

К. Шварц¹, А. Даулетбекова², М. Сорокин³

¹ Центр по изучению тяжёлых ионов им. Гельмгольца, Дармштадт, Германия

² Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Криоэлектронная микроскопия открывает новые горизонты

Нобелевская премия по химии 2017 г. была присуждена швейцарскому биофизику Жаку Дюбоше (*Jacques Dubochet*, 1942 г.), немецко-американскому биофизику Иоахиму Франку (*Joachim Frank*, 1940 г.) и британскому молекулярному биологу Ричарду Хендерсону (*Richard Henderson*, 1945 г.) за разработку криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (Рис.1). Крио-ЭМ используется для определения структуры биомолекул, бактерий, вирусов и других с высоким разрешением. Нобелевский комитет отметил: «Это упрощает и улучшает визуализацию биомолекул. Этот метод открыл новую эру в биохимии».

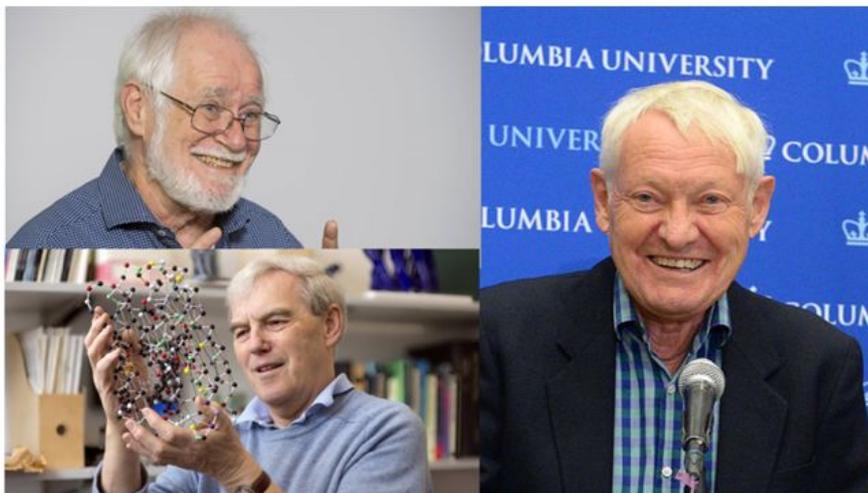


Рисунок 1 – Нобелевская премия по химии в 2017 году была присуждена швейцарскому биофизику Жаку Дюбоше (вверху слева), немецко-американскому биофизику Иоахиму Франку (справа) и британскому структурному и молекулярному биологу Ричарду Хендерсону (внизу слева) за разработку криоэлектронной микроскопии

Особенностью этой Нобелевской премии является сотрудничество трех ученых с начала 1970-х годов. Каждый из них внес особый вклад в развитие крио-ЭМ. Швейцарский биофизик Жак Дюбоше разработал основы криотехнологии [1], немецко-американский ученый Иоахим Франк разработал новые компьютерные программы для создания трехмерных изображений из двумерных наблюдений в электронном микроскопе [2] и британский биофизик Ричард Хендерсон, удалось получить трехмерную структуру биомолекул с атомным разрешением [3].

1. Изобретение криоэлектронной микроскопии

Электронный микроскоп (ЭМ) был построен в 1932 году немецким электро-инженером Эрнстом Руска (*Ernst Ruska*, 1906-1988, Нобелевская премия по физике 1986 года), что открыло новую эру для всего естествознания. Но прошло более двух десятилетий, прежде чем электронные микроскопы были изготовлены в промышленных масштабах. Разрешение ЭМ зависит от длины волны электронов и качества линз и теперь составляет 0,1 нм или 1 Å (1 Å = 0,1 нм = 10⁻¹⁰ м). Это на два порядка превышает теоретический предел для напряжения 100 кВ (длина волны электронов $\lambda_e = 0,004$ нм).

Долгое время считалось, что с помощью электронного микроскопа можно изучать только мертвое вещество, потому что электронный луч разрушает биологический материал и биологические объекты испаряются в вакууме. Только в 1970-х швейцарец Жак Дюбоше сумел разработать крио-ЭМ, что открыло путь для биологических объектов.

В 1970-е годы Дюбоше работал над проектом «Как использовать воду в электронной криомикроскопии». Проблема с водой в том, что при охлаждении в вакууме ЭМ она кристаллизуется в лед, что мешало наблюдениям биологических объектов.

Дюбоше совершил прорыв в крио-ЭМ благодаря более быстрому охлаждению. При попадании биологического объекта в жидкий азот в образце образовался кристаллический лед, который искажает структуру биологического образца при прохождении электронов. Чтобы обойти эту проблему, Дюбоше использовал охлажденный жидкий этанол (C_2H_5OH) (рис. 2), который имеет более высокую теплопроводность. Удивительно, но в результате этого процесса образовался стекловидный (аморфный) лед, который не искажал биологическую структуру при исследовании под микроскопом. Тогда можно было получать хорошие изображения в крио-ЭМ (рис. 3). Следует отметить, что большинство биологических объектов частично разрушается под действием электронного пучка (радиационные повреждения). Ричардсон отмечает, что для получения хороших изображений необходимо использовать минимально возможные интенсивности электронного пучка и короткие выдержки [3].

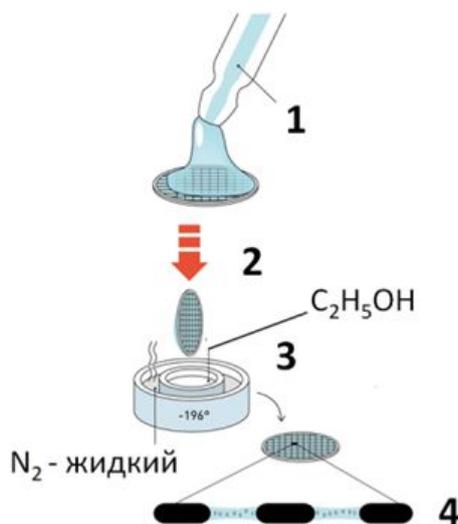


Рисунок 2 – Жак Дюбоше разработал криоэлектронную микроскопию в 1970-х годах: 1 - образец переносится на металлическую сетку, а излишки материала удаляются; 2 - образец образует тонкую пленку над отверстиями в сетке при погружении в охлажденный этан (температура плавления $T = 159\text{ K}$ (-114°C)); 3 - вода в образце остекловывается, затем образцохлаждается жидким азотом для наблюдения в электронном микроскопе; 4 - можно получить множество образцов, из которых создается 3D-модель (Рис. 4) [1]

Дюбоше был первым, кто создал лед, похожий на стекло. Преобладало мнение, что вода в стекловидном состоянии невозможна. Успех Дюбоше заключался в высокой скорости охлаждения: за несколько секунд до температуры жидкого азота (-190°C). Первая публикация образцов с аморфным льдом, которая привела к Нобелевской премии, была отклонена редакцией из-за аморфной воды!

Крио-ЭМ Dubochet открыла новую эру в биохимии и медицине. Еще в 1986 году он опубликовал трехмерную структуру вируса Семлики-Фиорест (*Semliki-Forest-Virus, SFV*), возбудителя воспаления головного мозга (энцефалита) у животных-гвоздей в Африке с

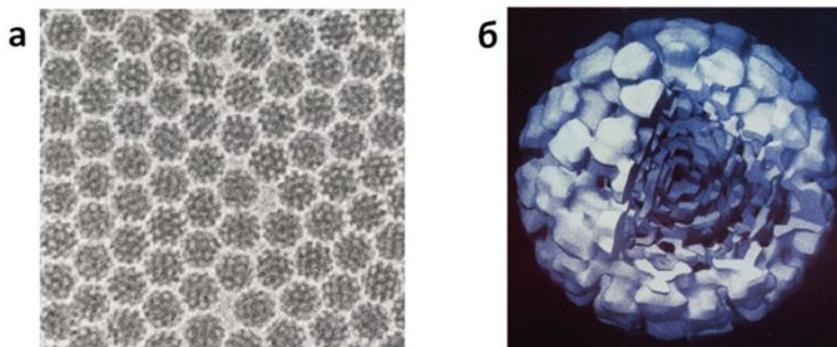


Рисунок 3 – Криоэлектронная микроскопия *Semliki-Forest-Virus* (SFV): а - первичное изображение в криоэлектронном микроскопе; б - 3D модель конструкции после компьютерной обработки [1]

разрешением 3,5 нм (рис. 3). Дальнейшее сотрудничество с Иоахимом Франком и Ричардом Хендерсоном привело к атомному разрешению 0,35 нм (3,5 Å) [1, 2, 3].

2. Компьютер создает трехмерное изображение биомолекул

После получения докторской степени в Техническом университете Мюнхена в 1970 году Иоахим Франк работал в различных университетах США, Германии и Англии. Он также имел ранние контакты с Ричардом Хендерсоном и Жаком Дюбоше. Научный интерес Франка в 1970-х и 1980-х годах был связан со структурами биомолекул и вирусов. Большинство ученых в этой области считали, что для точного определения структуры биологических объектов требуются образцы с высокой степенью упорядоченности (кристаллические). Кроме того, структуру биомолекул с такими атомами, как водород (H), углерод (C) и кислород (O) с низкими атомными номерами (Z от 1 до 8), было трудно изучить с помощью дифракции рентгеновских лучей. Чтобы избежать этих проблем, Франк придумал рассматривать биологические образцы в электронном микроскопе под разными углами. Для расчета трехмерной структуры объекта по его проекциям требуется большое количество 2D-изображений и необходимо знать угол каждой проекции.

Успех в разработке нового метода начался после того, как Иоахим Франк был назначен старшим научным сотрудником Департамента здравоохранения штата Нью-Йорк (*New York State Department of Health*) в 1975 году. В последующие десять лет Иоахим Франк разработал методы обработки изображений, которые позволили с помощью компьютера получить 3D-изображения с высоким разрешением от многих 2D-изображений. Из большого количества первичных изображений с разной ориентацией компьютер разделил изображения на похожие группы. После этого компьютер генерирует двухмерные (2D) изображения с высоким разрешением этих групп. Из 2D-изображений с разной ориентацией на компьютере создается трехмерное изображение (3D-структура) с высоким разрешением (Рис.4) [2]. Метод, разработанный Франком, открыл возможность создания трехмерной структуры аморфных биологических объектов, в отличие от дифракции рентгеновских лучей.

3. Мир биомолекул

Жак Дюбоше в своей Нобелевской лекции сказал: «Как и все живые организмы, мы - мешок с водой, состоящий из миллиардов клеток, каждая из которых также представляет собой небольшие мешочки с водой». Все живые существа состоят из биомолекул, в которых в основном представлены химические элементы водород (H), углерод (C), кислород (O), азот (N), фосфор (P) и сера (S). В различных биоструктурах живых существ содержится до 60 % воды, 18 % белков, 5 % жиров, 2 % углеводов (сахар) и 1,5 % нуклеиновых кислот (генетическая информация). В отличие от неорганического мира, биомолекулы имеют более сложную структуру с молекулярной массой от десятков тысяч до многих миллионов дальтон

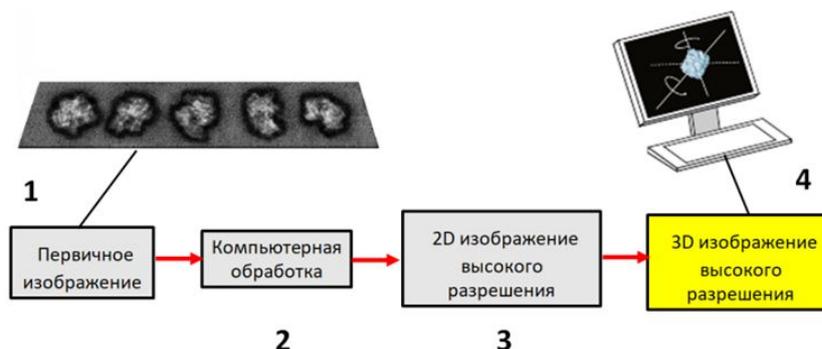


Рисунок 4 – Иоахим Франк разработал методы компьютерной обработки 2D изображений для получения трехмерных изображений высокого разрешения: 1 - первичные изображения случайно ориентированного белка; 2 - компьютер анализирует размытые изображения и объединяет их в похожие группы; 3 - из множества похожих нечетких изображений компьютер генерирует двухмерное (2D) изображение высокого разрешения; 4 - из различных 2D-изображений, полученных под разными углами, компьютер создает трехмерное 3D-изображение с высоким разрешением [2]

(дальтон - единица массы (u), равная 1/12 массы углерода и примерно равна массе водорода, $1u = 1.660 \times 10^{-27}$ кг). Размер биомолекул находится в нанометровом диапазоне, и наблюдение за этими молекулами, а также за вирусами патогенов возможно только с помощью электронного микроскопа (рис. 5). Ричард Хендерсон создал первую трехмерную структуру высокого разрешения из бактериородопсина в 1975 году [4].



Рисунок 5 – Примеры объектов в электронном микроскопе: а - галобактерии (длина (высота) 5 мкм); б - бактериородопсин в мембране бактерии *Halobacterium salinarum*, трехмерную структуру которой Ричард Хендерсон определил (рис. 6) [3]; в - вирус Corona-Virus 2 в электронном микроскопе (диаметр 50-140 нм)

Бактериородопсин (BR) - это мембранный белок с молекулярной массой 26 788 Дальтон, который был обнаружен в клеточной мембране *Halobacterium salinarum*. Белок BR состоит из 248 различных аминокислот, которые расположены в семи приблизительно параллельных α -спиралях (α -*Helix*), которые пересекают клеточную мембрану и образуют поры (рис. 6).

Аминокислоты содержатся во всех живых существах и являются строительными материалом белков. Биологам известно более 250 различных аминокислот, 23 из которых отвечают за построение белков. Структура аминокислот поясняется на рисунке 7. Аминокислоты в белках образуют спирали (α -*Helix*), которые определяют трехмерную структуру (рис. 8). Спиральная структура белков была открыта и теоретически описана в середине прошлого века известным американским химиком Линусом Полингом (*Linus Pauling*, 1901–1993, Нобелевская премия по химии 1954 г., Нобелевская премия мира 1962 г.).

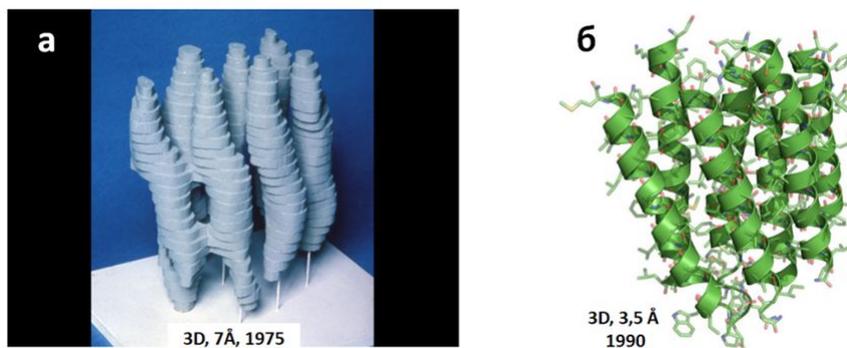


Рисунок 6 – а - первая 3D-модель бактериородопсина с разрешением 7 Å[4]; б - после пятнадцати лет исследований Хендерсон добился разрешения 3,5 Å; длина (высота) α -спирали (α -*Helix*) в бактериородопсине составляет 4.5 нм [5]

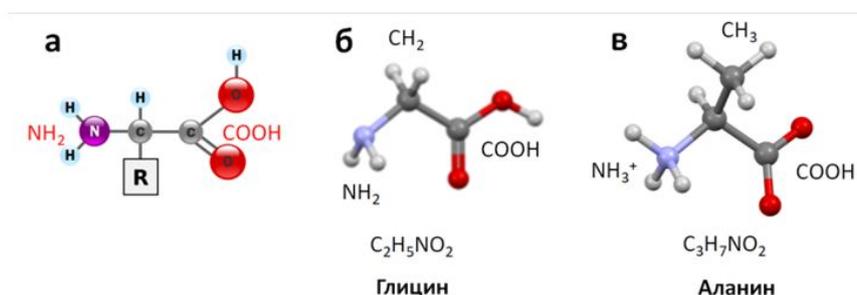
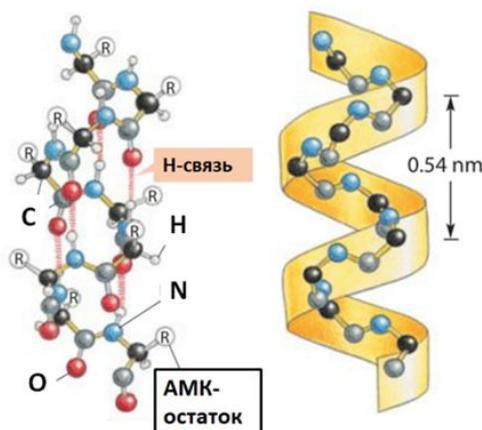


Рисунок 7 – а - Аминокислоты имеют идентичную структуру и состоят из аминогруппы (NH_2) и карбоксильной группы (COOH), которые связаны центральным атомом углерода, на котором также есть атом водорода (H) и остальная группа R; остаточная группа R определяет разновидность различных аминокислот. б - Простейшая аминокислота глицин, где остальная группа R состоит из атома водорода (H). в - Для аланина остаточная группа R более сложна



Структуры α -спирали (α -*Helix*) в BR составляют 75% от общей массы, а 25% липидов (жиров) составляют остальное. В поре между α -спиралями находится молекула сетчатки, (английский - *Retinal molecule*), связанная с белком, которая имеет фиолетовый цвет и определяет цвет BR. Молекула сетчатки поглощает зеленый свет (длина волны (λ) 500-650 нм, $\lambda_{max} = 568$ нм). Поглощение света стимулирует обратимую реакцию с переходом протона. В отличие от родопсина в сетчатке глаза, световая реакция в бактериородопсине (*Retinal molecule*) является источником энергии для всех процессов в *Halobacterium salinarum*.

Трехмерная структура ВР с разрешением 7 Å, впервые была определена Ричардом Хендерсоном в 1975 г. с помощью криоэлектронной микроскопии [4]. После пятнадцати лет работы с Жаком Дюбоше и Иоахимом Франком ему удалось достичь разрешения 3,5 Å, что сделало видимыми детали структуры α -спирали и радикалов (рис. 6) [5]. Сегодня структура ВР определяется с разрешением 1 Å.

Хендерсон был первым, кто создал трехмерную модель бактериородопсина, которая подчеркнула роль ВР как важной модели для биоэнергетики, а также сделала возможными технические приложения. В интервью Хендерсон упомянул: «Теперь электронная криомикроскопия стала доминирующим методом в структурной биологии. Если вы откроете журналы сейчас, то все еще предстоит большое число работ с ядерным магнитным резонансом и дифракцией рентгеновских лучей, но все сложные проблемы теперь решаются с помощью криоэлектронной микроскопии, потому что технические проблемы теперь в значительной степени преодолены» [6].

4. Путь к высокому разрешению

После получения докторской степени в Кембриджском университете Ричард Хендерсон работал в Лаборатории молекулярной биологии (*Laboratory of Molecular Biology, LMB*) Совета по медицинским исследованиям (*Medical Research Council, MRC*), где в течение трех лет изучал биологические объекты с помощью дифракции рентгеновских лучей. Для дифракционных экспериментов биологические объекты должны были находиться в кристаллическом состоянии, что не всегда было возможно. По этой причине Хендерсон попытался определить структуру в электронном микроскопе. То есть вместо использования дифракции рентгеновских лучей используются двумерные изображения электронов в разных направлениях. Так он и назвал свою Нобелевскую лекцию: «От дифракции электронов до криоэлектронной микроскопии одиночных частиц», которая хорошо описывает его научную деятельность.

В интервью Хендерсон упомянул: «Мой переход от рентгеновского кристаллографа к электронной микроскопии произошел в Йельском университете (*Yale University*) в 1970-х годах» [6]. Затем Хендерсон вернулся в лабораторию молекулярной биологии (*LMB*), где продолжил свою научную деятельность, с 1986 года возглавляя лабораторию.

Ричард Хендерсон принял участие во всех нововведениях в электронной микроскопии, начиная со стабильности и интенсивности электронного луча, качества электронных линз и чувствительности детекторов. Хендерсону удалось создать трехмерную структуру биомолекул к атомному разрешению из двумерных изображений в электронном микроскопе (рис. 6). О пути к высокому разрешению Хендерсон упоминает: «Как только все препятствия были преодолены, можно было начать получать точные изображения в электронном микроскопе. Важное значение имела компьютерная обработка изображений. Все это положило начало великой революции» [6].

5. Рождение молекулярной биологии

Нобелевская премия по криоэлектронной микроскопии знаменует собой конец долгого пути в исследованиях биомолекул, возглавляемых Дюбоше, Франком и Хендерсоном. Для общественности результат Хендерсона о трехмерной структуре бактериородопсина был четким доказательством возможностей крио-ЭМ. Хендерсон начал свою научную работу в Лаборатории молекулярной биологии (*LMB*) Медицинского исследовательского совета (*MRC*). Под руководством Макса Перуца (*Max Perutz*, 1914–2002, Нобелевская премия по химии 1962 года) *LMB* превратился в ведущий мировой исследовательский центр в области биологии и медицины, в котором приняли участие пятнадцать лауреатов Нобелевской премии. Перуц разработал новые методы дифракции рентгеновских лучей для биомолекул. Используя эти методы, его коллега сэр Джон Кендрю (*Max Perutz*, 1917–1997, лауреат Нобелевской премии по химии 1962) определил трехмерную структуру миоглобина, первую трехмерную структуру белка. Фредерик Сэнгер (*Frederick Sanger*, 1918–2013), один из ведущих ученых *LMB*, дважды

получал Нобелевскую премию по химии в 1958 году за свои работы по структуре белков и в 1980 году за структуру нуклеиновых кислот. Нобелевская премия Ричарда Хендерсона - пятая для сотрудников *LMB* в области структуры биомолекул.

Возможность наблюдать отдельные атомы в биомолекулах открывает новые горизонты для понимания биологических процессов. В отличие от полупроводников, где все процессы определяются электронами и их движением, процессы в биологических клетках намного сложнее. Биохимические реакции определяются переносом протонов (ионизированных атомов водорода) и электронов. Без понимания атомной структуры невозможно интерпретировать сложные процессы. Обладая таким подробным пониманием, можно лучше понять процессы в живых клетках. Фармакологии также необходимы структурные модели биологических объектов, чтобы разрабатывать активные ингредиенты для новых лекарств.

Список литературы

- 1 Dubochet J. // Early Cryo-Electron microscopy. Nobel lecture. - 2017. - 8.
- 2 Frank J. // Single-Particle Reconstruction of Biological Molecules – Story in a Sample. Nobel lecture. - 2017. - 8.
- 3 Henderson R. // From electron crystallography to single particle cryo-EM. Nobel lecture. - 2017. - 8.
- 4 Henderson R., Unwin P.N.T. // Three-dimensional model purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*. - 1975. - 257. - P. 28 – 32.
- 5 Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. // Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of Molecular Biology*. - 1990. - 213. - P. 899 – 929.
- 6 Henderson R., Alsari M. History of Cryo-EM. [Электронный ресурс] - URL: <https://youtu.be/ZnxCnUmtKGU> (дата обращения: 06.05. 2021)

Сведения об авторах:

Шварц К. - академик Латвийской академии наук, доктор физико-математических наук, профессор GSI (Центр по изучению тяжёлых ионов имени Гельмгольца), Дармштат, Германия.

Даулетбекова А.К. - кандидат физико-математических наук, профессор кафедры технической физики, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана, 13, Нур-Султан, Казахстан.

Сорокин М. - кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия.

Schwartz K. - Academician of the Latvian Academy of Sciences, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor of GSI (Helmholtz Centre for Heavy Ion Research), Darmstadt, Germany.

Dauletbekova A. - Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Professor of the Department Technical Physics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukhan str., 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Sorokin M. - Candidate of Physical and Mathematical Sciences. Senior Researcher at the National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow.