

Određivanje strukture bioloških makromolekula i supramolekulskih struktura

Živković, Lana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:252935>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Lana Živković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Određivanje strukture bioloških makromolekula i
supramakromolekulskih struktura

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

SADRŽAJ

SAŽETAK	x
1. UVOD	1
2. METODE STRUKTURNE ANALIZE	3
2.1. Kristalografija rendgenskim zrakama (rendgenska kristalografija).....	3
2.1.1. Kristalizacija	4
2.1.2 Sinkrotronsko zračenje.....	10
2.1.3 Dobivanje trodimenzionalne strukture	11
2.1.4 Problem faze.....	12
2.2 Krioelektronska mikroskopija	13
2.2.1 Priprema uzoraka za mikroskopiranje i smještanje uzorka	14
2.2.2 Napredak u instrumentaciji elektronskog mikroskopa	16
2.2.3 Napredak u tehnologiji slike	17
2.2.4 Računalni napredak.....	18
2.3. Rendgenski laseri sa slobodnim elektronima.....	21
2.3.1 Svojstva rendgenskih lasera sa slobodnim elektronima	21
2.3.2 Uporaba rendgenskih lasera sa slobodnim elektronima	22
3. LITERATURNI IZVORI.....	24

SAŽETAK

Glavna tema ovog rada bila je pobliže prikazati metode korištene za određivanje strukture bioloških makromolekula i supramakromolekulskih kompleksa. U radu su opisane metode rendgenske kristalografije, krioelektronska mikroskopija i XFEL metoda (rendgenski laseri sa slobodnim elektronima). Pobliže su objašnjeni principi rada samih metoda preko pripreme uzorka, snimanja pa do nastanka trodimenzionalne slike samih molekula, odnosno struktura. Za svaku od metoda navedene su prednosti i mane svake pojedine metode.

1. UVOD

Veliki napredak u primjeni fizikalnih principa i tehnika u proučavanju bioloških sustava uvelike je pomogao u razumijevanju molekularne osnove života. Od velikog značaja je i način na koji se proučavaju strukture i dinamička svojstva proteina i nukleinskih kiselina što često vodi ka dubljem razumijevanju prirode i mehanizama njihovog djelovanja. Povećan broj eksperimentalnih i teorijskih tehnika koje se mogu uspješno primijeniti na žive sustave uveli su nas u novo doba strukturalne biologije koja iz temelja mijenja informacije o očuvanju zdravlja, izvorima bolesti i razvoju efektivnih strategija za terapijske postupke.

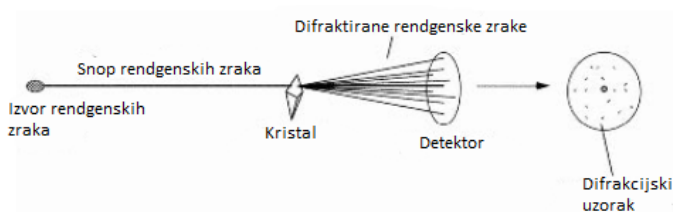
Proces spajanja ideja i metoda iz područja fizike sa područjem biologije i na taj način stvaranjem znanstvene discipline poznate kao biofizika očituje se u mnogim tehnikama kao što su, na primjer, elektronska mikroskopija, NMR spektroskopija, masena spektroskopija (MS), i niz drugih optičkih spektroskopija. Metodološki razvoj ovih tehnika kao i kristalografije Rendgenskim zrakama bio je značajan, a njihov utjecaj na strukturalnu biologiju revolucionaran. Tako, na primjer, krioelektronskom mikroskopijom sada možemo odrediti strukturu vrlo velikih molekula i kompleksa na atomskoj rezoluciji i to bez potrebe za kristalizacijom. Postignuće takve rezolucije se godinama smatralo nemogućim, ali kako to često biva u znanosti, kombinacija znanstvene intuicije i razvoj novih tehnologija dovode nas do velikih napredaka. NMR spektroskopija je omogućila određivanje makromolekulskih struktura u otopinama, u okruženju u kojem inače djeluju, a uporaba specijaliziranih tehnika u čvrstom stanju omogućila je proboj u njihovu strukturu i konformaciju dok se nalaze unutar nekog drugog medija, kao na primjer, membrana ili patološkog agregata. Masena spektroskopija je danas napredovala do te mjere da se strukturna svojstva velikih bioloških kompleksa mogu proučavati u njihovom funkcionalnom okruženju. Optičke tehnike, pogotovo one koje uključuju fluorescenciju, su također doživjele napredak koji im je omogućio da se koriste na razini jedne molekule i za generiranje prikaza puno veće rezolucije nego se prije smatrala mogućom. Pretpostavka da optičke metode ne mogu dati informacije o strukturnim karakteristikama manjim od duljine svjetlosti se pokazala krivom razvojem super-rezolucijskih tehnika. Nedugo nakon prvog određivanja struktura pomoću difrakcije rendgenskih zraka, utvrđeno je da će proteini sa visokom razinom sličnosti u sekvenci imati i sličnu strukturu. Prvi takav primjer molekularne homologije modeliranjem otkriven je generiranjem modela

alfa-laktalbumina iz lizosoma koji imaju u potpunosti različitu funkciju, ali su sekvence aminokiselina u njima vrlo slične. Usporedbom tog modela sa eksperimentalnom strukturom potvrđena je pozdanost ovakvog pristupa. Od tada se dogodio veliki porast u broju struktura pohranjenih u *The Protein Databank* i proteinskih sekvenci u bazi *UniProt* što je omogućilo bolje razumijevanje poveznice između sekvence aminokiselina i strukture samog proteina te modeliranje raznih do tad nepoznatih struktura i dizajniranje novih sekvenci aminokiselina koje se slažu u specifične strukture. Sva ova postignuća bila su moguća zbog napretka u instrumentaciji, od konstrukcije sve snažnijih izvora rendgenskih zraka do razvoja centara za sekvenciranje visokom propusnošću. Sukladno tome, ubrzani i kontinuirani rast kompjuterske snage su se pokazali kao bitan dio svih ovih razvoja, kao i primjena simulacijskih tehnika koje daju uvid u svojstva makromolekula koje su izazovne za definirati eksperimentalnim putem zbog mnogih aspekata kao što su dinamičko ponašanje i reakcijski mehanizmi.

2. METODE STRUKTURNE ANALIZE

2.1. Kristalografija rendgenskim zrakama (rendgenska kristalografija)

Jedna od vrlo važnih metoda proučavanja struktura bioloških makromolekula je kristalografija rendgenskim zrakama. To je metoda koja se bazira na difrakciji rendgenskih zraka na površini atoma u molekuli kristala proteina ili molekule DNA i trodimenzionalnom prostoru koji zauzimaju te molekule. Rendgenske zrake koristimo iz razloga što je raspon njihovih valnih duljina istog reda kao i duljine kemijskih veza pa je samim time vidljiv ekvivalent rezolucije udaljenosti između dva atoma (0,8-2,5 Å). Za detekciju difrakcije Rendgenskih zraka potrebno je da se ona odvija na velikom broju atoma. Da bi se taj uvjet ispunio difrakciju moramo vršiti na molekulama koje zauzimaju uređeni trodimenzionalni prostor, odnosno, imaju formu kristala. U kristalu puno ekvivalentnih atoma u različitim molekulama doprinose istom difrakcijskom uzorku. U slučaju bioloških makromolekula nije lako dobiti odgovarajuću kristalnu formu. Upravo je to jedan od većih limitirajućih faktora ove metode jer se određene biološke makromolekule ne mogu prevesti u kristalnu formu (na primjer, integralni membranski proteini u membrani stanice). Usprkos tome kristalografija rendgenskim zrakama, temeljena na difrakciji rendgenskih zraka prikazanih na slici 1, pokazala se često korištenom metodom za istraživanje bioloških makromolekula. Ovom metodom određene su trodimenzionalne strukture na tisuće raznih proteina i jedna je od najpopularnijih metoda određivanja trodimenzionalne strukture visoke rezolucije. Uz pomoć kristalografije rendgenskim zrakama se došlo do spoznaje da su enzimi po svojoj građi zapravo proteini, Watson-Crickovog modela DNA (difrakcija na vlaknima DNA), razumijevanja fenomena alosteričnosti i interakcija između DNA i proteina. Nadalje, zahvaljujući kristalografiji rendgenskim zrakama možemo povući direktnu vezu između eksperimentalno određene strukture neke molekule i njezine funkcije što je osnova moderne biokemije i molekularne biologije.¹



Slika 1. Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)

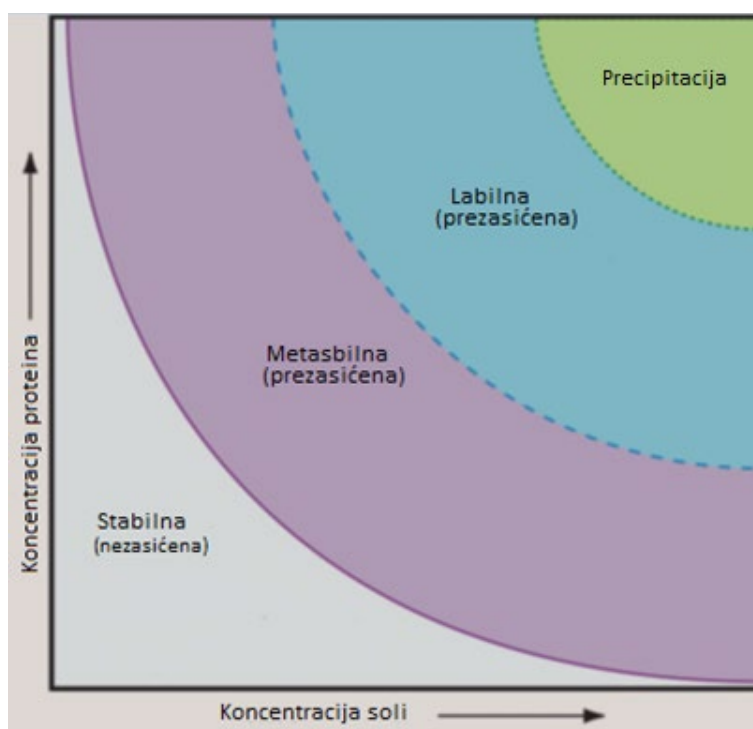
Kristal se može definirati kao uređena struktura u kojoj se određeni poredak molekula u trodimenzionalnom prostoru periodički ponavlja. Pojedine tvari prirodno tvore kristale (na primjer: natrijev klorid, grafit, dijamant, kvarc...). Ti kristali povezani su čvrstim ionskim interakcijama pa su samim time to iznimno stabilne strukture. Za razliku od njih kristali koje tvore biološke makromolekule kao što su proteini su puno nestabilnije strukture jer su vezani slabim vodikovim vezama ili van der Waalsovим interakcijama. Takve je kristale puno teže uzgojiti od prirodno nastajućih ionskih kristala.

2.1.1. Kristalizacija

Kristalizacija se postiže pri urednom slaganju molekula u kristale pri prelasku iz tekuće u čvrstu fazu. Tu kristalizacija dolazi u opreku sa pojavom taloženja (precipitacije) pri kojem se molekule nasumično skupljaju u amorfne i neuređene agregate. Za razliku od anorganskih tvari (NaCl , SiO_2 ...) koje kristale stvaraju spontano i vrlo lako, kristali bioloških makromolekula će se stvarati samo pri vrlo specifičnim uvjetima koje nije lako postići. Zbog toga je teško predvidjeti pri kojim će uvjetima doći do kristalizacije pa se ti uvjeti određuju empirijski provođenjem nizom eksperimenata sa različitim uvjetima kristalizacije te se kasnije analizira koji su uvjeti najpovoljniji za pojedini protein. Za kristalizaciju je vrlo bitno da postoji takozvani „čisti uzorak“. Tipičan način pripreme smjese za kristalizaciju je da se u koncentriranu smjesu proteina ili molekula DNA doda precipitanta malo ispod koncentracije koja bi izazvala precipitaciju (taloženje) uzorka. Kao precipitanti se najčešće koriste molekule male molekulske mase kao na primjer: polialkoholi (heksan-diol), soli (amonijev sulfat), polimeri velike mase (etilen-glikol) i organska otapala (metanol). Zbog prirode samih proteina i molekula DNA dvije

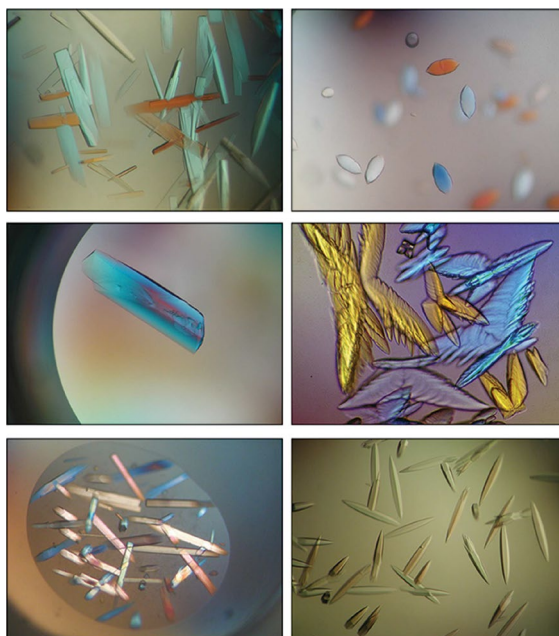
molekule istovrsnog proteina neće imati u potpunosti istu konformaciju te da bi pri kristalizaciji imali što sličnije molekule, za kristalizaciju priređujemo otopinu u kojoj dolazi do pojave kokristalizacije, odnosno, dodaje se ligand niske molekulske mase koji će se vezati za molekulu od interesa i na taj način postići minimalne konformacijske razlike u proteinima. Primjer kokristalizacije je dodatak inhibitora enzimima ili hormona promatranim hormonskim receptorima. Na samom početku postupka smjesa je, iako koncentrirana, nezasićena, kao što prikazuje fazni dijagram kristalizacije na slici 2. Tokom procesa kristalizacije postepenim povećanjem koncentracije proteina i/ili precipitanta se dolazi u točku zasićenja. U toj su točki tekuća i čvrsta faza u ravnoteži, a svako dodatno povećanje količine čvrstog proteina prati njegova disolucija pa u njoj ne može doći do stvaranja kristala. Nastajanje kristala ovisi o stvaranju stabilne jezgre. Ovaj proces teći će tako da se dvije molekule iz otopine spoje i tako tvore „podlogu“ za daljnji rast kristala sve do ponovnog uspostavljanja ravnoteže. Kristal će rasti dok god se ne ispuni maksimum veza koje se mogu uspostaviti između molekula (vodikove veze ili van der Waalove sile). Naravno puno je više slučajeva u kojima neće doći do kristalizacije jer entropija sustava teži povećanju, a uređeni kristalni sustav je upravo suprotno te je puno češća situacija da jezgra krene rasti i onda stane. Takvu jezgru nazivamo nestabilnom jezgrom. Molekule se također mogu slagati jedna na drugu nasumično i tako dovesti do taloženja (precipitacije). Iz svega ovoga proizlazi da bi se postigli uvjeti za nastajanje kristala proteina povoljnog za difrakciju potrebno je iscrpno ponavljanje stotina i tisuća različitih uvjeta kristalizacije. U stanju prezasićenosti sustav ima tendenciju povratka u ravnotežno stanje i pri tom povratku se mogu stvoriti kristali bioloških makromolekula. Prezasićeno stanje je najlakše postići na dva načina: isparavanjem otapala i promjenama temperature. Na slici 2 faznog dijagrama prikazana je podjela prezasićenog stanja na metastabilnu regiju i labilnu regiju. U metastabilnoj regiji se stabilne jezgre ne mogu stvoriti, ali ako već stvorena stabilna jezgra dođe u metastabilnu regiju može nastaviti rasti i stvarati kristal dok se u labilnoj regiji stabilne jezgre stvaraju i nastavljaju rasti. Ako se kristali počinju stvarati daleko od ravnotežne točke, odnosno daleko u labilnoj regiji, brzo se krenu stvarati stabilne jezgre, ali se njihov rast usporava približavanjem ravnotežnom stanju i kao rezultat se dobije veliki broj malih kristala nepogodnih za difrakciju („kiša mikrokristala“).

Suprotno tome, što je prezasićeni sustav bliže metastabilnoj regiji, nastati će manji broj stabilnih jezgara koje će polagano kristalizirati i dati manji broj kristala većih dimenzija. To je upravo željeno stanje iz kojeg će nastati kristali bioloških makromolekula povoljni za difrakciju rendgenskim zrakama prikazani na slici 3. Svaki protein i molekula DNA se ponaša drugačije u ovom faznom dijagramu te je zato vrlo teško točno odrediti uvjete potrebne za uspješno nastajanje kristala povoljnih za difrakciju. Uz to svaka varijabla koja bi utjecala na topljivost proteina u otapalu može značajno utjecati na određivanje povoljnih uvjeta, stoga je iznimno bitno eksperimente provoditi u strogo kontroliranim uvjetima pH, temperature i slično.²



Slika 2. Fazni dijagram kristalizacije bioloških makromolekula (preuzeto i prilagođeno iz ref.

3)

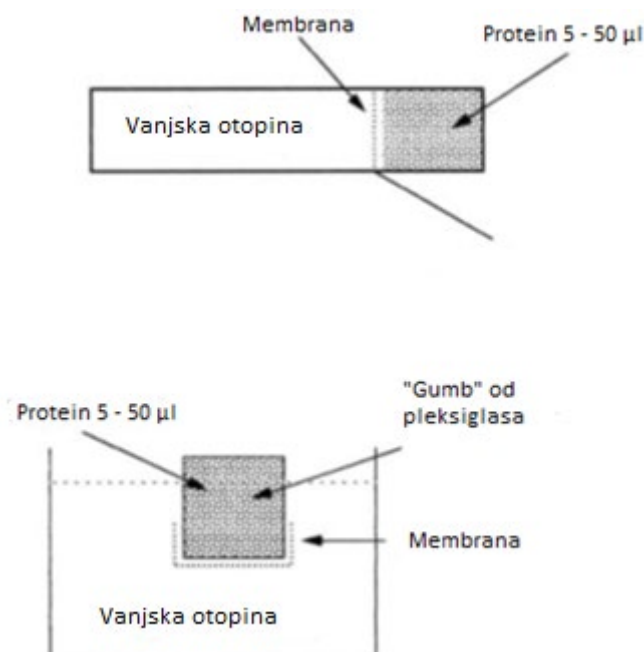


Slika 3. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskim zrakama (preuzeto iz ref. 4)

Sve metode kristalizacije za cilj imaju dovesti otopinu u prezasićeno stanje. To se postiže na tri načina: polaganim isparavanjem otapala, postepenim dosezanjem desolvatacije dodatkom polialkohola ili soli te promjenom topljivosti proteina manipulacijom vanjskih uvjeta (pH, temperatura). Zbog velikog broja mogućih uvjeta kristalizacije (pH, temperatura, koncentracija precipitanta, ionska jakost otopine...), a često ograničene količine uzorka proteina ili DNA nije moguće proći kroz sve varijacije uvjeta. Zato koristimo „uzorkovanje rijetkom matricom“. To je proces u kojem se uzima 25 do 50 različitih uvjeta baziranih na prethodno uspješnim kristalizacijama te danas dolaze komercijalno dostupni u obliku setova za kristalizaciju sa uputama za što uspješniji uzgoj velikih kristala.

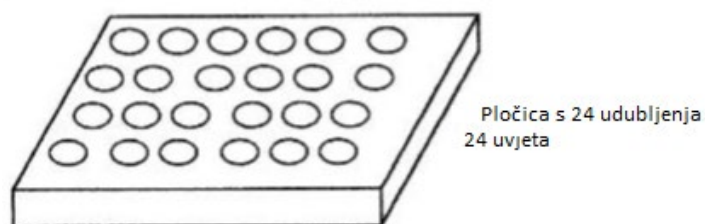
Mikrodijaliza je tip dijalize sa vrlo malim volumenima. Vršiti se na istom principu difuzije kroz polupropusnu membranu i to na način da se sa jedne strane membrane stavi otopina sa željenim uvjetima kristalizacije, a sa druge strane vrlo mali volumen otopine proteina. Eksperiment je prikazan na slici 4 uz upotrebu staklene kapilare ili posebno pripravljenog, komercijalno dostupnog, „gumba“ od pleksiglasa u koji se uvodi otopina proteina. Uspostavljanjem ravnoteže preko semipermeabilne membrane, otopina proteina će poprimiti karakteristike otopine sa druge strane. Više uvjeta kristalizacije postiže se

mijenjanjem karakteristika otopine sa željenim uvjetima koji uzrokuju promjenu otopine proteina sa druge strane membrane sve dok se ne uspostave uvjeti pogodni za kristalizaciju.

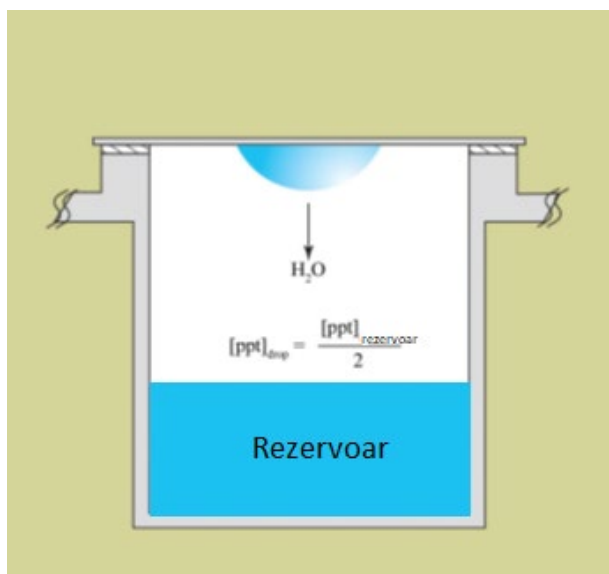


Slika 4. Prikaz kristalizacije mikrodijalizom (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)

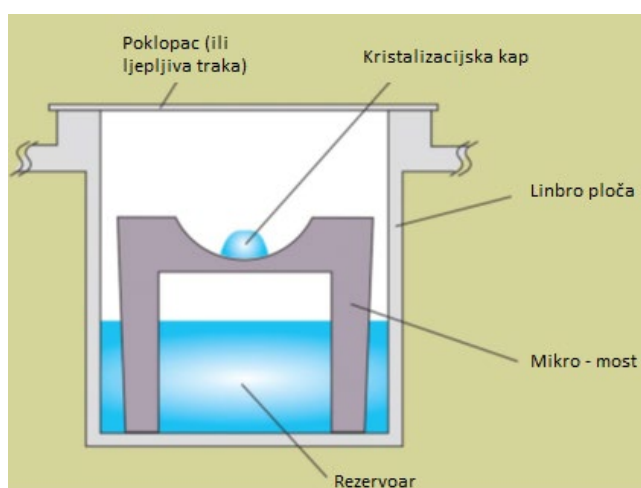
Druga metoda je difuzija para otapala. Ova metoda bazira se na polaganom uspostavljanju ravnoteže između male kapljice otopine proteina i puno većeg volumena kristalizacijske otopine. Postoje dvije varijacije ove metode: „viseća kap“ prikazana na slici 6 i „sjedeca kap“ prikazana na slici 7. Viseća kap odnosi se na iznimno mali volumen otopine proteina pomješanog sa kristalizacijskom otopinom u omjeru 1:1 (<10 µl) koji se u obliku kapljice nanosi na predmetno stakalce te okreće tako da „visi kao kap“ iznad kristalizacijske otopine puno većeg volumena. Dolazi do vrlo sporog uspostavljanja ravnoteže kroz fazu pare između kapljice sve dok otopina u kapljici ne poprimi karakteristike otopine ispod nje. Više različitih uvjeta postiže se koristeći pločice sa više udubljenja (jažica), što je prikazano na slici 5, u kojima se isprobavaju različiti uvjeti kristalizacije. Metoda sjedeće kapi bazira se na istom principu spore uspostave ravnoteže samo što kap „sjedi“ na postolju okružena sa svih strana parnom fazom.²



Slika 5. Pločica sa 24 udubljenja (jažica) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)



Slika 6. Prikaz metode viseće kapi (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4)



Slika 7. Prikaz metode sjedeće kapi (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4)

2.1.2 Sinkrotronsko zračenje

Sinkrotronsko zračenje je zračenje koje stvaraju elektroni kada emitiraju svoj višak zračenja u obliku snažnog snopa rendgenskih zraka tangencijalno na prsten za pohranu elektrona, odnosno prstenasti akcelerator čestica. To se događa jer se elektroni ubrzavaju u prstenu do brzina bliskih brzini svjetlosti, a zatim ih se brzo uspori prisiljavajući ih u zakrivljene putanje.

Snop rendgenskih zraka generiran iz izvora sinkrotrona ima niz karakteristika koje ga čine izuzetno korisnim u difrakcijskim eksperimentima. U usporedbi sa snopom rendgenskih zraka koje se mogu stvoriti iz laboratorijskih izvora, zraka iz sinkrotrona ima oko tisuću puta veću energiju što znači da su izmjerena mjesta difrakcije manja i intenzivnija, što pojačava razlučivost i preciznost difrakcijskog uzorka. Također znači da se skupovi podataka koji se sastoje od tisuća Bragg-ovih refleksija mogu prikupiti u nekoliko minuta, a ne sati koliko je potrebno za laboratorijske izvore. Sinkrotronski snop je izuzetno uzak i intenzivan te omogućava prikupljanje podataka iz mnogo manjih kristala nego što se mogu koristiti s instrumentom laboratorijske skale.²

2.1.3 Dobivanje trodimenzionalne strukture

Kako bi se utvrdila molekularna struktura potrebno je koristiti rendgenske zrake jer je valna duljina ovog zračenja sličnog reda veličine kao i atomi i duljine kovalentnih veza. Dobiveni uzorak difrakcije sadrži informacije koje se koriste za izračunavanje molekularne strukture. Međutim, difrakcijski uzorak je dvodimenzionalni niz točaka određenog položaja i intenziteta koji su računalno prikazani na slici 8. Za pretvorbu u trodimenzionalnu strukturu potrebno je prikupiti skup podataka o većem broju takvih difrakcijskih uzoraka iz jednog kristala. Prava struktura koja se izračunava iz uzoraka difrakcije rendgenskih zraka je mapa elektronske gustoće koja predstavlja položaj C, N, S, O i drugih atoma. Sustav za otkrivanje raspršenih rendgenskih zraka trebao bi snimati položaj difrakcijskog mjesta i njegov intenzitet kao i ukupni uzorak difrakcije. Raspršene zrake mogu se otkriti korištenjem elektronskih detektora koji pretvaraju intenzitet i položaj točaka u električni naboj koji se snima. Dobiveni podaci se spremaju elektronički u obliku koji je čitljiv računalu. Jednom kada se kristal izloži rendgenskom zračenju uzorak raspršenja se prikuplja i sprema. Podaci na detektoru bivaju izbrisani, kristal se zarotira i dobiva se drugi difrakcijski uzorak. Na taj se način prikuplja skup podataka koji opisuju kristal.²



Slika 8. Uzorak raspršenih rendgenskih zraka (preuzeto iz ref. 2)

Izračun mape elektronske gustoće cilj je rendgenske kristalografije jer nam omogućuje prikaz molekularne struktura. Trodimenzionalni raspored elektrona unutar molekule predstavljen je kao mapa elektronske gustoće. Izračun mape elektronske gustoće provodi se uz pomoć računalnih programa čija je dostupnost uglavnom odgovorna za brzinu kojom se makromolekularne strukture mogu odrediti.

2.1.4 Problem faze

Valna funkcija definirana je s dva pojma, a to su amplituda i valna duljina. Budući da se kod rendgenske kristalografije traži trodimenzionalno mjesto s kojeg difraktirana zraka potječe potreban je treći pojam za opis difraktiranog rendgenskog vala koji se naziva fazni kut. Svaka Bragg-ova refleksija proizlazi iz kombinacije valova raspršenih po svim atomima u molekuli. Različite refleksije imaju različite fazne kutove koji se moraju odrediti kako bi se mogla izračunati mapa elektronske gustoće.

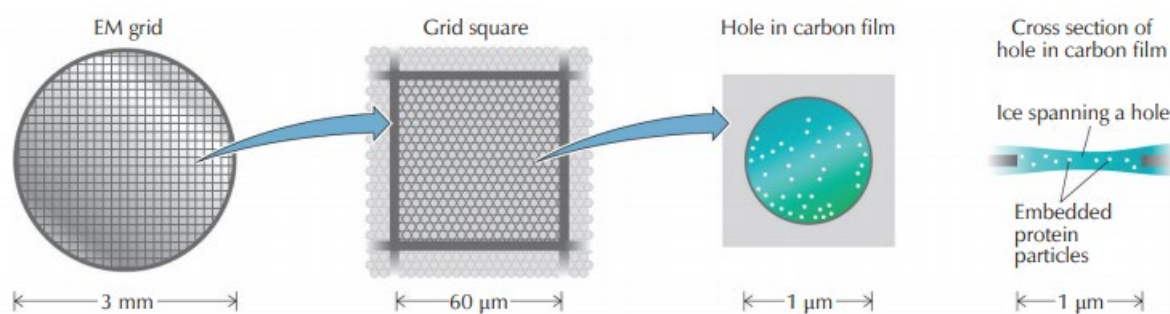
Difrakcijski skup podataka iz kristala sadrži podatke o amplitudi, ali gubi fazu. Budući da je potrebno znati i fazu i amplitudu svake Bragg-ove refleksije da bi se izračunala mapa elektronske gustoće ovaj nedostatak faznih podataka predstavlja prepreku u strukturiranju proračuna koji se naziva fazni problem.²

2.2 Krioelektronska mikroskopija

Iako se kristalografija rendgenskim zrakama pokazala kao odlična metoda rješavanja struktura bioloških makromolekula pokazala je i određena ograničenja. Najveće ograničenje ove metode je upravo činjenica da promatrane biološke makromolekule moraju nužno biti u kristalnom obliku kako bi im se mogla odrediti struktura. Sam proces dobivanja kristala bioloških makromolekula je vrlo spor i vrlo zahtjevan te se često kao rezultat i neće dobiti željeni kristal koji će biti pogodan za difrakciju. Uz problem samog procesa pripreme kristala, postoji i problem da se ne mogu sve biološke makromolekule prevesti u kristalnu formu. To su na primjer proteini vezani na membranu. Navedeni problemi su se pokušali riješiti uz pomoć već poznatih metoda strukturne analize, poput elektronskog mikroskopa. Krioelektronska mikroskopija razvila se zahvaljujući brzom razvoju nove generacije elektronskih detektora i razvoju poboljšanih postupaka obrade slika. Za krioelektronsko snimanje potrebna je manja količina uzorka, manje je ograničenje za čistoću uzorka i nije potrebna kristalizacija. Proteini raspršuju elektrone oko deset tisuća puta jače od rendgenskih zraka. Budući da se elektroni raspršuju u zraku elektronski mikroskopi moraju raditi u visokom vakuumu. To predstavlja problem u proučavanju bioloških uzoraka od koji se većina u prirodnom obliku nalazi u vodenom okolišu. Biološke strukture osjetljive su i na oštećenja zračenjem. Održavanjem uzoraka na kriogenim temperaturama krioelektronska mikroskopija omogućuje im očuvanje u visokom vakuumu i pruža im određenu zaštitu od oštećenja zračenjem. Kada se biološke molekule stave u vakuum dolazi do dehidratacije samih molekula čime se narušava njihova nativna struktura, a samo bombardiranje molekule snopom elektrona također dovodi do uništavanja njene strukture i kidanja veza među atomima. Zbog navedenih razloga prije promatranja bioloških uzoraka pod elektronskim mikroskopom mora se provesti složena priprema uzoraka za mikroskopiranje.⁵ Neki od najvećih napredaka mikroskopa dostignuti su upotrebom većih napona ubrzanja (200-300 kV) i specijalnog emisijskog topa (*eng. Field emission gun* - FEG) koji je izvor elektrona. Ova poboljšanja povećavaju vremensku i prostornu koherentnost snopa elektrona omogućujući sakupljanje slika visoke razlučivosti pri vrijednostima potrebnim za vizualizaciju nebojenih čestica u vitrificiranom ledu. Ostale prednosti elektronskih mikroskopa uključuju stabilne sustave leća, poboljšani vakuum te stabilne krio-faze koje minimiziraju skretanje uzoraka.⁶

2.2.1 Priprema uzoraka za mikroskopiranje i smještanje uzorka

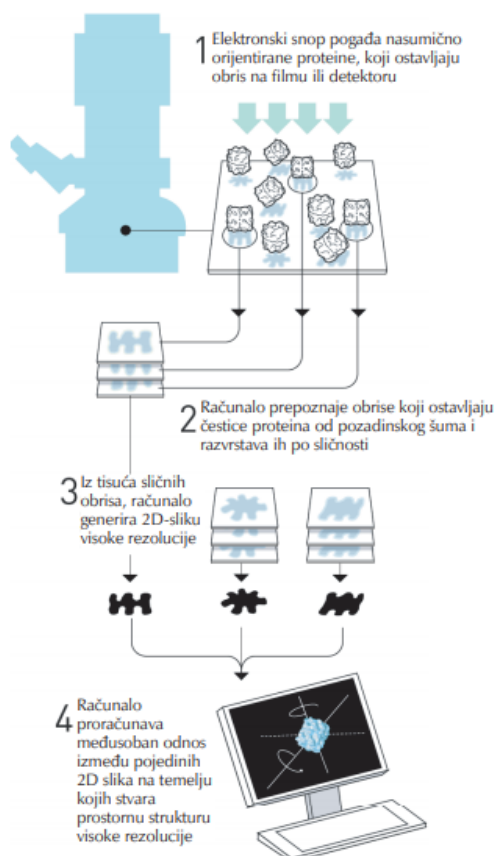
Priprema uzoraka uključuje: fiksiranje prije uklanjanja vode, naparavanje parama metala poput zlata ili platine, ili natapanje otopinama teških metala poput uranija, osmija, molibdena da bi se biološke strukture učinile vidljivima i da bi se povećao kontrast pod elektronskim mikroskopom. Nedostatak je da dolazi do neizostavnog narušavanja strukture bioloških makromolekula te iako je moguće vidjeti stanične strukture i pojedinačne molekule poput ribosoma ili molekula DNA i RNA ipak se ne može vidjeti sama struktura tih molekula na atomskoj razini. Dva osnovna problema koja su se morala razriješiti da bi se uspješno analizirala struktura bioloških molekula uz pomoć elektronskog mikroskopa su: očuvanje native strukture bioloških molekula i njihovih supramolekulskih tvorevina te ih je potrebno učiniti "vidljivima" bez dodatnog tretmana ili fiksacije, koja bi takvu strukturu narušila. Problem očuvanja native strukture riješen je uz pomoć procesa vitrifikacije. Vitrifikacija je proces smrzavanja uzorka pomoću tekućeg dušika i to na način da voda zadržava amorfnu strukturu i ne stvara kristaliće leda jer bi oni nepovoljno utjecali na difrakciju zraka elektrona. Zbog toga se metoda i zove krio-elektronska mikroskopija, jer uzorak ostaje ohlađen na temperaturu tekućeg dušika prije i tijekom promatranja u elektronskom mikroskopu. Međutim, koliko god jednostavan se činio proces smrzavanja uzorka u tekućem dušiku, riječ je o vrlo složenom i zahtjevnom postupku. Kako bi se pripremio uzorak nekoliko se mikrolitara pročišćene otopine proteina nanese na metalnu (obično bakrenu) rešetku na kojoj se nalazi tanki film od amornog ugljika koji sadrži šupljine. Nakon što se višak tekućine upije filter papirom rešetka se uroni u tekući etan. Proces pripreme uzorka prikazan je na slici 9. U idealnom slučaju to rezultira stvaranjem tankog sloja nekristalnog ili staklastog leda. Slike snimljene kroz šupljine u ugljičnom filmu sadrže dvodimenzionalne projekcije pojedinih proteinskih kompleksa koje se nazivaju česticama. Projekcije čestica u različitim orijentacijama pružaju komplementarne informacije o temeljnom trodimenzionalnom objektu. Brojne dvodimenzionalne projekcije stoga se mogu kombinirati u jednu trodimenzionalnu rekonstrukciju pod uvjetom da su poznate njihove relativne orijentacije.⁵



Slika 9. Priprema uzorka za krioelektronsku mikroskopiju (preuzeto iz ref. 7)

Drugi je problem, problem „vidljivosti“ bioloških makromolekula koje zbog svoje prirode i činjenice da su izgrađene, uglavnom, od lakih atoma ugljika, vodika, dušika i kisika koji čine slabu kontrastnu sliku u odnosu na vitrificirano otapalo. Dodatno otežanje je i činjenica da pri elektronskoj mikroskopiji bioloških makromolekula snop elektrona mora biti malog intenziteta kako se ne bi narušila sama struktura uzorka. Rezultat svega toga je vrlo mutna slika slabog kontrasta koja je jedva vidljiva. Navedeni problem se rješava na način da se prikupi veliki broj slika čestica (deseci tisuća) koje se onda grupiraju, uprosječuju, izoštravaju te orijentiraju u prostoru. Naziv metode je *single particle analysis*, odnosno analiza pojedinačnih čestica. Metoda je ovaj naziv dobila jer se oko deset tisuća različitih čestica zapravo smatra jednom česticom nasumične orijentacije, a te mikrofotografije su njezine projekcije stoga je vrlo bitno da promatrani uzorak bude čist i homogen, odnosno, da ne sadržava nikakve druge tvari jer bi to narušilo stvaranje točnog prikaza strukture biološke makromolekule.⁷

Računalnom analizom i rekonstrukcijom trodimenzionalne strukture proteina prikazane na slici 10, ne dobiva se statičan prikaz, nego prikaz trodimenzionalnog modela molekula čija rezolucija doseže atomsku razinu i može se mjeriti sa onom kristalografije rendgenskim zrakama (od 2–3 Å). Zbog svoje učinkovitosti i već navedenih prednosti pred kristalografijom (mogu se promatrati strukture koje ne tvore kristale i općenito strukture ne moraju imati kristalnu formu) krioelektronska mikroskopija je doživjela široku primjenu u strukturnoj analizi bioloških makromolekula te se svakim danom sve više unapređuje. Napretkom tehnologije i razvojem detektora za snopove elektrona slabijeg intenziteta postalo je još lakše određivati biomolekulske strukture.⁷



Slika 10. Rekonstrukcija trodimenzionalne strukture proteina (preuzeto iz ref. 7)

2.2.2 Napredak u instrumentaciji elektronskog mikroskopa

Biološki uzorci su kako je i prije navedeno osjetljivi na zračenje i snop elektrona ih može oštetiti zato je potrebno uspostaviti ravnotežu između dovoljno velike “doze” elektrona za otkrivanje signala i samog uzorka kako se on ne bi oštetio. U praksi bi to značilo da će slike bioloških uzoraka imati nizak omjer signal-šum (*eng. Signal to Noise Ratio - SNR*) čineći tako neophodnim prikupljanje skupova podataka koji sadrže tisuće, pa čak i stotine tisuća čestica, ovisno o tome je li uzorak velik i vrlo simetričan ili dinamičan i asimetričan.

Moderni elektronski mikroskopi u potpunosti su kompjuterizirani što dovodi do razvoja i integracije softvera koji povećava učinkovitost prikupljanja podataka. Jedan važan napredak bio je digitalna integracija “načina niskih doza” (*eng. “low-dose mode”*). Taj je protokol razvijen 70-ih godina prošloga stoljeća kako bi se smanjila oštećenja zračenjem bioloških uzoraka tijekom prikupljanja podataka. Rad u tom načinu na kompjuteriziranom mikroskopu

omogućuje jednostavno i precizno prikupljanje defokusirajućih slika korištenjem minimalne “doze” elektrona. Sljedeći važan napredak softvera je sposobnost potpune automatizacije prikupljanja slika kontrolom računala. S vremenom su razvijeni brojni akademski i komercijalni programi koji korisnicima omogućuju brzo skeniranje mreže u potrazi za određenim dijelovima vitrificiranog leda, a zatim prikupljanje slika uz minimalni angažman operatora mikroskopa. Korištenje tih programa značajno je poboljšalo prikupljanje velikih količina podataka visoke kvalitete na najučinkovitiji način.⁶

2.2.3 Napredak u tehnologiji slike

Osjetljivost bioloških uzoraka na oštećenja zračenjem ograničava “dozu” elektrona koja se može koristiti za stvaranje slika, što tehnologiju detektora čini važnim područjem razvoja za krioelektronsku mikroskopiju. Tip detektora koji se koristi za prikupljanje slika u krioelektronskoj mikroskopiji uvelike utječe na kvalitetu podataka i sposobnost određivanja struktura visoke rezolucije. Učinak detektora mjeri se s dva parametra: funkcija prijenosa modulacije/kontrasta (*eng. Modulation Transfer Function - MTF*) i kvantna učinkovitost (*eng. Detective Quantum Efficiency - DQE*). MTF kvantificira odziv detektora na različitim frekvencijama (razlučivost kamere), dok DQE kvantificira kombinirane učinke signala koje generira uzorak i šumova koji generira kamera na konačnoj slici. Koristeći ove parametre, idealni uređaj za snimanje imao bi visok MTF u spektru i generirao bi slike koristeći samo signal koji proizlazi iz uzorka bez dodatnog šuma od detektora. Nažalost, takav savršeni detektor još ne postoji, što znači da svi detektori imaju ograničenja razlučivosti i doprinose različitim razinama šumova konačnoj slici.

Najnovija inovacija u tehnologiji krioelektronske slike je razvoj kamere s izravnom detekcijom elektrona (*eng. Direct Electron Detection - DED*) koja snima slike izravno na senzoru. DED kamere izrađene su od tanke poluvodičke membrane izravno povezane s tankim matriksom. Debljina potpornog matriksa važna je jer tanji matriks generira manje šumova od povratno raspršenih elektrona. Pri dovoljno niskim “dozama” elektrona DED kamere mogu otkriti pojedinačne elektrone, značajno poboljšavajući SNR slike, izlaganje niskih “doza” koje se obično koriste za prikupljanje krioelektronskih slika koje zasićuju DED senzor. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje i kako bi se generirale slike najviše razlučivosti DED kamere rade u “filmskom načinu” koji frakcionira “dozu” elektrona tijekom dugog izlaganja koja se snima

velikom brzinom kadrova. Krajnji je rezultat da je svako slikanje zbirka od 20–30 pojedinačnih slika vrlo niskog kontrasta koje se moraju kombinirati prije nego što se provede bilo kakva daljnja obrada slike i strukturni izračuni. Razvoj robusnih DED kamera jedan je od najznačajnijih napredaka u krioelektronskoj mikroskopiji.⁶

2.2.4 Računalni napredak

Pretvaranje velikih skupova dvodimenzionalnih podataka u trodimenzionalne strukture zahtijeva algoritme koji mogu točno odrediti položaj i orijentaciju slikanih čestica. To je postupak koji zahtijeva značajnu računsku snagu. Veliki računalni klasteri s vremenom postaju sve dostupniji i moćniji. Ti resursi omogućuju paralelno izvođenje velikih računalnih poslova poput poravnavanja i klasifikacije tisuća do stotina tisuća dvodimenzijskih projekcija sa pozadinskim šumovima na više računalnih procesora. To je strategija koja značajno smanjuje vrijeme potrebno za pretvaranje grubih slika trodimenzijske strukture. Ovi računski resursi, koji se vrlo brzo razvijaju, omogućili su da se računski intenzivni algoritmi obrade slika koriste za strukturne izračune. Obrada slike potrebna je kako bi se ispravilo kretanje čestica unutar vitrificiranog sloja leda te kako bi se precizno klasificirala orijentacija dvodimenzijskih projekcija. Razvoj brzih računalnih resursa u kombinaciji s novim strategijama obrade slika doveo je do mogućnosti izračuna detaljnijih strukturnih modela iz krioelektronskih slika sa šumovima.

Zbirka krioelektronskih slika u "filmskom načinu" (eng. *"movie mode"*) omogućuje praćenje gibanja inducirano zrakama. Ovo kretanje uzrokuje zamagljenje konačne slike ograničavajući sposobnost stvaranja struktura visoke rezolucije stoga su razvijeni brojni algoritmi koji ispravljaju ovo gibanje inducirano zrakama. Ovi pristupi usklađuju frakcionirane slike, bilo pomoću cijele slike ili pojedinačnih prozorskih čestica prije zbrajanja u konačnu sliku. To značajno poboljšava kvalitetu konačnih podataka iz nekoliko razloga koji su slikovito prikazani na slici 11. Prvo, algoritmi za poravnavanje ispravljaju gibanje inducirano zrakama, a drugo, učinci oštećenja zračenjem mogu se smanjiti odabirom odgovarajućih frakcioniranih slika koje će biti uključene u konačnu zbrojenu sliku.⁶



Slika 11. Napredak u instrumentaciji mikroskopa, tehnologiji slike i računanju (preuzeto i prilagođeno iz ref. 6)

Poboljšanja algoritama također su omogućila analizu skupova podataka koji sadrže određenu strukturnu heterogenost. Makromolekule su dinamičke strukture podložne konformacijskim promjenama kao dio svoje biološke funkcije. Iz tog razloga čak i biokemijski čisti uzorci rijetko su strukturno homogeni. Uzorci prirodno zauzimaju više od jedne konformacije u vitrificiranom ledu. U idealnoj situaciji molekule se nalaze u različitim orijentacijama u sloju amornog leda, pružajući različite pogleda na molekulu. Iako su različiti pogledi na molekule neophodni za točne strukturne proračune, oni mogu stvoriti ozbiljne probleme tijekom trodimenzionalne rekonstrukcije ako je pročišćeni uzorak kompozicijski ili strukturno heterogen. Kako bi se utvrdila trodimenzionalna struktura visoke rezolucije, u rekonstrukciju trebaju biti uključene samo slike strukturno identičnih molekula. Međutim, samo iz pogleda projekcije teško je razlikovati čestice u različitim orijentacijama i čestice koje se nalaze u različitim konformacijskim stanjima. Što je uzorak heterogeniji, ovaj je problem teži. Razvijeni su brojni pristupi obradi slike kako bi se precizno dodijelili orijentacijski parametri dvodimenzionalnim projekcijama i kako bi se osiguralo da su projekcije samo strukturno homogenih čestica uključene u trodimenzionalnu rekonstrukciju.

Svi se ovi programi koriste različitim strategijama klasifikacije i trodimenzionalne rekonstrukcije, dajući im različite prednosti i mane. Međutim, zbog ovih razlika uobičajeno je da se više programa koristi u različitim fazama klasifikacije, trodimenzionalne rekonstrukcije i procesa usavršavanja.

Sposobnost krioelektronske mikroskopije da klasificira strukturno raznolike skupove podataka čini ju moćnom metodom za određivanje struktura mnogih biološki važnih kompleksa koje je teško kristalizirati zbog njihove konformacijske heterogenosti. Trenutno su algoritmi za obradu slike još uvijek ograničeni količinom strukturne heterogenosti koja se može tolerirati. Klasifikacija manjih, asimetričnih i/ili visoko dinamičnih uzoraka ostaje izazov u krioelektronskoj mikroskopiji.⁶

2.3. Rendgenski laseri sa slobodnim elektronima

Rendgenski laseri sa slobodnim elektronima (*eng. X-ray free electron laser – XFEL*) predstavljaju najnoviju generaciju izvora rendgenskih zraka s jedinstvenim svojstvima koja pružaju nove mogućnosti u proučavanju materije u jedinstvenim oblicima kao i u proučavanju interakcija i dinamike na vrlo brzim vremenskim skalama. Koncepti i tehnologije koje su s vremenom doveli do izvedivosti XFEL-a u rendgenskom režimu razvijeni su tijekom 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća što je kulminiralo realizacijom linearnih strojeva s jednim prolazom na bazi linearnih akceleratora posvećenih proizvodnji kratkih impulsnih fotonskih zraka koje s vremenom dolaze do međuatomskih razmaka od nekoliko angstrema ili manje.

2.3.1 Svojstva rendgenskih lasera sa slobodnim elektronima

XFEL-ovi ponekad se klasificiraju kao sinkrotronski izvori četvrte generacije. Unatoč tome, XFEL-ovi koriste i tehnologije iz izvora trećih generacija. Izvori treće generacije temeljili su se na upotrebi undulatora. XFEL-ovi u potpunosti se oslanjaju na proširenje upotrebe undulatora na uređaje veće za jedan red veličine. Linearni dizajn XFEL-a se koristi iako bi kružni dizajn bio poželjniji jer omogućuje više izvora slobodnih elektrona. Ono što XFEL zračenje razlikuje od sinkrotronskog zračenja je svjetlina potrebnog snopa elektrona, zajedno s duljinom undulatora, što omogućuje samopojačanu spontanu emisiju (*eng. Self-Amplified Spontaneous Emission - SASE*) i eksponencijalni rast intenziteta zračenja interakcijom snopa elektrona s prethodno emitiranim rendgenskim poljem dok se oni zajednički šire duž undulatora. Postizanje SASE-a prilično je izazovno i zahtijeva da snop elektrona bude dovoljno kvalitetan, tj. da bude mala emisija, velika vršna struja i malo širenje energije koje je moguće postići samo linearnim akceleratorom. Ovi parametri u osnovi kontroliraju koliko su svi elektroni slični. Proces korištenja lasera je pojačana emisija energije smještanjem što većeg broja elektrona u isto stanje tako da se emitiraju u fazi. Proces SASE proizvodi kratke impulse obično reda veličine nekoliko desetaka femtosekundi (fs) s potencijalnim dužim impulsima u rasponu od nekoliko stotina fs ili kraćim impulsima u atosekundnom rasponu. Trajanje rendgenskog impulsa kontrolira se duljinom elektronskog snopa koji posjeduje dovoljnu kvalitetu za proizvodnju laseriranja. To se može postići jednostavnom kontrolom ukupne duljine snopa elektrona ili namjernim stvaranjem snopa elektrona gdje mali dio posjeduje karakteristike potrebne za proizvodnju laseriranja.⁸

2.3.2 Uporaba rendgenskih lasera sa slobodnim elektronima

Tipično trajanje impulsa XFEL-a s rendgenskim zrakama otprilike je tri reda veličine kraće od tipičnog najkraćeg impulsa od sinkrotrona (ali sadrži približno jednak broj fotona koje bi sinkrotron stvorio u 1 s). S duljinama impulsa obično kraćim od 30 fs otvara novo područje ultrabrze znanosti. XFEL-ovi kombiniraju ove vrlo kratke impulse s kratkim valnim duljinama omogućujući istovremeno visoku prostornu i vremensku rezoluciju.

Pump-probe metode su sveprisutne u XFEL eksperimentima, a većina eksperimenata koristi laser koji osvjetljava uzorak za proučavanje njegove dinamike. Te se metode primjenjuju na sva područja znanosti. U kemiji se može primijetiti ultrabrzo pucanje i stvaranje veze koje započinje optički laser kako bi se stvorio molekularni film reakcije. Različite metode raspršivanja i spektroskopske metode mogu se također koristiti za bolje razumijevanje prijenosa naboja u metalnim kompleksima, što nam na kraju pomaže u razumijevanju sustava s potencijalnim primjenama sakupljanja energije.

Difrakcija prije uništenja je koncept u kojem je moguće dovoljno velikim intenzitetima i dovoljno kratkim impulsima ublažiti i eventualno prevladati konvencionalne granice štete od zračenja koje postoje za dulja, kontinuirana mjerenja. Neke rendgenske zrake koje padaju na uzorak ispituju njegovu strukturu raspršivanjem, ali većina zraka koje reagiraju s uzorkom predaju svoju energiju u uzorak rendgenskom apsorpcijom. Ta predana energija na kraju oštećuje uzorak, ali to se ne događa odmah. Ako se trajanje impulsa može održavati kraćim od dinamike oštećenja, tada je u principu moguće u ovo kratko vrijeme propustiti više rendgenskih zraka nego što bi dopuštala granica oštećenja na sinkrotronu. Koncept difrakcije prije uništenja presudan je za većinu bioloških primjena zbog osjetljivosti na zračenje samih bioloških uzoraka.

XFEL ima raspon spektra od UV do mekog i tvrdog rendgenskog zračenja. Tvrdе rendgenske zrake primarno se koriste za pronalazak mjesta na kojem se nalaze atomske jezgre u prostoru, bilo u statičkoj strukturi ili dinamičkoj strukturi koristeći metode temeljene na vremenu. Također se koriste za ispitivanje elektronskih stanja metalnih centara s apsorpcijskim rubovima u tvrdom rendgenskom području u metaloenzimima ili proteinima. Mekše rendgenske zrake koriste se za metode snimanja gdje presjek većeg raspršenja može

biti koristan za povećanu razinu signala. Oni su također korisni alati za spektroskopska ispitivanja elektronske strukture lakših atoma s apsorpcijskim rubovima pri nižim energijama.⁸

3. LITERATURNI IZVORI

1. M. J. S. Dewar, *The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry*, McGraw Hill, Ireland, 1969, str. 225-226.
2. D. Sheehan, *Physical Biochemistry 2nd Edition*, John Wiley & Sons, Ireland, 2009, str. 226 – 232, 235-237, 241-242, 253
3. A. McPherson, *Methods Mol. Biol.* **1607** (2017), 17-50.
4. A. McPherson, J. A. Gavira, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70** (2014), 2-20
5. R. Fernandez-Leiro, S. H. W. Scheres, *Nature*, **537** (2016) 339-346.
6. E. Binshtein, M. D. Ohi, *Biochemistry*, **54** (2015) 3133-3141.
7. M. Močibob, *Kem. Ind.*, **66** (2017) 696-708.
8. S. Boutet, P. Fromme, M. S. Hunter, *X-ray Free Electron Lasers*, Springer, California, 2018, str. 9 – 14.