Новый микроскоп для электронной трехмерной кристаллографии

В. С. Башкирцев¹

УДК 621.385.833.22

Рассмотрен метод электронной кристаллографии как инструмент структурной биологии, альтернативный рентгеновской кристаллографии. Новый просвечивающий микроскоп CRYOARM 300 был испытан для сбора данных электронной дифракции вращения для анализа трехмерной структуры белковых макромолекул. Приведены результаты анализа тонких трехмерных кристаллов каталазы и мембранного белкового комплекса ExbBD. Благодаря фильтрации электронов по энергиям качество данных заметно улучшилось. Описаны особенности взаимодействия электронов с замороженным в стекловидный лед криогенным биологическим образцом. Показаны преимущества использования электронов больших энергий и фильтрации электронов с потерями энергии в электронной трехмерной кристаллографии.

Ключевые слова: трехмерная электронная кристаллография, электронная дифракция вращения, энергетический фильтр, Ω -фильтр, CRYOARM

The method of electron crystallography is considered as an instrument of structural biology, an alternative to x-ray crystallography. The new CRYOARM 300 transmission microscope was tested to collect electron diffraction data for the analysis of the three-dimensional structure of protein macromolecules. The results of analysis of thin three-dimensional crystals of catalase and membrane protein complex ExbBD are presented. By filtering electrons by energy, the quality of the data has improved markedly. The features of the interaction of electrons with a biological sample embedded in thin vitreous ice cooled to low temperatures are described. The advantages of using electrons of higher energies and filtering electrons with energy losses in electronic three-dimensional crystallography are shown.

Keywords: three-dimensional electron crystallography, electron rotation diffraction, energy filter, Ω filter, CRYOARM

Статья получена 05.05.2020

Принята к публикации 09.06.2020

Введение

Основным методом исследования структур белковых молекул является дифракция рентгеновских лучей. Однако далеко не всегда удается получить дифракционную картину достаточного качества даже при интенсивном рентгеновском облучении. В таком случае для достижения большего дифракционного

контраста может помочь электронная дифракция, благодаря более эффективному взаимодействию электронов с веществом. Разница в эффективности рассеяния электронов и рентгеновских квантов составляет четыре-пять порядков.

Не все белковые молекулы образуют кристаллы, пригодные для исследования методом рентгеновской дифракции. Более того, формирование белковых кристаллов – это сложная самостоятельная

¹ «ДЖЕОЛ (РУС)», Москва, vladimir@jeolrus.com.

задача. Однако в ряде случаев мембранные белки формируют в липидной мембране двумерные кристаллы, которые часто дорастают до тонких трехмерных кристаллов, состоящих буквально из нескольких слоев молекул. Дифракция электронов на таких кристаллах может давать разрешение лучше, чем 2 Å, то есть электронная двумерная и трехмерная дифракция (также известная как MicroED) дает возможность исследовать структуру таких небольших кристаллов, растущих в естественных условиях, а также некоторых других биологических структур.

Кроме того, электронная кристаллография благодаря высокой эффективности взаимодействия электронов с зарядом, имеет некоторый потенциал в исследовании распределения последнего в образце.

Независимо от морфологии кристалла, при сборе данных для анализа его трехмерной структуры методами и рентгеновской, и электронной дифракции, необходимо использовать наклон и непрерывное вращение образца. Однако сильное взаимодействие электронов с веществом накладывает ограничение на длину их пути в кристалле, а эффективная толщина плоского образца увеличивается при наклоне. Ситуация существенно ухудшается уже при достижении 40–50°.

Дифракционные картины белковых кристаллов также страдают от высокого фонового шума, создаваемого электронами, неупруго рассеянными как на атомах исследуемого кристалла, так и аморфного льда, в который кристалл заморожен. Влияние неупругого рассеяния возрастает с увеличением толщины кристалла и наклона образца. Это создает большие трудности при исследовании тонких пластинчатых кристаллов, которые являются наиболее распространенной формой образцов, исследуемых в электронной кристаллографии. Такие кристаллы крепятся к пленке, поддерживающей образец, одной и той же (плоской) стороной, что не позволяет дополнять наборы данными, собранными на кристаллах, ориентированных по-другому. Отсутствие определенной симметрии, позволяющей достраивать недостающие данные, для полного анализа трехмерной структуры выдвигает требования как можно больше увеличить диапазон угла наклона (до 60° и выше).

Система трехмерной электронной кристаллографии должна обеспечивать интенсивный пучок параллельных электронов высоких энергий, фильтрацию неупруго рассеянных электронов, непрерывное и стабильное вращение образца, а также точную и эффективную работу как аппаратного, так и программного обеспечения.

В качестве примера использования метода электронной дифракции вращения с фильтрацией электронов по энергиям для анализа трехмерной структуры биологических макромолекул приведем исследования группы К. Yonekura двух белковых комплексов на просвечивающем электронном криомикроскопе JEOL CRYOARM 300 (JEM-Z300FSC) (Koji Yonekura, Tetsuya Ishikawa, Saori Maki-Yonekura A new cryo-EM system for electron 3D crystallography by eEFD. Journal of Structural Biology, 2019. V. 206. Issue 2. P. 243–253).

Материалы и методы

Оборудование

Электронный просвечивающий микроскоп JEM-Z300FSC CRYOARM 300 оснащен электронной пушкой с холодной полевой эмиссией, работающей при ускоряющем напряжении до 300кВ, четырехлинзовым конденсором для параллельного освещения и встроенным в колонну энергетическим Ω-фильтром. Автоматический криозагрузчик предназначен для одновременной загрузки до трех сеточек с замороженными гидратированными образцами, одна из которых устанавливается на предметный столик в колонне для исследования. Загрузчик оборудован магазином для хранения образцов, двенадцать ячеек которого, как и предметный столик микроскопа охлаждаются автоматически подаваемым жидким азотом, что позволяет использовать JEM-Z300FSC как криомикроскоп. Специально разработанный гониометр обеспечивает стабильное равномерное вращение образца с различными скоростями. Под электронной колонной установлены две нижние КМОП-камеры, одна над другой: камера прямого электронного детектирования (DDD) Gatan K2 Summit (сверху) и камера сцинтилляторного типа Gatan OneView (снизу). Новый графический интерфейс пользователя (GUI) облегчает управление и увеличивает точность структурного анализа.

Программное обеспечение

Для обеспечения эффективного и быстрого сбора данных электронной дифракции вращения (рис. 1 и 2) был разработан пакет ParalleEM (рис. 1), работающий параллельно с другими программами управления микроскопом CRYOARM 300. В него входят четыре программы: SetDiff, Rotation, SamplePositioner и ChkLensDef.

Программа SetDiff (рис. 1a) позволяет быстро переключаться между тремя предварительно настроенными режимами работы

Рис. 1. Программы GUI, применяемые для сбора данных электронной дифракции вращения, входящие в пакет ParallelEM: а – SetDiff, б – Rotation, в – ChkLensDef, г – SamplePositioner

электронно-оптической системы, предназначенными для поиска (расфокусированная дифракция) и сбора данных (сфокусированная дифракция), обычно это режимы большой и малой доз облучения. При включении программа использует шестнадцатеричные значения токов линз (конденсора, объектива и промежуточных) и катушек дефлекторов (настройки проекционных линз) предыдущей сессии, а также позволяет загружать их из ранее сохраненного файла.

Программа Rotation (рис. 1б) управляет вращением предметного столика и синхронизирует его с экспонированием. Чтобы вращение при сборе данных было равномерным, гониометр нуждается в предварительном запуске и разгоне. В описываемых экспериментах была установлена задержка в один градус между запуском вращения и экспонированием, а также между перекрытием пучка и остановкой вращения. Программа Rotation не зависит от программы контроля камеры, поэтому может работать с любым детектором. Она сохраняет параметры вращения, токи линз (конденсора, объектива, промежуточных и проекционной) и катушек дефлекторов (выравнивания оси проекционной линзы), а также другие связанные данные для каждой серии вращений.

В программе SamplePositioner (рис. 1г) можно отмечать положение предметного столика и переходить к предварительно сохраненным меткам. Но, в основном, она используется для записи траектории движения предметного столика при сборе дифракционных данных. Голубая линия на рисунке – траектория движения предметного столика, зелеными точками отмечены позиции, выбранные для исследования.

Программа ChkLensDef проверяет параметры линз и выделяет красным те шестнадцатеричные величины, которые критично отличаются от предварительно настроенных значений. В приведенном на рис. 1в примере, это конденсор (CL3) и стигматор фильтра 1 по оси X (FLS1 X). Неправильная настройка последнего может привести к эллиптическим деформациям дифракционной картины. Установлены значения токов линз конденсора для управления интенсивностью пучка и параллельностью освещения, промежуточных линз для фокусировки пучка, а также настройки энергетического фильтра и его стигматоров.

Пакет ParallelEM специально разработан для CRYOARM 300, но может работать и с другими просвечивающими микроскопами JEOL, оснащенными функцией внешнего управления.

Рис. 2. Блок-схема сбора данных электронной дифракции

Образцы

Образец раствора бычьей каталазы был приобретен у компании Sigma-Aldrich. Небольшие тонкие кристаллы каталазы получали путем инкубации в калий-натрий-фосфатном буфере, при $pH = 5,3$ и $t = 4^\circ C$ в течение приблизительно месяца. Несколько микролитров суспензии кристаллов каталазы наносили на покрытую сплошной пленкой медную сеточку с 200 ячейками (200 mesh), удаляли избыток жидкости и быстро замораживали, погружая сеточку с образцом в жидкий этан при помощи самодельного плунжера.

Образец белкового комплекса протонного канала E.coli был подготовлен и кристаллизован при высоком pH . Попытки кристаллизации дали много мелких и тонких кристаллов, не пригодных для рентгеновской дифракции. Кристаллизационную каплю около одного микролитра и примерно два микролитра раствора наносили на медную сеточку, покрытую перфорированной пленкой (Quantifoil R1.2/1.3, Quantifoil Micro Tools GmbH), вручную промокали фильтровальной бумагой и замораживали в жидком азоте.

Сбор данных

Полученные замороженные гидратированные кристаллы исследовали при температуре около 96 K. Обзор всей сеточки для предварительного выбора подходящих для исследования ячеек и поиска кристаллов проводился либо при помощи программы SerialEM, либо с помощью улучшенной версии JADAS*.

Затем, переместившись в подходящую ячейку, при помощи программы SetDiff электронно-оптическую систему переключали в режим поиска для настройки позиции эвцентрики** на месте, не содержащем кристаллы, и затем уже перемещались на исследуемый кристалл. Поиск кристаллов внутри ячейки может проходить по записанным траекториям перемещения предметного столика или по меткам в программе SamplePositioner. На хороших кристаллах пучок быстро перекрывали, и электронно-оптическую систему переключали в режим фокусированной дифракции электронов и вставляли энергетический фильтр, который был настроен на пропуск электронов с потерей

* JADAS – JEOL Automated Data Acquisition System, специальное программное обеспечение JEOL для сбора данных на CRYOARM, входит в GUI.

** Позиция эвцентрики – действительный центр наклона. Положение гониометра по оси Z, в которой образец не смещается в поле зрения при наклоне образца.

энергии не более 10 эВ. Вращение гониометра запускали в программе Rotation вручную перед началом сбора видеоданных программой Gatan DigitalMicrograph. Экспозиция начиналась после поворота гониометра на один градус. Картины дифракции вращения с нулевыми потерями записывали на камеру OneView.

Кристалл освещался параллельным пучком 5 или 7,6 мкм. Гониометр вращался со скоростью 1,0 °/с для пространственной интеграции интенсивностей дифракционных рефлексов. С одного кристалла собирали 110÷120 кадров. Каждый кадр охватывал 0,644° поворота за 0,644 с. Это число использовано, как кратное минимальной продолжительности кадров (0,161) камеры OneView в режиме дифракции ($0,161 \times 4 = 0,644$). Итоговая доза на кадр составляла 0,03÷0,04 электронов / Å² (табл. 1). Общее время сбора данных – 70÷80 с. Rotation перекрывала пучок после заданного угла поворота и останавливала вращение предметного столика после поворота еще на один градус.

С помощью программы Rotation можно остановить вращение вручную после оценки картины дифракции. Съемку видео останавливали также вручную после или до остановки вращения гониометра. Данные обычно собирались по углу наклона от малого к большому при вращении по часовой стрелке. Rotation позволяет собирать данные дополнительно и в противоположном направлении, при вращении гониометра против часовой стрелки и наклоне от высокого к низкому. Такая схема использована для кристаллов ExbBD, потому что отсутствие симметрии не позволяет достроить данные о противоположных углах поворота, а низкий изоморфизм объединить данные от разных кристаллов.

Настройки электронно-оптической системы могут быть в любой момент проверены с помощью программы ChkLensDef для корректного освещения, увеличения, дифракции и энергетического фильтрования. Параметры системы стабильны в течение одного сеанса, продолжаясь несколько дней, поэтому корректировка токов линз и катушек дефлекторов минимальна.

Длина камеры и увеличение было откалибровано после окончания сеанса по кольцам, соответствующим параметрам решетки 2,3469 или 2,0325 Å, на картине дифракции поликристаллического золота, напыленного на графит рис. 3.

На рис. 2 показана блок-схема сбора данных. Программы, включенные в ParallelEM, выделены жирным шрифтом.

Рис. 3. Картина дифракции поликристаллического золота, нанесенного на графит: 1 – кольцо рефлексов кристаллов золота (111), с параметром решетки 2,3469 Å; 2 – кольцо рефлексов кристаллов золота (002), с параметром решетки 2,0325 Å. (Источник: JEOL RD department)

Дополнительно для сравнения такие же кристаллы были исследованы на микроскопе JEOL JEM-2100, с катодом из гексаборида лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Данные дифракции вращения собирались на камеру OneView без энергетического фильтра. Диаметр диафрагмы 400 мкм, что соответствует примерно 7 мкм в плоскости образца.

Структурный анализ

Серии данных дифракции вращения, сохраненные в формате GatanDM4, сначала были преобразованы в стеки MRC при помощи программы IMOD*, а потом конвертированы в формат SMV программой MRC2ADSC из пакета Mosflm**.

Наборы дифракционных данных кристаллов катализаторов обработаны с помощью программы

* IMOD – кроссплатформенный набор программ моделирования, отображения и обработки изображений, используемый для 3D-реконструкции и моделирования микроскопических изображений с особым акцентом на данные электронной микроскопии.

** Mosflm – пакет программ интеграции монокристаллических дифракционных данных с планарных детекторов. Обсчитывает параметры дифракционных рефлексов по данным с камеры детектора электронов (экранному изображению).

XDS*, также при ее помощи были уточнены длина камеры и другие параметры. Симметризацию проводили программами Pointless** и Aimless***. Кристаллическую структуру каталазы определяли методом молекулярного замещения, начиная с атомной модели каталазы (PDB ID: 3NWL), при помощи программы Phaser****. Полученные решения были единственными и имели высокие показатели (табл. 1). По данным электронной дифракции атомные модели уточнены с использованием коэффициентов рассеяния электронов в программе Phenix.refine****. Ручное моделирование для объективного сравнения не проводили. Данные и статистика уточнений приведены в табл. 1.

Наборы данных дифракции вращения кристаллов ExbBD обработаны в программе XDS аналогичным образом, пространственная группа была определена Pointless как C2. Два набора данных, снятых с одного кристалла при вращении в противоположном направлении, были объединены при помощи программы Aimless. Определение структуры проводили методом молекулярного замещения, начиная с атомной модели гексамера ExbBD (PDB ID: 5ZFP), программой Phaser. Результаты приведены в табл. 3. Модели были уточнены по данным электронной дифракции программой Phenix.refine.

* XDS – пакет программ для оптимизации (сокращения) данных 2D-изображений (кадров) рентгеновской дифракции вращения, записанных на планарном детекторе.

** POINTLESS – программа первичной обработки данных дифракции. Направлена на определение симметрии данных по точечным группам и вероятной пространственной группы и симметрии исследуемого кристалла.

*** AIMLESS – программа масштабирования, пришедшая на смену SCALA. После POINTLESS приводит все измерения к общему масштабу, усредняет измерения, связанные с симметрией рефлексов (используя симметрию, определенную ранее) и рассчитывает статистические показатели, которые обеспечивают первую важную оценку качества данных.

**** Phaser – программа для фазирования макромолекулярных кристаллических структур методами максимальной вероятности. Она была разработана группой Рэнди Реда в Кембриджском институте медицинских исследований (CIMR) Кембриджского университета.

***** Phenix.refine – пакет программ общего назначения для автоматизированного определения молекулярных структур с помощью рентгеновской кристаллографии и других методов. Phenix – Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography, иерархическая архитектура для интегральной кристаллографии на Python.

Результаты и обсуждение

Настройка системы и сбор данных

CRYOARM был разработан как для анализа отдельных частиц, так и для электронной трехмерной кристаллографии. О первом применении сообщено в статье [3], где описаны стабильность полевой электронной пушки и возможности системы для анализа отдельных частиц.

Применение второго метода позволило разрешить структуру двух белковых комплексов. Один набор данных дифракции вращения монокристалла с углами наклона от небольшого отрицательного до $\sim 68^\circ$ обычно набирается за 1÷1,5 мин. За это время интенсивность пучка холодной полевой пушки не успевает заметно упасть. Не ясно, повысилось ли качество дифракционных данных от использования пучка с высокой временной когерентностью, но, видимо, ее влияние на исследование кристаллических образцов не существенно. Электронная оптика, включая настройки параллельного освещения, дифракцию и энергетическое фильтрование, стабильна в течение одного сеанса длительностью 1÷2 дня.

Разработаны инструменты GUI, входящие в пакет ParallelEM (см. рис. 1), для набора данных электронной дифракции вращения от тонких трехмерных белковых кристаллов. Благодаря эффективной работе этих программ для получения хорошего набора данных было достаточно от половины в одном случае до двух дней – в другом. В качестве тестовых образцов использованы тонкие трехмерные кристаллы каталазы и ExbBD.

На рис. 4а показан пример кадра электронной дифракции вращения от кристалла каталазы при 300 кВ ускоряющего напряжения с фильтрацией электронов по энергиям, соответствующий набору данных 2 в табл. 1. Дифракционные максимумы видны по крайней мере до $\sim 3,1$ Å вдоль диагональной оси. Кромка кадра соответствует разрешению 3,0 Å. Справа отображаются профили интенсивности трех рефлексов, пронумерованных слева. Качество дифракционного рефлекса I/σ составляют: 15,0 для рефлекса 1 на разрешении 10,8 Å; 9,8 для рефлекса 2 на 5,0 Å; и 8,2 для рефлекса 3 на 3,1 Å.

На рис. 5а представлен пример такого кадра тонкого трехмерного кристалла ExbBD, соответствующий набору данных А в табл. 3. Кромка кадра соответствует разрешению 3,1 Å. Профили интенсивности трех рефлексов показаны аналогично рис. 4а. Значения I/σ составляют: 12,4 для рефлекса 1 на 9,9 Å; 10,7 для рефлекса 2 на 5,4 Å; и 6,4 для рефлекса 3 на 3,6 Å.

На дифракционных картинах электронной дифракции с нулевыми потерями (от нерассеянных и упруго рассеянных электронов) ясно видны

Таблица 1. Данные и статистика уточнений кристалла каталазы

Идентификатор		Набор данных 1	Набор данных 2	Набор данных 3
Сбор данных				
Длина волны электронов, Å		0,0197	0,0197	0,0251
Ускоряющее напряжение, кВ		300	300	200
Энергетический фильтр		+	+	-
Тип камеры		OneView	OneView	OneView
Длина камеры	Измеренная, мм	4 679	4 679	3 522
	IL1 (шестнадцатеричное)	545F	545F	51BC
	Уточненная, мм	4 659	4 705	3 505
Скорость вращения, °/с		1,00	1,00	1,68
Вращение на кадр, °/кадр		0,644	0,644	0,522
Доза на кадр, e ⁻ /Å ² /кадр		0,031	0,031	~0,06*
Пространственная группа		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Размер ячейки	a; b; c, Å	69,1; 171,9; 195,0	68,9; 172,1; 201,4	69,6; 174,1; 200,4
	α; β; γ, °	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90
Разрешение, Å	Максимальный угол с 3,0 Å	47,4	43,6	37,1**
	диапазон	3,13–3,00	3,15–3,00	3,16–3,00
Полнота, %		82,6 (81,1)	72,0 (67,9)	62,0 (62,2)
CC _{1/2} , %		80,8 (35,5)	87,2 (60,0)	70,0 (13,9)
R _{merge}		0,251 (0,526)	0,210 (0,367)	0,428 (1,50)
I/σ		3,2 (1,6)	3,5 (2,1)	2,0 (0,7)
Кратность		2,9 (2,7)	2,8 (2,5)	2,8 (2,8)
Количество кристаллов		1	1	1
Общая доза, e ⁻ /Å ²		2,9	2,5	~4,8*
MR решение для рентгеновской структуры				
LLG***		7 188	8 841	6 058
TFZ****		57,4	57,9	
Уточнение				
Разрешение, Å	Максимальный угол с 3,0 Å	47,4	43,6	34,6*****
	диапазон	(3,08–3,00)	(3,08–3,00)	(3,18–3,10)
R _{work}		0,251 (0,336)	0,207 (0,282)	0,245 (0,330)
R _{free}		0,283 (0,380)	0,251 (0,338)	0,301 (0,364)
Среднеквадратичное отклонение RMS	Длина связи, Å	0,006	0,008	0,003
	Угол связи, °	0,65	0,87	0,55
Карта Рамачандрана, %	Отлично	94,22	94,57	94,42
	Удовлетворительно	5,68	5,33	5,48
	Не совпадает	0,10	0,10	0,10
All-atomclashscore*****		2,62	4,84	2,00

* Грубая оценка на люминофорном экране.

** Скорректировано под набор данных, собранный при 300 кВ.

*** Log-likelihoodgain – логарифмический показатель правдоподобия [1]. LLG должен быть положительным и большим для вероятного решения. (LLG показывает, насколько лучше данные могут быть предсказаны из ориентированной модели, чем из модели случайной атомной структуры. Абсолютное значение LLG можно использовать для сравнения качества разных моделей с одними и теми же данными).

**** Z-оценка трансляционной функции [1]. TFZ > 8 говорит о вероятном решении.

***** Исключены данные с CC_{1/2} > 0,2 и I/σ = ~1.

***** Число конфликтных наложений атомов модели на 1000 атомов [2].

Таблица 2. Статистика уточнения кристалла каталазы в зависимости от задаваемой длины камеры

ID	Набор данных 2		
Длина камеры	Измеренная	Заданная	Заданная
Начальная, мм	4 679	4 609*	4 749*
Уточненная, мм	4 705	4 634	4 775
R_{work}	0,207	0,238	0,233
R_{free}	0,251	0,283	0,287

* $\pm 1,5\%$ от измеренного расстояния камеры (4679 мм).

дифракционные рефлексы по всей поверхности детектора (см. рис. 4а и 5а).

Для сравнения такие же кристаллы исследованы на обычном электронном криомикроскопе при 200 кВ ускоряющего напряжения без применения энергетического фильтра и данные дифракции вращения получены на такой же камере.

На рис. 4б показан пример кадра дифракции кристалла каталазы, соответствующий набору данных 3 в табл. 1. Значения I/σ трех пронумерованных дифракционных рефлексов составляют: 5,1 для рефлекса 1

Таблица 3. Данные и статистика уточнений кристаллов ExbBD

Идентификатор		Набор данных А	Набор данных Б
Сбор данных			
Длина волны, Å		0,0197	0,0251
Ускоряющее напряжение, кВ		300	200
Энергетический фильтр		+	–
Тип камеры		OneView	
Длина камеры	Измеренная, мм	4 851	3 522
	IL1 (шестнадцатеричное)	545A	51BC
	Уточненная, мм	4 856	3 510
Скорость вращения, °/с		1,00	1,68
Вращение на кадр, °/кадр		0,644	0,522
Доза на кадр, $e^-/\text{Å}^2/\text{кадр}$		0,038	~0,07*
Пространственная группа		C2	
Размер ячейки	$a; b; c, \text{Å}$	128,9; 74,7; 213,2	126,6; 72,8; 206,0
	$\alpha; \beta; \gamma, ^\circ$	90; 94,8; 90	90; 97,7; 90
Разрешение, Å	Максимальный угол с 3,2 Å	37,4	35,03**
	Разброс	3,42–3,20	3,42–3,20
Полнота, %		68,0 (68,6)	12,9 (11,0)
$CC_{1/2}, \%$		72,8 (16,0)	23,7 (0,9)
R_{merge}		0,283 (0,593)	0,395 (0,856)
I/σ		3,4 (2,0)	1,2 (0,6)
Кратность		3,2 (3,2)	2,2 (2,2)
Количество кристаллов		1***	1
Общая доза, $e^-/\text{Å}^2$		3,3 / 3,2***	~5,6*
MR решение для рентгеновской структуры			
LLG****		764,3	
TFZ*****		12,6	

* Грубая оценка на люминофорном экране.

** Скорректировано на набор данных, собранный при 300 кВ.

*** Два набора данных от одного кристалла с вращением в противоположную сторону были собраны в разных точках.

**** Log-likelihood gain – логарифмический показатель правдоподобия [1]. LLG должен быть положительным и большим для вероятного решения.

***** Z-оценка трансляционной функции [1]. TFZ > 8 говорит о вероятном решении.

на 7,7 Å; 6,8 для рефлекса 2 на 4,8 Å; 5,3 для рефлекса 3 на 3,3 Å.

Пример кадра электронной дифракции вращения, полученного на обычном криомикроскопе от кристалла ExbBD, соответствующий набору данных Б

а)

б)

Рис. 4. Картины электронной дифракции вращения тонких трехмерных кристаллов каталазы: а – кадр дифракции, полученный eEFD, соответствует набору данных 2 в табл. 1; край кадра соответствует разрешению 3,0 Å; б – одиночный кадр, снятый при 200 кВ без фильтрации энергии. Справа показаны профили интенсивности рефлексов, пронумерованных слева. Интенсивность дана в относительных единицах (Источник: Elsevier)

в табл. 3, показан на рис. 5б. Значения I/σ отмеченных рефлексов составляют: 10,6 для рефлекса 1 на 8,4 Å; 5,8 для рефлекса 2 на 4,3 Å; 5,6 для рефлекса 3 на 3,3 Å.

По профилям интенсивности видно, что применение энергетического фильтра значительно снижает шум, а качество I/σ отдельных рефлексов значительно лучше даже за пределами разрешения 3 Å за счет энергетической фильтрации (см. рис. 4 и 5).

Для расчета качества рефлексов I/σ в одном кадре использовали ранее разработанную программу EDINT, рассматривающую каждый кадр, как двумерную решетку в решетке P1. Для отображения трехмерного профиля этих рефлексов применяли программу XQED. Интенсивность показана в относительных единицах.

Анализ данных кристалла каталазы

Данные и статистика уточнения структуры кристаллов каталазы для двух лучших наборов данных представлены в табл. 1 (наборы данных 1 и 2). Основные показатели, отражающие качество данных и уточнение структуры (разрешение, полнота, $CC_{1/2}$, I/σ , LLG, TFZ и R_{free}), превосходят аналогичные для данных собранных на обычном криомикроскопе без энергетического фильтра при ускоряющем напряжении 200 кВ (набор 3 в табл. 1). Последний набор получен на образце из той же партии кристаллов, что и первые два, и является лучшим из собранных в течение двух дней.

Обычно сложно получить хорошие дифракционные рефлексы в ходе исследования при ускоряющем напряжении 200 кВ для углов наклона больше 40° – 50° , тем более без энергетического фильтра. С энергией электронов 300 кэВ удалось собрать данные до 65° и даже выше. Однако кристаллы не образовывали рефлексы за пределами 3 Å при больших углах наклона даже с Ω -фильтром, поэтому общее

разрешение наборов 1 и 2 в табл. 1 было ограничено 3,0 Å. В наборе 2 при удалении последних кадров с большим углом наклона, когда часть кристалла была закрыта полосой сетки, поддерживающей образец, получено лучшее значение R_{free} . Отметим, что

объединение нескольких наборов данных может привести к большим ошибкам из-за низкого изоморфизма кристаллов.

Набор данных 3 (200 кЭВ и без энергетической фильтрации) уступает результатам, собранным при таких же условиях группой Gonen [4] (набор данных 4 в табл. 4). Их данные были получены из кристалла с размером С ячейки примерно на 20 Å меньше (табл. 4). Ось С параллельна электронному пучку и меньший размер ячейки в этом направлении благоприятен с точки зрения проникновения электронов. Тем не менее, разрешение (3,0 против 3,2 Å), R_{work}/R_{free} и другие критерии полученных на CRYOARM (наборы данных 1 и 2 в табл. 1) данных значительно лучше, чем у Gonen (набор данных 4 в табл. 4).

Если ограничить данные из табл. 1 разрешением набора 4 (табл. 4), то большинство значений будет лучше для CRYOARM, что демонстрирует его преимущество.

Обнаружено, что длина камеры значительно влияет на статистику уточнения (табл. 2). Уменьшение на 1,5% длины камеры относительно откалиброванной привело к увеличению ошибки в R_{free} более чем на 3%. Длина камеры оптимизирована в ходе постобработки программой XDS. Такая же возможность недавно была реализована и в Refmac*, но уточнение, вероятно, попадает в локальные

* Refmac – программа макромолекулярного уточнения (REFinement of MACromolecular structures), написанная Гарибом Муршудовым в Йоркском университете (Garib Murshudov at the University of York). Одна из самых простых в использовании программ такого рода. Применяется после масштабирования и симметризации (например, POINTLESS и AIMLESS). Использует понятие максимального правдоподобия и некоторые элементы Байесовской статистики.

Рис. 5. Картины электронной дифракции вращения тонких трехмерных кристаллов белка EhbD: а – кадр дифракции, полученный eEFD; край кадра соответствует разрешению 3,0 Å; б – одиночный кадр, снятый на 200 кВ без фильтрации энергии. Справа показаны профили интенсивности рефлексов, пронумерованных слева. Интенсивность дана в относительных единицах (Источник: Elsevier)

Таблица 4. Сравнение данных и статистики уточнения кристаллов каталазы (наборы 1 и 2 из табл. 1 ограничены по разрешению 3,2 Å) с набором данных из [3]

Идентификатор	Набор данных 1	Набор данных 2	Набор данных 4*
Сбор данных			
Длина волны электронов, Å	0,0197	0,0197	0,0251
Ускоряющее напряжение, кВ	300	300	200
Энергетический фильтр	+	+	–
Тип камеры	Gatan OneView	Gatan OneView	TVIPS F416
Кристаллические данные, использованные в уточнении			
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Размеры ячейки $a; b; c$, Å	69,1; 171,9; 195,0	68,9; 172,1; 201,4	67,8; 172,1; 182,1*
$\alpha; \beta; \gamma$, °	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90*
Угол, при котором разрешение достигает 3,20 Å	47,4**	43,6**	21,2*
Диапазон разрешений, Å	3,37–3,20	3,39–3,20	3,4–3,20*
Полнота данных, %	82,8 (83,6)	72,6 (73,0)	79,4 (75,5)*
CC _{1/2} , %	82,0 (69,2)	88,5 (76,1)	89,1 (55,5)*
R _{merge}	0,233 (0,356)	0,199 (0,277)	0,175 (0,327)*
I/σ	3,5 (2,3)	4,1 (2,8)	3,4 (2,0)*
Множественность	3,0 (3,0)	2,9 (2,8)	2,4 (2,3)*
Количество кристаллов	1		
Общая доза, e [–] /Å ²	2,9	2,5	~6,8*
Уточнение			
Угол, при котором разрешение достигает 3,20 Å	47,4	43,6	21,2*
Диапазон разрешений (Å)	3,28–3,20**	3,28–3,20**	3,28–3,20*
R _{work}	0,254 (0,314)	0,204 (0,245)	0,262 (0,348)*
R _{free}	0,282 (0,327)	0,255 (0,280)	0,308 (0,382)*

* Взято из табл. 3 в [4].

** Разрешение ограничено 3,2 Å.

минимумы (табл. 2), что связано с короткой длиной волны электронов и большей протяженностью дифракционных максимумов в направлении, нормальном к пластине кристалла. Таким образом, лучше сразу начинать с оптимизации длины камеры.

В программу XDS предварительно введена измеренная длина камеры, и после уточнения длины и других параметров получены хорошие значения R_{free}, как показано в табл. 1. Длина камеры и увеличение непосредственно связаны с фокусировкой дифракционной картины с помощью промежуточной линзы 1 (IL1). Программа Rotation из пакета ParalleM сохраняет шестнадцатеричные значения токов линз и катушек дефлекторов для каждого режима сбора данных дифракции вращения.

Настройки IL1 не меняются в ходе одной сессии 1–2 дня, но могут различаться между сессиями (табл. 1 и 3). Это приводит к изменению длины камеры на несколько процентов (см. ниже). Поэтому после каждой сессии проводили калибровку длины камеры по золоту, напыленному на графит (рис. 3). С определенной периодичностью необходимо проверять отсутствие эллиптичности колец на изображении. Во время сбора данных также важно проверять настройки других линз и катушек дефлекторов с помощью ChkLensDef (см. рис. 1 и 2). Сбитые настройки могут привести к ошибкам в освещении и увеличении и вызвать искажение изображения, а непосредственно по дифракционной картине их контролировать невозможно (сравните рис. 3 и рис. 4 и 5).

Разрешенная таким образом трехмерная структура показана на рис. 6а. Серые сетки очерчивают электронную плотность на уровне $1,3\sigma$. Электронная плотность в основных и боковых цепях хорошо видна. Разностные фурье-карты, рассчитанные путем исключения всех молекул лигандов, то есть 4 гемов и 4 NADPH (дигидро никотинамидадениндинуклеотид), в то же время показывают четкие плотности, соответствующие гему и NADPH, как видно на рис. 6б и в. Зеленые сетки очерчивают электронную плотность по $2,5\sigma$ на рис. 6б и по $2,8\sigma$ на рис. 6в, углеродные связи в моделях гема и NADPH нарисованы зеленым. Изображения на рис. 6 подготовлены с помощью PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

Атомные координаты и структурные факторы для кристаллов каталазы были помещены в Банк данных белков (ProteinDataBank) под регистрационными номерами 6JNT (набор данных 1) и 6JNU (набор данных 2).

Анализ данных кристалла ExbBD

Следующий объект исследования более сложный – тонкий трехмерный кристалл мембранного белкового комплекса ExbBD, который использует протон-движущую силу для транспорта различных веществ через наружную бактериальную мембрану. Обычный электронный криомикроскоп с ускоряющим напряжением до 200 кВ и без энергетического фильтра не позволяет собирать данные из этих кристаллов с большими углами наклона (набор данных В в табл. 3).

Такие данные дифракции вращения были собраны при помощи CRYOARM 300. Но для увеличения полноты набора данных потребовалось дополнительное вращение, поскольку кристаллы принадлежали к пространственной группе C2, что отличает их от более крупных кристаллов ExbBD, использованных для рентгеновской кристаллографии. Объединение же наборов данных от разных кристаллов приводит к ухудшению статистики, как упоминалось выше. Поэтому объединяли только по два набора данных от одного и того же кристалла, снятые при движении в противоположных направлениях.

Четырехлинзовый конденсор CRYOARM 300 формирует параллельный пучок диаметром 5 и 7,6 мкм, что позволяет уменьшить облучение областей, окружающих экспонированную область исследуемого кристалла. Для этого, после окончания экспозиции, пучок смещали на свежий необлученный участок до следующей экспозиции. Большая площадь кристаллической пластины позволяла делать это.

По сравнению с предыдущим исследованием каталазы, точка фокусировки линзой IL1 (первой промежуточной линзой) изменилась. Это привело к изменению длины камеры на 3,8%, а край кадра соответствует разрешению $3,1\text{ \AA}$ (табл. 1). При этом кристаллы не формируют качественные дифракционные рефлексы за пределами $3,2\text{ \AA}$ при больших углах наклона. Разрешение ограничило этой величиной, и полнота объединенного набора данных достигла 68% (набор данных А в табл. 3). Проведено сравнение этих данных от CRYOARM с набором от

Рис. 6. Кристаллическая структура каталазы, определенная по набору данных 1 в табл. 1: а – построенная по распределению кулоновского потенциала разностная карта окрестности гема, наложенная на атомную модель, уточненную в настоящем исследовании; б, в – разностные фурье-карты окрестности гема (б) и NADPH (в) наложены на уточненную модель. Лиганды гем и NADPH в модели выделены зеленым

обычного криомикроскопа, собранных при ускоряющем напряжении 200 кВ без энергетической фильтрации (набор данных Б в табл. 3).

Набор Б – лучший из пяти, полученных в течение нескольких дней на различных кристаллах из той же партии, что и набор А.

Как видно из табл. 3, все статистические параметры для набора А превосходят аналогичные для набора Б. Полнота набора Б была низкой, поэтому молекулярную замену удалось провести только для данных, полученных на CRYOARM.

Разрешенная структура показала хорошее совпадение с полученной методом рентгеновской кристаллографии структурой гексамера ExbBD. Но уточнение структуры по данным электронной дифракции дало относительно высокие значения R_{work}/R_{free} ($\approx 35/37\%$). Это может быть связано с тем, что структурно белковые субъединицы отличаются при электронной и рентгеновской дифракциях.

Структурный анализ все еще продолжается.

Энергия электронов и энергетический фильтр

Средняя длина свободного пробега электронов с энергией 300 кэВ для стекловидного льда белкового раствора измерена как ~ 400 нм [5]. Причем для неупруго рассеянных электронов она намного меньше, чем для упруго рассеянных.

Замороженные гидратированные белковые кристаллы дают большое количество неупруго рассеянных электронов, что приводит к гораздо более высокому фоновому шуму при дифракции электронов, чем при дифракции рентгеновских лучей. Этот эффект сильнее для кристаллов с большей толщиной и для больших углов наклона. Фильтрация электронов по энергиям позволяет эффективно удалить потерявшие при неупругом рассеянии энергию электроны (рис. 4 и 5), так же как и многократно-рассеянные электроны, поскольку они, с большой долей вероятности, рассеивались неупруго хотя бы один раз. Более того, кулоновские потенциалы могут быть определены правильно только по упруго рассеянным электронам.

Средняя длина свободного пробега при ускоряющем напряжении 200 кВ, и тем более 100 кВ, значительно меньше, чем при 300 кВ, которое является самым высоким в современных криоэлектронных микроскопах высокого класса.

Также при неупругом рассеянии электроны вызывают «радиационное повреждение биологических образцов». Поглощенную дозу D_E можно посчитать как:

$$D_E = \frac{dose \cdot e \cdot V}{\rho_0 r_0},$$

где $dose$ представляет число поглощенных электронов на единицу площади, V – ускоряющее напряжение, $\rho_0 = 0,98$ г/см³ – плотность воды, r_0 – глубина проникновения для воды.

Справочные данные из (ICRU2014*) для произведения $\rho_0 r_0$ при различных ускоряющих напряжениях:

- $1,439 \cdot 10^{-2}$ г/см² для 100 кВ;
- $4,512 \cdot 10^{-2}$ г/см² для 200 кВ;
- $8,464 \cdot 10^{-2}$ г/см² для 300 кВ;
- $1,294 \cdot 10^{-1}$ г/см² для 400 кВ.

Используя коэффициент перевода ($1,602 \cdot 10^{-19}$ Дж/эВ), рассчитывая поглощенную дозу D_E для $e^-/\text{\AA}^2$ (D_E ; Дж/кг=Гр), получаем:

- $D_E(100 \text{ кВ}) = 1,091 \cdot 10^7$ Гр;
- $D_E(200 \text{ кВ}) = 6,960 \cdot 10^6$ Гр;
- $D_E(300 \text{ кВ}) = 5,565 \cdot 10^6$ Гр;
- $D_E(400 \text{ кВ}) = 4,854 \cdot 10^6$ Гр.

Предел Хендерсона**, используемый как критерий допустимой дозы поглощенной энергии биологическим криообразцом в рентгеновской кристаллографии определен как $\approx 2 \cdot 10^7$ Гр. Следовательно, полный набор трехмерных данных от монокристалла может быть собран при 300 кВ ускоряющего напряжения без достижения предела Хендерсона (табл. 1 и 3).

Соотношение поглощенных доз на один электрон:

- $D_E(100 \text{ кВ})/D_E(300 \text{ кВ}) = 1,961$,
- $D_E(200 \text{ кВ})/D_E(300 \text{ кВ}) = 1,251$,
- $D_E(300 \text{ кВ})/D_E(400 \text{ кВ}) = 1,147$.

Видно, что радиационное повреждение, вызванное одним электроном с энергией 300 кэВ, меньше на 96 и 25% по сравнению с 100 и 200 кэВ соответственно, но на 15% больше, чем 400 кэВ. Конечно, это лишь приближенная оценка для стекловидного льда. Последние исследования показали, что повреждение на один электрон 100 кэВ в парафине и пурпурной мембране в 1,6 раза больше, чем 300 кэВ [7].

Таким образом, можно сделать вывод, что криомикроскоп с ускоряющим напряжением 300 кВ и энергетическим фильтром очень полезен для 3D-кристаллографии белковых комплексов, особенно для сбора данных трехмерных кристаллов с большим наклоном.

* ICRU, 2014. Stopping Powers for Electrons and Positrons (Тормозная способность для электронов и позитронов). <https://www.nist.gov/document/update-estar-pstar-and-astar-databases>.

** Предел Хендерсона – рентгеновская доза (энергия на единицу массы), которую охлажденный до криогенных температур кристалл может поглощать до того, как дифракционная картина затухает до половины своей начальной интенсивности. Его значение определяется как $2 \cdot 10^7$ Гр (Дж/кг) [6].

Заключение

CRYOARM 300 хорошо работает в качестве прибора для трехмерной электронной кристаллографии в сочетании с пакетом ParallelEM, эффективно собирая качественные данные электронной дифракции вращения.

Шум, возникающий при нескольких проходах одного дифракционного кадра, ухудшает качество данных. Его влияние можно было бы уменьшить применением нового детектора, более подходящего для регистрации слабого сигнала дифракционных рефлексов от сильно наклоненных кристаллов.

Так же как и для рентгеновской кристаллографии, было бы желательно использовать камеры, регистрирующие отдельные кванты, чтобы уменьшить шум детектирования и увеличить качество собираемых данных.

Однако DDD-камеры, такие как K2 Summit, которые способны регистрировать одиночные электроны и широко используются для визуализации электронных изображений низкой интенсивности, не подходят для электронной дифракции, поскольку их устойчивость к облучению слишком мала, чтобы выдержать высокую интенсивность электронов высокой энергии вокруг прямого пучка.

Литература / References

1. McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Storoni L. C., Read R. J. Likelihood-enhanced fast translation functions // *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2005. V. 61 (Pt 4). P. 458–464.
2. Chen V. B., Arendall 3rd W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., Richardson D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2010. V. 66 (Pt 1). P. 12–21.
3. Motoki S. Development of Cryo High-Resolution Transmission Electron Microscope CRYO ARMTM 300, Equipped with Cold Field Emission Gun for Structural Biology // *JEOL NEWS* 2019. V. 54. No 1. P. 68–71. (Мотоки С. Новый инструмент для структурной биологии – просвечивающий полевой электронный микроскоп высокого разрешения CRYO ARM 300 // *АНАЛИТИКА*. 2019. Т. 9. № 6. С. 468–473).
4. Nannenga B. L., Shi D., Hattne J., Reyes F. E., Gonen T. Structure of catalase determined by MicroED // *eLife*. 2014. 3. Article e03600.
5. Rice W. J., Cheng A., Noble A. J., Eng E. T., Kim L. Y., Carragher B., Potter C. S. Routine determination of ice thickness for cryo-EM grids // *Journal of Structural Biology*. 2018. V. 204 (1). P. 38–44.
6. Henderson R. Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1990. V. 241. P. 6–8.
7. Peet M. J., Henderson R., Russo C. J. The energy dependence of contrast and damage in electron cryomicroscopy of biological molecules // *Ultramicroscopy*. 2019. V. 203. P. 125–131.

VI Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии

Программа конференции включает в себя пленарные лекции, устные доклады, постерные сессии, а также дискуссии в рамках круглых столов.

Научная программа будет включать в себя следующие темы и секции:

- Биологическая химия
- Медицинская химия
- Молекулярная биология
- Организация и проведение доклинических исследований кандидатов в лекарственные препараты
- Органическая химия
- Таргетная терапия
- Трансляционные исследования в медицине
- Фармакология
- Фармацевтика

Научные дискуссии пройдут в насыщенной творческой атмосфере на специально подготовленных для этого площадках, оснащенных всем необходимым оборудованием. Также запланировано неформальное общение с представителями разных научных школ и направлений.

Желающие принять участие в конференции или стать информационными партнерами могут получить всю необходимую информацию на нашем сайте: www.mobi-chem.org.