

Cryo-EM: Moleküler Görüntüleme ve Yeni Trendler

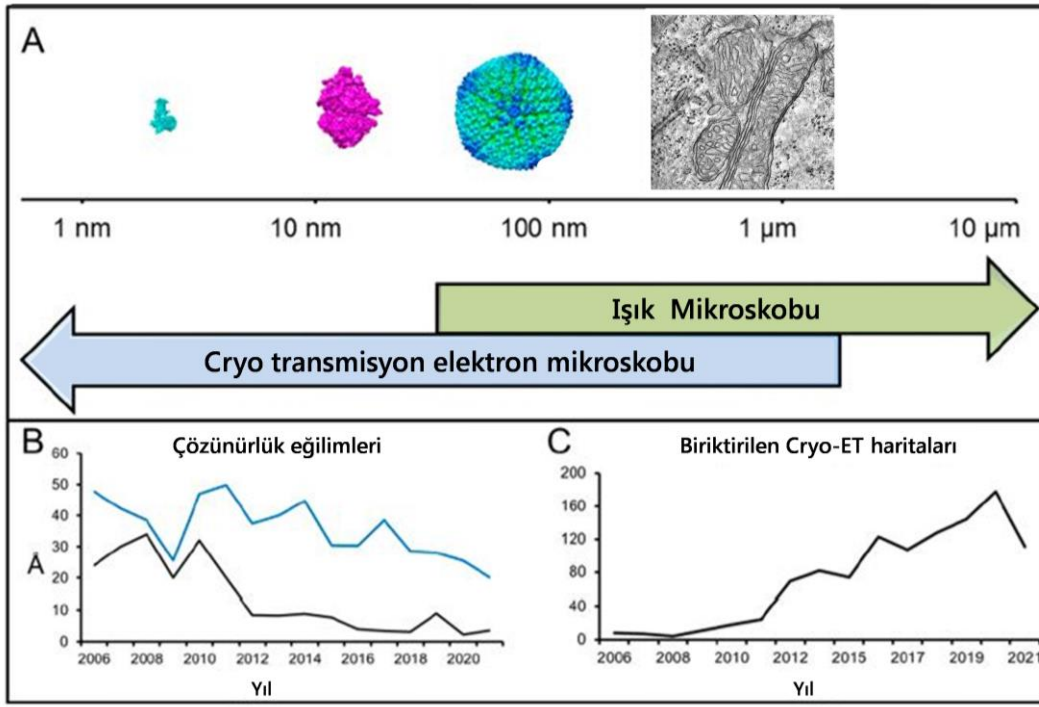
Yağmur Güzel^Y, İrem Coşkun^E

Cryo-EM (Kriyo-elektron mikroskobu), makromoleküllerin üç boyutlu (3B) yapılarının elde edilmesine yarayan ve **yapısal biyoloji** alanında devrim niteliğinde gelişim gösteren bir elektron mikroskobu (EM) tekniğidir. EM, teknik çeşitlilik bakımından zengin olup; çok küçük boyutlardaki proteinlerin atomik çözünürlükte yapı analizini ve canlı hücrelerdeki işlevlerinin anlaşılmasını amaçlamaktadır. Cryo-EM tekniği ile birlikte biyomedikal, nanoteknoloji, mikrobiyoloji ve yapısal biyoloji analizleri için virüsler, proteinler, oligomerik membran proteinleri gibi pek çok partikül ayrıştırılarak incelenebilmektedir¹. Jacques Dubochet, Richard Henderson ve Joachim Frank'ın "Çözeltideki Biyomoleküllerin Yüksek Çözünürlüklü Yapı Tayini İçin Cryo-EM Geliştirilmesi" alanında **2017 yılında Nobel Kimya Ödülü**'ne layık görülmelerinden itibaren devam eden önemli gelişmeler, Cryo-EM tekniğine artan bir ilgiye yol açmış ve özellikle yapısal biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmesini sağlamıştır^{2,3}.

Onlarca kilo daltondan (kDa) oluşan proteinlerin yapısal analizinde kullanılabilen Cryo-EM, kriyojenik sıcaklıklarda ($\leq -140^{\circ}\text{C}$) makromoleküllerin partiküler yapı tayinini düzenlemeyi içermektedir. Analiz öncesi hazırlık aşaması başlangıçta saflaştırılmış

numunenin uygun kararlılık ve homojenlik derecesine getirilmesinden oluşmaktadır. Mikromolar (μmol) seviyedeki çözeltiler delikli Cryo-EM gridleri (ızgara) üzerinde iyi dağılmış ve polidispers partiküller oluşturmaktadır^{2,3}. Cryo-EM ile günümüzde yaklaşık 1.5 Å'ya (Angstrom) kadar çözünürlüklü analizler mümkün olabilmektedir⁴.

Süreçte protein karışımı, 1-2 μm (mikrometre) boyutunda düzenli deliklere sahip bir karbon film ile sarılmış, Cu (bakır) veya Au (altın) gibi iletken bir maddeden yapılmış 3 mm çapında gridler üzerinde doldurulmaktadır. Gride totalde 3-5 μl (mikrolitre) örnek yüklenerek grid üzerinde dondurulmaktadır. Örneğe elektron demetlerinin işlenmesi sırasında ince bir tampon filmi oluşturmak amacıyla gridler filtre kâğıdıyla kurutulmaktadır. Elektron saçılımının stabilize edilmesi ve ışınların örneğe düzgün bir şekilde nüfuz etmesi açısından buz tabakalarının kalınlığının ideal olmasına dikkat edilmelidir. Kurutulduktan sonra grid, etkili bir kriyojen niteliğe sahip olan etan banyosuna alınarak dondurulmaktadır⁵. Makromolekül komplekslerinin işlevlerini incelemek için yapı analizi teknikleri ile görüntüleme arasındaki boşluğu, ışık mikroskobundan çok daha yüksek çözünürlüğe sahip olan EM doldurmaktadır (Şekil 1)⁶.



Şekil 1. Cryo-EM, sub-nm çözünürlük şeması⁶. (A) β_1 -adrenerjik reseptörü (mozaik, EMDB-22357), insan ribozomu (sarı, EMDB-2450), adenovirüsler (mavi ve yeşil) tek parçacık analizi üst sınırı (yeşil/mavi, EMDB-10768). Retinal mitokondrinin elektron tomogramı (EMDB-11125), EM ve ışık mikroskobunun örtüştüğü bir görüntü. (B) Sub-tomogram ortalaması ile çözülmüş haritaların çözünürlük aralığı; en yüksek çözünürlüğe (siyah) ve ortalama çözünürlüğe sahip haritalar (mavi). (C) EM veri tabanında saklanan tomografi haritalarının eğilimi.

Cryo-EM ve Yapı Analizi Aşamaları

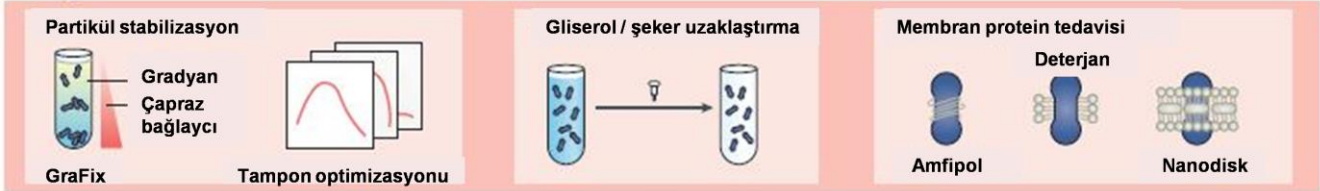
Cryo-EM ile yapı analizi iş akışı genel olarak; protein ekspresyonu ve saflaştırılması, negatif boyama, negatif boyama verilerinin toplanması, numunenin dondurulması, numunelerin Cryo-EM'e yüklenmesi, ekran (screen) örneği, verilerin toplanması ve 3B yeniden yapılandırılması aşamalarından oluşmaktadır; bununla birlikte görüntüleme ve kristal yapı tayini için farklı metotlar farklı aşamalar içerebilmektedir⁵. Örneğin, **tekli parçacık analizi (SPA)** olarak adlandırılan metot için bir takım spesifik ek aşamalar bulunmaktadır. Bunlar; numune hazırlama, EM grid hazırlama, görüntü elde etme ve görüntü işlemedir (Şekil 2)^{7,8}. Numune hazırlama aşamasında sağlamlığı korumak ve

görüntü kontrastını düşürmeden moleküllerin heterojenitesini azaltmak amaçlanmaktadır. Gliserol veya şeker gibi ajanlar, bir tampon değişim sütunu aracılığıyla Cryo-EM numunesinde güçlü bir görüntü arka planı oluşturmasından dolayı uzaklaştırılmaktadır. Membran proteinleri için, transmembran alan çoğunlukla amfipoller, zayıf deterjanlar veya nanodiskler ile dengelenmektedir⁶⁻⁸. EM grid hazırlığı aşamasında makromoleküllerin örnek gride yerleştirilmesi için negatif boyama ve cryo-numune olmak üzere iki farklı yöntem uygulanabilmektedir. Görüntü elde edilirken numune gridi bir transmisyon EM'ye dâhil edilmekte ve bir görüntü setine ulaşılarak kaydedilmektedir. Görüntü işleme esnasında bir 3B modeli yeniden kurmak için, elektron mikrografları tarafından kaydedilmiş veri

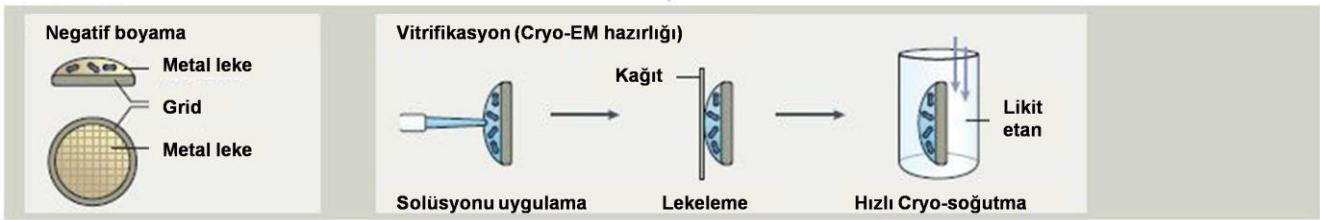
kümesi üzerindeki görüntüsü işlenmektedir. Moleküllerin parçacık olarak isimlendirilmiş 2B projeksiyonları elektron mikrografları üzerinde görselleştirilmektedir. Parçacıklar ayrı ayrı tek görüntü olarak seçilmektedir. Aynı görünümü

simgeleyen parçacık görüntülerinin daha sonra bir grupta toplanması ve aynı grup içindeki görüntülerin ortalamasının alınmasıyla sinyal-gürültü oranı iyileştirilebilmektedir^{7,8}.

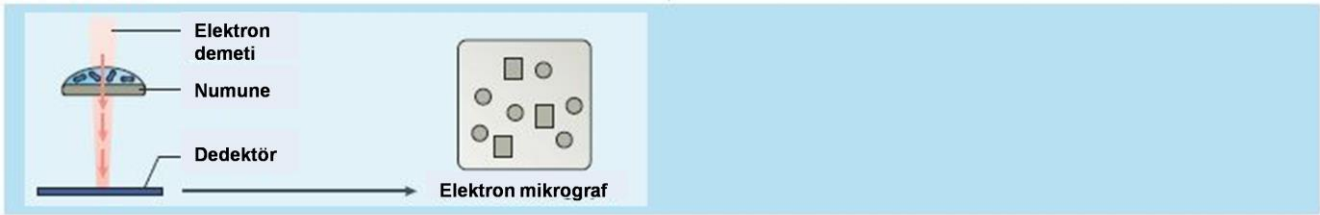
a Numune hazırlama



b EM grid hazırlama



c Görüntü edinme



d Görüntü işleme



Şekil 2. Cryo-EM, makromoleküllerin yapı tayininde takip edilen aşamalar⁷. Cryo-EM tekniği ile moleküler yapıların belirlenmesinde kullanılan adımlar şekilde gösterilmiştir. Numune tedavi (panel a), EM grid hazırlama (panel b), Görüntü elde etme (panel c) ve Görüntü işleme (panel d).

Cryo-EM Uygulama Alanları

Cryo-EM; makromoleküllerin ya da makromolekül komplekslerinin **gen ifadesi ve düzenlenmesi** ile ilgili yapısal analizlerde kullanılmaktadır. Kromatinin 3B yapısı ve kromatin yeniden modelleme sürecinde DNA translokasyonunun temel prensipleri Cryo-EM kullanılarak keşfedilmiştir⁹⁻¹². Protein sentezinde **ribozom ve proteozom** 3B yapısının elde edilmesi, bu yapıların

fonksiyonlarının yakından incelenmesi bakımından önemli rol üstlenmektedir¹³. Membran proteinlerinin saflaştırılması ve kristalleştirilmesinde yaşanan sorunlardan dolayı X-ışını kristalografisinde incelenmesi zor olduğundan; iyon kanalları, transportlar ve süpermembran protein kompleksleri gibi **membran proteinlerinin** Cryo-EM ile analizi hücrede farklılaşma, sinyal iletimi ve malzeme taşınımı gibi pek çok biyolojik sürecin

derinden araştırılmasında önemli katkılar sağlamaktadır¹⁴. **Virüslerin** Cryo-EM tekniğiyle 3B yapılarının tayini, konak hücredeki viral etkinin açığa çıkarılmasını ve aynı zamanda viroloji bağlamında terapötik ilaç hedeflerinin geliştirilmesini sağlayan günümüzdeki sıklıkla kullanılan yöntemdir¹⁵. Son yıllarda Alzheimer, Huntington ve Parkinson gibi birçok **nörobiyolojik** rahatsızlıkların sebebinin Cryo-EM aracılığıyla aydınlatılması amaçlanmaktadır¹⁶. Karmaşık bir düzene sahip olan **doğuştan gelen bağışıklık sistemi** (innate immune system) hücrelerinin moleküler mekanizmasının Cryo-EM ile incelenerek raporlanması da önem arz etmektedir¹⁷. Cryo-EM mikroskobu son yıllarda oldukça popülerlik kazanmış tek parçacık analizi (SPA) ve Cryo-elektron tomografisi (Cryo-ET) olmak üzere iki adet temel 3B yapısal analiz yaklaşımına sahiptir. Buna ek olarak Mikrokristal Elektron Kırınımı (MicroED) gelişmekte olup, son zamanlarda kullanımı hız kazanmıştır (Şekil 3)¹⁸.

1. SPA

Tek Parçacıklı Cryo-EM Analizi (Single Particle Analysis, SPA), biyomolekül komplekslerinden elde edilen görüntülerin teker teker dizilenerek 3B rekonstrüksiyon yapılandırmasını içeren ve saflaştırılmış makromoleküllerin fonksiyonunu *in vitro* olarak inceleyen bir Cryo-EM görüntü işleme tekniğidir. SPA, 2-4 Å çözünürlükteki 3B haritaların oluşturulması ve görüntülerdeki makromoleküllerin yapısal olarak incelenmesi için kullanılmaktadır. Cryo-EM'de

görüntülenmek amacıyla üzerinde çalışılan örnekler, SPA süresince temel bir geçit olan numune hazırlama aşamasında uzun bir süreçten geçmektedir. Numune hazırlanırken örneklerin ince buz tabakasında bulunmaması, komplekslerin denatürasyona uğraması ve parçalara ayrılması gibi bazı problemler de yaşanabilmektedir¹⁹.

2. Cryo-Elektron Tomografisi (Cryo-ET)

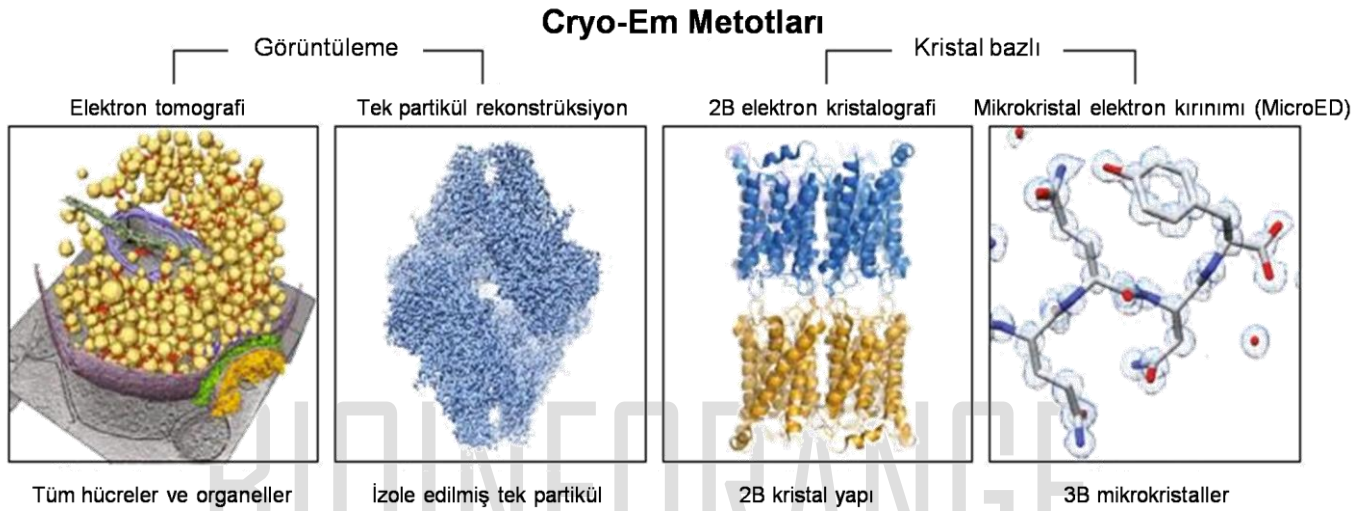
3B yapının 2B görüntülerden rekonstrüksiyonu, partiküllerden çıkıntılar arasındaki açıların belirlenmesine dayanmaktadır⁶. Cryo-ET ile, doğal ortamındaki biyomolekül numunesinin mikroskoptaki eğimiyle çok yönlü 2D projeksiyon görüntüsü elde edilmesi sonrasında hesaplama ile 3B yapının rekonstrüksiyonu yapılabilmektedir²⁰. Azami ~5 µm kalınlıktaki hücrelere plunge freezing (dalma dondurma) ve 5 µm üzerindeki kalınlığa sahip hücrelere high-pressure freezing (yüksek basınçlı dondurma) ile vitrifikasyon (yavaş kontrollü dondurma) işlemi uygulanabilmektedir. Mikromanipülasyon, deneysel ihtiyaçlara göre birleştirilen opsiyonlu adımları kapsamaktadır. CLEM (Correlative light and electron microscopy) işleminde, hedef bölgelerin analiz edilmesi için Cryo-Floresan Mikroskobu'ndan (cryo-FM) yararlanılmaktadır. FIB-milling, numunelerin istenilen boyutta inceltilmesini ve Cryo-FIB lift-out ise büyük numunelerin parçalarının analiz edilmesini sağlamaktadır. Vitreus bölümlerinin Cryo-elektron mikroskobu (CEMOVIS), büyük numunelerin ilk düzenlemesi için

kullanılabilmektedir. Son olarak örnekler bilgisayar destekli tomografiye benzer bir yöntemle elektron demetleri kullanılarak görüntülenmektedir²¹.

3. Mikrokristal Elektron Kırınımı (MicroED)

Hem 2B elektron kristalografisi hem de MicroED tekniği, maddenin kristal dizilerini kullanmaktadır. Bu iki farklı Cryo-EM

tekniklerinin arasındaki temel fark, MicroED'nin 3B ve elektron kristalografisinin 2B olmasından kaynaklı veri toplama ve işlem tekniklerinin aynı olmamasından kaynaklanmaktadır. MicroED verileri, Cryo-EM aşamaları sürekli olarak döndürülürken bir film olarak toplanmakta ve sonrasında hedef madde yapısı görüntülenebilmektedir¹⁸.



Şekil 3. Cryo-EM uygulama alanları¹⁸.

Avantajlar ve Güncel Gelişmeler

Cryo-EM tekniğinin avantajları arasında; doğal yapıdaki makromoleküller üzerinde derin inceleme ve çok küçük boyuttaki moleküllerin yüksek çözünürlükte gözlemlenmesi örnek olarak gösterilebilmektedir. Buna karşın Cryo-EM tekniği sürecinde bazı mevcut sınırlamalar da bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; incelenecek numunenin bozulmuş, kararsız veya toplanmış olması, moleküler ağırlığı düşük olan bazı ligandların yoğunluk haritasında görülememesi, tamponda numune çözünürlüğünü düşürebilecek bazı şeker ve gliserin gibi istenmeyen maddelerin bulunması, numune homojenliğinin zayıf

olması ve konsantrasyonu, numunelerin dondurulma esnasında tahrip olma olasılığı, sıcaklık, grid özellikleri gibi parametrelerdir²². Biyomoleküllerin 3B yapılarının yüksek çözünürlükte görüntülenebilmesi, ilaç keşiflerindeki uygulamaların hız kazanmasını sağlamıştır. Nispeten yeni bir teknik olan Cryo-EM yaklaşımındaki olası sınırlamalar ve bilinmeyenlerin yanıtlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır⁷. Moleküler yapıların özgün doğaları dolayısıyla 3B yapı analiz tahminleri için kullanılan değişik teknikler arasında Cryo-EM, geleneksel analiz yöntemleri ile kıyaslandığında *de novo* modeller oluşturabilmek için gelişmeye açık nefes kesici bir alan olarak öne çıkmaktadır.

Referanslar:

1. Richert-Pöggeler, K. R., Franzke, K., Hipp, K., & Kleespies, R. G. (2019). Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses. *Frontiers in microbiology*, 9, 3255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03255>
2. Lyumkis D. (2019). Challenges and opportunities in Cryo-EM single-particle analysis. *The Journal of biological chemistry*, 294(13), 5181–5197. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.005602>
3. Murata, K., & Wolf, M. (2018). Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1862(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.020>
4. Bhella D. (2019). Cryo-electron microscopy: an introduction to the technique, and considerations when working to establish a national facility. *Biophysical reviews*, 11(4), 515–519. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00571-w>
5. Costa, T., Ignatiou, A., & Orlova, E. V. (2017). Structural Analysis of Protein Complexes by Cryo Electron Microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1615, 377–413. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_28
6. Wang, Z., Zhang, Q., & Mim, C. (2021). Coming of Age: Cryo-Electron Tomography as a Versatile Tool to Generate High-Resolution Structures at Cellular/Biological Interfaces. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6177. <https://doi.org/10.3390/ijms22126177>
7. Renaud, J. P., Chari, A., Ciferri, C., Liu, W. T., Rémigy, H. W., Stark, H., & Wiesmann, C. (2018). Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(7), 471–492. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77>
8. Shigematsu H. (2020). Electron cryo-microscopy for elucidating the dynamic nature of live-protein complexes. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1864(2), 129436. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129436>
9. Zhan, X., Yan, C., Zhang, X., Lei, J., & Shi, Y. (2018). Structure of a human catalytic step I spliceosome. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6375), 537–545. <https://doi.org/10.1126/science.aar6401>
10. Wan, R., Yan, C., Bai, R., Wang, L., Huang, M., Wong, C. C., & Shi, Y. (2016). The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6272), 466–475. <https://doi.org/10.1126/science.aad6466>
11. Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xu, R. M., Zhu, P., & Li, G. (2014). Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6182), 376–380. <https://doi.org/10.1126/science.1251413>
12. Yan, L., & Chen, Z. (2020). A Unifying Mechanism of DNA Translocation Underlying Chromatin Remodeling. *Trends in biochemical sciences*, 45(3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.09.002>
13. Brown, A., Amunts, A., Bai, X. C., Sugimoto, Y., Edwards, P. C., Murshudov, G., Scheres, S., & Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6210), 718–722. <https://doi.org/10.1126/science.1258026>
14. Gong, X., Qian, H., Zhou, X., Wu, J., Wan, T., Cao, P., Huang, W., Zhao, X., Wang, X., Wang, P., Shi, Y., Gao, G. F., Zhou, Q., & Yan, N. (2016). Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell*, 165(6), 1467–1478. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.022>
15. Yuan, S., Wang, J., Zhu, D., Wang, N., Gao, Q., Chen, W., Tang, H., Wang, J., Zhang, X., Liu, H., Rao, Z., & Wang, X. (2018). Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6384), eaao7283. <https://doi.org/10.1126/science.aao7283>
16. Yang, G., Zhou, R., Zhou, Q., Guo, X., Yan, C., Ke, M., Lei, J., & Shi, Y. (2019). Structural basis of Notch recognition by human γ -secretase. *Nature*, 565(7738), 192–197. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0813-8>
17. Shen, C., Sharif, H., Xia, S., & Wu, H. (2019). Structural and mechanistic elucidation of inflammasome signaling by Cryo-EM. *Current opinion in structural biology*, 58, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.033>
18. Nannenga, B. L., & Gonen, T. (2019). The Cryo-EM method microcrystal electron diffraction (MicroED). *Nature methods*, 16(5), 369–379.

[https://doi.org/10.1038/s41592-019-](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0395-x)

19. Danev, R., Yanagisawa, H., & Kikkawa, M. (2019). Cryo-Electron Microscopy Methodology: Current Aspects and Future Directions. Trends in biochemical sciences, 44(10), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.008>

20. Benjin, X., & Ling, L. (2020). Developments, applications, and

[0395-x](https://doi.org/10.1002/pro.3805)

prospects of cryo-electron microscopy. Protein science : a publication of the Protein Society, 29(4), 872–882. <https://doi.org/10.1002/pro.3805>

21. Turk, M., & Baumeister, W. (2020). The promise and the challenges of cryo-electron tomography. FEBS letters, 594(20), 3243–3261.

<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13948>

22. Yin Chang-Cheng (2018). Structural biology revolution led by technical breakthroughs in cryo-electron microscopy. Chinese Physics B, 27(5), 10. doi:101088/1674-1056/27/5/058703

BIOINFORANGE