



Jacques Dubochet



Joachim Frank



Richard Henderson

KÉMIAI NOBEL-DÍJ A KRIO-ELEKTRONMIKROSKÓPIA KIDOLGOZÁSÁÉRT

Bepillantás a molekulák szerkezetébe

A Svéd Királyi Tudományos Akadémia döntése nyomán Jacques Dubochet, Joachim Frank és Richard Henderson kapta megosztva a 2017-es kémiai Nobel-díjat. A kutatóknak a krio-elektronmikroszkópia kifejlesztéséért ítelték oda az elismerést. A technika segítségével vált lehetővé az oldott állapotú biomolekulák szerkezetének atomi felbontású meghatározása.

Már a régi görögök is sejtették, hogy az érzékszerveinkkel közvetlenül megtapasztalható anyagi világ mögött létezik egy rejtelmes mikrovilág. Régi a törekvés, hogy ebbe a mikrovilágba bepillantassunk mind az élő, mind az élettelen anyag vonatkozásában. Ez először a XVII. században sikerült, amikor lelkes mikroszkópépítők, köztük *Robert Hooke*, majd *Anton van Leeuwenhoek* optikai mikroszkóppal sejteket figyeltek meg és írtak le. Ezután eltelt még vagy 150 év, amikor is 1838-ban *Matthias Schleiden* botanikus és *Theodor Schwann* zoológus – mikroszkópos megfigyelésekre alapozva – megalkották „elméletüket”, miszerint az élő szervezetek sejtekből állnak. Ez volt a modern biológia kezdete, jelentős mérföldkő a tudománynak az élővilág megértésével kapcsolatos törekvései során. Azért érdemes erre emlékezni, mert most a krio-elektronmikroszkóp birtokbavételével – minden bizonnyal – megint új fejezet nyílik az élet-tudományban. A képfeldolgozás fejlődésével lehetővé válik a krio-elektrontomográfia alkalmazásával

3-dimenziós képen megjeleníteni akár a legkisebb sejtalkotórészeket atomi szintű felbontással. Talán túlzás nélkül hasonlíthatjuk ezt az állomást a közönséges fénymikroszkóp megjelenéséhez. Érdekes az **1. ábrán** összehasonlítani a fejlődést a képalkotásban és a képfelbontásban a fénymikroszkóptól a krio-elektrontomográfiáig.

A kép kulcsfontosságú a tudományos megértésben. A nagy áttörések gyakran alapulnak az emberi szem számára láthatatlan dolgok láthatóvá tételén. A *fénymikroszkóp* XVII. századi megjelenésétől a most Nobel-díjjal elismert krio-elektronmikroszkóp kifejlesztéséig hosszú út vezetett. A fénymikroszkóp tipikusan 10–2000-szeres nagyításra képes, és láthatóvá teszi a sejteket, ha kell, működésük közben, pl. fáziskontraszt-technikával, és segítségével a sejtek organellumait is megfigyelhetjük. Nagy lépés volt a képalkotásban az *elektronmikroszkóp* megjelenése. Ennek elvi alapjául *Louis de Broglie* 1924-beli posztulátuma szolgált, miszerint minden mozgó részecskéhez hullámhossz rendel-

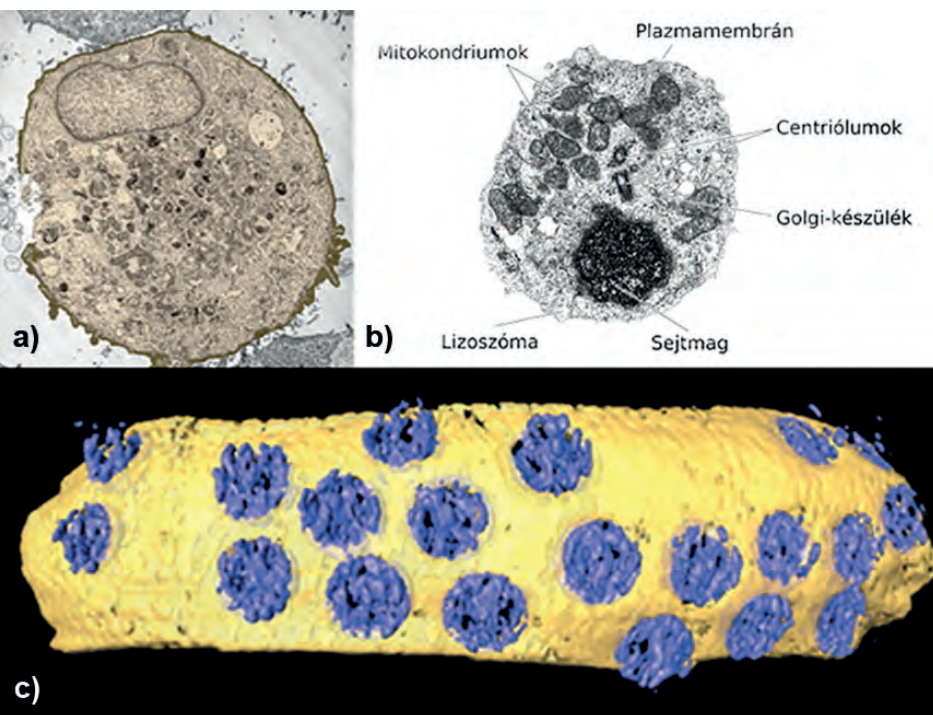
hető. Az elektronnyalábok hullámhossza pikométeres nagyságrendű, ami százezerszer rövidebb, mint a fény néhány száz nanométeres hullámhossza. Az elektronnyaláb hullámtermészetének *J. J. Thomson* adta kísérleti bizonyítékát elektrondiffrakciós kísérleteivel 1927-ben. A következő elem az elektronnyaláb fókuszálásához szükséges elektromágneses lencse megalkotása volt 1926-ban *Hans Busch* által. Ezen a ponton vetette fel *Szilárd Leó* az elektronmikroszkóp megépítésének lehetőségét, az ötletet *Ernst Ruska* realizálta 1931-ben. Ezt, a továbbfejlesztéssel kapcsolatos eredményekkel együtt 1986-ban ismerték el Nobel-díjjal. Az első elektronmikroszkóp is jó példája annak, hogy egymástól független tudományos felismerések és technikai fej-

A *transzmissziós elektronmikroszkóp* működési elve nagyon hasonló a fénymikroszkópéhoz. Felgyorsított elektronok nagy intenzitású nyalábját fókuszálják a speciálisan előkészített mintára. A képalkotás üveglencsék helyett elektromágnesekkel történik. Az elektronmikroszkóppal 100 000-szeres nagyítás is elérhető, felbontásának határa 0,2 nm. Ez a felbontásbeli javulás lehetővé teszi a sejtorganellumok szerkezetének megfigyelését. A jobb felbontásért azonban nagy árat kellett fizetni. Az elektronmikroszkópban a fényt helyettesítő elektronnyalábot vákuumban kell vezetni, s a jó felbontás nagy intenzitású elektronsugár alkalmazását kívánja meg. Ez a nyaláb roncsolja az érzékeny biológiai mintát, a vákuumban pedig a víz – az

élő rendszerek esszenciális közege – elpárolog. E tényezők speciális és nagyon durva mintakészítési eljárást követelnek. Az élő szövetet fixálják pl. glutáraldehiddel, ozmium-tetroxiddal, majd mossák. Ezt követően etanolban vízmentesítik, majd műanyagba ágyazzák és keményre égetik, ezután kb. 100 nm vastag szeletekre vágják. A szeletet rézrácsra helyezve uranil-acetáttal és ólom-citráttal festik. Nyilvánvaló, hogy az így készített biológiai mintának nem sok köze van a természetes, élő állapothoz. Egy elektronmikroszkópos képen általában csak a sejtalkotók és nagy molekulák lenyomatát figyelhetjük meg.

A *krio-elektronmikroszkópia* kifejlesztése az utóbbi évtized legjelentősebb technikai eredménye a tudományban, megjelenése óhajtott, de sokáig nem remélt eszközt ad, elsősorban az élettudomány kezébe. Különlegessége abban rejlik, hogy a mintákat fixálás vagy bármiféle festés nélkül saját, természetes, vizes környezetükben teszi megfigyelhetővé elektronmikroszkópos úton, s nagy felbontású, 3-dimenziós szerkezeti képet eredményez.

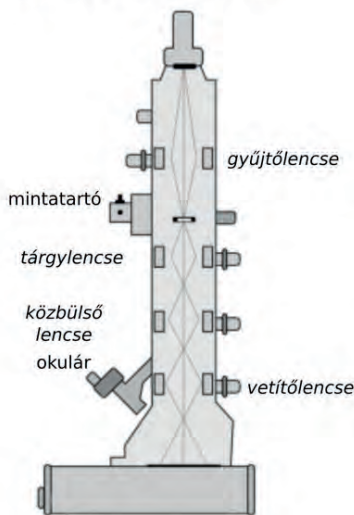
A most Nobel-díjjal értékelt fejlesztés két területen épül forradalmi újításra. Egyrészt megoldotta a hidratált, a natív állapotú szerkezetet megőrző mintakészítés problémáját a gyorsfagyasztás technikájának kidolgozásával. Másrészt a számítógépes képalkotás fejlesztésével lehetővé tette az alkalmazott elektronnyaláb intenzitásának, ezáltal szerkezetroncsoló hatásának jelentős csökkentését a képminőség és -felbontás megőrzése, sőt javítása mellett (**2. ábra**).



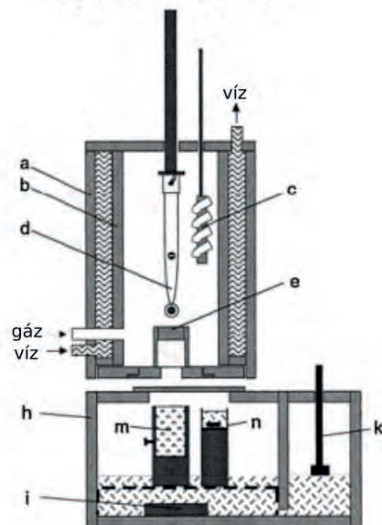
1. ábra. A mikroszkópia fejlődése a fénymikroszkóptól az elektronmikroszkópon keresztül a krio-elektron-tomográfiáig. (a) Egy sejt fénymikroszkópos képe. (b) Egy sejt elektronmikroszkópos képe. (c) Egy sejtmag krio-elektron-tomográfiával készített képe. Jól látszanak a sejtmag pórusai (az ábrán kékkel színezve)
(FORRÁS: WHITE TA ET AL. PLOS PATHOG. 6:E1001249 (2010))

lesztések szerencsés kombinációjából nagy alkotások jönnek létre. A harmincas évek óta az elektronmikroszkópos technika látványos fejlődésen ment keresztül. Transzmissziós készülékkel 0,2 nm felbontás is elérhető. Pásztázó elektronmikroszkóppal a felszínről kaphatunk 10 nm felbontású, jó mélységű képet.

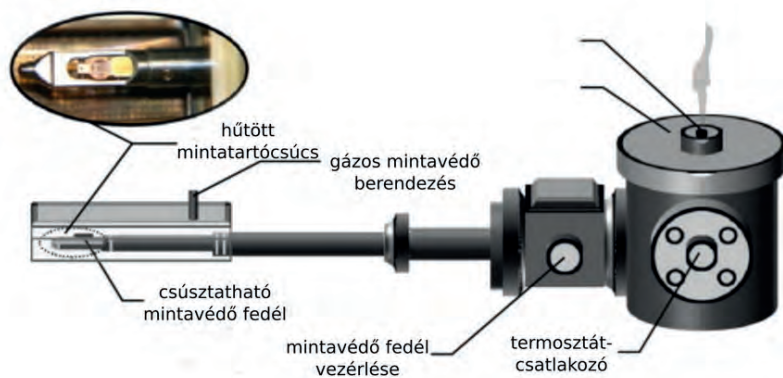
a) Elektronmikroszkóp



c) Mintaüvegesítés



b) Mintatartó



2. ábra. A krio-elektronmikroszkóp felépítése.

(a) A transzmissziós elektronmikroszkóp sematikus felépítése. (b) A beépített ráccsal rendelkező mintatartó csúcsa. (c) Minta-fagyasztó berendezés: (a) és (b): a fagyasztókamra dupla akrilüvegfala, (c) tartó a minta kiegyensúlyozásához, (d) csipesz, (e) főleg folyadék föltitására szolgáló szűrőpapír, (h) folyékony nitrogén-tartó edény, (i) a nitrogéngáz finom keringetésére szolgáló ellenállás, (k) nitrogénszintmérő, (m) fagyasztó és (n) mintatároló edény
(FORRÁS: KUNTSCHKE J, HORST JC, BUNJES H. (2011) INT J PHARM 417, 120–137)

A Nobel-díjhoz hosszú út vezetett. Az élettudományokban régen megjelent az igény a nagyfelbontású szerkezeti képalkotásra. A technikai fejlődés az 50-es években lehetővé tette a röntgendiffrakciós technika alkalmazásával a biológiai makromolekulák szerkezetének meghatározását atomi szintű felbontással. Ezzel a módszerrel számos kristályosítható fehérje szerkezetéről nyertünk statikus képet. A 80-as években jutott el a magmágneses rezonancia (NMR) a fejlődésnek arra a

fokára, hogy segítségével fehérje méretű makromolekulákról nyerhettünk dinamikus képet. Ez jelentős lépés volt abba az irányba, hogy a szerkezet és a funkció közvetlen kapcsolata megérthető legyen a maga dinamikus voltában.

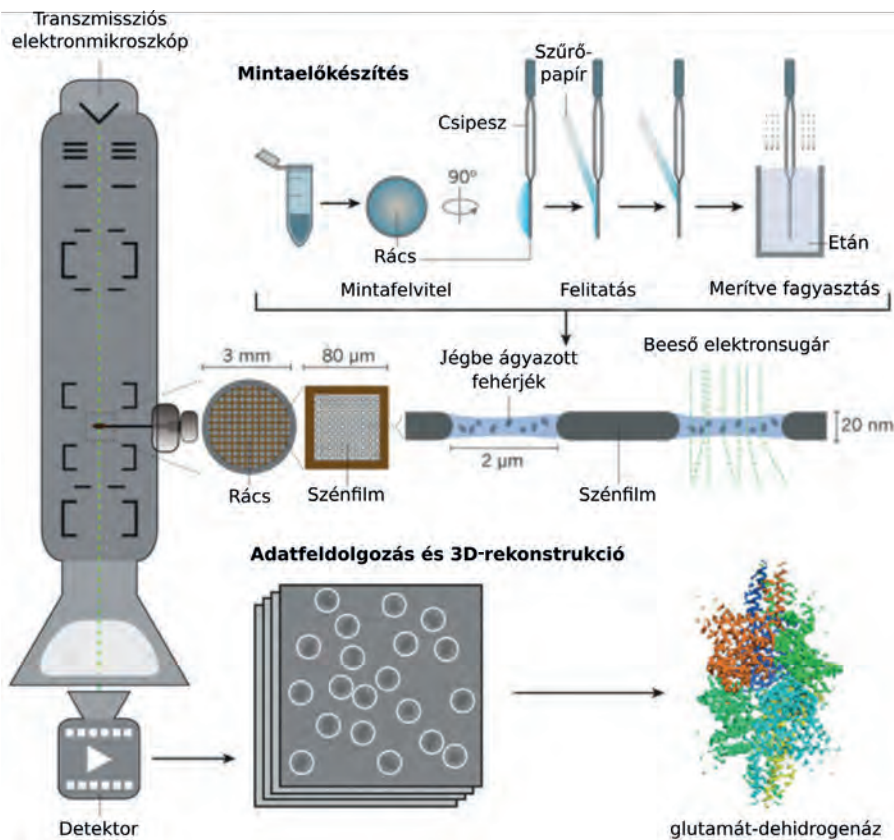
Vannak azonban olyan biológiai szerkezetek, amelyek nem kristályosíthatók, s méretük vagy oldhatatlanságuk folytán NMR-rel sem vizsgálhatóak (pl. membránfehérjék, csatornák, sejtorganellumok, nagyméretű komplex szerkezetek). Itt merült fel az elektronmikroszkóp bevetésének igénye. Ezt a már említett technikai problémák gátolták. Szerencsénkre voltak céltudatos és kitartó kutatók, akik megfogalmazták a célt, és évtizedeken át állhatatosan dolgoztak a sokak által reménytelennek ítélt problémán.

A most beérett munka a hetvenes években kezdődött, és három helyen, három szalon futott mindaddig, amíg végül a krio-elektronmikroszkópia technikájában egyesült a 2010-es években.

A mai krio-elektronmikroszkóp létrejöttének első lépése a remény felkeltése volt 1990-ben, amikor Cambridge-ben az MRC Molekuláris Biológiai Laboratóriumában *Richard Henderson* és munkatársai egy membránba ágyazott, bonyolult fehérje, a bakteriorodopszin szerkezetét határozták meg nagy felbontással, elektronmikroszkóppal. Ez megmutatta, hogy az eddig reménytelennek ítélt út járható, ami a képfeldolgozás és az elektronmikroszkópos technika csiszolásának volt az eredménye. De ez

nagyon speciális eset: a fehérjét membránkörnyezetével együtt lehet izolálni, s e membrándarabkákból az egyes fehérjék azonos orientációt vesznek fel. Ezért ez a megközelítés a legtöbb biológiai objektumra és más fehérjékre nem volt alkalmazható.

Ezzel párhuzamosan, de ettől függetlenül, a heidelbergi Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumában (EMBL) egy Svájc-ból érkezett fiatalember, *Jacques Dubochet* már 1978 óta dolgozott nagy elszántsággal azon, hogy elektronmikroszkópos vizsgálatra alkalmas biológiai mintakészítési eljárást fejlesszen ki. Az általa kidolgozott gyorsfagyasztási eljárás lehetővé teszi, hogy vizes közegben lévő biológiai mintákat készíthessünk. Egy fémkereten kialakított szénrácson sikerült – rutinszerűen – mikrométer vastagságú réteget képezni a vizes mintából, amelyet ezután -190 °C hőmérsékletű etánfűrdőbe belőve, nagy sebességgel megfagyasztottak. A gyors fagyasztás egyrészt nem engedi meg apró – az elektronsugárzást károsan szóró, képminőséget rontó – jégkristályok kialakulását, mivel a víz



3. ábra. Minta előkészítése krio-elektronmikroszkópiai méréshez. A vizsgálandó fehérje mindössze néhány mikroliternyi oldatát egy fémrácsra viszi föl, amely egy perforált szénfilmet tartalmaz. A minta fölvitele után a rácsot cseppfolyós etánba mártják, aminek hatására pillanatszerűen megfagy, és a vizsgálandó részecskéket üvegszerű jégbe zárja. A mintáról különböző orientációjú, 2-dimenziós képeket készítenek a szénfilm pórusain keresztül. A 2-dimenziós adatok további feldolgozásával 3-dimenziós kép nyerhető. Példaként a glutamát-dehidrogenáz enzim krio-elektronmikroszkóp segítségével megoldott szerkezete látható

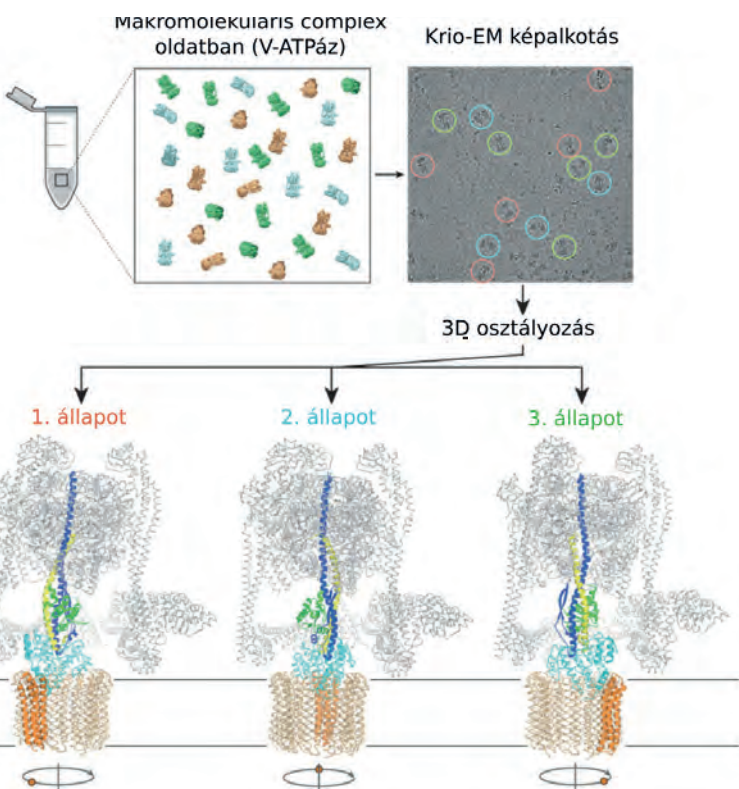
(FORRÁS: RAFAEL FERNANDEZ-LEIRO & SJORS H. W. SCHERES. NATURE 537, 339–346 (2016))

strukturátlan, amorf formában szilárdul meg, vitrifikálódik, másrészt a vitrifikált víz a vákuumban nem párolog. Az így készített mintában a biológiai objektum (vírus, membráncsatorna, fehérjekomplex, bakteriofág, DNS) megőrzi hidratált, natív szerkezetét, mintegy befagyasztható működésének egy bizonyos időpontjában a maga természetes állapotában. Ez a minta egy olyan oldatfilm, amely elég vékony ahhoz, hogy gyorsan hűthető legyen, másrészt elég vastag ahhoz, hogy befogadjon egy molekuláris réteget a vizsgálandó, véletlenszerűen orientált molekulákból vagy komplexekből. A **3. ábra** a mintakészítés sematikus vázlatát mutatja.

A mintakészítés problémája így megoldódott, azonban a minta natív állapotának megőrzése érdekében az elektronsugár intenzitásának csökkentésére is szükség volt, mégpedig úgy, hogy a képesség ne csökkenjen. Az általában használt nagyenergiájú (80–300 keV) elektronok energiája elegendő a biológiai szerkezeteket stabilizáló gyenge másodlagos kötések megbontására, de hatására a kovalens kötések is felhagyhatnak. Az elkerülhetetlen energiacsökkentés és a képfeldolgozási módszer között szoros az összefüggés. Az alacsony energia alkalmazása miatt a romló képességet kompenzálhatja, ha matematikai eljárással az azonos, befagyasztott molekulák szórásai képének válogatása, rendezése, átlagolása útján állítunk elő nagy felbontású képet.

E probléma megoldása mentén kapcsolódik be a harmadik – most szintén díjazott – szál. Ez New Yorkban, a Columbia Egyetemen ered, ahol *Joachim Frank* Németországban tanult biofizikus dolgozott a 70-es évektől a nem-kristályos, aszimmetrikus, véletlenszerűen orientált oldott molekulák (ilyenek a fagyasztott biológiai szerkezetek) „elmosódott” szórásai képeinek számítógépes, matematikai analízisének és „feljavításán” – sikerrel. Nagyszámú szórásai kép automatikus kiválogatásának, értékelésének és analízisének problémáját oldották meg, és összegezték a mások által is egyszerűen használható SPIDER programcsomagban. E módszer segítségével nagyszámú kis felbontású képből nagyfelbontású 3-dimenziós képet kaphatunk (**4. ábra**). Ez az eljárás nemcsak a felbontást javítja, hanem a különböző orientációjú szerkezetekről kapott képek válogatásával és rendezésével a 2-dimenziós elemekből 3-dimenziós kép számítását is lehetővé teszi.

Miközben ezek a próbálkozások folytak, a technika is fejlődött, jelentősen javult az elektrondetektorok érzékenysége, és fejlődtek a számítógépes képelemző eljárások is. Fontos tényező volt a mintáról szórt elektronok közvetlen detektálására képes komplementer fém-oxid félvezető (CMOS) kamerák tökéletesítése. Ezek az egyedi elektronok nagy térbeli felbontású, gyors detektálásra képesek, ami lehetővé teszi akár másodpercenként 400 szórásai kép felvételét. Így az adatgyűjtés alatt



4. ábra. A képfeldolgozási folyamat során a krio-elektronmikroszkóp által 2-dimenziós képek feldolgozása során nyert 3-dimenziós képek osztályozásával a fehérjék konformációs dinamikájára vonatkozó információ is kinyerhető. Egy V típusú ATPáz szerkezetének megoldása során három különböző konformációs állapotot találtak (FORRÁS: RAFAEL FERNANDEZ-LEIRO & SJORS H. W. SCHERES NATURE 537, 339–346 (2016))

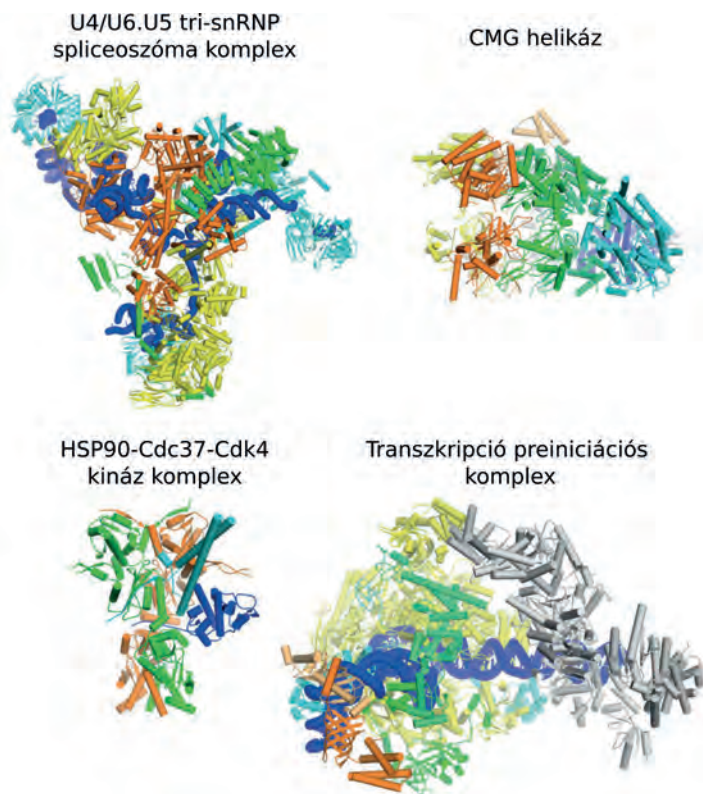
a vizsgált fehérjemolekuláknak az elektronnyaláb hatására történő elmozdulása a hordozó rácson precízen nyomon követhető és korrigálható, ami jelentős jel/zaj aránynövekedéshez vezetett.

A nemrégiben kifejlesztett alacsony hőmérsékletű elektronemissziós ágyúk alkalmazása, amelyek erősen koherens, kis intenzitású elektronnyaláb előállítását teszik lehetővé, megoldja a mintakárosító elektronnyaláb intenzitásának további csökkentését.

Az elmúlt években sokat fejlődött az automatizált mintapreparálás, -behelyezés és automatikus adatgyűjtés is. Ma már 2–3 nap alatt, minimális emberi beavatkozással összegyűjthető több százezer szerkezeti kép, ami a jórészt ugyancsak automatizált szerkezetanalízis révén lehetővé teszi a szerkezet atomi szintű, 0,2 nanométer körüli felbontású meghatározását.

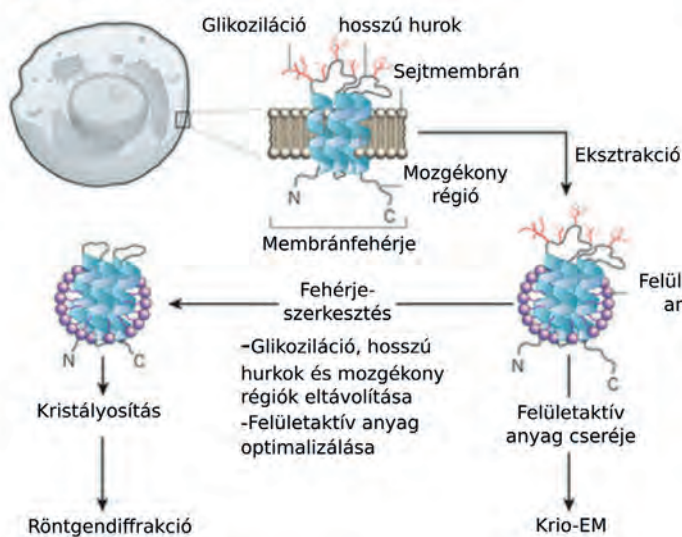
A krio-elektronmikroszkópia jelentőségét az adja, hogy segítségével a biológiai minták szerkezetét mindenféle festés, fixálás, egyéb durva beavatkozás nélkül, természetes vizes közegüknek megfelelő

állapotban határozhatjuk meg atomi szintű felbontással. Mindezt úgy, hogy működésük közben, különböző fázisokban az állapotot – a szó szoros értelmében – befagyaszttjuk. Így a pillanatfelvételek sorozatából a működés szerkezeti dinamikájáról is pontos képet kaphatunk. A sejtek működésének szabályozásában alapvető jelentősége van a fehérjék közötti nagyon specifikus kölcsönhatásoknak. A kölcsönhatások első fázisa a szelektív felismerés. Ez a fehérjék egyedi felszíni, komplementer topológiáján, vagyis a szerkezeten alapul. Az élővilágban előfordulnak nagy makromolekuláris „gépezetek”, amelyek pl. a fehérjeszintézis komplex, jól irányított folyamatát hajtják végre. Ezen nagyméretű fehérjekomplexek szerkezetének és működésük mechanizmusának megfigyelésére ad lehetőséget a nagyfelbontású szerkezeti sorozatfelvételek készítése olyan esetekben is, amikor a komplexek mérete miatt a röntgenkristallográfia vagy NMR-módszer nem jön számításba. Ilyen példa a spliceoszómakomplex szerkezetének meghatározása. Ez az óriás komplex végzi az eukarióta

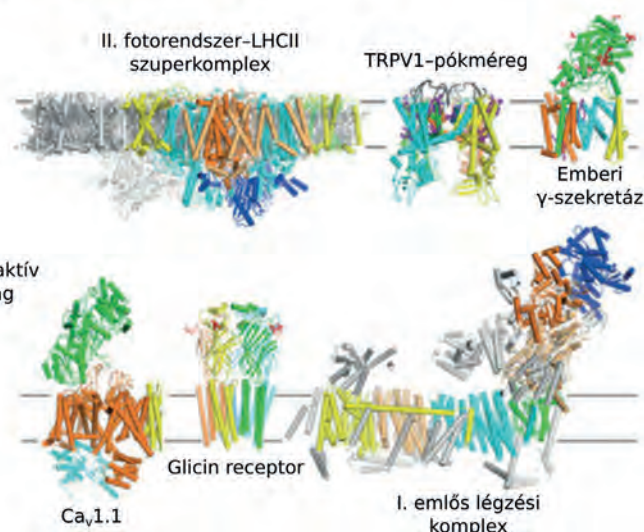


5. ábra. Nagy méretű fehérjekomplexek krio-elektronmikroszkóppal feltárt szerkezetei (FORRÁS: RAFAEL FERNANDEZ-LEIRO & SJORS H. W. SCHERES NATURE 537, 339–346 (2016))

a) Membránfehérjék kinyerése



b) Membránfehérjék



6. ábra. Krio-elektronmikroszkóp segítségével lehetővé vált membránfehérjék – más módszerekkel hozzáférhetetlen – szerkezetének feltárása. (a) Membránfehérjék kinyerése röntgendiffrakciós és krio-elektronmikroszkópos szerkezetmeghatározáshoz. Krio-elektronmikroszkópos szerkezetmeghatározás esetén, szemben a röntgendiffrakcióval, a glikozilációra, ill. a hosszú hurok és a mozgékony régiók szerkezetére vonatkozó információ nem vesz el. (b) Krio-elektronmikroszkóp segítségével megoldott membránfehérje-szerkezetek

(FORRÁS: RAFAEL FERNANDEZ-LEIRO & SJORS H. W. SCHERES NATURE 537, 339–346 (2016))

sejtekben az örökítő anyag „szerkesztését”, kivágvá az irreleváns részeket, hasonlóan a filmvágáshoz. Az 5. ábrán néhány nagy méretű fehérjekomplex krio-elektronmikroszkóppal meghatározott szerkezete látható. A CMG helikázkomplex a két DNS-szál szétválasztását végzi a DNS megkettőződése során. A HSP90 dajkafehérjének (chaperone-nak) és Cdc37 nevű cochaperone-jának a Cdk nevű kinázzal alkotott komplexe. A dajkafehérjék az újonnan szintetizált vagy rosszul felgombolyodott fehérjéknek segítenek a megfelelő szerkezet kialakításában. A transzkripció preiniciációs komplex a génátíródás során az RNS-polimeráz II enzimet irányítja az átíródás kezdőpontjába, valamint denaturálja, és a polimeráz aktív helyéhez irányítja a DNS-t. A szerkezetről alkotott nagyfelbontású pillanatképek alapján érthető meg ezen bonyolult „molekuláris gépezetek” működésének mechanizmusa.

Nagy jelentősége van a krio-elektronmikroszkópiának a membráncsatornák és -fehérjék szerkezetének felderítésében. Ezeket a fehérjéket rendkívül nehéz tisztítani. Ugyanis kiemelve őket hidrofób fosfolipid környezetükből, szerkezetük többnyire összeomlik, a detergenssel való stabilizálás pedig megnehezíti a kristályosítást. Így a biológiai és gyógyszertervezési szempontból legérdekesebb membránfehérjékről nagyon korlátozottak a direkt

szerkezeti ismereteink. A jelenleg ismert kis molekulasúlyú hatóanyagok felének membránfehérje vagy csatorna a támadáspontja. Ezen célpontok szerkezetének ismerete lehetővé teszi új hatóanyagok tervezését. E téren talán a legjelentősebb az átörös. Néhány krio-elektronmikroszkóp segítségével meghatározott szerkezetet mutat a 6. ábra.

Sok kiváló és elkötelezett kutató több évtizedes munkájából összeállt egy korábban nem remélt, nagyszerű technikai eszköz, a krio-elektronmikroszkóp, amely új lehetőséget nyit a szerkezeti biológia előtt. Lehetővé teszi, hogy a komplex makromolekuláris rendszereket működésük egy pillanatában, natív állapotban befagyasszuk, és atomi szinten meghatározzuk a szerkezetüket, topográfiájukat, kölcsönhatásaikat.

Egy új mérés technika megjelenése mindig felszínre hoz olyan kérdéseket, amelyeket – ennek hiányában – fel sem tettek. Így volt ez korábban, amikor a röntgenkristallográfia, majd a magmágneses rezonancia (NMR) módszerének fejlődése lehetővé tette ezek alkalmazását komplex biológiai objektumok szerkezetének meghatározására. Azt gondolom, a krio-elektronmikroszkópia elterjedése is új korszakot nyit a molekuláris szerkezeti alapon nyugvó funkcionális biológiában.

ZÁVODSZKY PÉTER