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.

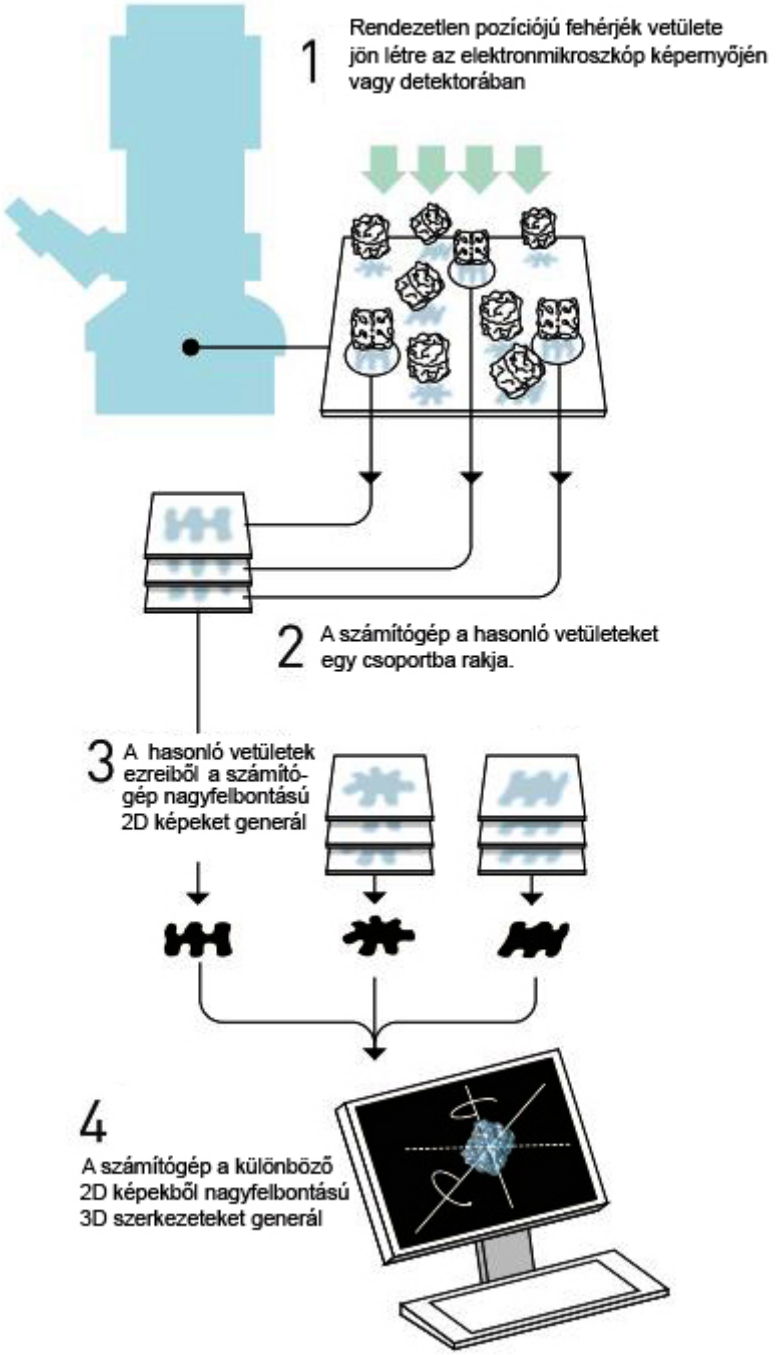
Két módszert fogunk részletesen tárgyalni: az egyedi részecskék analízisét és a krio-elektrontomográfiát.

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.

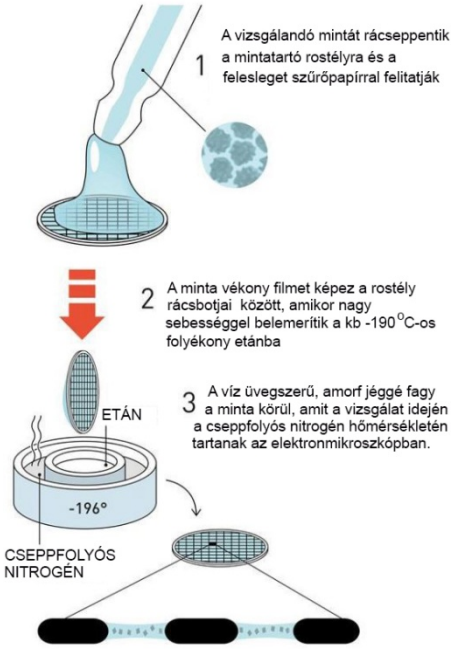
A krio-elektrontomográfiában (angolul cryo-electron tomography, a továbbiakban krio-ET) kevés vagy egyetlen biológiai objektum áll rendelkezésre. Ekkor a mintatartó döntésével lehet elérni, hogy különböző irányú vetületeket készítsünk az objektumról az elektronmikroszkópban, és ezekből rekonstruáljuk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

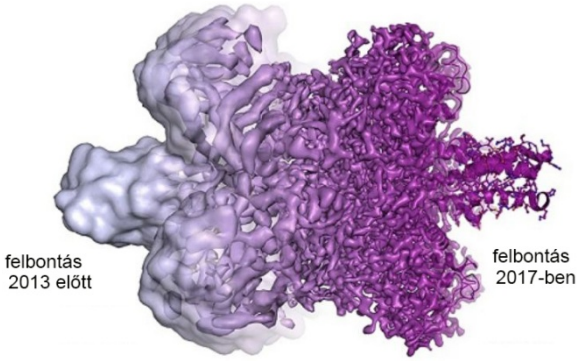
A krio-ET-vel heterogén mintákat, nagyobb szerkezeti egységeket vizsgálnak, mint SPA-val, például sejteket, sejtszervecskéket, szöveteket. A vizsgálat sok esetben *in vivo*-nak tekinthető, mivel a vizsgált egységeket nem szakítják ki természetes környezetükből. (A krio-ET-t részletesen az V. fejezetben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



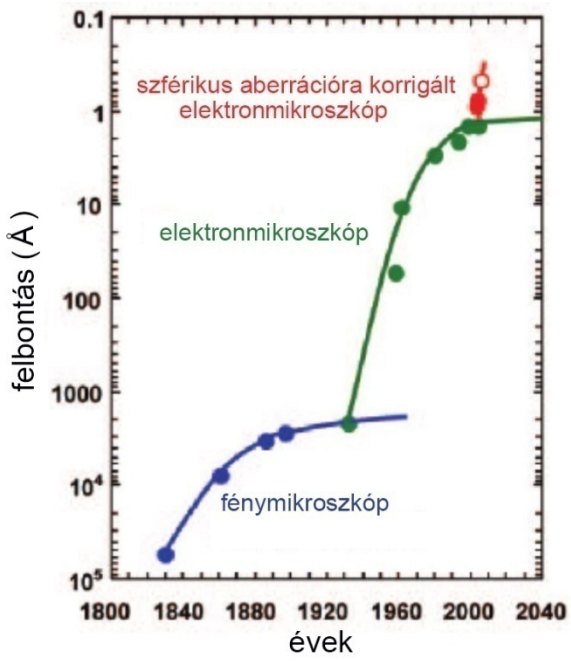
1.2. ábra. Az ultragyors merítéses fagyasztás (angolul plunge freezing) sémája. (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017 2)



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.

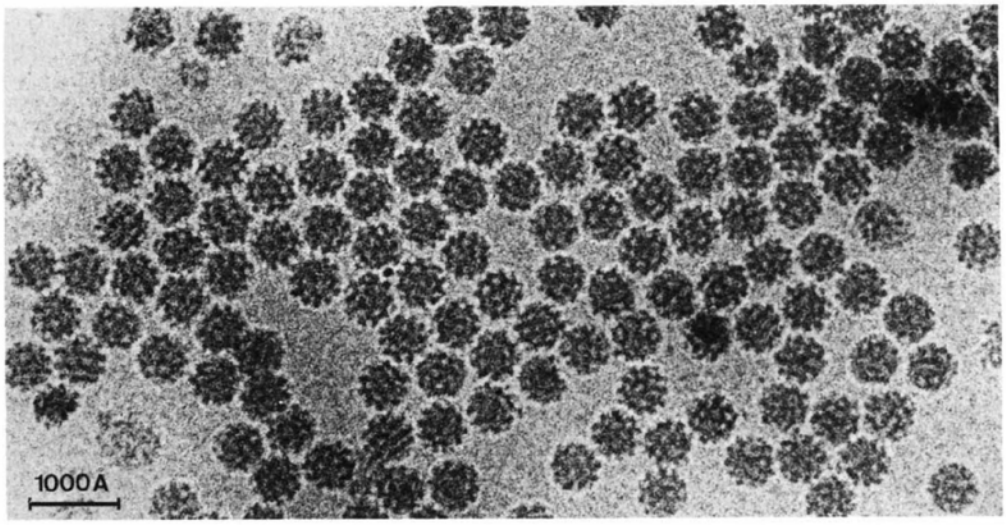
Anyagtudományi mintákon sokkal jobb felbontást lehet elérni, mint biológiai mintákon, mert a biológiai minták az elektronnyaláb alatt sugárkárosodást szenvednek, másrészt elveszítik víztartalmukat (dehidratálódnak) az elektronmikroszkóp vákuumának hatására.
A sugárkárosodás különösen a nagy nagyításoknál 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.

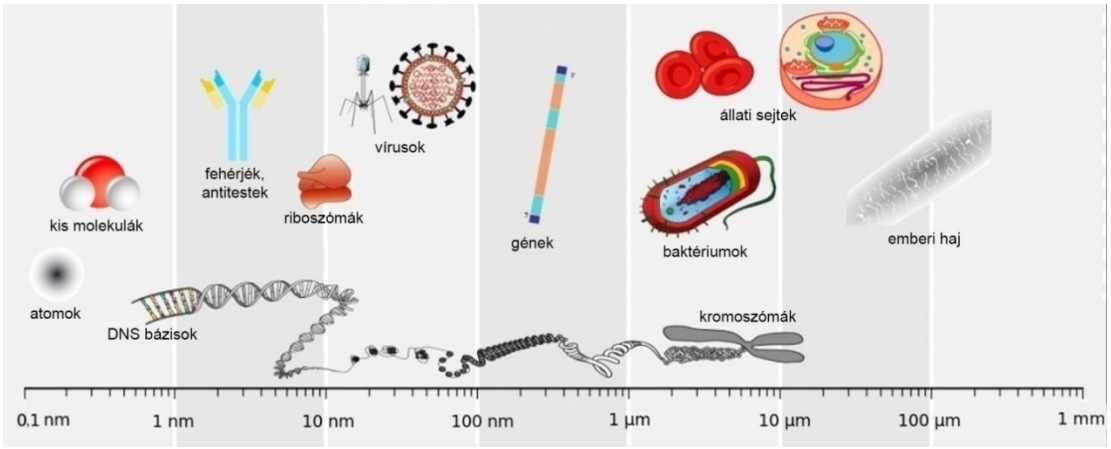
Taylor és Glaeser volt az első, aki fagyasztott, hidratált mintákat vizsgált elektronmikroszkópban (TAYLOR és GLAESER 1974 és 1976). A vizsgált kataláz kristály védőrétegek között volt beágyazva (C+SiO a minta alatt és felett), így nem károsodott. A szerzők tévesen nem az amorf jégnek, hanem a védőrétegeknek 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)

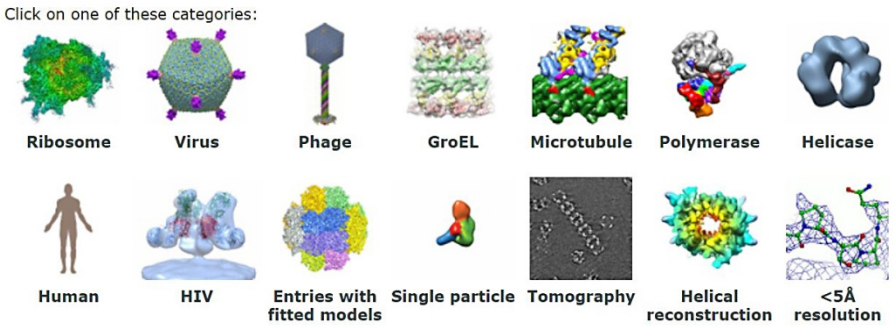
Lehet-e véletlen, hogy az emberiség a baktériumok elleni küzdelmet eddig sikeresebben folytatta, mint a vírusok ellen? Nem. A vírusok sokkal kisebbek, mint a baktériumok. A vírusok többségének mérete 20–300 nm között van, a baktériumoké az 1–10 µm tartományba esik (1.6. ábra). Amit nem látunk, az ellen 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