A krio-elektronmikroszkópia feltáruló új világa a biomolekuláris szerkezetkutatásban

### Vonderviszt Ferenc

Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Pannon Egyetem







## Bakteriális flagellumok

A baktériumok mozgásszervei.





HAP2 sapka a filamentumok végén

A bakteriális flagellumok szerkezeti diagramja

• • • 230 Å

HAP2

Flagelláris filamentum:

- ~10<sup>4</sup> flagellin alegység
- hossz: 5-20 μm
- átmérő: 23 nm
- önszerveződésre képes

A filamentumot felépítő flagellin alegységek a szűk belső csatornán keresztül vándorolnak és beépülnek a filamentumok végét lezáró HAP2 molekuláris sapka alá.

Ellentmondásos követelmények: a HAP2 sapka erősen kötődik a filamentum végéhez, mégis lehetővé teszi, hogy alá a flagellin alegységek beépülhessenek.

# HAP2: Molekuláris sapka a bakteriális flagellumok tetején

Miként működik a HAP2 sapka?

Krio-EM egyedi részecske analízise:

- 589 egyedi filamentum
- JEOL JEM-3000SFF
- 300 kV, ~25 e/ Ų, 4K
- adatrögzítés: fotolemez →
  digitalizálás
- helikális szerkezet rekonstrukció
- 27Å felbontás



Egyedi filamentum-HAP2 sapka komplexumok krio-EM felvétele, valamint 586 kép átlaga.

Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* 290, 2148-2152 (2000)

Vonderviszt F, Imada K, Furukawa Y, Uedaira H, Taniguchi T & Namba K: Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J. Mol. Biol.* 284, 1399-1416 (1998)



HAP2 dekamer

A filamentum-HAP2 sapka komplexum 27Å felbontású szerkezete.

## A HAP2 sapka működésének molekuláris mechanizmusa



A filamentum-HAP2 komplexum egy protofilamentum mentén felnyitott, síkba kiterített sematikus szerkezete

#### Jellemzők:

- filamentumnövekedés az alaphélix mentén
- nemkompatibilis szimmetria (11- ill. 5-fokú szimmetria; planáris vs szabálytalan szerkezet)
- rendeztelen ↔ rendezett
  szerkezeti átmenetek
- energiaforrás: flagellin polimerizáció
- HAP2 lassú forgómozgást végez



A HAP2 sapka működésének animációs modellje

## Első krio-EM fehérjeszerkezet: flagellin



Kísérleti körülmények:

- 102 egyedi filamentum
- ~41500 fehérje alegység
- JEOL JEM-3000SFF
- 300 kV, ~20 e/ Å<sup>2</sup>, 4K
- adatrögzítés: fotolemez → digitalizálás
- helikális szerkezet rekonstrukció
- 4Å felbontás





A flagellin alegység polipeptid vázának szerkezete A flagellin alegységek elrendeződése a filamentumban

Yonekura K, Maki-Yonekura S & Namba K: Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424, 643-650 (**2003**).

## Metodikai áttörések

Miként jutott el a krio-elektronmikroszkópia az alacsony szimmetriájú szupramolekuláris rendszerek "rutinszerű" atomi felbontású szerkezetmeghatározásához?

Megoldandó problémák:

- Mintapreparálás automatizálása
- Nagyon zajos képek
- Alacsony kontraszt
- Elektronsugár indukálta elmozdulások
- Körülményes képfeldolgozás és analízis



glutamát dehidrogenáz

#### 2017 Nobel Laureates in Chemistry



All 'Bout Chemistry www.chemohollic.com

"A biomolekulák oldatbeli szerkezetének meghatározására alkalmas alacsonyhőmérsékletű elektronmikroszkópia létrehozásáért"

## A mintapreparálás követelményei

- Parányi mennyiségű, viszonylag tiszta minta elegendő, vizes közegben
- Az elektronok intenzíven elnyelődnek az anyagban  $\rightarrow$  csak vékony minták vizsgálhatók, nagyvákuumban
- Biológiai minta folyékony etánban pillanatszerűen lefagyasztva (vákuum körülmények tolerálása; sugárzási károsodás csökkentése; konformációs állapot rögzítése; amorf jégréteg létrehozása) → a szerkezet megmarad
- Automatizált mintapreparálás, behelyezés és grid csere
- Krio-mintatartó: < -160 °C hőmérséklet, akár -270 °C is lehet
- Vékony amorf jégrétegben különböző orientációjú, különféle konformációs állapotú egyedi molekulák/komplexumok
- Vetületi képeket veszünk fel  $\rightarrow$  3D szerkezet rekonstrukció





## Adatgyűjtés (képfelvétel)

Elektronsugár erősen roncsol → extrém alacsony nyalábintenzitás szükséges (20-30 e/Å<sup>2</sup>) Erősen zajos, alacsony kontrasztú, 2D vetületi képek

CMOS detektorok fejlesztése (Henderson és mts.) és bevezetése (fotólemez, CCD kamerák helyett):

- Közvetlen elektron detektálás
- Sokkal nagyobb érzékenység, jel/zaj arány és térbeli felbontás
- Jóval nagyobb kontraszt
- Gyors kiolvasás → movie mód→ lehetővé teszi az elektronsugár indukálta elmozdulások korrigálását

Drasztikusan megnövekedett képminőség



*elmozdulás korrekció* Brilot *et al.* (2012) *J. Struct. Biol.* 177:630–637.

## Szerkezetanalízis (képfeldolgozás)

#### Kihívások:

- Egyedi molekulák 2D vetületi képei mindenféle orientációban
- Erősen zajos, alacsony kontrasztú képek
- Többféle konformációs állapot lehetséges
- Szennyező molekulákat tartalmazhat
- Automatizált adatgyűjtés

#### Analízis lépései:

- Egyedi részecskék kiválasztása
- Nem megfelelő felvételek figyelmen kívül hagyása (számítógépes mintatisztítás: szennyezők, aggregátumok, fragmentumok kiszórása)
- Azonos orientációjú vetületi képek csoportokba gyűjtése és kiátlagolása
- 3D szerkezet rekonstrukció (elektrosztatikus potenciáltérkép, polipeptidlánc ráillesztése)

 $Nagy számításigény \rightarrow szuperszámítógép$ 







Reichow Lab, Portland State University

## Hogyan lesznek 2D vetületekből 3D térképek?

Nogales & Scheres (2015) Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity Molecular *Cell* 2015 58, 677-689



## A krio-EM kínálta előnyök a biomolekuláris szerkezetkutatásban

- parányi minta elegendő
- szoftveres mintatisztítás lehetősége
- funkcionálisan releváns állapot(ok) megjelenítése
- membránfehérjék szerkezetmeghatározása
- gyakorlatilag bármilyen biológiai anyag vizsgálható (fehérjék, nukleinsavak, lipidek, glikánok)
- nagy komplexumok is könnyen vizsgálhatók
- széles mérettartomány (alsó méretkorlát kb. 200 kDa  $\rightarrow$  40 kDa )
- tomográfia lehetősége (pl. sejtek sokféle orientációban)



β-galaktozidáz 2.2 Å felbontású szerkezete



Hatóanyag kötődés feltérképezése



TRPV2 receptor

### A krio-EM térhódítása

### A publikációk ill. meghatározott térszerkezetek számának növekedése Electron Microscopy Data Bank (EMDB) <u>https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/</u>





## Krio-EM: fejlesztési lehetőségek

- Még jobb detektorok
- Kontrasztnövelés  $\rightarrow$  fázislemez alkalmazása
- Kifinomultabb analizáló programok  $\rightarrow$  folytonos állapotok vizsgálata
- Méretkorlát csökkentése 200 kDa  $\rightarrow$  40 kDa
- Mintapreparálás tökéletesítése





Kontrasztnövelés fázislemez alkalmazásával (Glaeser (2016) Nature Methods 13:28-32)

## A mitokondriális riboszóma krio-EM szerkezete (3.8 Å)



Complete structure of the 55S mitochondrial ribosome including tRNAs (P-site purple, A-site gold) and mRNA (red) Greber et al. (2015) Science 348:303-308

### A γ-szekretáz membránfehérje szerkezete

Bai et al. (2015) Nature 525:212-217



- 3.4 Å felbontás
- 170 kDa méret
- 4 komponens
- 2M-ból kiválasztott 160e egyedi részecske analízisével

## Diszkrét funkcionális állapotok feltérképezése: vakuoláris ATPáz



Zhao et al. (2015) Nature 521:241-245.

## Tanulság(os történet)

Structure of actomyosin rigour complex at 5.2 Å resolution and insights into the ATPase cycle mechanism.

T. Fujii & K. Namba, Nature Communications 2017, 8:13969







Keiichi Namba Osaka University



JEOL's cryo-electron microscope "CRYO ARM™" in Professor Namba's laboratory



## Köszönőm a figyelmet.



