

Jan Bednár

„Chladná” moderní elektronová mikroskopie

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 62 (2017), No. 4, 237–253

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/147066>

Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 2017

Institute of Mathematics of the Czech Academy of Sciences provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This document has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://dml.cz>

„Chladná“ moderní elektronová mikroskopie

Jan Bednár, Grenoble, Praha

Abstrakt. Mikroskopické techniky v biologii zažívají v posledních letech neobyčejný pokrok a s tím související ocenění. V roce 2008 byla Nobelova cena udělena za objev a práce na zeleném fluorescenčním proteinu, v roce 2014 obdrželi Nobelovu cenu Eric Betzig, Stefan W. Hell a William E. Moerner za práce v oblasti superrezoluční optické mikroskopie. V roce 2017 se k nim připojila elektronová mikroskopie, když se laureáty Nobelovy ceny za chemii stali průkopníci v oblasti elektronové mikroskopie — Jacques Dubochet, Richard Henderson a Joachim Frank. Jejich zásluhou byly položeny zhruba před 35 lety základy moderní elektronové mikroskopie pro použití ve strukturní biologii — takzvané kryoelektronové mikroskopie (kryo-EM), která v současné době zažívá neuvěřitelný rozmach. Zavedení kamer s přímou detekcí elektronů a dalších technologických vylepšení umožňuje pomocí kryo-EM určovat struktury biologických komplexů s rozlišením lepším než 2 Å, tedy na úrovni atomů. Bez průkopnických prací letošních tří laureátů by ovšem nic z toho nebylo možné.

Rekapitulace principů elektronové mikroskopie

Elektrony místo fotonů

Princip elektronového mikroskopu byl navržen na počátku dvacátých let minulého století Ernstem Ruskou a první funkční prototyp byl zkonstruován v roce 1933. V roce 1937 začala firma Siemens-Reiniger-Werke AG vyrábět první komerčně dostupný elektronový mikroskop. Základní Ruskovou motivací pro konstrukci elektronového mikroskopu byla nízká rozlišovací schopnost optických mikroskopů daná Abbeovým vztahem

$$d = \frac{0,5\lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{0,5\lambda}{NA}, \quad (1)$$

kde d je rozlišení objektivu, λ vlnová délka použitého záření, n index lomu prostředí mezi zobrazovaným objektem a zobrazovací soustavou, α polovina maximálního vrcholového úhlu kužele difraktovaného světla, který je zobrazovací soustava schopna zachytit. NA je numerická apertura. Vzhledem k nejkratší použitelné vlnové délce viditelného spektra kolem 400 nm je nejvyšší rozlišení optických mikroskopů rovno přibližně 200 nm.

Roku 1924 zformuloval de Broglie svou hypotézu dualismu vln a částic, podle které je každá hmotná částice doprovázena vlnou o vlnové délce

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m_0 v} \sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}, \quad (2)$$

Doc. RNDr. JAN BEDNÁR, Ph.D., Institut Albert Bonniot, CNRS, Grenoble; 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, e-mail: Jan.Bednar@univ-grenoble-alpes.fr, Jan.Bednar@lf1.cuni.cz

kde h je Planckova konstanta, p hybnost částice, m_0 její klidová hmotnost a v rychlost, c rychlost světla.

První funkční prototyp elektronového mikroskopu s velmi omezenými parametry byl zkonstruován Ernstem Ruskou v roce 1931. Stojí za zmínku, že se Ruska o existenci vlnových vlastností elektronů dozvěděl až při testování mikroskopu a začal se obávat, že maximální rozlišení bude opět limitováno Abbeovým zákonem. Brzy ovšem spočítal, že vlnová délka elektronů (při urychlovacím napětí 75 kV, které tehdy používal) je v porovnání s viditelným světlem o 5 řádů kratší a teoretické dosažitelné rozlišení elektronových mikroskopů se tak pohybuje v jednotkách pikometrů ($1 \text{ pm} = 10^{-2} \text{ \AA}$). Příklady vlnové délky λ elektronů urychlených různým urychlovacím napětím V jsou uvedeny v tabulce 1.

| V (kV) | v/c | m/m_0 | λ (pm) |
|----------|-------|---------|----------------|
| 100 | 0,548 | 1,196 | 3,70 |
| 300 | 0,776 | 1,587 | 1,97 |
| 1 000 | 0,941 | 2,957 | 0,87 |

Tab. 1. Rychlosti, relativistické hmotnosti a vlnové délky elektronů při vybraných urychlovacích napětích

Dosažení takto vysokého teoretického rozlišení bohužel brání vlastnosti základního zobrazovacího elementu elektronového mikroskopu — rotačně symetrické elektromagnetické čočky. Ty umožňují využít pouze paraxiální svazek a výsledná odpovídající úhlová apertura elektromagnetické čočky má hodnotu pouze několika miliradiánů. To snižuje prakticky dosažitelné rozlišení elektronových mikroskopů na úroveň setin nanometru (100 pm), což je rozměr průměrného atomu. Nicméně tato mez je v poslední době překonávána, jak si ukážeme později.

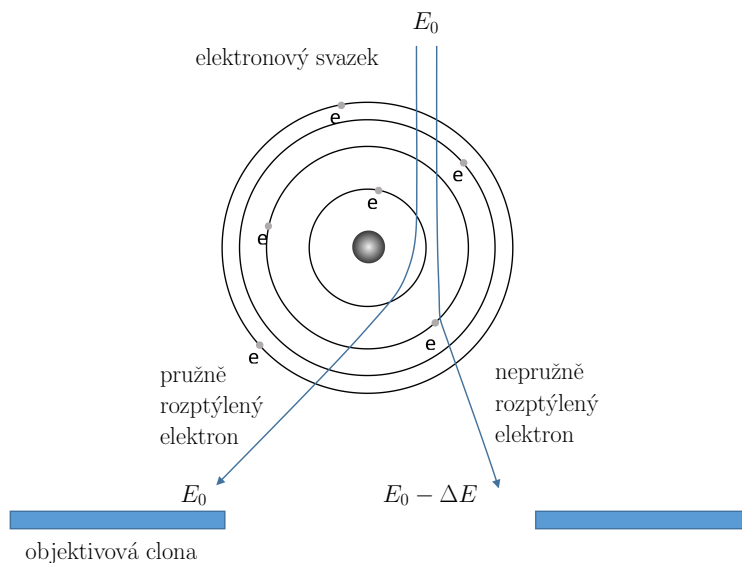
Elektromagnetické čočky využívají toho, že dráha nabitě částice v magnetickém poli je zakřivená v důsledku působení Lorentzovy síly

$$\vec{F} = q(\vec{v} \times \vec{B}), \quad (3)$$

kde \vec{F} je působící síla, q náboj částice, \vec{v} její rychlost v magnetickém poli o intenzitě \vec{B} . Lorentzova rovnice umožňuje navrhnout systém magnetických polí schopných definovaně měnit dráhu elektronů a vytvořit tak ekvivalent „optického“ systému. Na základě uvedených principů byly zkonstruovány dva základní typy elektronového mikroskopu: transmisní elektronový mikroskop (TEM) a skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM). Dále se budeme zabývat pouze TEM.

Interakce elektronů se vzorkem a vznik kontrastu

Na rozdíl od mikroskopie optické nevzniká při zobrazování pomocí TEM kontrast absorpcí procházejícího záření — elektronů. Dochází pouze k jejich rozptylu a to dvěma odlišnými mechanismy: interakcí s jádry atomů vzorku a interakcí s elektronovými obaly těchto atomů. Při interakci s jádry dochází ke změně trajektorií elektronů bez ztráty rychlosti. Jedná se o rozptyl pružný, neboli elastický (obr. 1). Elektrony, které



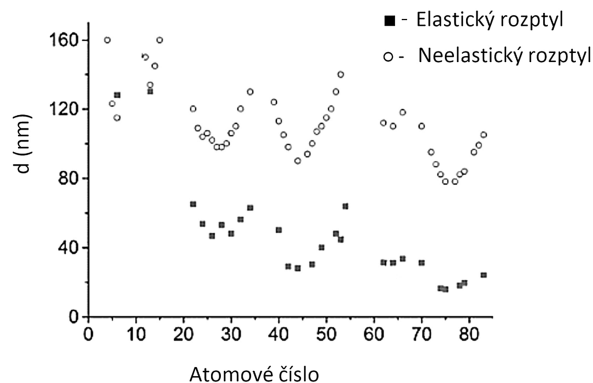
Obr. 1. Schéma interakcí elektronu s atomem vzorku

jsou při elastickém rozptylu dostatečně odchýleny od původního směru, jsou potom zachyceny prostorovou objektivovou clonou, což je zdrojem amplitudového kontrastu. Je zřejmé, že odchýlení elektronů z původní dráhy bude záviset na atomovém čísle, přičemž těžké prvky budou rozptylovat elektrony efektivněji. Neelasticky rozptýlené elektrony naopak ztrácejí při interakci s elektronovým obalem atomů část své energie a hybnosti. Kvůli snížené rychlosti pohybu se proto chovají při průletu elektromagnetickými čočkami jinak než elektrony nerozptýlené nebo rozptýlené elasticky. Zjednodušeně řečeno, nejsou stejně zaostřovány. Navíc, protože je jejich charakteristický úhel rozptylu malý, projdou objektivovou clonou a působí negativně na formování výsledného obrazu — zvyšují šum.

Důležitým parametrem ovlivňujícím kvalitu obrazu je takzvaná střední volná dráha elektronů D . Ta je definována jako vzdálenost mezi dvěma rozptylovými událostmi při průchodu elektronů vzorkem a závisí na jeho kompozici vztahem

$$\frac{1}{D} = \frac{N_A \sigma_T(\mu)}{A}, \quad (4)$$

kde N_A je Avogadrovo číslo, σ_T celkový rozptylový průřez (elastický a neelastický) izolovaného atomu, A atomová hmotnost atomů ve vzorku o hmotové tloušťce (hustota krát tloušťka). Tento parametr je velmi důležitý, protože při průchodu elektronů vzorkem by nemělo docházet k vícečetným rozptylovým událostem. V takovém případě výsledný obraz neodpovídá složení vzorku. Typické hodnoty střední volné dráhy pro urychlovací napětí 200 kV jsou uvedeny v obr. 2. Z uvedených faktů vyplývá pro elektronovou mikroskopii několik podstatných důsledků:



Obr. 2. Volná dráha d elektronu pro pružný a nepružný rozptyl v závislosti na atomovém čísle. (Yougui Liao, *Practical Electron Microscopy and Database*, <http://www.globalsino.com/EM/>)

- Aby elektrony mohly interagovat pouze se vzorkem, celý tubus elektronového mikroskopu musí být evakuován (podle typu mikroskopu na tlak 10^{-6} až 10^{-9} Pa).
- Tloušťka vzorku musí být přizpůsobena jeho chemickému složení, aby nedocházelo k násobným rozptylovým událostem.
- Typický biologický materiál bude elektrony velmi málo rozptylovat vzhledem k převažujícímu obsahu lehkých prvků, a tedy bude vykazovat velmi malý kontrast zobrazení.

Požadavek na umístění vzorků ve vakuu komplikuje zásadním způsobem studium nativních biologických materiálů obsahujících vodu. Ve vakuu by se voda z hydratovaného preparátu začala okamžitě vypařovat a tím by došlo ke kolapsu a znehodnocení jeho struktury. Biologický materiál lze proto pozorovat v EM až po určitých úpravách, jejichž charakter se liší podle toho, jestli se jedná o vzorky tkání nebo o izolované částice (viry, proteinové komplexy, liposomy atd.). U obou typů je ale důležitým krokem přípravy zvýšení kontrastu pomocí substancí obsahujících těžké prvky. Vzhledem k tomu, že předmětem tohoto pojednání je současný rozvoj aplikací vysokorozoluční elektronové mikroskopie ve strukturální biologii, které jsou téměř výlučně spjaty s izolovanými komplexy, budeme se dále věnovat pouze této problematice.

Příprava biologických izolovaných komplexů pro elektronovou mikroskopii

Nejčastější typy izolovaných biologických komplexů studovaných elektronovou mikroskopií jsou viry, DNA, částice¹ vezikulárního typu, proteinové nebo nukleoproteinové komplexy, biologické polymery a jiné. Podstatnou výhodou většiny z nich je, že obsahují pouze velmi malé množství vody. Dehydratace tudíž v mnoha případech nemá

¹ Částice (*particle*) se v kryoelektronové mikroskopii používá jako terminus technicus pro objekty nanometrových rozměrů.

vážnější dopad na jejich strukturu. Pro jejich vizualizaci v elektronovém mikroskopu se nejčastěji používá technika negativního barvení (kontrastování). Vzorek je nejprve nanesen na mikroskopickou sítku pokrytou podpůrnou blankou (tenký film uhlíku nebo polymeru) a následně inkubován v roztoku kontrastovacího média, například uranyl acetátu. Následně se přebytek kontrastovacího roztoku odsaje a zbylá vrstva se nechá zaschnout. V místech, kde se nacházejí částice, je tato vrstva tenčí a částice se tak jeví jako světlé objekty na tmavém pozadí. Tato klasická technika má ovšem několik podstatných omezení: i) Adsorpce na plochý podklad může vést k deformaci prostorové konformace objektu. ii) Adsorbované objekty mohou zaujmout preferovanou orientaci, při které určité projekce nebudou viditelné. iii) Vzorek nelze pozorovat v podmínkách odpovídajících jeho fyziologickému prostředí. iv) Méně stabilní komplexy se při procesu dehydratace rozloží. v) Zaschlá vrstva kontrastovacího roztoku překrývá jemné detaily vzorku, čímž snižuje dosažitelné rozlišení.

Výše popsání omezení vedla koncem sedmdesátých let k postupnému útlumu počátečního nadšení z aplikací elektronové mikroskopie v biologii, protože začalo být jasné, že standardní techniky přípravy biologických preparátů způsobují mnohé a navíc často těžce odhalitelné artefakty. Z této přechodné skepse se zrodil záměr vyvinout metodu pro pozorování nativních preparátů — hydratovaných, nekontrastovaných, neadsorbovaných a uchovaných ve fyziologických podmínkách.

Zrod kryoelektronové mikroskopie

Vitrifikace

Jak bylo zmíněno výše, přítomnost vody ve vzorku je neslučitelná s nízkými hodnotami tlaku v tubusu elektronového mikroskopu. Možný způsob, jak tento problém obejít, je z fyzikálního hlediska velmi jednoduchý. Stačí udržovat hydratovaný vzorek na teplotě, při níž je tlak vodních par řádově srovnatelný s tlakem uvnitř mikroskopu. V praxi to znamená zchladit vzorek na teplotu hluboko pod $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (běžně $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$), při které je voda pochopitelně v pevném skupenství. Při obyčejném ochlazení vody za atmosférického tlaku pod bod mrazu přechází voda do pevného skupenství ve formě buď hexagonálního, nebo, při vyšších rychlostech ochlazení, kubického ledu. Tvorba jakýchkoli krystalů ledu je ovšem v biologickém preparátu nepřijatelná. Dochází totiž při ní ke změně objemu a tím mechanickému poškození struktury vzorku, separaci fází, změně iontových, osmotických a tonických podmínek a jiným procesům, které znehodnocují strukturní informaci. V neposlední řadě je potom EM pozorování biologického vzorku obsahujícího krystalický led znemožněno přítomností Braggových reflexí.

Vývojem metod elektronově mikroskopického zobrazování biologických preparátů v nativní hydratované formě se začal ve druhé polovině 70. let zabývat Dubochet se svými spolupracovníky. Prvním problémem, který bylo třeba vyřešit, bylo zamezení vzniku krystalů při mražení hydratovaných preparátů pro elektronovou mikroskopii. Jako jedna z mála možností se nabízelo využití třetího typu pevného skupenství vody, tzv. amorfního ledu („amorphous“ nebo „vitreous ice“), který nemá krystalickou strukturu a může existovat i za atmosférického tlaku. Tato forma pevného skupenství vody byla pozorována již v roce 1935 [5] a lze ji získat buď pomalou kondenzací vodních par na podkladu o velmi nízké teplotě nebo tzv. vitifikací, což je přechod z kapalného skupenství do pevného bez tvorby krystalů. Lze jej dosáhnout dostatečně „rychlým“

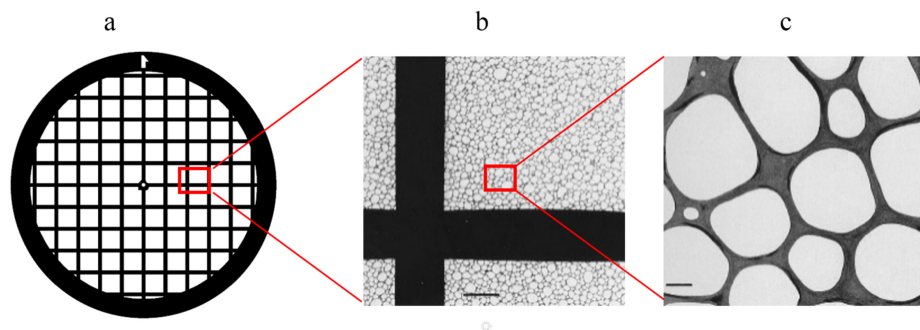
odebíráním tepla, při kterém prudký nárůst viskozity prostředí zabrání molekulám tekutiny zaujmout polohu v krystalické mřížce. Je zřejmé, že čím větší je difuzní koeficient molekul, tím rychlejší musí být ochlazování vzorku, což současně znamená, že bude obtížnější vitrifikace dosáhnout. Fyzikální parametry vody jsou pro vitrifikaci velmi nepříznivé: vysoký difuzní koeficient ($2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [15], relativně vysoká tepelná kapacita ($4,1813 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) a malá tepelná vodivost ($0,591 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$). V případě čisté vody se pro dosažení vitrifikace uvádí jako minimální rychlost chlazení $10^6 \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$ [17]. Vitrifikace tak musí proběhnout během 10^{-5} až 10^{-4} s. Proto ještě na konci 70. let minulého století nebylo jasné, jestli lze procesu vitrifikace vody vůbec reálně dosáhnout. V roce 1980 ale byly publikovány výsledky ukazující možnost vitrifikovat vodní kapky mikrometrických rozměrů [4], které inspirovaly Dubocheta k využití vitrifikace pro přípravu nativních hydratovaných vzorků pro elektronovou mikroskopii [9].

Způsob přípravy tenkých vitrifikovaných vrstev

V roce 1984 publikoval J. Dubochet v časopise Nature revoluční článek [1], ve kterém popsal metodu přípravy nativního vzorku virů pro elektronovou mikroskopii. Trik byl stejně elegantní jako geniální. Z předchozího je zřejmé, že lze vitrifikovat pouze velmi omezený objem vody nebo vodného roztoku/suspenze. Dubochet a jeho kolegové vymysleli jednoduchý systém, jak tento objem minimalizovat a současně připravit vzorek dostatečně tenký pro pozorování v elektronovém mikroskopu. Elektronomikroskopickou sítku potáhli tenkým podložním filmem s otvory o rozměru pouze několika mikrometrů (obr. 3) pomocí metody popsané již v roce 1965 [12]. Na takto upravenou sítku byl nanesen roztok vzorku o objemu cca $3 \mu\text{l}$. Po odsátí přebytečného roztoku filtračním papírkem zbyla na sítkce tenká (cca 100–200 nm) metastabilní vrstva roztoku obsahující studovaný materiál — v případě zmíněné publikace viry. Tato vrstva po ponoření do kryogenu (kapalného etanu zchlazeného na teplotu blízkou jeho bodu tuhnutí, $-183 \text{ }^\circ\text{C}$) okamžitě zvitřikovala a změnila se tak v tuhý třírozměrný (3D) vzorek, v němž jsou studované objekty imobilizovány v tenké vrstvě amorfního ledu přesně ve stavu a orientaci, ve kterých se nacházely v okamžiku vitrifikace. Úspěšná realizace vitrifikace je v tomto případě dána tím, že poměr objem/plocha je extrémně výhodný pro rychlý odvod tepla ze vzorku, který navíc probíhá z obou stran vrstvy. Výhodou popsané metody přípravy vzorků je fakt, že elektronový svazek prochází vitrifikovaným vzorkem pouze v místech otvorů v podložním filmu a získaná informace tak není rušena signálem ze samotného podložního filmu.

Jedním z důležitých faktorů při optimalizaci vitrifikační metody byla identifikace vhodného, dostatečně účinného kryogenu. Tekutý dusík je jako kryogen velmi neúčinný, protože rozdíl mezi jeho teplotou tání a vypařování je pouze $14 \text{ }^\circ\text{C}$. Při jeho kontaktu s teplým objektem proto dojde k okamžitému vytvoření vrstvy plynné fáze okolo objektu, která brání efektivnímu odvodu tepla ze vzorku (tzv. Leidenfrostův jev, známý též z popularizačních přednášek fyziky, kdy experimentátor na krátký okamžik bez obav ponoří svůj prst do kapalného dusíku). Na základě mnoha experimentů se jako nejefektivnější kryogeny jeví tekutý etan a tekutý propan.

Od okamžiku vitrifikace musí již všechny další operace se vzorkem probíhat při teplotách nižších než $-150 \text{ }^\circ\text{C}$, neboť při teplotě nad $-146 \text{ }^\circ\text{C}$ dochází k rekrystalizaci (devitřifikaci) amorfního ledu [22]. Bylo tedy nutné vyřešit postup vkládání vzorku

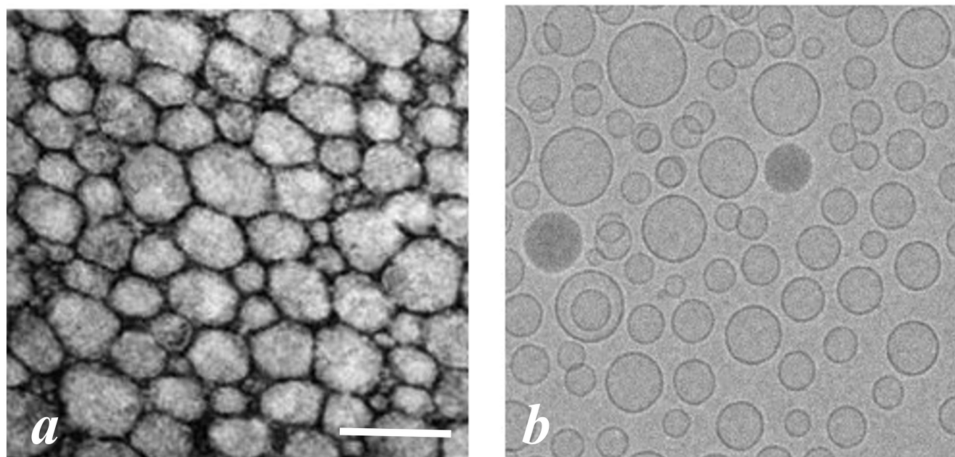


Obr. 3. (a) Elektronmikroskopická síťka pokrytá děrovaným filmem, (b) měřítko $20\ \mu\text{m}$, (c) měřítko $1\ \mu\text{m}$

do elektronového mikroskopu a jeho udržení na velmi nízké teplotě v průběhu pozorování bez jeho ohřátí nad kritickou teplotu a navíc bez jeho kontaminace kondenzující atmosférickou vlhkostí. Extrémně ochlazený vitrifikovaný vzorek se chová jako kryogenní pumpa a kondenzující voda spolu se zbytkovými nečistotami má za následek jeho postupné znehodnocování. Během akvizice kryo-EM snímků musí být teplota vzorku velmi stabilní v řádu desetin $^{\circ}\text{C}$, aby nedocházelo ke ztrátě rozlišení způsobené tepelným driftem objektů. Řešení těchto technických problémů si vyžádalo určité modifikace v konstrukci elektronového mikroskopu, zejména držáku vzorku a jeho vkládání do mikroskopu a ochraně vzorku proti kontaminaci uvnitř mikroskopu.

Dubochetova metoda vitrifikace umožnila rozvoj kryoelektronové mikroskopie izolovaných částic. Jelikož jsou individuální částice při vitrifikaci imobilizovány v náhodných polohách, lze při pořízení snímků dostatečného počtu částic obdržet kompletní sadu projekcí ze všech možných projekčních úhlů a různými matematickými postupy potom určit 3D strukturu. Na vývoji metod matematické rekonstrukce 3D struktur se významně podílel další z laureátů letošní Nobelovy ceny za chemii, Joachim Frank, který postupně vyvinul jednotlivé části algoritmu 3D rekonstrukce z náhodných projekcí a vytvořil první ucelený softwarový systém zvaný SPIDER.

Negativním aspektem techniky zobrazování tenkých vitrifikovaných vrstev bez použití kontrastních látek je velmi malý obrazový kontrast. Je proto prakticky nemožné používat kontrast amplitudový spočívající v rozdílech jasu objektů a pozadí. V analogii s optickou mikroskopií se neabsorbující objekty bez kontrastní látky nazývají objekty fázové a při jejich studiu je nutné přejít na zobrazování pomocí kontrastu fázového. Značné, avšak řešitelné, technické obtíže spojené s nízkým kontrastem jsou nepodstatné ve srovnání s tím, že si vitrifikované vzorky zachovávají svůj nativní stav se strukturou, která není ovlivněna žádnými externími faktory. Dosažitelné rozlišení při zobrazení vitrifikovaných vzorků není už limitováno jejich stavem, ale pouze parametry mikroskopu, záznamového media a postupem analýzy obrazu. Přestože technika tenké vitrifikované vrstvy je používána zejména pro vysokorezoluční strukturální studie, existují situace, kdy je jediným možným řešením pro úspěšné zobrazení určitých typů vzorků i při nízkém rozlišení. Jedním z klasických příkladů jsou lipidové membrány ve formě sférických vezikulů, které prakticky nelze zobrazit standardními technikami elektronové mikroskopie a kryoelektronová mikroskopie je jedinou možností (obr. 4).



Obr. 4. Roztok syntetických liposomů zobrazených technikou negativního barvení (vlevo), kdy dochází k dehydrataci a následnému kolapsu částic, a kryoelektronovou mikroskopií (vpravo). Měřítka 100 nm. (Autor, nepublikované výsledky)

Fázové zobrazování — poměr signál/šum versus rozlišení

Fázový kontrast v elektronové mikroskopii se získává pomocí rozostření obrazu, přesněji podostřením. Jedná se však o relativně složitou záležitost. Zjednodušeně lze elektronový mikroskop přirovnat k nedokonalému akustickému zesilovači, který různé frekvence přenáší s různým zesílením. Aby výsledný zvuk odpovídal původní nahrávce, je nezbytné provést odpovídající korekce. Stejně tak je nutné korigovat obraz z elektronového mikroskopu, který nepřenáší všechny prostorové frekvence (rozměry) se stejnou intenzitou. V praxi to znamená, že různé velké detaily vzorku jsou v závislosti na hodnotě rozostření zobrazovány s odlišným kontrastem. Tzv. funkce přenosu kontrastu (Contrast Transfer Function — CTF) popisuje, jak závisí na velikosti detailů objektu poměr mezi jasovým kontrastem jejich zobrazení a lokálními fázovými posuvy elektronových vln procházejících vzorkem.

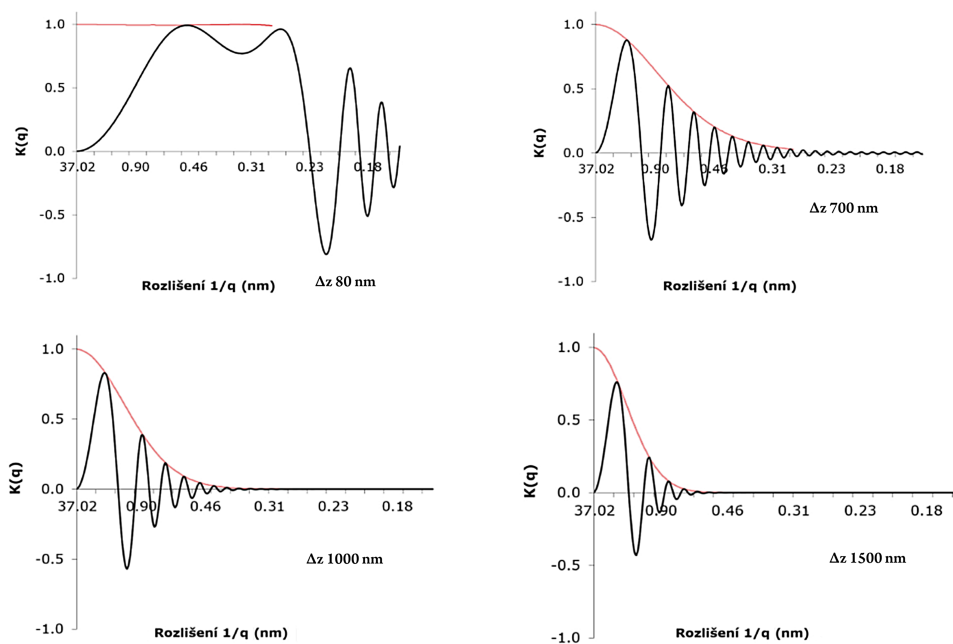
CTF je určena vlastnostmi elektromagnetické čočky, zejména sférickou aberací, a lze ji vyjádřit přibližným² vztahem

$$K(q) = -2 \sin \left[\pi \left(\Delta z \lambda q^2 - \frac{C_s \lambda^3 q^4}{2} \right) \right], \quad (5)$$

kde C_s je sférická aberace čočky, Δz hodnota rozostření, q prostorová frekvence, λ vlnová délka elektronu (obr. 5). CTF nabývá hodnot z intervalu $[-1, 1]$, kterými moduluje fázi výsledného obrazu při Fourierově transformaci.

Průběh CTF závisí na hodnotě rozostření, což má za následek, že při velmi nízkých hodnotách blízko optimálního zaostření je informace o objektu zaznamenána

²Vztah (5) udává CTF ve zjednodušeném ideálním případě bez vlivu faktorů, které utlumují amplitudu směrem k vyšším prostorovým frekvencím. Těmi jsou například rozptyl energií elektronů v původním svazku, drift vzorku, kvalita koherence svazku apod.



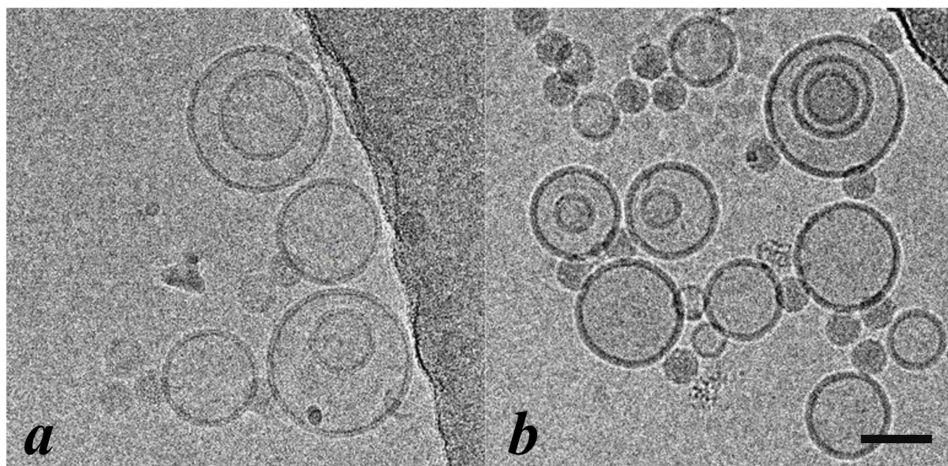
Obr. 5. Simulace průběhu CTF pro různé hodnoty Δz . Použité parametry: urychlovací napětí $V = 300$ kV, sférická aberace objektivové čočky $C_s = 2,1$ mm, emitor studená katoda

s vysokým rozlišením, ale jeho kontrast je velmi malý (malá hodnota CTF pro nízké prostorové frekvence) a objekt velmi obtížně identifikovatelný. Při vyšších hodnotách se kontrast objektu sice zvyšuje, ale klesá hodnota zaznamenaného rozlišení (obr. 6). Dále je nutné kompenzovat důsledky průchodů CTF nulou; ty odpovídají frekvencím, které se přenášejí s nulovým kontrastem. V praxi se problém řeší snímáním obrazů při různých hodnotách podostření v takovém rozsahu, aby celé spektrum prostorových frekvencí bylo získáno s nenulovými hodnotami.

Další komplikací při zobrazování nativních preparátů v elektronovém mikroskopu je jejich citlivost na poškození elektronovým svazkem, která omezuje použitelnou expoziční dávku na hodnotu okolo 20 až 50 elektronů/ $\text{\AA}^2 \cdot \text{s}$ podle typu vzorku a urychlovacího napětí. Proto je nutné používat při pořizování snímků techniku tzv. nízké dávky (low dose): Nejprve je při malém zvětšení a velmi nízké intenzitě svazku lokalizována vhodná oblast pro snímek. Poté je elektronový svazek odkloněn na sousedící oblast, na které se při požadovaném velkém zvětšení obraz zaostří a provedou se nezbytné korekce svazku. Pak je vrácen do původní polohy a provedena expozice. Vzorek je tak vystaven intenzivnímu svazku pouze po dobu sejmutí snímku.

Záznam signálu přímými detektory elektronů

Protože intenzita části signálu obsahující vysokorezoluční informaci je nízká, je nutné, aby záznamové médium bylo co nejcitlivější. Záznamové médium bylo po mnoho let

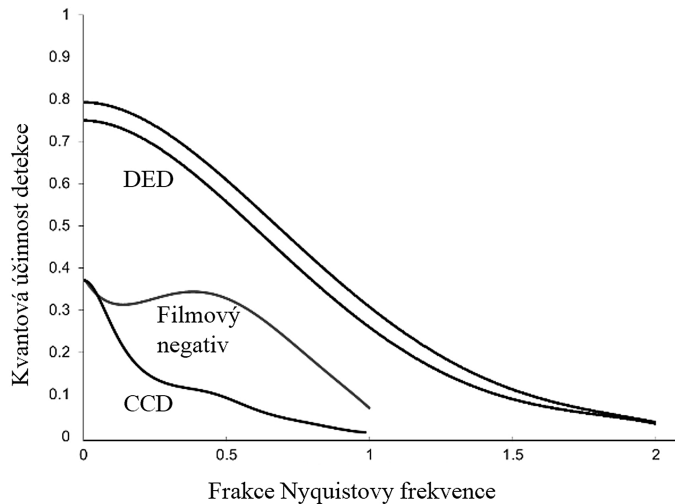


Obr. 6. Závislost kontrastu na úrovni podostření: (a) 1 900 nm, (b) 2 700 nm. Vzorek: syntetický liposom, měřítko 100 nm. (Autor, nepublikované výsledky)

jedním z omezujících faktorů rozvoje vysokorezoluční kryoelektronové mikroskopie. Zatímco vývoj ostatních součástí elektronových mikroskopů pokračoval relativně rychle (digitalizace ovládání, stabilita proudových zdrojů pro elektromagnetické čočky, motorizace mechaniky polohování vzorku v mikroskopu), v oblasti záznamu k žádným podstatným změnám nedocházelo. Až do relativně nedávné doby byl stále nejlepším médiem klasický fotografický negativ (optimalizovaný pro interakci s elektrony). Jeho používání ale přinášelo řadu komplikací při akvizici dat i následujícím zpracování.

Pro 3D analýzu individuálních částic (single particle analysis — SPA) je nutné shromáždit desítky až stovky tisíc jejich projekcí, což představuje srovnatelné počty negativů, které je třeba vyvolat a digitalizovat s maximální možnou kvalitou zachování originální informace. Z technických důvodů bylo možné za jeden den nasnímat a zpracovat pouze omezený počet negativů. Následné počítačové zpracování bylo také pomalé vzhledem k výkonnosti tehdejší výpočetní techniky a náročnosti operací, které celý algoritmus 3D rekonstrukce představuje. Proces 3D rekonstrukce proto trval typicky až několik měsíců. Bylo zjevné, že jediným možným řešením do budoucna je přechod k přímému digitálnímu záznamu EM snímků. Jako první digitální záznamová média pro elektronové mikroskopy byly používány CCD kamery, které se začaly objevovat na počátku 90. let minulého století. Jejich citlivost a dynamický rozsah ale byly pro vysokorezoluční studie nevyhovující. Fotografické negativy byly proto používány až do příchodu kamer s přímou detekcí elektronů (Direct Electron Detectors — DED), které na rozdíl od kamer CCD nepoužívají konverzi elektronů na světlo pomocí scintilátoru a jsou schopny detekovat elektrony přímo.

Byl to právě příchod DED kamer (na jejichž vývoji se také podílel Richard Henderson), který před přibližně šesti lety zahájil skutečnou revoluci ve vysokorezoluční elektronové mikroskopii. Citlivost detektorů překročila citlivost fotografických negativů (obr. 7) a ve spojení s výkonnou elektronikou bylo možné zavést několik nových postupů při akvizici dat, které výrazně posunuly praktický rozlišovací limit kryo-



Obr. 7. Porovnání kvantové účinnosti detekce různých typů detektorů. Adaptováno z www.gatan.com

elektronové mikroskopie. Filmový záznamový materiál lze použít pouze v integračním režimu, kdy je celá informace zaregistrována najednou v určitém časovém úseku (doba expozice). Bohužel i u velmi stabilních mikroskopů nevyhnutelně dochází k určitému driftu zobrazovaného vzorku, který má několik příčin (mechanická a teplotní nestabilita, nestabilita čočkových proudů, reakce vzorku na interakci s elektronovým svazkem). Tyto pohyby se v průběhu expozice sčítají, čímž dojde k „rozmazání“ snímku a ztrátě rozlišení. DED kamery ale díky svým parametrům umožňují získat informaci per partes (tzv. „movie“ režim) — několika velmi krátkými expozicemi, které jsou posléze srovnány a sumarizovány. Tím lze drift na výsledném obrazu do značné míry eliminovat. Ještě dále zachází jiný režim akvizice signálu, který DED umožňují, tzv. počítání jednotlivých elektronů (electron counting). V tomto režimu je s velkou opakovací frekvencí vyhodnocován stav jednotlivých pixelů detektoru ($400\times$ za sekundu, v případě kamer poslední generace až $1500\times$). Při překročení určité prahové hodnoty se předpokládá, že na daný pixel dopadl elektron. Jednotlivé záznamy jsou potom integrovány do výsledného obrazu. Toto prahování do značné míry eliminuje vlastní šum detektoru, což umožňuje dále zvýšit jeho výslednou citlivost. Nedostatkem současných DED kamer je nemožnost rozeznat dopad více elektronů na jeden pixel v průběhu jednoho záznamu. Tyto tzv. koincidenční ztráty však nejspíše nemají podstatný vliv na výsledné rozlišení. Očekává se, že problém koincidenčních ztrát bude výrazně eliminován u příští generace kamer.

Další možnost, kterou nabízejí DED kamery, je subpixelové rozlišení. Při dopadu elektronu na daný pixel jsou ovlivněny i pixely sousedící a analýzou jejich signálu lze vyhodnotit, do kterého kvadrantu pixelu elektron dopadl. Tím lze fakticky zdvojnásobit fyzické rozlišení detektoru.

Pokroky ve vývoji ostatních technologií — software a automatizace

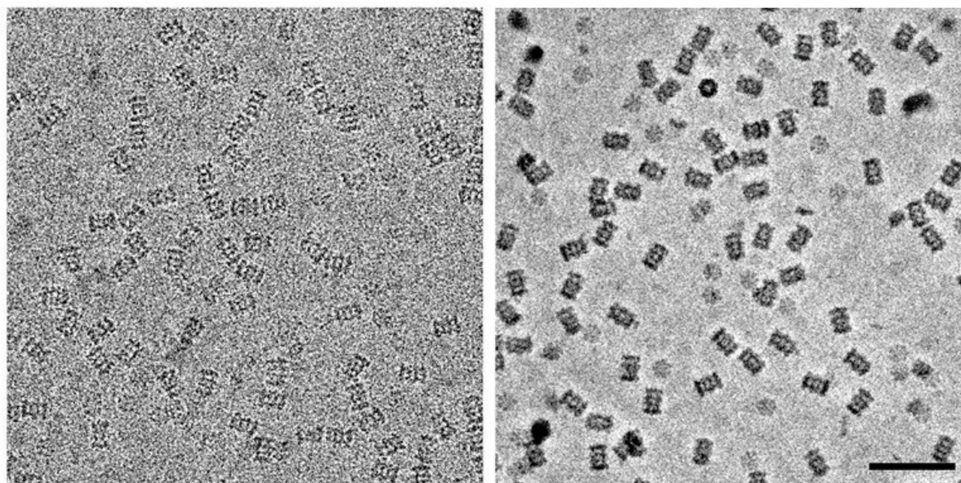
Další dílčí technologická vylepšení přispěla k nevídanému zefektivnění při akvizici dat. Byly vyvinuty a jsou komerčně dostupné elektronmikroskopické sítky s podložní blankou s definovaným tvarem a rozměrem otvorů a jejich periodicitou. Díky této periodicitě a definovaným parametrům otvorů bylo možné vyvinout systém automatizovaného postupu snímání dat. Operátor na začátku pouze vybere zóny vhodné pro akvizici z hlediska tloušťky vrstvy a minimální kontaminace. Po zadání požadovaných parametrů již snímání probíhá automaticky (přesun do vybrané zóny, vycentrování jednotlivých otvorů, zaostření, korekce astigmatismu, kontrola driftu a vlastní expozice, doplňování kapalného dusíku pro chlazení vzorku). Mikroskop je tak schopný pracovat v úplné autonomii kontinuálně až několik dní. Tento režim umožňuje získat přibližně 500–1500 snímků za 24 hodin, což by bylo při manuálním snímání zcela nemožné.

Software pro zpracování a analýzu dat pro 3D rekonstrukci prošel za uplynulá desetiletí také dramatickým vývojem. Jedním z velmi důležitých pokroků bylo zavedení metody 3D klasifikace. Na počátku používání SPA bylo nutné pracovat s vysoce homogenními vzorky. Jakákoli nehomogenita (například různé možné konformace studované částice nebo kontaminace jiným typem částic) vedla k degradaci rozlišení. V roce 2006 Joachim Frank a jeho kolegové publikovali důležitou práci [19], v níž zavedli algoritmus 3D klasifikace, který umožňuje rozřadit analyzované částice podle jejich konformace. Tak lze nejen identifikovat různé konformace studovaného objektu, ale i eliminovat kontaminující objekty, což umožňuje snížit nároky na purifikaci vzorku. Dnes už se začíná uvažovat o možnosti purifikace „*in silico*“.

3D klasifikace má ale daleko významnější potenciální dopad na použití kryoelektronové mikroskopie a SPA. Protože vitrifikovaný vzorek představuje vlastně „momentku“ stavu studovaného komplexu, je možné například identifikovat různé konformace, které může za fyziologických podmínek zaujmout určitá makromolekula. Pomocí 3D klasifikace lze při cyklických reakcích identifikovat jednotlivé intermediální stavy reakčního komplexu a tak charakterizovat strukturálně průběh reakce. Jako ilustraci této možnosti zde uvádíme analýzu konformačních změn ribozomu při asociaci tRNA [11]. Ani krystalografie ani NMR nejsou schopné takovýto typ analýzy poskytnout.

Doplňkový, ale důležitý hardware

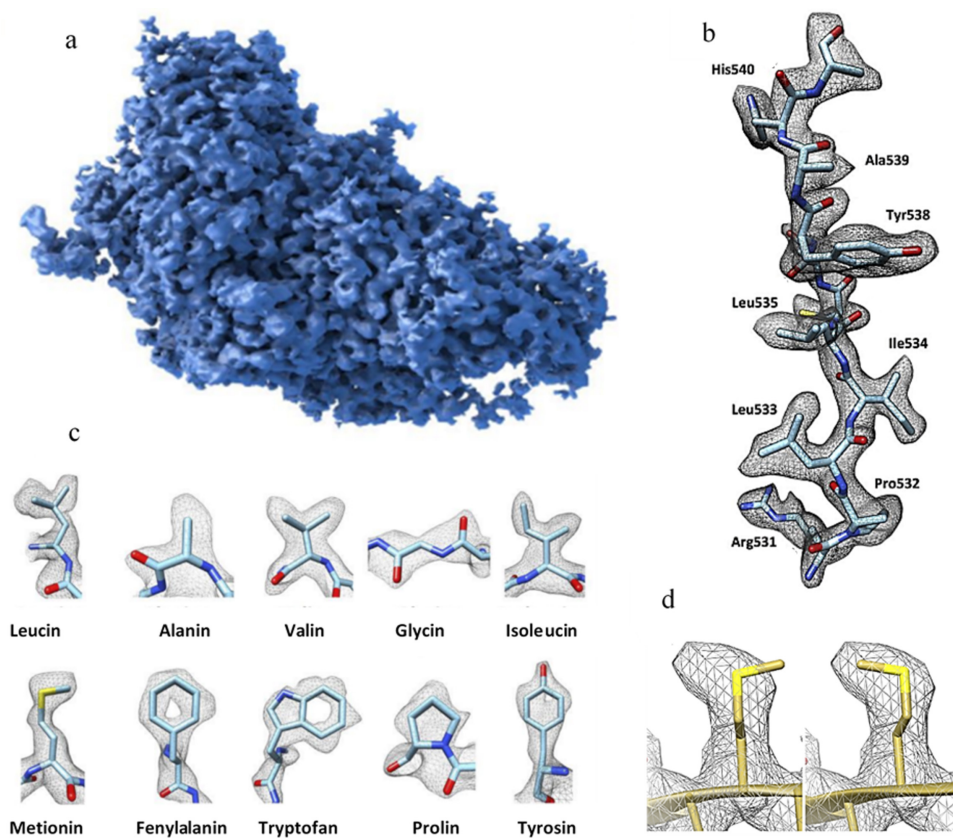
Zavedením DED byl vyřešen klíčový problém kryo-EM, jímž je získání kvalitních snímků v digitální formě. Kromě klíčové úlohy DED detektorů lze dále vylepšit kvalitu signálu ještě před jeho záznamem. Pro tento účel jsou v poslední době intenzivně využívány tři technologické doplňky: energetický filtr, korektor sférické aberace a Voltova fázová destička. Jak víme, kontrast výsledného obrazu negativně ovlivňují nepružně rozptýlené elektrony. Ty lze eliminovat pomocí energetického filtru, tedy zařízení, které nechá projít pouze elektrony s určitou energií (= rychlostí). Protože nepružně rozptýlené elektrony mají jinou rychlost, jsou tímto filtrem zachyceny. Dlouhou dobu byly energetické filtry založené na elektrostatickém hranolu pro kryo-EM relativně málo efektivní. Jejich poslední generace však již vykazuje výkonnost, která kvalitu snímků významně zlepšuje. Zvláštní kapitolou je korektor sférické aberace, který umožňuje konstrukci asférických systémů. Scherzer ukázal [20], že kombinace běžných rotačně symetrických elektromagnetických čoček může mít pouze konvexní efekt s kladným



Obr. 8. Porovnání kontrastu vzorku (20S proteazom) s malým podostřením bez použití fázové destičky (vlevo) a s přesným zaostřením při použití fázové destičky (vpravo). Měřítko 50 nm. Převzato z [7].

koeficientem sférické aberace. Naproti tomu multipólové čočky mohou fungovat jako čočky konkávní s negativním koeficientem sférické aberace. Vhodnou kombinací konvexních a konkávních čoček pak lze vytvořit solidně korigovaný zobrazovací systém bez sférické aberace umožňující dosáhnout vyššího rozlišení. Pomocí skenovacího transmisního mikroskopu s asférickou korekcí bylo na krystalu germania dosaženo rozlišení vyšší než $0,5 \text{ \AA}$ (50 pm) [10].

Poslední podstatné přístrojové vylepšení rozšiřující možnosti aplikací kryo-EM ve strukturální biologii představuje Voltova fázová destička [8]. Jedním z kritických parametrů 3D rekonstrukcí byla po dlouhou dobu velikost studovaných částic. Ještě před několika lety byla za nejmenší možnou považována hmotnost 250 kDa. Potíže s rutinní vysokorozoluční rekonstrukcí objektů menších molekulových hmotností jsou převážně způsobeny malou úrovní signálu nízkých prostorových frekvencí při malých hodnotách podostření (nezbytných pro zajištění přítomnosti vysokých prostorových frekvencí). Kvůli tomu lze malé komplexy velmi obtížně (eventuálně vůbec ne) na snímcích detekovat. Zavedení DED kamer tuto hranici snížilo pod 200 kDa, ale pro malé částice (menší než 100 kDa) stále neexistovalo řešení. Tato situace se změnila použitím fázové destičky Voltova typu (cca 10 nm silný film z amorfního uhlíku zahřátý na teplotu kolem 250°C nacházející se v zadní ohniskové rovině objektivu), která vnáší mezi vlny rozptýlených a nerozptýlených elektronů fázový rozdíl rovnající se $\pi/2$. V obrazové rovině pak dochází k jejich interferenci, která až dvojnásobně zvyšuje poměr signál/šum pro nízké prostorové frekvence při zachování frekvencí vysokých. Zvýraznění nízkých prostorových frekvencí významně zlepšuje detekovatelnost a identifikaci projekcí částic na snímku a jejich následnou přesnější analýzu (2D klasifikaci), přičemž zůstává zachována vysokorozoluční informace spojená s vysokými prostorovými frekvencemi (obr. 8). Nedávno byla publikována práce ukazující 3D rekonstrukci he-

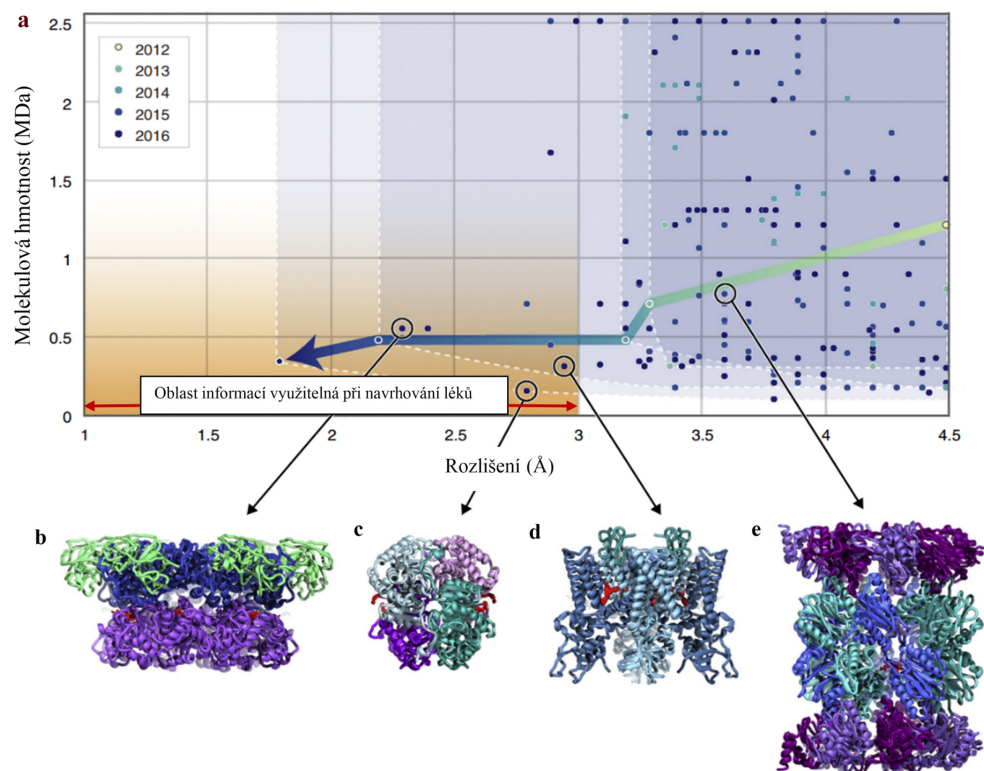


Obr. 9. (a) Struktura β -galaktosidázy-PETG komplexu s rozlišením 2,2 Å, (b) detail její sekvence residuů 531–540. Převzato z [3]. (c) Při tomto rozlišení již lze jednoznačně identifikovat jednotlivé typy aminokyselin i jejich orientaci. (d) Detail proložení chemické struktury metioninu do elektronové mapy a jednoznačné určení jeho rotamerické konformace [6].

moglobinu (65 kDa) s rozlišením 3,2 Å [14]. Díky tomuto technologickému vylepšení tak kryo-EM pokryla poslední, dosud chybějící část spektra velikosti komplexů, které je schopná zpracovávat s rozlišením srovnatelným s rentgenovou difrakcí. V současné době je možné studovat objekty od několika desítek kDa až po desítky MDa s atomárním nebo téměř atomárním rozlišením, a to bez nutnosti přípravy jejich krystalů. Nejvyšší doposud publikované dosažené rozlišení pro biologický komplex, konkrétně enzym glutamát dehydrogenázu, je 1,8 Å [18].

Závěr

Současný stav kryoelektronové mikroskopie je výsledkem velmi šťastného souběhu vývoje jednotlivých nezbytných komponent. Poslední generace mikroskopů představuje technologicky velice vespělý hardware po mechanické a elektronické stránce a kvalita současných špičkových detektorů je vynikající. Vývoj ostatních doplňkových zaří-



Obr. 10. Pokroky v rozlišení kryoelektronové mikroskopie: (a) Graf ukazující vstupy vložené do EM databanky od roku 2012 s rozlišením lepším než 4,5 Å pro proteinové komplexy menší než 2,5 MDa. Čtyři vybrané struktury (zakroužkované) s vysokým rozlišením: (b) p97 (druh ATP-ázy) (EMD-3295, PDB-5ftj) [2]; (c) laktát dehydrogenáza (EMD-8191, PDB-5k0z) [18]; (d) TRPV1 (druh iontového kanálu) (EMD-8117, PDB-5irx) [13]; (e) 20S proteasome z *Plasmodium falciparum* (zimnička tropická — parazit způsobující tropickou malárii) (EMD-3231, PDB-5fmg) [16]. Převzato z [21] (courtesy of Sriram Subramaniam, NIH, Bethesda, MD).

zení (fázová destička, energetický filtr, korektor sférické aberace) posunul rozlišovací schopnost a možnosti použití elektronového mikroskopu na úroveň, kterou si ještě relativně nedávno dokázal málokdo představit. Vývoj softwarových komponent pro analýzu a zpracování dat pro rekonstrukci také dosáhl vysoké úrovně spolehlivosti, efektivity a automatizace a ve spojení s pokroky výkonnosti výpočetní techniky už představuje relativně rychlý proces. Nová komerčně dostupná zařízení pro vitrifikaci vzorku umožňují přesnou kontrolu všech parametrů a tím reprodukovatelnou kvalitu vzorku. Automatizace procesu akvizice dat nesmírně zefektivnila celý proces, takže dnes je možné bez lidského přispění získat stovky tisíc projekcí částic za 24 hodin.

Souběh všech těchto faktorů nyní dělá z kryoelektronové mikroskopie nejsilnější techniku pro vysokorezoluční strukturální studie v biologii. Kromě použití v základním výzkumu se dostala do popředí zájmu i ve farmaceutickém průmyslu. Při dosažení

rozlišení lepším než 3 Å je strukturální informace natolik detailní, že ji lze použít při navrhování léčiv, neboť při takovém rozlišení je možné rozlišit rotamerické konformace postranních řetězců aminokyselin i detekovat kavity u aromatických kruhů (obr. 9). Navíc je kryoelektronová mikroskopie kombinovaná s SPA v současné době velmi výkonná a doba pro získání 3D struktury s vysokým rozlišením se pohybuje typicky v řádu několika dnů až týdnů (v závislosti na výpočetních kapacitách, charakteristikách vzorku a počtu zpracovávaných projekcí). Za posledních pět let posunula své limity dvojnásobně (obr. 10) a lze předpokládat, že v příštích letech bude pokrok pokračovat podobným tempem. Není náhodou, že velká centra pro strukturální rentgenovou difrakci (synchrotrony) po celém světě se urychleně vybavují špičkovými elektronovými mikroskopy, protože kryoelektronová mikroskopie nabízí něco, co krystalografie nebude nikdy schopná strukturální biologii nabídnout: atomární strukturu nativního vzorku ve fyziologických podmínkách.

Poděkování. Autor děkuje prof. J. Pláškoví (MFF UK) a Dr. L. Bednárové (ÚOCHB AV ČR) za pečlivé přečtení rukopisu. Profesoru Pláškoví náleží velké poděkování za jeho cenné připomínky a rady k formě a obsahu rukopisu, které výrazně přispěly k jeho konečné podobě.

Použité zkratky:

Å — angström = 0,1 nm = 10^{-10} m; jednotka vzdálenosti běžně používaná ve strukturální biologii

CTF — funkce přenosu kontrastu (Contrast Transfer Function)

Da — dalton, jednotka hmotnosti používaná v biochemii a biologii pro proteinové komplexy, činí 1/12 klidové hmotnosti atomu uhlíku $^{12}_6\text{C}$

DED — přímý detektor elektronů (Direct Electron Detector)

EM — elektronový mikroskop, elektronová mikroskopie

NMR — nukleární magnetické rezonance

SEM — rastrovací elektronový mikroskop

SPA — analýza izolovaných částic (Single Particle Analysis)

TEM — transmisní elektronový mikroskop

L i t e r a t u r a

- [1] ADRIAN, M., DUBOCHET, J., LEPAULT, J., MCDOWALL, A.W.: *Cryo-electron microscopy of viruses*. *Nature* 308 (1984), 32–36.
- [2] BANERJEE, S., BARTESAGHI, A., MERK, A., RAO, P., BULFER, S.L., YAN, Y., GREEN, N., MROCKOWSKI, B., NEITZ, R.J., WIPF, P., FALCONIERI, V., DESHAIES, R.J., MILNE, J.L., HURYN, D., ARKIN, M., SUBRAMANIAM, S.: *2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition*. *Science* 351 (2016), 871–875.
- [3] BARTESAGHI, A., MERK, A., BANERJEE, S., MATTHIES, D., WU, X., MILNE, J.L., SUBRAMANIAM, S.: *2.2 Å resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor*. *Science* 348 (2015), 1147–1151.

- [4] BRÜGGELLER, P., MAYER, E.: *Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions*. *Nature* 288 (1980), 569–571.
- [5] BURTON, E. F., OLIVIER, W. F.: *The crystal structure of ice at low temperature*. *Proc. R. Soc. Lond. A* 153 (1935), 166–172.
- [6] CAMPBELL, M. G., VEESLER, D., CHENG, A., POTTER, C. S., CARRAGHER, B.: *2.8 Å resolution reconstruction of the Thermoplasma acidophilum 20S proteasome using cryo-electron microscopy*. *Elife* 4 (2015) [online], article no. e06380, DOI: 10.7554/eLife.06380.
- [7] DANEV, R., BAUMEISTER, W.: *Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate*. *Elife* 5 (2016) [online], article no. e13046, DOI: 10.7554/eLife.13046.
- [8] DANEV, R., BUIJSSE, B., KHOSHOUEI, M., PLITZKO, J. M., BAUMEISTER, W.: *Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014), 15635–15640.
- [9] DUBOCHET, J., MCDOWALL, A. W.: *Vitrification of pure water for electron microscopy*. *J. Microsc.* 124 (1981), 3–4.
- [10] ERNI, R., ROSSELL, M. D., KISIELOWSKI, C., DAHMEN, U.: *Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe*. *Phys. Rev. Lett.* 102 (2009) [online], 096101.
- [11] FISCHER, N., KONEVEGA, A. L., WINTERMEYER, W., RODNINA, M. V., STARK, H.: *Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy*. *Nature* 466 (2010), 329–333.
- [12] FUKAMI, A., ADACHI, K.: *A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application*. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 14 (1965), 112–118.
- [13] GAO, Y., CAO, E., JULIUS, D., CHENG, Y.: *TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action*. *Nature* 534 (2016), 347–351.
- [14] KHOSHOUEI, M., RADJAINIA, M., BAUMEISTER, W., DANEV, R.: *Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate*. *Nat. Commun.* 8 (2017) [online], 16099.
- [15] KRYNICKY, I., GREEN, C. D., SAWYER, D. W.: *Pressure and temperature dependence of self-diffusion in water*. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 66 (1978), 199–208.
- [16] LI, H., O'DONOGHUE, A. J., VAN DER LINDEN, W. A., XIE, S. C., YOO, E., FOE, I. T., TILLEY, L., CRAIK, C. S., DA FONSECA, P. C., BOGYO, M.: *Structure- and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors*. *Nature* 530 (2016), 233–236.
- [17] MAYER, E.: *Vitrification of pure liquid water*. *J. Microsc.* 140 (1985), 3–15.
- [18] MERK, A., BARTESAGHI, A., BANERJEE, S., FALCONIERI, V., RAO, P., DAVIS, M. I., PRAGANI, R., BOXER, M. B., EARL, L. A., MILNE, J. L. S., SUBRAMANIAM, S.: *Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery*. *Cell* 165 (2016), 1698–1707.
- [19] PENCZEK, P. A., FRANK, J., SPAHN, C. M.: *A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation*. *J. Struct. Biol.* 154 (2006), 184–194.
- [20] SCHERZER, O.: *Sphärische und chromatische Korrektur von Elektronenlinsen*. *Optik* 2 (1947), 114–132.
- [21] SUBRAMANIAM, S., EARL, L. A., FALCONIERI, V., MILNE, J. L., EGELMAN, E. H.: *Resolution advances in cryo-EM enable application to drug discovery*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 41 (2016), 194–202.
- [22] YANNAS, I.: *Vitrification temperature of water*. *Science* 160 (1968), 298–299.