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron Cryo-Microcopy, *J. Mol. Biol*. 213, 899–929.
KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 1, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/popular-chemistryprize2017.pdf
KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 2, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/popular-chemistryprize2017.pdf
KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 3, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/popular-chemistryprize2017.pdf
KÜHLBRANDT, W. (2014): The Resolution Revolution, *Science* 343, 1443–1444.
LUYET, B.J. et al. (1940): Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, *Biodynamica.*

LYUMKIS, D.(2019): Challenges and Opportunities in Cryo-EM Single-Particle Analysis, *JBC,* http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.REV118.005602

MALHOTRA, S. et al. (2019): Modelling structures in cryo-EM maps, *Current Opinion in Structural Biology* 58 105–114.

MARTYNOWYCZ, M.W. et al. (2018): From electron crystallography of 2D crystals to MicroED of 3D crystals, *Current Opinion in Interface Sci.* 34, 9–16.

MURATA, K. et al. (2018): Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules, *BBA General Subjects* 1862, 324–334. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.020

NAKANE, T. et al. (2020): Single-particle cryo-EM at atomic resolution, *Nature* 587, 152–156.

NOGALES, E. et al. (2015): Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity, *Molecular Cell* 58, 677–688.

PASSMORE, L. et al. (2016): Specimen preparation for high-resolution cryo-EM, *Methods in Enzymol.* 579, 51–86. doi:10.1016/bs.mie.2016.04,011.

QUENTIN, D. et al. (2018): Electron cryomicroscopy as a powerful tool in biomedical research, *J. Mol. Med. (Berl)* 96 (6) 483–493.

ROSE H. (1994): Corrections of aberrations, a promising means for improving the spatial and energy resolutions of energy-filtering electron microscopes, *Ultramicroscopy,*56, 11–25.

SATO, C. (2018): Structural Biology Using Electron Microscopy, in *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations,* (eds) Hejátko J., Hakoshima T., https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_13

SKINIOTIS, G. et al. (2016): Single-particle cryo-electron microscopy of macromolecular complexes, *Microscopy* 9–22, doi:10.1093/jmicro/dfv366

TAYLOR, K.A. and GLAESER, R.M. (1974): Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals, *Science* 186, 1036–1037.

TAYLOR, K.A. and GLAESER, R.M. (1976): Electron Microscopy of Frozen, Hydrated Biological Specimens, Journal of Ultrastructure Research 55, 448–456.

UNWIN, P.N.T. (1975): Beef Liver Catalase Structure: Interpretation of Electron Micrographs, *J.Mol. Biol.* 98, 235–242.

VINOTHKUMAR, K. R. and HENDERSON, R. (2016): Single particle electron cryomicroscopy: trends, issues and future perspectives, *Quarterly Reviews of Biophysics.* e13, 1–25. doi:10.1017/S0033583516000068

WU, S. et al. (2016): Single-particle cryo-EM data acquisition by using direct electron detection camera, *Microscopy* 65 (1) 35–41. doi:10.1093/jmicro/dfv355.
YIP, K.M. et al. (2020): Breaking the next Cryo-EM resolution barrier – Atomic resolution determination of proteins!, bioRxiv, preprint, DOI: 10.1101/2020.05.21.106740

II. fejezet. Alapismeretek a biológiai minták elektronmikroszkópiájához

II.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Tekintettel arra, hogy a krio-elektronmikroszkópia, a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) egyik ága, felelevenítjük a transzmissziós elektronmikroszkópia néhány idevonatkozó alapfogalmát (WILLIAMS és CARTER 1996), (KOHL és REIMER 2008). A TEM részletes ismertetése meghaladja e könyv kereteit.

A fénymikroszkópiához hasonlóan a transzmissziós elektronmikroszkópiában is a leképező sugárzás hullámhossza határozza meg a felbontóképességet.

A fénymikroszkópiában a Rayleigh által módosított Abbe-képlet szerint a felbontás a besugárzásra merőleges x-y síkban:

$$\frac{0{,}61\lambda}{n\,sin\theta} \qquad (2.1.)$$

ahol λ a fény hullámhossza, n – a törésmutató, θ az objektívlencse nyílásszögének a fele.

A transzmissziós elektronmikroszkópiában a hullámhossz

$$\lambda\ 1{,}22/E^{1/2}$$

ahol E – az elektronok energiája elektronvolt (eV) egységekben, λ – a hullámhossz nanométer (nm) egységekben értendő.

Az elektronok hullámhosszának numerikus értékét a 2.1. táblázatban láthatjuk nemrelativisztikus és relativisztikus közelítésben. (A fényhez közeli sebességeknél az elektron tömege megnő. Ha ezt figyelembe vesszük, akkor relativisztikus közelítésről beszélünk. Egy 300 kV-os elektronmikroszkópban az elektronok meghaladják a fénysebesség háromnegyedét.)

2.1. táblázat. Az elektronok hullámhossza a mikroszkóp gyorsítófeszültségének függvényében.

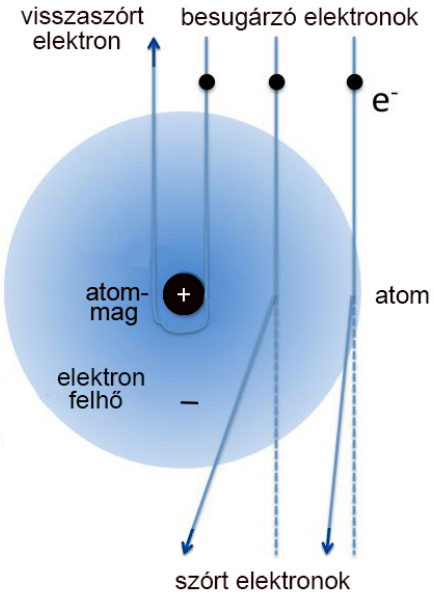
(WILLIAMS és CARTER 1996)

Gyorsítófeszültség (kV)	Nemrelativisztikus hullámhossz (nm)	Relativisztikus hullámhossz (nm)
100	0,00386	0,00370
200	0,00273	0,00251
300	0,00223	0,00197

A táblázatban látható hullámhosszak öt nagyságrenddel kisebbek a látható fény hullámhosszánál, így az elektronmikroszkóp felbontóképessége (1 Å körüli érték) öt nagyságrenddel jobb, mint a fénymikroszkópé a (2.1.) képlet alapján. Az összehasonlítást árnyalja, hogy a szuperfelbontású fluoreszcens fénymikroszkópiában már 10-20 nanométeres

felbontást is el lehet érni, ami csak az Abbe-elmélet keretein kívül értelmezhető. A fluoreszcens fénymikroszkópia említése itt annyiban helyénvaló, hogy az is hasonlóan forradalmi módon hat a biológiai kutatásokra, mint a krio-elektronmikroszkópia (POZSGAI 2019). Újabban a krio-EM és a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kombinációját is gyakran alkalmazzák, hogy a keresett mintarészletet lokalizálják a „túlzsúfolt” képben. (V.2.5. fejezet)

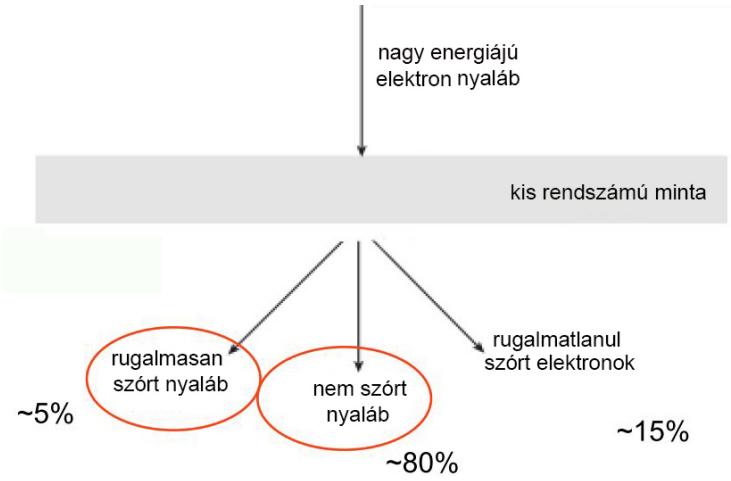
Az elektronmikroszkópban az elektronnyaláb a vizsgálandó mintával rugalmas és rugalmatlan kölcsönhatásba lép. A rugalmas kölcsönhatás főleg az atommagokon, a rugalmatlan kölcsönhatás főleg az elektronhéjakon megy végbe. (2.1. ábra)



2.1. ábra. Az elektronok szóródása az atommagon és az elektronhéjakon.

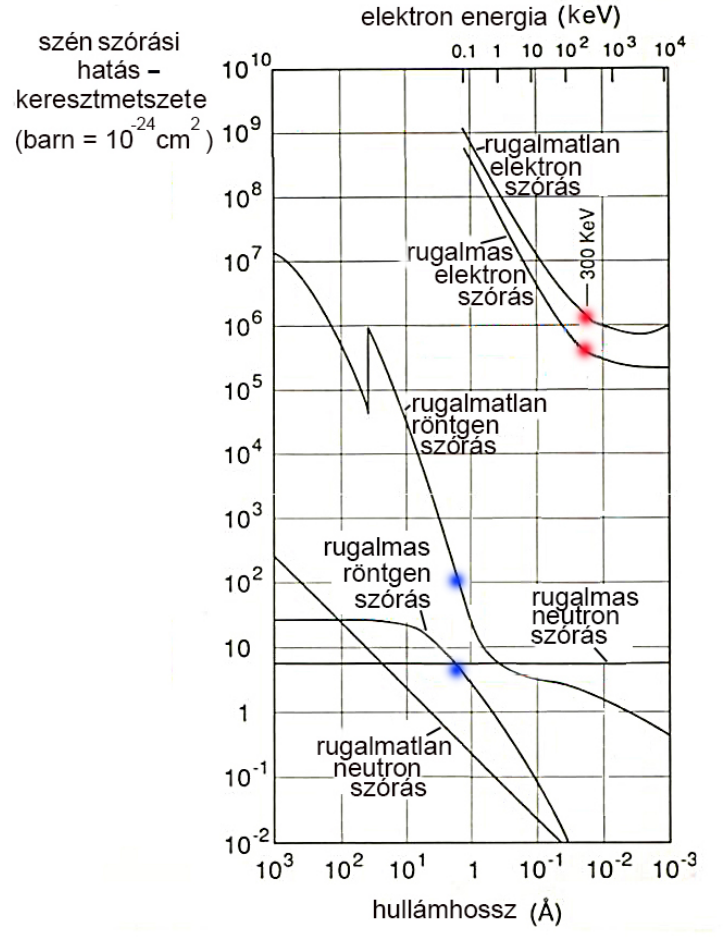
Képalkotásra és diffrakcióra a szóródás nélküli és a rugalmasan szórt elektronokat használjuk. A rugalmatlanul szórt elektronok károsak mind a képalkotásban, mind a diffrakcióban. Energiaszűrővel ellátott mikroszkópokban el lehet érni, hogy csak a mintán energiaveszteség nélkül áthaladt elektronok vegyenek részt a leképezésben. Bár a rugalmatlanul szórt elektronok a leképezésben ún. színi hibát (kromatikus aberrációt) okoznak, rengeteg információt hordoznak magukon, ezért ezeket többek között kémiaiösszetétel-analízisre használják. A rugalmatlanul szórt elektronok által kiváltott röntgensugárzást röntgenspektrométerrel, magukat az energiaveszteséget elszenvedett elektronokat elektronspektrométerrel detektálják. Ez utóbbi esetben elektronenergia-veszteségi spektroszkópiáról beszélünk, amire még ebben a fejezetben visszatérünk.

A rugalmatlan szórásnak egy másik nemkívánatos hatása a kromatikus aberrációs kívül az, hogy sugárkárosodást okoz.



2.2. ábra. A szórt elektronnyalábok megoszlásának részaránya (RUSSO 2014)

A 2.2. ábra azt mutatja, hogy minden szórt elektronból 1 szóródik rugalmasan, 3 rugalmatlanul. (Gyakorlatilag függetlenül attól, hogy 100 kV-os vagy 300 kV-os gyorsítófeszültségen dolgozunk.)



2.3. ábra. Az elektronok és röntgensugárzás szénnel való kölcsönhatása. A kölcsönhatás mértéke a függőleges tengelyen ábrázolt szórási hatáskeresztmetszet. (HENDERSON 1995)

Az elektronok szóródását együtt mutatjuk a röntgensugarak szóródásával, tekintettel arra, hogy sokszor fogjuk a krio-elektronmikroszkópiát összehasonlítani a röntgenkrisztallográfiával. Ennek oka az, hogy a biológiai makromolekulák háromdimenziós rekonstrukcióját gyakran végzik röntgendiffrakcióval, amikor a vizsgálandó molekula kristályosítható (elég nagy méretben és elég jó minőségben). Azért a szénre vonatkozó szórási keresztmetszeteket mutatjuk, mert a biológiai minták egyik fő komponense a szén. A 2.3. ábrából kiolvasható, hogy az elektronok sokkal erősebben lépnek kölcsönhatásba a szénnel, mint a röntgensugarak. A leggyakrabban használt elektron- és röntgenenergiákat pirossal, illetve kékkel jelöltük.

A nagy felbontású krio-elektronmikroszkópiában a kontraszt létrejöttének az alapja a fáziskontraszt, szemben a konvencionális elektronmikroszkópiával, amelyben az amplitúdókontraszt dominál. A fáziskontraszt egy interferenciajelenség: a mintán áthaladó, rugalmasan szórt, és a szóródás nélküli elektronok kölcsönhatása révén jön létre. Az objektív apertúrán kívülre szórt elektronok hozzák létre az amplitúdókontrasztot. Az amplitúdókontraszt csak csekély mértékben (<10%) járul hozzá az itt tárgyalandó vékony biológiai minták fáziskontrasztjához.

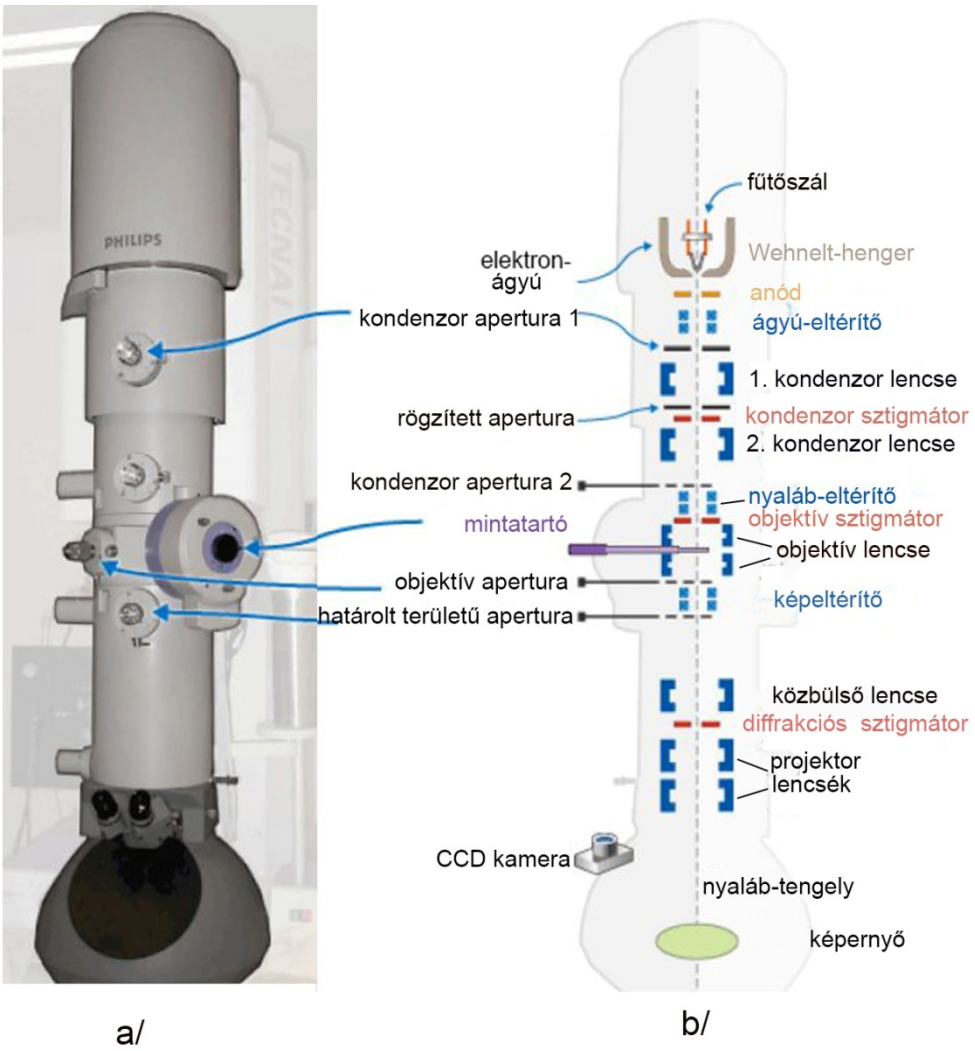
II.1.1. Az elektronmikroszkóp

Az első elektronmikroszkópot Ernst Ruska és Max Knoll építette 1931-ben. Ruska 1986-ban kapta meg a fizikai Nobel-díjat ezért a teljesítményért.

Egy konvencionális elektronmikroszkóp sémáját mutatja a 2.4. ábra.

A kondenzorlencsével párhuzamos elektronsugarat állítunk elő, amely megvilágítja a mintát. Az objektívlencse hátsó fókuszában keletkezik a diffrakciós kép, a képsíkban pedig egy nagyított (kb. 100×), fordított állású kép. A közbülső lencse és a projektorlencse segítségével megjeleníthetjük a képernyőn a diffrakciós képet vagy a minta valódi képét az említett két lencse gerjesztőáramától függően. Az összes lencse együttes nagyítása meghaladhatja az 1 milliót is, viszont a nagyítás nem jellemző paraméter sem a fény-, sem az elektronmikroszkópiában. Helyette irányadó paraméter a felbontás vagy felbontóképesség.

Az elektronmikroszkóp belsejében vákuum van. Ez biztosítja, hogy a katód fűtőszála ne égjen ki, és hogy az elektronok ne szóródjanak a levegő molekuláin. A jó minőségű vákuum fontos követelmény azért is, hogy a katód és a minták ne szennyeződjenek el. A vákuum nagyságára a 2.2. táblázatban találunk számszerű adatokat.



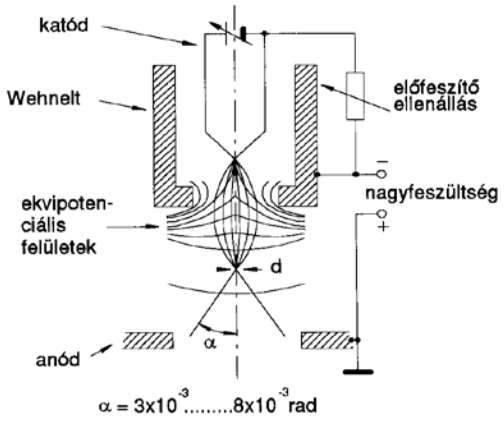
2.4. ábra. Konvencionális transzmissziós elektronmikroszkóp (a/), a mikroszkóp egyes elemei (b/). (RUSSO 2014)

II.1.2. Az elektronágyú

Az elektronágyú szerelvényének feladata egy kis méretű elektronforrást előállítani (a 2.5. ábrán „d”-vel jelölve), amelyet a szakirodalom „crossover”-nek nevez. A crossovert a kondenzorlencse kicsinyíti tovább.

Kezdetben az elektronmikroszkópok ellenállás-fűtésű termikus volfrámkatódokkal működtek. A következő fejlődési fok a lantánhexaborid (LaB_6), majd a téremissziós katód (FEG, angolul Field Emission Gun) volt. A fejlődést az egyre fényesebb elektronforrás utáni igény hajtotta. (A fényességet az egységnyi térszögben mért áramsűrűséggel mérik. (2.3) képlet)

A volfrám- és LaB6 katódok termo-emissziósak. Egy volfrámkatóddal működő elektronágyú sémáját mutatja a 2.5. ábra.



2.5. ábra. A termikus volfrámkatóddal működő elektronágyú sémája („d” jelöli a virtuális forrás, az ún. crossover átmérőjét)

A felfűtött katód elektronokat emittál. A gyorsítandó elektronok mennyiségét a Wehnelt-henger előfeszítésével lehet szabályozni.

Termoemissziós volfrámkatódra igaz, hogy a nyalábáram (i), amely a vizsgálandó mintát éri

$$i \approx C_s^{-2/3} \beta d^{8/3} \tag{2.2}$$

ahol

C_S – a szferikus aberrációs koefficiens,

ß – az elektronforrás fényessége [A/cm^2 szteradián] egységben,

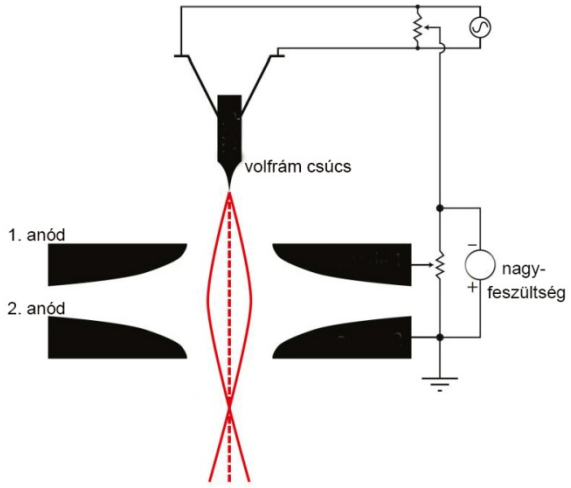
d – az elektronnyaláb átmérője.

Az elektronnyaláb átmérőjének (d) csökkentésével jelentősen csökken a nyaláb árama (i), de egy bizonyos határon túl zajos képhez vezet. Ahhoz, hogy egy kis méretű elektronnyalábban nagy elektronáramunk legyen, a (2.2) képletnek megfelelően nagy forrásfényességre (β) van szükség. A fényességdefiníció szerint az egységnyi térszögre vonatkoztatott áramsűrűség:

$$\beta = \frac{áram / felület}{térszög} = \frac{4i}{\pi^2 d^2 \alpha^2} \left[A / cm^2 sr \right] \tag{2.3.}$$

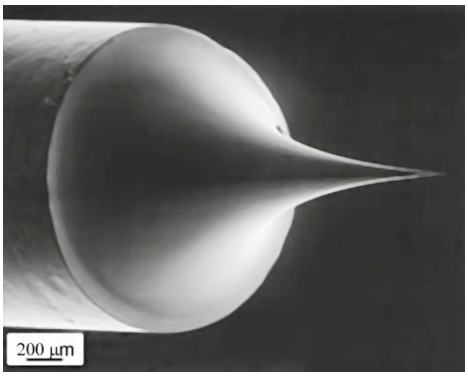
– Téremissziós ágyú

A téremissziós ágyú (FEG, Field Emission Gun) sémáját a 2.6. ábra mutatja.



2.6. ábra. Téremissziós ágyú

A modern elektronmikroszkópok tűszerűen kiképzett, téremissziós, ún. pontkatóddal működnek.

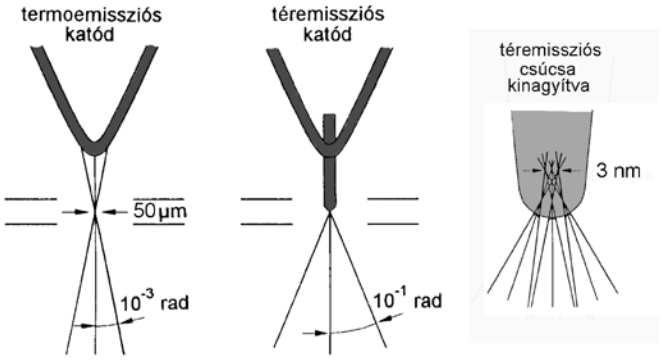


2.7. ábra. A 2.6. ábrán mutatott téremissziós volfrámcsúcs elektronmikroszkópos képe (WILLIAMS és CARTER 1996)

A pontkatódokból nagy elektromos térerővel (>10^7 V/cm) „szippantják” ki az elektronokat. Fényességük sokkal nagyobb, mint a termoemissziós volfrám vagy a LaB_6 katódoké. A szobahőmérsékleten működő pontkatódokat hideg téremissziós katódoknak, a magasabb hőmérsékletűeket pedig termikus téremissziós katódoknak nevezzük. A termikus téremissziónál az erős (3-6 kV) elektromos kiszívó tér mellett még a katód hőmérsékletének megemelésével (~1600 K) is rásegítenek az elektronemisszióra. Ez utóbbi katódfajtát meg kell különböztetnünk a Schottky-emitterektől (ZrO-dal bevont volfrám), amelyeknél szintén van erős elektromos tér és megemelt hőmérséklet is. A ZrO a volfrám kilépési munkájának csökkentésére szolgál.

A Schottky-emitter nagyobb elektronáramot szolgáltat, mint a hideg téremissziós ágyú, ezért analitikai mikroszkópokhoz kedvezőbb. Viszont a megemelt hőmérséklet miatt az elektronok

energiakiszélesedése kromatikus aberrációt okoz, ezért nagy felbontású leképezésre nem olyan jó, mint a hideg téremissziós katód.



2.8. ábra. A virtuális forrás az ún. crossover mérete a termikus és a téremissziós katódnál 50 µm illetve 3 nm. A téremissziós katódnál a crossover a katód csúcsán belül van.

Az elektronágyúk kritikus paraméterei a fényesség, időbeli és térbeli koherencia, energiakiszélesedés és stabilitás.

2.2. táblázat. Az elektronmikroszkópiában használatos katódok összehasonlítása

	Termikus volfrám	LaB_6	Hideg téremissziós	Termikus téremissziós	Schottky-emitter
Fényesség [A/cm^2 sr]	10^6	10^7	10^9	10^8	10^8
Crossover átmérő	50 µm	10 µm	<5 nm	<5 nm	15-30 nm
Energiaszórás [eV]	1-2	1-2	0,25-0,4	1	0,6-0,8
Élettartam [óra]	50-100	1000	>10 000	>4000	>4000
Vákuum [Pa]	10^{-3}	10^{-5}	10^{-8}-10^{-10}	10^{-8}	10^{-8}

Az időbeli és térbeli koherencia szorul magyarázatra. Az időbeli koherencia azt jelenti, hogy a sugarak fáziskülönbsége állandó a sugárzás terjedési irányában. Egyszerűbben: az időben koherens elektronok azonos sebességgel mozognak. Ezért a sugárzás amplitúdóját és fázisát egy adott helyre vonatkozóan bármelyik időpontban előre meg lehet jósolni. A térbeli koherencia viszont azt jelenti, hogy egy adott időpontra vonatkozóan a sugárzás amplitúdója és fázisa bármelyik helyen (nem csak a terjedés irányába) megjósolható. A térben koherens sugarak párhuzamosak.

A forrás energiakiszélesedése vagy más néven energiaszórása azt okozza, hogy a lencsék a különböző energiájú elektronokat különböző helyre fókuszálják. Minél nagyobb a forrásból jövő elektronok energiaszélessége, annál nagyobb a színi hiba vagy más néven kromatikus aberráció.

A táblázatban megadott vákuum abban játszik szerepet, hogy rosszabb vákuumban a katód hamarabb elszennyeződik, és emissziója lecsökken.

A táblázatból látható, hogy a téremissziós katódok (ideértve a Schottky-emittereket is) jobbak, mint a termikus volfrám vagy a lantánhexaborid katód az ágyú fényessége, crossoverméret, és energia-kiszélesedés szempontjából. (Az áruk viszont sokkal magasabb.) Bár a táblázatból nem látható, de az időbeli és térbeli koherenciát illetően is a hidegkatódos FEG a legjobb.

II.1.3. Az elektronmikroszkóp lencséi

Az elektronok fókuszálására mind mágneses, mind pedig elektrosztatikus lencsék alkalmasak. A modern elektronmikroszkópokban az esetek túlnyomó részében mágneses lencséket alkalmaznak, mert kisebbek a lencsehibák, és nincs szükség nagyfeszültségű szigetelésre. Az elektronoptikai oszlop rendszerint egy kétlencsés kondenzorból és egy objektívből áll. (A krio-EM-nél látunk majd háromlencsés kondenzorokat is.) A kondenzor feladata, hogy a 2.5. ábrán megjelölt minimális nyalábátmérőt, a crossovert lekicsinyítse, az objektívé pedig az, hogy a nyalábot a minta felületére fókuszálja. Az összes lencse közül az objektívlencse tulajdonságai a leginkább meghatározóak a képminőség szempontjából. A vizsgálandó minta az objektívlencsén belül helyezkedik el, miként az a 2.4. b/ ábrán látható. A minta alatti közbülső és projektorlencsék az objektív által előállított képet nagyítják tovább.

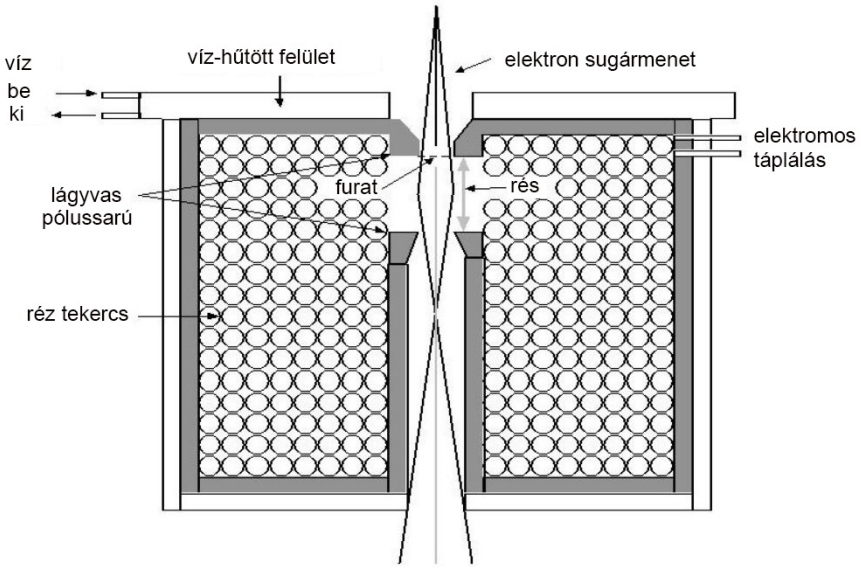
Az elektronra elektromos és mágneses térben ható Lorentz-erőt (**F**) a következő egyenlet írja le:

$$\mathbf{F} = -e\left(\mathbf{E} + \mathbf{v}x\mathbf{B}\right) \tag{2.4}$$

ahol **e** – az elektron töltése, **E** – az elektromos térerősség,
v – az elektron sebessége, **B** – a mágneses indukció.

Az elektron töltését kivéve a többi vektormennyiség, a **v** és **B** szorzata vektoriális szorzat.

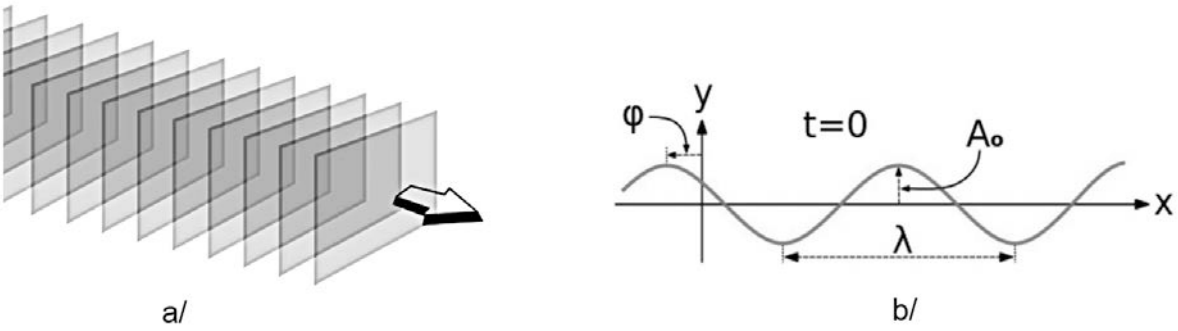
Az **E** értéke nulla, mert a mikroszkóposzlop elektromosan vezető részei földpotenciálra vannak kötve. Az elektronok a mikroszkópon belül csavarvonalú (spirális) pályán haladnak a hengerszimmetrikus mágneses térben a minta felé. Az elektronoptika elemeinek leírását megtaláljuk pl. Simonyi Károly Elektronfizika című tankönyvében (SIMONYI 1981).



2.9. ábra. Elektromágneses lencse keresztmetszete.

A 2.9. ábrán egy mágneses lencse metszeti képe látható. Az árammal átfolyt réztekercset lágyvasburkolat veszi körbe, és a tekercsből kijövő mágneses tér a vasban lévő, körgyűrű alakú résre koncentrálódik. Minthogy a réztekercsben folyó áram hőt termel, a lencséket vízhűtéssel kell ellátni.

Az elektronok kettős természetűek: egyszer részecskeként, máskor hullámként kezelhetők. Tárgyalásainkban az elektronokat síkhullám-közelítésben fogjuk vizsgálni (2.10. a/ ábra), amelyeket matematikailag szinusz- vagy koszinuszhullámokkal írunk le (2.10. b/ ábra)



2.10. ábra. a/ Az elektronok terjedése síkhullámok formájában és matematikai leírásuk b/

A hullám nagysága x távolságban és t időpontban A(x,t)

$$A(x,t) = A_o \cos(kx - \omega t + \varphi) \tag{2.5}$$

ahol

A_o – a hullám (maximális) amplitúdója,

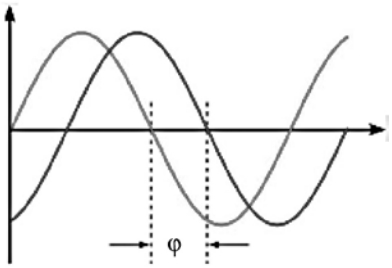
x – a terjedés iránya,

k – a hullámszám, radiánban mérve $k=2\pi/\lambda$,

λ – a hullámhossz,

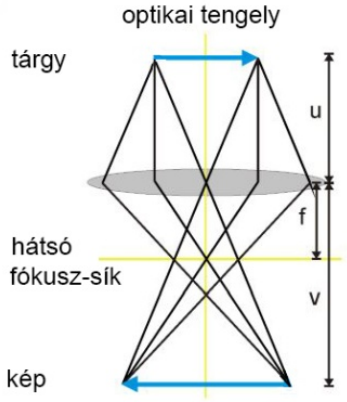
ω – körfrekvencia, $\omega=2\pi/T$, ahol T a hullám periódus ideje,

φ – a hullám fáziseltolódása a t=0 időpillanatban, radiánban kifejezve. A 2.10. ábra szerint a t=0 pontban a pozitív fáziseltolódás a bal oldal irányába való eltolódást jelenti.
Minket a későbbiekben a relatív fáziseltolódás fog érdekelni: azaz hogy a mintán rugalmasan szórt elektronhullám milyen fáziseltolódást szenved a szórás nélkül áthaladt elektronhullámhoz képest.



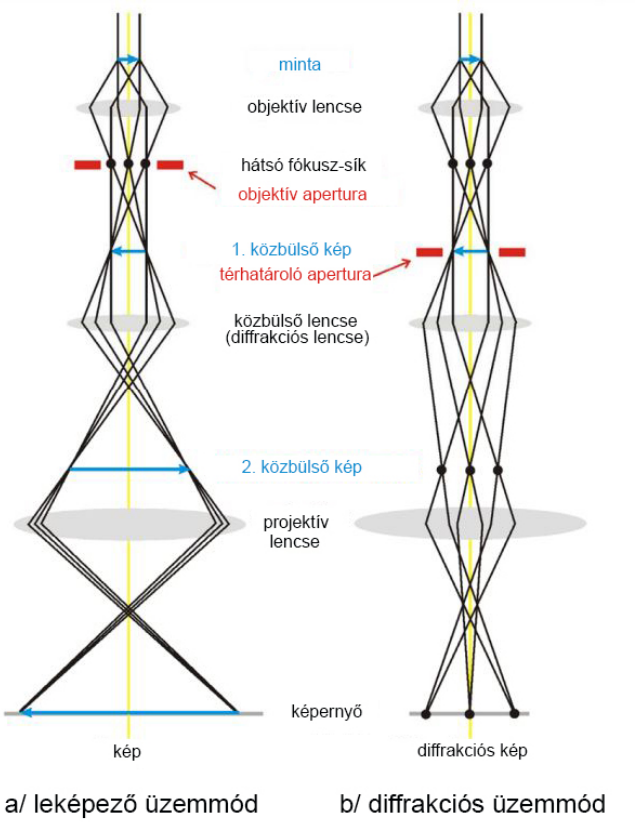
2.11. ábra. Fáziseltolódás két hullám között

A sugármenetet a fényoptikából ismert módon lehet megszerkeszteni (2.12. ábra)



2.12. ábra. A lencsetörvényhez

A 2.12. ábrán az optikai tengellyel párhuzamosan beeső sugarak a lencse után a fókuszponton mennek keresztül. Másrészt a ferdén beeső és a lencse középpontján átmenő sugarak törés nélkül haladnak tovább. A lencse mögött fordított állású valós kép jön létre.
Mint említettük, az objektívlencsét követő lencsék beállításától függ, hogy a képernyőre a minta képe vagy diffrakciós képe jut. (2.13. ábra)



2.13. ábra. Sugármenet a transzmissziós elektronmikroszkópban a/ leképező és b/ diffrakciós üzemmódban.

Miként a fényoptikában, az elektronoptikában is érvényes a következő törvény:

$$\frac{1}{u}+\frac{1}{v}=\frac{1}{f} \tag{2.6}$$

ahol u – a tárgytávolság, v – a képtávolság és f – a lencse fókusztávolsága. A nagyítás M, a képtávolság és tárgytávolság hányadosa:

$$M = v/u \tag{2.7}$$

A 2.13. ábrán végigkísérhetjük a kép, illetve a diffrakciós kép létrejöttét.

A diffrakciós kép az objektívlencse hátsó fókuszsíkjában nem más, mint a minta Fourier-transzformáltja: az objektívlencse egy Fourier-transzformációt végez. A valódi kép pedig a diffrakciós kép inverz Fourier-transzformáltja. A könyvben mindvégig fontos szerepet fog játszani a Fourier-transzformáció. (A Fourier-transzformációról részletek a II.5. és II.8. pontokban.)

II.1.4. Lencsehibák

Az elektronlencsék és fényoptikai lencsék viselkedése között sok hasonlóság van. Így a fényoptikában megismert lencsehibák az elektronoptikában szintén megtalálhatók.

A szakirodalom mintegy tízféle lencsehibát tart számon, de a transzmissziós elektronmikroszkópiában három lencsehiba játszik fontos szerepet. Ezek a szferikus aberráció (vagy gömbi eltérés), a kromatikus aberráció (vagy színi hiba) és az asztigmatizmus. A zárójelben megadott elnevezéseket használjuk ritkábban. Magyarázatukhoz a 2.14. ábra nyújt segítséget.

A felsorolt hibák azt okozzák, hogy egy pont képe nem pont lesz, hanem egy olyan d méretű kör, nevezzük konfúziós körnek, amelynek átmérőjét egy bizonyos határon túl nem tudjuk csökkenteni.

a/ Szferikus aberráció

Az okozza ezt a fajta hibát, hogy a fókusztávolság rövidebb az optikai tengelytől távolabb beeső sugarakra, mint az optikai tengelyhez közelebb beeső sugarakra. Más szavakkal kifejezve, a lencse külső széle erősebben töri a sugarakat, mint a közepe. A 2.14. a/ ábrán látható legkisebb nyalábátmérő ds

$$d_s = C_s \alpha^3 \tag{2.8}$$

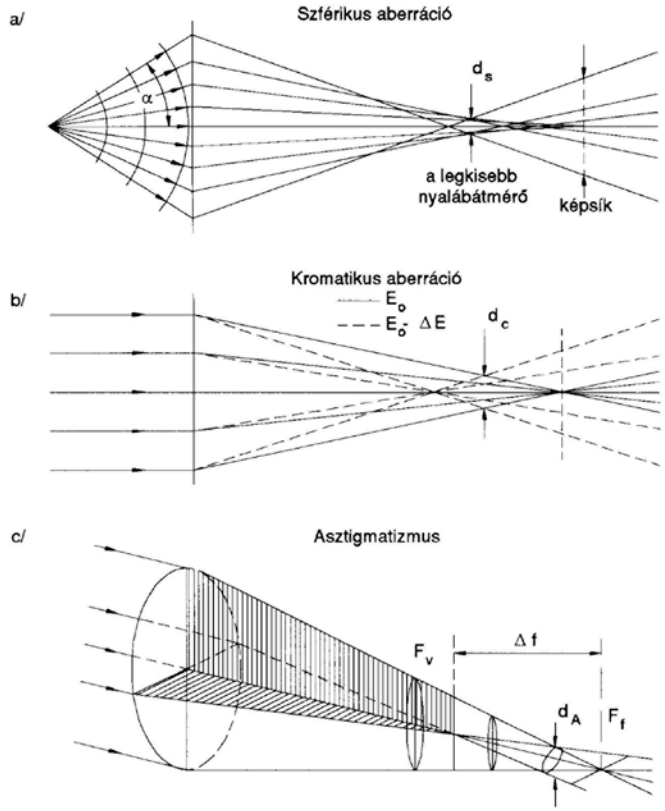
ahol

C_s – a szferikus aberrációs koefficiens,

α – az objektív blende nyílásszöge.

A minta felszínén a nyalábátmérő a (2.8) képletben megadott érték kétszerese.

A transzmissziós elektronmikroszkópiában a felbontást leginkább korlátozó tényező a szferikus aberráció. A TEM-ben használt objektívlencsék szferikus aberrációs koefficiense (C_s) 1-2 mm, amit a mikroszkópot gyártó cég megad. A nagy felbontású elektronmikroszkópoknál C_s kisebb mint 1 mm. A szferikus aberráció csökkentésének egyik lehetősége kisebb blendék alkalmazása, mert a szferikus aberráció az α szög harmadik hatványával arányos. A másik lehetőség korrektorok alkalmazása, ami a mikroszkóp árát jelentősen megnöveli. A szferikus aberrációnak a korrigálása hozta el a nagy felbontású elektronmikroszkópia korszakát.



2.14. ábra. Lencsehibák (REIMER 1993)

b/ Kromatikus aberráció

A kromatikus aberráció vagy színi hiba (2.14. b/ ábra) onnan ered, hogy a besugárzó elektronáram nem tökéletesen monokromatikus. A katódok tárgyalásánál utaltunk arra (energiaszórás a 2.2 táblázatban), hogy a katód típusától függően a katódot elhagyó elektronáramnak van egy természetes energiakiszélesedése. Ez az energiakiszélesedés, továbbá a nagyfeszültségben és a lencseáramokban meglévő instabilitások vezetnek a kromatikus aberrációhoz. A kisebb energiájú sugarak erősebben törnek meg, mint a nagyobb energiájúak. A 2.14. b/ ábra szerinti minimális nyalábátmérő d_C

$$d_c = C_c \frac{\Delta E}{E_0} \alpha \qquad (2.9)$$

ahol C_C – a kromatikus aberrációs koefficiens,

ΔE – az elektron energiájának ingadozása az E_0 energia körül.

A felsorolt okok ellenére sem lenne túl nagy a kromatikus hiba, de a mintában végbemenő elektronszórás jelentősen megnöveli, akár 15-20 eV-ra. Minél vastagabb a minta, annál nagyobb az energiaveszteség, illetve elektronszórás a mintában. Ezért a kromatikus hiba ellen úgy védekeznek, hogy nagyon vékony mintákkal dolgoznak. Az energiaszűrő

mikroszkópokban (EFTEM, Energy Filtering Transmission Electron Microscope), amelyekben nagyon szűk energiatartományt lehet kiválasztani, pl. a veszteség nélküli (zero-loss) elektronokat használják a leképezésre. Az energiaszűrés jelentősen javítja a képek vagy a diffrakciós képek minőségét.

c/ Asztigmatizmus

Az asztigmatizmus (vagy más néven asztigmia) oka az, hogy a lencsék nem tökéletesen forgásszimmetrikusak. Ha az emberi szemlencsének van ilyen jellegű hibája, akkor a szemorvos cilinderes szemüveget rendel. Az elektronoptikában a pólussaru anyagának mágneses inhomogenitásai vagy a mechanikai megmunkálásból adódó pontatlanságok, végül az optikai oszlop elszennyeződése következtében fellépő elektromos feltöltődés okozhatják. Az asztigmatizmus abban nyilvánul meg, hogy a lencse két egymásra merőleges fókuszsíkjában a fókusztávolságok nem egyenlők. (2.14. c/ ábra. A vízszintes síkban haladó sugarak fókusza F_V, a függőlegesek síkban haladóké F_f-fel jelölve az ábrán.) Asztigmiás képet mutatunk a 2.17. ábrán. Az asztigmatizmus korrekciójára sztigmátorok vannak az elektronmikroszkópba beépítve, amint az a 2.4. b/ ábrán látható.

A 2.14. c/ ábra szerinti legkisebb nyalábátmérő d_A

$$d_A = \Delta f \ \alpha \qquad (2.10.)$$

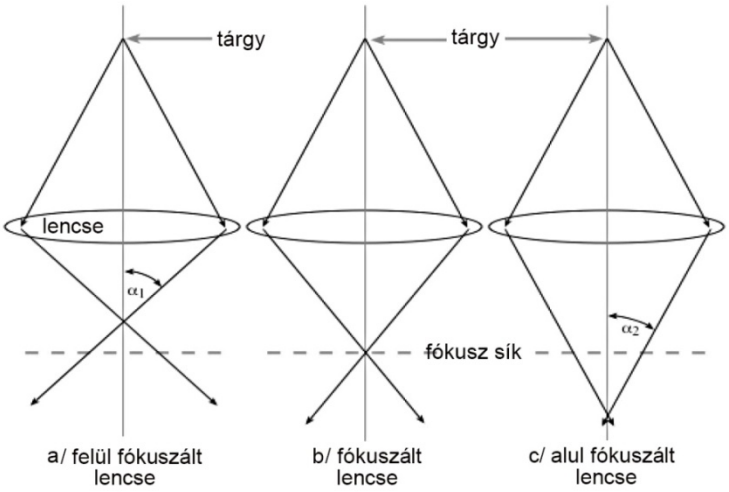
ahol Δf – a fókusztávolságokban megmutatkozó különbség.

A lencsehibák és lencse által előállított mágneses tér nagysága között is van kapcsolat. Minél nagyobb a lencsében folyó áram, és ezáltal a mágneses tér, annál kisebb a fókusztávolság, és annál kisebbek a lencsehibák (C_s szferikus aberrációs koefficiens, C_c kromatikus aberrációs koefficiens).

Az elektronmikroszkóp mágneses lencséit rossz leképezőnek tartják a szakemberek. A rossz minőség szemléltetésére Russo egy előadásában a helyzetet ahhoz hasonlította, mintha egy tárgyat (adott esetben egy kutyát) üvegpoháron keresztül fényképeznénk le (2.15. ábra). Hasonló negatív véleménnyel találkozunk a Williams és Carter Transmission Electron Microscopy című kiváló kézikönyvében is. Szerencsére vannak eszközök a leképezési hibák korrekciójára.

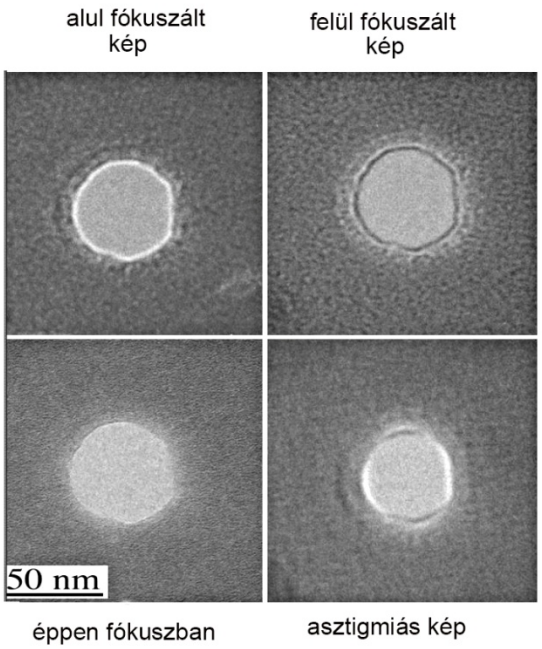


2.15. ábra. Kutya fényképe üvegpoháron keresztül. Ehhez hasonlítható az elektronmikroszkóp leképezésének tökéletlensége (RUSSO 2017)



2.16. ábra. Lencsék alul- és felülfókuszálása

Az elektronmikroszkóp mágneses lencséinek áramát gombok segítségével változtathatjuk. A 2.16. ábrán a fókuszsík ott van, ahol a minta párhuzamos megvilágítása esetén a sugarak kereszteződnek. Ha egy lencse áramát a fókuszált beállításnál nagyobbra vesszük, akkor a lencse erősebben töri a sugarat, a fókuszsík felett lesz a nyalábkereszteződési pont (beam cross-over) (2.16. a/ ábra), és ekkor felülfókuszált lencséről beszélünk. Ellenkező esetben alulfókuszált a lencse (2.16. c/ ábra). A második kondenzorlencsét felülfókuszáljuk a párhuzamos megvilágító sugár előállításához.



2.17. ábra. Alul- és felülfókuszált kép

Sokszor kerül említésre a továbbiakban az alulfókuszált kép. Ennek magyarázatára a 2.17. ábra kapcsán térünk ki. Az elektronmikroszkópon általában „Focus” felirattal van ellátva az a gomb, amivel az objektívlencse áramát szabályozhatjuk. Feltételezve, hogy a mintánkat párhuzamosan világítjuk meg, a fókuszban lévő képet a minimális kontrasztról ismerjük fel. Ehhez a teszthez szokás egy lyukas szénhártyát tenni a mintatartóba (ha az éppen vizsgálandó mintában nem lennének lyukak), és néhány százezerszeres nagyítást alkalmazni. Amikor a fókuszált beállításnál kisebb lencseáramot alkalmazunk, akkor kapjuk a 2.17. ábra bal felső sarkában látható képet. A mintában lévő lyuk belsejét egy világos, ún. Fresnel-gyűrű veszi körül. Az ilyen képet nevezzük alulfókuszáltnak. Túl nagy objektívlencse-áramnál sötét színű Fresnel-gyűrű lép fel (felülfókuszált kép). Az ábra jobb alsó sarkában egy asztigmiás kép látható: a kis lyuk egyik fele alul-, a másik fele felülfókuszált. Az objektívsztigmátorral elérhető, hogy az említett aszimmetria eltűnjön.

Egy jó felbontású kép előállításához kissé alulfókuszált képet állítanak elő. Ennek az alulfókuszálásnak az optimumát Scherzer-defókusznak (Δf_{Sch}) nevezzük, az alábbi formula megalkotójáról:

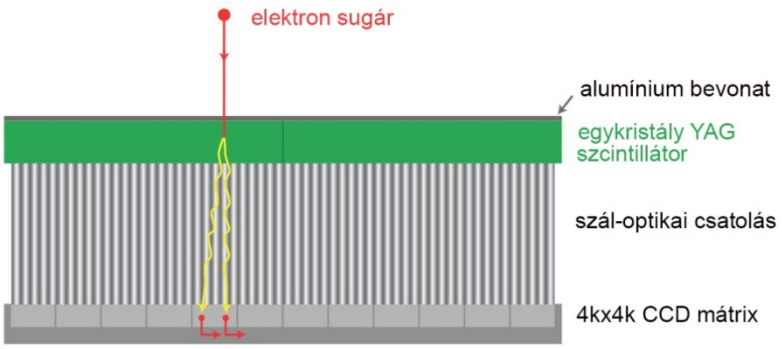
$$\Delta f_{Sch} = -1{,}2(C_s\lambda)^{1/2} \tag{2.11}$$

A legnagyobb felbontást a fenti képletnek megfelelő defókuszáláskor érjük el (viszont ekkor a legkisebb a kontraszt).

A defókuszálásnak jó hasznát vesszük a krio-elektronmikroszkópiában az ún. kontrasztátviteli függvény zéruspontjainak megváltoztatásában.

II.1.5. Detektorok

A TEM-ben detektálásra ezüsthalogeniddel bevont filmet, képlemezt (image plate) vagy szcintillátor alapú CCD kamerát használnak (CCD – Charge-Coupled Device, töltéscsatolt eszköz). A CCD kamerában a beérkező elektronokat egy szcintillátor (többnyire YAG, yttrium-aluminium-gránát) először fénnyé konvertálja, majd a fényt a CCD detektor



2.18. ábra. Az elektronmikroszkópiában használt CCD kamerában az elektron fénnyé, majd vissza elektronná konvertálódik.

elektronokká visszakonvertálja (2.18. ábra). 2012-2013-tól kezdve egy új detektortípus, az ún. direkt elektrondetektorok jelentős előrelépést hoztak, mert közvetlenül detektálják az elektronokat a fénnyé való átalakítás nélkül. (III.2. fejezet).

A detektorokat többek között a detektálási kvantum hatásfokkal (DQE, Detective Quantum Efficiency) szokás jellemezni, amely a detektor által adott kép jel/zaj viszonyát (S/N, signal/noise) hasonlítja össze a detektorba bemenő jel jel/zaj viszonyával:

$$DQE = \frac{\left(S/N\right)^2_{ki}}{\left(S/N\right)^2_{be}} \tag{2.12}$$

A tökéletes detektor hatásfoka 1. A valóságban DQE ennél kisebb; a relatíve nagyobb DQE jobb minőségű képet jelent.

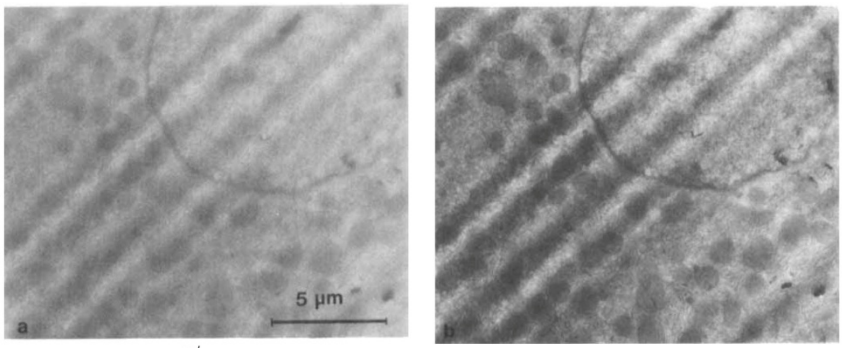
A filmek detektálási kvantum hatásfoka viszonylag magas a CCD kamerához képest, továbbá a felhasználható képpontok (pixel) száma is nagyobb, mint a CCD kameráké. Kezdetben a krio-EM szerkezetmeghatározások film segítségével történtek (GRIGORIEFF 2011, RUSKIN 2013).

A filmek hátránya a CCD kamerához képest, hogy az eredményt nem lehet azonnal látni, a képet elő kell hívni. Nem digitálisak, ezért nem automatizálható az adatgyűjtés filmek használatakor, és nem lehet velük a mintamozgás miatti képelmosódást korrigálni. A CCD kamerák az automatizálhatóság előnyét hozták. A CCD kamerákat követő direkt elektrondetektorok minden tekintetben felülmúlják a filmeket és a CCD detektorokat. Óvatosaknak kell lennünk egy-egy detektor értékelésekor, mert tulajdonságaik függnek attól, hogy milyen gyorsítófeszültségen dolgozunk a mikroszkóppal. 300 kV-on a direkt elektrondetektorok előnye egyértelmű, 100 kV-on a CCD kamerák egyelőre még előnyben vannak.

II.1.6. Az elektronok energiaszűrése

A nagy felbontású krio-EM a fáziskontraszton alapul, amelyet a nem szórt és a rugalmasan szórt elektronnyaláb szuperpozíciója hoz létre. Az amplitúdókontrasztot azok az elektronok okozzák, amelyek az objektívapertúra nyílásán kívülre szóródnak. A rugalmatlanul szóródó elektronok az amplitúdókontraszthoz járulnak hozzá, és nem a fáziskontraszthoz. A rugalmatlanul szórt elektronok nagy szolgálatot tesznek az elektronmikroszkópos analitikában, pl. az elektronsugaras mikroanalízisben és az elektronenergia-veszteségi spektrometriában.

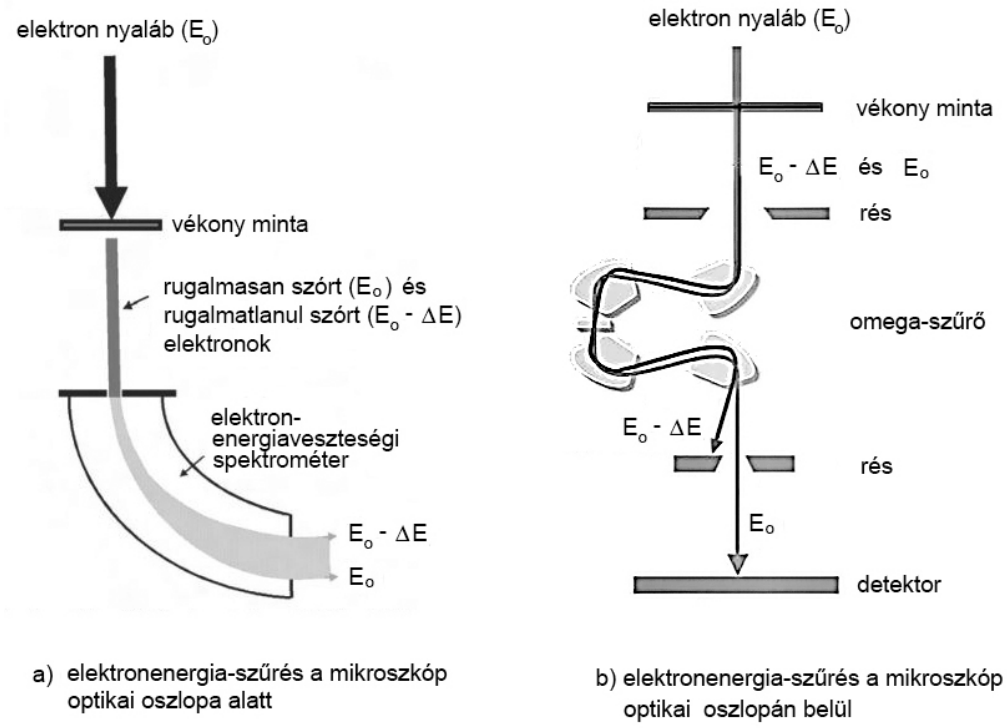
Kívánatos az energiaveszteséggel szóródott elektronokat kiszűrni a képalkotásból a jobb képminőség érdekében. (2.19. ábra)



2.19. ábra. a/ Nem szűrt kép: rugalmasan és rugalmatlanul szórt elektronokkal készült. b/ Szűrt kép: rugalmasan (energiaveszteség nélkül) szórt elektronokkal készült kép. (A minta májmetszet, ozmium-tetroxid-fixálás és uranil-acetát-festés után) (REIMER 1991)

Az energiaveszteség nélkül szóródott elektronokkal készült képet az angol nyelvű szakirodalom zero-loss image-nek nevezi.

Az elektronok energiájának szűrésére különféle energiaveszteségi spektrométereket használnak. Itt most két olyan spektrométert mutatunk be, amelyeket krio-EM-ekben is alkalmaznak. Az egyik egy 90°-os eltérítésű mágneses prizma, amelyet az elektronmikroszkóp alatt helyeznek el. A kereskedelmi forgalomban elterjedt változatát a gyártó cég neve után Gatan Image Filternek (GIF) neveznek (2.20 a/ ábra). A másik szintén mágneses eltérítéssel működik (2.20. b/ ábra), de a mikroszkóp oszlopon belül van elhelyezve. Négy mágnes az átmenő elektronnyalábot a görög Ω betűhöz hasonló pályára hajlítja meg, innen az ómegaszűrő elnevezés.



2.20. ábra. Két mágneses típusú elektronenergia-szűrő spektrométer

A GIF elektronenergia-veszteségi spektrométer elhelyezését a Thermo Fisher Scientific cég Titan Krios1 mikroszkópján később mutatjuk be (3.1.ábra).

A JEOL cég a CRYO ARM 300 mikroszkópjában ómegaszűrőt használ.

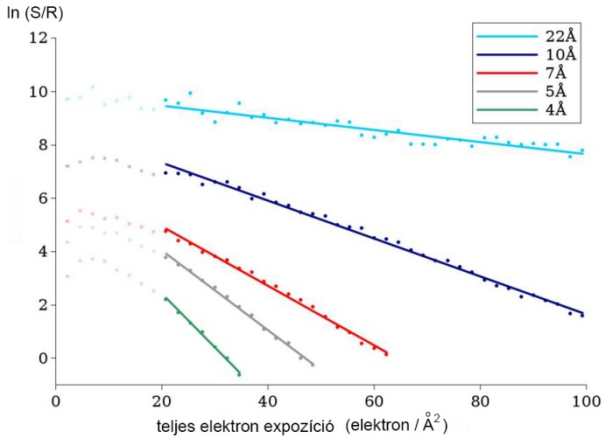
A két típusú mágneses elektronspektrométerről és az elektronenergia-veszteségi spektrometriáról részletes leírást találhatunk magyar nyelven is (POZSGAI 1996).

II.2. Elektronok okozta sugárkárosodás

A dózis – terminológiailag helyes értelmezésben – a vizsgált minta egységnyi súlyában vagy egységnyi térfogatában abszorbeált energiát jelenti. Ezzel szemben az elektronmikroszkópos irodalomban dózis vagy elektrondózis alatt az áramsűrűség és az exponálási idő szorzatát értik, és elektronexpozíciónak nevezik. Ezt a mennyiséget elektronszám/Å^2 (vagy elektronszám/nm^2)

egységekben mérik. A „dózis” kifejezés az elektronexpozícióra egy elektronmikroszkópos szakzsargon. (Az angol nyelvű szakirodalomban electron dose, electron exposure és fluence néven említik.) Viszont az abszorbeált dózis energia/tömeget jelent és eV/g egységekben mérik. Az abszorbeált dózis és elektronexpozíció közötti átszámításra nem térünk ki, minthogy nem lesz rá szükségünk.

Az áramsűrűség mérése történhet Faraday-kalitkával a minta síkjában. (A kalitka egy alul zárt kis henger, felül fémlappal befedve, amelynek közepén kis lyuk található. A henger kis rendszámú anyaggal, pl. szénnel van bélelve. A Faraday-kalitka ilyen formájú kiképzése a visszaszórt elektronok számának minimálisra csökkentését szolgálja.) Az áramsűrűség mérhető képernyő síkjában is Faraday-kalitka nélkül. Ekkor a mért érték függ a gyorsítófeszültségtől és a nagyítás értékétől is, ezért Faraday-kalitkás méréssel végeznek korrekciókat a képernyő síkjában mért értékekre.



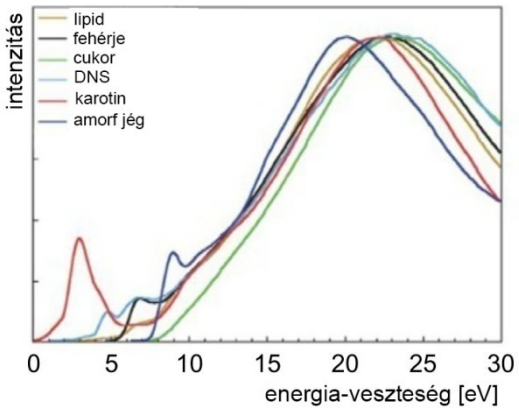
2.2.1. ábra. A kép jel/zaj (S/N) viszonyának függése az expozíciótól és a felbontástól 300 kV-os gyorsítófeszültségen (GRANT 2015)

A 2.2.1. ábra azt szemlélteti, hogy jobb jel/zaj viszony (S/N) rosszabb felbontással jár együtt (a felbontásértékek a kis négyzetben láthatók). A rosszabb felbontáshoz tartozó egyenesek magasabban helyezkednek el az ábrán. A képek készítésekor az áramsűrűség a nagyítás növelésével négyzetesen nő. Ezzel magyarázható, hogy miért okoz súlyosabb problémát a sugárkárosodás nagy nagyításoknál.

A méréspontokat direkt elektrondetektorokkal ún. moziüzemmódban vették fel (III.2. fejezet), amikor a videófelvételek egyes képkockáit külön-külön hasznosítani lehet. A teljes dózis a képkockánkénti dózis összegzéséből adódik. A függőleges tengelyen a jel/zaj viszonyának logaritmusát ábrázolják, így a változások vizuálisan kisebbnek tűnnek, mint a lineáris ábrázolásban. (A 2.2.1. ábrán látható egyenesek exponenciális lecsengést jelentenek.)

Az egyenesek dőlésszöge modellezi a minták sugárkárosodását, hiszen a sugárkárosodás miatt következik be a jel/zaj viszony romlása. Továbbá az is látható, hogy a nagyobb felbontáskor (alsó zöld görbe) csak kisebb teljes dózist engedhetünk meg. Megnőtt a sugárkárosodás sebessége, ami abból látható, hogy a zöld görbe meredeksége nagyobb, mint a kéké. (Amikor új terepre vitték a nyalábot, akkor a kép bemozdulása erősebb volt, ezeket halvány pontok jelölik az ábrán, és kihagyták a kiértékelésből.)

Az elektronok sugárkárosító hatásánál azt kell figyelembe venni, hogy egy elektron akár 100 eV energiát is veszíthet a mintával való kölcsönhatásban. Ezt elektronenergia-veszteségi spektrumokból lehet tudni, mert a sugárkárosító hatással összefüggő ún. plazmoncsúcs kb. 100 eV-ig terjed. Az említett spektrumoknak csak a kis energiás részét mutatjuk, minthogy ezen spektrumok maximuma 20-25 eV körül van.



...

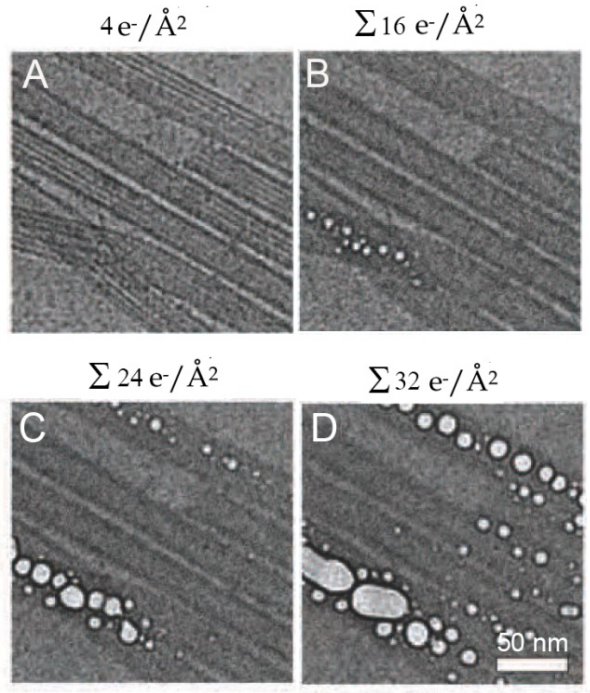
2.2.2. ábra. Néhány anyag elektronenergia-veszteségi spektrumának kis energiájú részlete. (GLAESER 2016)

Ha az átlagos energiaveszteséget (20 eV) vesszük figyelembe, ez akkor is sokkal nagyobb, mint a fehérjékben lévő kovalens kötések (H-C, C-C, vagy a C=C kötés) energiája. (Erről könnyen meggyőződhetünk, ha átszámoljuk a Wikipedia Chemical bond címszó alatt kJ/mol-ban megadott kötési energiákat eV-ra. Az átszámolásban az „Energy Unit Converter” nyújt segítséget) (http://www.colby.edu/chemistry/PChem/Hartree.html)

A sugárkárosítás hatása fagyasztva hidratált minták esetében három formában nyilvánul meg. Az elsődleges hatás az ionizáció, a kémiai kötések megbontása, szekunder elektronok kiváltása és szabad gyökök létrehozása. A másodlagos hatás abban nyilvánul meg, hogy a szekunder elektronok és a szabad gyökök mozognak a mintán belül, és lavinaszerűen újabb kémiai reakciókat okoznak. A harmadlagos hatás hidrogéngáz-buborékok létrejötte a mintán belül, amely durván tönkreteszi a mintát. Ezek a hatások az expozíció csökkentésével csökkenthetők. Az elsődleges hatás a szórási és ionizációs keresztmetszetek függvénye, független a minta hőmérsékletétől, hűtéssel nem lehet csökkenteni. A másodlagos hatás, a szabad gyökök és

szekunder elektronok mozgása, hűtéssel csökkenthető, és ezzel magyarázzák a szobahőmérsékletű és az alacsony hőmérsékletű minták közötti különbséget a sugárkárosodást illetően.

A 2.2.3. ábrán látható egy alacsony dózisú krio-EM felvétel, amely 4 $e^-/Å^2$ elektrondózissal készült. Ezután újabb felvételeket készítettek, amelyeken 4 $e^-/Å^2$-es lépésekben akkumulálódott a dózis. Mi ennek a felvételsorozatnak néhány elemét ragadtuk csak ki. Az ábra alapján levonhatjuk a következtetést, hogy 4 $e^-/Å^2$ dózis még jó, de 16 $e^-/Å^2$ már túl sok a mikrotubulusok leképezésére krio-elektronmikroszkópos környezetben.



2.2.3. ábra. Hidrogénbuborékok képződése mikrotubulusokban az akkumulált dózis függvényében. A mikrotubulusok fehérjetartalma sötét vonalként látszik, a világos háttér amorf jég. (CARLSON 2012)

Az, hogy a buborékok főként molekuláris hidrogént tartalmaznak, elektronenergia-veszteségi spektroszkópiával mutatták ki (LEAPMAN 1995). Meglepő, de az idézett szerzők számítása szerint a hidrogén nyomása a buborékokban 1000 atmoszférát is elérhet. Amikor a buborék eléri a felszínt, kipukkad, és lyukat hagy az amorf jégben.

Hogyan képződik a hidrogén a mintában? Leapman és Sun (1995) javasolták a következő mechanizmust a hidrogén képződésére. Először a víz bomlik fel az ionizáló sugárzás hatására

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$$

majd a szabad gyökök a fehérje vagy más szerves molekulákkal reakcióba léphetnek a következő módon:

$$OH^- + R - H \rightarrow RO^- + H_2$$

Míg a fehérjék dózistűrése szobahőmérsékleten kb. $2e^-/Å^2$, (SUN 2010), cseppfolyós nitrogén hőmérsékletén (77K) csaknem egy nagyságrenddel jobb, 10-20 $e^-/Å^2$ (GLASER és TAYLOR 1978). A cseppfolyós hélium hőmérsékletén (4,2 K) még egy 2-4-es faktorral javul a dózistűrés, és eléri a 40 $e^-/Å^2$-t (FUJIYOSHI 1991, KNAPEK 1982). Sajnálatos módon a cseppfolyós hélium hőmérsékletén az amorf jég sűrűsége nő, ami kontrasztcsökkenést eredményez a fehérjékhez viszonyítva, így a sugártűrésben bekövetkezett javulás hatása kiegyenlítődik. Meg kell említeni, hogy dózistűrést illetően egymásnak kissé ellentmondó eredmények találhatók az irodalomban, így ezeket kellő óvatossággal kell kezelni. Újabb cikkek (NOGALES 2015) szerint 20–40 elektron/$Å^2$ teljes expozíció a tipikus érték a biológiai makromolekulákra 300 kV-os gyorsítófeszültségen. Felső határként 50 elektron/$Å^2$ (HENDERSON 2013), illetve 60 elektron/$Å^2$ (PASSMORE 2016) található az irodalomban.

Felmerülhet még az elektronok melegítő hatása is, de fehérjékre végzett szimulációból kiderült, hogy cseppfolyósnitrogén-hőmérsékleten ez a hatás elhanyagolható, ha 50 $e^-/Å^2$-nél kisebb dózissal dolgoznak (KARUPPASAMY 2011).

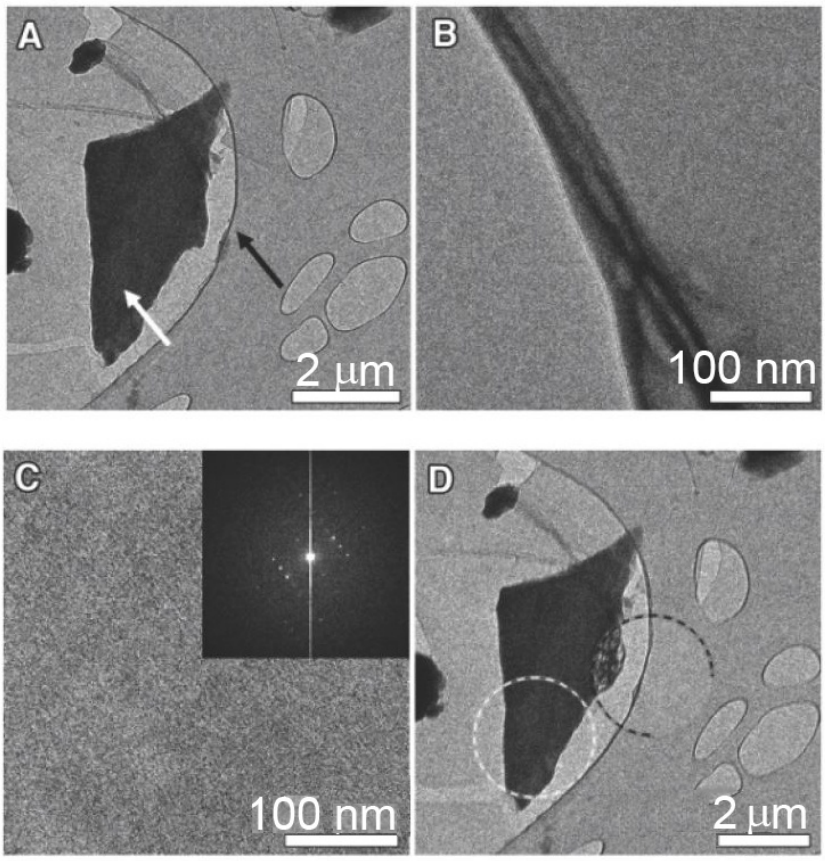
A minta hőmérsékletén kívül a minták kémiai összetétele is fontos szerepet játszik a sugárkárosodásban. Ismeretes, hogy az aromás vegyületek gyűrűszerkezete sokkal stabilabb, mint az alifás vegyületek kötései. Ez sugárkárosodás szempontjából abban nyilvánul meg, hogy az aromás vegyületből álló minták ellenállóbbak a sugárzás károsító hatásával szemben, mint az alifás vegyületek.

II.3. Alacsony dózisú elektronmikroszkópia

A modern biológiai elektronmikroszkópok fel vannak szerelve az alacsony dózisú exponáláshoz szükséges szoftverrel, hardverrel. Az alacsony dózisú mikroszkóp lehetőséget ad arra, hogy az exponálást megelőzően a lehető legkisebb elektrondózis érje a leképezendő területet. Ezt úgy valósítják meg, hogy a fókuszálás (defókuszálás) helye távol van a fényképezendő területtől. Most a JEOL mikroszkópok Minimal Dose System interfészén keresztül mutatjuk be, hogy ez hogyan történik (2.3.1. ábra).

A/ A KERESÉS (SEARCH) mód. Kis nagyítású kép a vizsgálandó terep kiválasztására. Fekete nyíl jelzi a területet, ahol fókuszálni fogunk; fehér nyíl, ahol exponálni fogunk.

B/ FÓKUSZÁLÁS mód. Nagy nagyítású kép, ahol manuálisan beállítjuk az optimális defókuszálási paramétereket.



2.3.1. ábra. Az alacsony dózisú mikroszkóp működéséhez (lásd a szövegrészt)

C/ FOTO mód. Nagy nagyítású kép kataláz kristályról, itt exponáltunk. A kép jobb felső sarkában a kép gyors Fourier-transzformáltja látható.

D/ Az A/ képnek megfelelő kis nagyítású terület. A fehér kör jelzi a fotó helyét, a fekete kör a fókuszálás helyét, beleértve a sugárkárosodást, amit a minta a fókuszálás alatt elszenvedett. A fotó helyén viszont nem látható sugárkárosodás.

A mikroszkóp elmenti a KERESÉS, FÓKUSZÁLÁS és FOTO mód lencseáramait, így az egyik módból a másikba váltás könnyen megy. Szakszerű használat esetén a mintát kb. 0,2 $e^-/Å^2$ dózis éri az exponálást megelőzően. (Utaltunk arra, hogy az áramsűrűség a nagyítás növelésével négyzetesen nő, ezért a minta kis nagyításban (KERESÉS módban) kis dózist kap.)

II.4. Biológiai minták előkészítése elektronmikroszkópos vizsgálatokra

A biológiai minták rosszul viselik az elektronmikroszkóp vákuumát. A víztartalmuk, amely kb. 80%-ot tesz ki, a vákuum hatására elpárolog (a minták dehidratálódnak). Ennek következtében szerkezetük eltorzul, alkalmatlanná válnak az elektronmikroszkópos vizsgálatra. A kézenfekvő ellenszer, a víztartalom megőrzése fagyasztással, de a fagyasztott minták vizsgálata sem bizonyult járható útnak egészen az 1980-as évekig. Ennek oka az, hogy a minták víztartalma a

fagyasztáskor kristályos jéggé változik, ami legalább úgy tönkreteszi a mintákat, mint a dehidratálás.

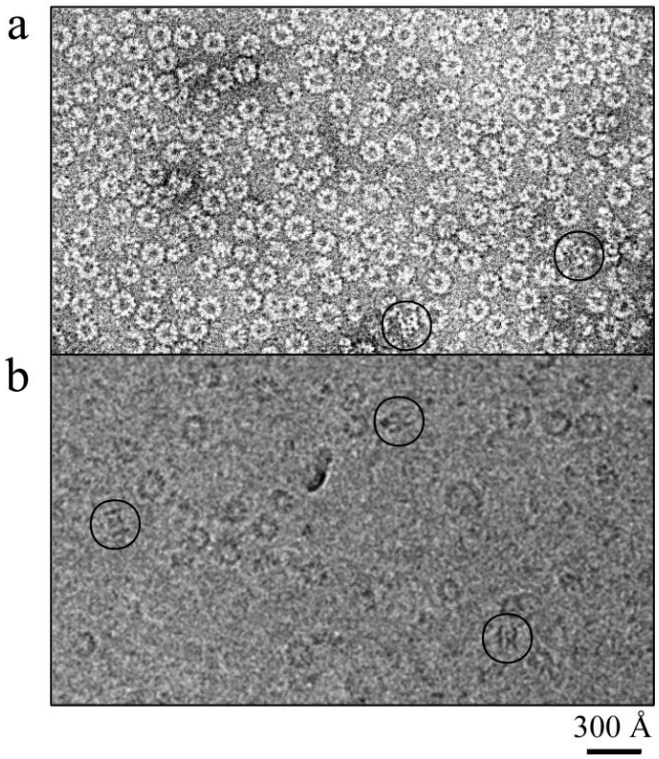
A biológiai minták alacsony rendszámú elemekből állnak, amelyek kevéssé szórják az elektronokat, ezért kis kontrasztot adnak. A minták dehidratálódása és sugárkárosodása azt eredményezte, hogy a biológiai mintáknál 15-20 Å-nél jobb felbontást nem lehetett elérni, egészen a ultragyors merítéses fagyasztás (plunge freezing) módszerének kidolgozásáig.

A konvencionális elektronmikroszkópiában a mintapreparálás első lépése a kémiai rögzítés vagy más szóval fixálás, amelynek során igyekeznek rögzíteni a minta natív állapotát a preparáció további lépéseihez. A fixálás akadályozza meg a minta bomlását, autolízisét, és rögzíti a mobil komponenseket. Ehhez gyakran használnak glutár-aldehidet, ozmium-tetroxidot vagy uranil-acetátot. A glutár-aldehid előnye, hogy megőrzi a minta finomszerkezetét, az ún. ultraszerkezetet, de a lipidekhez már ozmium-tetroxidra van szükség. Az ozmium-tetroxid és uranil-acetát előnye, hogy nagy rendszámú elemeket is tartalmaznak, amelyek az elektronokat jól szórják, ezért nemcsak fixáló, de kontrasztosító szerként is szolgálnak. A leggyakrabban alkalmazott fixálás a glutár-aldehid és ozmium-tetroxid kombinációja.

A fixált mintából vékony metszeteket készítenek gyantába való beágyazás után. A beágyazás első lépése, hogy a mintát alkalmassá teszik a folyékony gyanta befogadására. Ehhez különböző oldószerekkel lehelyettesítik a minta víztartalmát, ezt követi a gyantával való átitatás, a gyanta megkeményítése, majd a felszeletelés. A felszeletelés történhet üvegkéses mikrotómmal vagy gyémántkéses ultramikrotómmal. Az előbbi esetben ~1μm, az utóbbi esetben 50-70 nm körüli vastagságú szeleteket kapnak. A beágyazás előtt vagy után kontrasztosító anyagot adnak a mintához, ezt nevezik festésnek.

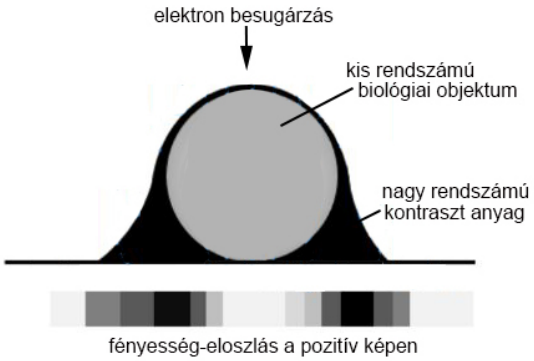
A fent vázolt folyamatokról pontos és részletes leírás található magyarul az interneten László Lajos tollából, a „Szövettani és sejtbiológiai vizsgáló módszerek” című tankönyvben (LÁSZLÓ 2012).

A krio-EM-es vizsgálatot rendszerint megelőzi egy negatív festéses vizsgálat. Egyszerű, gyors, problémamentes, nem szükséges téremissziós katódú elektronmikroszkóp, termikus volfrámkatóddal is el lehet végezni. Legfőbb előnye, hogy jó kontrasztot ad. A negatív festést követő krio-elektronmikroszkópos vizsgálatokat festés nélküli mintákon végzik! A 2.4.1. ábra a negatív festés jó kontrasztját állítja szembe a krio-EM felvétel gyenge kontrasztjával:



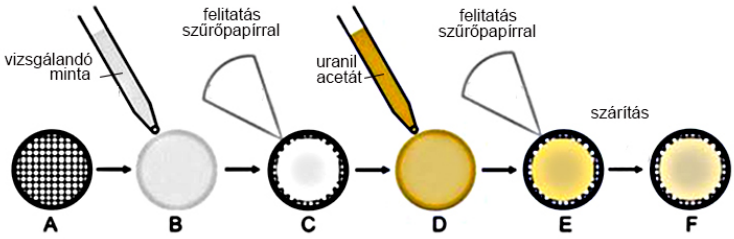
2.4.1. ábra. Rekombináns veszettségi vírus RNS-ének elektronmikroszkópos képe. a/ negatív festés, b/ festés nélküli krio-elektronmikroszkópos kép. A körökkel határolt vírusok oldalnézeti képet mutatnak (SCHOEHN 2001)

A negatívfestés-kontrasztosító eljárás a nevét onnan kapta, hogy a vizsgálandó objektumok képe világos, a háttere sötét, mint azt a filmnegatívokon látni szoktuk (2.4.2. ábra).



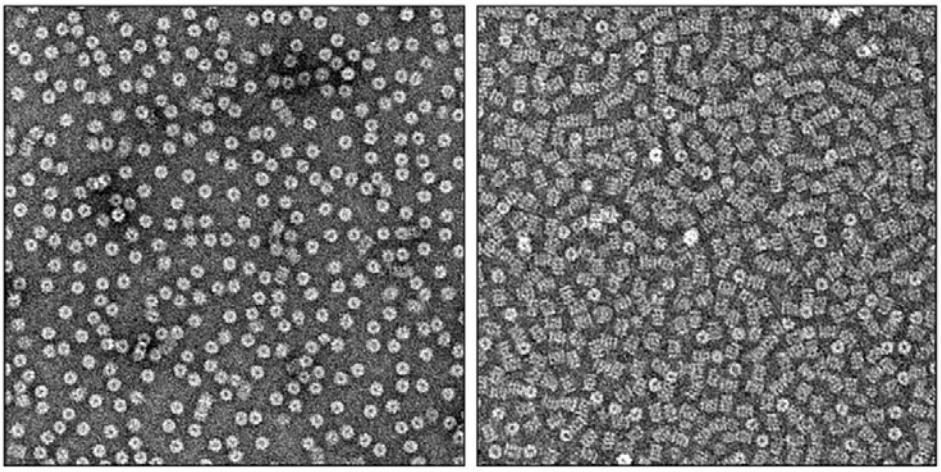
2.4.2. ábra. A negatívan festett minta kontrasztja

A pozitív festésnek nevezett eljárás nem a hátteret, hanem a vizsgálandó objektumot festi meg, ezért megvan az esély arra, hogy meg is változtatja a mintát. Negatív festéshez nehézfémsók oldatát (pl. ammónium-molibdátot vagy uranil-acetátot) kevernek össze a vizsgálandó biológiai makromolekulák (vírusok, baktériumok) szuszpenziójával, és a 2.4.3. ábrán látható módon készítik elő a mintákat.



2.4.3. ábra. Negatív festés uranil-acetáttal.
A/ Formvar hártyával bevont rézrostély. B/ Minta hozzáadása, C/ Felitatás szűrőpapírral, D/ Uranil-acetát hozzáadása, E/ Felitatás szűrőpapírral, F/ Szárítás

A negatív festésű felvételekből sok információ nyerhető a képek jó kontrasztja miatt. Hátrány viszont, hogy a festék beszáradásakor a vizsgálandó minta elveszti hidrátburkát, így deformálódik. Ez kis felbontás esetén nem túlságosan zavaró, de kb. 15 Å-nál jobb felbontás negatív festéssel nem érhető el. A nagy felbontású 3D rekonstrukcióhoz festés nélküli krio-EM felvételek szükségesek. A kiindulási (később finomítandó) 3D modell megalkotásához viszont igénybe vehetik a negatív festést, tekintettel arra, hogy a szemcsék orientációját a kis felbontású mintakontúrok határozzák meg.
A 2.4.4. ábra jól mutatja, hogy negatív festéskor a részecskék rendszerint egy kitüntetett orientációban fekszenek fel a hordozóra, és ezt az orientációt a vizsgáló befolyásolni tudja.



2.4.4. ábra. Humán 20S proteaszóma-komplex negatív festésű elektronmikroszkópos képei. A két különböző orientációt a szén hordozó felületi töltésének megváltoztatásával lehetett elérni. A bal oldali képen a szén hordozó kezelését gázkisüléses, kevés levegőt tartalmazó vákuumban végezték, a jobb oldali képen pentilamingőzt eresztettek be a gázkisüléshez. (MORRIS 2017)

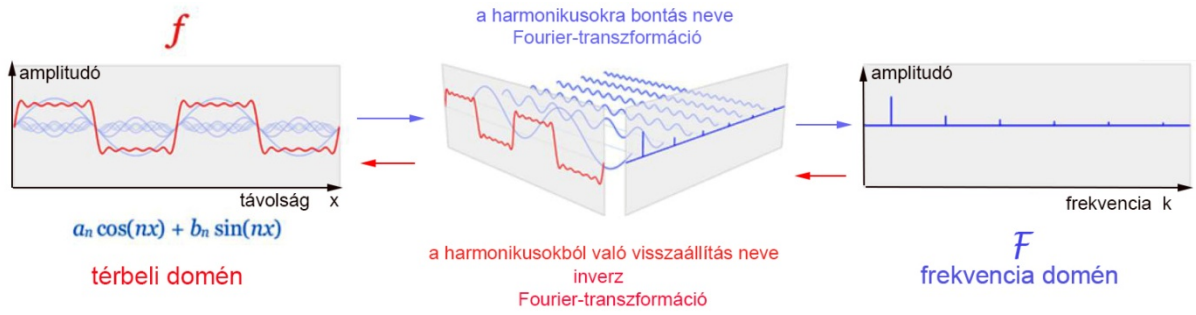
A krio-EM azon módszerében, amit egyedi részecskék analízisének neveznek, az szükséges, hogy a vizsgálandó molekulák ne vegyenek fel kitüntetett orientációt, mert különben a 3D rekonstrukcióhoz több irányból hiányzik a vetületi kép. Szerencsére a merítéses ultragyors fagyasztáskor az oldatban lévő részecskék véletlenszerű eloszlása megmarad.

II.5. Fourier-transzformációról röviden

A Fourier-transzformáció az élet számos területén előfordul, de hozzánk legközelebb az emberi fülben. A fül komponenseire bontja a beérkezett hangot, és pusztán a felharmonikusok alapján is meg tudjuk mondani, hogy hegedűt vagy zongorát hallunk. A Fourier-transzformációnak az elektronmikroszkópiában megkerülhetetlen szerepe van.

A 2.5.1. ábrán a piros színű f(x) függvényt különböző frekvenciájú szinusz- és koszinuszfüggvények kombinációjára lehet bontani.

$$f(x) = a_n cos(nx) + b_n sin(nx) \tag{2.13}$$



2.5.1. ábra. Egydimenziós függvény felbontása szinusz- és koszinuszfüggvényekre

A középső ábrán az egyes frekvenciakomponenseket szeparáltan látjuk: balról az első kék függvény sin(x), a második sin(2x), sin(3x)… stb. (2.5.1. ábra). Amplitúdójukkal arányos a függőleges kék vonalak magassága. Jobb oldalon ez a frekvenciaeloszlás látható az ún. frekvenciadoménben. A szinuszfüggvény magasabb frekvenciájú komponensei egyre kisebb mértékben esnek latba.

A további magyarázathoz az egyszerűség kedvéért tekintsük csak az egydimenziós szinuszfüggvényt. Alakja lehet

$$f(t) = sin(\omega t + \varphi) \tag{2.14}$$

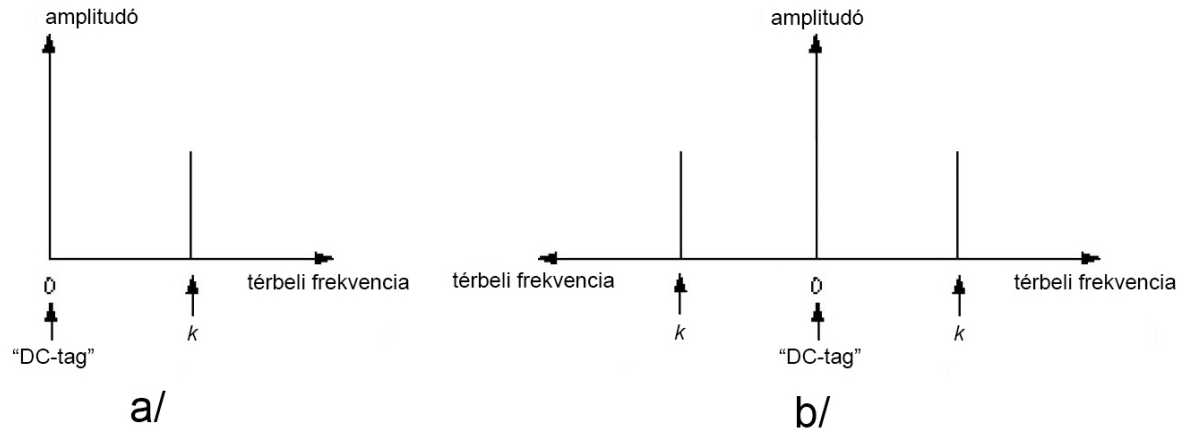
vagy

$$f(x) = sin(kx + \varphi) \tag{2.15}$$

Az első egyenletben a független változó t az idő, a második esetben x a távolság. Mindkét egyenletben ott találjuk a frekvenciát: ω az időbeli frekvencia, k a térbeli frekvencia. A térbeli

frekvencia az a frekvencia, amellyel a függvény amplitúdója a térben, jelen esetben az x-tengely irányában modulálódik. A φ fázis azt határozza meg, hogy a függvény oszcillációja a t=0 időpontban milyen állapotban van. Az ω a körfrekvencia $\omega = 2\pi/T$, ahol a T a függvény periódusának ideje.

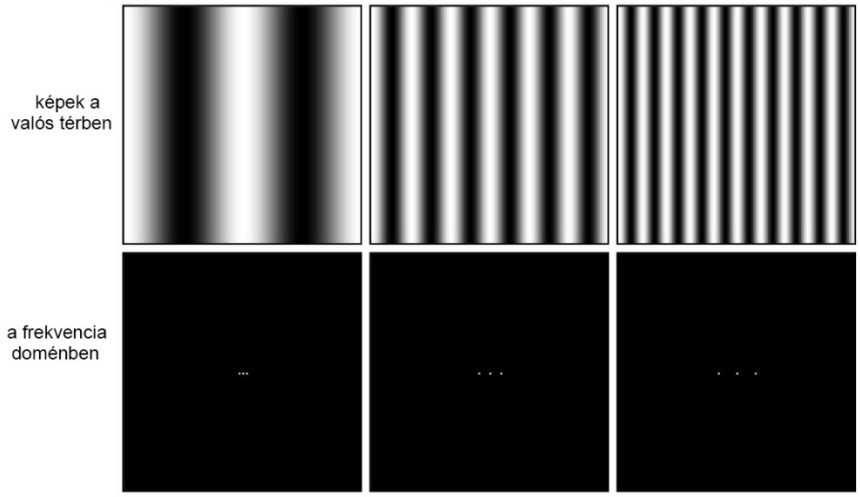
Amikor szétbontjuk az *f(t)* vagy *f(x)* függvényt komponenseire, akkor egy Fourier-analízist (másik elnevezése szerint Fourier-transzformációt) végzünk. Átvisszük a függvény vizsgálatát az időtartományból (amelyben az *f(t)* függvény van) az ω frekvencia-tartományba. A transzformált függvényt *F(ω)*-val jelöljük. Hasonlóképpen kerül át a térben változó *f(x)* függvény a térbeli frekvenciadoménbe *F(k)* jelöléssel. Nekünk többnyire a k-val jelölt térbeli frekvenciadoménnel lesz dolgunk, az ω időbeli frekvenciadoménnel nem. (Megjegyezzük, hogy a 2.5.1. ábra bal oldalán látható térbeli doménre az időtartomány elnevezést meg szokták tartani, akkor is, ha nem időről van szó. Az egységesítés kedvéért az eredeti függvény doménjét időtartománnak nevezik. Mi a félreértések elkerülése végett az eredeti függvény doménjét valós térnek fogjuk nevezni.) Az egydimenziós szinuszfüggvény Fourier-transzformáltja egyetlen függőleges vonal, mivel egyetlen frekvencia van benne (2.5.2. a/ ábra). Az ábrán látható még egy „DC-tag” jelölés, ami egy additív tagot jelöl a szinuszfüggvény mellett (és amelyet az egyszerűség kedvéért a (2.14) és (2.15) képletekben nem tüntettünk fel). Kétdimenziós szinuszfüggvény esetén a kép átlagos fényességeként értelmezzük ezt a tagot. Matematikai okokból a szinuszfüggvény Fourier-transzformáltja szimmetrikusan a bal oldali irányban is jelentkezik (2.5.2. b/ ábra).



2.5.2. ábra. A szinuszfüggvény Fourier-transzformáltja: a/ logikai megfontolások szerint, b/ valójában

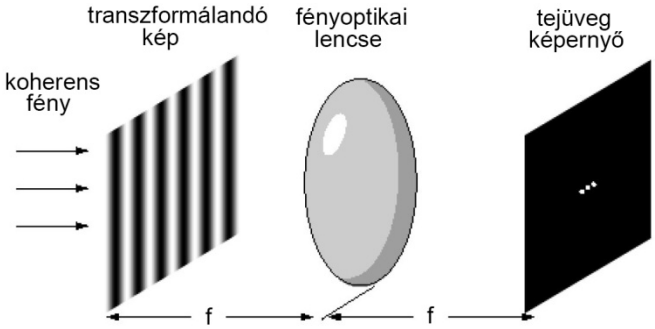
Minthogy mi a Fourier-transzformációt kétdimenziós képek megmunkálására fogjuk használni, így szükségünk lesz a kétdimenziós *sin(x,y)* függvény Fourier-transzformáltjára is. (2.5.3. ábra). (Ennek jelölésére *F(h,k)*-t fogjuk használni.)

Amint a 2.5.3. ábra mutatja, minél szélesebbek a csíkok a képben, annál közelebb vannak egymáshoz a megfelelő pontok a frekvenciadoménben. (Ezért kifejező a diffrakció elméletében a frekvenciadoménre a reciproktér elnevezés!) A felső sor képeiben balról jobbra a frekvencia nő. Ennek megfelelően az alsó képsorban a fényes pontok egyre távolodnak a középponttól a kép széle felé a magasabb frekvenciák irányába.



2.5.3. ábra A sin(x,y) függvények és Fourier-transzformáltjai. Felső sor balról jobbra: sin(x,y), sin(3x,y) és sin(5x,y). Az alsó sorban a megfelelő Fourier-transzformáltak (LEHAR)

A 2.5.3. ábrán látható transzformáció megvalósítható egy fényoptikai lencsével, egy tejüveg képernyővel és koherens fényforrással (kollimált lézer) (2.5.4. ábra).



2.5.4. ábra. A kétdimenziós szinuszfüggvény Fourier-transzformálása fényoptikai lencsével

A Fourier-transzformáció azon alkalmazásaira, amelyeket az elektronmikroszkópos képek analízisekor használunk fel, a II.8. pontban visszatérünk.

II.6. Az elektronhullám amplitúdójának és fázisának szerepéről

A krio-elektronmikroszkópiában fehérjék, vírusok és egyéb biológiai makromolekulák 3D szerkezetét rekonstruálják kétdimenziós elektronmikroszkópos képekből.

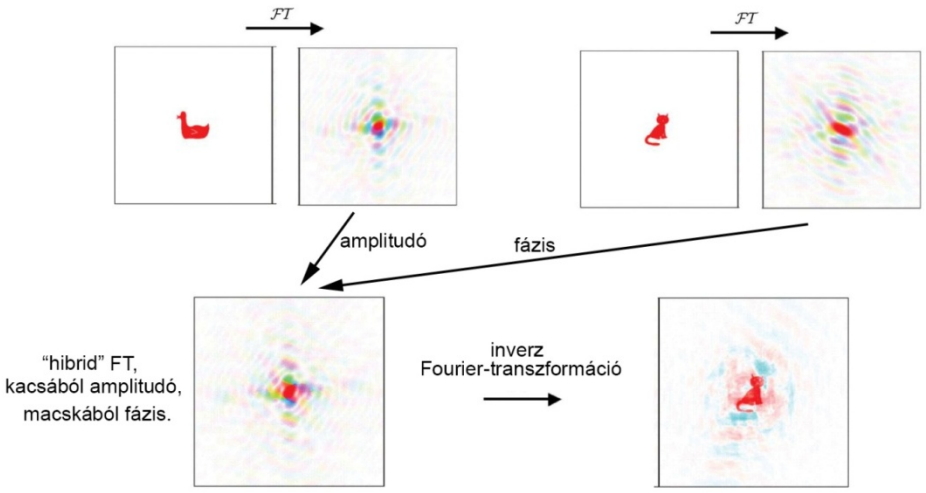
A háromdimenziós minták szerkezetének rekonstruálásában nagy szerep jut a hullám amplitúdójának és fázisának, amely megőrződik a Fourier-transzformációkor még akkor is, ha ezt az eddigi ábráink nem jelezték volna. Ám a gyakorlatban, amikor diffrakciós képet veszünk fel (legyen ez elektron- vagy röntgendiffrakció), elvész a fázis, mert a detektorok nem képesek detektálni a fázist. Ez ún. fázisprobléma, amely elnevezés a röntgendiffrakcióból származik, jóval a krio-elektronmikroszkópiát megelőzve. (A fázis elvesztésének magyarázata az, hogy egy kvantummechanikai axióma szerint a mért intenzitás nem a röntgen vagy elektronhullám-függvény amplitúdója, hanem annak négyzete. A komplex hullámfüggvény négyzetét kell venni, azaz a hullámfüggvényt a komplex konjugáltjával kell szorozni. De $e^{i\varphi}e^{-i\varphi} = 1$, ahol i az imaginárius egység $\sqrt{-1}$ és φ pedig a fázis. Így vész el a fázis.)

A röntgendiffrakcióban a fázisprobléma megoldására több mód van: az egyik például az, hogy a biológiai minták könnyű elemeihez nagyobb rendszámú elemet (pl. S vagy Se) visznek be.

Az elektronmikroszkópiában egyszerűbb a megoldás: 1968-ban ismerte fel Aaron Klug, hogy az elektronmikroszkópos képből meg lehet határozni a fázist is, nem csak az amplitúdót. A mikroszkópos képben azért őrződik meg a fázis, mert a diffraktált nyalábokat veszteség nélkül lehet a mikroszkópos képbe fókuszálni.

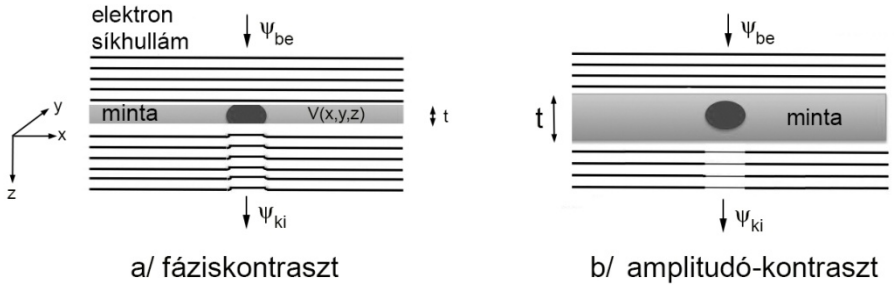
Az elektronmikroszkópos képből fényoptikai úton (optikai diffraktométerrel) előállított Fourier-transzformáltat használta erre a célra. Később a denzitométerrel beszkennelt elektronmikroszkópos képen nem lencsével, hanem számítógéppel végezte el a Fourier-transzformációt. A gyakorlatban pontosabban lehet meghatározni az amplitúdót a diffrakciós képből, mint a mikroszkópos képből, ezért azt onnan határozzák meg, a fázist pedig a mikroszkópos képből. Az ok, hogy a minta kis mértékű bemozdulása a képet zavarja, a diffrakció pedig kevésbé érzékeny rá, a benne lévő periodicitás miatt.

A fázis fontosságának illusztrálására érdekes ábra található az irodalomban (2.6.1. ábra). Egy kacsa és egy macska képének Fourier-transzformáltját állítják elő külön-külön. (Az amplitúdó nagyságát a szín erősségével jelzik, a szín változása pedig a fázist mutatja.) Aztán egy olyan hibridet készítenek, amelyben az egyik állat Fourier-transzformáltjából veszik az amplitúdót, a másikéból a fázist. Végül elvégzik az inverz Fourier-transzformációt a „hibridből”, és annak az állatnak a képét kapják vissza, amelynek Fourier-transzformáltjából a fázis származott. Így a képen a kacsaamplitúdó és macskafázis használata az inverz Fourier-transzformáció után macskaképet eredményez. Le is vonja a szerző a következtetést: „Sajnos az információ fő részét a fázis tartalmazza. Ezért nehéz a röntgenkrisztallográfia.”



2.6.1. ábra. A hullám fázisa több információt tartalmaz, mint az amplitúdója (COWTAN)

Az elektronmikroszkópiában megkülönböztetünk amplitúdókontrasztot és fáziskontrasztot. Az amplitúdókontraszt azáltal jön létre, hogy a mintán szórt elektronok egy része az apertúranyíláson kívülre kerül. A vastag és/vagy nagy rendszámú mintákban az amplitúdókontraszt, a nagyon vékony és alacsony rendszámú mintákban a fáziskontraszt dominál.



2.6.2. ábra. Fázis- és amplitúdókontraszt. Vékony mintákon a fáziskontraszt dominál, a hozzájárulás az amplitúdókontrasztból csak 5-7%.

Ennek alapján különböztetjük meg a konvencionális transzmissziós elektronmikroszkópiát a nagy felbontású elektronmikroszkópiától. Ez utóbbit fáziskontraszt-elektronmikroszkópiának is nevezik. A krio-elektronmikroszkópiában a fáziskontraszt a jellemző kontrasztmechanizmus (2.6.2. a/ ábra).

A fáziskontraszt úgy jön létre, hogy a mintában lévő atomok Coulomb-potenciálja (V(x,y,z)) fáziskésést okoz a rugalmasan szórt nyalábban a nem szórt elektronnyalábhoz képest, majd a két nyaláb interferál a képsíkban. Gyenge-fázis közelítésről (weak-phase approximation) akkor beszélünk, amikor a minta szórópotenciálja V(x,y,z) olyan kicsi, hogy a minta vetített

potenciáljára (V_t) igaz, hogy $V_t << 1$, és ekkor a kimeneti hullámfüggvény amplitúdója (ψ_{ki}) lineárisan arányos V_t-vel:

$$\psi_{ki} = 1 - \sigma V_t \tag{2.16}$$

ahol

$$V_t = \int_0^t V(x,y,z)dz$$

és

t – a minta vastagsága,

σ – kölcsönhatási állandó,

A gyengefázis-objektum közelítés vékony, alacsony rendszámú elemekből álló mintákra érvényes. A biológiai minta eleve kis rendszámú, így az egyik feltétel eleve teljesül. A másik feltételt, hogy a minta legyen nagyon vékony, a vizsgáló mikroszkóposnak kell teljesíteni.

II.7. Kontrasztátviteli függvény (CTF)

A kontrasztátviteli függvény (más néven fáziskontraszt-átviteli függvény) leírja az információ átvitelét a leképezendő tárgyból az elektronmikroszkópos képen megfigyelhető kontrasztba. A benne lévő változó a térbeli frekvencia (k) az objektívlencse hátsó fókuszsíkjára vonatkozik, ahol a diffrakciós kép keletkezik. A CTF leírja az elektronhullám amplitúdójának és fázisának modulációját, és magában foglalja azokat az aberrációkat, amelyeket az elektronmikroszkóp visz a képbe.

Az objektívlencse hátsó fókuszsíkjában (más néven frekvenciatérben vagy Fourier-térben) a kapcsolat a kép és a leképezendő tárgy között egyszerű módon fejezhető ki:

$$I(k) = CTF(k) \times O(k) \tag{2.17}$$

ahol

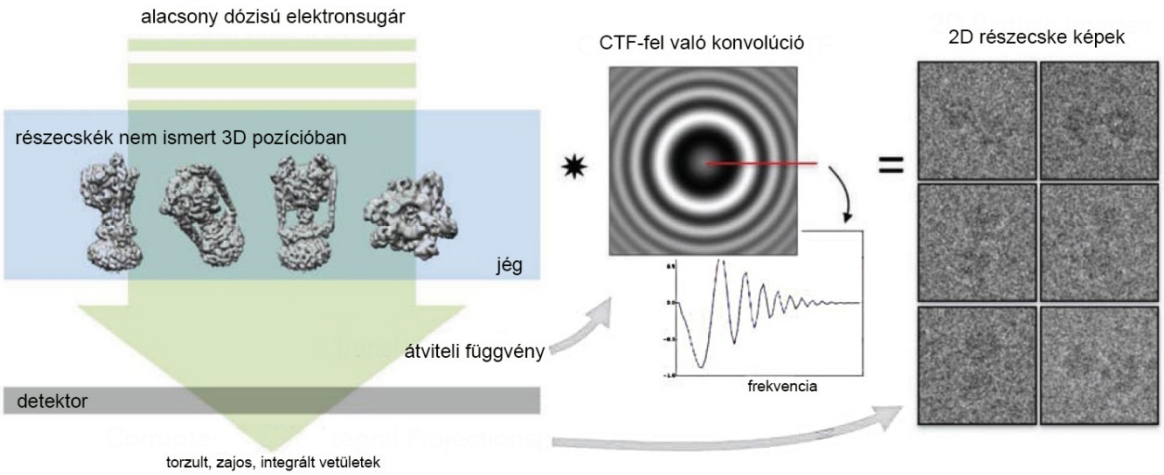
I(k) – a kép Fourier-transzformáltja,

CTF (k) – a kontrasztátviteli függvény,

O (k) – az objektum Fourier-transzformáltja,

Az egyszerűség kedvéért elhagytunk a képlet jobb oldaláról egy additív tagot, ami a zajt veszi figyelembe. A valós térben a képet az objektum és a CTF konvolúciója adja, a Fourier-térben az objektum és a CTF szorzata.

A biológiai minták nagy felbontású elektronmikroszkópiájában a kontrasztot defókuszálással állítják elő. A mikroszkópminta különböző finomságú részleteit különböző súlyozással viszi át a képbe. A mikroszkóp ezen tulajdonságát írja le a CTF. A CTF segítségével végzett képkorrekció alapvető fontosságú a krio-EM-mel végzett háromdimenziós rekonstrukcióhoz, és minden olyan esetben, amikor a felbontás 10 Å-nél jobb.



2.7.1. ábra. A kontrasztátviteli függvény (CTF) szerepének szemléltetése a mikroszkópos képek létrejöttében. A mikroszkópos képek oly módon torzultak, ahogy azt a kontrasztátviteli függvény leírja. A piros vonal menti kontraszt változását az alatta lévő egydimenziós CTF mutatja. A csillag a konvolúciót jelöli. (A konvolúció magyarázatát lásd a II.8.2. pontban.) (BRUBAKER 2015)

Egy mikroszkóp, legyen az fény- vagy elektronmikroszkóp, sohasem tökéletes. A mikroszkóp hibáit azzal lehet jellemezni, hogy egy pont képe mennyire tér el a ponttól. Ezt a torzulást a valós térben az ún. pontkiterjedési függvény (Point Spread Function PSF), a frekvenciatérben ennek a Fourier-transzformáltja, a kontrasztátviteli függvény írja le.

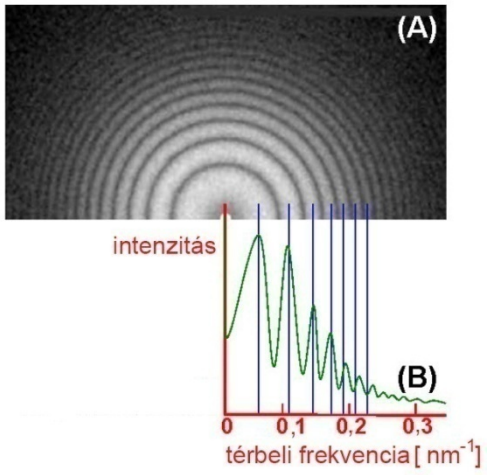
Fénymikroszkópos esetben a pontkiterjedési függvény kísérletileg is meghatározható. Fluoreszcens gyöngyöket képeznek le, amelyek mérete a leképező fény hullámhosszának a felénél kisebb. Így a gyöngyök pontforrásnak tekinthetők. Ha konfokális mikroszkóppal dolgoznak, akkor a fókusz kis mértékű változtatásával fókuszsorozatot készítenek, így a pontkiterjedési függvény három dimenzióban is meghatározható méréssel (SIBARITA, 2005). Az elektronmikroszkópiában nem tudunk olyan objektumot alkalmazni, amely az elektronok hullámhosszánál kisebb méretű. Ezért az elektronmikroszkópos pontkiterjedési függvény helyett annak Fourier-transzformáltjával, a kontrasztátviteli függvénnyel írják le az elektronmikroszkóp hibáit a frekvenciatérben.

A mikroszkóp torzító hatását a valós térben konvolúcióval lehet jellemezni, miként azt a 2.8.3 ábrán egy pont és kutya képének konvolúciójával szemléltetjük. A konvolúció kiszámítása a valós térben sokkal nehezebb, mint a frekvenciatérben (Fourier-térben), mert az utóbbi esetben a művelet két függvény szorzásává redukálódik (a tárgy Fourier-transzformáltjának a kontrasztátviteli függvénnyel való szorzásává).

A nagy felbontású elektronmikroszkópiában (fáziskontraszt-elektronmikroszkópiában) az amplitúdókontraszt elhanyagolható (<10%), így az átviteli függvényt fáziskontraszt-átviteli függvénynek, röviden kontrasztátviteli függvénynek nevezik. (Az amplitúdókontraszt azáltal keletkezik, hogy az elektronok egy része az apertúranyíláson kívülre szóródik.)

Nézzük meg ismételten a leképezés folyamatát, azért, hogy az elektronmikroszkópos kép torzításának mértékét meg tudjuk határozni, majd korrigálni tudjuk.

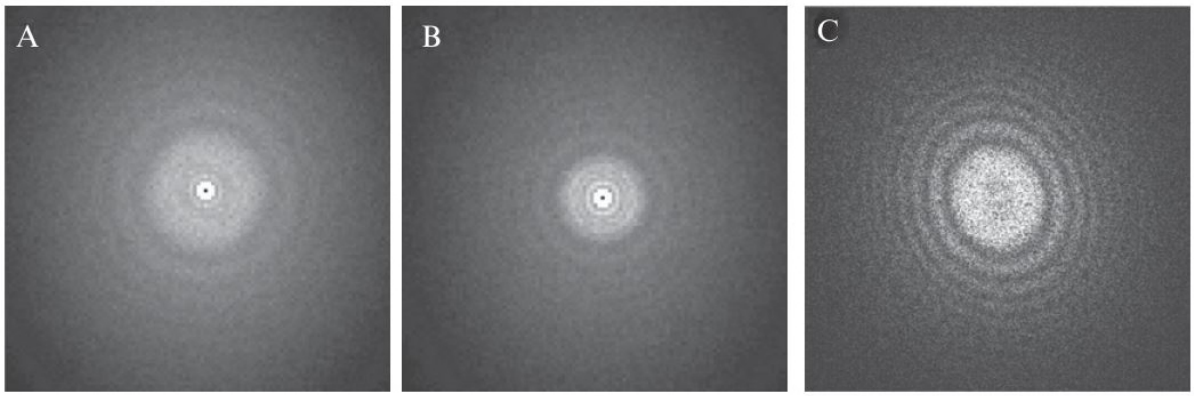
Az objektívlencse egy Fourier-transzformációt végez az elektronnyaláb hullámfüggvényén, és a lencse hátsó fókuszsíkjában megjelenik a diffrakciós kép. A szórt elektronhullámok Fourier-transzformáción kívül fáziseltolást is szenvednek a nem szórt hullámokhoz képest. Az objektívlencse hátsó fókuszsíkjában elhelyezett detektor az intenzitást (az amplitúdó négyzetét) méri, és a hullámfüggvény képzetes részében lévő fázis elvész. A hátsó fókuszsíktól a képsíkig egy inverz Fourier-transzformáció történik. A keletkezett mikroszkópos képben benne van az amplitúdó- és fázisinformáció, de az utóbbit detektorral közvetlenül itt sem lehet kinyerni. Amikor a mikroszkópos kép Fourier-transzformáltját fényoptikai diffraktométerrel (4.1.2. ábra) vagy számítógéppel állítják elő, a fázisinformáció hozzáférhetővé válik (THON 1949). Manapság a mikroszkópos képet digitálisan direkt elektrondetektorral (vagy CCD-kamerával) veszik fel, és egy képernyőn valós időben láthatjuk a mikroszkópos kép számítógépes Fourier-transzformáltját. Ez a diffrakciós képhez hasonló, a szélek felé elhalványuló koncentrikus gyűrűkből, az ún. Thon-gyűrűkből áll. (2.7.2.A/ ábra csak a teljes kép felét mutatja.) Neve kétdimenziós teljesítménysűrűségi spektrum



2.7.2. ábra. Teljesítményspektrum (A) kétdimenziós, (B) egydimenziós megjelenítésben

(power spectral density spectrum, rövidítve PSD) vagy rövidebben teljesítményspektrum (power spectrum). Az intenzitást a térbeli frekvenciafüggvényében ábrázolva az egydimenziós teljesítményspektrumot kapjuk (2.7.2.B/ ábra).

A kétdimenziós (2D) teljesítményspektrum segítségével az elektronmikroszkópos kép minősége a felvétel közben ellenőrizhető (2.7.3. ábra).



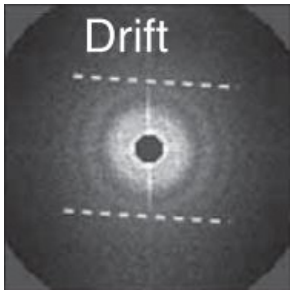
2.7.3. ábra. Kétdimenziós teljesítményspektrumok

A – fókuszhoz közeli képből, B – fókusztól távolabbi képből, C – asztigmatikus képből.

Az „A” illetve „B” kép defókusza -1,6 illetve -2,9 μm, miként azt az 1D teljesítményspektrumokra való görbeillesztésből meghatározták (CONG 2010)

A jó minőségű mikroszkópos képből készült teljesítményspektrumot koncentrikus körök jellemzik, amelyek messze terjednek a kép széle felé. Minél távolabb, annál jobb a mikroszkópos kép felbontása. Ha a körök elliptikusak, akkor asztigmatizmus van jelen.

Ha a kép bemozdul az expozíció alatt, akkor driftes képről beszélünk. A driftes kép 2D teljesítményspektrumát a 2.7.4. ábrán mutatjuk:



2.7.4. Bemozdult képről készült 2D teljesítményspektrum (SHAIKH 2008)

A bemozdult kép teljesítményspektrumára az jellemző, az egyik irányba a Thon-gyűrűk hamarabb megszűnnek, mint a rá merőleges másik irányban.

A teljesítményspektrum a mikroszkópos képből készült diffrakciós kép. Abban különbözik az objektív hátsó fókuszsíkjában keletkező diffrakciós képtől, hogy az utóbbiból fázisinformációt nem lehet kinyerni, a teljesítményspektrumból viszont igen.

A szferikus aberrációnak és a defókuszálásnak a mikroszkópos képre gyakorolt hatását legjobban a teljesítményspektrumon lehet megmutatni.

A kontrasztátviteli függvény a frekvenciatérben matematikailag írja le az elektronmikroszkópban történő képalkotást (ERICKSON 1970). Azon túlmenően, hogy meg lehet határozni belőle a mikroszkóp pontfelbontását, információs határát, korrigálhatóvá teszi a felvett képet. Alapvető fontosságú a nagy felbontás eléréséhez a krio-EM-ben végzett 3D rekonstrukcióban (2009 JIANG).

A CTF egyszerűbb formája (T(k)) csak a szferikus aberrációt és a defókuszálás mértékét foglalja magában:

$$T(k) = -sin\left[\frac{\pi}{2} C_s \lambda^3 k^4 + \pi \Delta f \lambda k^2\right] \tag{2.18}$$

ahol

C_s – az objektívlencse szferikus aberrációs koefficiense,

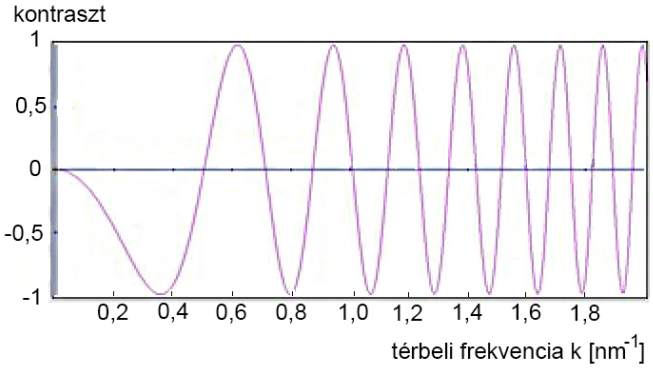
λ – az elektronok hullámhossza,

k – a térbeli frekvencia,

Δf – a defókuszálás értéke, amelyet a mikroszkópos vizsgáló szabályozhat, de pontosabb meghatározása ennek a képletnek a segítségével történik a CTF függvénynek a mért teljesítményspektrumhoz történő illesztésével.

A szögletes zárójelben lévő rész a térbeli frekvenciától függő fáziseltolás!

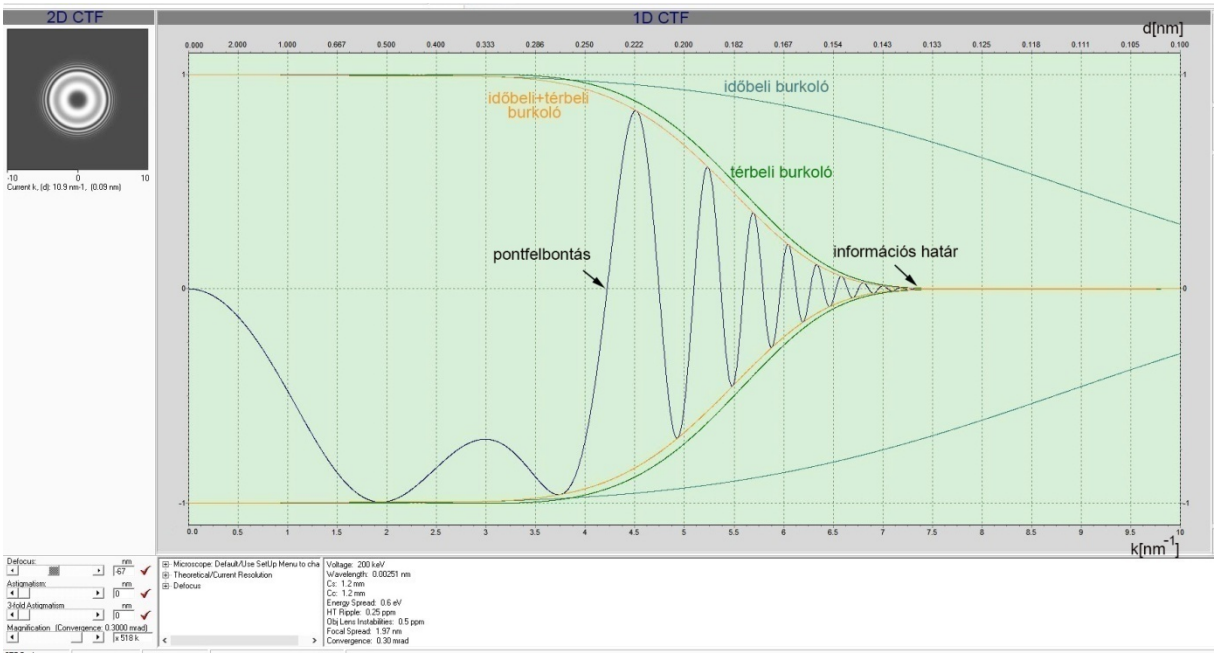
A (2.18) képletnek megfelelő görbe így néz ki: (2.7.5. ábra)



2.7.5. ábra. Az „egyszerűsített” kontrasztátviteli függvény egydimenziós formája

A 2.7.5. ábrának megfelelő „egyszerűsített” kétdimenziós CTF koncentrikus körökből áll, amelyek nagy „k”-értékeknél sem halványodnak el. A valódi (effektív) CTF-nél az amplitúdó a magasabb térbeli frekvenciák irányába egyre csökken.

Az internetről ingyenesen letölthető CTFexplorer program segítségével mutatjuk meg az effektív kontrasztátviteli függvény néhány tulajdonságát (ábra). (Letöltés helye http://www.maxsidorov.com/ctfexplorer/)



2.7.6. ábra . Egydimenziós effektív kontrasztátviteli függvény. Az ábra bal felső sarkában a kétdimenziós CTF látható.

Ha figyelembe vesszük, hogy a szferikus aberráción és a defókuszon kívül más tényezők is befolyásolják a CTF-t, akkor kapjuk az effektív CTF-t (amelyet most T_{eff}(k)-val jelölünk):

$$T_{eff}(k) = T(k)E_cE_a \tag{2.19}$$

ahol

T(k) – a (2.18) képlet által van meghatározva,

E_c – a kékkel jelölt időbeli burkoló görbe a 2.7.6. ábrán. Az elektronnyaláb nem tökéletes időbeli koherenciájára jellemző, amelyet főként a nyaláb energiakiszélesedése, a kromatikus aberráció, a nagyfeszültség és az objektívlencse instabilitásai okoznak.

E_a – a zölddel jelölt térbeli koherenciaburkoló görbe a 2.7.6. ábrán. Az elektronnyaláb részleges térbeli koherenciára jellemző, amelyet az okoz, hogy a megvilágító elektronnyaláb nem tökéletesen párhuzamos.

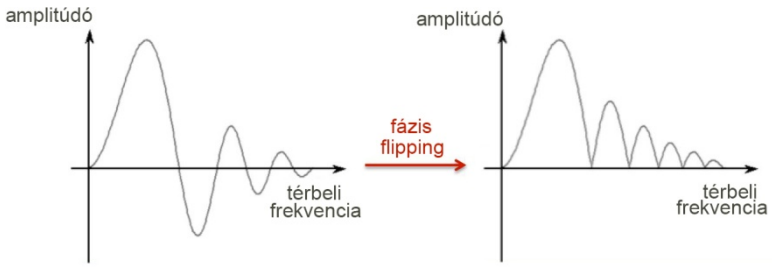
Összességében a CTF nemcsak a hullámhossztól (ezáltal a mikroszkóp gyorsítófeszültségétől), a szferikus aberrációtól és a defókusztól függ, hanem a térbeli és időbeli koherencia részleges hiányától is. Ez korlátozza az információk kinyerését a magasabb térbeli frekvenciák tartományában. (A fenti tárgyalásban eltekintettünk az asztigmatizmustól, amelyet a CTF meghatározása előtt korrigálnak.)

A 2.7.6. ábra bal felső sarkában látható a koncentrikus gyűrűkből álló kétdimenziós CTF. A körgyűrűk nagy „k” értéknél eltűnnek. Az oszcilláló kék vonal az egydimenziós CTF, amely már magában foglalja az időbeli és térbeli inkoherencia korlátozó hatását is. Az ábra a

frekvenciatérre vonatkozik, a vízszintes tengelyen alul a térbeli frekvencia „k” látható (nm^{-1}) egységekben. (Az ábra felső peremén fel van tüntetve a valós térre vonatkozó d=1/k is.) Az ábra függőleges tengelyén a kontraszt látható +1 és -1 közötti tartományban. Az ideális CTF-re a CTF=1 lenne jellemző, azaz a mikroszkóp a minta minden térbeli frekvenciáját 100%-osan vinné át a képbe. A k=0-tól kiindulva az egydimenziós CTF görbe a negatív kontraszttartományban fut. Ahol a görbe először metszi a (zérus kontrasztnak megfelelő) vízszintes tengelyt, ott kapjuk meg a mikroszkóp pontfelbontását. A nulla és a pontfelbontás közötti tartomány azért érdekes, mert itt az elektronmikroszkópos képet vizuálisan, intuitíven lehet értékelni. Ha a pontfelbontáson túli nagyobb k-értékek irányába megyünk, a kontraszt elkezd oszcillálni a fáziseltolás frekvenciafüggése miatt. Ettől kezdve a vizuális látvány megtévesztő, a képeket csak számítógépes szimulálással lehet kiértékelni. A CTF-görbe (2.7.6. ábra) jobb szélén bejelöltük az információs határt. Ha ennél nagyobb k-értékeket veszünk, akkor értelmes információt számítógépes szimulációval sem kapunk. Az információs határt a felbontás egy formájának kell tekintenünk.

Érdemes a hivatkozott ingyenes CTFexplorer programot letölteni, mert segítségével nyomon követhetjük a különböző paraméterek hatását a CTF-re.

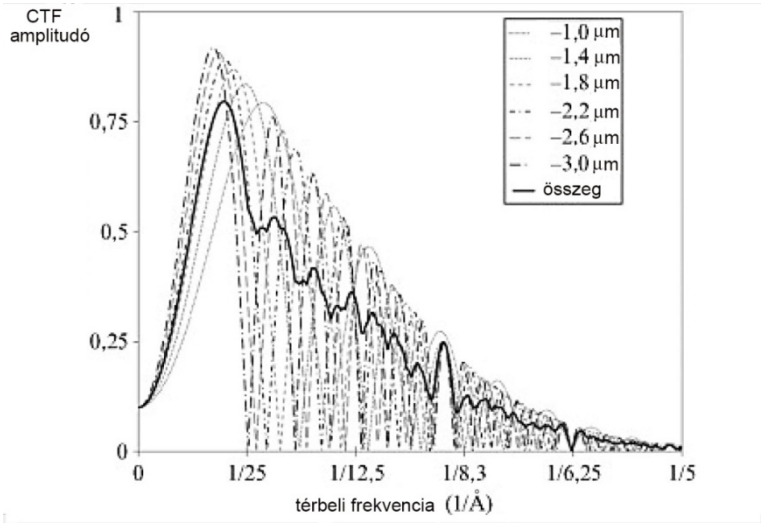
Mielőtt a CTF-et a mikroszkópos képek javítására (CTF-korrekció) használni lehetne, meg kell határozni a CTF függvényben lévő paraméterek (alapvetően a defókusz) értékeit. Ez úgy történik, hogy az elméleti CTF függvényt illesztik a kísérleti teljesítményspektrumhoz. Ezt a folyamatot nevezik CTF-becslésnek: először a defókusz mértékét határozzák meg, majd kiküszöbölik a függvény oszcillációját. A defókusz pontos meghatározása azért fontos, mert kis hibái jelentős változásokat idézhetnek elő a CTF-ben nagy térbeli frekvenciáknál. A CTF oszcillációjának a kiküszöbölése úgy történik, hogy a vízszintes tengely alá eső tartományok fázisát 180°-kal eltolják, ami azzal egyenértékű, hogy a tengely alatti részek a tengely fölé kerülnek. (Az eljárást angolul phase flippingnek nevezik.)



2.7.7. ábra. „Fázis flipping”

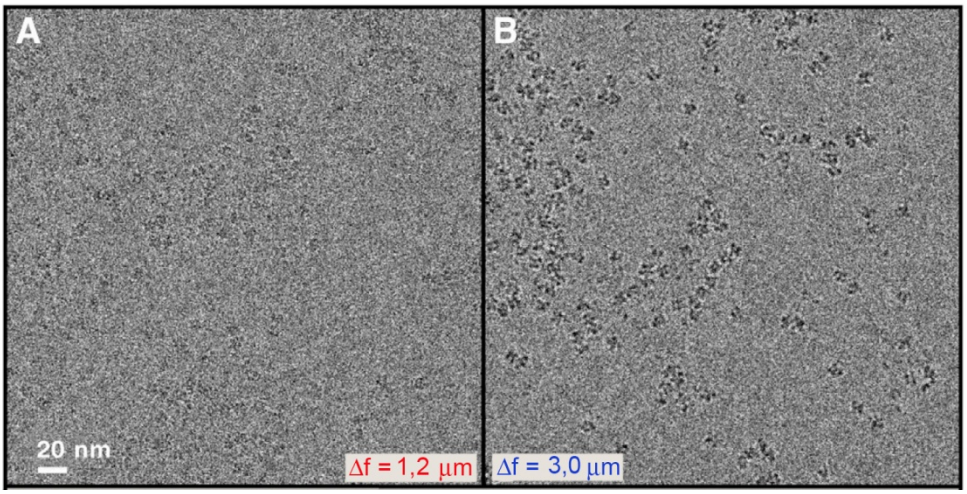
Minden olyan helyen, ahol a 2.7.6. ábrán a (kék) CTF-görbe zérus értéket vesz fel, az információtartalom a kontraszt hiányában elvész az adott k-értékre. Ha fókuszsorozatot

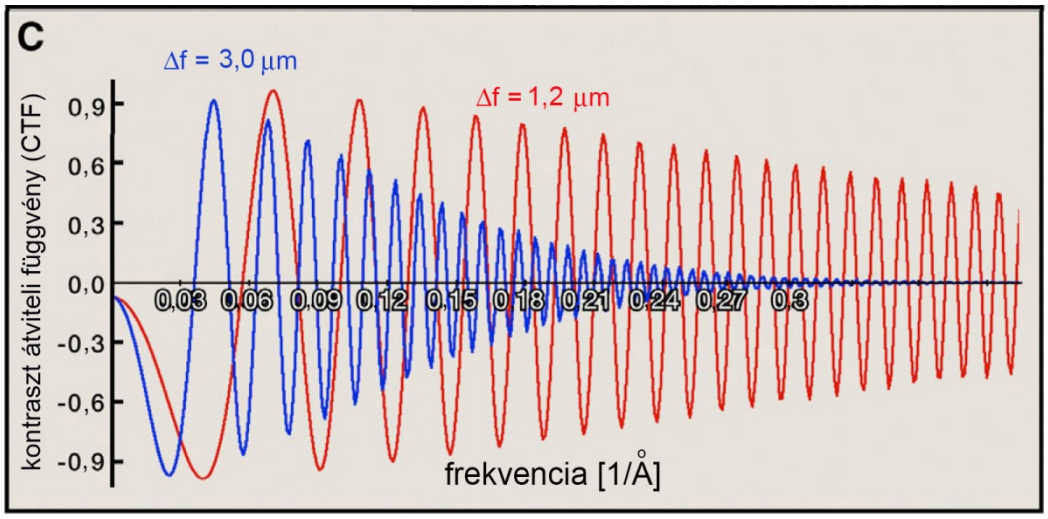
veszünk fel, akkor használható kontrasztértéket kapunk a CTF minden olyan pontjában, ahol egy korábbi defókuszbeállításkor a kontraszt zérus volt (2.7.8. ábra).



2.7.8. ábra. Fókuszsorozat és a belőle készült összeg annak kiküszöbölésére, hogy a CTF-ben ne legyenek olyan térbeli frekvenciák, amelyekhez zérus kontrasztérték tartozik (CONG 2010)

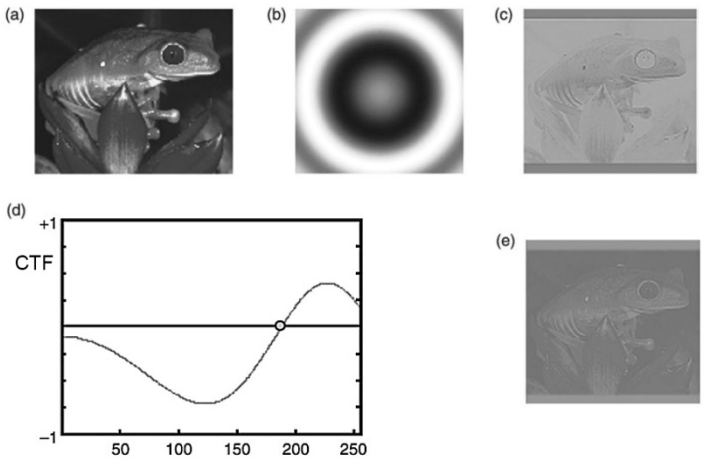
Egy elektronmikroszkópos képpárral szemléltetjük, hogy a kis defókusz (1,2 µm) jobb felbontást, de gyengébb kontrasztot ad (2.7.9./A ábra), mint a nagyobb defókusz (3,0 µm) (2.7.9./B ábra). A /C ábrán a két mikroszkópos képhez tartozó szimulált kontrasztátviteli függvényt mutatjuk: az 1,2 µm-es defókuszt piros, a 3,0 µm-es defókuszt kék szín jelzi.





2.7.9. ábra. A különböző mértékű defókusz szemléltetése humán transzferrin-komplex elektronmikroszkópos képén (/A és /B ábra). A defókuszálás megnyilvánulása a kontrasztátviteli függvényben (/C ábra). A kék görbe a nagyobb defókusszal a minta kisebb térbeli frekvenciáit emeli ki (/B ábra). Míg a piros görbe (és /A ábra) a minta nagyobb térbeli frekvenciáit részesíti előnyben a kék görbéhez képest (CHENG 2015).

Az elektronmikroszkóp, a 2.7.9. ábrán látható kék görbe miatt, alul áteresztő szűrőként viselkedik. A nagy frekvenciáknál a burkoló görbe lecsengése miatt romlik a felbontás. A kis kontrasztértékek az alacsony frekvenciáknál (k<1,5 a 2.7.6. ábrán) különösen zavarók a biológiai minták krio-EM vizsgálatában, mert a szemcséket alig lehet megkülönböztetni a háttértől. Ilyenkor a kontraszt növelése érdekében kénytelenek a defókuszt növelni.
A CTF hatását szemléletesen mutatja meg Frank a 2.7.10. ábrán:



2.7.10. ábra. A kontrasztátviteli függvény (CTF) hatása a képre
a/ a leképezendő objektum, b/ A kétdimenziós CTF, és egydimenziós változata a d / ábrán.

c/ A CTF hatása az objektum képére: a kontraszt megfordul és csökken nagy területeken, az élek kontrasztja megnő. e / a c/ábrán mutatott kép kontrasztinverzió után (FRANK 2006)

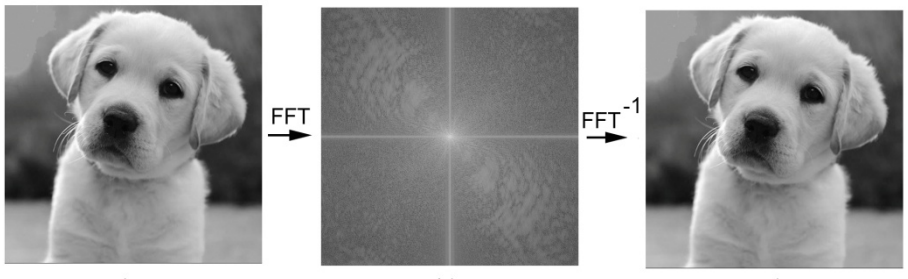
A legjobb pontfelbontást és legkisebb kontrasztot akkor kapjuk, ha a defókusz megfelel a Scherzer által megadott értéknek:

$$\Delta f_{Sch} = -1{,}2(C_s\lambda)^{1/2}$$

A CTF-korrekció és CTF-becslés részleteire az IV.3.4., illetve a IV.3.5. fejezetben visszatérünk.

II.8. A Fourier-transzformáció alkalmazásai a képanalízisben

Mi okunk van a Fourier-transzformációval kapcsolatos manipulációkra? Nagyon sok. Az elsőt már említettük: az elektronmikroszkóp objektívlencséje a hátsó fókuszsíkban előállít egy diffrakciós képet, amely a minta Fourier-transzformáltja. A diffrakció elméletében ennek a frekvenciadoménnek a neve reciproktér. A második ok, hogy több olyan matematikai műveletre lesz szükségünk (pl. képek zajszűrése, konvolúciója, keresztkorrelációja stb.), amelyet a valós térben sokkal nehezebb elvégezni, mint a frekvenciadoménben. Miután elvégeztük a szükséges műveletet a frekvenciadoménben, visszatranszformálunk a valós térbe. Ez utóbbi folyamatot nevezzük inverz Fourier-transzformációnak (más néven Fourier-szintézisnek). A harmadik ok lehet, hogy a Fourier-transzformációnak és az inverzének is van egy gyors változata, az FFT (Fast Fourier Transformation), amit ingyenes számítógépes programok egyetlen gombnyomásra elvégeznek, anélkül, hogy bármit is tudnánk a Fourier-transzformáció matematikai vonatkozásairól. Erre példa a 2.8.1. ábra, amely egy kutya Fourier-transzformációját és visszatranszformálását mutatja be az internetről ingyenesen letölthető ImageJ program segítségével. (https://imagej.nih.gov/ij/download.html)



2.8.1. ábra. Fourier-transzformáció és inverze az ImageJ programmal. Nincs különbség az a/ és c/ kép között.

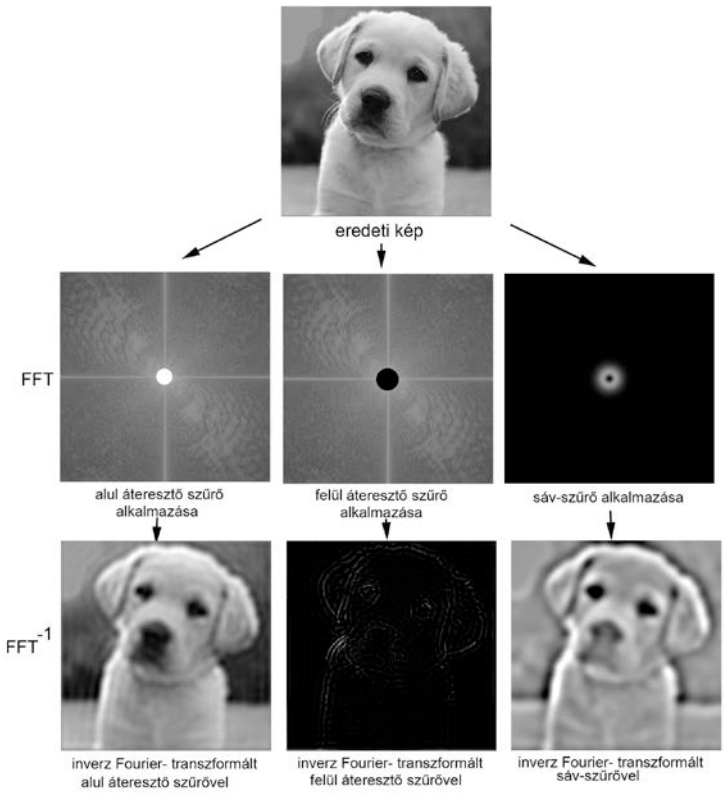
A matematikai részből csak annyit kell tudni, hogy Fourier tétele szerint egy integrálható f(x) függvény (függetlenül attól, hogy periodikus vagy nem) előállítható harmonikus (pl. szinusz-

és koszinusz-) függvények összegéből. A tétel vonatkozik nemcsak az egydimenziós, de a két- és háromdimenziós képekre is. Ismételjük, hogy amikor egy függvényt trigonometrikus függvényekből álló komponensekre bontunk, akkor Fourier-analízist végzünk, amikor a komponensekből visszaállítjuk az eredeti függvényt, akkor Fourier-szintézist végzünk.

II.8.1. Képek szűrése Fourier-transzformáció segítségével

Néha szükség van arra, hogy a magas frekvenciájú komponenseket (pl. a zajt) eltávolítsuk egy képből. Máskor az objektum alakjának a meghatározása a cél, a magasabb frekvenciájú, finomabb részletek feláldozása révén. Erre mutat példát a 2.8.2. ábra.

A fehér kört belerajzolva a minta Fourier-transzformált képébe egy alul áteresztő (kis frekvenciákat áteresztő) szűrőt kapunk (bal oldali függőleges képsor a 2.8.2. ábrán). Az inverz transzformáció után hiányoznak a magasabb frekvenciájú részletek, az adott esetben a kutya bajusza. Ha a Fourier-transzformált képbe egy sötét kört rajzolunk, akkor egy alul záró, felül áteresztő szűrőt kapunk. Ekkor a kutya bajusza és az éles körvonalak jól látszanak, de a kis frekvenciájú részletek eltűnnek (középső függőleges képsor a 2.8.2. ábrán). Létezik egy harmadik megoldás, az első kettő kombinációja, a sávszűrés, amikor az alacsony frekvenciájú képrészletek egy részét és a magas frekvenciájú részletek más részét zárjuk ki. Ez a sávszűrés (2.8.2. ábra jobb oldali függőleges képsora).



2.8.2. ábra. A frekvenciadoménben alkalmazott alul áteresztő, felül áteresztő szűrő és sávszűrő hatásának szemléltetése az ImageJ program segítségével

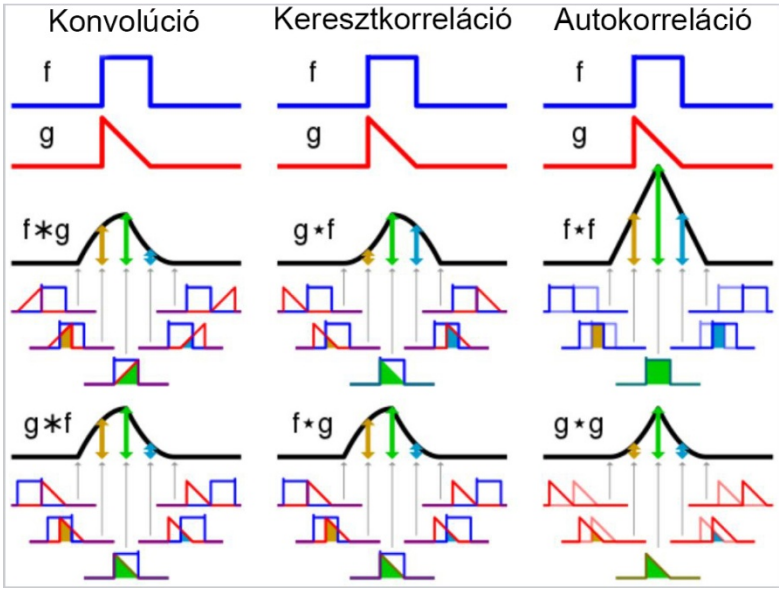
II.8.2. Konvolúció és dekonvolúció

A konvolúció egy olyan matematikai művelet, amely két függvényre (legyen az *f* és *g*) vonatkozik, és egy harmadik függvényt (*f***g*) eredményez, amely azt mutatja meg, hogy az egyik függvény hogyan változtatja meg a másikat.

A mikroszkópiához visszatérve: egy pont képe ideális esetben pont lenne. Az optika, a mikroszkópkörnyezet olyan hozzájárulást ad, amitől a pont képe elmosódik, egy ún. pontkiterjedési függvénnyé (PSF, Point Spread Function) változik.

Ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy a pontkiterjedési függvény miatt hogyan mosódik el vagy torzul el egy egész kép, akkor a konvolúció az a művelet, amely a kérdésünkre válaszol. A konvolúció a valós térben szorzások és összeadások sokaságát eredményezné egy mikroszkópos kép esetében. Szerencsére a művelet a frekvenciadoménben leegyszerűsödik a szóban forgó két függvény Fourier-transzformációjának szorzására. További szerencse, hogy amennyiben a (torzító/elmosó) pontkiterjedési függvény Fourier-transzformáltját ismerjük, a kép torzítása korrigálható. Ez a folyamat a dekonvolúció.

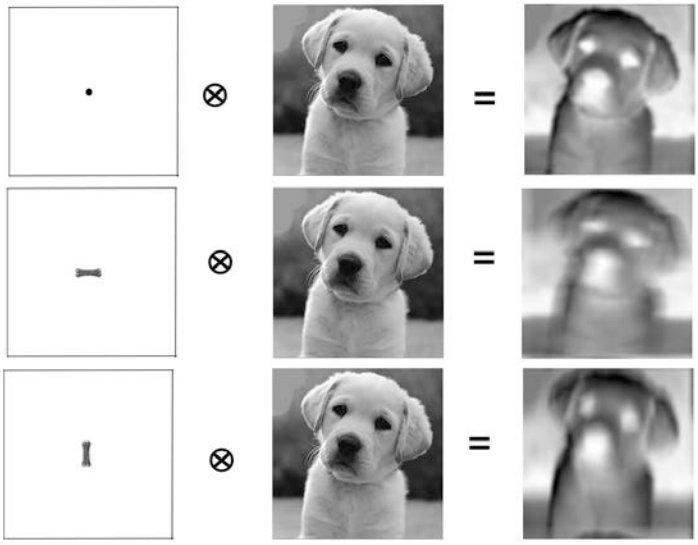
Egydimenziós függvények esetére a Wikipediából vett példa jól illusztrálja a konvolúció lényegét (2.8.3. ábra).



2.8.3. ábra. Konvolúció, keresztkorreláció és autokorreláció szemléltetése.(WIKIPÉDIA)

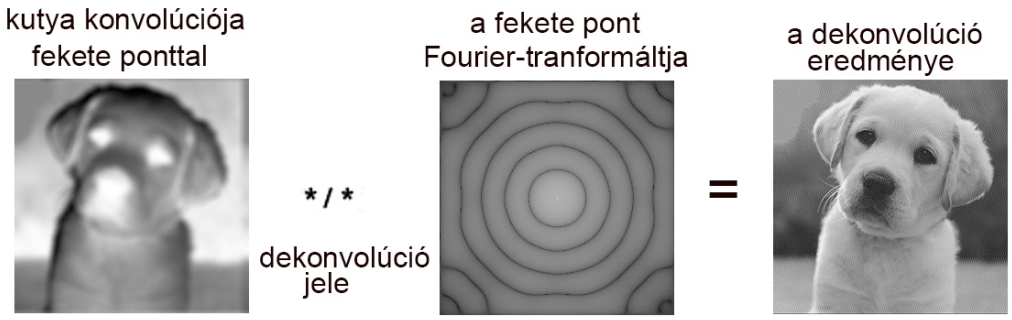
A kép bal oldalán látható, feketével jelzett konvolúció *f***g* függvény úgy keletkezik, hogy a piros *g* függvényt folyamatosan jobbra toljuk, és a kék *f* függvénnyel való átlapolódás területét

határozzuk meg. A *g*f* függvény esetében a kék *f* függvényt toljuk jobbra, és határozzuk meg a *g*-vel való átlapolás területét. Kétdimenziós esetre jól szemléltethetjük a konvolúció hatását az ImageJ program segítségével.



2.8.4. ábra. Kutya konvolúciója egy-egy tökéletlen leképező rendszer pontkiterjedési függvényével. A bal oldali függőleges képsorban egy méretes pont, egy vízszintes és egy függőleges helyzetű csont reprezentálja a pontkiterjedési függvényeket. A konvolúciót a ⊗ jelöli. A legfelső sorban a konvolúció a kör alakú fekete pont szimmetrikussága miatt nem okoz torzulást a keletkezett képben. A felbontáscsökkenés a pont viszonylag nagy mérete miatt következik be. A középső és alsó sorban a felbontás csökkenésén túlmenően torzulás is lép fel a képekben a csont helyzetétől függően. (A konvolúció a Fourier-transzformáltak összeszorzásával történt az ImageJ programmal.)

A 2.8.4. ábra felső sorát felhasználva megmutatjuk, hogy a pontkiterjedési függvénynek az ismeretében a leképezés torzító (elmosó) hatása korrigálható. A 2.8.5. ábra bal oldalán látható kutya képe azonos a 2.8.4. ábra felső sorának a jobb oldali képével. A 2.8.5. ábrához a legegyszerűbb PSF-t, a pontot választottuk. Az ImageJ-vel elkészítettük a pont Fourier-transzformáltját (2.8.5. ábra középső képe). Az elmosódott kutyaképnek a pont Fourier-transzformáltjával (középső kép a 2.8.5. ábrán) való dekonvolúciója visszaadta a kutya eredeti, torzítatlan képét.

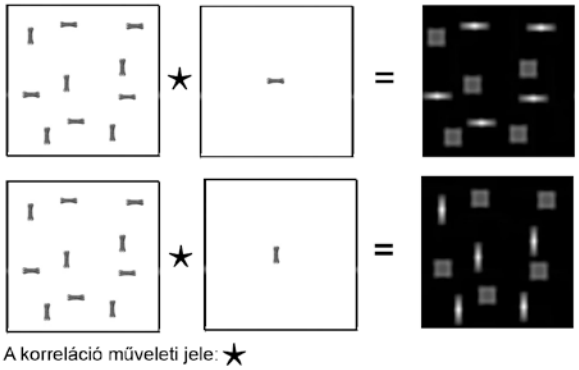


2.8.5. ábra. A dekonvolúció szemléltetése ImageJ programmal

A pontkiterjedési függvény (PSF) Fourier-transzformáltját optikai átviteli függvénynek nevezzük a fényoptikában, az elektronmikroszkópiában pedig kontrasztátviteli függvénynek (CTF, Contrast Transfer Function). (II.7. pont). A nagy felbontású háromdimenziós rekonstrukcióban a CTF fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni!

II.8.3. Keresztkorreláció

A keresztkorreláció a jelfeldolgozásban a hasonlóságnak a mértéke két függvény vagy két kép között. Rendszerint arra használják, hogy egy összetettebb képben egy ismert motívumot keressenek. Alkalmazzák a mintázatfelismerésben, egyedi részecskék analízisében és elektrontomográfiában.



2.8.6. ábra. A keresztkorrelációhoz

A 2.8.6 ábra bal oldalán látható képekben megkeressük korreláció segítségével, hol találunk vízszintes, illetve függőleges csontocskákat. Az ábra felső sorában a vízszintes csontocskákra, az alsó sorában a függőleges csontocskára keresünk rá. A jobb oldali korrelációs képekben a fényes részek tükrözik a találatok eredményét. (A korrelációs képek az ImageJ programmal készültek.)

Irodalom

BRUBAKER, M.A. et al. (2015): Building Protein in a Day: Efficient 3D Molecular Reconstruction, *arXiv*:1504.03573 (cs.CV), DOI: 10.1109/CVPR.2015.7298929

CARLSON, D. et al. (2012): 5 Low-Dose Imaging Techniques for Transmission Electron Microscopy, https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/34878.pdf

CHENG, Y. (2015) Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution, *Cell* 161, 450–457.

CONG, Y. et al. (2010): Chapter Eight – Single Particle Analysis at High Resolution, *Methods in Enzymology* 482, Jensen G. (ed). 211–235.

COWTAN, K., Kevin Cowtan's Book of Fourier, http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan /fourier/magic.html

FRANK, J. (2006): Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State, Oxford University Press, ISBN 0-19-515096-1; 0-19-518218-9 (pbk.)

FUJIYOSHI, Y. et al. (1991): Development of superfluid helium stage for high-resolution electron microscopy, *Ultramicroscopy* 38, 241–251.

GLAESER, R.M. (2016): Specimen Behavior in the Electron Beam, *Methods in Enzymology* 579, Jensen G.(ed), 19–47. ISSN 0076-6879, http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.010

GLASER, R.M. és TAYLOR, K.A. (1978): Radiation damage relative to transmission electron microscopy of biological specimens at low temperature: a review, *Journal of Microscopy* 112, (1), 127–138

GRANT, T. et al. (2015): Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6, *eLife* 2015;4:e06980.DOI: 10.7554/eLife.06980

GRIGORIEFF, N. et al. (2011): Near-atomic resolution reconstruction of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy, *Current Opinion in Structural Biology* 21, 265–273.

HENDERSON, R. (1995): The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution of unstained biological molecules, *Quarterly Reviews of Biophysics* 28,2, 171–193.

HENDERSON, R. (2013): Avoiding the pitfalls of single particle cryo-electron microscopy: Einstein from noise, *PNAS* 110(45) 18037–18041.

KARUPPASAMY, M. et al. (2011): Radiation damage in single-particle cryo-electron microscopy: effects of dose and dose rate, *Journal of Synchrotron Radiation* 18, 398–412.

KNAPEK, E. et al. (1982): Electron microscopical results on cryoprotection of organic materials obtained with cold stages, *Ultramicroscopy* 10, 105–110.

KOHL, H. and REIMER, L. (2008): Transmission Electron Microscopy, Springer kiadó

LÁSZLÓ, L. (2012): Szövettani és sejtbiológiai vizsgáló módszerek, https://regi.tankonyvtar.hu/hu /tartalom/tamop412A/2011-0073_szovettani_sejttani_vizsgalo _modszerek/index.html

LEAPMAN, R.D. et al. (1995): Cryo-electron energy loss spectroscopy: observations on vitrified hydrated specimens and radiation damage, *Ultramicroscopy* 59, 71–79.

LEHAR, S., An Intuitive Explanation of Fourier Theory, https://cns-alumni.bu.edu /~slehar/fourier /fourier.html

MORRIS, E.P. et al. (2017): High-resolutin cryo-EM proteasome structures in drug development, *Acta Cryst*. D73, 522–533.

NOGALES, E. et al. (2015): Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity, *Molecular Cell* 58, 677–688.

PASSMORE, L. et al. (2016): Specimen preparation for high-resolution cryo-EM, *Methods in Enzymol*. 579, 51-86. doi:10.1016/bs.mie.2016.04,011.

POZSGAI, I. (1996): Az analitikai elektronmikroszkópia alapjai, ELTE Eötvös Kiadó, ISBN 963 463 005 7

POZSGAI, I. (2019): A fluoreszcens mikroszkópia hagyományos és szuperfelbontású módszereinek alapjai, Typotex kiadó, ISBN 978 963 493 072 3

REIMER, L. (1991): Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy, *Advances in electronics and electron physics* 81, 43–119.

REIMER, L. (1993): Transmission Electron Microscopy, Springer kiadó, doi: 10.1007/978-3-662-21556-2

RUSKIN, R.S. et al. (2013): Quantitative characterization of electron detectors for transmission electron microscopy, *J. Struct. Biol.* 184 (3), doi: 10.1016/j,jsb.2013.10.016

RUSSO, C. (2014) EM Course 2014 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK) 3. lecture, Electron Microscopy Physics and Optics

RUSSO, C. (2017) EM Course 2017 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK) 2. lecture, Electron Microscopy Physics and Optics

SCHOEHN, G. et al. (2001): Structure of Recombinant Rabies Virus Nuckeoprotein-RNA Complex and Identification of Phosphoprotein Biding Site, *Journal of Virology* 75, (1), 490–498,

SHAIKH, T.R. et al. (2008): SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs, *Nature Protocols* 3 (12), 1941–1974.

SIMONYI, K. (1981): Elektronfizika, Tankönyvkiadó Vállalat, Budapest

SUN, J. et al. (2010): How to operate a Cryo-Electron Microscope, *Methods in Enzymology* 481, Jensen G.(ed), 231–249.

WILLIAMS, D.B. and CARTER, C.B. (1996): Transmission Electron Microscopy, A Textbook for Materials Science, Plenum Press New York, ISBN 0-306-45247-2

III. A krio-elektronmikroszkóp és segédberendezései

A nagy felbontású elektronmikroszkóp nélkülözhetetlen kellék, továbbá azok az eszközök, amelyekkel jó vákuumot lehet előállítani; a stabil, hűtött mintatartó, a nagy érzékenységű digitális detektor. Két nagy problémát, a minta kiszáradását és sugárkárosodását kell megoldani. A minta dehidratációját a gyors fagyasztással lehet meggátolni. A sugárkárosodás nagymértékű csökkentése alacsony dózisú üzemmóddal valósul meg, de ennek következtében a képek jel/zaj viszonya nagyon kicsi.

III.1. A krio-elektronmikroszkóp

A mai kor követelményeinek legjobban a 300 kV-os gyorsítófeszültségű, hideg, téremissziós katódú krio-elektronmikroszkópok felelnek meg. Nem kell ezt dogmának tekinteni, mert értek már el 3 Å-nél jobb felbontást 200 kV-os mikroszkóppal is (HERZIK 2017). Sőt kimondott cél, hogy a nagyon drága 300 kV-os krio-mikroszkópok helyett kevésbé költséges, téremissziós katódú, 100 kV-os krio-elektronmikroszkópokat fejlesszenek ki (VINOTHKUMAR és HENDERSON 2016).

Mint a II. fejezetben írtuk, az elektronágyúk kritikus paraméterei a fényesség, időbeli és térbeli koherencia, energiakiszélesedés és stabilitás.

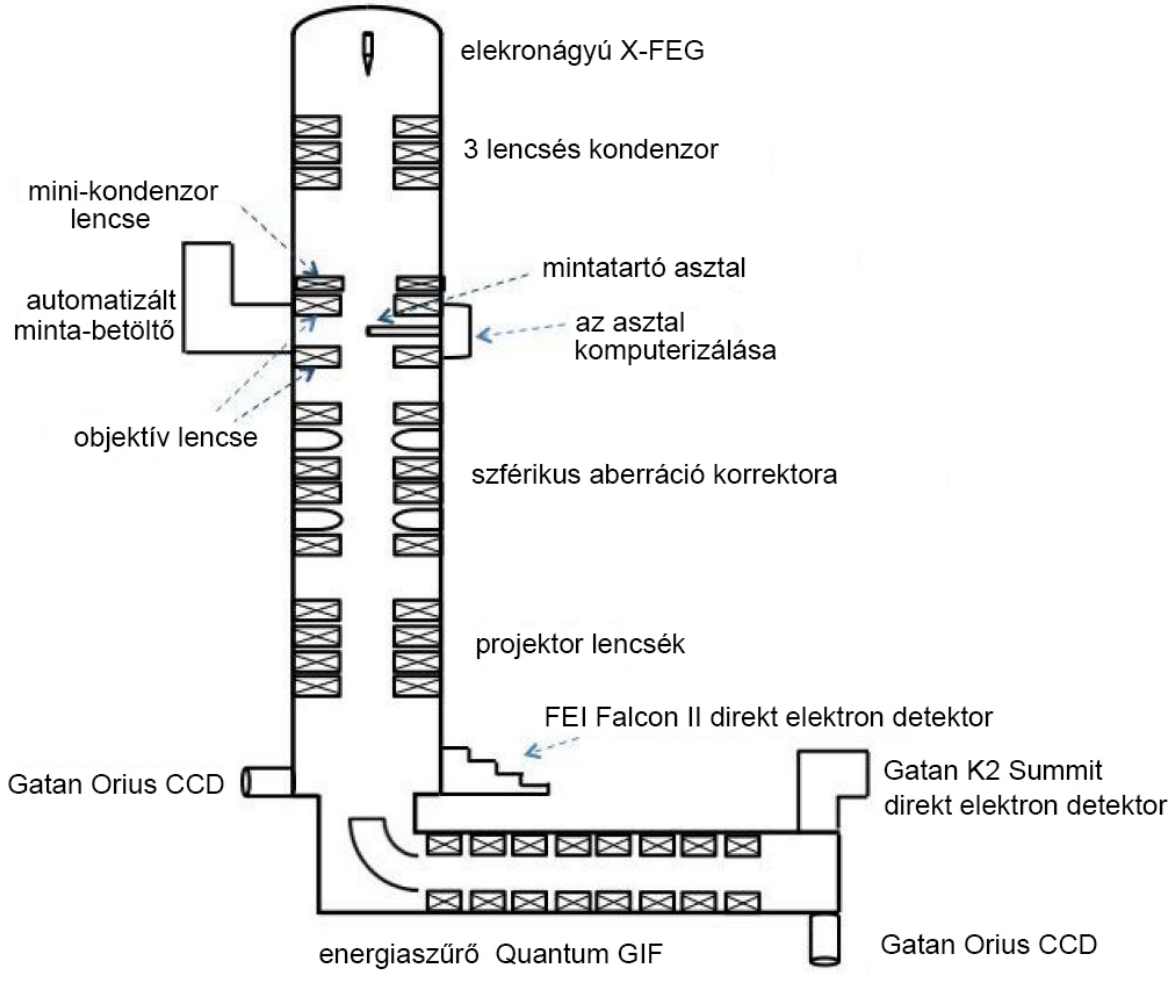
Fontos állomás volt a hideg téremissziós katódok (FEG, Field Emission Gun) kifejlesztése, mert az kb. 1000-szeres fényességjavulást hozott a katód fényességében a termikus volfrámkatódokhoz képest. Kisebb az energiaszórás a nyalábban, és ettől javul a nyaláb időbeli koherenciája. A jó koherencia pedig megnyilvánul a kontrasztátviteli függvény (CTF) burkológörbéjének lassúbb lecsengésében a magasabb térbeli frekvenciák, a finomabb mintarészletek átvitelében (2.7.6. ábra).

A téremissziós katód bevezetése megkövetelte a jobb vákuumviszonyok (10^{-10} Pa) kialakítását. Rezgésmentes, precíz goniométer mintatartó asztalokra van szükség, továbbá olyan krio-mintatartókra, amelyekkel a mintát át lehet vinni a folyékony etánból az elektronmikroszkópba, és ott megtartani a cseppfolyós nitrogén hőmérsékletén. Az átvitelkor nem szabad a minta hőmérsékletének -140 ^{o}C fölé emelkedni, mert az amorf jég kristályossá válik, és emiatt a minta tönkremegy. Követelmény a krio-mintatartó asztalokkal szemben, hogy rezgésmenteseknek és driftmenteseknek (stabilan helyben maradónak) kell lenni atomi léptékében. A biológusoknak sokáig azzal kellett azzal küzdeniük, hogy vagy a mikroszkóp nem volt kellő felbontású, vagy a krio-mintatartó asztalok nem voltak megfelelő stabilitásúak. Szükség volt szennyezésmentesítő eszközökre (antikontaminációs eszközök).

Az elektronmikroszkóp jelentős fejlődésen ment keresztül a szferikus aberráció korrigálásával (ROSE 1994), és ezzel beköszöntött a nagy felbontású elektronmikroszkópia korszaka.

A kómahibát a besugárzó nyaláb párhuzamosságának a növelésével, egy harmadik kondenzor beépítésével lehetett kiküszöbölni. (A kóma elnevezés az angol comet, üstökös szóból ered.) Sokáig nem volt kellően megoldva a detektorok kérdése. A fotográfiai filmeket felváltották a CCD kamerák, ezzel lehetővé vált a képi adatok gyors digitalizálása, és megteremtődött a mérések automatizálásának lehetősége. Az igazán jó megoldást jelentő direkt elektrondetektorok csak 2012-2013 után kerültek forgalomba. Ez hozta a már említett felbontási forradalmat.

A krio-elektronmikroszkóp összetettségét egy jól felszerelt Titan Krios sémáján keresztül mutatjuk be (3.1. ábra).



3.1. ábra. Titan Krios 1 (Thermo Fisher Scientific) krio-elektronmikroszkópjának sémája. Az elektron energiaszűrő Quantum GIF merőleges a lap síkjára. A Gatan K2 Summit direkt elektrondetektor, valamint a Gatan Orius CCD kamera az energiaszűrő oldalán foglalnak helyet. A direkt elektrondetektorokkal, valamint az elektronenergia-szűrővel a II.1.1.4., illetve a II.1.1.5. pontban foglalkozunk. (HHMI Janelia Research Campus honlapjáról, https://www.janelia.org/support-team/cryo-electron-microscopy/equipment)

Az ábrán látható X-FEG (extreme field emission gun) téremissziós ágyú helyett a hidegkatódos CFEG (CFEG, Cold Field Emission Gun) jobb felbontást eredményezett, mert abban kisebb az elektronok energiakiszélesedése az X-FEG-hez képest (SCHERES 2020).

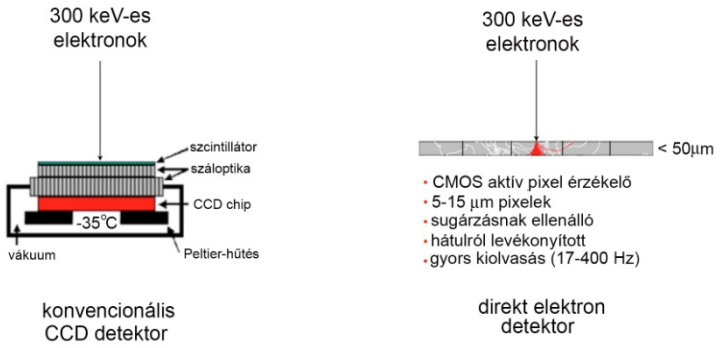
A fejlesztések másik vonala a szoftverfejlesztés volt. Ezek egy része a mikroszkóp vezérlésére vonatkozott, másik részük az automatikus adatgyűjtést (LEGINON), a képek feldolgozását és a háromdimenziós rekonstrukciót szolgálta. A képek Fourier-transzformáltjait valós időben láthatjuk a képernyőn, ezáltal a jó és kevésbé jó felvételek között szelektálni lehet. Az egyedi részecskék analízisénél képek tízezreit-százezreit kell feldolgozni, a kevésbé jó felvételek erősen hátráltatják a nagy felbontású 3D rekonstrukciót. Ezeket kiveszik az adatbázisból. Szoftver kellett az alacsony dózisú mikroszkópia megvalósításához, a minta driftjének (csúszásának) kompenzálásához, valamint az automatizáláshoz. Manapság a krio-elektronmikroszkópiában csaknem minden automatizálva van, beleértve a mikroszkóp centrálását és az adatgyűjtést. Ez óriási könnyebbséget jelent a mikroszkóposnak, különösen akkor, ha figyelembe vesszük, hogy gyakran több napos adatgyűjtésről van szó. Ehhez gyors számítógépekre és nagy adattároló kapacitásra van szükség. A jelen korban mindkét feltétel biztosítható. Az I. fejezetben idézett 30 év alatt, amikor a felbontás 35 Å-ről 3,5 Å-re javult (DUBOCHET 2017), a számítógépek kb. egymilliószor gyorsabbá váltak, és az adattárolási kapacitásuk is kb. egymilliószorossá vált. Olyan számítógépes algoritmusok hajthatók végre rövid idő alatt, amiről 30 évvel korábban álmodni se lehetett.

Nemegyszer igen bonyolult és számításigényes matematika húzódik meg a háttérben. Ezért meglepő, amikor azt halljuk, hogy a krio-elektronmikroszkópia legnehezebb része nem a matematika, hanem a minta-előkészítés. Ez azzal magyarázható, hogy a vizsgáló kutató a legbonyolultabb matematikai műveleteket egyetlen gombnyomásra végzi el anélkül, hogy annak részleteit ismerné. A minta-előkészítéshez viszont megfelelő gyakorlatot, tapasztalatot kell szerezni. Ez utóbbi pedig időigényes.

III.2. Direkt elektrondetektorok

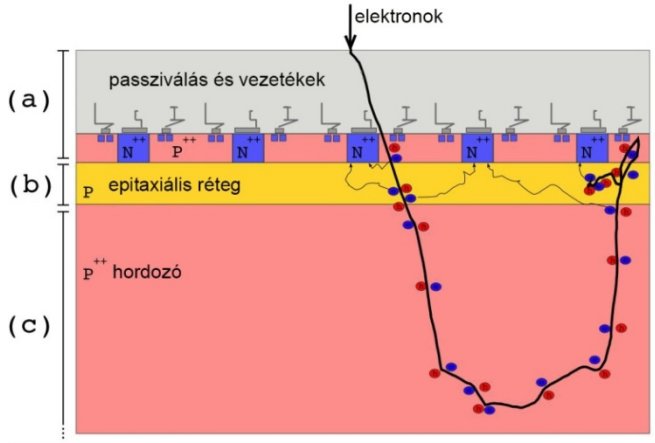
A direkt elektrondetektorok (angolul Direct Electron Detectors, DED vagy Direct Detection Devices, DDD) közvetlenül detektálják a beérkező elektronokat (anélkül, hogy elektronokból fényt, majd fényből ismét elektronokat állítanának elő, miként azt a CCD-k teszik.). A krio-elektronmikroszkópiában a vitrifikáció és a direkt elektrondetektorok kidolgozása volt az a két tényező, amely legnagyobb mértékben hozzájárult a terület fejlődéséhez.

Kezdetben ezüsthalid-filmekkel, majd az 1990-es évektől kezdve CCD alapú detektorokkal detektáltak az elektronmikroszkópban. A CCD alapú detektálás sémáját a 2.18. ábrán mutattuk. A foszforréteg (majd később a YAG kristály, mint a 2.18. ábrán látható) és a száloptikai csatolás megvédte a CCD-t a nagy energiájú elektronoktól. A CCD-k azt a nagy előnyt hozták, hogy az eredményhez nem kellett a film előhívására és digitalizálására várni. Megteremtették a mérési folyamatok automatizálásának lehetőségét is, mert biztosították az automatizáláshoz szükséges azonnali visszacsatolást. Az elektronmikroszkópok fejlődésével a 300 kV-os mikroszkópok nagyobb felbontásra lettek képesek, mint a 100 kV-osak, így igény keletkezett olyan gyors és digitális detektorok kifejlesztésére, amelyek elviselik a nagy energiájú elektronok hatását sugárkárosodás nélkül. Többek között ezt az előnyt is hozták magukkal a direkt elektrondetektorok a kedvező detektálási hatásfok és a kedvező jel/zaj viszony mellett.

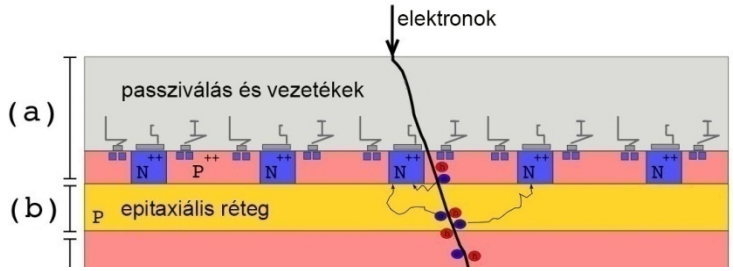


3.2.1. ábra. A konvencionális CCD detektor és direkt elektrondetektor összehasonlítása. Hangsúlyos a direkt elektrondetektoroknak a sugárzással szembeni nagyobb ellenálló képessége a CCD kamerákhoz képest

A direkt elektrondetektorok gyártásának alapját a számítógép-processzorok gyártásában jól bevált CMOS technológia képezi (CMOS, Complementary Metal-Oxid-Semiconductor, komplementer fém-oxid-félvezető) (3.2.1. ábra). A direkt elektrondetektorok monolitikus, aktív pixeleket tartalmazó érzékelőket használnak (MAPS, Monolithic Active Pixel Sensor). Monolitikusak, azaz egy chipre vannak integrálva, aktívak, mert az egy pixelen belüli három tranzisztor közül az egyik egy aktív erősítő. (A másik kettő a kiolvasandó pixelsorok kiválasztására, illesztve az exponálás előtti, kiindulási állapot helyreállítására (reset) szolgál.) A direkt elektrondetektorok a mobiltelefonok kameráinak módosított változatai.



3.2.2. ábra. A direkt elektrondetektor keresztmetszetének sémája. A hasznos töltés generálása a (b)-vel jelzett p-típusú epitaxiális rétegben történik. A nemkívánatos elektron-visszaszórást a hordozóból egyetlen nagy energiájú elektron trajektóriája szemlélteti a (c)-vel jelzett p++ rétegben. Töltéshordozó párok az elektron beérkezésétől távoli helyen is keletkeztek a hordozó nagy vastagsága miatt (McMULLAN 2009).



3.2.3. ábra. A hátulról levékonyított direkt elektrondetektor keresztmetszetének sémája. Az eredeti kb. 500 μm-ből 30 μm-nél kisebb vastagságú lett, ezzel a tömb anyagból történő, nemkívánatos elektron-visszaszórás megszűnt (McMULLAN 2009).

A detektor a végleges formáját a hordozó (c) nagy részének eltávolítása után nyeri el (3.2.3. ábra). Ezzel lecsökkentették a fals jelek létrejöttének lehetőségét, a hordozóról történő elektron-visszaszórást.

A detektor előtt gördülő zár (rolling shutter) van, és a képeket folyamatosan nagy sebességgel (1-500 képkocka/s) lehet kiolvasni. Magának a képfelvételnek a sebessége nemcsak a kiolvasás sebességétől függ, hanem attól is, hogy az analóg jel digitálissá való átalakításához mennyi analóg-digitál konverter áll rendelkezésre a chipen.

A detektorokat detektálási kvantumhatásfokkal (DQE, Detective Quantum Efficiency) és modulációs átviteli függvénnyel szokás jellemezni. Mielőtt e két paraméter tárgyalásába kezdenénk, ismerkedjünk meg a Nyquist-frekvenciával.

Mint a Fourier-analízis elméletéből ismeretes, a képek különböző szinuszhullámok összegéből állíthatók elő (II.5. fejezet). Ezek közül a legnagyobb frekvenciájú hullám határozza meg, hogy milyen lesz a felbontás.

Nyquist elmélete a mintavételezések gyakoriságára ad támpontot. A mintavételezésnek legalább kétszer gyakoribbnak kell lenni, mint a képen előforduló legnagyobb (térbeli!) frekvencia, azaz a legfinomabb képrészlet, ahhoz, hogy azt a részletet fel lehessen bontani. Tehát ahhoz, hogy egy *d* felbontást elérjünk, a mintavételezés távolságának *d*/2-nek vagy annál kisebbnek kell lenni.

Viszont a mintavételezési pontok távolságát a detektor pixeleinek mérete korlátozza. Nyquist elmélete szerint legalább két detektáló pixelre van szükség egy vonalpár (egy fekete és egy fehér vonal) felbontására. A Nyquist-frekvencia a Nyquist-távolság reciproka $\frac{1}{2*pixelméret}$.

Az ipari standardként használatos, vonalpár/mm-ben megadott felbontás és a pixelméret között a következő összefüggés áll fenn:

$$detektorfelbontás\left[\frac{vonalpár}{mm}\right] = \frac{1000}{2*pixelméret[\mu m]} \tag{3.1}$$

(Az 1000-es szorzó a mikrométerből milliméterre való átváltás miatt kerül a képletbe.)

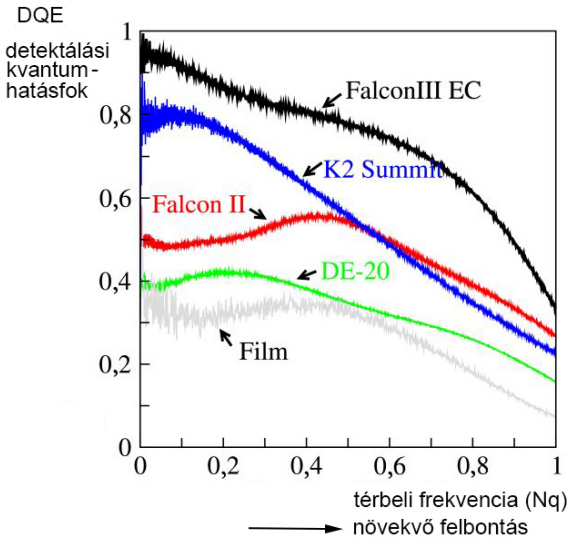
A felbontáshoz két pixel a szükséges feltétel Nyquist szerint, de az optimális feltétel a vonalpáronkénti három pixel. A pixelméret csökkentése gyakoribb mintavételezést, nagyobb detektorfelbontást tesz lehetővé, de mint látni fogjuk, csökkenő kontrasztot eredményez. Az érzékelő összes pixeleinek a száma a látómező méretét határozza meg.

Ha két különböző pixelméretű detektor kvantumhatásfokát akarják összehasonlítani a térbeli frekvencia függvényében, akkor a térbeli frekvenciát a Nyquist-frekvenciához (Nq) viszonyítva szokás megadni. (3,2,4, ábra). Nq = 1 jelenti a detektor felbontását.

Visszatérve eredeti témánkhoz, a detektorokat a detektálási kvantumhatásfokkal (DQE, Detective Quantum Efficiency) szokás jellemezni, amely a detektorral kapott kép jel/zaj viszonyát (S/N, signal/noise) hasonlítja össze a beérkező jel jel/zaj viszonyával:

$$DQE = \frac{\left(S/N\right)_{ki}^2}{\left(S/N\right)_{be}^2} \tag{3.2}$$

Nagyobb DQE jobb minőségű képet jelent. Jó kép esetén a detektornak nem szabad járulékos zajt adni a bejövő jelhez.



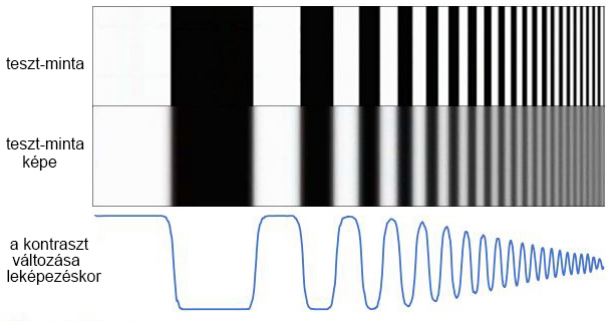
3.2.4. ábra. A detektálási kvantumhatásfok a térbeli frekvencia függvényében négy direkt elektrondetektorra és egy elektronmikroszkópos filmre 300kV-os gyorsítófeszültségen. A Nyquist-frekvencia 1-es értéke a felbontási határt jelenti (McMULLAN 2014), kiegészítve a Falcon III EC görbéjével .

Három cég három direkt elektrondetektora kerül összehasonlításra a 3.2.4. ábrán (zárójelben a gyártó cég neve): K2 Summit (Gatan), Falcon II és Falcon III EC (FEI), és a DE-20 (Direct Electron). Viszonyítási alapként a fotográfiai film szolgál. Az összehasonlítás csak a mikroszkóp 300kV-os gyorsítófeszültségére vonatkozóan igaz. Az ábrán látható, hogy direkt elektrondetektorok felülmúlják a film detektálási kvantumhatásfokát. Továbbá az is leolvasható, hogy a nagyobb felbontás irányába csökken a detektálási hatásfok. Az ideális detektor kvantumhatásfoka minden frekvencián 1. A Gatan K2 Summit detektora és a FEI Falcon III EC detektora elektronszámláló üzemmódban is képes működni. (Az elektronszámláló üzemmód 3.2.7. ábra.) Kereskedelmi forgalomban van már a Gatan K3 és a Falcon 4 detektor is, de ezekre DQE görbét nem tudunk mutatni. A Gatan K3 DQE-je nagyobb az elődjénél, és alkalmas elektronszámlálásra is.

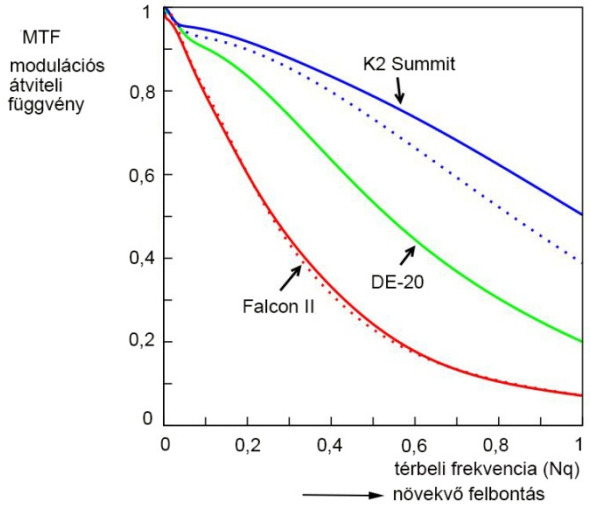
Óvatosnak kell lennünk a detektorok kvantumhatásfokának megítélésénél: 80-120 kV-os gyorsítófeszültség-tartományban a direkt elektrondetektorok rosszabb eredményt produkálnak, mint 300 kV-on. Viszont a mikroszkóposok előnyben részesítik a 300 kV-ot a jobb felbontás miatt. A 4 Å-nél jobb felbontású 3D rekonstrukciók 98%-a 300 kV-os mikroszkóppal készült (HERZIK 2017). Viszont az idézett szerző produkált 3Å-ös felbontást 200 kV-on.

A detektálási kvantumhatásfok egyedül nem elegendő a detektor jóságának jellemzésére, mert a jóságban a kontrasztnak is szerepe van. A 3.2.5. ábrán látható kék görbe azt mutatja, hogy

amint egyre sűrűbb vonalak (egyre nagyobb felbontás) felé közeledünk, úgy csökken a tesztminta képének kontrasztja.



3.2.5. ábra A kontraszt csökkenése nagy frekvenciák átvitele esetén



3.2.6. ábra. Az eredeti képkontrasztnak a detektor tökéletlensége miatt bekövetkező csökkenését tükrözi a modulációs átviteli függvény (MTF). Ez a tulajdonság függ a leképezendő objektumban előforduló térbeli frekvenciáktól. A pontozott görbe integráló üzemmódot, folytonos görbe elektronszámláló üzemmódot jelöl (ez utóbbira még kitérünk, lásd a 3.2.7. ábrát!). (McMULLAN 2014)

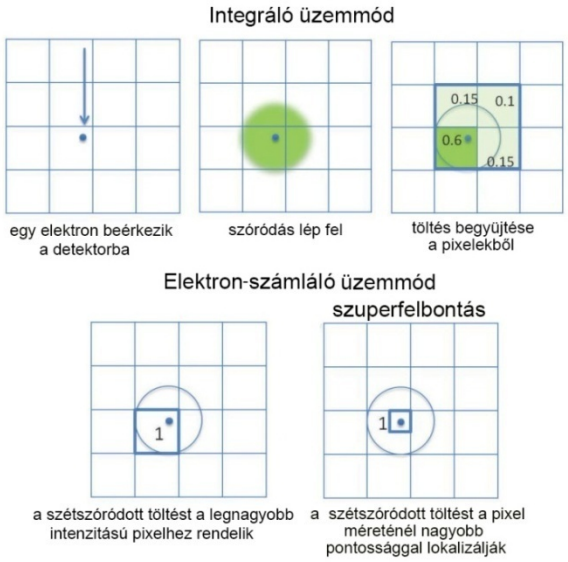
A kontraszt változását figyelembe vevő mennyiséget modulációs átviteli függvénynek nevezzük (MTF, Modulation Transfer Function), és a 3.2.6. ábrán mutatjuk a térbeli frekvencia függvényében.

Az MTF azt mutatja meg, hogy a vizsgált mintáról kapott különböző térbeli frekvenciák kontrasztját a detektor milyen mértékben rontja le. Az MTF=1 értéknél a detektor tökéletesen megőrzi a kép eredeti kontrasztját. A magasan futó K2 Summit görbéje azt mutatja, hogy ez a detektor jobban megőrzi az eredeti kép kontrasztját, mint az ábrán szereplő másik két detektor.

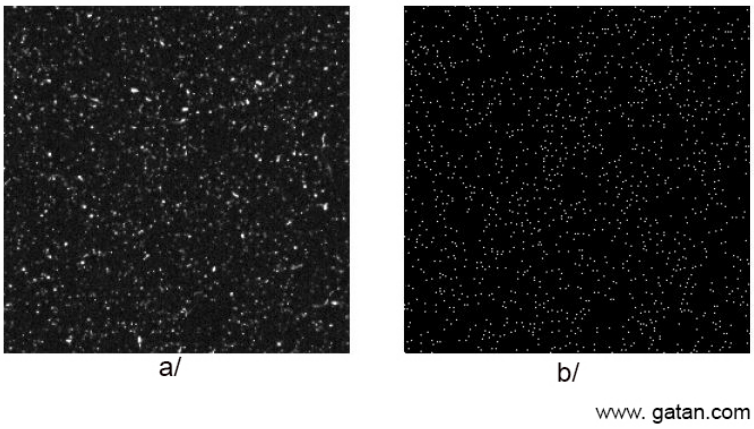
A kék pontozott vonal az ún. integráló üzemmódban végzett mérést, a folytonos kék vonal pedig az elektronszámláló üzemmódban készültet jelöli.

Kitérőt kell tennünk az integráló és elektronszámláló üzemmód magyarázatához.

Az integráló és elektronszámláló üzemmód között az a különbség, hogy az integráló módban pixelenként kiolvassák az analóg feszültségjelet (pl. egy 4K × 4K pixelszámú detektorban), majd digitalizálják, és ez adja a képet (McMULLAN 2009). Az elektronszámláló üzemmódban a beérkező elektron helyét azonosítják, és az analóg jel helyett egyetlen diszkrét impulzust rendelnek a legnagyobb intenzitású pixelhez (3.2.7. ábra).

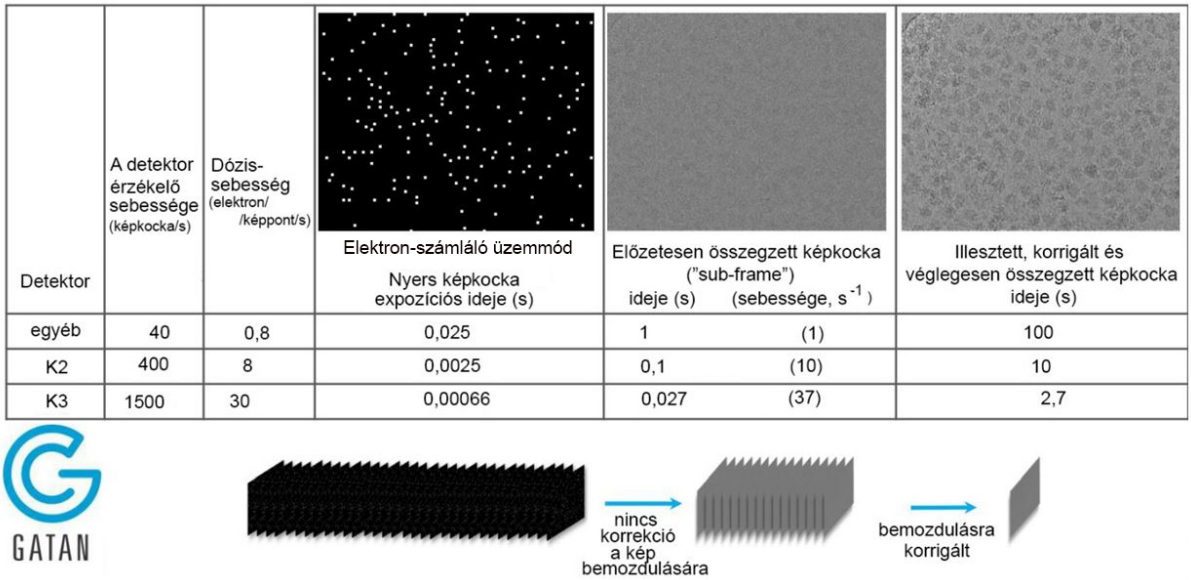


3.2.7. ábra. Integráló és elektronszámláló üzemmód közötti különbség, továbbá a szuperfelbontás szemléltetése (BOOTH 2013)



3.2.8. ábra. Ugyanaz a terep direkt elektrondetektorral felvéve a/ integráló, b/ elektronszámláló üzemmódban. A b/ ábrán jobb a jel/zaj viszony, mint az a/ ábrán (BOOTH 2019)

A detektorba beérkező elektronok töltéshordozó párokat gerjesztenek, amelyek energiájának van egy statisztikai eloszlása, ami zajt okoz az integráló üzemmódban felvett képekben. Azáltal, hogy meghatározzák az elektronok „landolási” pontját, és ezt egyetlen impulzussal helyettesítik, mellőzve az elektronok energiaeloszlását, javul a detektálási hatásfok valamennyi frekvencián.



3.2.9. ábra. A K2 Summit és K3 detektort elektronszámláló üzemmódra tervezték. Az ábrán jelzett 1500 képkocka/s detektálási sebesség 1/0,027=37 képkocka/s kimeneti felvételi sebességet eredményezett (BOOTH 2019).

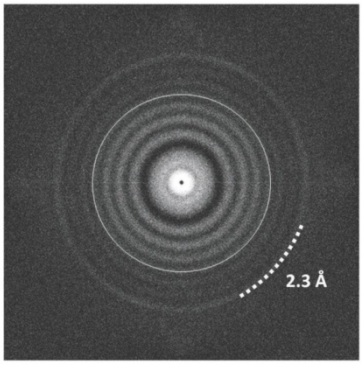
A 3.2.9. ábrán látható képek és számok megvilágítják a direkt elektrondetektorral való képalkotás folyamatát. A három kép közül a bal oldali azt mutatja, hogy milyen az elektronszámláláskor kapott nyers kép. A felvételi körülményeknek olyanoknak kell lenni, hogy egy detektáló pixelbe egynél több elektron ne kerülhessen egy képkocka expozíciója alatt. Ellenkező esetben hamis képet kapunk. Ezt egyrészt az alacsony dózissebességgel, másrészt a rövid expozíciós idővel érik el. (A 3. és 4. oszlop adatainak szorzata 0,2 elektron/pixelt eredményez, azaz 50 pixelre jut egyetlen elektron egy képkocka expozíciós ideje alatt!) Ezek a körülmények jó összhangban vannak azzal az igénnyel, hogy a minta ne szenvedjen sugárkárosodást. A második oszlopban látható, előzetesen összegzett képkocka („sub-frame”) több tízezer nyers képből készül. Végül ezeket „sub-frame”-eket egymáshoz illesztik, korrigálják a képek bemozdulását, és újabb összegzés után kapják az ábra jobb felső sarkában látható végleges képet.

Az integráló üzemmódra jellemző: a rövid expozíció, nagy dózissebesség (10-50 elektron/pixel/s), és az elektronszámláláshoz viszonyított alacsony DQE.

Az elektronszámlálásra jellemző: a nagyon gyors képkockasebességek, nagyon alacsony dózissebesség (0,5-5 elektron/pixel/s), hosszú expozíciós idő, és az integráló üzemmódhoz viszonyított magasabb kvantumhatásfok.

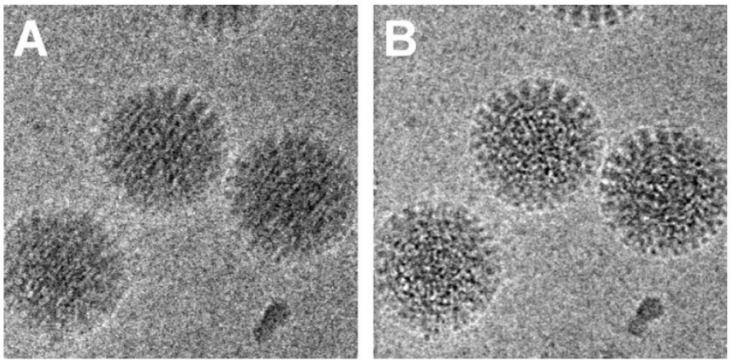
Egyes detektorok (pl. a Gatan cég K2 Summit és K3 detektorai) képesek ún. szuperfelbontású üzemmódban is működni. Ekkor a detektorba érkező detektorok landolási helyének pontos meghatározása lehetőséget ad arra, hogy a pixelméretet szoftveres úton egynegyed méretre csökkentsék (7680×7424 pixel), miközben a pixelek fizikai mérete változatlan marad. Ennek következtében tovább javul a detektálási hatásfok, viszont a felvételi sebesség lecsökken a normál felbontású elektronszámláláshoz képest.

A szuperfelbontás hatását egy platina-iridium rétegen felvett elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformáltjával szemléltetjük (3.2.10. ábra).



3.2.10. ábra. A direkt elektrondetektor szuperfelbontásának szemléltetése. A képen platina-iridium minta elektronmikroszkópos képének Fourier-transzformáltja látható (Thon-gyűrűk). A legkülső fehér kör a detektor pixel méretnek megfelelő információs határt (Nyquist-frekvencia) jelzi szuperfelbontás nélkül (3,4 Å). A szaggatott fehér körív a szuperfelbontással kapott 2,3 Å-ös felbontást jelöli. (A felvétel adatai: Gatan K2 Summit kamera, a mikroszkóp nagyítása 23 000×, expozíció 20 elektron/Å^2, teljes expozíciós idő 3 sec (BOOTH 2013).

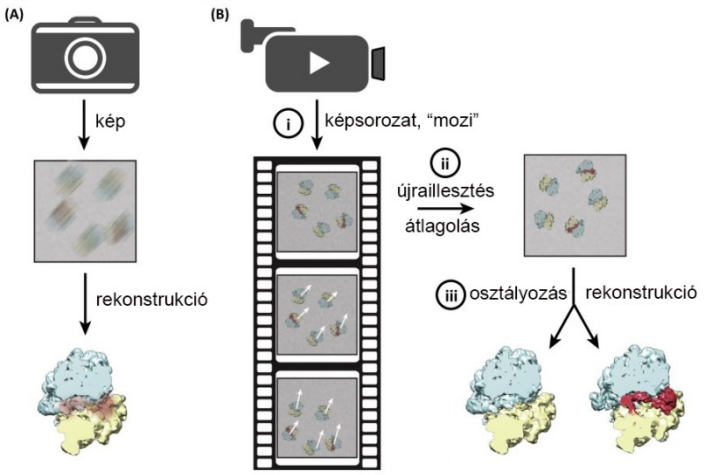
Az elektronszámlálás nagy sebessége lehetővé tesz egy mozgófilm („movie”) üzemmódot, amikor a detektor egy kép helyett képsorozatot vesz fel, amelyeknek elemei külön-külön felhasználhatók. Ily módon az elektronsugár okozta mintamozgás és a minta tartó instabilitásai miatti bemozdulás korrigálhatóvá válik az egyes képkockák összehasonlításával (3.2.11. ábra).



3.2.11. ábra. Mozgáskorrekció rotavírusmintán. A hordozó Quantifoil, a mozgófilm felvételi sebessége 40 képkocka/s. 10 képkockánként átlagolták a képeket, majd 60 felvételen korrekciót végeztek a transzlációs elmozdulásra. Az „A” kép a mozgáskorrekció nélküli, a B kép az elmozdulásra van korrigálva. Az elmozdulásra korrigált képben jól látható minőségjavulás következett be. (Paraméterek: FEI TF20 elektronmikroszkóp, 200 kV gyorsítófeszültség, a direkt elektron típusa DE-12, a Direct Electron vállalat terméke.) (BRILOT 2012)

A képbemozdulás jól tetten érhető az elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformáltján. A bemozdult kép teljesítményspektrumára az jellemző, az egyik irányba a Thon-gyűrűk hamarabb megszűnnek, mint a rá merőleges másik irányban (2.7.4. ábra).

A direkt elektronok moziüzemmódjának egyik következménye lehet, hogy a rekonstrukcióban könnyebb felismerni és megkülönböztetni az egymáshoz közel álló szerkezeteket. A 3.2.12. ábra azt szemlélteti, hogy a rekonstrukció a moziüzemmód alkalmazásakor két szerkezetet talál, míg a korábbi, filmrögzítésű, állóképes felvétel után a rekonstrukció egyetlen szerkezetet eredményez. A jobb oldali képen három fejlesztési eredményt jelenítettek meg: (i) a direkt elektrondetektorra utal, (ii) a komputer szerepét mutatja, segítségével az elektronnyaláb okozta bemozdulás korrigálható, (iii) új osztályozási szoftverek két külön szerkezetet mutatnak meg, ha azok a mintában keverten vannak jelen.



3.2.12. ábra. A direkt elektrondetektorok moziüzemmódjának és az abból adódó előnyöknek a szemléltetése (BAI 2015)

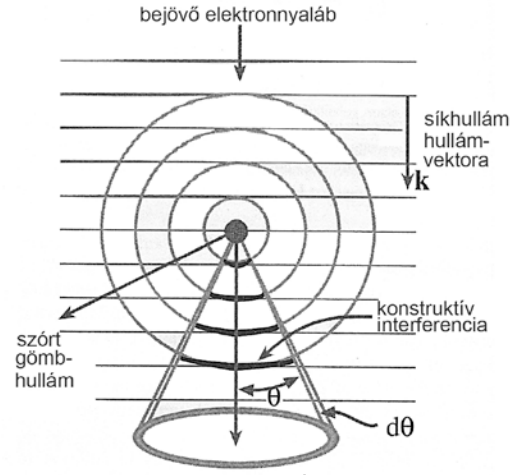
A mozgóképüzemmód jól hasznosítható dózisfrakcionálásra is. Ez alatt azt értjük, hogy ha a megengedett dózis pl. 20 elektron/pixel másodpercenként, akkor azt fel lehet osztani 20 darab 1 elektron/pixeles képre, amelyek expozíciós ideje egyenként 50 msec.

A direkt elektrondetektoroknak az elektronmikroszkóp optikai oszlopán vagy az oszlopon kívüli, az elektronenergia-szűrő utáni elhelyezését láthatjuk a 3.1. ábrán.

III.3. Fázislemezek

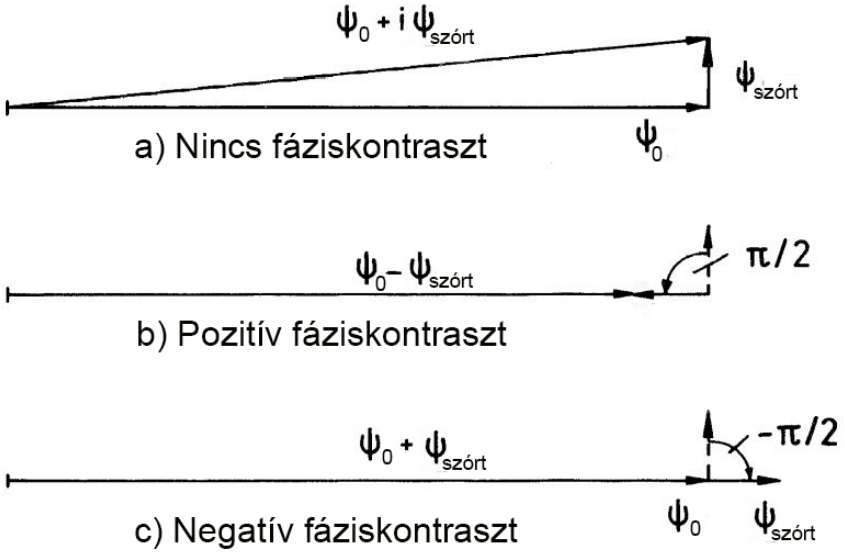
A rugalmasan szórt elektronok amplitúdókontrasztot és fáziskontrasztot hozhatnak létre. Az amplitúdókontraszt annak a következménye, hogy az elektronok egy része az objektív apertúrán kívülre szóródik. A fáziskontraszt viszont azáltal keletkezik, hogy a nem szóródó besugárzó elektronok interferálnak a képsíkban az energiaveszteség nélküli, azaz rugalmasan szórt elektronokkal. A fáziskontraszt, ami a nagy felbontású elektronmikroszkópia alapja, függ a mikroszkóp gyorsítófeszültségétől, a defókuszálástól, a szferikus aberrációtól és az objektívlencse apertúrájától. A fázislemezek az alacsony térbeli frekvenciák tartományában növelik meg a kontrasztot, ami főként a részecskék kontúrjának a megerősödését jelenti. A nagyfrekvenciás tartományban is valamivel jobb felbontást adnak, mint a fázislemez nélkül (azonos számú vizsgált részecskét figyelembe véve). (DANEV és BAUMEISTER 2016)

A besugárzó elektronnyaláb síkhullámként érkezik, a mintával való kölcsönhatás után a szórt sugárzás gömbhullám formájában terjed tovább (3.3.1. ábra).



3.3.1. ábra. A besugárzó elektronnyaláb mint síkhullám; a szórt elektronnyaláb gömbhullámként terjed tovább (WILLIAMS és CARTER 1996).

A fáziskontraszt mikroszkópiában az elmélet az elektronokat hullámként kezeli. A nem szórt és szórt hullámok szuperpozíciója következtében előáll egy 90°-os (π/2 radián) fáziseltolás a nem szórt és a szórt nyaláb között (KOHL 2016, WILLIAMS és CARTER 1996).



3.3.2. ábra. A fáziskontraszt magyarázatához (KOHL 2008)

Amennyiben a szórt sugárzás amplitúdója ($\psi_{szórt}$) elenyészően csekély, akkor az 3.3.2.a) ábrán mutatott összeg ($\psi_o+i\psi_{szórt}$) nem fog észrevehetően különbözni a besugárzó nyaláb ψ_o amplitúdójától, így nem keletkezik fáziskontraszt. Amennyiben defókuszálással járulékos π/2 fáziskontrasztot hozunk létre, akkor pozitív fáziskontrasztot kapunk (3.3.2.b) ábra). A negatív

fáziskontraszt -π/2 radián (vagy -90°) fáziseltolással jön létre (3.3.2.c) ábra). A π/2 fáziseltolás λ/4 úthosszkülönbségnek felel meg a szórt és nem szórt nyaláb között.

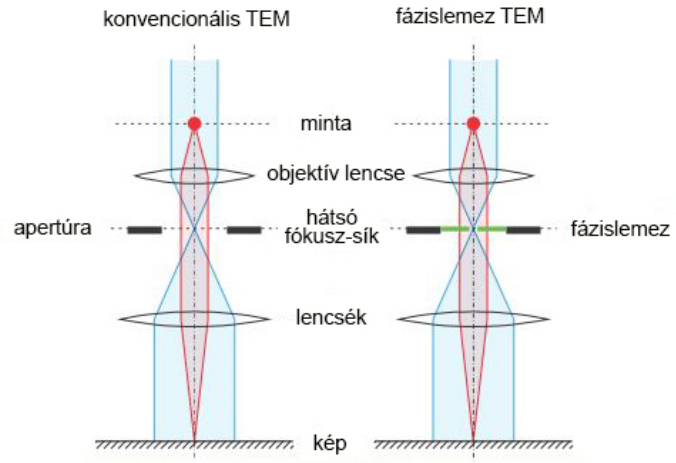
A mérhető intenzitás (I) minden esetben az amplitúdó négyzete:

$$I = \psi\psi^* = |\psi|^2 \tag{3.3}$$

ahol ψ^* a ψ amplitúdó komplex konjugáltja.

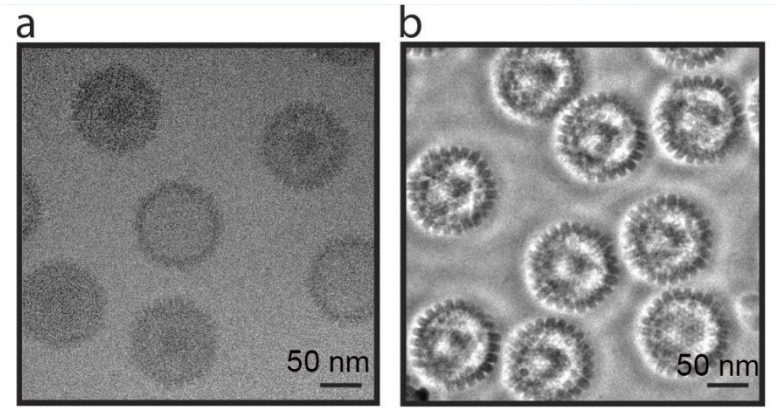
Ezért az ábrán mutatott a) esetben $I \sim I_0$, b) esetben $I < I_0$, és végül c) esetben $I > I_0$. Negatív fáziskontraszt esetén a háttér sötét és az objektum világos, pozitív fáziskontraszt esetén a háttér világos és az objektum sötét.

A fáziskontraszt fénymikroszkóp(!) az 1930-as évek óta ismert Frits Zernike, holland tudós munkássága nyomán, de csak 1953-ban kapott érte fizikai Nobel-díjat. A fáziskontraszt befolyásolása az elektronmikroszkópban később kezdődött, de egy 2013-as összefoglaló közlemény már 17 ilyen módszert ismertet (GLAESER 2013). Mi két módszerrel foglalkozunk: a Zernikéről elnevezett vékonyréteg-fázislemezzel és a jelenleg legsikeresebbel, a Volta-fázislemezzel. A fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos Zernike-fázislemezek nem azonosak.



3.3.3. ábra. A fázislemez elhelyezése az elektronmikroszkópban (DANEV 2017)

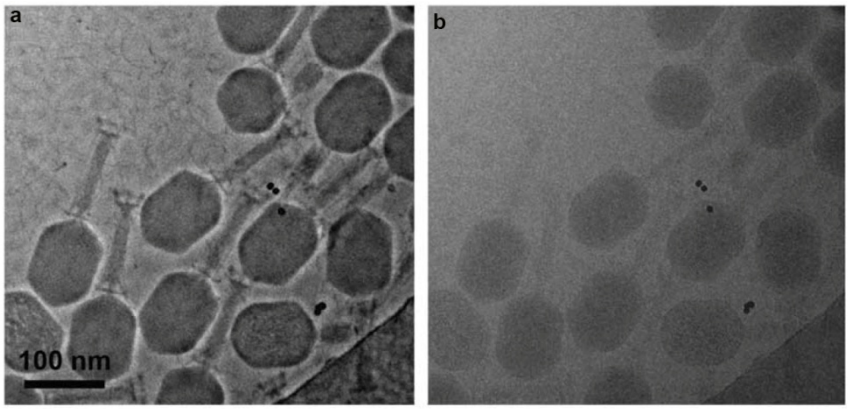
Az elektronmikroszkópban használt Zernike-fázislemez egy ~20 nm vastagságú amorf szénréteg, közepén egy ~1 μm átmérőjű lyukkal. A fázislemezt (legyen az Zernike- vagy a Volta-lemez) az objektívlencse hátsó fókuszsíkjában helyezik el. A Zernike-fázislemez hatékonyságára jellemző képet mutat a 3.3.4. ábra.



3.3.4. ábra. Herpesz szimplex vírus 1B kapszidjának krio-elektronmikroszkópos képe. a/ fázislemez nélkül, b/ Zernike-fázislemezzel (ROCHAT 2011)

A Zernike-fázislemez gyakorlati alkalmazásában problémák jelentkeztek: elektromosan feltöltődött, rövid (néhány nap) élettartamú volt, műtermékeket hozott létre a képen, ami abban nyilvánult meg, hogy a leképezett objektum körül fodrozódás lépett fel. Ezek egy részét szoftveres úton korrigálni lehetett. Végül az elektronnyalábnak a lyukba való centrálása nehézkes volt, és ezért automatikus analízisre nem volt használható.

A Zernike-fázislemezt követte a Volta-fázislemez (Volta Phase Plate, VPP), amely lyukmentes, ~10 nm vastagságú amorf szénréteg, a fáziseltoló foltot elektronnyalábbal hozzák létre benne ~200 ^{o}C hőmérsékleten (DANEV 2014). A folton belül elektromos tér épül be, a működés pontos mechanizmusa nem ismert. Ami biztos, hogy nem elektrosztatikus feltöltődésről vagy a szénrétegre krakkolódott szénszennyeződésről van szó. Működéséhez és az antikontaminációs berendezés működtetéséhez szükség van az említett ~200 ^{o}C hőmérsékletre. Szénszennyezés csökkenti vagy meggátolja a működését. A Volta-fázislemez kiküszöböli a Zernike-lemezzel kapcsolatos gyakorlati nehézségeket: használható élettartama csaknem korlátlan, nem produkál műterméket, nem szükséges pontos centrálás a film felszínén, így automata üzemmódban is jól használható. (A Thermo Fisher Scientific cég minimum négy hónap élettartamot ad meg a Volta-fázislemezre.) Az irodalomban Volta phase plate (VPP) elnevezés mellett más szerzők (MARKO 2016, PRETZSCH 2019) a lyukmentes fázislemez elnevezést (Hole Free Phase Plate, HFPP) használják, de ez a kettő ugyanaz. A fázislemezzel elérik a -90°-os fáziseltolást úgy, hogy megnövelt kontrasztot kapnak fókuszált nyalábbal, szemben azzal, hogy fázislemez nélkül defókuszálással kell elérni a viszonylag kisebb kontrasztnövekedést. A Volta-fázislemez hatásának szemléltetésére álljon itt a 3.3.5. ábra:

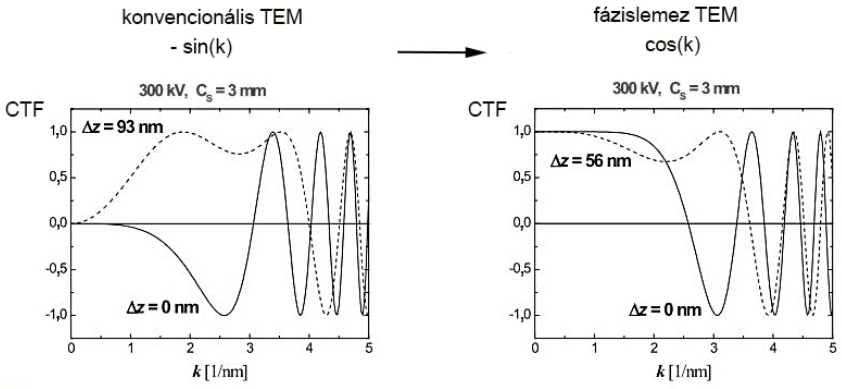


3.3.5. ábra T4 makrofágok elektronmikroszkópos képe a/ Volta fázislemezzel, fókuszban, b/ fázislemez nélkül -5 μm defókuszálással (MARKO 2016)

A 3.3.5. ábra azt mutatja, hogy fázislemezzel fókuszált képen jóval nagyobb kontraszt érhető el, mint fázislemez nélkül -5 μm defókuszálással.

A fázislemezek előnye, hogy megnövelik a jel/zaj viszonyt mintegy kétszeresen, aminek következtében alacsonyabb dózisú besugárzás engedhető meg, mint fázislemez nélkül. Ez a körülmény biológiai minták vizsgálatakor különösen kedvező. A fázislemez okozta jel/zaj viszony növekedés olyankor is előnyként jelentkezik, amikor kis molekulatömegű makromolekuláknál éppen az alacsony jel/zaj viszony miatt nem tudtak korábban elég jó felbontást elérni. Nem véletlen, hogy az eddig rekonstruált legkisebb tömegű molekula krio-elektronmikroszkópos rekonstrukciója (humán hemoglobin, 64kD tömeg) éppen Volta-fázislemezzel készült. A hemoglobin felbontása 3,2 Å volt (KHOSHOUEI 2017).

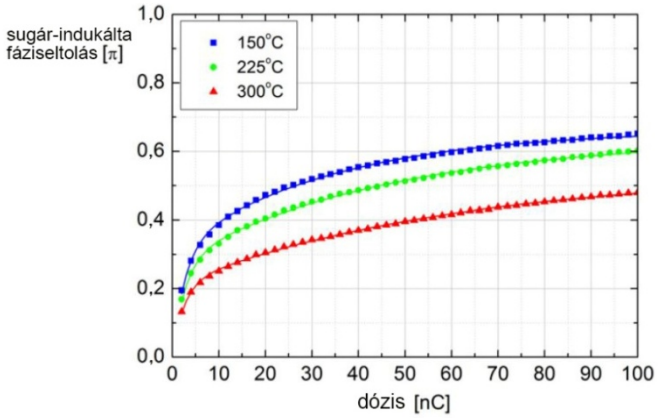
A Volta-fázislemez sikerét 2019-ig több mint 20 közlemény bizonyítja. Ezeket sorolja fel tételesen, a megfelelő hivatkozásokkal Wang közleménye (WANG 2019). Az ideális, azaz 90°-os fáziseltolást adó fázislemez hatását mutatja a 3.3.6. ábra.



3.3.6. ábra. Az ideális (90°-os) eltolást eredményező fázislemez hatása a kontrasztátviteli függvényre. A Δz =0-nak megfelelő jobb oldali, folytonos vonalú görbe azt mutatja, hogy a

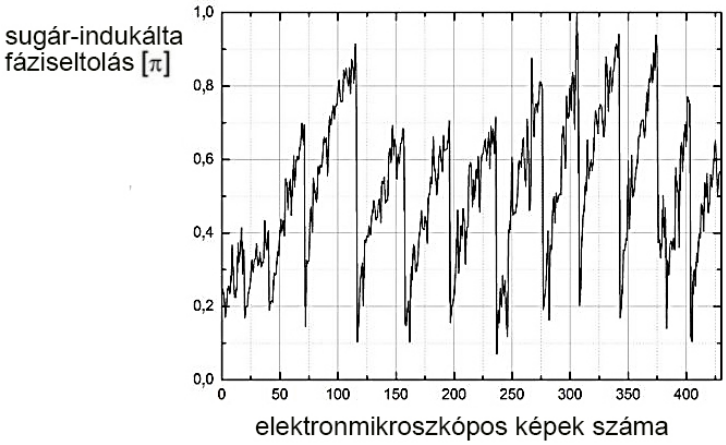
Volta-fázislemez az alacsony térbeli frekvenciák tartományában növeli meg a kontrasztot (DANEV 2017).

A valóságban a Volta-fázislemez nem viselkedik ideálisan: a fáziseltoló hatása (adott szénrétegvastagságot és hőmérsékletet feltételezve) függ a használat során felhalmozódott elektrondózistól (3.3.7. ábra).



3.3.7. ábra. A Volta-fázislemez fáziseltolásának mértéke függ a használat során alkalmazott dózistól. (Paraméter a fázislemezek működési hőmérséklete.) (DANEV 2014)

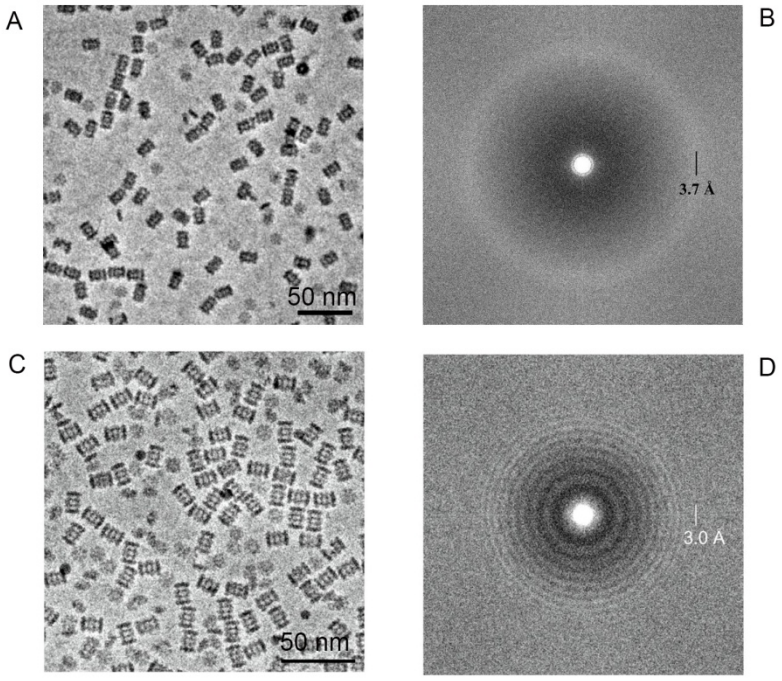
A fáziseltolás dózisfüggésére a kutatók úgy reagáltak, hogy 1,5 óránként a fázislemezt új pozícióba tolták, ahol újrakezdődött az elektromos tér felépülése szénrétegben. (Ez alatt a 1,5 óra alatt ~40 felvételt készítettek, és ~50 nC töltés halmozódott fel az adott pontban.) (DANEV 2017).



3.3.8. ábra. A fáziseltolások változása egy adathalmaz felvétele alatt. A Volta-lemezen a besugárzási pontot 1,5 óránként megváltoztatták, mert a dózisakkumulálódás miatt egyre nőtt a fáziseltolás (DANEV 2017).

A 0,5π fáziseltolás ideális, a 0,2π-nél kisebb vagy 0,8π-nél nagyobb fáziseltolású képeket el túlnyomórész eldobták a vizsgálók. A 3.3.7. és 3.3.8. ábrák azt mutatják, hogy a Volta-fázislemez használatakor is fellépnek gyakorlati nehézségek.

A Volta-fázislemezzel fókuszban készült felvételek olyan problémákat vetettek fel, hogy a képek teljesítményspektrumában (amelyek az elektronmikroszkópos képek Fourier-transzformáltjai) hiányoztak a Thon-gyűrűk, és nem lehetett végrehajtani a fáziskontrasztfüggvény (CTF) szerinti korrekciót (IV.3.4. és IV.3.5. pontok). Ezért áttértek a kicsi (500 nm), de állandó értékű defókuszálásra, és ekkor már a Thon-gyűrűk jól hasznosíthatókká váltak, és a CTF korrekció elvégezhetővé vált. Míg a 20S proteaszómákon 3,2 Å-ös felbontásig jutottak az asztigmatizmus korrekciója nélkül (fázislemez alkalmazása, fókuszban felvett képek), addig az asztigmatizmus korrekciójával 2,4 Å felbontást értek el (fázislemez alkalmazása, -500 nm defókuszálás).



3.3.9. ábra. 20S proteaszómák krio-elektronmikroszkópos képe Volta-fázislemezzel.
A/ A kép fókuszban van. B/ az „A” képről készült teljesítményspektrum. A Thon-gyűrűk hiányoznak, kivéve az amorf jégből származó 3,7 Å-ös gyűrűt. A rekonstrukció felbontása 3,2 Å. A szferikus aberráció nem lett korrigálva (DANEV 2016)
C/ A kép -500 nm defókusszal készült. D/ A „C” képről készült teljesítményspektrum. A Thon-gyűrűk láthatók, az asztigmatizmus korrigálva lett. A rekonstrukció felbontása 2,4 Å (DANEV 2017)

A 3.3.9. ábrán látható előrehaladáshoz arra volt szükség, hogy a CTF-re vonatkozó (2.18) egyenletet úgy egészítsék ki, hogy abban a fázislemez által okozott fáziseltolás is figyelembe vehető legyen, és a kiértékelő programot is módosítani kellett (CTFFIND 4 program, ROHOU 2015).

Kereskedelmi forgalomban is kapható Volta-fázislemezt tartalmazó, fűthető, mikroszkópba szerelhető tartozék (például Thermo Fisher Scientific forgalmazásában). A fázislemezen kívül van benne hely két objektívapertúra részére, és ezek cserélhetők a sugármenetben.

Összefoglalva a fázislemezekről írottakat. Jelenleg a Volta-fázislemez örvend a legnagyobb népszerűségnek. A segítségével elérhető kontrasztjavulás szemmel látható. Használatával csökkenthető a besugárzó áram dózisa, illetve kisebb méretű makromolekulák válnak vizsgálhatóvá a megjavult kontraszt miatt. A fázislemez hatása a kis térbeli frekvenciák leképezésekor nyilvánul meg, de a nagyfrekvenciás tartományban sem rontja a feloldást. A kis térbeli frekvenciák a szemcsék alakjának orientációjának meghatározásánál fontos, ezért a többlépcsős rekonstrukciós folyamat első lépésében a kiindulási 3D modell meghatározásában játszik nagy szerepet. A felsorolt előnyök ellenére még sokat kell javítani a konstrukción, hogy igazán problémamentesen használható legyen. A szerzők kiemelik, hogy eddig még csak „könnyű” esetekben került a lemez alkalmazásra (DANEV 2019).

Irodalom

BAI, X. et al. (2015): How cryo-EM is revolutionizing structural biology, *Trends in Biochemical Sciences,* http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005.

BOOTH, C. et al. (2013): Applications of electron-counting deirect-detection cameras in high-resolution cryo-electron microscopy, *Microscopy and Analysis* 2013 Sept., 13–21.

BOOTH, C. et al. (2019): Detection Technologies for Cryo-Electron Microscopy, S^2C^2 Gatan Workshop, Jan 22. 2019.

BRILOT, A.F. et al. (2012): Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film, *Journal of Structural Biology* 177, 630–637.

DANEV, R. (2017): Phase plate electron microscopy, Guest lecture EMBO Course 2017 London

DANEV, R. és BAUMEISTER, W. (2016): Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate, https://elifesciences.org/articles/13046, https://doi.org/10.7554/eLife. 13046.001

DANEV, R. et al. (2014): Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy, *PNAS* 111, 44, 15635-15640.

DANEV, R. et al. (2019): Single particle Imaging with the Volta Phase Plate, *Microsc. Microanal*. 25 (Suppl. 1) Microscopy Society of America, doi: 10.1017/S1431927619000011

DUBOCHET, J (2017) Nobel-lecture-slides, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06 /dubochet-lecture-slides.pdf

GLAESER, R.M. et al. (2013): Minimizing electrostatic charging of an aperture used to produce in-focus phase contrast in the TEM, *Ultramicroscopy,* December; 135: doi:10.1016/j.ultramic.2013.05.023.

HERZIK, M.A. et al. (2017): Achieving better than 3 Å resolution by single particle cryo-EM at 200 keV, *Nat. Methods* 14(11), 1075–1078.

KHOSHOUEI, M. et al. (2017): Volta phase plate cryo-EM of the small protein complex Prx3, *Nature Communcations* 7, Article number 10534

KOHL, H. and REIMER, L. (2008): Transmission Electron Microscopy, Springer kiadó

MARKO, M. et al. (2016): Practical Experience with Hole-Free Phase Plates for Cryo Electron Microscopy, *Microscopy and Analysis*, Microscopy Society of America, doi:10.1017/S143192761601196X

McMULLAN, G. et al. (2009): Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy, *Ultramicroscopy* 109, 1126–1143.

McMULLAN, G. et al. (2014): Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy, *Ultramicroscopy* 147, 156–163.

PRETZSCH, R. et al. (2019): Investigation of hole-free phase plate performance in transmission electron microscopy under different operating conditions by experiments and simulations, *Advanced Structural and Chemical Imaging* 5,5 (2019) doi:10.1186/s40679-019-0067-z

ROCHAT, R.H. et al. (2011): Seeing the Portal in Herpes Simplex Virus Type 1 B Capsids, *Journal of Virology*, 85,4, 1871–1874.

ROHOU, A. et al. (2015): CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs, *J. Struct. Biol*. 192 (2) 216–221.

VINOTHKUMAR, K. R. an Henderson, R. (2016): Single particle electron cryomicroscopy: trends, issues and future perspectives, *Quarterly Reviews of Biophysics.* e13, 1–25. doi:10.1017/S0033583516000068

WANG, H-W. et al. (2019): Challenges and opportunities in cryo-EM with phase plate, *Current opinion in Structural Biology* 58, 175–182.

WILLIAMS, D.B. and CARTER, C.B. (1996): Transmission Electron Microscopy, A Textbook for Materials Science, Plenum Press New York, ISBN 0-306-45247-2

IV. Egyedi részecskék analízise

Az egyedi részecskék analízisének (Single Particle Analysis, SPA) célja az krio-elektronmikroszkópos felvételek alapján rekonstruálni a biológiai makromolekulák háromdimenziós szerkezetét (I.6. ábra). Egyedi részecskék alatt „izolált, rendezetlen – elvben – azonos szerkezetű" biológiai makromolekulákat értenek (FRANK 2006). A térbeli szerkezet fontos szerepet játszik a biológiai makromolekulák működésében – gondoljunk a fehérjék feltekeredésére vagy a DNS kettős spiráljára –, ezért a krio-EM-ben kitűzött cél, a 3D rekonstrukció rendkívül fontos a szerkezeti biológia szempontjából. Ha figyelembe vesszük, hogy a különböző konformációk egyidejűleg is detektálhatók az SPA-val, akkor egyes esetekben a makromolekulán belüli átalakulások dinamikájára is következtetni lehet.

Az SPA-val vizsgálandó makromolekulákat pufferoldatból ultragyors merítéses fagyasztással (IV.3.2.2. fejezet) úgy fagyasztják meg, hogy a részecskék az oldatban lévő rendezetlenségüket a keletkező amorf (üvegszerű) jégrétegben közel natív állapotban megőrizzék. Pufferek segítségével beállíthatók azok a környezeti feltételek, amelyek a vizsgált makromolekula vagy a konformációik szempontjából optimálisak. A mikroszkópos képeket alacsony dózisú üzemmódban veszik fel, hogy a minták sugárkárosodását elkerüljék. Az azonos egyedekből álló részecskék sokaságának mikroszkópos képei sok különböző irányból felvett 2D vetületnek felelnek meg a részecskék rendezetlen elhelyezkedése miatt.

– SPA felbontása

Az SPA-ban többnyire közel atomi felbontásról beszélünk (near-atomic resolution), ami alatt ~2,5 Å-től ~4,0 Å-ig terjedő felbontást értenek (QUENTIN 2018). A krio-EM-ben egyelőre ritka az atomi felbontás. Például a glutamát-dehidrogenáz 1,8 Å-ös felbontása (MERK 2016)) vagy az apoferritin 1,25 Å-ös felbontása (NAKANE 2020) azt bizonyítja, hogy kedvező esetekben krio-elektronmikroszkópiával (nevezetesen SPA-val) is lehetséges atomi felbontást elérni. A szemléletesség kedvéért: a szerves anyagokban a szén-szén kötés távolsága 1,54 Å.

A krio-EM-ben a felbontást osztályozhatjuk egy másik terminológia szerint is (PASSMORE 2016):

közepes felbontás $\geq$ 3,5Å

nagy felbontás $\leq$ 3,5Å

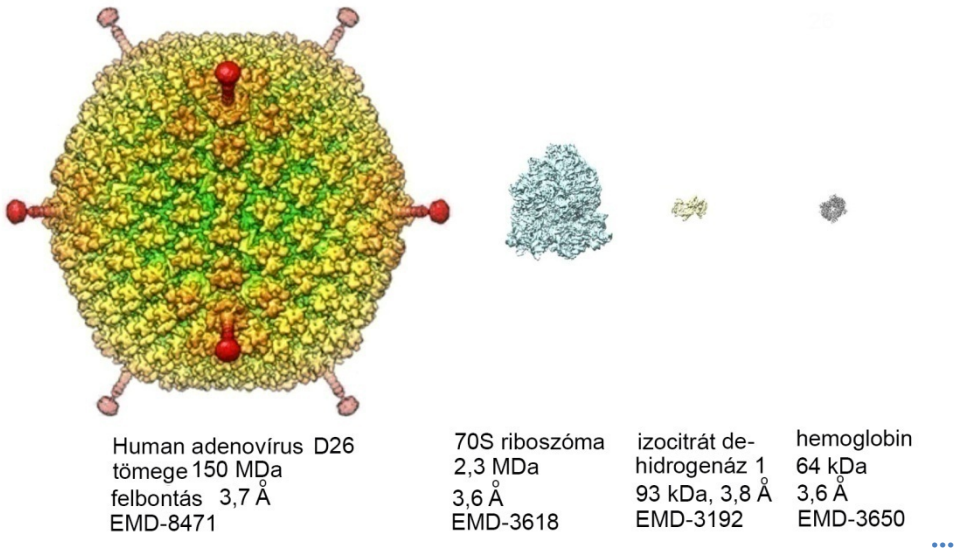
igen nagy felbontás <2,8Å

Annál jobb (nagyobb) a felbontás, minél kisebb a szóban forgó számérték.

A térképek felbontását úgy kell elképzelnünk, hogy 3,5 Å felbontásnál a peptidvázon kívül már sok aminosav-oldalág is láthatóvá válik. 4,8 Å-nél jobb felbontásnál az egyes β-lemezek, 9 Å-

nél jobb feloldásnál már pedig az α-hélixek is láthatók. Ennél rosszabb felbontásban csak a fehérjedomének különböztethetők meg (BAI 2015).

Bár még a kérdésére visszatérünk, annyit előrebocsátunk, hogy a felbontás egyetlen makromolekulán belül sem homogén: pl. a fehérjék központi részében, ahol a peptidváz fix, jobb a felbontás, de a oldalágak végződéseinél rugalmas kötődések miatt a felbontás elromlik.



4.1. ábra. A krio-EM-mel a biológiai makromolekulák széles tömegtartományban vizsgálhatók. A felbontás a 3D rekonstrukcióra vonatkozó becsült értéket jelent. Az EMD-szám az Elektronmikroszkópos Adatbankban tárolt helyre vonatkozik (MURATA 2018).

A 4.1. ábrával azt szemléltetjük, hogy a krio-EM-mel vizsgálható makromolekulák tömege milyen széles tartományban változik: a több száz megadaltontól (MDa) a néhányszor tíz kilodaltonig (kDa). A krio-EM felbontásában inkább a kis tömegű makromolekulák okoznak problémát a gyenge kontraszt miatt. A kiro-EM-ben eddig rekonstruált egyik legkisebb szerkezet az ábrán látható 64 kDa tömegű hemoglobin. Az ábrán feltüntettük a rekonstruált térképek felbontását angström egységekben, és azt az EMD-számot, amely alapján a molekulára vonatkozó vizsgálatokat megtalálhatjuk az Elektronmikroszkópos Adatbankban (EMDB).

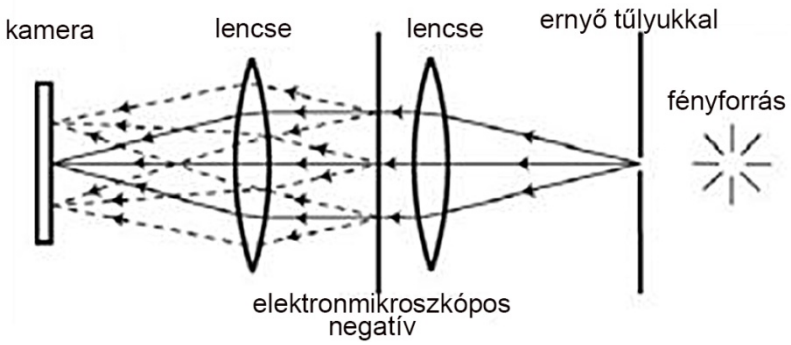
A krio-EM felbontása sokszor nem egyértelmű a különböző kritériumok miatt, ezért a kutatók közleményeikben a megadott felbontási értékek mellett közlik azokat a görbéket is, amelyek alapján az olvasó is meg tudja határozni a felbontást a saját kritériumai szerint. (A felbontásról még a IV.3.7. pontban.)

IV.1. A 3D rekonstrukció korai eredményei

Az I. fejezetben dióhéjban összefoglaltuk a krio-EM történetét mindazok számára, akik gyorsan egy átfogó képet kívánnak kapni. Most viszont kicsit részletesebben vázoljuk azokat a fejlődési lépéseket, amelyek a biológiai makromolekulák krio-EM-mel történő 3D rekonstrukciójának jelenlegi állapotához vezettek. Megemlítünk néhány közleményt is, amelyek még szobahőmérsékletű vizsgálatokra vonatkoznak, de jelentőségük vitathatatlan. Azokat az előzményeket, amelyek az elektronmikroszkópra és segédberendezéseikre vonatkoznak a II. és III. fejezetben tárgyaltuk.

Aaron Klug volt az első, aki 1964-ben felismerte, hogy a 3D rekonstrukcióhoz oly nagyon fontos hullámfázis az elektronmikroszkópos képben benne van, és kinyerhető belőle. Ugyanis a detektorok a röntgen- vagy elektrondiffrakció készítésekor nem mérik a fázist. Egy atomi felbontású elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformáltja hasonló az elektronmikroszkópban felvett diffrakciós képhez, de mégsem azonos vele. A mikroszkópos képből kinyerhető a fázis, a diffrakciós képből nem.

Klug és Berger a kész elektronmikroszkópos képből fényoptikai úton diffrakciót készített (KLUG 1964). Az optikai diffraktométer vázlatát egy későbbi közleményből mutatjuk, amely ugyanabban a laboratóriumban készült, mint az eredeti: (4.1.1. ábra)

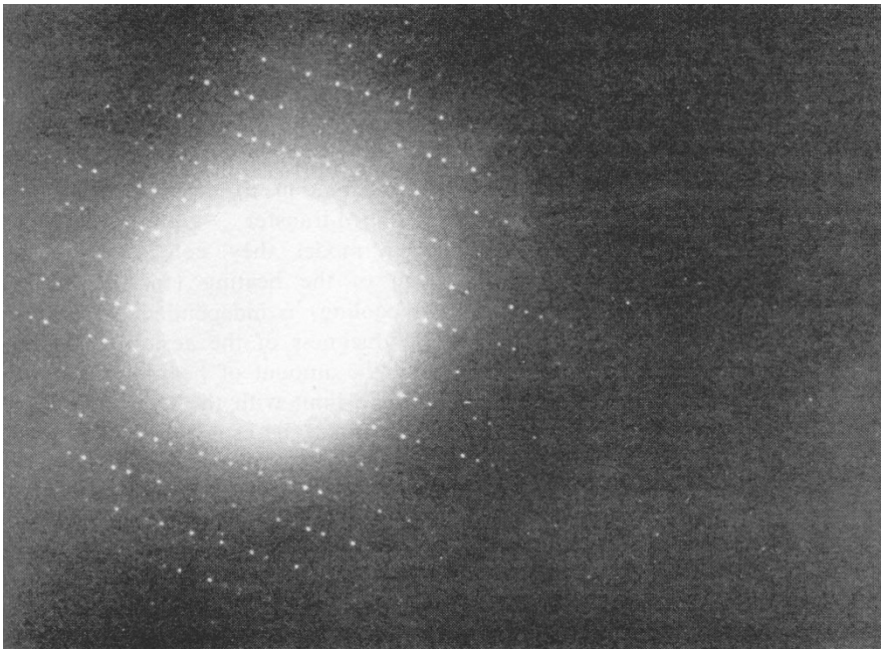


4.1.1. ábra . Optikai diffraktométer vázlata (AMOS 2005)

A koherens fényforrás (lézer) az ábra jobb oldalán látható. A fény egy tűlyukon keresztül halad az első lencse felé, amely párhuzamos sugarakkal megvilágítja az elektronmikroszkópos negatívot. A következő lencse elvégzi a Fourier-transzformációt, és a kamerában lévő filmen rögzíthető a diffrakciós kép. A 60-as években filmes kamerával, későbbi időkben CCD-kamerával rögzítették a diffrakciós képet. Ennek az eljárásnak fontos vonása volt, hogy már nemcsak nagyszámú, kristályosított makromolekulán, hanem egyedi részecskéken is működött. 1968-ban újabb nagy lépést tett előre A. Klug és munkatársa, De Rosier: az elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformációját nem lencse segítségével végezték el, hanem számítógéppel. Mikrodenzitométerrel mérték meg pontról pontra az

elektronmikroszkópos kép optikai sűrűségét, a mikrodenzitométert pedig számítógéppel kötötték össze a Fourier-transzformáció elvégzésére és a további kiértékeléshez (DE ROSIER és KLUG 1968). Ugyanebben a közleményben írták le a háromdimenziós rekonstrukció általános elvét (4.1.4. ábra).

Az 1974-es évet tekintik a krio-elektronmikroszkópia megszületési évének. Mintegy 8 évvel megelőzve Dubochet-t, Taylor és Glaeser cseppfolyó nitrogén hőmérsékletén fagyasztott, hidratált állapotú fehérjét, kataláz kristályt vizsgált elektronmikroszkópban (TAYLOR és GLAESER 1974). A minta jó állapotban megmaradt, ezt bizonyítja a róla készült elektrondiffrakciós felvétel (4.1.2. ábra).



4.1.2. ábra. Kataláz kristály elektrondiffrakciós képe (TAYLOR és GLAESER 1974)

A diffrakciós kép 3,4 Å-ös felbontásából arra lehetett következtetni, hogy a minta nem károsodott a preparáció és a vizsgálat alatt. Az elektronmikroszkóp mintatartó asztalát cseppfolyós nitrogén hűtötte. A kísérlet igazi jelentőségét csak Dubochet ismerte fel, mert ezután szisztematikusan vizsgálta a víz és a vizes oldatok fagyasztáskor fellépő tulajdonságait. Ennek alapján dolgozta ki a merítéses ultragyors fagyasztás módszerét, amelyben a vizsgálandó mintát amorf jég (üvegszerű jég) veszi körbe. Ez vált a krio-elektronmikroszkópos preparálási módszerek fő irányvonalává.

Két évvel későbbi közleményükben (TAYLOR és GLAESER 1976) az üvegszerű jeget is említik annak okaként, hogy a minta miért maradt jó állapotban, de az igazi felismerés mégis elmaradt. Tudták, hogy -140 ^{o}C alatt kellett lenni a minta hőmérsékletének, hogy a jég amorf

állapotban megmaradjon, mégis azt írták, hogy „esetünkben ez a feltétel nem teljesül”. Dubochet Nobel-előadásában elismerte Taylor és Glaeser kísérleteinek motiváló hatását.

1975-ben Unwin és Henderson festetlen, bíbormembrán-kristályokat (!) vizsgált elektronmikroszkóppal szobahőmérsékleten (UNWIN 1975) (HENDERSON 1975). A bíbor membránt bakteriorodopszin nevű integrális membránfehérje alkotja, amely protonpumpaként működik a fotoszintézisben. A fehérje 1:1 arányban komplexet képez a retinál kromoforral, és ez adja a jellegzetes bíborszínét. Egyetlen membrán 100 000-nél több fehérjét tartalmaz, elemi cellánként hármat. Azon tulajdonsága tette vonzóvá az elektronmikroszkópos vizsgálatokra, hogy monoréteg vastagságban kétdimenziós (2D) kristályt képez. A fáziskontraszton alapuló nagy felbontású elektronmikroszkópiában fontos a vizsgálandó minta vékonysága, hogy a számításokban a gyengefázis-objektum közelítés alkalmazható legyen.

A vizsgálandó bakteriorodopszin kristályt *Halobacterium Halobium* kultúrából állították elő, és 0,5-1%-os cukoroldattal védték a dehidratáció és sugárkárosodás ellen.

A szobahőmérsékletű (!) elektronmikroszkópos vizsgálatokban olyan alacsony elektrondózist alkalmaztak, hogy a kapott mikroszkópos képeken szabad szemmel semmiféle szerkezetet nem lehetett látni: a defókuszálással elért fáziskontraszt kisebb volt 1%-nál. A diffrakciós képek viszont mutattak a kristályszerkezetre utaló reflexiókat. A vizsgálatokat a De Rosier és Klug által megadott általános elvek szerint végezték (4.1.4. ábra): a mintát 0-57° tartományban döntötték. 15 diffrakciós képet és 18 elektronmikroszkópos képet készítettek 100 kV-os gyorsítófeszültségen. A képek és diffrakciós képek kiértékelésére a Klug és munkatársai által kidolgozott számítógépes módszereket használták (DE ROSIER és KLUG 1968) (ERICKSON és KLUG 1971).

Első lépésben 7Å-ös felbontást sikerült elérni a 3D modellben (4.1.3. ábra), amiben az is szerepet játszott, hogy nem speciális, hanem kereskedelmi minőségű elektronmikroszkópot használtak.



4.1.3. ábra. Bakteriorodopszin 7Å felbontású 3D modellje 1975-ből (HENDERSON 2018 Nobel Lecture)

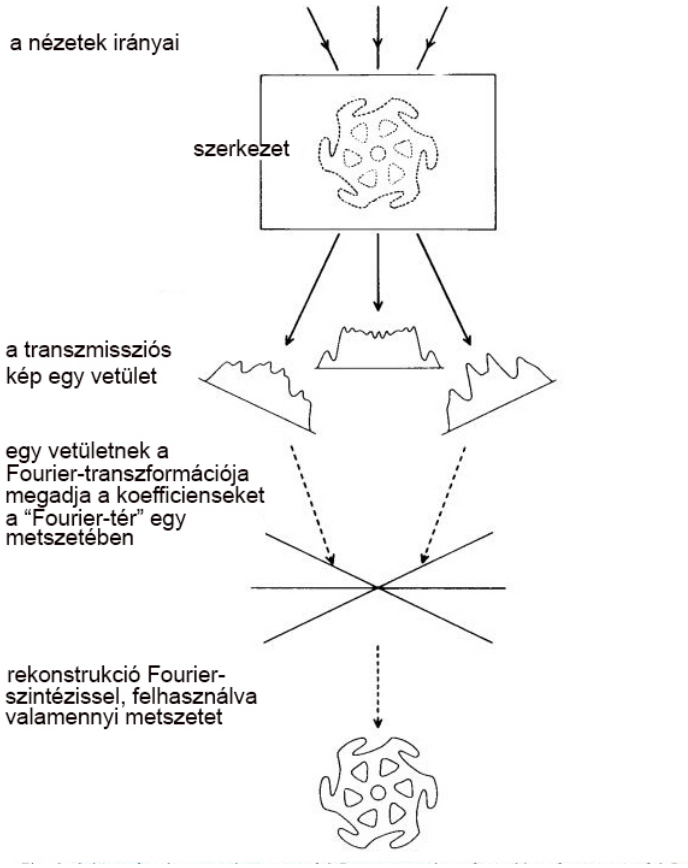
A 4.1.3. ábrán a monomer bakteriorodopszin 3D modellje látható. Az elemi cellában hét α-hélix található. A modell javítására irányuló röntgendiffrakciós kísérleteik nem jártak sikerrel, így fordult Henderson az elektronmikroszkópia irányába. Ez a váltás évekkel később 3,5 Å-ös felbontást eredményezett, sokkal modernebb krio-elektronmikroszkópos körülmények között.

– Az első elektronmikroszkópos 3D rekonstrukció

Egy elektronmikroszkópos minta egy háromdimenziós objektum, amelyet nem lehet úgy rekonstruálni 3D-ben, hogy a fókusz változtatásával rétegenként leképezzük. Ugyanis az elektronmikroszkóp képernyőjén a minta olyan kétdimenziós vetülete jelenik meg, amelyet az egymás feletti rétegek szuperpozíciója hoz létre. Ez a vetület tartalmazza az elektronamplitúdóval és fázissal kapcsolatos információkat, de csak a besugárzónyaláb irányában. Ahhoz, hogy a kétdimenziós képekből háromdimenziós képet lehessen készíteni, sok különböző irányból felvett képre van szükség. Ezt pl. a minta szisztematikus döntésével lehet megvalósítani. De Rosier és Klug nem a mikroszkópos képekből, hanem azok Fourier-transzformáltjából nyerte ki a szükséges adatokat Fourier-koefficiensek formájában. A háromdimenziós kép összeállítása is a Fourier-térben történt, majd a valódi 3D képet inverz Fourier-transzformációval nyerték.

Az elv szemléltetéséhez az egyszerűség kedvéért a minta sok irányú döntéséből csak hármat tekintünk, amelyeket a 4.1.4. ábra tetején lévő három sugár jelez. Az ábra közepén a minta említett három pozíciójának megfelelő vetület látható. A vetületek képének Fourier-

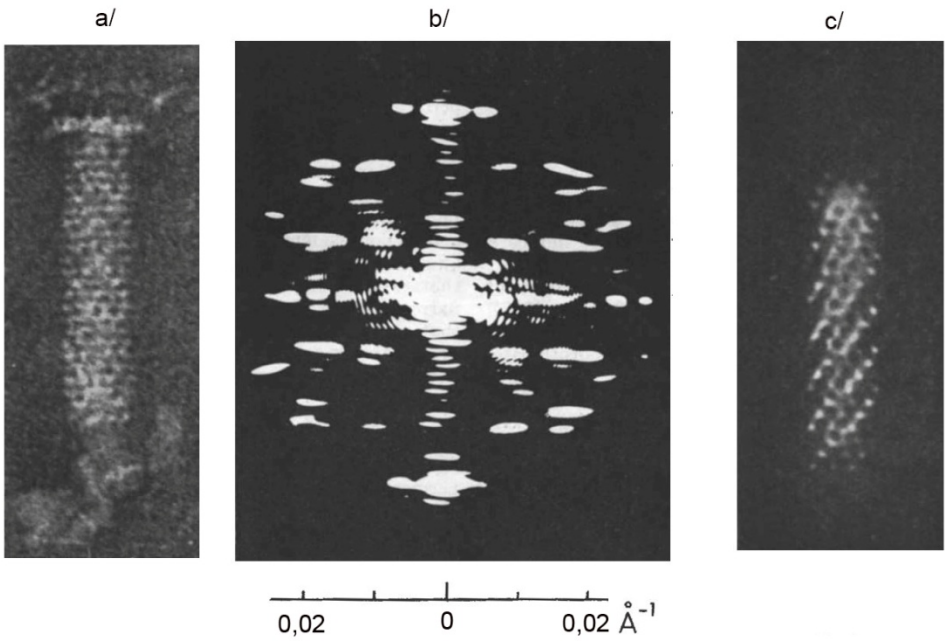
transzformáltjaiból állítják össze a háromdimenziós kép Fourier-transzformáltját, majd ennek inverz Fourier-transzformációjával rekonstruálják a valós térbeli háromdimenziós képet.



4.1.4. ábra. A háromdimenziós rekonstrukció elvének szemléltetése két dimenzióban (DE ROSIER és KLUG 1968)

Kezdetben fontos volt, hogy a vizsgált minta kristályos legyen, mert a kristályrácsban egymás melletti sok azonos helyzetű molekula jobb jel/zaj viszonyt ad, mint a rendezetlen helyzetű molekulák halmaza. Bár a fehérjemolekulák az elemi cellán belül aszimmetrikusan helyezkedhetnek el, az elemi cellák rendeződhetnek szimmetrikus módon, pl. helikális (spirális) vagy ikozaéderes szerkezetbe. Ettől a szimmetriától függ, hogy egy adott felbontású 3D modellhez hány felvételre van szükség. Nagyobb szimmetria esetén kevesebb képre van szükség. Ezért az sem véletlen, hogy az első vizsgálatok szimmetriával rendelkező molekulákon történtek. A 4.1.4. ábrán jelzett folyamat általános érvényű, bármilyen molekulára igaz, függetlenül a szimmetriatulajdonságoktól.

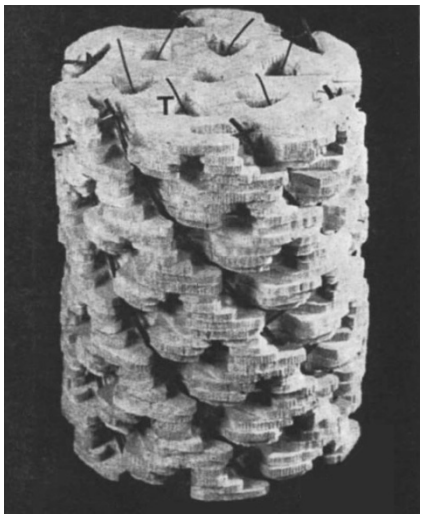
A szerzők negatív festésű T4 bakteriofág farkán mutatták be első sikeres 3D rekonstrukciójukat, amelynek felbontása 35 Å. (Itt még nincs szó a minta hűtéséről, pusztán negatív festéssel védték a mintát. Mint korábban jeleztük, a negatív festés korlátozza a felbontást.)



4.1.5. ábra. a/ Negatív festésű T4 bakteriofág farkának elektronmikroszkópos képe N=500 000× nagyításban; b/ az a/ ábrán látható kép fényoptikai diffrakciós képe; c/ a diffrakciós képből előállított szűrt kép

A Fourier-szintézissel készült 3D modell a 4.1.3. ábrán (a 4.1.5.a/ ábrán látható magasság 1/3-nak megfelelő részlet) jól mutatja a bakteriofág helikális (spirális) felépítését.

Aron Klug munkásságát kémiai Nobel-díjjal jutalmazták 1982-ben, többek között a krisztallográfiai elektronmikroszkópia kifejlesztéséért. Rendkívül fontos volt az a felismerése, hogy az elektronmikroszkópos kép tartalmazza az elektronhullám amplitúdóját és fázisát is, míg a röntgen- vagy elektrondiffrakciós kép a fázist nem tartalmazza.



4.1.6. ábra. A T4 bakteriofág 3D modellje. (A T-vel jelzett drótok a molekula belsejében lévő helikális üregeket jelzik (DE ROSIER és KLUG 1968)

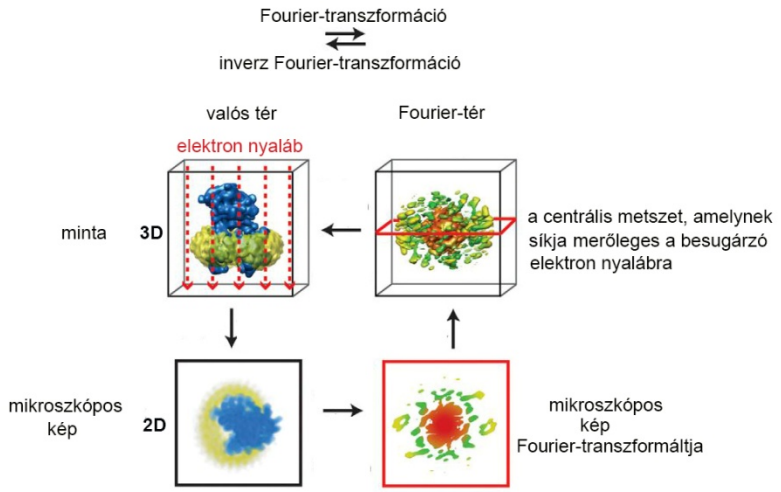
IV.2. Az egyedi részecskék analízisének elmélete

IV.2.1. Vetület-szelet tétel

A kétdimenziós vetületekből a háromdimenziós rekonstrukció az úgynevezett vetület-szelet tételen alapul (angolul projection-slice theorem) (WIKIPEDIA). Eszerint a 3D minta egy mikroszkópos képének Fourier-transzformáltja a minta 3D Fourier-transzformáltjában egy középponton átmenő szeletet ad. Ennek a centrális szeletnek a síkja merőleges a vetítés irányára (azaz a besugárzó elektronnyaláb irányára). Az elvet a 4.2.1. ábrán szemléltetjük:

A vetület-szelet tételt más néven is megtalálhatjuk a szakirodalomban, mint pl. a központi szelet tétele (angolul central line theorem) vagy Fourier-szelet tétele (Fourier slice theorem).

Ha ismerjük a 2D vetületek irányát, akkor ismerjük a megfelelő 2D szeletek irányát is a 3D Fourier-transzformáltban: síkjuk merőleges a vetítés irányára. Így először 2D vetületek (a mikroszkópos képek) irányait kell meghatározni, majd Fourier-transzformáltjaikból összeállítani a 3D képet a Fourier-térben. Végül vissza kell transzformálni a valós térbe, ami a minta 3D képének rekonstrukcióját jelenti.



4.2.1. ábra A vetület-szelet tétel szemléltetéséhez (NOGALES 2015)

IV.2.2. Vetületillesztés

Az egyedi részecskék analízisében a nehézségek abból adódnak, hogy a vetületek irányai nem ismertek. Továbbá az elektronmikroszkópos képek kontrasztszegények a minták kis rendszáma miatt, és zajosak az alkalmazott alacsony dózisú leképezés miatt. Ezért a képek átlagolásával javítják a jel/zaj viszonyt.

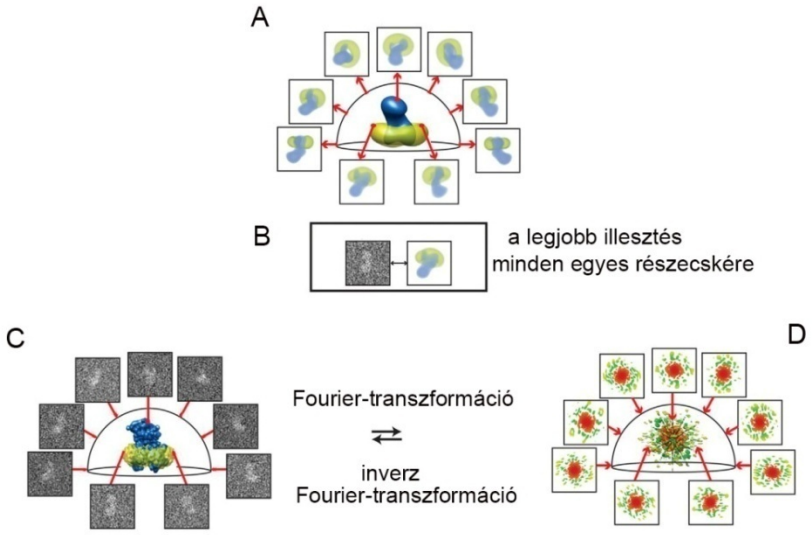
A 3D rekonstrukció – a matematika nyelvén szólva – hiányos, rosszul kitűzött, inverz feladat (angolul incomplete, ill-posed and inverse problem) (SCHERES 2012). 3D alakzatból könnyű meghatározni a 2D vetületeket, visszafelé (ami a SPA feladata) sokkal nehezebb, innen az inverz jelleg. Minthogy a részecskék orientációja ismeretlen, ettől hiányos matematikailag a

feladat. (A röntgenkrisztallográfia is a hiányos matematikai problémák közzé tartozik, ott a sugárzás fázisa hiányzik.) A nagy zaj és a részecskék orientációjának hiánya miatt a kísérleti adatok nem határozzák meg egyértelműen a megoldást, ezért nevezik a feladatot matematikailag rosszul kitűzöttnek.

Viszont vannak közelítő módszerek, és ezen alapuló szoftverek, amelyek nagyon jó közelítéseket eredményeznek. Furcsa módon a legnagyobb nehézséget a krio-EM-ben nem a fent jelzett matematikai probléma, hanem a helyes minta-előkészítés jelenti. A pozitív üzenet az, hogy számítógépes rekonstrukcióhoz szükséges programok könnyen végrehajthatók anélkül, hogy a vizsgáló a programok mögötti matematikai hátteret ismerné. Az utóbbi évek másik pozitív üzenete, hogy a minta-előkészítő automaták bámulatos eredményeket érnek el, így a mintapreparálás sem olyan nehéz, mint évekkel ezelőtt volt.

A leggyakrabban alkalmazott 3D rekonstrukció az úgynevezett vetületillesztés (projection matching). a 4.2.2. ábra segítségével magyarázható.

A rekonstrukcióhoz meg kell határozni az elektronmikroszkópos képek (4.2.2./C ábrán látható fekete-fehér képek) egymáshoz viszonyított orientációját, ami három szöggel jellemezhető (ún. Euler szögek, 4.2.4. ábra). Ez a szögmeghatározás számítógépes úton iterációs eljárással történik. Az első lépésben fel kell tételezni a vizsgálandó mintához hasonló 3D szerkezetet (a továbbiakban *kezdeti 3D modell*), és abból számítógéppel vetületeket generálni, amint az a



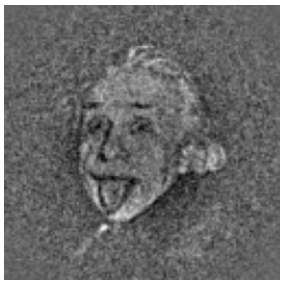
4.2.2. ábra. A vetületillesztés a krio-elektronmikroszkópos 3D rekonstrukció leggyakrabban alkalmazott változata (lásd a szöveget) (NOGALES 2015)

4.2.2./A ábrán látható. Utána összehasonlítják a mikroszkópos képeket a számítógéppel generált vetületekkel: a gép kiválasztja a legjobban összeillő kísérleti és elméleti vetületeket

(4.2.2./B ábra). (A generált képeknél a szögek már ismeretek!) A legjobban összeillő mikroszkópos képek (fekete-fehér képek a 4.2.2./C ábrán) Fourier-transzformáltjaiból a vetület-szelet tétel alapján összeállítható egy 3D alakzat a Fourier-térben (4.2.2./D ábra). Ez utóbbiból inverz Fourier-transzformációval előállítják a 4.2.2./C ábra közepén látható 3D objektumot.

Az iteráció következő lépésében az imént meghatározott 3D objektumot tekintik a 4.2.2./A ábra szerinti kezdeti 3D modellnek, és újragenerálják belőle a vetületeket. És folytatódik az imént leírt folyamat. Az iteráció folyamán egyre javulnak az orientációk, nő a felbontás, és a rekonstruált objektum közelít a valódihoz. Az iterációt ott állítják le, ahol már nem nő a felbontás.

A gyakorlatban a problémát a 4.2.2./A ábrán látható kezdeti 3D modell megválasztása jelenti. Ugyanis ha rosszul választják meg a kezdeti modell alakját, akkor az iterációk egy lokális minimumhoz fognak konvergálni, és helytelen 3D objektumot generálnak. A szakirodalomban Einstein egyik ismert fényképét hozzák fel példának arra, hogy a kezdeti modell megválasztása az iterációk végeredményére is rányomhatja bélyegét (4.2.3. ábra).



4.2.3. ábra. Ezer random zajú kép illesztésekor a kezdeti modellként alkalmazott Einstein-kép az iterációk végén Einstein-képet eredményezett (SHATSKY 2009).

„Einstein from noise” néven említi az irodalom azokat az esetet, amikor a kutató szilárd meggyőződése, hogy részecskék képeit használta fel a vetületillesztéskor, és valójában csak zaj volt jelen a képben, részecske nem. Az ilyen csapdák elkerülésének egyik módja, hogy felhasználandó mikroszkópos képek kiválogatásakor ellenőrzik a kép minőségét, hogy a zajban tartalmaznak-e nagy felbontású információkat. Ez kiderülhet abból, hogy a teljesítményspektrumuk mutat-e Thon-gyűrűket, és azok milyen felbontásig terjednek ki.

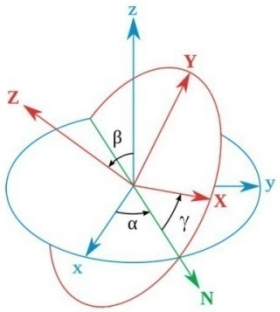
Mielőtt a kezdeti 3D modellek generálási lehetőségeire rátérnénk, megismételjük, hogy az SPA előnyeinek egyike az általános alkalmazhatóság: nem szükséges kristályos vagy szimmetriatulajdonságokkal rendelkező minta.

IV.2.3. Módszerek a *kezdeti 3D modell* generálására

Mint jeleztük, a rekonstrukció folyamatában a kritikus lépés a 4.2.2./A ábrán mutatott kezdeti 3D modell megválasztása vagy létrehozása. Alább bemutatunk három ún. referenciamentes módszert a kezdeti 3D modell generálására. (A kevésbé türelmesek a IV.2.3.1.–IV.2.3.3. pontokat átugorhatják, mivel az utóbbi időkben a IV.2.3.4. és a IV.2.3.5. pontban említett elektrontomográfiát, illetve a *de novo* és *ab initio* módszereket alkalmazzák a kezdeti 3D modell generálására.)

IV.2.3.1. Szögek helyreállítása

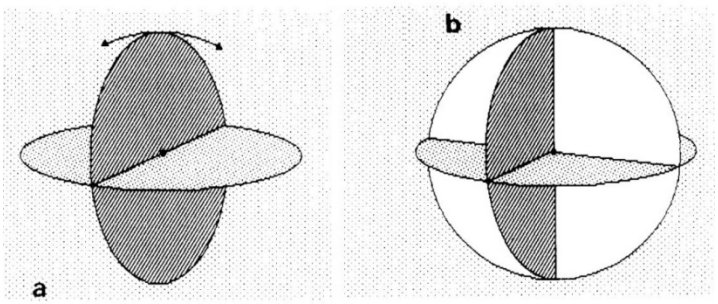
Az elektronmikroszkópiában a háromdimenziós rekonstrukció általános vonása 5 paraméter, úgymint az x,y koordináta, a vizsgált molekula helyzetére jellemző három szög, az ún. Euler-szögek meghatározása (4.2.4. ábra). A szögek meghatározását megelőzi egy transzláció, amellyel a kivágott részecskét a kép közepébe tolják, Egy részecske helyzete a pirossal jelölt XYZ koordinátarendszerben meghatározható az $\alpha, \beta,$ és γ szögekkel a kékkel jelölt xyz referencia-koordinátarendszerhez képest. A két koordinátarendszer xy síkjainak metszésvonalát N-nel jelöltük.



4.2.4. ábra Euler-szögek

Az Euler-szögeket többféle módon szokás definiálni. A geometriai definíció szerint (4.2.4. ábra) az α (vagy ϕ) az x- és az N-tengely, a β (vagy θ) a z- és Z-tengely közötti szöget, a γ (vagy ψ) pedig a X- és N-tengely közötti szöget jelöli. A 3D modell középpontja egyben az Euler-gömb középpontja.

Van Heel arra alapozta az Euler-szögek meghatározását, hogy legalább három részecskevetületnek (mikroszkópos képnek) kell rendelkezésre állnia, hogy a meghatározás egyértelmű legyen. Módszerét a szögek helyreállításának fogjuk nevezni (angolul angular reconstitution).



4.2.5. ábra. A közös központi vonal (common central line) magyarázatához (lásd a szöveget) (VAN HEEL 1987)

Amennyiben egy 3D részecske két vetületének csak egy közös metszésvonala van (4.2.5./a) ábra), akkor a részecske helyzetét nem lehet egyértelműen meghatározni, mert a részecske a nyíllal jelölt irányba szabadon elfordítható. Amikor van egy harmadik vetület is (fehér körrel jelölve a 4.2.5./b ábrán), akkor már két közös centrális vonal van. (Amikor valós térben dolgoznak, akkor az a/ ábrán mutatott metszésvonalat közös döntési tengelynek (common tilt axis) nevezik, amikor a Fourier-térben vizsgálódnak, akkor közös központi vonalnak (common central line) nevezik.)

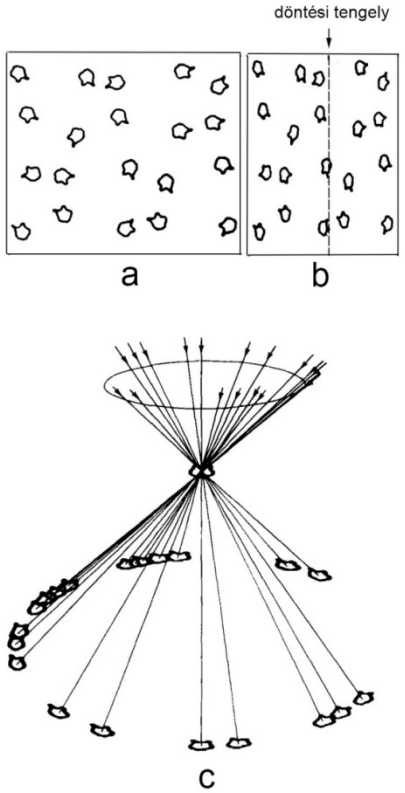
Van Heel az Euler-szögek meghatározását egy többváltozós statisztikai osztályozási algoritmus segítségével valósította meg, amely a zajos képekből jó jel/zaj viszonyú képeket hozott létre. Az eljáráshoz nem volt szükség a mintatartó döntésére. A kritika szerint (CONG 2010) van Heel módszere különösen alkalmas nagy szimmetriával rendelkező részecskék kezdeti 3D modelljének generálására, de szimmetria nélkül helytelen szerkezetekhez vezethet.

IV.2.3.2. Random kúpos döntés

A random kúpos döntésnek (angolul random conical tilt) nevezett rekonstrukciós módszer végrehajtásához a mintatartó rostélyra kitüntetett orientációban felfekvő részecskékre van szükség (RADEMACHER 1987). A kitüntetett orientáció kettőre redukálja az ismeretlen szögek számát. Az is szükséges még a részecskéket jellemző szögek meghatározásához, hogy a kitüntetett orientációban, a minta síkjában a szemcsék szinte minden forgásirányt felvegyenek. Ezt Rademacher néhány száz részecske segítségével érte el.

Az SPA-ban jó szolgálatot tehet ez a módszer a kis felbontású kezdeti 3D modell megalkotásához, ha el tudjuk érni, hogy a mintában a vizsgálandó részecskék kitüntetett orientációt vegyenek fel. A Rademacher által bemutatott példában (*Escherichia coli* 50S riboszóma alegységek) a részecskék hossztengelye párhuzamos a mintatartó rostély síkjával. A kitüntetett orientáció létrehozására különösen alkalmas a negatív festés (amit krio-EM előtti

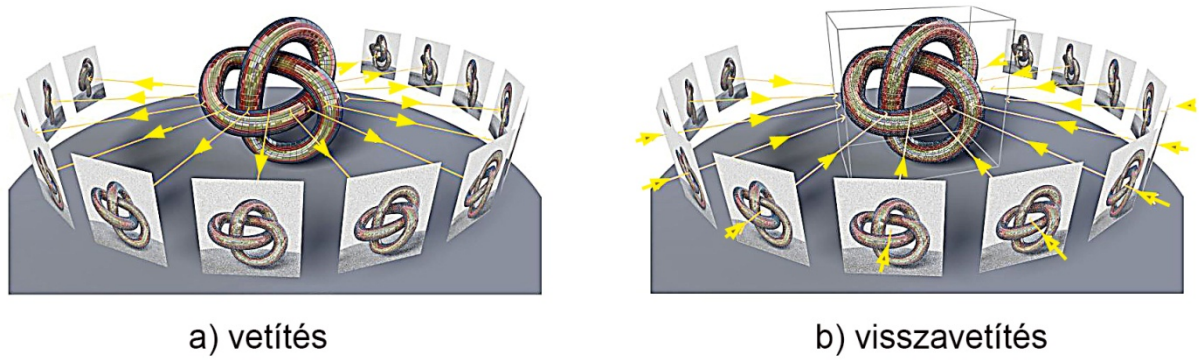
elővizsgálatokban szoktak alkalmazni), de krio-EM vizsgálatokkor is előfordul, hogy a részecskék akaratunk ellenére kitüntetett orientációt vesznek fel. Ez bekövetkezhet feltehetően a részecskéknek a levegő/víz határfelülettel való kölcsönhatása miatt. Ilyenkor a kitüntetett orientáció csökkentésére vagy megszüntetésére detergenssel csökkentik a víz felületi feszültségét (CHENG 2015 Primer).



4.2.6. ábra. A random kúpos döntés módszerének magyarázatához (RADEMACHER 1987)
a/ kitüntetett orientációjú 50S riboszómák elhelyezkedése vízszintes síkban
b/ az a/ ábrán látható kép megváltozása a minta döntése után
c/ a kísérleti feltételek (a minta döntése, a részecskék kitüntetett orientációja, valamint a vízszintes síkban való sokféle forgásirányú elhelyezkedésük) miatt olyan kép áll elő, amely egyenértékű egy olyan döntési sorozat eredményével, amelyben a vetítési irányok egy kúp palástján helyezkednek el.

Rademacher a mintát nagy szög (50°) alatt döntötte meg. Egyetlen mikroszkópos kép alapján olyan részecskevetületeket kapott, mintha egy döntési sorozatot végzett volna, amelyben a vetítési irányok egy kúp palástján helyezkednének el (4.2.6./c ábra).
A döntött mintáról készített mikroszkópos képet a részecskéknek a vízszintes síkban lévő szögállásának meghatározásához használta Rademacher, de később nem használta fel a 3D rekonstrukcióban. Minthogy a minta döntése geometriai okok miatt korlátozott (manapság +70°

és -70° közötti tartományra), a 3D rekonstrukcióban egy széles szögtartományból hiányzik az információ. Ezt a szakirodalomban a hiányzó kúp (missing cone) elnevezéssel illetik, mert az információ kúp alakban hiányzik a reciprok térben. A rekonstrukció szempontjából ez abban nyilvánul meg, hogy a rekonstruált objektum a minta síkjára merőleges irányba megnyúlik. Rademacher módszerében a hiányzó kúphoz köthető torzítás megjelenik, ennek ellenére Cheng az összefoglaló cikkében (CHENG 2015 Primer) ezt az eljárást „jóformán üzembiztosnak” (virtually foolproof) nevezi a kezdeti modell megalkotása szempontjából.
A rekonstrukció az ún. súlyozott visszavetítéssel történt.



4.2.7. ábra. A vetítés és visszavetítés szemléltetése (JEOL USA)

IV.2.3.3. Merőleges döntés módszere

Az SPA-ban a kezdeti 3D modell generálására a random kúpos döntésnél alkalmasabb a merőleges döntés (orthogonal tilt) módszere (LESCHZINER 2006), amelynél egy +45°-os és egy -45°-os mintadöntést alkalmaznak az elektronmikroszkópos felvételek exponálásakor. A random kúpos módszertől abban is eltér, hogy a sikeres megvalósításhoz rendezetlenül elhelyezkedő molekulákra van szükség, amit az amorf jégbe történő ultragyors fagyasztással biztosítani lehet. További eltérés, hogy ebben a módszerben kiküszöbölik a hiányzó kúp (missing cone) jelenségét, azaz nem lépnek fel torzítások a rekonstruált objektumban az elégtelen információ miatt. A két módszer közös vonása, hogy a Frank által kifejlesztett SPIDER szoftvercsomagot használja SPA adatfeldolgozásra (FRANK 1996).

IV.2.3.4. Elektrontomográfia alkalmazása a kezdeti 3D modell megalkotásához

A kezdeti 3D modell létrehozása a fenti módszereknél pontosabban történhet az elektrontomográfia módszerével (V. fejezet), amikor a mintát széles szögtartományban fokozatosan döntik ismert szögekkel, és közben mikroszkópos képeket vesznek fel.

IV.2.3.5 Ab initio vagy de novo módszerek alkalmazása

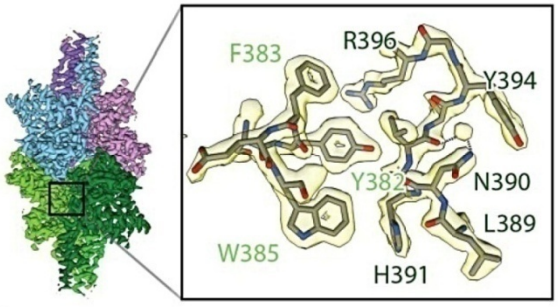
A biológiai informatikában az *ab initio* vagy *de novo* kifejezés (mindkettő latin eredetű, jelentésük kezdettől fogva) olyan algoritmusokra vonatkoznak, amelyek nem használnak segédeszközöket, templátokat a fehérjék harmadlagos szerkezetének meghatározására, hanem a primér szerkezetből kiindulva számolják azokat.

A legújabb 3D rekonstrukciós szoftverekben (pl. RELION és cryoSPARC) külső segítség vagy külön mérések igénybevétele (pl. mintadöntés) nélkül számolják a kezdeti 3D modelleket a rendelkezésre álló 2D vetületekből (IV.3.6. fejezet).

IV.2.4. Sűrűségtérkép

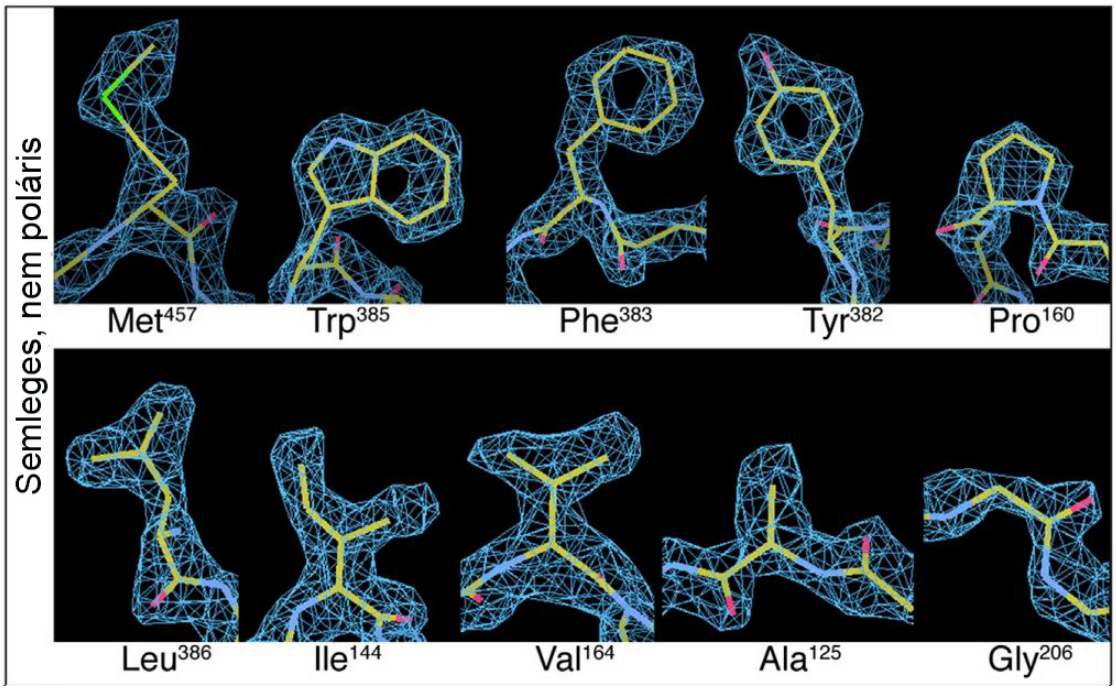
A transzmissziós elektronmikroszkópos képek a vizsgált objektumnak olyan vetületei, amelyek a sűrűségeloszlást mutatják az orvosi röntgenképhez hasonlóan. Sűrűségen nem anyagsűrűséget kell érteni, hanem a mintában lévő elektromos potenciál sűrűségét. Az elektromos potenciált a pozitív töltésű atommagok és a negatív töltésű elektronok adják. Ez eltér a röntgenkrisztallográfiában érvényes elektronsűrűségtől, mert ott az kizárólag az elektronoktól származik. A röntgensugarak szóródása az atommagokon elhanyagolható. Az exponált elektronmikroszkópos film optikai sűrűsége lineárisan függ a potenciálsűrűségtől, legalábbis a gyenge-fázis-objektum közelítésben (2.16. egyenlet). A gyenge-fázis-objektum közelítés akkor érvényes, ha a vizsgált minta nagyon vékony és kis atomsúlyú elemekből épül fel. A krio-EM-mel vizsgált mintákra ezek a tulajdonságok többnyire teljesülnek.

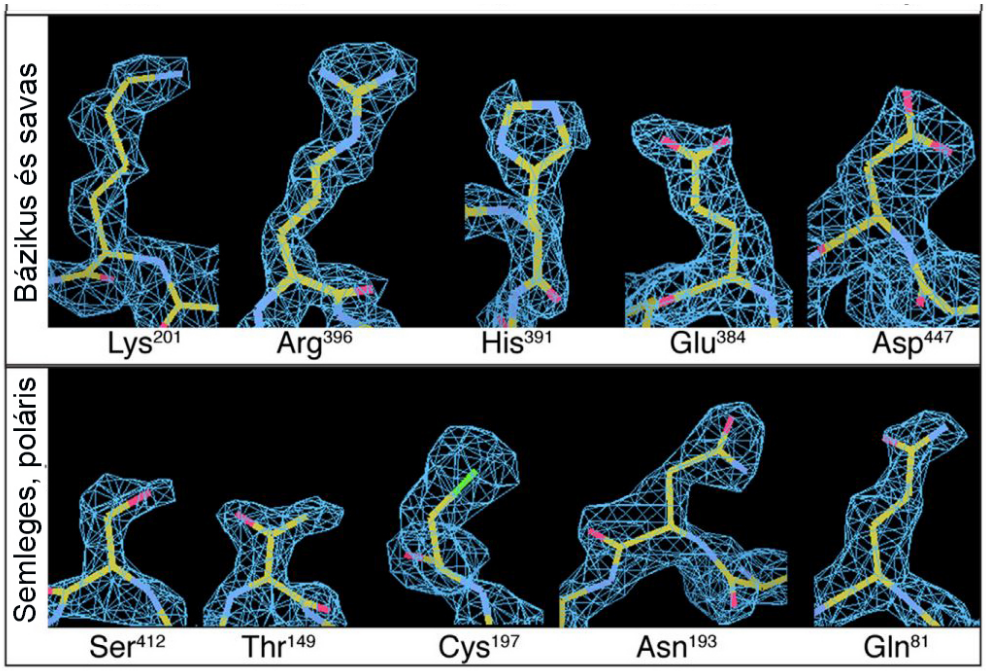
A krio-EM „őskorában” a röntgenkrisztallográfiából átvett elektronsűrűség-térkép elnevezést használták. Később a krio-elektronmikroszkópos sűrűségtérkép elnevezést választották. Ezt a hosszú elnevezést egyszerűsítve sűrűségtérképnek vagy még egyszerűbben térképnek nevezik. Ezek a térképek kerülnek be az Elektronmikroszkópos Adatbankba. A háromdimenziós sűrűségtérkép a rekonstruált 3D objektum (BAKER 2010).



4.2.8. ábra. Példa a sűrűségtérképre. Balra a glutamát-dehidrogenáz 3D sűrűségtérképe krio-EM felvételek alapján. A különböző színek az enzim hat alegységét jelölik. Jobbra egy kinagyított részlet, amelyben a halványsárga rész a 2D sűrűségtérkép, a színes pálcikák pedig az utólag belerajzolt atommodellt jelölik. A betűk az aminosavakat (a 6.2.1. ábrán látható egybetűs jelölések), a számok a peptidláncban elfoglalt helyüket jelölik (MERK 2016).

Egy másik példa a sűrűségtérképre, amelyet a 4.2.9. ábrán kék háló jelez.

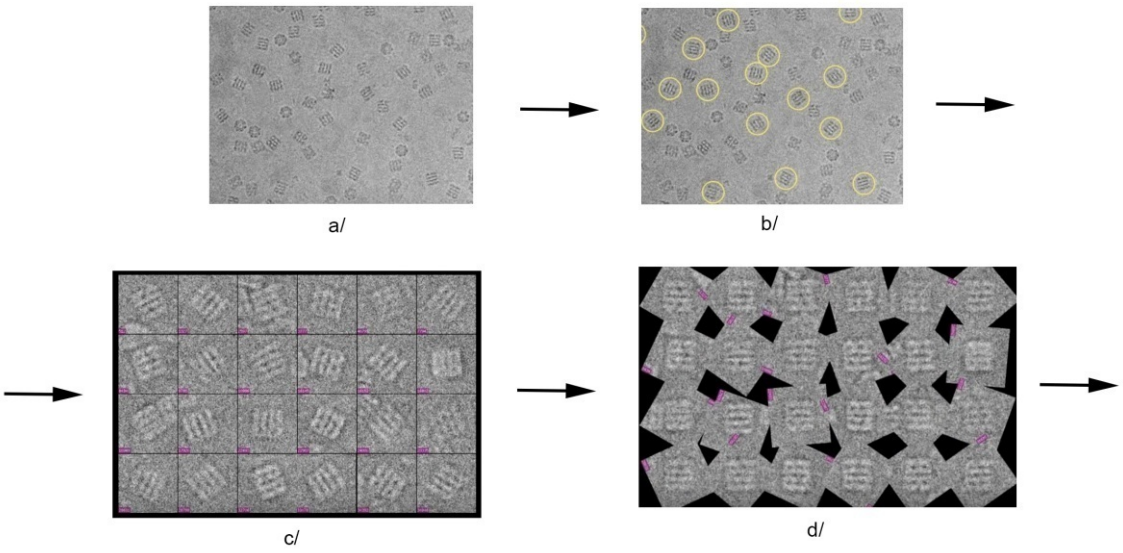


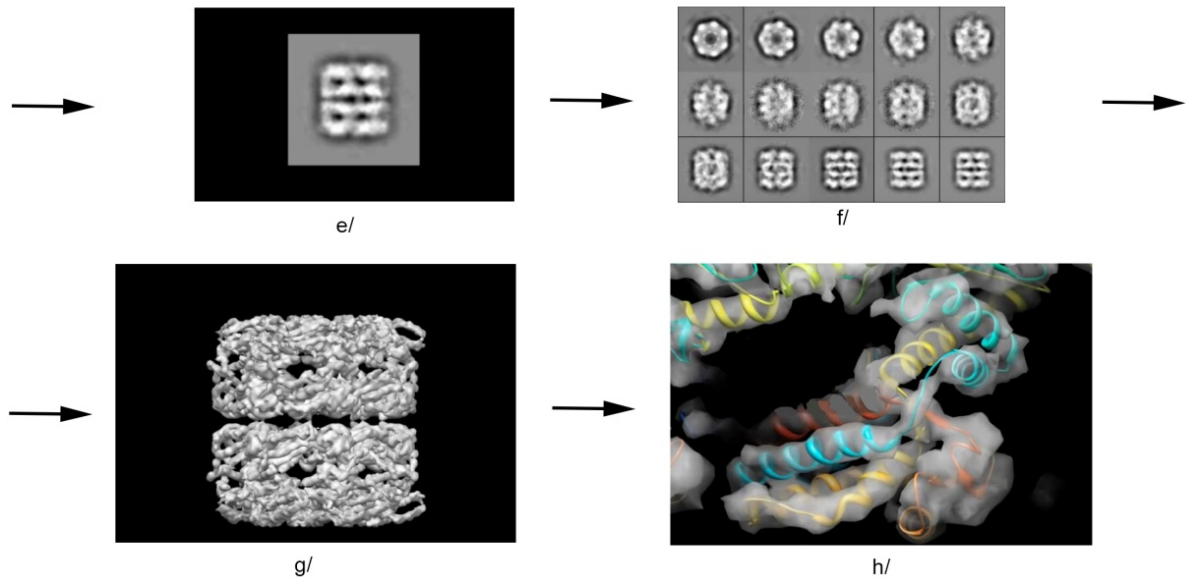


4.2.9. ábra. A kékkel rajzolt háló újabb példa a sűrűségtérkép megjelenítésére. Glutamát-dehidrogenáz krio-EM vizsgálataiból származnak a fenti fehérjealkotó aminosavak sűrűségtérképei. Az atommodellt színes pálcikák jelzik (MERK 2016).

IV.3. Az egyedi részecskék analízisének gyakorlata

A III. fejezetben tárgyaltuk a krio-elektronmikroszkópot, a direkt elektrondetektorokat és fázislemezeket. Ezek képezik a SPA gyakorlatának eszközoldalát. Jelen fejezetben a gyakorlati rész többi elemét fogjuk nagy vonalakban tárgyalni, majd későbbi fejezetekben tovább árnyalni. A SPA menetét leegyszerűsítve a 4.3.1. ábrán mutatjuk meg:





4.3.1. ábra. Az egyedi részecskék analízisének vázlatos menete (LANDER 2009)

a./ A vizsgálandó makromolekula krio-elektronmikroszkópos képe.

b./ A zajos képen kiválasztják azokat a részecskéket, amelyek ugyanabban az orientációban fagytak be az amorf jégbe.

c./ A kiválasztott részecskéket kivágják a mikroszkópos képből egy négyszögletes ablak formájában (angolul windowing vagy boxing vagy extraction), és az ablak közepére tolják.

d./ A részecskéket úgy forgatják be, hogy ugyanazon irányba álljanak, majd összegzik és átlagolják azokat.

e./ Az összegzés és átlagolás után előálló képben a jel/zaj viszony sokkal jobb, mint az elektronmikroszkópos képen (4.3.1./a ábra) látható, és ezért pontosabb információt ad erről az orientációról.

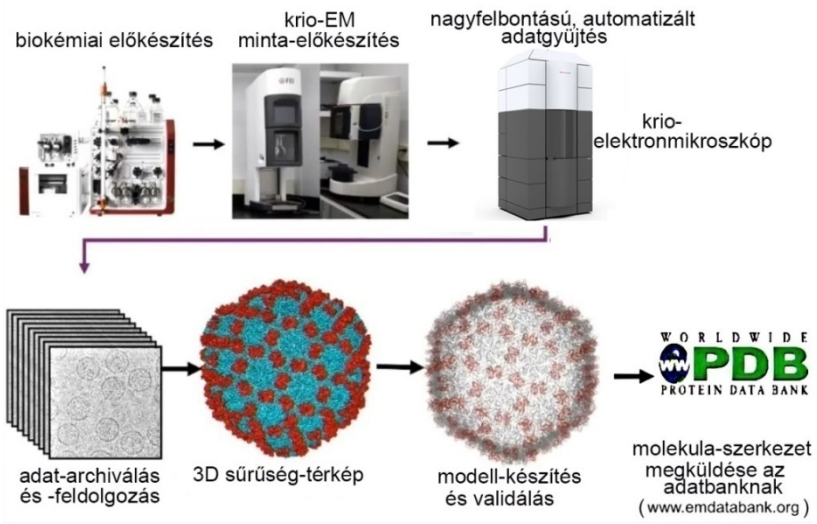
f./ Minthogy az összegzést és átlagolást nemcsak egyetlen orientációjú részecskére hajtják végre, hanem valamennyi „jól viselkedő” (hasznosítható) részecskére, utána ún. osztályokat képeznek a különböző orientációkra.

g/ Az összegzett és átlagolt, különböző orientációjú részecskéket számítógépes úton összekombinálják 3D objektummá.

h./ Nagy nagyításban megláthatók azok a szerkezeti vonások, amelyekből következtetni lehet arra, hogyan működik a makromolekula.

IV.3.1. Az egyedi részecskék analízisének munkamenete vázlatosan

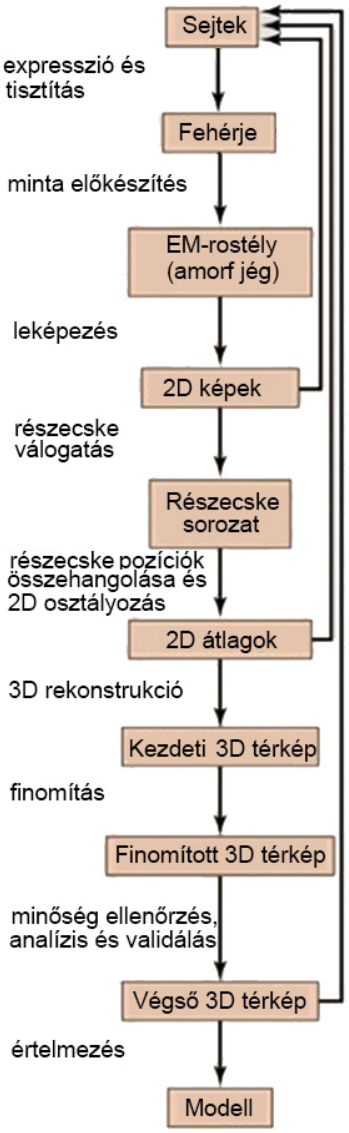
A krio-EM vizsgálatokat meglehetősen szisztematikusan kell felépíteni, mert egy előzetes vizsgálatban elkövetett hiba az egész mikroszkópos vizsgálatot megnehezítheti, illetve meghamisíthatja. A munkamenetet vázlatosan a 4.3.2. ábrán mutatjuk.



4.3.2. ábra A krio-EM menete vázlatosan

Az első lépésben a vizsgálandó oldat kémiai tisztaságát kell ellenőrizni és tisztítással biztosítani (biokémiai előkészítés). Ezt követi a minta-előkészítés. A nagy felbontású krio-elektronmikroszkópos vizsgálatokat kisebb felbontású szűrővizsgálatok előzik meg, pl. negatív festésű mintákon. (Ez a 4.3.2. ábrán nincs jelezve.) Ezekhez olcsóbb, kisebb teljesítményű termikus volfrámkatódú, ún. diagnosztikai elektronmikroszkópot használnak. A nagy felbontású krio-EM adatgyűjtés nagy mértékben automatizált. Meglehetősen nagy mennyiségű adatot kell gyűjteni, amiből először kétdimenziós, majd háromdimenziós krio-EM sűrűségtérképet készítenek. A térképekből készülnek a molekulamodellek, amelyek érvényességét ellenőrizni (validálni) kell. Végül a kész molekulamodell adatai a fehérjeadatbankba (Protein Data Bank, https://www.rcsb.org/) vagy az elektronmikroszkópos adatbankba kerülnek (Electron Microscopy Data Bank, EMDB, https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/). Az ezekhez való hozzáférés ingyenes.

A krio-EM menetét egy másik, kevésbé képszerű ábrával részletesebb is bemutatjuk, amely segít abban, hogy a következő paragrafusokban leírtak egységes képpé álljanak össze. (4.3.3. ábra) (CHENG 2015 Primer)



4.3.3. ábra. A „nagy felbontású” finomítás menete. A 2D képekből és a kezdeti 3D modellből iterációval történő, 3D modellt eredményező eljárást finomításnak nevezik (CHENG 2015 Primer).

Az eredeti közleményben egy „kis felbontású” finomításnak nevezett ábrarészlet is látható, ami a krio-EM-et megelőző negatív festéses eljárást mutatja. Hasonló a 4.3.3. ábrán látható munkamenethez, de a 2D átlagok képzésével véget ér. Minthogy a negatív festéses eljárás gyors, és kontrasztos képet ad, ennek segítségével győződnek meg arról, hogy a minta monodiszperz, nem aggregálódott részecskékből áll, és a heterogenitása is megfelelő. Ez a vizsgálat az esetek többségében nem alacsony hőmérsékleten történik.

Ezek után a minta-előkészítéssel (IV.3.2), adatgyűjtéssel (elektronmikroszkópos képek felvételével) (IV.3.3) és képanalízissel (IV.3.4. és IV.3.5.) fogunk foglalkozni.

Az adatfeldolgozás részletesebb ismertetésére a RELION szoftver kapcsán térünk vissza (IV.3.6).

IV.3.2. Minta-előkészítés az egyedi részecskék analíziséhez

IV.3.2.1. Fehérjék elválasztása, tisztítása.

A krio-EM vizsgálatok előtt biztosítani kell a minták homogenitását, hogy a mikroszkópba egy monodiszperz rendszer (azonos tömegű, méretű és alakú molekulák) kerüljön.

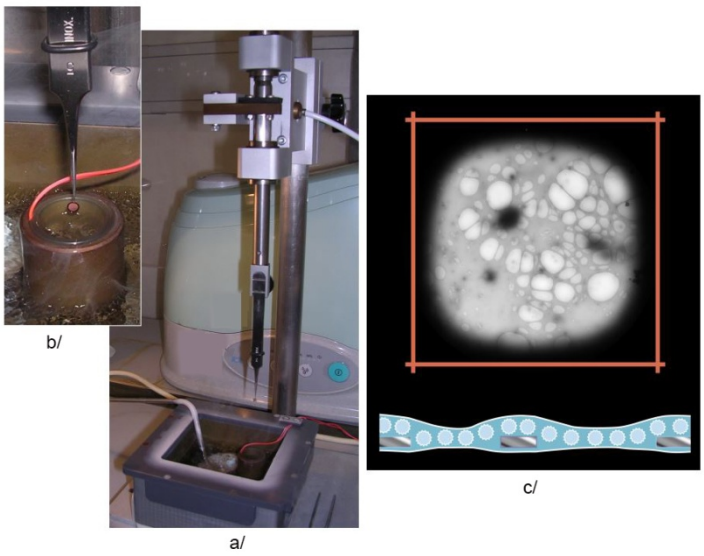
A fehérjék szétválasztására a szennyezőktől és a fragmentektől gél-elektroforézist alkalmaznak, amely molekulatömeg alapján választja szét a molekulákat gélközegben elektromos tér segítségével (WIKIPÉDIA, Elektroforézis, Gélelektroforézis). Egy gyakran alkalmazott változat SSD-PAGE néven ismert (az SSD a sodium-dodecil-szulfát, a PAGE pedig a poliakrilamidgél-elektroforézis rövidítése). Az elválasztás másik módja a kromatográfia, illetve annak fényszórással kombinált változata (méretkizárásos kromatográfia több szögben mért fényszórással; ezek angol elnevezései size-exclusion chromatography (SEC) és multi-angle light scattering (MALS). A kettő kombinációja pedig SEC-MALS) (WIKIPÉDIA, Kromatográfia). A molekulák méreteloszlását a dinamikus fényszórással (Dynamic Light Scattering, DLS) ellenőrzik. Végül a vizsgálatra kiválasztott fehérjék tömegét tömegspektrometriával mérik.

Létezik a „tisztításnak” olyan formája is, amit *in silico* tisztításnak neveznek: a számítógép felismeri, hogy melyik a vizsgálandó molekula, és melyik a szennyező. Valószínűsíthető, hogy a mesterséges intelligencia elterjedésével ez az irányzat mind erősebbé válik.

IV.3.2.2. Ultragyors merítéses fagyasztás (vitrifikálás)

Az 1. fejezet 1.2. ábráján már mutattuk a Dubochet-féle ultragyors fagyasztás sémáját. A vitrifikálás lényege, hogy az oldatban lévő, véletlenszerű eloszlású vizsgálandó részecskék körül amorf jég képződik, amint azt folyékony etánba merítik. Ez a módszer a mintát hidratált formában, közel natív állapotban őrzi meg. A dehidratáció volt az egyik nagy akadály a biológiai minták elektronmikroszkópiájában az ultragyors fagyasztást megelőző időkben.

A Dubochet-féle ultragyors fagyasztó egy ejtő berendezés (angolul plunge freezer) (4.3.4./a ábra). A berendezés alján található csipesz a mintatartó rostéllyal együtt kinagyítva a 4.3.4./b ábrán látható. A lyukacsos mintatartó szénhártyát mutatja a 4.3.4./c ábra. Az amorf jég a szénhártya lyukaiban képződik.



4.3.4. ábra. A Dubochet-féle ultragyors fagyasztóberendezés. Az a/ ábrán látható az ejtőrúd, amelynek kinagyított képét mutatja a b/ ábra. A csipesz végén mintatartó rostély látható, az alatta lévő tartályban folyékony etán van. A folyékony etán tartálya egy cseppfolyós nitrogénnel töltött edényben foglal helyet. A c/ ábra felső részén a mintatartó rézrostély lyukacsos szénhártyával fedett egyetlen háló szeme látható. A lyukakba vékony amorf jéghártya fagy bele a mintát tartalmazó pufferoldatból (keresztmetszete halvány kékkel jelölve a c/ ábrán). A fehér körök pedig a vizsgálandó biológiai makromolekulákat jelölik.

A cseppfolyós etán hőmérséklete kb. -180 ^{o}C, a tartályának cseppfolyós nitrogénnel való hűtése miatt. (A cseppfolyós nitrogén forráspontja -196 ^{o}C, a cseppfolyós etáné -88,5 ^{o}C.) A vizsgálandó minta natív állapota minden valószínűség szerint megmarad az igen gyors fagyasztáskor, mert a fagyás kb. 10^{-4} s alatt megy végbe, és a fehérjemolekulák konformációs átrendeződéséhez ehhez hosszabb időre van szükség. A becsült 10^{6} ^{o}C/s nagyságrendű fagyasztási sebesség abból adódik, hogy a 200 ^{o}C-os hőmérséklet-változás az említett kb. 10^{-4} s alatt következik be. A víz rossz hővezető, ezért a gyors lehűléshez a mintának vékonynak kell lenni.

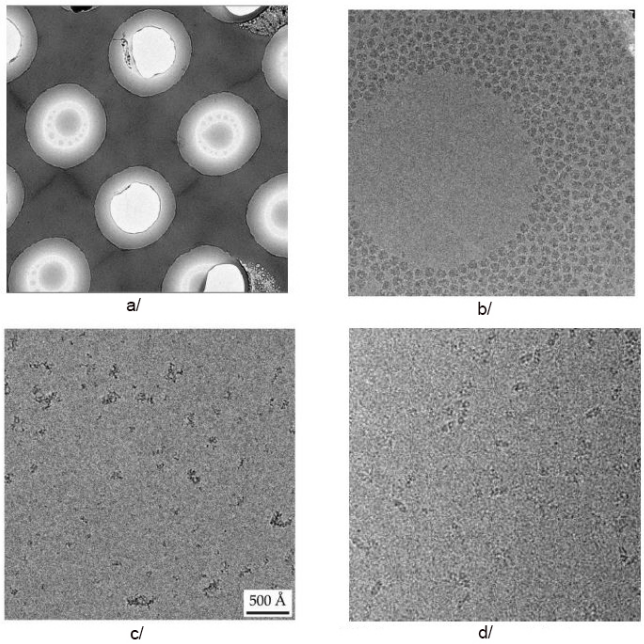
Az első lépésben pipettából a mintatartó rostélyra cseppentik az oldatban lévő mintát (~5µl). Az oldat feleslegét szűrőpapírral felitatják, majd a rostélyt gyorsan alámerítik folyékony etánba. Az alámerítést pneumatikusan vagy más módon gyorsítják. Manapság már a vitrifikálást is automatizálták. A leggyakrabban használt ultragyors (alámerítő) fagyasztó automata a Thermo Fisher Scientific cég Vitrobot és a Leica cég EM GP2 nevű készüléke. A víz -135 ^{o}C alatt fagy meg amorf (üvegszerű) formában. Ha a minta valamilyen oknál fogva -135 ^{o}C fölé kerül, akkor az addig amorf állapotban lévő jég kristályossá válik. (A jégnek 18 kristályos formája van, ezek

közül leggyakoribb a hexagonális, illetve a köbös szerkezetű. Mint többször említettük, a kristályos jég szétroncsolja a vizsgálandó mintát.) A vizsgálandó mintát (a 4.3.4./c ábrán gömbszerűnek ábrázolva) teljes egészében körbeveszi az amorf jég. A negatív festéssel ellentétben az amorf jégbe fagyó makromolekulák „random” módon, mindenféle orientációt felvesznek. Erre nagy szükség van, mert az egyedi részecskék analízisében nem alkalmaznak mintadöntést ahhoz, hogy különböző orientációjú vetületeket nyerjenek. Az SPA-ban a mintákban lévő részecskék véletlenszerű orientációját kell kihasználni. (Előfordul a SPA-ban is, hogy a kezdeti 3D modell generálásához a minta döntéséhez folyamodnak (IV.2.3. fejezet), viszont a nagy felbontású vizsgálatokban nem használják fel a korábban döntéssel készült képeket.)

A preparációval kapcsolatos nehézségek közül mutat néhányat a 4.3.5. ábra.

A jégréteg vastagsága optimális esetben a legnagyobb makromolekulák méretével egyenlő. A túl vastag vagy túl vékony jégréteg egyaránt kerülendő. A túl vastag jég (4.3.5./b ábra) azt okozhatja, hogy a kontraszt az egész mintán gyenge lesz. Valószínűtlen, hogy a 3D rekonstrukcióban 6Å-nél jobb felbontást érjenek el, ha az amorf jégréteg vastagsága 100 nm-nél több (AGARD 2014).

A jégréteg helyes vastagságának és a részecskék homogén eloszlásának elérése az egyik legnehezebb, leginkább időigényes feladat. A helyes jégvastagság beállítását próbálgatással végzik (trial and error módszer) (CONG 2010).



4.3.5. ábra. Mintapreparálási nehézségek

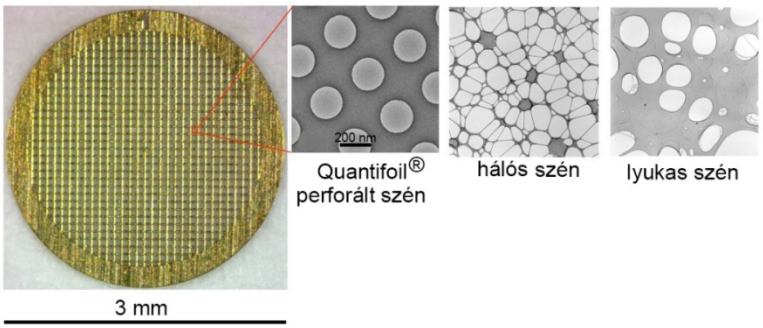
a./ Inhomogén vastagságú jégréteg tölti ki a mintatartó rostély lyukait. b/ Ha túl vékony a jég; a vizsgálandó anyag a jég peremén összetorlódik. c/ A minta egy része dehidratálódott. d/ A részecskék nemkívánatos kitüntetett orientációban helyezkednek el a jégen belül.

IV.3.2.3. Mikrostély, hordozófólia és film előkészítése

Számos követelmény van a mintatartó rostéllyal és a kialakult amorf jégréteggel szemben, ezeket alább részletezzük.

A minta felvihető csupasz vagy valamilyen hártyával, többnyire szénhártyával fedett rostélyra. Amennyiben csupasz rostélyra történik a felvitel, a rostélynak hidrofilnak kell lennie, hogy a folyadékminta egyenletesen terüljön szét, és ne képezzen cseppet. A rostély hidrofilizálását plazmakisülés segítségével gázatmoszférában érik el (PASSMORE 2016). A plazmakisülésben az ionok eltávolítják a felületről a szennyezést, és a felületet hidrofillé teszik. Friss szénhártyára történő mintafelvitelkor nincs probléma a folyadék szétterülésével, mert a szénhártya hidrofil. Hosszabb ideig tárolt szénhártyák hidrofóbbá válnak, és ezért alkalmazzák a plazmakisülést, amit a rostéllyal kapcsolatban már említettünk. A kép kontrasztjának szempontjából fontos az amorf jég és a fehérjék közötti sűrűségkülönbség (az amorf jégé 0,9 g/cm^3, a fehérjéé 1,3 g/cm^3). A minta-előkészítés javítására irányuló kísérlet, hogy még alacsonyabb hőmérsékleten dolgozzanak (cseppfolyós nitrogén helyett cseppfolyós héliummal, amelynek forráspontja -269 ^{o}C), eddig nem hozott elég jó eredményeket, mert az amorf jég sűrűsége megnőtt, és közelebb került a fehérjéhez.

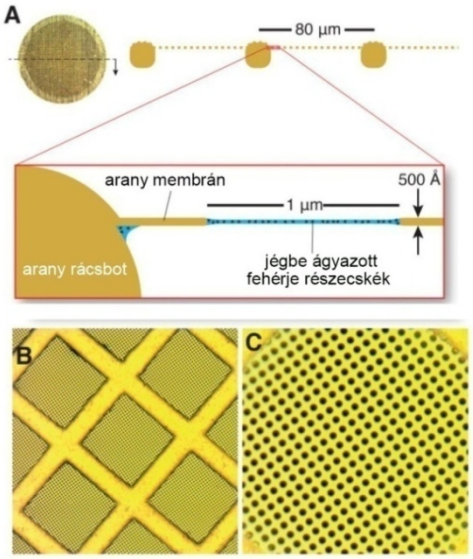
A rostély anyaga valamilyen fém, többnyire réz vagy arany. A rostélyra felvisznek egy vékony amorf szén- vagy aranyfóliát. Néha a hordozófóliára még egy vékony filmet is felvisznek, azért, hogy a fólia felületi tulajdonságait megváltoztassák. A filmanyagok közt is a leggyakoribb az amorf szén, de néha grafént vagy grafén-oxidot alkalmaznak.



4.3.6. ábra. A mintatartó rostélyon alkalmazott szénhordozók szerkezeti formái. A kis méretű képeken a rostély egyetlen hálószemén belüli szerkezetek láthatók.

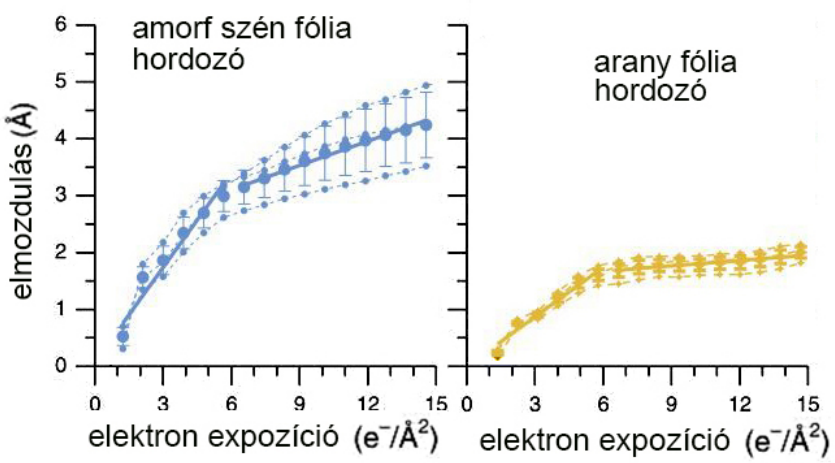
A 4.3.6. ábrán a szénhordozó különböző formáit mutatjuk: a szén lehet folytonos, lyukacsos, hálószerű vagy perforált, mint a Quantifoil® rétegek.

Az amorf szén felületén a cseppfolyós nitrogén hőmérsékletén elektromos töltés halmozódik fel, ami végső soron a mikroszkópos kép lassú mozgásához vezet. Egy másik tényező a kép instabilitásban, hogy a fémrostély és az amorf szén hőkiterjedési együtthatói különböznek, ami mechanikai feszültséget és elmozdulást eredményez. Így jutott Passmore és Russo arra a gondolatra, hogy aranyrostélyt és felette perforált aranyfóliát alkalmazzon hordozónak (4.3.7. ábra).



4.3.7. ábra. Quantifoil® aranyrostély és -fólia. Az A/ ábrán megadott léptékek vonatkoznak a B és C ábrára is. Az A/ ábrából leolvasható, hogy a jégréteg vastagsága 500 Å-nél vékonyabb (RUSSO 2014).

A Quantifoil® gold nagy mértékben kiküszöböli az eddig felsorolt problémákat: az arany jó elektromos vezető marad alacsony hőfokon is, nincs különbség a rostély és a rajta lévő fólia termikus tulajdonságaiban. Ráadásul inert, nem oxidálódik. Mint az ábrán látható, az aranyfólia vastagsága 500Å. (A Quantifoil® a kereskedelmi forgalomban kapható különféle geometriai méretekben, arany- vagy lyukacsosszén-fóliával is. A nagy stabilitású, Au rostélyból és Au fóliából készült változat márkaneve UltrAuFoil®.)



4.3.8. ábra. Három amorf szén- és három aranyfólia-hordozó elmozdulása a növekvő elektronexpozíció (dózis) hatására. A függőleges tengelyen az elmozdulások négyzetes középértéke látható (RUSSO 2014).

Az aranyrostély és aranyfólia együttesének a stabilitást növelő hatását mutatja a 4.3.8. ábra. Három szén- és három aranyfólián mérték a rostély elmozdulását a kezdeti állapothoz képest az elektronexpozíció függvényében. Az ábrán a függőleges tengelyen a képelmozdulások négyzetes középértékét láthatjuk. A görbék meredeksége azt tükrözi, hogy a besugárzás kezdetén nagyobbak az elmozdulások, mint a későbbi szakaszban.

Normál körülmények között a szerzők 15 $e^-/Å^2$ elektronexpozícióval dolgoztak, ami a 4.3.8. ábra szerint, aranyrácson aranyfólia esetében, 2Å elmozdulást okoz. Ez még mintegy kétszerese az elméletileg várható optimumnak, amit a víz diffúziós koefficiensének figyelembevételével számoltak (RUSSO 2016).

Bár fentebb a minta-előkészítés nehézségeit vázoltuk, az utóbbi időben olyan automatizált minta-előkészítő berendezések jelentek meg a piacon, amelyek leveszik a kezdő mikroszkópos vagy szerkezetbiológus válláról a terhek nagy részét. (DANDEY 2018, Spotiton, kereskedelmi neve Chameleon, videó róla https://www.sptlabtech.com/products/ sample-preparation/chameleon/...), VitroJet a CryoSol cégtől, videó róla https://www.cryosol-world.com/vitrojet/#automation, CryoWriter a Nunonex cégtől.) Ezek a berendezések már nem mikroliter, hanem nano- és pikoliter anyagmennyiséggel működnek. (Ez kedvező vonás a röntgenkrisztallográfiával szemben, mert ott viszonylag nagy anyagmennyiségre van szükség a kristálynövesztéskor.) Kiküszöbölik a felesleges minta felitatását, mert vagy a folyadékminta cseppjének méretét szabályozzák szoftveres úton, vagy speciális mintatartó rostély szívja fel a felesleges oldatmennyiséget (RAZINKOV 2016). Az automata ellenőrzi a jégréteg vastagságát, és megfelelő vastagságú jégréteget állít elő. Ha kell, a hordozórostély plazmakezelését is

elvégzi ugyanazon egységen belül, amelyik a fagyasztást végzi (VitroJet a CryoSol cégtől). Rendkívüli mértékben megnőtt a mintapreparálás automatizáltsága, és kiküszöbölték a próba szerencse (trial and error) közelítésmódot. A minta-előkészítési nehézségek fenti részletezése arra szolgál, hogy értsük, mit kell a robotoknak teljesíteniük, és mennyire közelebb kerültünk a feladatmegoldáshoz a modern technika segítségével.

IV.3.2.4. Diagnosztikai és előzetes vizsgálatok

A krio-EM vizsgálatokat megelőzően negatív festést is gyakran alkalmaznak. Ennek oka, hogy az eljárás gyors, és jó kontrasztot ad. A kezdeti 3D modell generálására is jó, amit festés nélküli krio-EM felvételekkel finomítanak.

A minta-előkészítés fontos lépése az ún. diagnosztikai krio-EM (PASSMORE 2016): megvizsgálják a jégréteg minőségét és a fehérjék sűrűségét. Ha az amorf jégréteg túl vastag, elromlik az amúgy is gyenge kontraszt. Ha túl vékony, akkor olyan körkörös tartományok keletkeznek, amelyekben nincsenek fehérjék, viszont ennek következtében máshol túl nagy lesz a fehérjemolekulák sűrűsége. A kiindulási oldatban lévő fehérjekoncentrációból, a molekulák tömegéből és a réteg vastagságából kiszámítják, hogy milyen részecskesűrűségnek kell lenni. A számolt és mért értékek közötti nagy különbség mintapreparálási hibára utal. A pufferelés megváltoztatásával el lehet érni, hogy a fehérjéknek a rostéllyal, fóliával való kölcsönhatása megváltozzon, és megfelelő számú, illetve sűrűségű, egyenletes eloszlású fehérjemolekula maradjon a jégrétegben (GLAESER 2016).

A SPA bonyolultságára jellemző, hogy a diagnosztikai krio-EM után még mindig nem a tényleges felvételkészítés következik, hanem egy újabb ellenőrző szakasz, amit előzetes krio-EM adatgyűjtésnek neveznek. Ilyenkor olyan felbontású képeket gyűjtenek, amelyeken a másodlagos szerkezetek pl. alfa-hélixek már felismerhetők, és megkísérlik felvételek alapján a 2D vetületeket osztályba sorolni. Ehhez néhány száz felvétel szükséges, amelyen néhány tízezer részecske található. Ellenőrzik, hogy a részecskék orientációeloszlása megfelelő-e a kiindulási háromdimenziós rekonstrukcióhoz. (Mint már említettük, nem jó, ha a részecskék kitüntetett orientációt vesznek fel.) Ezek a lépések még mind a minta-előkészítés fázisát jelentik. Amennyiben valahol eltérést tapasztalnak a várható képektől vagy értékektől, a minta-előkészítés megváltoztatásával próbálják javítani a helyzetet. Az idézett közlemény (PASSMORE 2016) szerencsére több minta-előkészítési protokollt tartalmaz, amelyek a kezdőknek jó segítséget nyújtanak.

IV.3.3. Adatgyűjtés egyedi részecskék analíziséhez

A nagy felbontású 3D rekonstrukciókhoz jó minőségű elektronmikroszkópos képek szükségesek, amelyek felvételénél fontos szerepet játszik:

– a defókuszálás mértéke,

– az alkalmazott elektrondózis és

– az objektívapertúra mérete (CHENG 2015 Primer)

Defókuszálásra, pontosabban alulfókuszálásra szükség van, mert a fókuszban nagyon kicsi a képek kontrasztja. A defókuszálás mértéke és a jó felbontás összefüggő paraméterek: nagyobb mértékű defókuszáláskor javul az alacsony térbeli frekvenciájú részletek (kontúrok) kontrasztja, és csökken a nagy térbeli frekvenciáké (a minta finom részletei). Ez utóbbi miatt romlik a felbontás. Ezért azt a minimális defókuszálást kell alkalmazni, amely még nem rontja a felbontást. A defókusz névleges értékét a képkészítéskor állítják be, de ez csak közelítő érték. Pontosabb értéket a CTF becsléssel lehet megállapítani (IV.3.5.). (Fázislemez alkalmazásakor az alacsony frekvenciájú komponensek kontrasztja javul, anélkül, hogy a magas frekvenciájúakét rontaná. Egy kis mértékű defókuszálást mégis alkalmaznak, hogy a mikroszkópos felvételek Fourier-transzformáltjában a Thon-gyűrűk megjelenjenek, és ezáltal a CTF-fel való összehasonlítást el lehessen végezni.)

Az objektívapertúra azáltal hat a kontrasztra, hogy a kifelé szóródó elektronokat nem engedi a képbe jutni. Nagy amplitúdókontrasztot kis apertúrával, nagy fáziskontrasztot pedig nagy apertúrával lehet elérni. A krio-EM-ben a nagy (70 μm vagy 100 μm-es) apertúrára van szükség.

Az elektrondózis növelése javítja a kontrasztot, viszont e növelésnek határt szab a minta sugárkárosodása. Ezért amikor direkt elektrondetektorral nem „moziüzemmódban” dolgoznak, akkor jellemző módon ~20 elektron/Å^2 alatt tartják a dózist. Mint a III.2. pontban említettük, a direkt elektrondetektorok „moziüzemmódjában” a teljes dózist több képre elosztják. Erre hozunk most példát.

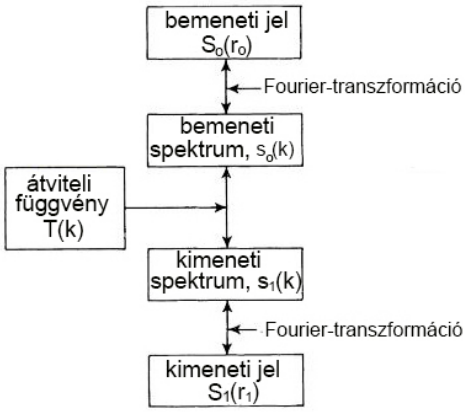
A 64 kDa molekulatömegű humán hemoglobin (3,2 Å felbontás) példáján keresztül mutatjuk be, hogy nagyon költséges hardver mellett is mennyire igényes a krio-elektronmikroszkópos adatgyűjtés a 3D rekonstrukcióhoz (KHOUSHOUEI 2017). Automatizált adatgyűjtés (három kondenzorlencsés) Titan Krios elektronmikroszkóppal 300 kV-os gyorsítófeszültségen történt 95200× nagyításban. Gatan K2 Summit direkt elektrondetektor „mozi”- és elektronszámlálás-üzemmódban. Egy „mozi” 40 képkockából állt, expozíciós ideje 2s, és a teljes elektrondózis 40 elektron/Å^2 volt (a 40 képkockára). Gatan Quantum elektronenergia-szűrőt és Volta-

fázislemezt használtak. 2261 elektronmikroszkópos képet készítettek egyetlen 89 órás műszakban! 175 000 részecske képét használták fel a rekonstrukcióhoz.
Ilyen és ehhez hasonló adatok ismeretében értelmet nyernek azok a törekvések, hogy legyenek országhatárokon túlnyúló krio-EM központok, ahol vendégkutatók dolgozhatnak a mikroszkóphoz értő, jól képzett kiszolgálószemélyzet támogatásával. Továbbá indokolttá teszi azokat a kívánságokat, hogy a krio-EM-hez fejlesszenek ki olcsóbb 100 kV-os krio-elektronmikroszkópokat. Szerencsére krio-EM központok már léteznek, az olcsó 100 kV-os krio-EM-re még várni kell.

IV.3.4. CTF-korrekció

A 4.3.3. ábrán bemutattuk vázlatosan a SPA folyamatát. Egy nagyon fontos részletkérdés, a kontrasztátviteli függvény (CTF) szerepe nem került ezekben említésre. Itt most pótoljuk. A CTF egy olyan szinuszfüggvény, amely a frekvenciával és a defókusszal változik (2.18. egyenlet).

A felvett elektronmikroszkópos képeket manuálisan szelektálják még azelőtt, hogy a 2D átlagokat képezik. Eleve kihagyják azokat a képeket, amelyektől 4Å-nél jobb felbontás nem várható. Ezt követi kis számú részecske manuális majd nagy számú részecske automatikus szelektálása (angolul particle picking). (BRUBAKER 2015). A részecskék szelektálására a VI. fejezetben visszatérünk.
A kontrasztátviteli függvény (CTF, II.7. fejezet) fontos szerepet játszik a nagy felbontású elektronmikroszkópiában. CTF-korrekció nélkül nem lehet nagy felbontású 3D rekonstrukciót végezni. (Negatív festésű mintákon nem végeznek CTF-korrekciót, a festék által korlátozott felbontás miatt.)
A kontrasztátvitel elmélete kapcsolatot teremt a vizsgált minta kimenetén lévő hullámfüggvény (4.3.9. ábrán bemeneti jel) és minta képe (4.3.9. ábrán kimeneti jel) között. Az elmélet alapfeltevése, hogy az elektronnyaláb párhuzamos és monokromatikus.



4.3.9. ábra. A kontrasztátvitel elméletéhez (LENZ 1971)

A CTF korrekciónak a 4.3.9. ábrán mutatott sémája szavakban a következőképpen írható le (WADE1992):

– kiszámolják a mintát elhagyó hullám hullámfüggvényének Fourier-transzformáltját, hogy megkapják a hullám amplitúdóját az objektívlencse hátsó fókuszsíkjában,

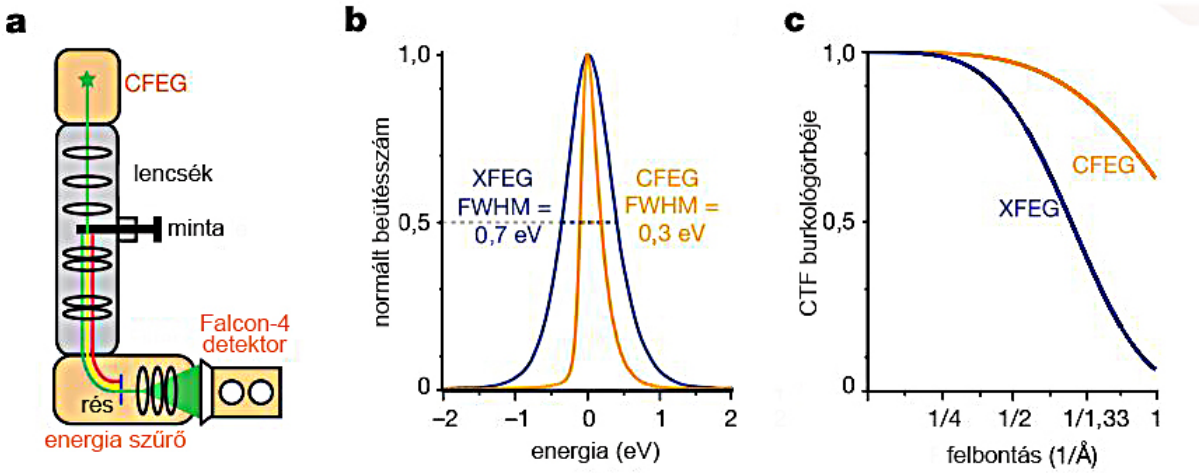
– megszorozzák azzal a függvénnyel, (kontrasztátviteli függvénnyel, a 4.3.9. ábrán T(k)-val jelölve), amely leírja a hullám torzulását a mikroszkóp aberrációi miatt,

– a kapott eredmény inverz Fourier-transzformáltja megadja a hullám amplitúdóját a képsíkban,

– az előző pontban kapott hullámamplitúdó abszolút értékének a négyzete adja a korrigált kép intenzitását.

A CTF paramétereinek meghatározása kulcsfontosságú, hogy a mikroszkóp torzító hatásait korrigálni lehessen és a képeket a pontfeloldási határon túl (a CTF függvény első zérus pontján túl) is interpretálni lehessen (VULOVIC 2010). A CTF-korrekcióról bővebben Cheng cikkében olvashatunk (CHENG 2015 Supplement).

A CTF korrekció jelentőségét jól mutatja, hogy a legújabb felbontási rekordot (1,2 Å apoferritin mintán, NAKANE 2020) a CTF burkológörbéjének (2.7.6. ábra) javításával érték el. Minél magasabban fut a CTF burkológörbéje, annál jobb a jel/zaj viszony. Ez kedvezően befolyásolja a felbontást a nagy térbeli frekvenciák (finom mintarészletek) tartományában. Nakane és munkatársai három javítást végeztek a korábbi technikán: csökkentették a mikroszkóp elektronágyújának energiakiszélesedését, javították a transzmittált elektronok energiaszűrését, és új, jobb minőségű Falcon-4 direkt elektrondetektort alkalmaztak (4.3.10. ábra).



4.3.10. ábra. Az apoferritin 1,2 Å-ös felbontásához alkalmazott technikai javítások a CTF burkológörbéjének megnövelését eredményezték (lásd a szöveget). (NAKANE 2020)

A jobb energiaszűrés és jobb detektor alkalmazása nem igényel kommentárt. De a fűtött (1700-1800 K), extra fényességű XFEG katód lecserélése szobahőmérsékletű ún. hidegkatódú CFEG-re (Cold Field Emission Gun a Thermo Fisher Scientific cégtől), már áldozatot követel a felhasználótól, mert a hidegkatódon kondenzálódott gázmolekulákat 5-6 óránként el kell távolítani rövid idejű felfűtéssel. A 4.3.10./b ábra szerint a katódból kijövő elektronok energiájának félértékszélessége (FWHM Full Width at Half Maximum) a CFEG-nél kisebb, mint az XFEG-nél. Ettől javul az elektronnyaláb időbeli koherenciája (E_c a 2.19 képletben) és magasabban fut a CTF burkológörbéje (4.3.10./c ábra).

IV.3.5. CTF-becslés

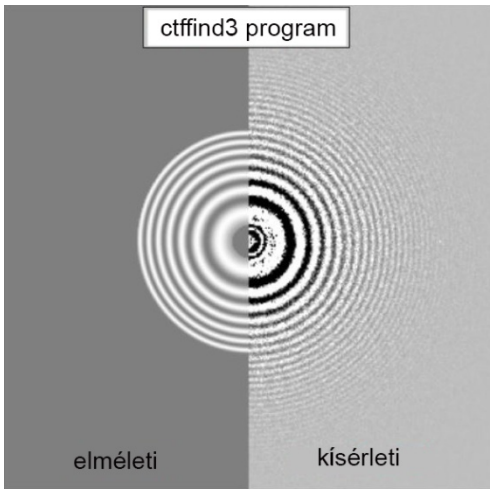
Ahhoz, hogy a CTF-korrekciót el lehessen végezni, nemcsak paraméteres formában, hanem konkrét értékekkel is ismerni kell a kontrasztátviteli függvényt.

A szakirodalomban a CTF meghatározása helyett a CTF becslése (estimation) kifejezést használják. Érthető az óvatosság, mert a kontrasztátviteli függvény a (2.18) és (2.19) egyenletek szerint az ismert paramétereken (az elektronok hullámhossza (λ), a szferikus aberráció (C_s)) túlmenően függ az asztigmatizmustól, a kromatikus aberrációtól, az elektronnyaláb térbeli koherenciájától, a nagyfeszültség és a lencsék stabilitásától.

A Thon-gyűrűk kör alakúak, ha nincs asztigmatizmus, ellenkező esetben ellipszis, parabola vagy hiperbola alakú is lehet, amint az asztigmatizmus növekszik. Ezért a CTF becslése előtt az asztigmatizmust határozzák meg (MALLICK 2005). Az idézett cikkben 11 paramétert

használnak a teljesítményspektrum oszcilláló viselkedésének, zajának és a burkológörbe alakjának modellezésére.

A CTF becslésére jól megírt, ingyenes, automatizált számítógépes programok vannak: például CTFFind3 (MINDELL 2003), CTFFind4 (ROHOU 2015) és az ACE (Automated CTF Estimation) (MALLICK 2005). Az ACE és annak újabb változata ACE2.4 letölthető a következő helyről: https://www.mybiosoftware.com/ace-2-4-ace2-1-0-automated-ctf-estimation.html.



4.3.11. ábra. A kísérleti teljesítményspektrumhoz illesztett elméleti CTF. Az ábra az automatikus ctffind3 program eredménye (DA FONSECA 2014).

Széles körben használatos a CTFFIND3 program (MINDELL 2003) az objektívlencse defókuszálásának az elektronmikroszkópos képből történő meghatározására. Modernebb változata CTFFIND4 (ROHOU 2015) már a dózisfrakcionálás vagy a fázislemez figyelembevételére is ad lehetőséget, és mintegy tízszer gyorsabb az elődjénél. Az egyszerűség kedvéért az asztigmatizmust a defókuszálástól külön, azt megelőzően határozzák meg. A defókusz meghatározásának hibáját a CTFFIND3 vagy a sokkal gyorsabb CTFFIND4 programmal néhány nanométer nagyságrendűnek találták a kristályos bakteriorodopszinban krisztallográfiai úton meghatározott értékekhez viszonyítva (ROHOU 2015). A defókusz-meghatározás hibája jelentősen befolyásolja a kontrasztátviteli függvényt a nagy térbeli frekvenciák tartományában.

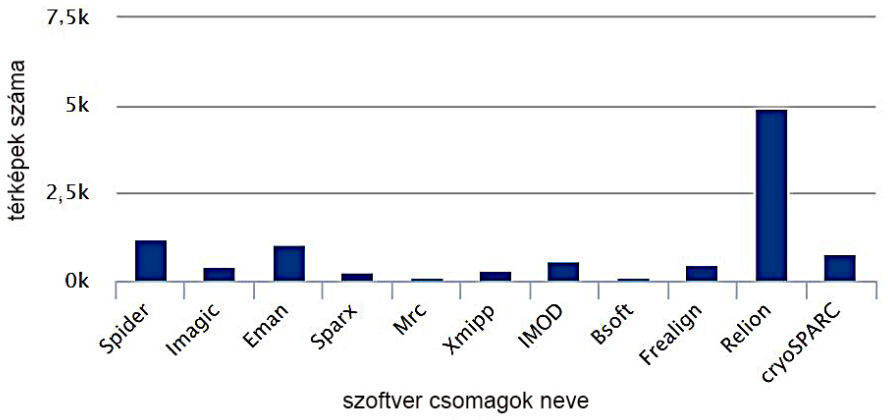
A CTF becslését általában a kiértékelés elején egy egész képre vonatkozóan végzik, de a kiértékelés későbbi fázisában minden egyes részecskére külön-külön elvégzik.

A GCTF program (ZHANG 2016) a számítógép grafikus kártyáját (GPU) használja, és újabb 10-50-szeres gyorsulást jelent az eddig említett programokhoz képest, amelyek nem használnak

grafikus kártyát. A szerzők szerint a defókusz pontosságának legalább 40 nm-nek kell lenni, ha 300 kV-os gyorsítófeszültségen közel atomi felbontást (<4,0Å)-t akarunk elérni.
Összefoglalva a kontrasztátviteli függvényről leírtakat: a CTF a nagy felbontású 3D rekonstrukció szempontjából rendkívüli fontosságú ahhoz, hogy a mikroszkópos képeket a változó térbeli frekvencia és defókusz függvényében korrigáljuk. Ehhez (a legegyszerűbb esetben) meghatározzák a defókuszt. A gyakorlatban ez az elméleti CTF-nek a mikroszkópos kép teljesítményspektrumához való illesztésével történik.

IV.3.6. Adatfeldolgozás

Minden krio-EM gyártó cég saját adatfeldolgozó szoftvercsomagot árul a mikroszkópjához. Számos ingyenes programcsomag van a SPA kiértékelésére a következő internetcímen: https://en.wikibooks.org/wiki/Software_Tools_For_Molecular_Microscopy .

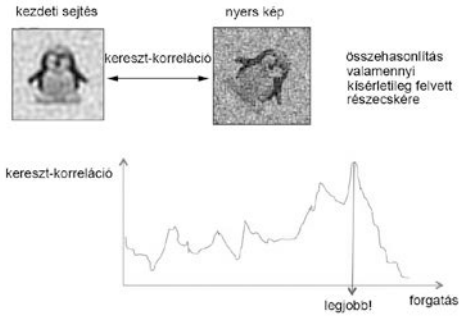


4.3.12. ábra. A krio-EM 3D rekonstrukciós programcsomagok alkalmazási gyakorisága az Electron Microscopy Data Bank statisztikája alapján. A programok időrendi sorrendben vannak balról jobbra elhelyezve az 1996-ban publikált a Spidertől kezdve a 2017-es cryoSPARC-ig.

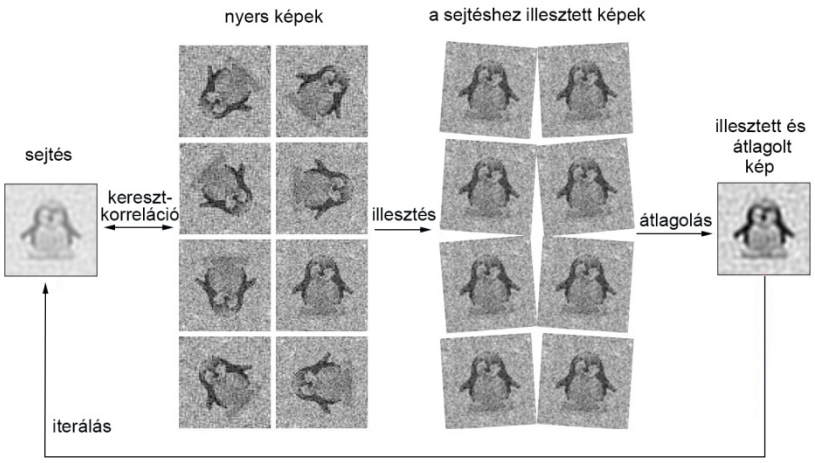
Az Electron Microscopy Data Bankból vett statisztika (4.3.12. ábra) szerint a jelenleg leginkább elfogadott az ingyenes és nyílt forráskódú programcsomag a RELION (REgularized LIkelihood OptimizatioN, kiejtése: re 'lai on, azaz bízz benne) (SCHERES 2012 B).
A 3D rekonstrukciós programok közös vonása, hogy vetületillesztést alkalmaznak. A programok CTF-eket határoznak meg, azután a CTF-fel korrigált képekből 3D szerkezeteket állítanak elő. Ehhez igénybe vesznek egy kezdeti 3D szerkezeti modellt, miként azt a IV.2.3. fejezetben leírtuk. 2017 utáni cryoSPARC volt az első olyan program, amely már nem használt kezdeti 3D modellt, hanem a rendelkezésre álló 2D vetületekből *ab initio* algoritmussal

generálta a 3D modellt. Később a RELION program is áttért az ab initio 3D modell generálására, de az algoritmus elnevezése *de novo* lett.

A mikroszkópos képek orientációjának meghatározása iterációval történik. Minden egyes iterációs lépésben 2D vetületeket készítenek az előző iterációban meghatározott 3D modellből, és a vetületeket összehasonlítják a rendelkezésre álló elektronmikroszkópos képekkel. Ezután minden képhez hozzárendelnek egy optimális orientációt keresztkorreláció segítségével (4.3.13. ábra):



4.3.13. ábra. Keresztkorreláció az optimális orientáció kiválasztásához, a képek elfordulásának függvényében. (Keresztkorrelációt illetően lásd a II.8.3. pontot.) (SCHERES 2017)



4.3.14. ábra. A mikroszkópos képek jel/zaj viszonyának javítása keresztkorreláció, illesztés, átlagolás és iteráció segítségével (SCHERES 2017).

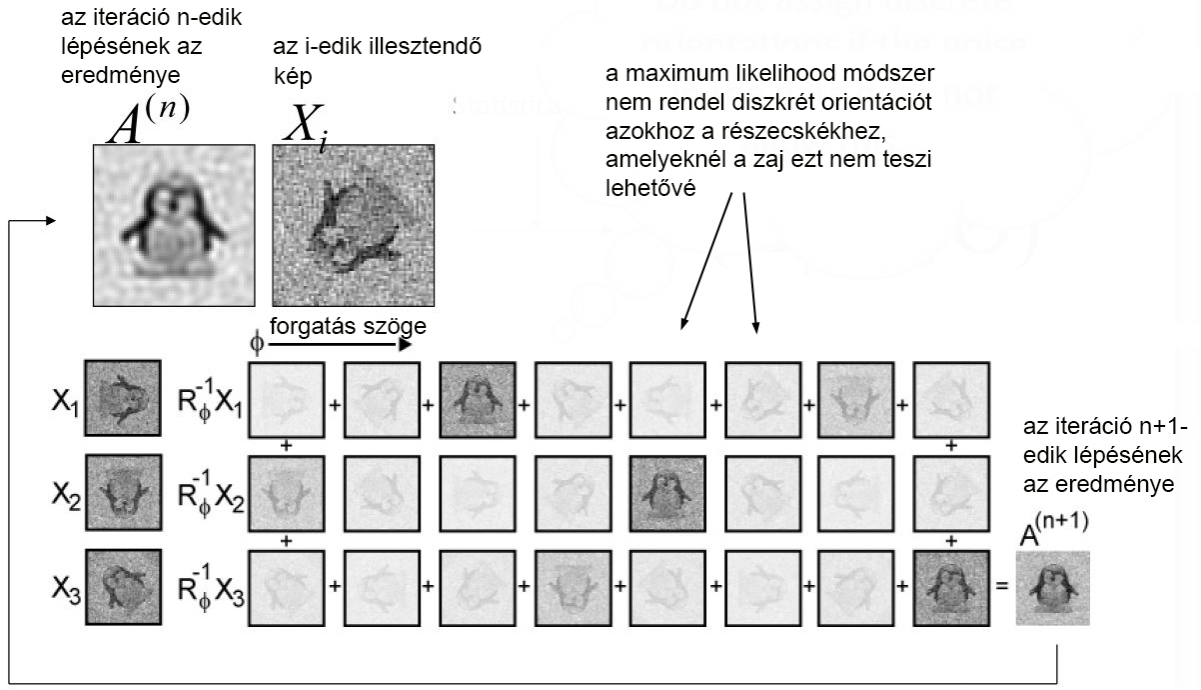
Megjegyzés: A képeknek a 4.3.14. ábrán látható sorba rendezését az angol az alignment kifejezéssel illeti, mi összehangolásnak vagy illesztésnek nevezzük.

Az orientáció kiválasztását átlagolás követi, ezzel javítva a jel/zaj viszonyt, majd iterációval fokozatosan javítják a képek orientációját (4.3.14. ábra). Az iterációs folyamatot finomításnak

nevezik, és addig futtatják a programokat, míg az egymást követő optimalizált orientációkban nincs változás.

Probléma akkor keletkezhet, amikor a jel/zaj viszony túl kicsi, és az algoritmus a zaj miatt hamis csúcsot választ ki optimális orientációként a 4.3.13. ábra szerint a keresztkorrelációs görbében.

Ennek elkerülésére alkalmazta Sigworth (SIGWORTH 1998) a maximum likelihood (maximális valószínűség) módszert. (WIKIPEDIA). Ez a módszer nem rendel minden részecskeképhez egy diszkrét orientációt, hanem csak akkor, ha a zaj ezt lehetővé teszi, és ekkor egy súlyozott összeget képez a lehetséges orientációkból (4.3.15. ábra). Sigworth szerint ez az algoritmus jelentősen javítja a helyes orientáció kiválasztását.



4.3.15. ábra. A maximum likelihood valószínűségi módszer alkalmazása a képek orientációjának meghatározására (SCHERES 2017)

Scheres a RELION programban szintén a maximum likelihood módszert alkalmazta a 2D képek orientálásához. A RELION programban a Bayes-elmélet (Bayesiánus statisztika, WIKIPÉDIA) olyan keretet ad, amelyben az adatfinomítás paramétereit nem *ad hoc* módon határozzák meg (mint az a korábbi programokban történt), hanem a program maga tanulja az adatokból. Ezt olyan feltételek mellett teszi, hogy a mért adatoknak és a kiindulási feltételeknek együttesen meg kell felelni egy valószínűségi modellnek. Mint korábban említettük, a matematikai feladat nem teljes, ezért korlátokat kellett életbe léptetni, ezt nevezik regularizációnak.

A RELION „objektív, jó minőségű adatokat eredményez a felhasználó szakértelme nélkül is” – idézet a RELION honlapjáról (https://www3.mrc-lmb.cam.ac.uk/relion/index.php/Main_Page). Erről a honlapról nemcsak magánfelhasználók, de kereskedelmi cégek is ingyen tölthetik le és módosíthatják is a programot. Mindössze egy hivatkozást várnak el a felhasználóktól az eredmények publikálásakor. Jelenleg a 3. verziónál tart a program fejlesztése (ZIVANOV 2018): újabb, pontosabb algoritmusok és gyorsabb processzorok alkalmazásával 4 óránál rövidebb ideig tart egy adatfeldolgozás. A Relion3-ban a fent említett Bayes-elméletet a részecskék elmozdulásának korrigálására is használják, és ezt nevezik a részecskék polírozásának (ZIVANOV 2019). A pontosságon kívül az adatfeldolgozás sebessége, a költségigényesség is szerepel a fejlesztési szempontok között. Már nem csak szakemberek tudják használni a programot, és ez sokakat vonz a krio-EM területére. A programot folyamatosan fejlesztik.

2017-ig a szoftvercsomagok megkívánták, hogy a kezdeti 3D modell jó hasonlóságot mutasson a végső finomított 3D szerkezettel. Ellenkező esetben a 3D finomítás iterációi pontatlan eredményre vezethettek amiatt, hogy megálltak egy lokális optimumnál (SCHERES 2012, PUNJANI 2017).

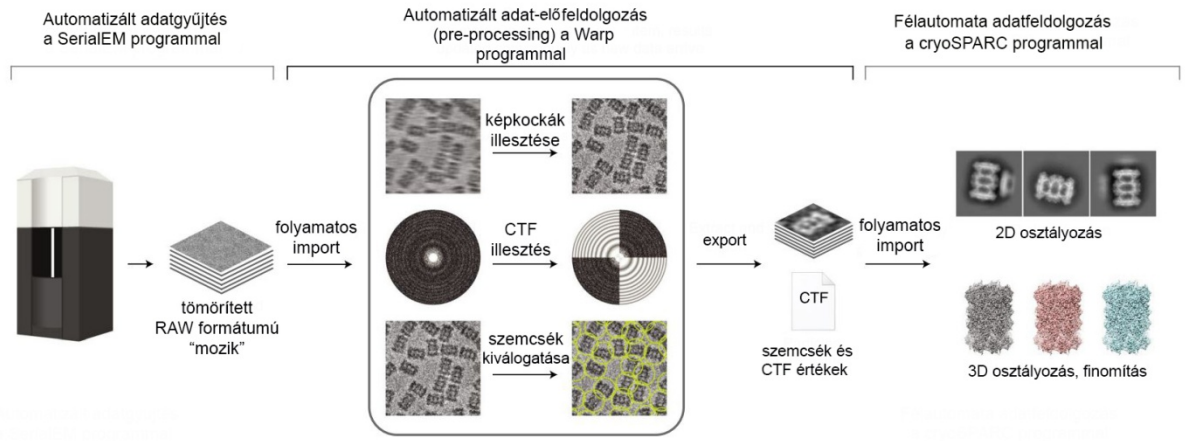
A cryoSPARC program volt az első, amely képes volt *ab initio* 3D modelleket generálni a kétdimenziós mikroszkópos képekből (a gépi tanulásban is alkalmazott) SGD algoritmus (stochasztikus gradiens leereszkedés) segítségével (Stochastic gradient descent optimization algorithm, WIKIPEDIA). Az *ab initio* (kezdettől fogva) arra utal, hogy nem kell más segítséget pl. olyan kezdeti 3D modelleket igénybe venni, amilyeneket a IV.2.3. pontban tárgyaltunk. Innen a cryoSPARC program neve: cryo Single Particle Ab-initio Reconstruction and Classification (PUNJANI 2017).

A cryoSPARC program hasonlóan a RELION-hoz az elektronmikroszkópos képekből képes 3D szerkezetet (vagy szerkezeteket, amennyiben több fordul elő a mintában) generálni járulékos beviteli adatok és a felhasználó szakértelme nélkül.

A grafikus kártya (GPU) alkalmazásának köszönhetően itt is (miként a fent említett ZHANG 2016 közleményben) igen nagy sebességnövekedést értek el. Egy-egy kiértékelés néhány óra kérdése átlagos asztali számítógépet feltételezve. Például a 80S riboszóma 3,2 Å-ös felbontása 2,2 óra alatt volt elérhető cryoSPARC szoftverrel (PUNJANI 2017). A szerzők szerint a program nem érzékeny a lokális optimumokra, megtalálja a globális optimumot. A cryoSPARC ingyenes a nonprofit, tudományos felhasználásra! A letöltésre engedély kérhető a https://cryosparc.com/download webhelyen. A cryoSPARC adatfeldolgozására vonatkozóan találhatunk oktató jellegű információkat a https://cryosparc.com/docs/tutorials

weblapon. A cryoSPARC legújabb változata cryoSPARC Live néven került forgalomba. A „Live” szó utal arra, hogy a felhasználó valós időben nyomon követheti az adatgyűjtés és adatfeldolgozás minden lépését.

Számos olyan program van forgalomban, amely nem a teljes SPA munkafolyamatra, hanem annak csak egy részére vonatkozik, és kimeneti adatformátumuk olyan, hogy csatlakozhatnak az említett RELION vagy cryoSPARC programhoz. Ilyen az ingyenes SerialEM program (MASTRONARDE 2005) és az ingyenes, nyílt forráskódú Leginon (SULOWAY 2005), amelyek automatikus adatgyűjtést végeznek, továbbá a Warp program (TEGUNOV 2019), amely automatizált, valós idejű 2D adat-előfeldolgozásra alkalmas (4.3.16. ábra). A Leginon honlapja https://emg.nysbc.org/ redmine/projects /leginon/wiki/Leginon_Homepage)

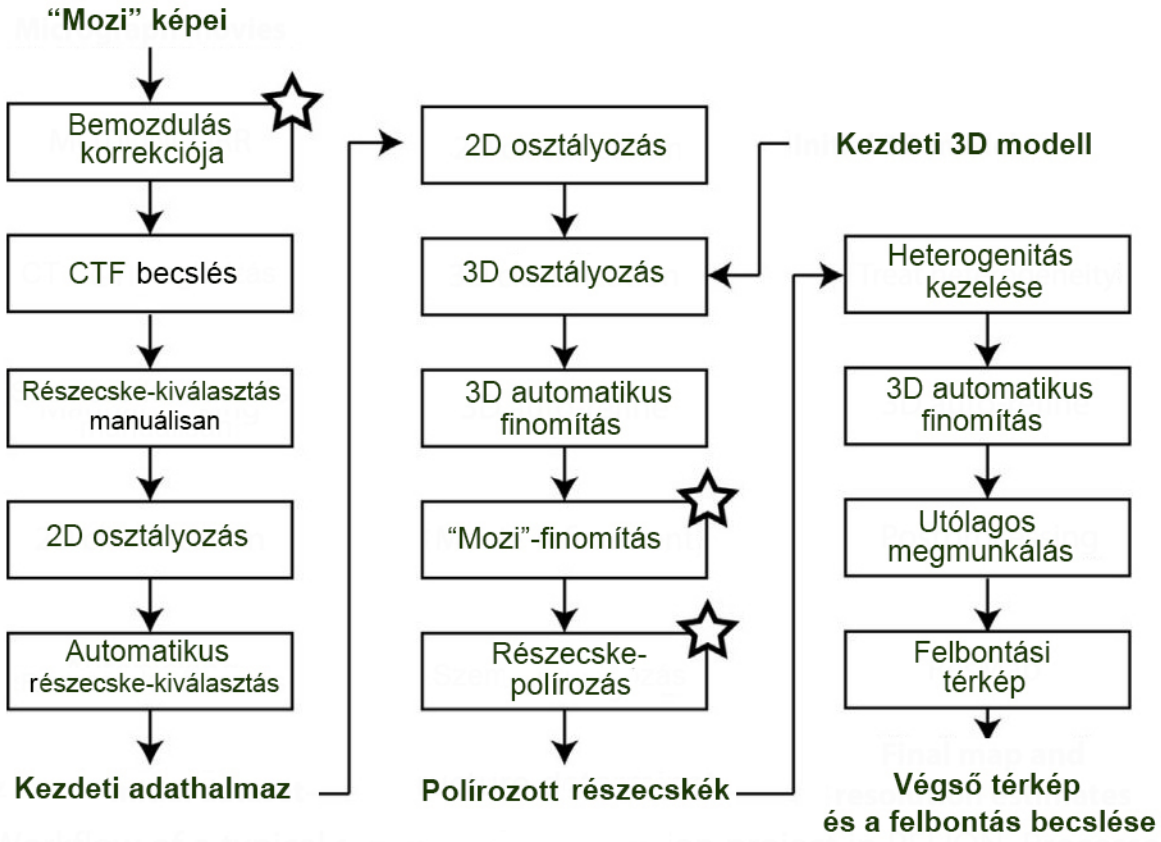


4.3.16. ábra. Balról jobbra három program összekapcsolása. A SerialEM adatgyűjtő program és a Warp valósidejű a 2D cryo-EM adatfeldolgozó program kapcsolható a RELION vagy cryo-SPARC programokhoz (TEGUNOV 2019).

A 4.3.16. ábrán balról jobbra haladva előbb a SerialEM programra találunk utalást, amely az automatikus adatgyűjtésre szolgál (letölthető a http://bio3d.colorado.edu/SerialEM/ webhelyről). Az ábra közepén a bekeretezett részben látható, hogy milyen feladatokat végez el a Warp program. A képkockák elmozdulásának korrigálását, a képkockák illesztését az egyes részecskék CTF-becslését végzi, valamint a további feldolgozásra alkalmas részecskéket válogatja ki automatikusan. Mindezt valós időben végzi, a kutató szemmel követni tudja. A részecskék kiválogatását és a zaj szűrését mesterséges intelligencia segítségével végzi. A Warp programnak az adatfeldolgozó vonalba való beiktatásával sikerült az influenzavírus hemagglutininjének 3,9 Å-ös felbontását 3,2 Å-re javítani. A Warp forráskódja letölthető a http://github.com/cramerlab/warp oldalról.

Az adatfeldolgozás részleteire Cheng oktató jellegű cikkének kiegészítésében találunk információt (CHENG 2015 B).

Az adatfeldolgozás egyes lépéseit a leggyakrabban használt RELION program példáján szemléltetjük (4.3.17. ábra)



4.3.17. ábra. Az adatfeldolgozás sémája a RELION programban (lásd a szöveget) (SCHERES 2016)

Néhány megjegyzés a 4.3.17. ábrán látható adatfeldolgozási sémához.

A RELION felhasznál több olyan, korábban más szerzők által készített programot, amely az adott feldolgozási lépésre legjobban megfelel. A 4.3.17. ábrán csillag jelöli azokat a adatfeldolgozási lépéseket, amelyek kizárólag a „moziüzemmódban" készített felvételekre vonatkoznak. A bemozdulás korrekcióját rendszerint a MOTIONCORR nevű programmal végzik (LI 2013), amely minden egyes „mozira" (képsorozat) egyetlen átlagos képet határoz meg. A CTF becslést is egy átlagos képre nézve végzik a CTFFIND (MINDELL 2003, ROHOU 2015) vagy a GCTF programmal (ZHANG 2016). Később mind a bemozdulás korrekcióját, mind pedig a CTF korrekciót megismétlik minden egyes részecskére. A manuális részecske kiválasztás célja az, hogy a későbbi automatikus részecske-kiválasztáskor a program ezeket a részecskéket tekintse templátnak (sablonnak). A 2D osztályozást, amit a kis számú kézzel kiválasztott részecske alapján készítettek, a program megismétli a nagyszámú automatikusan

kiválasztott részecskére. A folyamatábra még 2016-ból származik, amikor a 3D osztályozáshoz a RELION a kezdeti 3D modellt a külső forrásból vette, például az EMAN2 programból (LUDTKE 1999), vagy a IV.2.3. részben tárgyalt random kúpos döntés módszeréből (RADEMACHER 1987). Mint már említettük, a 3. verzióban a kezdeti 3D modellt maga állítja elő *de novo* SGD (Stochastic gradien descent) algoritmussal. A részecskepolírozáshoz (ami nem más, mint a részecskék elektronnyaláb okozta bemozdulásának figyelembevétele) a Bayesianus statisztikát alkalmazzák (WIKIPÉDIA). A konformációs és összetételi heterogenitás kezelése meglehetősen összetett feladat, részletes információ az idézett cikkben (SCHERES 2016).

A 3D sűrűségtérképet az SPA szoftverek többnyire az UCSF Chimera molekuláris modellező programmal rajzolják meg, amely letölthető a https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/ webhelyről. A program ingyenes, kivéve a kereskedelmi célú felhasználást (lásd még UCSF CHIMERA WIKIPEDIA).

A lokális felbontás becslésére a ResMap programot használják (KUCUKELBIR 2014).

Az atommodellt a sűrűségtérképekbe a Coot programmal készítik (https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/), amely szintén ingyenes (Coot (software), WIKIPEDIA). A sűrűségtérképbe berajzolt atommodellre példát találunk ennek a fejezetnek a 4.2.9. ábráján.

Amikor az elektronsűrűség-térképet és egy atommodellt illesztenek, az egyes atomok pozíciójához tartozó bizonytalanságok kiszámíthatók. Ezeket a bizonytalanságokat B-faktoroknak vagy hőmérsékleti tényezőknek nevezik. A fogalom a röntgenkrisztallográfiából került az elektronmikroszkópiába (Debye–Waller factor, WIKIPEDIA). Tekintettel arra, hogy a mikroszkópos kép kontrasztja magasabb frekvenciáknál csökken, az ezt kiváltó hatások bizonyos mértékű kompenzálását érik el a B faktorok alkalmazásával. Ez végül is a sűrűségtérkép élesítéséhez vezet (ROSENTHAL 2003).

Összefoglalva az adatfeldolgozást: a krio-EM SPA minden fázisára vonatkozóan találhatók automatizált programok az interneten, amelyek közül a RELION és a cryoSPARC emberi beavatkozás (szakértelem) nélkül is jól használható. Korábban az adatfeldolgozás jelentette az időigényesebb feladatot (a néhány napos automatikus adatgyűjtés mellett), de a hardver- és szoftverfejlesztéseknek köszönhetően néhány órára zsugorodott.

IV.3.7. A 3D sűrűség-térképek felbontása

A felbontás a szerkezet-meghatározásban az a legkisebb távolság, amelyben két objektum még különállónak látszik.

A nagy felbontású elektronmikroszkópiában a felbontást úgy definiálják, mint az első zéruspont, ahol a kontrasztátviteli függvény (CTF) metszi a vízszintes tengelyt (II.7. fejezet). Eddig a pontig a képek vizuálisan, intuitíve értelmezhetők (az van, amit látunk), de ezen a ponton túlmenően a képek csak CTF korrekció után értelmezhetők.

A felbontás a krio-elektronmikroszkópiában a rekonstruált 3D sűrűség térképekre vonatkozik, és egyetlen térképen belül sem állandó érték. A molekula stabilabb vázára jobb a felbontás, mint a külső rugalmasan változó részekre.

A 3D krio-EM-ben a felbontást a meghatározásának a módjával definiálják: a mérési adatok két felét úgy hasonlítják össze a frekvenciatérben, hogy a felbontás összhangban legyen a röntgenkrisztallográfiában használt felbontással (FRANK 2006). A 3D sűrűségtérképek felbontását a Fourier-térben $Å^{-1}$ egységben a valós térben Å-ben adják meg.

A röntgenkrisztallográfiában a felbontás kérdése viszonylag jól, de legalább is jobban tisztázott, mint a krio-EM-ben (RENAUD 2018). A krio-EM művelői olyan felbontási definíció elfogadásán fáradoznak, ami a krio-EM-et és a röntgenkrisztallográfiát összhangba hozza. Az egyik területen idézett felbontás egyezzen meg a másik területen idézett felbontással.

Ezért rövid kitérőt teszünk a röntgenkrisztallográfiai felbontás ismertetésére.

A röntgenkrisztallográfiában a nyert 3D elektronsűrűség térképből számítógéppel generálnak egy diffrakciós képet, és összevetik a kísérletileg felvett diffrakciós képpel. Az eltérés jellemzésére egy R-számot (R-value) használnak, amelynek értéke tökéletes egyezéskor 0, tipikus esetekben 0,2.

Minthogy a röntgenkrisztallográfiában is finomítással készül a térkép (egy atommodellhez viszonyítva), így az R-számban torzítás léphet fel. Az R-számot úgy teszik függetlenné a finomítástól, hogy csak a rendelkezésre álló adatok 90%-ából számolják a térképet. A maradék 10% adatból önálló finomítási folyamattal számolnak egy másik modellt, és összehasonlítják a 90%-os adatokból várható modellel. A kettő közötti eltérést egy R-free számmal jellemzik, amely már független a finomítás folyamatától. Az R-free nagyobb szám, mint az R-value, és értéke jellemzően 0,26.

A 3D felbontásnak a krio-EM-ben történő meghatározásakor (pontosabban a becslésekor) a röntgenkrisztallográfiával való hasonlóság a következő:

– a Fourier-térben történik,

– az adatokat szétválasztják,

– a felbontás becslését igyekeznek függetlenné tenni a finomítás folyamatától.

A krio-EM-ben többféle kísérletet tettek a felbontás meghatározására, de ezek közül az terjedt el, amelyik a Fourier-térben lévő adatok hasonlóságát (korrelációját) vizsgálja. Ez kezdetben

csak két dimenzióra, a Fourier-gyűrűk korrelációjára (Fourier ring correlation, FRC) (SAXTON 1982), később annak 3D kiterjesztésére a Fourier-héjak korrelációjára vonatkozott (Fourier shell correlation, FSC) (HARAUZ 1986).

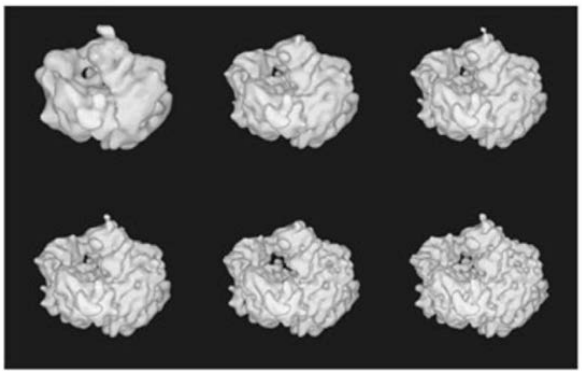
Az FSC szerepe a felbontásban kevésbé tűnik idegennek, ha arra gondolunk, hogy eddig is a legnagyobb átmérőjű, még látható Thon-gyűrű alapján állapítottuk meg a felbontást az elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformáltjában. Ha háromdimenziós objektumot vizsgálunk, akkor a gyűrű helyett a Fourier-tér gömbhéjában kell keresni a megoldást. A gondolatmenet további részletei már nem annyira nyilvánvalóak, és mint látni fogjuk, viszonylag önkényes megállapodásra jutottak az FSC küszöbértékét illetően.

Az FSC egy olyan függvény, amely két közel azonos felbontású térfogat Fourier-transzformáltjai közötti korrelációs koefficienseket mutatja a reciprok távolság (1/d ($Å^{-1}$)) függvényében (PENCZEK 2010).

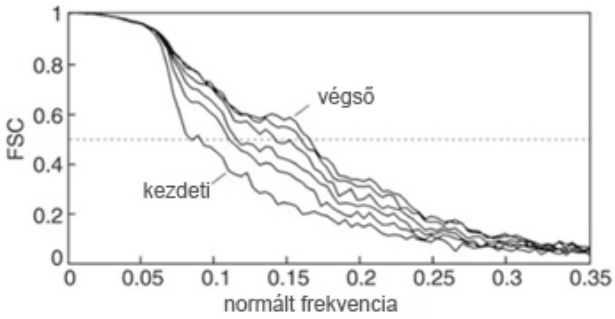
Az FSC meghatározásához az adatokat (2D vagy 3D) fele-fele arányban kettéválasztják (pl. random módon, vagy külön a páros sorszámú és páratlan sorszámú adatokat), és az egymáshoz való hasonlóságukat (korrelációjukat) vizsgálják a távolság reciprokának (1/d) függvényében. A teljes egyezés (FSC=1) a nagyobb méretek (kisebb frekvenciák) esetén valósulhat meg, de az egyre finomabb részleteknél (nagyobb frekvenciák) az eltérés nő és az FSC értéke egyre csökken.

(Sokáig az volt a gyakorlat, az összes rendelkezésre álló adatból készítették az első 3D rekonstrukciót, gondolván, hogy több adat jobb felbontást eredményez. Az adatok felezése csak a második lépésben történt meg. Henderson megcáfolta azt a feltételezést, hogy az adatok ilyen kezelése a több adat miatt jobb felbontást eredményez. Hátrány viszont származik belőle, mert a két féladatból készült két rekonstrukció már nem független egymástól, hiszen az összadatból nyert szögeket is felhasználták (HENDERSON 2011).)

A 4.3.18. ábrán azt mutatjuk meg, hogyan változik az FSC a reciprok távolság függvényében a rekonstrukciós finomítás előrehaladásával. Ugyanis az FSC-t minden finomítási lépésben meghatározzák.



a /



b/

4.3.18. ábra. 3D rekonstrukciós finomítási folyamat nyomon követése 80S riboszómán (*Thermomyces lanuginosus*-ból) 11 finomítási lépésben. Az ábrán csak minden második lépés eredménye látható. a/ A 3D térképek változása a finomításkor. b/ Az egymást követő finomítási lépésekhez tartozó Fourier-héjak korrelációja (FSC) nő: alul a legelső finomítási lépéshez, felül a legutolsó lépéshez tartozó FSC-görbe látható. A szerzők a korábban szokásos FSC=0,5 értéket választották felbontási kritériumként (pontozott vonal), így az ehhez tartozó felbontási távolságok 1/0,05347=18,9 Å-ről 1/0,07874=12,7 Å-re javultak a finomítás folyamán (FRANK 2006).

Henderson kritikája szerint (HENDERSON 2014) 2011 előtt olyan felbontási értékeket közöltek a cikkek, amelyek egymásnak ellentmondtak, túlságosan jók, a valóságnak nem megfelelőek voltak. Ez azért történhetett meg, mert a 3D rekonstrukciós finomításakor nemcsak a hasznos jel nő meg, hanem a zaj is, ilyenkor a megnövelt zaj már hasznos jelnek tűnik. Ezt a jelenséget „túlillesztésnek” angolul „overfitting”-nek nevezik. (hiv.) Henderson ráirányította a figyelmet egy ún. „gold-standard” eljárás szükségességére (HENDERSON 2012).

A „túlillesztés” (overfitting) elkerülésére a következő gold standard eljárást dolgozták ki Scheres és munkatársai: (SCHERES 2012 C):

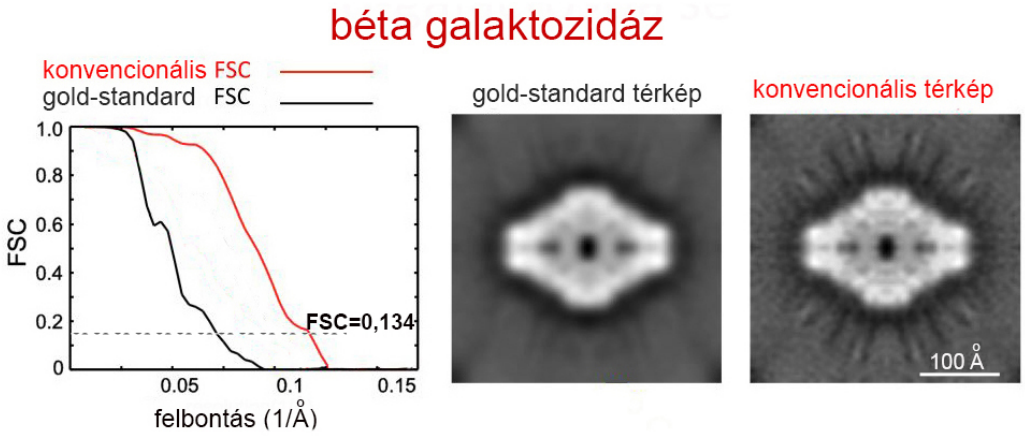
– az orientáció meghatározására szolgáló adatokat már a finomítási eljárás előtt fele-fele arányban kettéválasztják (a konvencionális FSC-számításban az adatok kettéválasztása az első finomítás után történik),
– a finomítást ugyanazon kiindulási modellhez és különböző kiindulási modellekhez viszonyítva is elvégzik,
– a finomításban aluláteresztő szűrőt használnak, mert csak az alacsonyabb frekvenciájú adatokban (részecskék kontúrjaiban) elég jó a jel/zaj viszony a képek orientációjának meghatározásához. A gold standard eljárásban aluláteresztő szűrőként a FSC négyzetgyökét használják.

Az aluláteresztő szűrő használata azért fontos, mert a finomítás csak a hasznos jelet javítja, és a zajt nem növeli. A konvencionális finomításban is használják az FSC-t aluláteresztő szűrőként, de a gold standard FSC-számítástól eltérő módon (SCHERES 2012 C).
A felbontásnak a kiindulási modelltől függő torzítását a konvencionális FSC-számításban az okozza, hogy a két részre választott adatok a finomítás kezdetén még együtt voltak, és ezért együtt függtek a kiindulási 3D modelltől. A gold standard FSC-számítás része a korábban említett RELION szoftvercsomagnak, végrehajtása külső beavatkozást nem igényel.

Az adatok kettéválasztása a finomítás előtt elvben befolyásolhatja a felbontást az adatok kisebb száma miatt, de a krio-EM-ben oly nagy számú adattal dolgoznak, hogy a kettéválasztás gyakorlatilag nem befolyásolja a felbontást. (Három tesztmintában a részecskék száma: GroEL 5053, béta galaktozidáz 50330, hepatitisz B kapszid 5403.)

A felbontás becsléséhez az FSC=0,143 kritériumot használják mind a konvencionális, mind pedig a gold standard eljárásban, mert ekkor van legjobban összhangban a krio-EM és a röntgendiffrakciós felbontás (ROSENTHAL 2003, MURATA 2018). A korábban használt FSC=0,5 kritérium (BÖTTCHER 1997, VAN HEEL 2005) a felbontás megállapítására túl lazának bizonyult. A valóságban jobb felbontásúak voltak a térképek, mint azt a FSC=0,5 kritérium sugallta.

A konvencionális FSC- és a gold standard FSC-számítás közötti különbséget Scheres három korábbi mérés (GroEL, béta galaktozidáz és hepatitisz B vírus kapszidja) újraszámolásával mutatja meg, összehasonlítva egyrészt az FSC-görbék menetét, illetve a számított térképeket (4.3.19. ábra). (SCHERES 2012) A kétféle módszer összehasonlításához az adott támpontot, hogy a három makromolekulának a nagy felbontású kristályszerkezeti adatai is rendelkezésre álltak röntgendiffrakcióból. Itt csak a béta galaktozidázra vonatkozó adatokat mutatjuk be.



4.3.19. ábra. A konvencionális FSC (Fourier-héj korreláció) és a gold standard FSC összehasonlítása krio-EM-mel vizsgált béta galaktozidáz makromolekulán. A bal oldalon látható FSC-görbék szerint a konvencionális FSC-számítás látszólag jobb felbontást eredményez (8,6 Å). Viszont a „valódi” felbontás (13,9 Å) a gold standard FSC-nek felel meg. A jobb oldali képek a rekonstruált térképek középponti metszetét mutatják.

A konvencionális számolás zajosabb képet és több műterméket ad, mint a gold-standard FSC (SCHERES 2012 C).

Irodalom

AGARD, D. et al. (2014): Single-Particle Cryo-Electron Microscopy (Cryo-EM): Progress, Challenges and Perspectives for Further Improvement, *Advances in Imaging and Electron Physics* 185, 113–137. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800144-8.00002-1

AMOS, B. (2005): Novel Benchtop Optical Diffractometer, *Microscopy and Analysis* September 2005, 5

BAI, X. et al. (2015): How cryo-EM is revolutionizing structural biology, Trends in Biochemical Sciences 1-9, http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005.

BAKER, L.B. et al. (2010): Analysis of Subnanometer Resolution Cryo-EM Density Maps, *Methods in Enzymnol.* Jensen G.(ed), 483, 1–29.

BÖTTCHER, B. et al.(1997): Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy, *Nature* 386, 88–91.

BRUBAKER, M.A. et al. (2015): Building Protein in a Day: Efficient 3D Molecular Reconstruction, arXiv:1504.03573 (cs.CV), DOI: 10.1109/CVPR.2015.7298929

CHENG, Y. et al. (2015 A): A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy, *Cell* 161, 438–448.

CHENG, Y. et al. (2015 B): A Supplement to Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.050

CONG, Y. et al. (2010): Chapter Eight – Single Particle Analysis at High Resolution, Methods *in Enzymology* 482, Jensen G. (ed). 211–235.

DA FONSECA, P. (2014): EM Course 2014 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK), 5 Lecture, Initial Data Analysis.

DANDEY, V.P. et al. (2018): Spotiton: New features and applications,. *Journal of Structural Biology* 202, 161–169.

DE ROSIER, D.J. és A. KLUG (1968): Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs, *Nature* 217, 130–134.

ERICKSON, H.P. és KLUG, A. (1971): Measurement of Defocusing and Aberrations by Fourier Processing of Electron Micrographs, *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. B 1971 261, doi: 10.1098/rstb.1971.0040.

FRANK, J. (2006): Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State, Oxford University Press, ISBN 0-19-515096-1; 0-19-518218-9 (pbk.)

GLAESER, R.M. (2016): Specimen Behavior in the Electron Beam, *Methods in Enzymology* 579, Jensen G.(ed), 19–47. ISSN 0076-6879, http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.010

HARAUZ, G. et al. (1986): Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction, *Optik* 73, 146–156.

HENDERSON, R. (2012): Outcome of the First Electron Microscopy Validation Task Force Meeting, *Structure* 20-330(2), 205–214.

HENDERSON, R. (2014.): EM Course 2014 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK), 8 Lecture, Resolution, Sharpening, Validation

HENDERSON, R. (2018): From Electron Crystallography to Single Particle CryoEM (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie*, Int. Nat. Edition, doi: 10.1002/anie.201802731.

HENDERSON, R. and UNWIN, P.N.T. (1975): Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature* 257, (5521) 28–32.

HENDERSON, R. et al. (2011): Tilt-Pair Analysis of Images from a Range of Different Specimens in Single-Particle Electron Cryomicroscopy, *J. Mol. Biol* 413(5-3), 1029–1046.

KHOSHOUEI, M. et al. (2017): Volta phase plate cryo-EM of the small protein complex Prx3, *Nature Communcations* 7, Article number 10534

KLUG, A. et al. (1964): An Optical Method for the Analysis of Periodicities in Electron Micrographs, and Some Observations on the Mechanism of Negative Staining, *J. Mol. Biol.* 10, 565–569.

KUCUKELBIR, A. et al. (2014): The Local Resolution of Cryo-EM Density Maps, *Nature Methods* 11(1), 63–65.

LANDER, G. (2009): Thesis, https://www.ocf.berkeley.edu/~glander/downloads/EMIntro.pdf

LENZ, F.A. (1971): Transfer of Image Information in the Electron Microscope, In Electron Microscopy in Material Science, ed. U. Valdre, eBookISBN 9780323142564, p.556.

LESCHZINER, A.E. et al. (2006): The orthogonal tilt reconstruction method: An approach to generating single-class volumes with no missing cone for ab initio reconstruction of asymmetric particles, *Journal of Structural Biology* 153, 284–299.

LUDTKE, S.J. et al. (1999): EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *Journal of Structural Biology* 128, 82–97.

MALLICK, S.P, et al. (2005): ACE: Automated CTF Estimation, *Ultramicroscopy* 104, 8–29.

MASTRONARDE, D. N. (2005): Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movement, *Journal of Structural Biology* 152, 36–51.

MERK, A. et al. (2016): Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery, *Cell* 165, 1698–1707.

MINDELL, J. A. et al. (2003): Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy, *Journal in Structural Biology* 142, 334–347.

MURATA, K. et al. (2018): Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules, BBA General Subjects 1862, 324–334. http://dx.doi.org/10.1016/ j.bbagen.2017.07.020

NAKANE, T. et al. (2020): Single-particle cryo-EM at atomic resolution, *Nature* 587, 152–156.

NOGALES, E. et al. (2015): Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity, *Molecular Cell* 58, 677–688.

PASSMORE, L. et al. (2016): Specimen preparation for high-resolution cryo-EM, *Methods in Enzymol.* Jensen G. (ed). 579, 51–86. doi:10.1016/bs.mie.2016.04,011.

PENCZEK, P.A. (2010): Chapter 3, Resolution Measures in Molecular Electron Microscopy in *Methods in Enzymology* Jensen G. (ed). 482, 74–100.

PUNJANI, A. et al. (2017): cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination, *Nature Methods* 14(3), 290–297.

QUENTIN, D. et al. (2018): Electron cryomicroscopy as a powerful tool in biomedical research, *J. Mol. Med.* (Berl) 96 (6) 483–493.

RADEMACHER, M. et al. (1987): Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to 50S ribosomal subunit of Escherichia coli, *Journal of Microscopy* 146, 2, 113-136.

RAZINKOV, I. et al. (2016): A new method for vitrifying samples for cryoEM, *Journal of Structural Biology* 195(2), 190–198. doi: 10.1016/j.jsb.2016.06.001.

RENAUD, J-P. et al. (2018): Cryo-EM in drug discovery: achivements, limitations and prospects, *Nature Reviews Drug Discovery* 17, 471–492.

ROHOU, A. et al. (2015): CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs, *J. Struct. Biol.* 192 (2) 216–221.

ROSENTHAL, P.B. et al. (2003): Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy, *J. Mol. Biol*. 333, 721–745.

RUSSO, C. J. et al. (2014): Ultrastable gold substrates for electron cryomicroscopy, *Science* 326 (6215): 1377–1380. doi:10.1126/science.1259530

RUSSO, C.J. et al. (2016): Progress towards an optimal specimen support for electron cryomicroscopy, *Current Opinion in Structural Biology* 37, 81–89.

SAXTON, W. O. et al. (1982): The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein, *Journal of Microscopy*, 127,2, 127-138.

SCHERES, S.H.W. (2012 B): RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination, *J. Struct. Biol.* 180(3) 519–530.

SCHERES, S.H.W. (2012): A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination, *J. Mol. Biol.* 415, 406–418.

SCHERES, S.H.W. (2016): Processing of Structurally Heterogeneous Cryo-EM Data in RELION,Chapter 6, *Methods in Enzymology* Jensen G. (ed). 579, 125–157.

SCHERES, S.H.W. (2017): EM Course 2017 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK), 6 Lecture, Image refinement.

SCHERES, S.H.W. et al. (2012 C): Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination, *Nat. Methods* 9(9), 853–854.

SHATSKY, M. et al. (2009): A Method for the Alignment of Heterogeneous Molecules from Electron Microscopy, *J. Struct. Biol.* 166 (1), 67–78.

SIGWORTH, F.J. et al.(1998): A maximum-likelihood approach to single-particle image refinement, *J. Struct. Biol.* 122, 328–339.

SULOWAY, C. et al. (2005): Automated molecular microscopy: The new Leginon system, *Journal of Structural Biology* 151, 41–60.

TAYLOR, K.A. and GLAESER, R.M. (1974): Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals, *Science* 186, 1036–1037.

TAYLOR, K.A. and GLAESER, R.M. (1976): Electron Microscopy of Frozen, Hydrated Biological Specimens, *Journal of Ultrastructure Research* 55, 448–456.

TEGUNOV, D. et al. (2019): Real-time cryo-electron microscopy data processing with Warp, *Nature Methods* 16, 1146–1152.

UNWIN, P.N.T. (1975): Beef Liver Catalase Structure: Interpretation of Electron Micrographs, *J.Mol. Biol.* 98, 235–242.

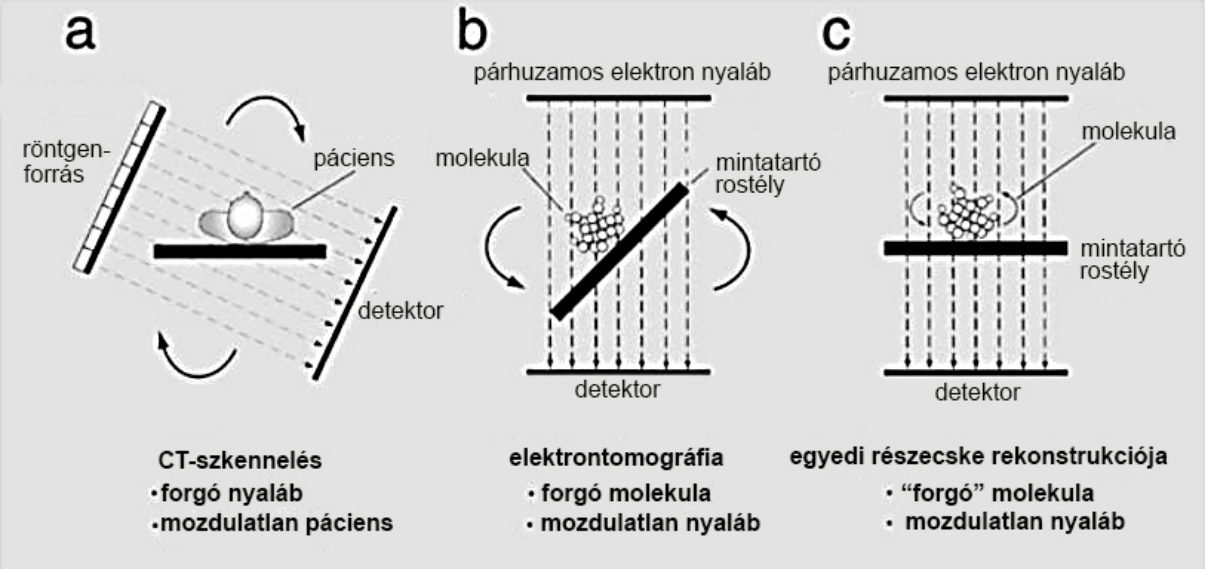
VAN HEEL, M. (1987): Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection direction for 3D reconstruction, *Ultramicroscopy* 21, 111–124.

VAN HEEL, M. et al. (2005): Fourier shell correlation threshold criteria, *Journal of Structural Biology* 151, 250–262.

V. Krio-elektrontomográfia

V.1. Áttekintés a krio-elektrontomográfiáról

A tomográfia a görög „tomos”, azaz szelet és a „gráfia”, írás összetételéből származik. Olyan eljárást jelent, amelyekben szeletetek készítünk egy objektumról a szó szorosabb vagy átvitt értelmében. A hétköznapokban leggyakrabban a CT, a kórházi komputertomográfia (angolul computerized tomography,) révén találkozunk a krio-elektrontomográfiával analóg módszerrel. CT kép felvételekor mozgó röntgenforrással készítenek kétdimenziós képeket nyugalmi helyzetben lévő páciensről és a 2D képekből háromdimenziós képeket rekonstruálnak. (5.1.1. ábra)



5.1.1. ábra Az orvosi röntgen komputertomográfia hasonlósága az elektrontomográfiával és az egyedi részecskék analízisével (FRANK 2006 B)

Az elektrontomográfia kis túlzással a CT mikroszkopikus változata, amely elektronokkal történik, és a vizsgálandó minta beesési szögét változtatják az álló elektronforráshoz képest. Az így felvett kétdimenziós képsorozatból rekonstruálják a minta háromdimenziós képét. Ha a vizsgálat alatt a mintát alacsony hőmérsékleten tartják az elektronnyaláb okozta sugárkárosodás elkerülésére vagy csökkentésére, akkor krio-elektrontomográfiáról beszélünk (a továbbiakban krio-ET). A krio-ET pusztán kétdimenziós képeivel, 3D rekonstrukció nélkül is, értékes adatokat szolgáltathat biológiai szerkezetekről.

Krio-ET-vel többek között szerkezeti elemek sejten belüli elhelyezkedése, egész sejtek és szövetek vizsgálhatók natív környezetben. Összekötő kapocsnak tekinthető a

fénymikroszkópiát alkalmazó sejtbiológia és a közel atomi felbontású, egyedi részecskék analízisét felhasználó szerkezeti biológia között.

Az elektrontomográfia gondolatát R.G. Hartnak tulajdonítják, aki a folyamatot körülírva „polytropic montage”-nak nevezte (HART 1968). De ugyancsak 1968-ban jelent meg De Rosier és Klug cikke a Nature-ben „Háromdimenziós szerkezetek rekonstrukciója elektronmikroszkópos képekből” címmel (DE ROSIER és KLUG 1968). A kétdimenziós vetületekből történő 3D rekonstrukció matematikai alapjait sokkal régebben vetették meg (RADON 1917).

A krio-ET és az egyedi részecskék analízise (SPA) a krio-elektronmikroszkópiának két ága, amelyekben a vizsgálatokat elektronmikroszkópban, nagyon hasonló körülmények között végzik. A sok hasonlóság ellenére most csak a különbségekre térünk ki. A SPA-ban a sokirányú kétdimenziós vetítést a nagyszámú részecske (biológiai makromolekula) véletlenszerű térbeli eloszlása teszi lehetővé. Ezzel szemben a krio-ET-ben a mintatartót kell dönteni, hogy a vizsgálandó objektumról különböző szögek alatt készíthessünk vetületet. A SPA-ban a vizsgálandó molekulákat az eredeti környezetükből kiszakítva (in vitro), tisztított formában, pufferoldatokból fagyasztják be, a krio-ET-nél a vizsgálandó objektumok eredeti környezetükben megmaradnak. Ez különösen olyankor fontos, amikor a makromolekulák közötti kölcsönhatás oly gyenge, hogy a SPA-nál szokásos tisztítási eljárások szétszakítanák azokat. De krio-ET alkalmazandó olyan esetekben is, amikor sejtekben vagy szövetekben a funkcionális kapcsolatok vizsgálata a cél. Így például a sejtszervecskék vizsgálatakor, amikor a sejt egésze érintetlen kell hogy maradjon. Ebben az értelemben a krio-ET-t in situ vizsgálatnak tekintik. Minthogy a krio-ET-vel szövetek is vizsgálhatók, nemcsak a sejten belüli, de a sejtek közötti kölcsönhatásokra is fényt lehet deríteni. A krio-ET a sejtbiológusok fontos segédeszköze. A krio-ET hidat képez a molekuláris és celluláris szintű szerkezet vizsgálatok között.

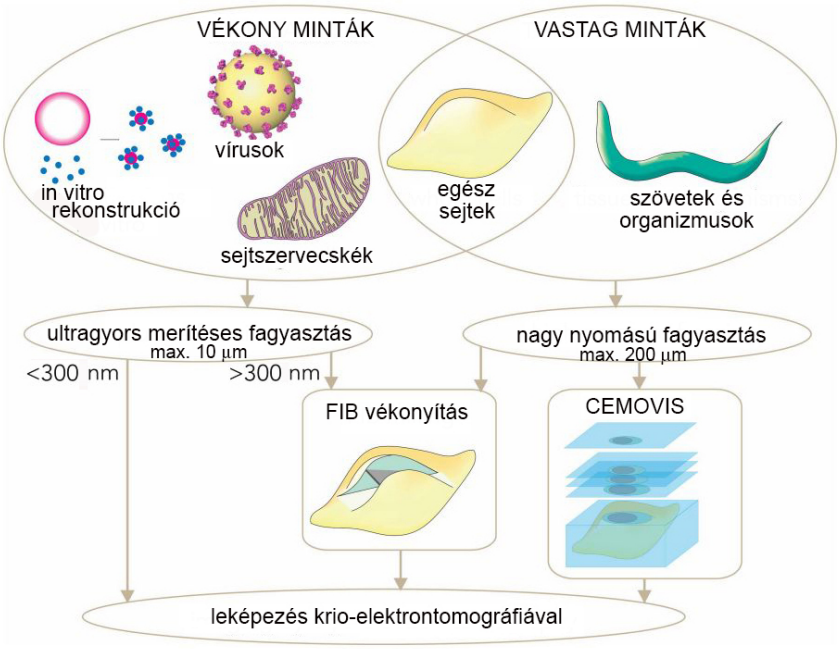
A krio-ET és a SPA közötti különbségeket sorolva, utalnunk kell arra, hogy a vizsgálatok feltételei a krio-ET-nél kedvezőtlenebbek, mint a SPA-nál, mert bár a képek mindkét esetben zajosak és kontrasztszegények, a krio-ET-nél nehezebb gazdálkodni a megengedhető teljes elektrondózissal. Ugyanis ugyanarról a területről sok szög alatt kell felvételsorozatot készíteni. Így egyetlen felvételre kisebb dózis jut, ezért zajosabb lesz a kép, mint a SPA-nál. A krio-ET-ben a minták általában vastagabbak (~100-500 nm), mint a SPA-ban (~50 nm), így a vizsgálandó objektum alatt és felett léteznek olyan mintarészletek, amelyek takarást okozhatnak az elektronnyaláb útjában. A minta valódi vastagsága virtuálisan megnő a minta döntésekor, mert az elektronnyalábnak hosszabb utat kell megtenni a döntött mintában, mint

az elektronnyalábra merőleges helyzetben. A sok kísérleti nehézség azt hozza, hogy rosszabb felbontás érhető el krio-ET üzemmódban (1–5 nm), mint SPA-ban (0,25–0,4 nm). Az előbbiben molekuláris felbontásról, az utóbbiban közel atomi felbontásról beszélünk. A krio-ET és a SPA felbontását folyamatosan javítják. Számoltak már be 3,9 Å-ös felbontásról a krio-ET-ben (SCHUR 2016) és 1,25 Å felbontásról a SPA-ban (YIP 2020). A krio-ET a gyengébb felbontás ellenére is egyedülálló módszer, amely nem helyettesíthető sem röntgen krisztallográfiával, sem más módszerrel éppen az in situ jellege miatt. A biológusok számára fontos, hogy a különböző felbontású módszerekből együttesen átfogó képet lehessen alkotni az élő szervezetről. Számos kiváló összefoglaló munka foglalkozik a krio-ET-vel (PLITZKO 2019, KUBA 2020).

V.2. A krio-ET minta-előkészítése

V.2.1.Vitrifikálás

Fagyasztással védjük a vizsgálandó mintát az elektronmikroszkópban uralkodó vákuumtól és a sugárkárosodást okozó elektronnyalábtól. Fagyasztás nélkül a minta dehidratálódna, tönkremenne. Hasonlóképpen mintakárosító hatása van az elektronmikroszkóp elektronnyalábjának. A Dubochet által bevezetett ultragyors merítéses fagyasztás (plunge freezing), amely amorf jégbe ágyazza be a mintát, és ezzel közel natív állapotban megőrzi (I. fejezet), a krio-ET esetén is alapvető fontosságú a vékony mintáknál (<10 μm). Tekintettel arra, hogy az egyedi részecskék analízisénél (SPA) ezt a módszert részletesen tárgyaltuk, itt a krio-ET-nél ennek tárgyalásától eltekintünk.

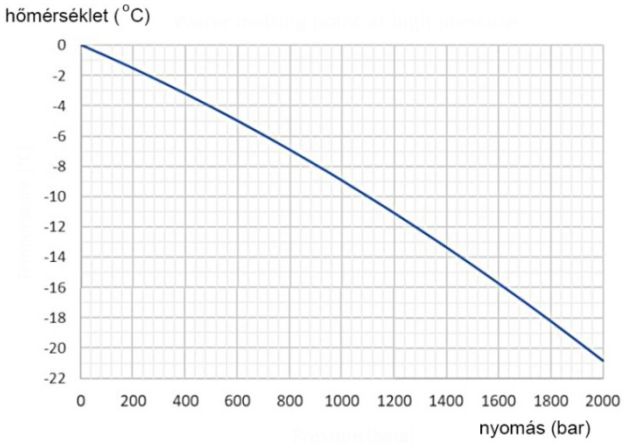


5.2.1. ábra. Minta-előkészítési módok a krio-elektrontomográfiához (HUTCHINGS 2018)

A krio-ET minta-előkészítésének lehetséges módjait az 5.2.1. ábrán mutatjuk:
A minta fagyasztását vitrifikálásnak nevezzük abban az esetben, amikor a mintában a víz amorf, üvegszerű formában fagy meg. A vitrifikálásnak nagyon gyorsan, milliszekundum nagyságrendű idő alatt kell végbemenni ahhoz, hogy a jég amorf formában jöjjön létre. A gyors hűtés miatt a minta alkotórészeinek mozgását meggátoljuk, ezért ezt a folyamatot kriofixálásnak is nevezik. Az ultragyors merítéses fagyasztáskor a minta vékonysága miatt a vitrifikálódás 10^{-4} s alatt mehet végbe, viszont a kiro-ET-vel vizsgált vastagabb mintáknál a lehűlés több időt vesz igénybe.
A 5.2.1. ábra szerint a gyors merítéses fagyasztás maximum 10 μm mintavastagságig alkalmazható, ellenkező esetben a nagynyomású fagyasztást kell igénybe venni.
A nagynyomású fagyasztásnak is megvannak a maga korlátai: 200 μm -nél vastagabb mintákra nem használható. A mikroszkópba kerülő mintának 300-500 nm-nél vékonyabbnak kell lennie, ezért a nagynyomású fagyasztást az esetek többségében krio-ultramikrotómos metszés követi. A metszésnél modernebb eljárás a fókuszált ionnyalábbal történő vékonyítás, amit az irodalomban FIB-bel jelölnek (FIB, Focused Ion Beam).

V.2.2. Nagynyomású fagyasztás

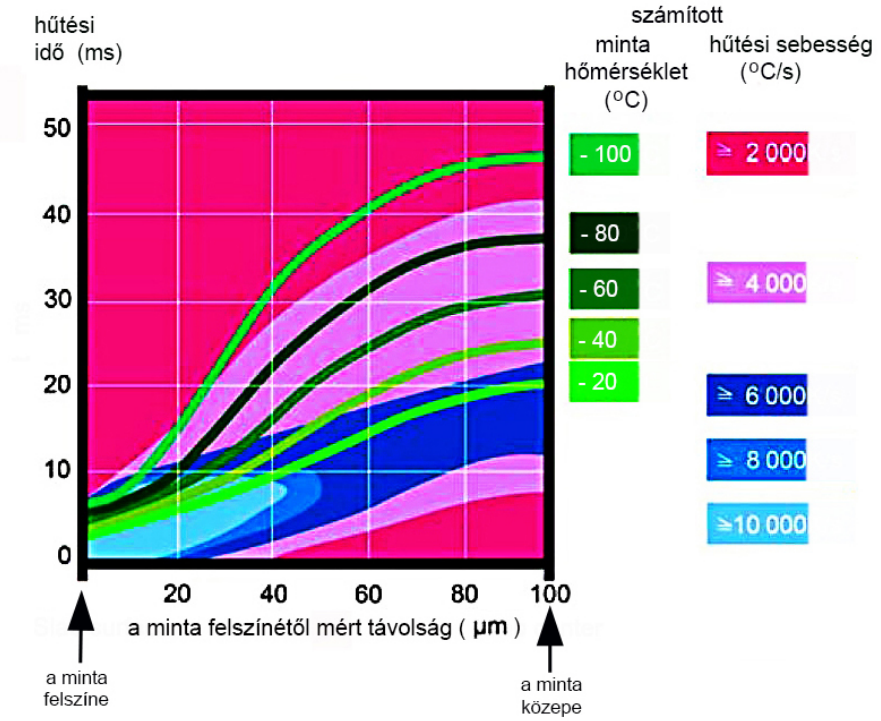
Nagy nyomás alkalmazásakor azt a térfogat-növekedést gátolják meg, ami a víznek jéggé való átalakulásakor fellép.
A tiszta jég olvadáspontja definíció szerint 0 °C, 1 atmoszféra nyomáson. A nyomás növelésével -22 °C hőmérsékletig megtartható folyékony, túlhűtött állapotban (5.2.2. ábra). (A nyomás hivatalos egysége a pascal (Pa): 10^5 Pa = 1 bar = 0,987 atmoszféra.)



5.2.2. ábra. A víz fagyáspontjának csökkenése a külső nyomás függvényében (WWW.ENGINEERINGTOOLBOX.COM)

A nagynyomású fagyasztás Moor és Riehle nevéhez fűződik, akik 100-200 μm vastag mintákat tudtak fagyasztani kristályos jég képződése nélkül (MOOR 1968). Az általuk kifejlesztett első nagynyomású fagyasztóberendezés részletes leírását megtaláljuk Moor későbbi cikkében (MOOR 1987). Manapság kereskedelmi berendezésekben úgy végzik a fagyasztást nagy nyomáson (200-210 MPa), hogy a mintát két oldalról cseppfolyós nitrogénsugárral hűtik.

Az 5.2.3. ábrán elméleti számítások segítségével mutatjuk be, hogy milyenek a fagyasztási viszonyok egy nagynyomású fagyasztókészülékben 200 μm vastag vizes minta vitrifikálásakor (STUDER 1995 és 2008). A mintát mindkét oldaláról cseppfolyós nitrogénsugárral hűtik 10 000 °C/s-nál nagyobb sebességgel. Az ábra jobb széle a teljes mintavastagság felét (100 μm) jelöli. (A tapasztalat szerint 200 μm-nél vastagabb mintát nem lehet nagynyomású fagyasztással vitrifikálni.) Az ábrán az látható, hogyan függ össze a hűtési idő, a hűtés sebessége és az adott mintamélységben uralkodó hőmérséklet. A színezett területek a hűtési sebességeket, míg a színes vonalak mintahőmérsékletet mutatják a mintamélység függvényében.



5.2.3. ábra. Elméleti számítások vizes mintának nagynyomású fagyasztóban történő vitrifikálására (lásd a szöveget) (STUDER 1995 és2008)

Az 5.2.3. ábráról leolvasható, hogy a minta felszínéhez közel kb. 40 μm mélységig 10 000 °C/s-nál nagyobb hűtési sebesség érhető el a világoskékkel jelölt területen. A -20 °C minta-hőmérsékletnek megfelelő zöld görbe mentén a víz még túlhűtött, folyadék állapotban van jelen

ezen a nyomáson (210 MPa). A -20 ^{o}C-nál alacsonyabb hőmérsékletet jelző görbék mentén a víz amorf, üvegszerű (vitrifikált) állapotban van. 50 ms hűtés után az egész 200 μm vastag minta vitrifikált állapotba kerül.

A vitrifikálódás kulcsfontosságú tényezője a minta lehűlésének nagy sebessége. A nagy hűtési sebesség biztosítja, hogy a vizsgált sejtben vagy szövetben változások nem tudnak végbemenni az idő rövidsége miatt, így közel natív állapotban vizsgálhatjuk a mintát.

A minta körüli hőt a lehető legnagyobb sebességgel kell elvezetni. Ezt több tényező is akadályozza:

a./ Leidenfrost-hatás. Abban nyilvánul meg, hogy amikor a minta cseppfolyós nitrogénnel kerül érintkezésbe, akkor körülötte nitrogéngőz keletkezik, ami rossz hővezető, és gátolja a mintának a cseppfolyós nitrogén forráspontjára való lehűlését (Leidenfrost-hatás, WIKIPÉDIA),

b./ a mintában lévő víz maga is rossz hővezető,

c./ a folyékony fázisból szilárd fázisba való átmenet hőfelszabadulással jár. (Az olvadáshoz hőt kell betáplálni, fagyáskor ez a hőmennyiség szabadul fel. Olvadáshő, WIKIPÉDIA)

V.2.3. A vitrifikált minta metszése

Mint az 5.2.1. ábra mutatja, a vastagabb mintákat csak szeletelés vagy ionsugaras vékonyítás után lehet elektronmikroszkóppal vizsgálni. A CEMOVIS néven ismeretes mintaszeletelési eljárást alacsony hőmérsékleten, -140 ^{o}C alatt végzik (CEMOVIS, Cryo-Electron Microscopy of VItreous Samples, amorf formában fagyasztott minták elektronmikroszkópiája). Az idézett -140 ^{o}C-nak az a jelentősége, hogy ha a minta visszamelegszik -135 ^{o}C-ra, akkor az amorf jég a mintában kristályossá válik, és a minta szerkezetét jelentősen károsítja.

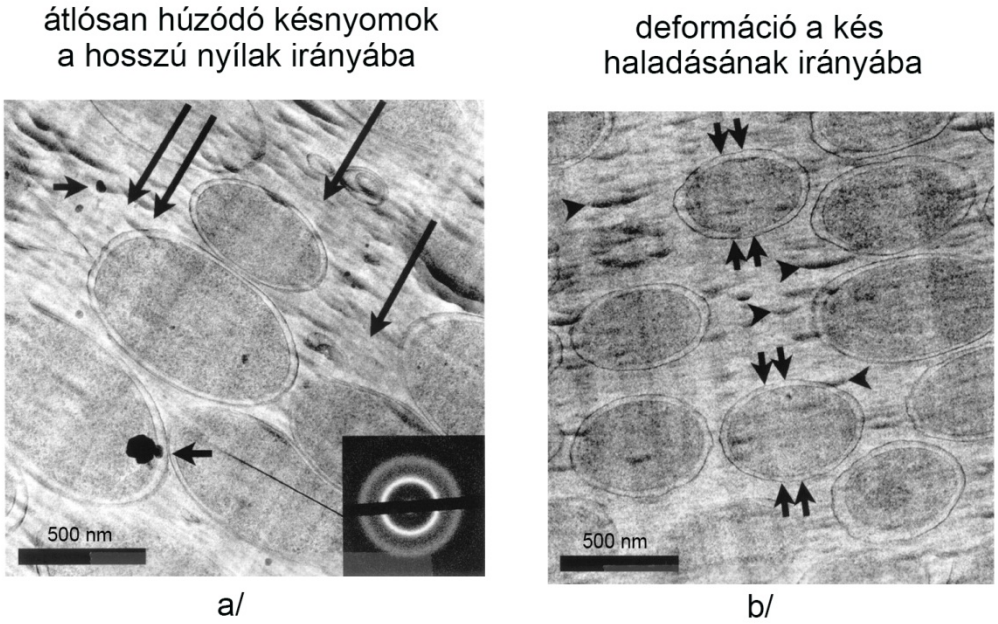
A CEMOVIS-ra jellemző, hogy sem festést, sem kémiai fixálást nem alkalmaznak, és a sejtek, szövetek megmaradnak natív állapotban. A nyerhető képek jobb minőségűek, mint a konvencionális elektronmikroszkópiában alkalmazott mintapreparáláskor. Ez utóbbi alatt olyan eljárást értünk, amelyben a mintát először kémiailag fixálják szobahőmérsékleten, szerves oldószerrel dehidratálják, majd megfestik, és epoxigyantába vagy műanyagba ágyazzák be az ultramikrotómos szeletelés előtt. A konvencionális preparálás után a mikroszkópos képeken a festés miatti amplitúdókontraszt dominál (rendszám okozta különbségek), a nem festett, krio-preparált (cseppfolyós nitrogénes hűtés) minták elektronmikroszkópos képére viszont a fáziskontraszt jellemző.

Vannak más minta-előkészítési eljárások is, amelyeket hűtött körülmények között végeznek. Ilyen pl. gyors fagyasztást és fagyasztásos helyettesítést együttesen alkalmazó eljárás (az angolul Rapid Freezing and Freeze-Substitution, röviden RF/FS). Ebben többnyire

nagynyomású fagyasztással -80 ^{o}C -ra lehűtik a mintát, a víztartalmát alacsony hőmérsékleten lehelyettesítik szerves oldószerrel, fixálják, majd -40 ^{o}C -on beágyazzák műanyagba. Ezt követi az ultramikrotómos szeletelés. Az RF/FS technika kevesebb műterméket okoz, mint a szobahőmérsékletű konvencionális eljárás (MURK 2003). de többet, mint a CEMOVIS. (LUCIC 2005)

A vitrifikált minta metszése hasonló a szobahőmérsékleten végzett metszéshez, de cseppfolyós nitrogénatmoszférában történik kb. -160 ^{o}C -on. A krio-ultramikrotómos metszés elterjedését évtizedekig technikai nehézségek hátráltatták: először is jó biológiai minta szükséges, aztán a mintát fagyasztása után át kell vinni a krio-mikrotómba, a metszés után mintatartó rostélyra kell helyezni, átvinni az elektronmikroszkópba, és alacsony dózisú körülmények között felvételt készíteni. Minden egyes lépésnek megvannak a nehézségei, és a hibázás valószínűségei összeszorzódnak.

A krio-metszés során műtermékek keletkezhetnek: késnyomok, a minta kompressziós deformációja, repedések (crevasses) és hullámosodás (chatter)



5.2.4. ábra. Műtermékek gram-negatív baktériumok krio-metszésekor: a/ a szeletelő kés nyomai párhuzamosak a szeletelés irányával (hosszú nyilak). A rövid nyilak jégkristály szennyeződésekre mutatnak. A minta Escherichia coli K-12. b/ Sejtek és membránjaik deformálódása a metszés irányára merőlegesen. A közel vízszintes nyílfejek repedésekre (angolul crevasses) mutatnak. A minta *Pseudomonas auruginosa* PAO1 (MATIAS 2003)

A CEMOVIS alkalmazásakor megjelenő műtermékekről és azok csökkentéséről Al-Amoudi munkájának tanulmányozását ajánljuk (AL-AMOUDI 2005).

A Diatome cég speciális 25°-os élű gyémántkéseket kínál a jó minőségű krio-metszetek készítéséhez a 30–150 nm mintavastagság-tartományban. A 3D rekonstrukcióhoz fontos, hogy a felhasznált 2D képekben ne legyenek torzítások a metszés miatt.

V.2.4. Ionsugaras mintavékonyítás

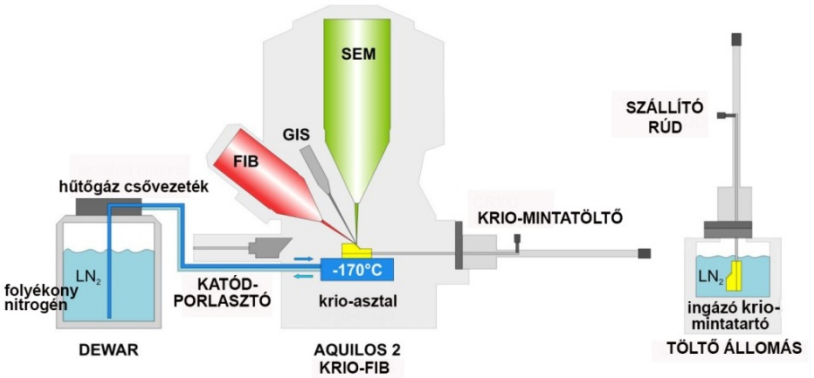
Az ionsugaras vékonyítás az anyagtudományból került a biológiába 2007 körül. (Nemzetközileg is kiemelkedő szakértője a területnek Barna Árpád, aki az ionsugaras vékonyítás elméletét és gyakorlatát nagy mértékben gazdagította. Munkássága nyomán jelenleg a Technoorg-Linda Kft. gyárt ionsugaras vékonyítókat.)

Ahhoz, hogy a FIB jól alkalmazhatóvá váljon a biológiában, krio-FIB-et kellett belőle készíteni. A krio-FIB-et számos jól megírt összefoglaló cikk ismerteti (MARKO 2007, RIGORT 2012 és 2015, PARMENTER 2014, 2016 és 2020, PLITZKO 2019, DE WINTER 2020, KUBA 2020, WAGNER 2020).

A katódporlasztáson alapuló mintavékonyítást a krio-ET-hez gallium ionsugárral végzik kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópban (FIB-SEM, Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope). A szakirodalomban a vékonyítás (angolul thinning) és a porlasztás (angolul sputtering) mellett leggyakrabban a milling kifejezést használják az ionsugárral történő mintavékonyításra. A FIB-SEM-ről magyar nyelven is találunk bővebb információt a pásztázó elektronmikroszkópiáról szóló monográfiában (POZSGAI 2016).

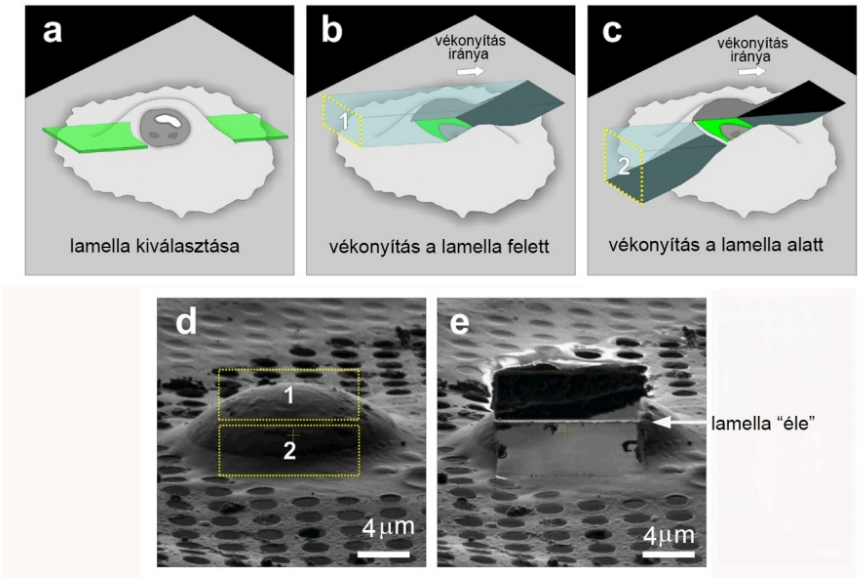
Az eljárás később került alkalmazásra a biológiában, mint a mikrotómos metszés, de egyre nagyobb körben terjed el, mert műtermék képződése nélkül képes a biológiai mintákat levékonyítani. Első lépésben szükséges volt, hogy megmutassák, hogy az ionnyaláb nem váltja ki a fagyasztott mintában lévő amorf jég kristályosodását (MARKO 2006).

A krio-ET-t kiszolgáló mintapreparáló FIB-SEM-ek mintatartója alacsony hőmérsékleten van, innen a krio-FIB-SEM elnevezés. (5.2.5. ábra)



5.2.5. ábra. Aquilos2 krio-FIB-SEM.(Thermo Fisher Scientific terméke). Piros szín jelzi a gallium ionsugarat, zöld pedig a pásztázó elektronmikroszkóp elektronnyalábját. Az „ingázó” krio-mintatartó a krio-FIB és a krio-fénymikroszkóp között ingázhat a benne lévő csereszabatos betét révén, miközben a minta hőmérséklete -140 ^{o}C alatt marad (KUBA 2020).

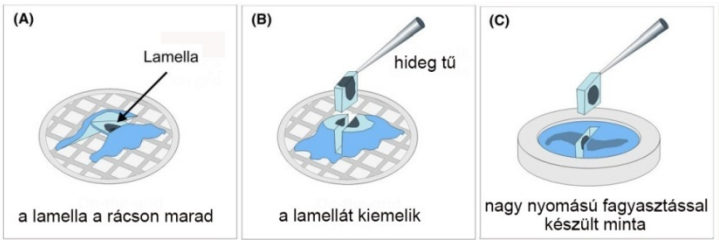
Az ábrán zöld szín jelöli a pásztázó elektronmikroszkóp optikai oszlopát, piros a fókuszált gallium ionsugarat előállító FIB optikai oszlopát. A GIS (Gas Injection System) gázbeeresztő rendszer segítségével olyan gázok (prekurzor) ereszthetők a mikroszkópba, amelyekből ion- vagy elektronsugár hatására vastag fémréteget (leggyakrabban platinát) lehet kondenzáltatni a minta felületére. Ez szükséges bizonyos mintarészek védelméhez és az előállított lamellának egy kiemelő tűhöz való kötéséhez. A katódporlasztót vékony fémrétegek előállítására használják. (A SEM és a FIB optikai tengelye 52°-os szöget zár be, a mintatartó 45° alatt van megdöntve.) A gallium ionnyaláb lapos (7°) szög alatt éri a mintatartó rostélyát, amelyen a vékonyítandó, ultragyors merítéssel fagyasztott sejttenyészet foglal helyet. Az Aquilos2 krio-FIB-SEM-ben a mintatartó asztal hőmérséklete -170 ^{o}C és a minta hőmérséklete a többlépcsős preparálási folyamatok alatt sem haladja meg a -140 ^{o}C-t.



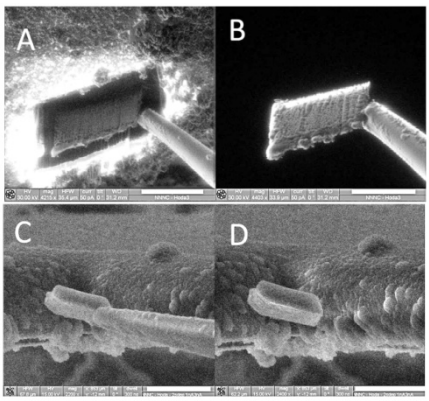
5.2.6. ábra. A lamellakészítés sémája a/ -tól c/ ábrákig. A kiválasztott terep alatt és felett bemetszést végeznek a gallium ionsugárral. A d/ ábrán egy mikrostélyon lévő minta látható, amelyen sárga pontozott téglalapokkal van bejelölve a b/ és c/ ábrának megfelelő eltávolítandó két területet. A d/ kép ionsugárral készült a FIB irányából. Az 1 és 2 jelű terület közti rész határozza meg a készítendő lamella vastagságát. (e/ ábra) (RIGORT 2015)

Az 5.2.6. ábrán bemutatott minta-előkészítés jó a krio-EM-hez, de nem elég jó a krio-ET-hez, mert a mintatartó rostély pereme gátolja a $\pm$60° – $\pm$70°-os mintadöntést. A tomográfiához

készülő lamellát kiemelik, és egy kettévágott fél-mikrostélyra helyezik át, és ott tovább vékonyítják. A minta kiemelésének folyamatát lift-out-nak nevezik a szakirodalomban. (5.2.7. ábra)



5.2.7. ábra. A kisebb méretű mintákat (max. 5 μm) ultragyors merítéses úton fagyasztják, és az (A) és (B) ábrának megfelelően készítik elő. A nagynyomású fagyasztással előállított mintát a (C) ábra szerint preparálják (KUBA 2020).



5.2.8. ábra. A lamella kiemelésének folyamata (lift-out). A kiemelő hideg tűt vízgőz fagyasztásával kötik a lamellához (A ábra), kiemelik (B és C), majd a lamellát ugyancsak vízgőz fagyasztásával rögzítik a rostélyhoz (D ábra) (PARMENTER 2016).

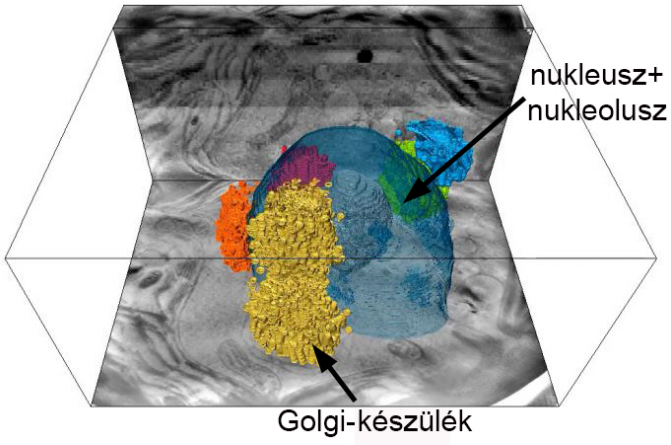
A 5.2.5. ábrán mutatott Aquilos2 krio-FIB-SEM-ben a lamella kiemeléséhez nem vízgőzt, hanem platinát kondenzáltatnak a hideg kiemelő tű és a platinával fedett lamella közzé. Ezt a GIS gázbeeresztő segítségével végzik. Miután a lamellát kiemelték, és áthelyezték egy fél-rostély alakú mintatartóba, ismét platina kondenzációjával kötik a lamellát az újabb mintatartóhoz. Végül a hideg tűt ionsugárral vágják le a lamellától. A lamellának a krio-ET-hez szükséges további vékonyítását ebben a második mintatartóban végzik el. A folyamatot videón végigkísérhetjük (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

A vékonyítás lehet „durva” és finom. Ez utóbbit polírozásnak nevezik. (A „durva”, nagyobb sebességű vékonyításkor alkalmazott FIB gyorsítófeszültség 30 kV, mintaáram 300-500 pA, polírozáskor 30 pA, (GILCHRIST 2019.) Alacsonyabb gyorsítófeszültség, kisebb ionáram vagy az ionnyaláb laposabb beesési szöge lassabb, de jobb minőségű polírozást eredményez.

(Az Aquilos specifikációja szerint az FIB feszültsége 500V és 30 kV, ionárama 1,5 pA és 65 nA között változtatható.)

Éveken át a lamellakészítés lassúsága volt a technika legnagyobb akadálya. Az említett Aquilos2 berendezéssel gyorsan és automatikusan (felügyelet nélkül, akár éjszakai műszakban) több előre kijelölt területen, sorozatban is készíthető lamella. A minta-előkészítő személyzetnek csak ki kell jelölni a mintavételek helyét és méretét, és meg kell adni a polírozás paramétereit. A krio-ET-re előkészített minta vastagsága 60–350 nm tartományba esik (VILLA 2013). Ha a minta vékony, akkor jobb felbontást lehet elérni a krio-TEM-ben, mint a vastagabb mintán.

Kitérésként megemlítjük, hogy Aquilosnak van egy olyan üzemmódja (auto slice and view) és szoftvere, amellyel az egymást követő sorozatos vékonyítások között szekunder elektronképeket vesznek fel (block face imaging), és ezek alapján készítenek 3D rekonstrukciót (5.2.9. ábra).



5.2.9. ábra. Krio-FIB-SEM szekunder elektron képek alapján készült 3D rekonstrukció (5 µm x 8 µm térfogat, *Chlamydomonas* sejt), (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2)

Bár az ilyen képek felbontásban nem veszik fel a versenyt a krio-ET-vel készített rekonstrukciókkal, mégis segítenek abban, hogy a vékonyítást kellő időpontban leállítsák.

V.2.5. Minta-előkészítés korrelációs fény- és elektronmikroszkópia segítségével

A korrelációs fény- és elektronmikroszkópia (CLEM, Correlative Light and Electron Microscopy) egyre nagyobb szerepet játszik a krio-elektrontomográfiában. Egyrészt a hagyományos (vagy más néven diffrakció által korlátozott) fluoreszcens mikroszkópiát kombinálják a krio-FIB-SEM-mel; a mintából jövő fluoreszcens fény segíti a célzott vékonyítást. Másrészt a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópiát kombinálják a nagy

felbontású transzmissziós elektronmikroszkópiával, hogy a keresett objektumot könnyebben megtalálják a krio-ET képekben (CHANG 2014).

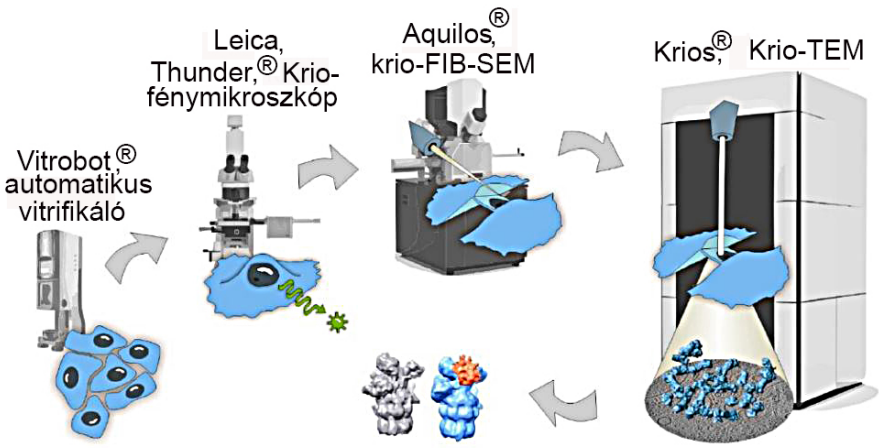
Mielőtt a mintapreparálást folytatnánk, egy rövid kitérőt kell tennünk a fluoreszcens fénymikroszkópia irányába.

A fluoreszcens fénymikroszkópia előnye a nem-fluoreszcens fénymikroszkópiához képest a jelentősen nagyobb kontraszt és szelektivitás. Csak a megfestett rész világít, a háttér sötét. Egyidejűleg több festékkel meg lehet festeni a vizsgálandó mintát, és nincs a sejtnek olyan része, amelyet nem lehetne szelektíven megfesteni. Így például a DNS és RNS egyidejűleg különböző színnel világítóvá tehető.

A fluoreszcens mikroszkópia fejlődésében két óriási ugrás történt. Először akkor, amikor 1962-ben Shimomura Oszama megtalálta az első fluoreszcens fehérjét egy medúzában. Ennek színe zöld volt, és GFP (Green Fluorescent Protein) néven szerepel az irodalomban. Jelentősége abban áll, hogy a fluoreszcens festéket genetikai úton be lehet vinni a vizsgálandó mintába. Később a színspektrum többi színére is találtak fluoreszcens fehérjéket. A második ugrás a fluoreszcens mikroszkópia fejlődésében akkor következett be, amikor megalkották a szuperfelbontású módszereket. Míg a hagyományos fluoreszcens mikroszkópia felbontása kb. a fény hullámhosszának felével egyenlő (kb. 200 nm), addig a szuperfelbontású fluoreszcens módszerek akár 10 nm-nél is jobb felbontást adnak. A fenti két (ugrásnak nevezett) teljesítményt egy-egy kémiai Nobel-díjjal jutalmazták (2008 Martin Chalfie, Shimomura Oszama és Roger Tsien; 2014 Eric Betzig, Stefan Hell és William Moerner).

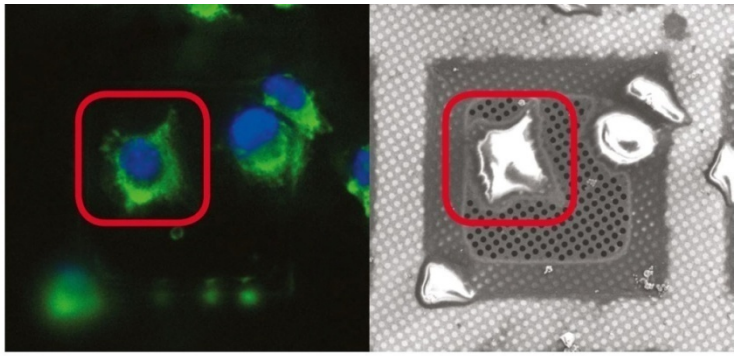
A szuperfelbontású fluoreszcens fénymikroszkópia legalább olyan nagy hatással van és lesz a biológia fejlődésére, mint a krio-elektronmikroszkópia. A hagyományos és a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópiáról magyar nyelvű tankönyv is jelent meg (POZSGAI 2020).

Visszatérve a krio-ET minta-előkészítésre, a Thermo Fisher Scientific és a Leica cégek kooperációjából született egy olyan krio-ET munkafolyamat, amelyben a fluoreszcens fénymikroszkópiát hasznosítják a célterület kiválasztásakor a krio-FIB-SEM minta-vékonyításkor (5.2.10. ábra).



5.2.10. ábra A krio-ET munkafolyamata a Thermo Fisher Scientific és a Leica berendezéseinek együttesével (THERMO FISHER SCIENTIFIC 3).

A Vitrobot (5.2.10. ábrán) automatikusan vitrifikálja a mikroszkópos mikrostélyon lévő sejttenyészetet. A Leica fluoreszcens krio-fénymikroszkópjában azonosítják a keresett, világító mintarészletet (zöld szín jelzi a fénykibocsátást az 5.2.10. ábrán).

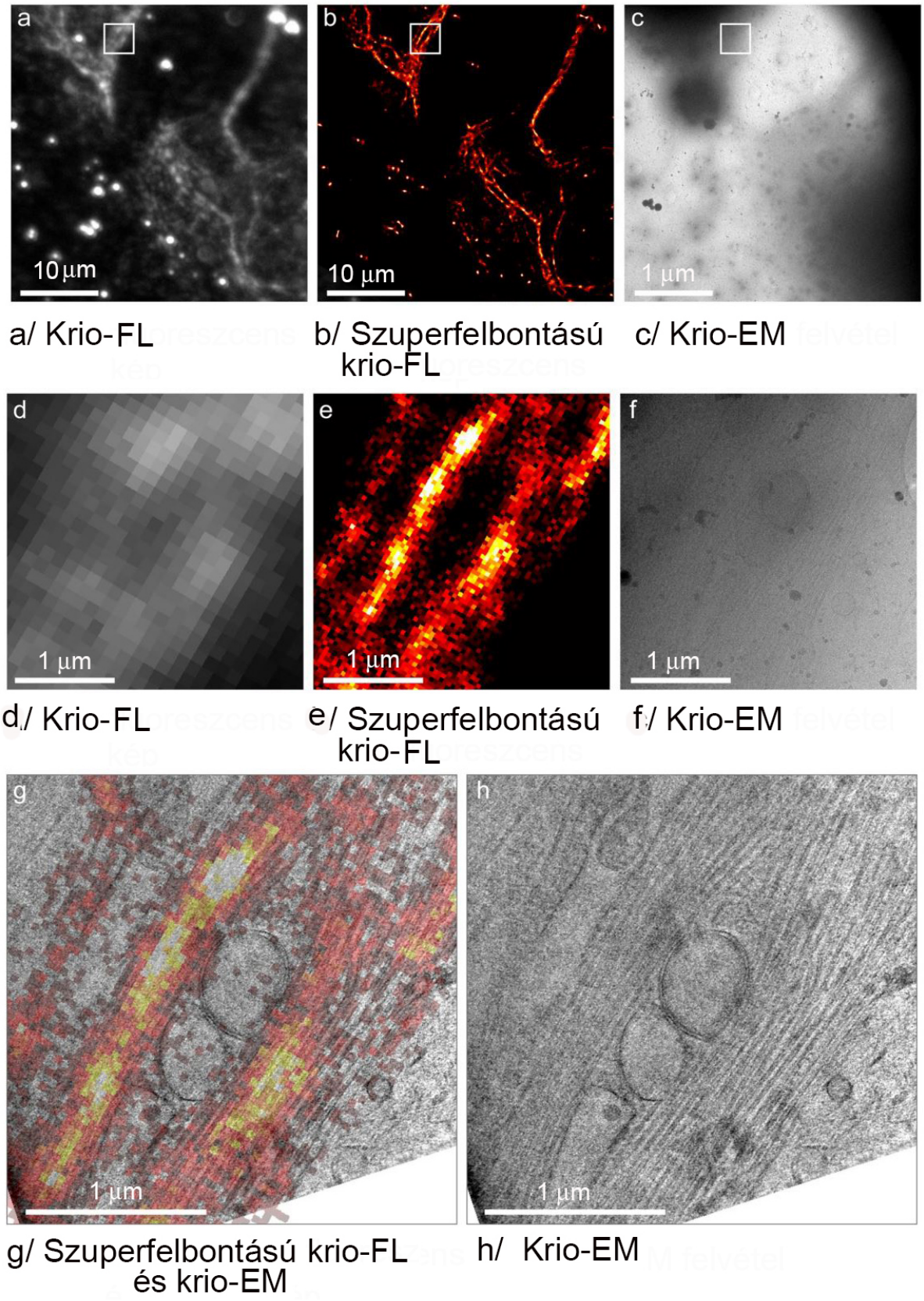


5.2.11. ábra A fluoreszcens fénymikroszkópban kiválasztott terület könnyen visszakereshető a pásztázó elektronmikroszkópban a speciális krio-fluoreszcens mintatartó és helykoordinátákat rögzítő és átvivő szoftver miatt. A nukleusz kék a DAPI festék és az F-aktin zöld az Alexa Fluor 488 fluoreszcens festék miatt. (LEICA)

Az Aquilos krio-FIB-SEM-ben történik a minta vékonyítása, és végül a Krios transzmissziós elektronmikroszkópiában készülnek azok a 2D vetületek, amelyekből rekonstruálják a 3D objektumot. A vitrifikált minta hőmérséklete a folyamat első lépésétől az utolsóig -140 ^{o}C alatt marad.

A másik alkalmazása a fluoreszcens mikroszkópiának a vizsgálat számára érdekes terep nagy pontosságú lokalizálása a szuperfelbontású krio-fluoreszcens fénymikroszkópban, majd a

lokalizáció hasznosítása az azt követő transzmissziós krio-elektronmikroszkópos vizsgálatban. Ennek lényegét az 5.2.12. ábra segítségével világítjuk meg.



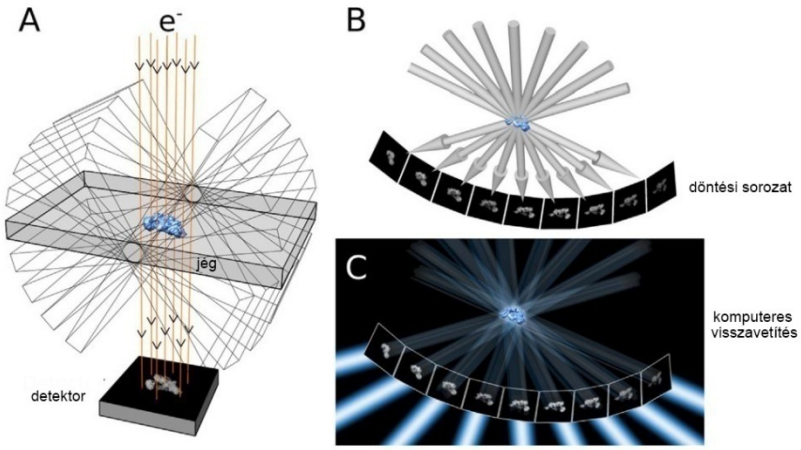
5.2.12. ábra. Korrelációs fény- és elektronmikroszkópia (CLEM) alkalmazása mikrotubulusok lokalizálására krio-ET-ben (FL – a fluoreszcencia rövidítése). Lásd a szöveget a magyarázathoz. (TUIJTEL 2019)

Az 5.2.12. ábra a/ és d/ képén a vizsgált minta látható krio-fluoreszcens fénymikroszkópban. Az a/ ábrán bekeretezett terep nagyobb nagyításban elmosódottan jelenik meg a d/ ábrán, már nem nyújtana segítséget a további kereséshez. A b/ és e/ ábrán az a/ és d/ ábrának megfelelő terepek láthatók szuperfelbontású krio-fluoreszcens képeken. A c/ és f/ ábrák krio-EM felvételek. Kis kontrasztjuk miatt nehéz a megfelelő terepek kiválasztása a nagyítás növelésekor. A g/ ábrán a krio-ET képre helyezett a szuperfelbontású krio-fluoreszcencens képet mutatjuk. A fluoreszcens kép segített a megfelelő terep kiválasztásához, amikor a h/ krio-EM felvétel készült. A h/ felvétel ugyanaz a terep, mint a g/ és a keresett mikrotubulus kötegeket mutatja. A szerzők szerint a lokalizáció pontossága 30 nm. A bemutatott CLEM technika kulcsfontosságú része, hogy a fluoreszcenciát kiváltó lézer intenzitása olyan kicsi legyen, hogy az amorf jég a mintában a vizsgálat során ne menjen át kristályos állapotba. A közlemény 5 olyan reverzibilisen kapcsolható fluoreszcens fehérjét sorol fel, amelyek krio-hőmérsékleten is megtartják a szuperfelbontáshoz szükséges fotokapcsoló tulajdonságaikat.
(Az 5.2.12. ábrán mutatott mintát humán csontból származó oszteoszarkoma hámsejteiből (U2OS sejtvonal) tenyésztették. A fagyasztás előtt fluoreszcens festék (rsEGFP2, reversibly switchable Enhanced Green Fluorescent Protein) és mikrotubulusokhoz kötődő fehérje (MAP2) fúziójával transzfektálták. Ezért a b/, e/ és g/ ábrákon a mikrotubulusok piros színben világítanak.)

V.3. Krio-ET adatgyűjtés

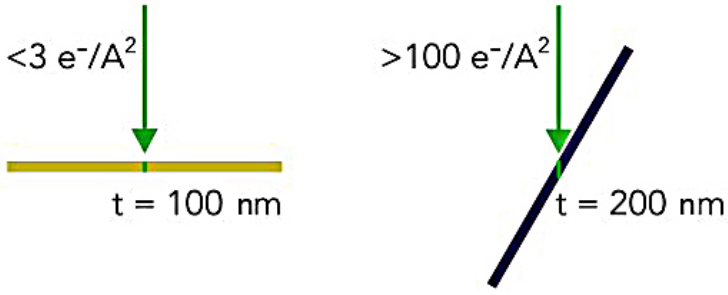
A krio-ET-hez való adatgyűjtést az egyedi részecskék analízisével (SPA) fogjuk összevetni, mert az előző fejezetekben leírt információk nagy része a krio-ET-re is vonatkozik. A különbségeket röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy a krio-ET-felvétel-készítés körülményei sokkal kedvezőtlenebbek. A továbbiakban feltételezzük, hogy a SPA-val kapcsolatban leírtak (IV. fejezet) ismertek.
A krio-ET és a SPA közötti hasonlóság abban nyilvánul meg, hogy ugyanolyan krio-elektronmikroszkópot, és többnyire ugyanúgy 300 kV-os gyorsítófeszültséget használnak. Az SPA-ban a rekonstrukcióhoz szükséges sok szög alatti nézeteket a nagy számú, azonos anyagú, de rendezetlen orientációjú szemcse biztosította. A krio-ET-ben egyetlen heterogén

objektumot kell sok szög alatt megdönteni és felvételt készíteni, hogy a 3D rekonstrukció elvégezhető legyen (5.3.1. ábra). Az elektrontomográfiával készült 3D rekonstrukciót tomogramnak nevezik. A mintadöntést a krio-ET-ben az indokolja, hogy döntés nélkül a vizsgálandó szerkezet alatt és felett lévő egyéb szerkezetek ugyanabba a vetületbe kerülnek, és a kiértékelést lehetetlenné teszik.



5.3.1. ábra. A krio-elektrontomográfia sémája. Az amorf jégbe ágyazott, sok szög alatt megdöntött mintáról mikroszkópos képek készülnek (döntési sorozat), amiből számítógépes visszavetítéssel készül el a rekonstruált 3D objektum, a tomogram (KONING 2018).

Az elektronenergia-szűrő spektrométernek, a direkt elektrondetektornak és a fázislemeznek ugyanolyan nagy szerepe van a krio-ET-ben, mint a SPA-ban. Ezeket az eszközöket a III. fejezetben tárgyaltuk. A SPA-nál tárgyalt alacsony dózisú üzemmódnak még szigorúbb követelményeknek kell eleget tenni, mert a krio-ET-ben a megengedhető teljes elektrondózisnak 50-100 mintadöntéssel készült felvétel között kell megoszlani. A krio-ET-vel vizsgált minták (esetenként egész sejtek vagy szövetek) vastagabbak, mint a SPA-nál, továbbá a minta döntése növeli a minta effektív vastagságát. (60°-os mintadöntésnél az effektív mintavastagság éppen kétszerese a valódi vastagságnak.) Mindezek azt eredményezik, hogy a felvételben a jel/zaj viszony rosszabb a krio-ET-ben, mint a SPA-ban.

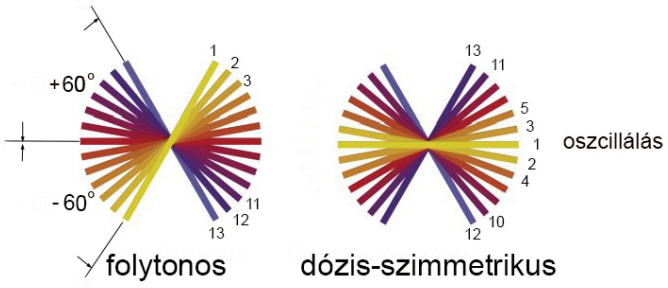


5.3.2. ábra. Nagy felbontású képekhez (nagy frekvenciák átviteléhez) szükséges elektrondózisok vízszintes és 60º alatt döntött minta esetén. A döntés miatt a minta látszólagos vastagsága 1/cos(θ) függvény szerint nő, ahol θ a döntési szög. A minta a jobb oldali döntött állapotban kétszer olyan vastagságúnak hat, mint vízszintesen (HUTCHINGS 2018).

A minta döntését jellemző folyamatot döntési sémának nevezik, és három szempont határozza meg: a döntés teljes szögtartománya, az egyes döntések közötti növekmény, és az a sorrend, ahogy a döntéseket végrehajtják (WAN 2016).

A döntés teljes szögtartománya általában ±60º, de a modern mikroszkópok ±70º-ot is lehetővé tesznek. A gyakorlatban kétféle döntési sémát alkalmaznak (5.3.3. ábra), a folytonos döntést és a dózis-szemmetrikus döntést. A folytonos döntési sémában fokozatosan döntik a mintát, és minden egyes döntés után felvétel készül. Ezt a sémát többnyire gyantába ágyazott minták esetén alkalmazzák, amikor a nagy felbontású rekonstrukció nem célja a vizsgálatnak.

A döntések közötti szögnövekmény jellemzően 1º, 2º vagy 3º. Az 5.3.3. ábra szerint a folytonos döntés nagy szögeknél kezdődik (a döntések sorrendjét az ábrán számok jelzik) és a nagy szögeknél végződik.



5.3.3. ábra. Folytonos és dózisszimmetrikus mintadöntési séma (HUTCHINGS 2018)

A folytonosnak nevezett mintadöntési séma előnytelenebb a nagy felbontású 3D rekonstrukció szempontjából, mint a dózisszimmetrikus, amelyben a döntési szögek váltakozva a pozitív és a negatív szögtartományban esnek. A dózisszimmetrikus döntésekkor a kis szög alatt készült felvételek hamarabb sorra kerülnek, mint a nagy szögűek, így a finomabb képrészletek jobban megőrződnek. A számunkra fontos nagy felbontású 3D rekonstrukcióhoz az optimális mintadöntési séma a dózisszimmetrikus döntés, viszonylag nagy lépésközökkel 0º, +3º, -3º, +6º, -6º… (HAGEN 2017).

A 3D rekonstrukcióhoz szükség van a finomminta-részletekre, azaz a kép nagyfrekvenciájú komponenseire. Minthogy az elektronmikroszkópos munka folyamán először a finomminta-

részletek károsodnak, ezért a felvételkészítést célszerű a vízszintes helyzetű mintával kezdeni, amikor még kis besugárzó áramokkal lehet dolgozni. Az 5.3.2. ábra szerint a döntött minta átvilágításához nagyobb elektrondózisokra van szükség, és ez gyorsabban károsítja a nagyfrekvenciás komponenseket.

A döntési sorozatok felvétele időigényes, általában 20-60 percet vesz igénybe, ami annak a következménye, hogy a mintatartó asztal a döntés közben elmozdul, és a fókusz is változik. Ezeket a változásokat szoftver segítségével automatikusan kompenzálják (követés, tracking), elektronikus képeltolás és autofókuszálás, ami lelassítja az eljárást. (A döntési sorozatok automatikus felvételét támogató programok pl. SerialEM (MASTRONARDE 2005), Leginon (SULOWAY 2009) vagy a USCF Tomography (ZHENG 2010).

Az adatgyűjtés meggyorsítására új módszert találtak Chreifri és munkatársai (CHREIFRI 2019),), amelynek alapja a Thermo Fisher Scientific által újonnan kifejlesztett stabilabb mintatartó. Az újítás lényege, hogy nem követik a mintatartó mozgásából adódó változásokat, hanem kis lépésekben döntik a mintát, és mozgófilmet vesznek fel (40 képkocka/s sebességgel). A mozgófilm néhány ezer kockáját egyenként használják fel. A képfelvételt nyalábszaggatással kapcsolják össze: amikor megáll az asztal a felvételkészítés idejére, akkor az elektronnyaláb rövid időre be van kapcsolva, a mintadöntés idejére pedig ki van kapcsolva. A K2 direkt elektrondetektor állandóan működik, és a teljes döntési sorozat felvétele egyetlen expozíció alatt történik. Így egy teljes döntési sorozat felvétele 5 és 10 perc között van a nagyítástól függően. Ezzel az eljárással, amelyet FISE rövidítéssel jelölnek az irodalomban (Fast-Incremental Single-Exposure), 4 nm-nél jobb felbontást nem lehet elérni.

A FISE módszert Eisenstein és munkatársai (EISENSTEIN 2019) egy jobb K3 direkt elektrondetektor segítségével kiterjesztették a 3D rekonstrukcióhoz kedvezőbb dózisszimmetrikus döntési sémára is, és ezzel nanométernél jobb felbontást értek el szubtomogram-átlagolással (V.4.5. fejezet). Egy-egy kép expozíciós ideje 1 s volt, a dózisszimmetrikus döntési sorozat teljes ideje 200 és 500 s között volt (a fent Hagentől idézett) $\pm 3^{o}$ döntési lépések mellett. A képeket a SerialEM programmal rögzítették, és a képeltolódási hibákat a döntési sorozat felvétele után kalibrációs görbék segítségével korrigálták. Felvétel alatt nincs lehetőség korrekcióra.

Összefoglalva a döntési sorozatokról írottakat: a 3D rekonstrukcióhoz a legkedvezőbb a dózisszimmetrikus döntési séma. A mintatartó asztal stabilitásának növelésével és az előzőknél jobb K3 direkt elektrondetektor alkalmazásával lehetőség nyílt az adatgyűjtés idejének néhány percre történő lerövidítésére.

V.4. Krio-ET adatfeldolgozás

V.4.1. A nyers képek előzetes megmunkálása

A direkt elektrondetektorok létezése óta gyakran használják a „moziüzemmódot” a képek felvételére (III.2. fejezet). A mozgó filmfelvétel (5-10 képkocka) egyes filmkockáit külön felhasználják. Viszont ezek egymáshoz képest elmozdulnak az elektronnyaláb töltése miatt. A képelmozdulások korrigálására krio-ET-ben leggyakrabban arany nanorészecskéket (5-25 nm) alkalmaznak markerként az amorf jégbe ágyazva. Minthogy az arany nagy kontrasztot ad, alkalmas az elmozduláskorrekció automatizálására is (WAN 2016).

A 3D rekonstrukció előtt a képek minőségét, a jel/zaj viszonyt és kontrasztot javítják. Ennek eredményeként a rekonstrukciónál alkalmazott iterációs eljárás gyorsabban konvergál. A minta döntésekor a később felvett képek minősége rosszabb, mint a korábbiaké. Az aluláteresztő szűrők (II.8.1.) javítják a külső kontúrokat, és a később felvett képekre erősebb szűrőt alkalmaznak (dózisfüggő szűrés).

V.4.2. A döntött képek defókuszának meghatározása

Amint a IV.3.4. és IV.3.5. fejezetben láthattuk, az elektronmikroszkóp nem ad tökéletes képet. A különböző finomságú (különböző térbeli frekvenciájú) részleteket eltérő hatásfokkal viszi át a képbe. Sőt egyes részleteket (ahol a kontrasztátviteli függvény CTF=0) egyáltalán nem visz át. A mikroszkóp hibáinak korrigálását a kontrasztátviteli függvénnyel (CTF) végzik (II.7. fejezet), amelyben az egyik legfontosabb paramétert, a defókuszt meg kell határozni, mielőtt a CTF korrekciót elvégzik. Ez hasonló elven történik, mint azt az SPA-nál leírtuk (IV.3.4. pont), de a krio-ET-ben a minta döntése miatt egy defókusz gradiens áll fenn a minta alsó és felső része között. Az SPA-hoz képest az is nehezíti a helyzetet, hogy a minták általában vastagabbak a krio-ET-ben (200-500 nm).

Egy szimuláció szerint egy 4 μm-es defókusz 300 kV-os gyorsítófeszültségen azt eredményezi, hogy a CTF első zéruspontja 1/28 Å-nél lesz, azaz CTF korrekció nélkül a rekonstrukció felbontása 28 Å-nél nem lesz jobb (ZANETTI 2009).

A defókusz meghatározásában elkövetett 100 nm-es hiba még nem gátolja meg a nanométernél jobb felbontás elérését. Általában elegendő döntött képekre meghatározni az átlagos defókuszt, vagyis a döntési tengelynek a defókuszát. Nagyobb pontosságigény mellett az egyes mintarészletek vagy egyes szemcsék defókuszát külön határozzák meg, és ezekre külön végzik el a CTF-korrekciót.

A minta döntésekor a vizsgált terület elmozdulhat, változhat a fókusz is. Számos kísérleti nehézség lép fel, ami itt fontos számunkra, az, hogy a műszaki fejlődés jelenlegi fokán a krio-ET döntési sorozatai automatizáltan végrehajthatók.

V.4.3. Kontrasztátviteli függvény meghatározása és CTF korrekció

Az SPA-nál leírtak szerint a CTF-et úgy határozzák meg, hogy illesztik a függvényt a teljesítményspektrumhoz (a mikroszkópos kép Fourier-transzformáltjához), amely ún. Thon-gyűrűket tartalmaz. A krio-ET sajátosságai miatt ezek a gyűrűk kisebb számban és rosszabb jel/zaj viszonnyal jelennek meg, mint az SPA-ban. Kiváltképp a nagy döntési szögek alatt felvett képek teljesítményspektrumai gyengébb minőségűek.

CTF korrekció történhet úgy, hogy

– egy-egy döntött kép átlagára jellemző CTF-et fogadják el, vagy

– a képeket kétdimenziós egységekre (négyzetekre vagy sávokra) osztják vagy

– a tomogramot háromdimenziós egységekre, ún. voxelekre osztják, majd határozzák meg a CTF-et, és végzik vele a korrekciót.

A CTF-re korrigált képekkel készítik a 3D rekonstrukciót, bár a fenti harmadik lehetőség azt mutatja, hogy 3D rekonstrukció után is lehet CTF korrekciót végezni.

V.4.4. Tomogram készítés (3D rekonstrukció)

A háromdimenziós rekonstrukció többféle módon készülhet:

– Fourier térben a vetület-szelet tétel (más néven központi szelet tétele) alapján (IV.2.1. pont). A tétel kimondja, hogy a mikroszkópos kép Fourier-transzformáltja a 3D transzformált középpontjában átmenő síkot képez (DE ROSIER és KLUG 1968),

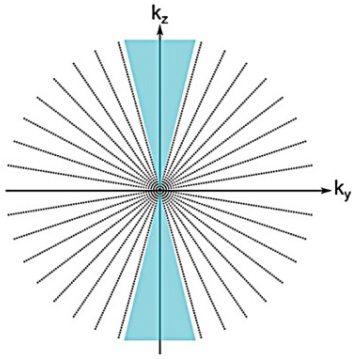
– súlyozott visszavetítéssel. Ennek is a vetület-szelet tétel az alapja. A Fourier-térben a szögeknek megfelelően elhelyezik a vetületeket, majd súlyozzák, összeállítják a 3D objektumot, majd inverz Fourier-transzformációval visszavetítik a valós térbe (RADEMACHER 1987). Ez a visszavetített 3D objektum a tomogram. Léteznek olyan visszavetítési algoritmusok is, amelyek a valós térben konvolúciót használnak (KONING 2018),

– algebrai módszerek is vannak a rekonstrukcióra (pl. SIRT) (GILBERT 1972), amelyek kontrasztosabb képet adnak, mint a súlyozott visszavetítés, de nem adják vissza olyan jól a finom mintarészleteket. Ezért a súlyozott visszavetítés a leggyakrabban alkalmazott módszer (WAN 2016).

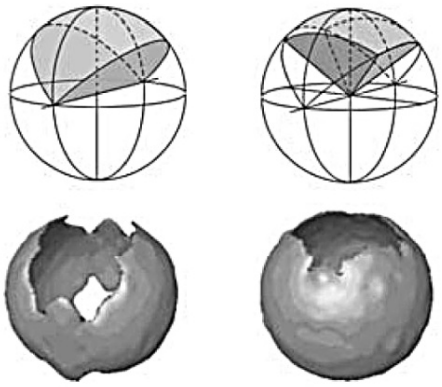
A SPA-nál említettük a visszavetítéshez alkalmazott súlyozást, de az egyszerűség kedvéért mellőztük magyarázatát. Az 5.4.1. ábrán a Fourier-térben küllőszerűen elhelyezkedő vonalak a

valós térben végzett mintadöntéseknek felelnek meg. A Fourier-tér középpontjában jelentősen több információ van, mint a széleken, ennek következtében az alacsony frekvenciájú komponensek túl vannak hangsúlyozva. Ezért szükséges az adatok súlyozása.

A minta döntési szögeinek korlátozottsága miatt bizonyos irányú vetületek hiányoznak a Fourier-térben (5.4.2. ábra). Az irodalomban ezt a hatást hiányzó éknek (angolul missing wedge) nevezik. Ellensúlyozására célszerű a kéttengelyű döntést alkalmazni, amikor a Fourier-tér fedettsége teljesebbé válik



5.4.1. ábra. A Fourier-térben hiányzik az információ a kékkel jelölt szögtartományban.



Döntési szög-tartomány	Fourier-tér fedettsége egy-tengelyű döntéskor	két-tengelyű döntéskor
±70°	78%	93%
±60°	67%	84%
±45°	50%	67%

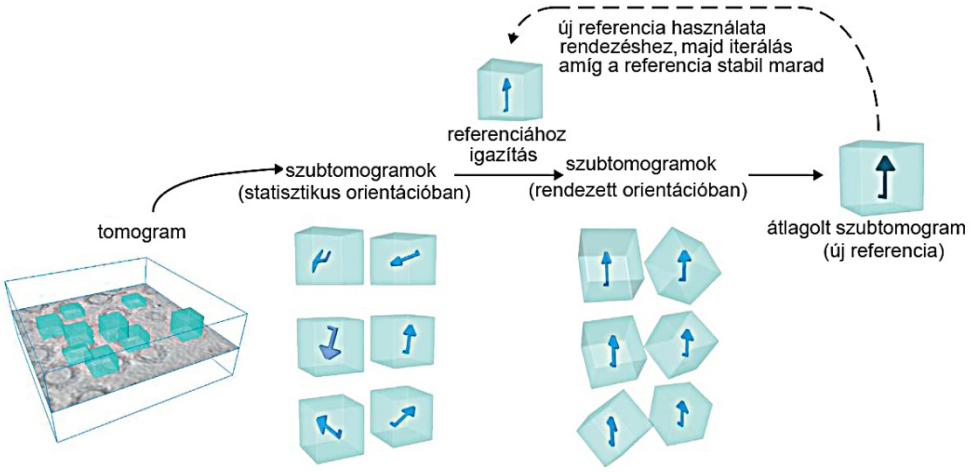
5.4.2. ábra. A minta korlátozott döntése miatt fellépő információ hiánya egytengelyű és kéttengelyű mintadöntéskor (lásd a szöveget) (LUCIC 2005)

Az 5.4.2. ábrán a felső két rajz a Fourier-térre, az alsó két ábra a valós térre vonatkozik. Jól látszik, hogy egytengelyű döntéskor ék alakú, kéttengelyű döntéskor (jobb felső ábra) pedig piramis alakú térrészből hiányzik az információ. Az alsó két kép a valós térre vonatkozóan azt mutatja, hogy a 3D rekonstrukcióban lényegesen nagyobb a torzítás az egytengelyű döntéskor, mint a kéttengelyű döntéskor (a jobb oldali kép). A számadatok szerint a kéttengelyű $\pm 70^{o}$-os döntéskor a szükséges információ 93%-a megszerezhető a rekonstrukcióhoz.

A Fourier-tér betöltöttségét nemcsak a döntési szögtartomány egésze, hanem a döntések közötti szögek nagysága is befolyásolja. Az ideális esethez szükséges kis lépésközök a minta nagy sugárterhelése miatt nem valósíthatók meg.

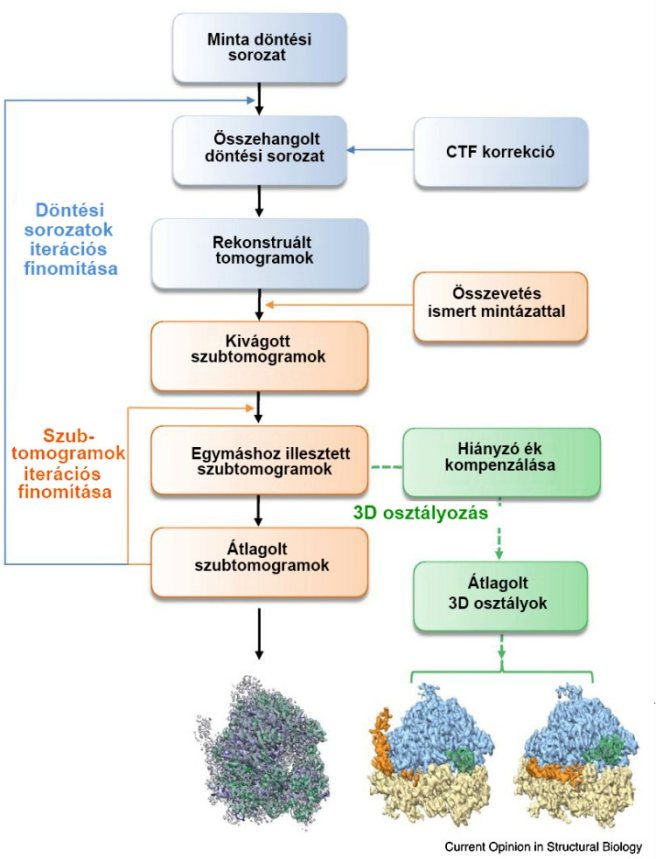
V.4.5. Szubtomogram-átlagolás

A krio-ET-ben meglehetően alacsony a jel/zaj viszony javítására lehetőség kínálkozik akkor, amikor egy tomogramon belül ugyanolyan szerkezet (objektum) több példányban, de statisztikus orientációban fordul elő (5.4.3. ábra). Ilyenkor a tomogramoknak ezeket a részeit (szubtomogramok) kivonatolják, egy referenciapozícióhoz igazítják (transzlációval és rotációval), majd átlagolják. Ezáltal megnő a szóban forgó tomogramrészlet jel/zaj viszonya és a rekonstrukció felbontása. Az így átlagolt alakzatot tekintik új referenciának, és ehhez igazítják a statisztikus orientációban lévő hasonló mintarészleteket. A folyamatot iteratív módon ismétlik, amíg az n-edik és n+1-edik átlagolt szubtomogram között már nincs különbség. A folyamat emlékeztet a SPA-ban bemutatott átlagolásra, azzal a különbséggel, hogy az SPA-ban kétdimenziós képekkel történt az átlagolás, a tomográfiában viszont 3 dimenziós térfogatokkal.



5.4.3. ábra. A szubtomogram átlagolás sémája (BRIGGS 2013)

A krio-ET szubtomogram átlagolást és az azt követő szerkezetosztályozást cryoSTAC rövidítéssel jelölik az angol cryo Subtomogram Averaging and Classification-nak megfelelően. A cryoSTAC sémáját mutatja a 5.4.4. ábra:



5.4.4. ábra A krio-elektrontomográfiaval végzett szubtomogram-átlagolás és -osztályozás (cryoSTAC) munkafolyamata (ZHANG 2019)

Amint az 5.4.4. ábra mutatja, mind a mintadöntési sorozatok összehangolását, mind pedig a szubtomogramok összehangolását iterációs folyamatok segítségével finomítják.

Az 5.4.4. ábrán jelölve van a hiányzó ék kompenzálása. Amint az 5.4.2. ábrán láthattuk, a Fourier-térben hiányzó ék a valós térben a 3D rekonstrukció után torzításokhoz vezet. A szubtomogramok összehangolásakor (angolul alignment) ügyelnek arra, hogy a referencia és a szubtomogram azonos orientációban legyen, és az összehasonlításkor mindkettőben kitakarják a hiányzó éknek megfelelő térfogatot. Ezt a műveletet maszkolásnak nevezik. A maszkolást gyakran alkalmazzák mind a SPA-ban, mind a krio-ET-ben, nemcsak ék, hanem más geometriai alakzat formájában is, amikor objektumokat keresztkorrelációval hasonlítanak össze, és el akarják kerülni az objektumot körülvevő környezet zavaró hatását.

A cryoSTAC végzéséhez használt szoftvercsomagokat Zhang cikke hasonlítja össze és adja meg az elérhetőségeiket (ZHANG 2019). Többek között a RELION programcsomagot is alkalmassá tették krio-ET adatok feldolgozására is. Az emClarity program (HIMES 2018) pedig azzal tűnik ki, hogy az egyik legújabb programcsomag, és olyan újításokat tartalmaz, amelyek a felsorolt többi programban nincsenek benne.

Irodalom

AL-AMOUDI, A. et al. (2005): Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy, *Journal of Structural Biology* 150, 109–121.

BRIGGS, J.A.G. (2013): Structural biology *in situ* – the potential of subtomogram averaging, *Current Opinion in Structural Biology* 23, 261–267.

CHANG, Y-W. et al. (2014): Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and electron cryotomography, *Nat. Mathods* 11 (7) 737–739.

CHREIFRI, G. et al. (2019): Rapid tilt-series aquisition for electron cryotomography, *Journal of Structural Biology* 205, 163–169.

DE ROSIER, D.J. és A. KLUG (1968): Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs, *Nature* 217, 130–134.

DE WINTER, D.A.M: et al. (2020): Cryo-FIB preparation of whole cells and tissue for cryo-TEM: use of high-pressure frozen specimens in tubes and planchets, *Journal of Microscopy*, doi: 10.1111/jmi.12943.

EISENSTEIN, F. et al. (2019): Improved applicability and robustness of fast cryo-electron tomography data acquisition, *Journal of Structural Biology* 208, 2, 107–114.

FRANK, J. (2006 B): Electron Tomography, Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell, Springer kiadó, (Frank, J. ed.) ISBN-10: 0-387-31234-X, 1–463.

GILBERT, P. (1972): Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections, J. Theor. Biol. 36(1) 105–107. doi:10.1016/0022-5193(72)90180-4.

GILCHRIST, J (2019): In situ structure determination using Cryo-FIB-SEM, Cryo-ET and subtomogram averages, https://www.youtube.com/watch?v=OTfO7A5IPkk

HAGEN, W.J.H. et al. (2017): Implementation of a cryo-electron tomography tilt-scheme optimized for high resolution subtomogram averaging, *Journal of Structural Biology* 197, 191–198.

HART, R.G. (1968): Electron Microscopy of unstained biological material: The polytropic montage, *Science* 159, 1464–1467.

HIMES, B.A. et al. (2018): emClarity: software for high-resolution cryo-electron tomography and subtomogram averaging, *Nature Methods* 15, 955-961.

HUTCHINGS, J. et al. (2018): Fine details in complex environments: the power of cryo-electron tomography, *Biochemical Society Transactions*, https:/doi.org/10.1042/BST20170351.

KONING, R.I. et al. (2018): Advances in cryo-electron tomography for biology and medicine, *Annals of Anatomy* 217, 82–96.
KUBA, J. et al. (2020): Advanced cryo-tomography workflow developments – correlative microscopy,milling automation and cryo-lift-out, *Journal of Microscopy,* doi: 10.1111/jmi.12939
LEICA, Thunder Imager EM Cryo CLEM, In-depth understanding of cellular structural biology, www.leica-microsystems.com/thunder
LUCIC, V. et al. (2005): Structural Studies by Electron Tomography: From Cells to Molecules, *Annu. Rev. Biochem.* 74, 833–865.
MARKO, M. et al. (2006): Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen hydrated biological samples, *Journal of Microscopy* 222, 1, 42–47.
MARKO, M. et al. (2007): Focused-ion-thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy, Nature Methods 4,3, 215–217.
MASTRONARDE, D. N. (2005): Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movement, *Journal of Structural Biology* 152, 36–51.
MATIAS, V.R.F. et al. (2003): Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen Hydrated Sections of *Escherichia Choli* and *Pseudomonas aeruginosa, Journal of Bacteriology,* doi: 10.1128/JB.185.20.6112-6118,2003
MOOR, H. (1987): Chapter 8, Theory and Practice of High Pressure Freezing, in Cryotechniques in Biological Electron Microscopy, Steinbrecht, R.A. and Tierold K. (eds), Springer Verlag Berlin, Heidelberg
MOOR, H. et al. (1968): Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze-etching. in Steve Bocciarelli D. (ed.) Electron Microscopy 2. Proc. 4th Eur Reg Conf Electron Microsc, Rome 33–34.
MURK, J.L. et al. (2003): Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography, *J. Microscopy* 212 (1), 81–90.
PARMENTER, C. et al. (2014): Cryogenic FIB Lift-out as a Preparation Method for Damage-Free Soft Matter TEM Imaging, *Microsc. Microanal.* 20 (Suppl 3),1224–1225, doi: 10.1017/S1431927614007855

PARMENTER, C. et al. (2016): Making the Practically Impossible „Merely Difficult” -Cryogenic FIB Lift-Out for „Damage Free” Soft Matter Imaging, *Microscopy Research and technique* 79, 298–303.
PARMENTER, C. et al. (2020): Cryo-FIB-lift-out: practically impossible to practical reality *Journal of Microscopy*, doi: 10.1111/jmi.12953
PLITZKO, J. et al. (2019): 4. Cryo-Electron Tomography, in Springer Handbook of Microscopy, Hawkes, P.W., Spence, J.C.H. (eds.), https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1_4
POZSGAI, I. (2016): Képalkotás, kémiai analízis és szerkezeti vizsgálat a korszerű pásztázó elektronmikroszkópban, Typotex kiadó, ISBN 978 963 279 908 7
POZSGAI, I. (2019): A fluoreszcens mikroszkópia hagyományos és szuperfelbontású módszereinek alapjai, Typotex kiadó, ISBN 978 963 493 072 3.
RADEMACHER, M. et al. (1987): Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to 50S ribosomal subunit of Escherichia coli, *Journal of Microscopy* 146, 2, 113–136.
RIGORT, A. et al. (2012): Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography, *PNAS* 109,12, 4449–4454.
RIGORT, A. et al. (2015): Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology, *Arch. Biochem. Biophys.* http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.009.
STUDER, D. et al.(1995): Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing, *J. Microscopy* 179, 321–332.
STUDER, D. et al.(2008): Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution, *Histochem. Cell Biol*. 130, 877–889.
SULOWAY, C. et al. (2005): Automated molecular microscopy: The new Leginon system, Journal of Structural Biology 151, 41–60.
Thermo Fisher Scientific (2020): Preparation of cells for cryo-ellectron tomography, https://www.youtube.com/watch?v=L-65mpdKLzQ)
THERMO FISHER SCIENTIFIC 2, Acquilos 2 Cryo FIB, https://www.thermofisher.com/hu/en/home/electron-microscopy/products/dualbeam-fib-sem-microscopes/aquilos-2-cryo-fib.html
THERMO FISHER SCIENTIFIC 3, Cryo Electron Tomography Workflow, Intracellular structure analysis with cryo electron microscopy,