

Krioelektronska mikroskopija in sorodne metode presevne elektronske mikroskopije

Samo Hudoklin

Letošnja Nobelova nagrada za kemijo je bila podeljena trem znanstvenikom, ki so pomembno prispevali k razvoju krioelektronske mikroskopije, metode, s katero lahko opazujemo biološke molekule z atomsko ločljivostjo. Poleg krioelektronske mikroskopije, kjer vsi postopki, od izolacije do opazovanja vzorcev, potekajo pri kriogenih temperaturah, poznamo tudi vrsto drugih kriometod, ki omogočajo preučevanje strukture in delovanja celic na ultrastrukturni ravni. Nekatere izmed njih uporabljamo tudi pri nas.

Problem priprave bioloških vzorcev za elektronsko mikroskopijo

Razumevanje normalnih in patoloških procesov temelji na poznavanju strukture in funkcije bioloških makromolekul, ki gradijo in uravnavajo kompleksen sistem odnosov od molekul, celičnih organelov in celic do tkiv in organizmov. Pomembno orodje celičnih biologov za preučevanje teh odnosov so elektronski mikroskopi, ki s pomočjo pospešenih elektronov omogočajo preučevanje površine vzorcev (vrstični elektronski mikroskopi - SEM) ali njihovo notranjo zgradbo na prerezih (presevni elektronski mikroskopi - TEM). Prvi presevni elektronski mikroskop je sestavil Ernst Ruska leta 1933 in z njim presešel ločljivost 200 nanometrov, ki velja za največjo ločljivost v svetlobni mikroskopiji. Sodobni presevni elektronski mikroskopi dosegajo ločljivost nekaj stotink nanometra ter omogočajo opazovanje posameznih atomov. Kljub izboljšani ločljivosti pa se je elektronska mikroskopija na področju ved o življenju začela uveljavljati šele v petdesetih letih dvajsetega stoletja. Takrat so raziskovalci uspeli razviti postopke pri-

prave bioloških vzorcev za opazovanje v elektronskih mikroskopih. Razmere, ki vladajo v elektronskih mikroskopih, namreč niso združljivi z živimi celicami (na primer visok vakuum, izpostavljenost destruktivnemu curku elektronov).

Klasična, to je na kemikalijah temelječa priprava vzorcev za presevni elektronski mikroskop vključuje fiksacijo, dehidracijo, vklop, rezanje in kontrastiranje, ki zagotovijo obstojnost, debelino in kontrastnost vzorca (tabela 1). Ker vsak korak priprave potencialno spreminja vzorec (uvaja artefakte), je ključno, da so vsi koraki optimizirani in potekajo na način, ki ohranja stanje vzorca čim bližje stanju v živih celicah (*in vivo*). Prvi in ključni korak priprave vzorca je fiksacija. Fiksacija preprečuje morfološke spremembe vzorca, ki nastanejo zaradi odmiranja celic, in poškodbe, ki bi nastale med vklopom in rezanjem tkiva. Klasični kemijski fiksativi se pri tem ne obnesejo najbolje, saj v celico prodirajo počasi (na primer glutaraldehid manj kot en milimeter na uro). To pa dopušča čas in razmere, da celične vsebine spremenijo mesto, se preoblikujejo ali kako drugače odstopajo od stanja *in vivo*. Hkrati s kemijskimi fiksativi in ostalimi kemikalijami (na primer alkoholi med dehidracijo in umetnimi smolami med vklopom) v celico uvajamo tuje molekule, ki negativno vplivajo na kasnejše analize vzorca (na primer ohranjenost antigenov za imunooznačevanje). Iz potrebe po izboljšanju postopkov priprave vzorcev za presevni elektronski mikroskop so se v osemdesetih letih dvajsetega stoletja razvile metode, ki vključujejo postopke pri nizkih temperaturah oziroma kriometode.

Korak	Namen koraka	Klasične metode	Kriometode
1. Fiksacija.	Ustaviti življenjske procese in ohraniti ultrastrukturo.	Kemijski fiksativi (formaldehid, glutaraldehid, osmijev tetroksid).	Kriofiksacija (zamrzovanje brez nastanka vodnih kristalov).
2. Vkllop.	Dati oporo za rezanje.	Umetne smole, plastike	Dodatni vkllop pri večini kriometod ni potreben (led daje oporo za rezanje).
3. Rezanje.	Zagotoviti debelino, skozi katero elektroni lahko presevajajo.	Pri sobni temperaturi.	Rezanje tanjših vzorcev ni potrebno, vzorce, debelejšje od 100 nanometrov, pa režemo pri temperaturi, nižji od temperature kristalizacije vode (pod -100 stopinj Celzija).
4. Kontrastiranje.	Povzročiti sipanje elektronov.	Dodajanje atomov težkih kovin (svinec, uran, osmij).	Ni nujno potrebno (uporaba zelo občutljivih kamer v elektronskem mikroskopu).

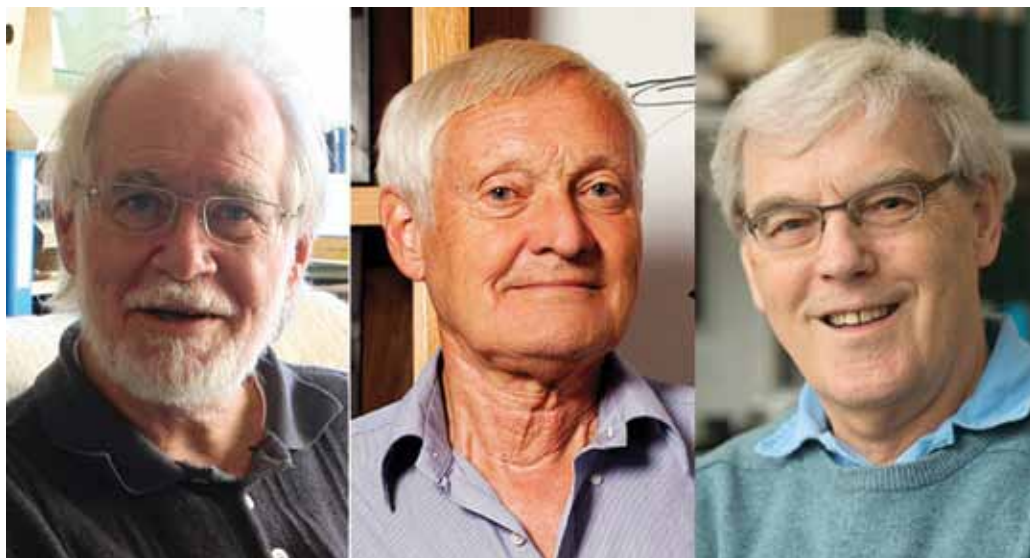
Tabela 1: Primerjava glavnih korakov priprave tkiva za presevani elektronski mikroskop.

Postavljanje temeljev krioelektronske mikroskopije

Krioelektronska mikroskopija obsega metode, pri katerih vsi koraki, od fiksacije do opazovanja, potekajo pri kriogenih temperaturah (pod -100 stopinj Celzija, največkrat okoli -196 stopinj Celzija). Za svoj prispevek k razvoju krioelektronske mikroskopije so Nobelovo nagrado za kemijo za leto 2017 prejeli Jacques Dubochet, Joachim Frank in Richard Henderson (slika 1).

Richard Henderson je sprva preučeval strukturo proteinov z uporabo rentgenske kristalografije, vendar se je kmalu srečal z veliko omejitvijo te metode. Za slikanje difrakcijskih vzorcev proteinov, ki so osnova za rekonstrukcijo struktur, je treba proteine izolirati iz njihovega naravnega celičnega okolja ter jih kristalizirati. Tako izolacija kot kristalizacija pa drastično spreminja-

ta opazovano makromolekulo. Ob tem pa mnogih bioloških makromolekul ni mogoče kristalizirati. Henderson se je zato preusmeril v elektronsko mikroskopijo. Ta sprva ni omogočala ločljivosti, ki jo je imela rentgenska kristalografija (približno 0,3 nanometra), saj mikroskopi niso bili prirejeni za delo z občutljivimi materiali, leče in detektorji so bili razmeroma slabi in metoda je bila zelo zamudna. Vendar Henderson ni obupal in leta 1975 je objavil prvi grobi model membranskega proteina bakteriorodopsina, narejenega s presevnim elektronskim mikroskopom, leta 1990 pa model iste makromolekule še pri atomski ločljivosti. S tem je postavil prvi temelj krioelektronske mikroskopije. Dokazal je namreč, da lahko elektronska mikroskopija dosega enake ločljivosti kot rentgenska kristalografija, ter menil, da lahko z uporabo (krioelektronske)



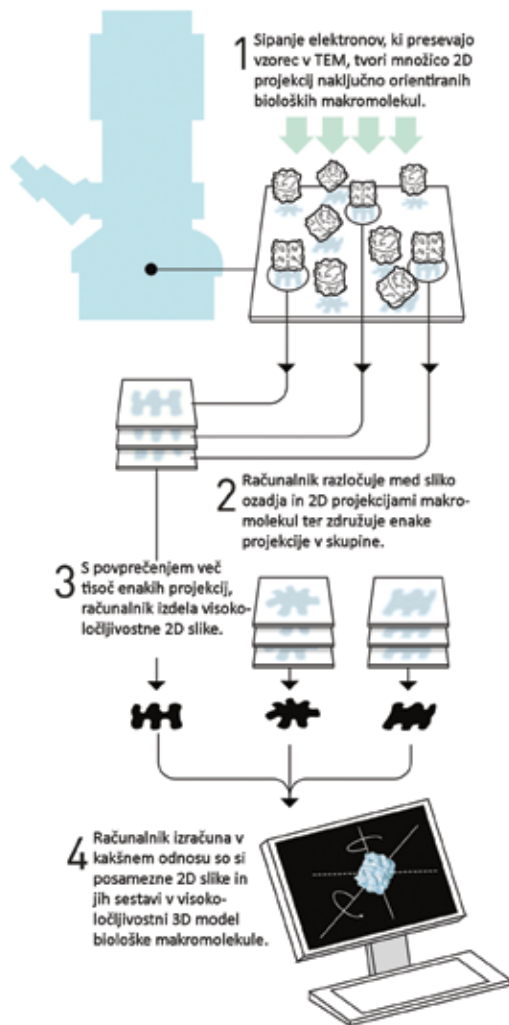
Slika 1: Nobelovi nagrajenci za kemijo leta 2017. Od leve proti desni Jacques Dubochet, Joachim Frank in Richard Henderson. Vir: <https://www.sciencenews.org/article/chemistry-nobel-prize-goes-3-d-snapshots-lifes-atomic-details>.

mikroskopije naredimo visoko ločljivostne tridimenzionalne modele proteinov. V naslednjih desetletjih se je Henderson veliko ukvarjal z izboljšavami elektronskih mikroskopov ter detektorjev v njih.

V istem času kot Henderson se je Joachim Frank ukvarjal z matematičnimi modeli za analizo slike. Želel je uporabiti minimalno informacijo, ki jo nosijo posamezne dvodimenzionalne projekcije naključno orientiranih makromolekul v elektronskem mikroskopu. Več tisoč projekcij pa bi sestavil v enoten visokoločljivostni tridimenzionalni model opazovane makromolekule (slika 2). Frank je pisal in izboljševal računalniške algoritme, s katerimi je združeval in povprečil šibke signale mnogih projekcij v povprečno dvodimenzionalno sliko, ki je tako postala ostrejša. Nato je posamezne dvodimenzionalne projekcije povezal v tridimenzionalni model. Sredi osemdesetih let je objavil model površine ribosoma, ki je temeljil na njegovih metodah analize slike, te pa so postale drugi ključni temelj pri razvoju krioelektronske mikroskopije.

Tretji temelj krioelektronske mikroskopije – pravzaprav njegov »krio« del - pa je dodal Jacques Dubochet, ki se je ukvarjal z zamrzovanjem vode (kriofiksacijo). Dubochet je ugotovil, da lahko biološke vzorce pred izsušitvijo in destruktivnim vplivom elektronov v vakuumu zaščitimo z ledom. V sedemdesetih letih je že bilo poznano, da led izpareva mnogo počasneje kot tekoča voda, vendar opazovanje zamrznjenih vzorcev v elektronskih mikroskopih ni bilo mogoče. Razlog je bil v razmeroma počasnem zamrzovanju vzorcev, pri čemer se molekule vode spreminjajo v ledene kristale. Kristali pa so toliko negativno vplivali na morfologijo vzorcev in sipanje elektronov, da so bile dobljene elektronskomikroskopske slike neuporabne. V začetku osemdesetih let je Dubochet našel ključ do rešitve problema kristalizacije vode. Ugotovil je, da lahko s pomočjo tekočega etana, ki je ohlajen s tekočim dušikom na -196 stopinj Celzija, zamrznemo vodo tako hitro, da se ledeni kristali ne tvorijo. Pravimo, da dobimo vitrificirano vodo oziroma amorfn led. Na takšni obliki ledu pa se

FRANKOVA METODA ANALIZE SLIKE

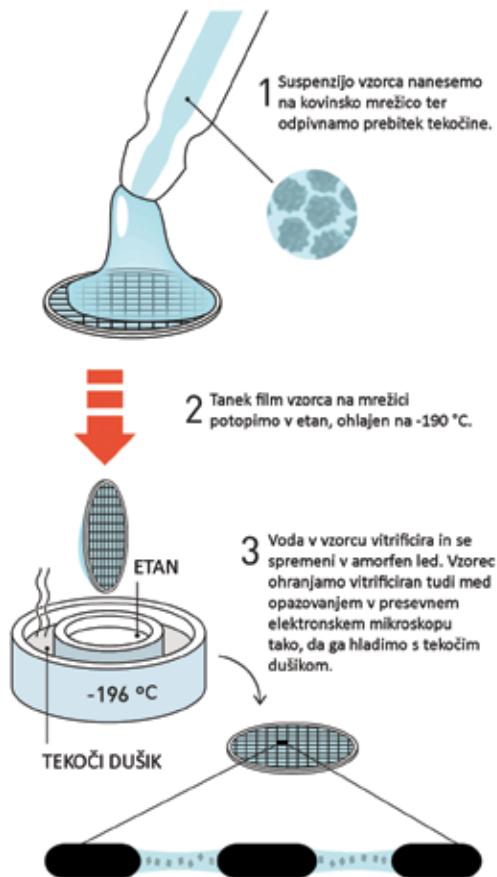


Priljevano po Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Slika 2: Koraki analize delcev, ki jih prispeval Joachim Frank. Vir: www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/advanced-chemistryprize2017.pdf.

elektroni sipajo enakomerno in zato dobimo homogeno ozadje vidnega polja v presevnem elektronskem mikroskopu. V nadaljevanju je Dubochet razvil - in na primeru virusov predstavil - protokol za vitrifikacijo v vodi

DUBUCHEJEVA METODA VITRIFIKACIJE



Priljevano po Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Slika 3: Metoda potopitvene krioifikacije bioloških vzorcev, ki jo je prispeval Jacques Dubochet.

Vir: www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/advanced-chemistryprize2017.pdf.

raztopljenih manjših bioloških vzorcev (tako imenovano potopitveno zamrzovanje), ki je v krioelektronski mikroskopiji uporaben še danes (slika 3).

Razmah krioelektronske mikroskopije

Temelji, ki so jih položili Dubochet, Frank in Henderson, ter tudi njihov prispevek k razvoju protokola krioifiksacije ter, stabilnejših elektronskih mikroskopov z boljšimi elektromagnetnimi lečami, zelo občutljivimi kamerami za detekcijo posameznih elektronov (angleško *direct detection camera*) in avtomatiziranimi programi za analizo slike so omogočili, da se je krioelektronska mikroskopija v zadnjih desetletjih močno razvila ter v letu 2013 prešla v dobo atomske ločljivosti.

Danes poznamo v krioelektronski mikroskopiji dve smeri. Prvo smer, tako imenovano metodo analize delcev (angleško *single particle analysis*), so utemeljili letošnji nobelovci in je namenjena analizi delcev (makromolekul, molekularnih kompleksov, virusov). Metoda analize delcev omogoča opazovanje in tridimenzionalno modeliranje širokega spektra makromolekul, pomembnih za celično biologijo, farmacijo in medicino (na primer proteinov, vključenih v cirkadiane ritme, proteinov, ki so ključni za odpornost proti antibiotikom, ali virusov Zika). Metoda je primerna le za vzorce, ki so dovolj tanki, da jih pred opazovanje s presevnim elektronskim mikroskopom ni treba rezati. Drugo smer krioelektronske mikro-

skopije predstavlja metoda krioelektronske mikroskopije vitrificiranih rezin (angleško *cryo-electron microscopy of vitreous sections – CEMOVIS*) in je namenjena analizi celic in tkiv oziroma bioloških vzorcev, debelejših od 100 nanometrov. Kot pri krioelektronski analizi delcev tudi tukaj poteka celotni postopek pri kriogenih temperaturah, a dodatno vključuje korak rezanja krioultratankih rezin. Slednje je zelo zahteven proces, saj je fizika rezanja vzorcev na debelino od 40 do 80 nanometrov pri temperaturi, nižji od -100 stopinj Celzija, zelo specifična.

Krioifiksacija je osnovni korak priprave vzorcev

Krioifiksacija (hitro zamrzovanje) je edini ustrezeni način fizikalne fiksacije bioloških vzorcev za elektronsko mikroskopijo. Je prvi in ključni korak pri metodah krioelektronske mikroskopije kot tudi pri njej sorodnih tako imenovanih kriometodah, kjer pri kriogenih temperaturah potekajo le nekateri koraki. V primerjavi s kemijsko fiksacijo poteče stabilizacija celičnih struktur hitreje, in sicer v nekaj milisekundah. Poleg tega v celice ne vstopajo tuje molekule (na primer fiksativi). Krioifiksacija zato velja za najboljši možni način za ohranitev ultrastrukture in kemijske sestave, kakršna je bila v fizi-



Slika 4: Napravi za udarno zamrzovanje (desno) in kriosubstitucijo (levo). Obe napravi sta blajeni s tekočim dušikom, ki se nabaja v jeklenkah (na sliki skrajno desno in pod napravo za kriosubstitucijo skrajno levo). Vir: Samo Hudoklin, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.

oloških razmerah v živih celicah. Slabosti kriofiksacije so občutljivost za napake zamrzovanja, zapletenost izvedbe in cena, saj so zanjo potrebne drage aparature. Osnove kriofiksacije v elektronski mikroskopiji je postavil Jacques Dubochet.

Glede na način zamrzovanja in debelino vitrifikacije ločimo tri načine kriofiksacije: potopitveno zamrzovanje, udarno zamrzovanje in visokotlačno zamrzovanje. Pri potopitvenem zamrzovanju (angleško *plunge freezing*) vzorec potopimo v kriogeni medij, na primer v propan ali etan, ki je hlajen s tekočim dušikom (vrelišče -196 stopinj Celzija). Vitrifikacija je pri tem postopku omejena na globino od enega do dva mikrometra, zato je potopitveno zamrzovanje primerno za kriofiksacijo zelo majhnih vzorcev, kot so makromolekule za analizo delcev. Pri udarnem zamrzovanju (angleško *impact freezing*, *slam freezing*, *metal-mirror fixation*) vzorec izstrelimo z določeno hitrostjo in pritiskom iz sobne temperature na kovinsko ploščico, ohlajeno na -196 stopinj Celzija, pri čimer pride do vitrifikacije vzorca od 10 do 15 mikrometrov (slika 4). Udarno zamrzovanje se uporablja za zamrzovanje struktur blizu površine tkiv (na primer površinske celice epitelijev), za zamrzovanje tkivnih rezin ali celičnih enoslojev. Najboljše rezultate zamrzovanja pa dosegamo s visokotlačnim zamrzovanjem (angleško *high pressure freezing*). Pri tem načinu je vzorec v trenutku zamrzovanja izpostavljen tlaku 2048 barov. Visok tlak zniža ledišče vode za 20 stopinj Celzija, tekoči dušik pa odvaja temperaturo s hitrostjo od -10^4 do -10^5 Kelvina na sekundo, kar prepreči nukleacijo ter rast ledenih kristalov (ti se tvorijo v kritičnem temperaturnem območju med $+4$ stopinjami Celzija in -80 stopinjami Celzija). Za visokotlačno fiksacijo se uporablja posebna naprava, ki je lahko opremljena z nosilci za zamrzovanje celičnih suspenzij, celičnih kultur ali koščkov tkiv. Naprava omogoča vitrifikacijo vzorcev do debeline okoli 300 mikrometrov. Pri krioelektronski mikroskopiji vzorce po

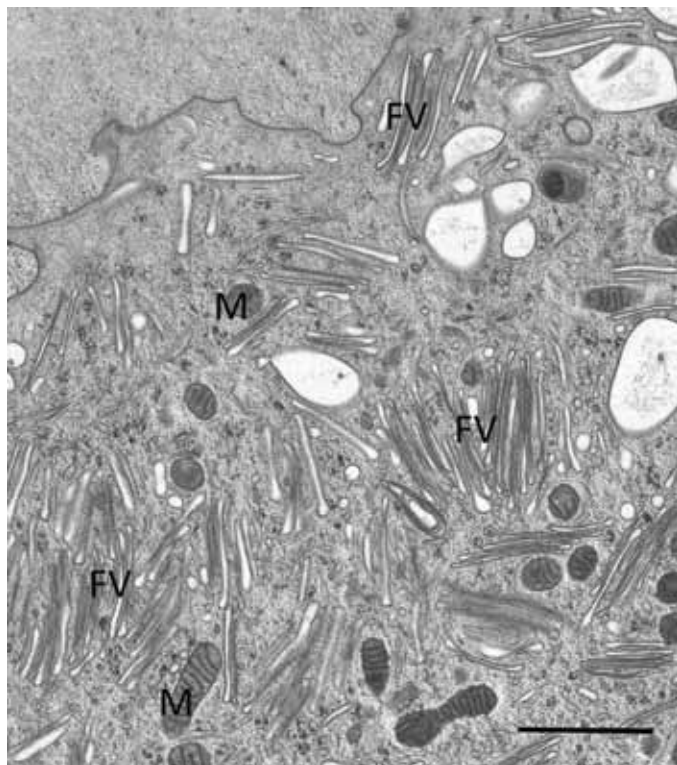
končani kriofiksaciji analiziramo pri kriogenih temperaturah v krioelektronskih mikroskopih. Pri ostalih kriometodah pa vzorec preučujemo s klasičnimi elektronskimi mikroskopi pri sobni temperaturi. V nadaljevanju bodo opisane kriometode v presewni elektronski mikroskopiji, ki jih izvajamo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani.

Kriosubstitucija omogoča prehod vzorca na sobno temperaturo

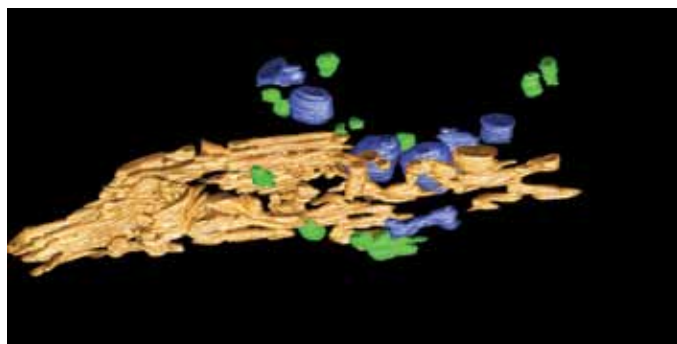
Kriosubstitucija je način dehidracije kriofiksiranih vzorcev, ki poteka v namenskih napravah z nadzorovano temperaturo (slika 4) in omogoča nadaljnjo analizo ultrastrukture ali označevanje makromolekul pri sobnih temperaturah. Med kriosubstitucijo se voda (led) v vzorcih zamenja z organskim topilom pri temperaturah, pri katerih so termična gibanja premajhna, da bi prišlo do kristalizacije vode in poškodb vzorca (to je okoli -90 stopinj Celzija). Kot organski topili se uporabljata aceton in etanol. Z izbiro fiksativov, ki jih lahko uvedemo med kriosubstitucijo, ter smol ali plastik, v katere vzorce vklopimo po končani kriosubstituciji kot oporo za rezanje, lahko vplivamo na končno ravnovesje med ohranitvijo antigenskih lastnosti proteinov in ultrastrukture vzorca. Če ohranimo več antigenskih lastnosti proteinov, lahko te v nadaljevanju označimo (imunooznačevanje). V kolikor pa ohranjamo zelo dobro ultrastrukturo, pa so vzorci primerni tudi za tridimenzionalne analize celičnih struktur.

Z elektronsko tomografijo izdelamo tridimenzionalne modele celičnih organelov

Elektronska tomografija omogoča izdelavo tridimenzionalnih modelov celičnih struktur ter posledično strukturno-prostorske analize odnosov med celičnimi organeli (slika 6). Metoda se izvaja v treh zaporednih korakih: zajemanje tomografije, rekonstrukcija in modeliranje. V prvem koraku posnamemo



Slika 5: Mikrografija dela površinske celice epitelija sečnega mehurja. V citoplazmi so vidni mitohondriji (M) in za te celice značilni fuziformni vezikli (FV). Vzorec je bil pripravljen z metodama krio-fiksacije in kriosubstitucije. Merilo: en mikrometer. Vir: Samo Hudoklin, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.



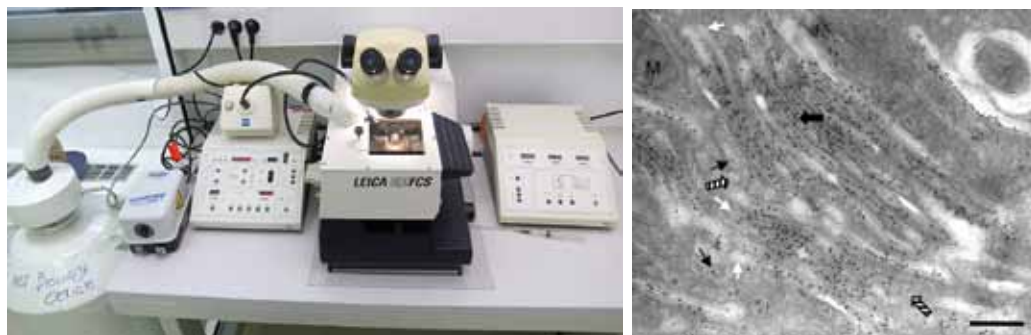
Slika 6: Tridimenzionalni model trans Golgijevega mrežja, izdelan s pomočjo elektronske tomografije. Rjavo obarvani predelki prikazujejo trans Golgijevo mrežje, okoli katerega so razporejeni modro in zeleno obarvani vezikli. Vir: Samo Hudoklin, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.

serijo projekcij celične strukture v prirejenem presevnem elektronskem mikroskopu. To dosežemo tako, da nosilec vzorca nagibamo od kota približno -70 stopinj do kota približno $+70$ stopinj v korakih po eno do dve stopinji. Tako dobimo serijo od 70 do 140 različnih dvodimenzionalnih projekcij celične strukture. Računalniški program nato iz serije dvodimenzionalnih projekcij rekonstruira tridimenzionalno obliko strukture ter jo predstavi kot serijo navideznih

serijskih rezin strukture. V tretjem koraku grafično prikažemo (modeliramo) celično strukturo, kar nam služi za razumevanje organizacije in delovanja celice.

Lokalizacija proteinov na ultrastrukturni ravni

Izdelava krioultratankih rezin je metoda, ki se uporablja za detekcijo proteinov v bioloških vzorcih (slika 7). Pri tej metodi, imenovani tudi metoda Tokuyashu, je edini



Slika 7: Krioultramikrotom in mikrografija krioultratanke rezine z imunooznačenimi membranskimi vezikli. Puščice prikazujejo različne membranske vezikle diferenciranih celic epitela sečnega mehurja, črne pike pa mesto proteinov, označenih s koloidnim zlatom. Merilo: 200 nanometrov. Vir: Samo Hudoklin, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.

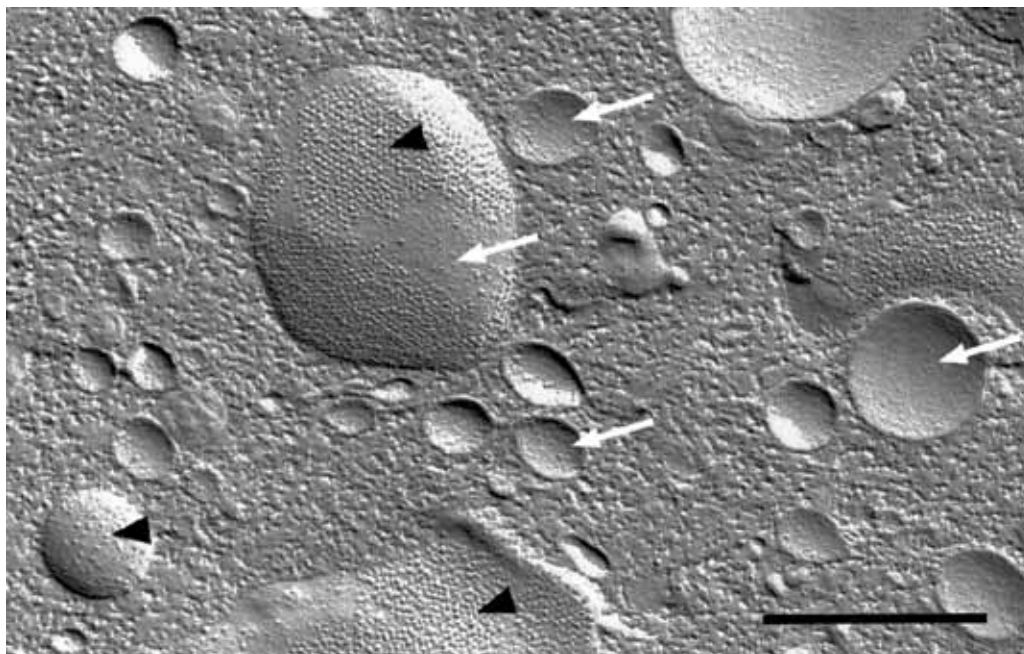
korak, ki poteka pri nizkih temperaturah, rezanje vzorca (od -120 do -140 stopinj Celzija). Tako se izognemo dehidraciji z alkoholi in vklapljanju vzorca v umetne smole. Oboje namreč spremeni proteine in s tem možnost za njihovo označevanje s protitelesi (tako imenovano imunooznačevanje). Koraki pri izdelavi krioultratankih rezin so sledeči: šibka kemijska fiksacija, zaščita vzorcev s snovmi, ki zmanjšujejo kristalizacijo vode med zamrzovanjem (to so krioprotektanti, na primer saharoza), zamrzovanje, rezanje, odtajanje rezin ter imunooznačevanje proteinov. Krioultratanke rezine režemo s pomočjo krioultramikrotoma (slika 7).

Zamrzovalno lomljenje izpostavi notranjost membrane

Zamrzovalno lomljenje je metoda, ki omogoča preučevanje notranje organizacije različnih membran, liposomov, micelov in različnih suspenzij lipidov ter koloidov. Pri tej metodi zamrznjene vzorce fizično lomimo v namenski napravi (slika 8) ter izkoriščamo verjetnost, da bo lom potekal po sredini lipidnih dvoslojev membran, kjer so privlačne sile najmanjše. Dobljene lomne površine nato pri nizkih temperaturah naprašimo s platino in ogljikom, s čimer dobimo zelo natančne odlitke (replike) izpostavljenih površin. V nadaljnjih korakih vzorec pre-

nesemo na sobno temperaturo, odstranimo organski material, replike površin pa opazujemo v presevnem elektronskem mikroskopu (slika 8). V modifikaciji standardnega postopka zamrzovalnega lomljenja se lahko repliko očisti le toliko, da ostanejo v repliko ujeti membranski proteini, ki se jih lahko





Slika 8: Naprava za zamrzovalno lomljenje (na prejšnji strani spodaj) in mikrografija replike membranskih veziklov, narejena z metodo zamrzovalnega lomljenja. Puščice prikazujejo izpostavljene membrane različno velikih veziklov, v katerih se vidi specifična organizacija proteinov (glava pušči). Merilo: 500 nanometrov. Vir: Samo Hudoklin in Rok Romih, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani.

v nadaljnjem postopku določi z imunooznačevanjem. To modifikacijo imenujemo imunooznačevanje replik ali tehnika FRIL (angleško *freeze-fracture replica immunogold labelling*).

Zaključek

Krioelektronska mikroskopija v zadnjih letih doživlja nesluten razcvet, čemur botrujeta razvoj metod in mikroskopov. Je edina metoda, ki omogoča analize bioloških vzorcev v razmerah, kakršne vladajo v živih celicah. V temeljnih znanostih, medicini in v farmaciji krioelektronska mikroskopija skupaj s sorodnimi metodami presevne elektronske

mikroskopije že prispeva k boljšemu razumevanju organizacije in delovanja celic ter razvoju novih pristopov k zdravljenju boleznih. Treba pa se je zavedati, da sta za njihovo izvajanje potrebna vrhunska oprema ter sprotno nadgrajevanje metod, ki omogočajo iskanje odgovorov na aktualna vprašanja v znanosti.