

# Радиационные повреждения в криомикроскопии: всегда ли во вред?

Е.В.Печникова, М.П.Кирпичников, О.С.Соколова

В попытках обойти дифракционный предел, связывающий максимально возможное разрешение микроскопа с длиной волны излучения, специалисты по оптической микроскопии дошли до столь изощренных методов, что недавно удостоились Нобелевской премии. Более естественный путь повышения разрешения выбрала микроскопия электронная: максимально снизить саму длину волны (использовать электроны с короткой длиной волны, т.е. с высокой энергией). При формировании изображений с помощью электронов дифракционный предел может быть смещен в субангстремную область. Разумеется, длина волны — не единственный фактор, определяющий достигаемое разрешение: на него влияют aberrации линз микроскопа, некогерентность пучка частиц, механическая нестабильность колонны микроскопа и окружающего его пространства, например, вибрации, сильные электромагнитные поля, скачки температуры. Все это приводит к уменьшению способности микроскопа передавать информацию о мелких деталях структуры объекта. Но у электронной микроскопии есть и более существенный недостаток: при облучении вещества высокоэнергичными электронами может произойти его радиаци-



**Евгения Викторовна Печникова**, младший научный сотрудник лаборатории электронной микроскопии Института кристаллографии им.А.В.Шубникова РАН. Занимается трехмерной реконструкцией белков, молекулярным моделированием, изучает структуру вирусов растений.



**Михаил Петрович Кирпичников**, академик, доктор биологических наук, декан биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, заведующий кафедрой биоинженерии этого факультета. Область научных интересов — генная инженерия и биоинженерия.



**Ольга Сергеевна Соколова**, доктор биологических наук, доцент той же кафедры. Специалист в области структурной биологии и электронной криомикроскопии.

онное повреждение. Особенно критично оно для биологических образцов, когда сохранность объекта изучения становится решающим фактором. В результате повреждения информация о тонких деталях объекта исследования оказывается утерянной.

© Печникова Е.В., Кирпичников М.П., Соколова О.С., 2015

## Потери и борьба с ними

Характер взаимодействия электронов с веществом зависит от их энергии и состава образца. Одни электроны проходят через образец без каких-либо взаимодействий, другие отклоняются электростатическим полем атомного ядра, экранированным электронами атомов, а некоторые могут сталкиваться с ядрами, рассеиваясь под большим углом или даже отражаясь назад. Какие-то из взаимодействующих частиц меняют свои траектории без потери энергии, а какие-то — передают часть своей энергии образцу (рис.1).

При *упругих* взаимодействиях кинетическая энергия падающего пучка электронов остается неизменной. Лишь незначительная часть подобных столкновений может повреждать образец, выбивая (knock-on) атомы со своих мест. Большинство лучевых повреждений вызывается *неупругими* соударениями, когда падающий пучок передает часть своей энергии образцу. Вероятность и тех и других взаимодействий (несущих информацию упругих и повреждающих неупругих) обратно пропорциональна величине ускоряющего напряжения катода [2]. Поэтому, если мы увеличиваем его, стремясь к все более высокому разрешению, нам придется (чтобы сохранить информативность) делать большим и время выдержки. А это означает, что и число радиационных дефектов вырастет... Есть ли выход из такой, казалось бы, безнадежной ситуации?

Чтобы ответить на этот вопрос, рассмотрим причины и следствия электронно-лучевого повреждения.

Переданная электронами энергия может ионизировать атомы в образце, вызывать рентгеновское излучение, инициировать перегруппировку химических связей. В итоге изменяется структура

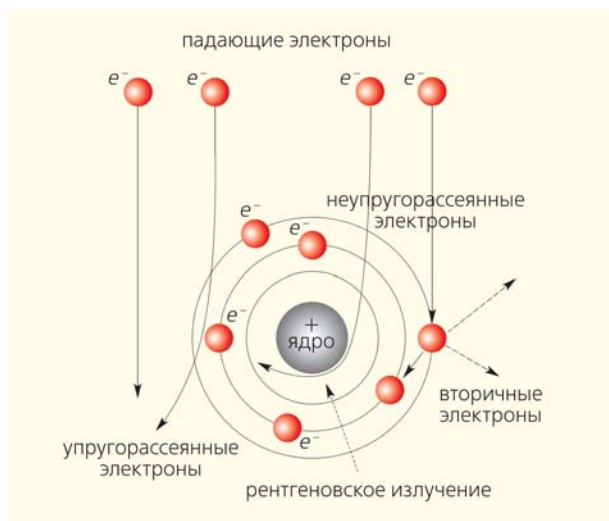


Рис.1. Траектории электронов, взаимодействующих с веществом образца [1].

образца, и, следовательно, получаемые данные не будут адекватно отображать его исходное строение. Используемые в микроскопии энергии электронов в сотни килоэлектронвольт значительно превышают энергии ковалентных связей (порядка нескольких электронвольт). Наибольшие повреждения наносятся образцу, когда падающие электроны теряют от  $\approx 5$  до  $\approx 100$  эВ своей энергии (в среднем  $\approx 20$  эВ) [3]. Эти потери идут по большей части на возбуждение валентных электронов (которые и образуют ковалентные связи), на разрыв связей, на эмиссию вторичных электронов, а в биологических объектах — на появление свободных радикалов. Этот процесс называется *первичным повреждением*. Свободные радикалы, в свою очередь, запускают каскад реакций, именуемый *вторичным повреждением*.

Для минимизации повреждений и искажения результатов в электронной микроскопии есть несколько подходов.

Во-первых, уменьшают экспозицию и время облучения образца. Типичные значения электронной экспозиции, выбираемые для биологических объектов, составляют от 1 до 20  $e/\text{Å}^2$ . Хотя некоторые биологические образцы и могут выдерживать воздействие в 100—500  $e/\text{Å}^2$  (в зависимости от химического состава и температуры), детали, требующие высокого разрешения, претерпевают изменения уже при экспозициях от 10  $e/\text{Å}^2$  и менее. Таким образом, радиационное повреждение определяет условия эксперимента и ограничивает разрешение регистрируемых биологических структур. Во-вторых, для снижения повреждений во время выбора зоны, выравнивания и фокусировки пучка электронов применяются специальные системы «низкой дозы», чтобы блокировать луч до последнего шага — получения изображения. Однако малые выдержки, как уже пояснялось, приводят к потере разрешения, шумным изображениям и, как следствие, к недостатку высокодетализированных данных. Это, в свою очередь, усложняет последующий процесс обработки изображений для определения трехмерной структуры объекта. Для таких коротких выдержек становится критически важной способность детектора воспринимать каждый попавший на него электрон.

## Заморозить, чтобы защитить

В целях сохранения структуры образца в 80-х годах XX в. была впервые применена криомикроскопия, позволяющая изучать биообъекты путем помещения их в моментально замороженный слой воды — «аморфный лед» (рис.2). Для этого используют специальные сетки, которые покрыты слоем углерода с маленькими отверстиями. На такую сетку наносят суспензию с образцом, а избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. В итоге тонкий слой жидкости (до 500 мкм), содержащий

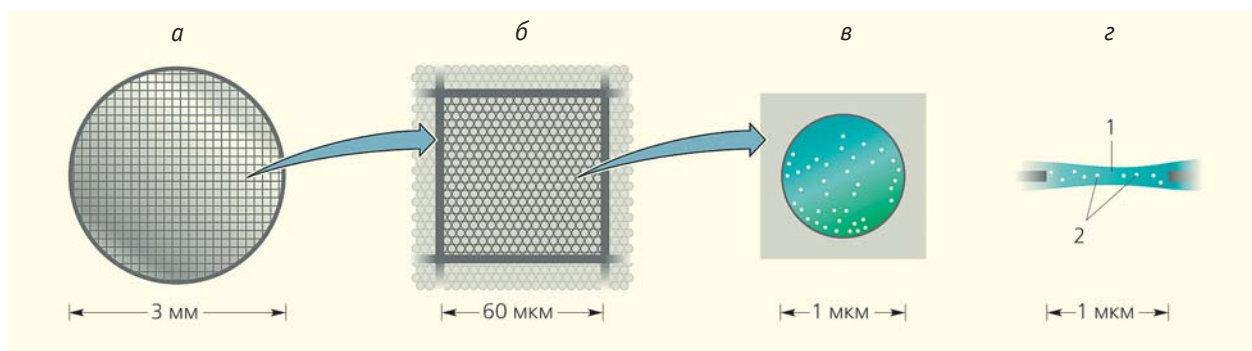


Рис.2. Схематическое изображение подготовки образца для изучения в криомикроскопе. Медная сетка, на которую нанесен слой углерода с отверстиями (а). Ячейка сетки с большим увеличением (б). Слой углерода, содержащий отверстие, заполненное аморфным льдом (в). Поперечный срез отверстия в углеродном слое (г): 1 — слой аморфного льда, 2 — изучаемые частицы в окружении аморфного льда [4].

объект исследования, сохраняется только в отверстиях углеродной пленки (рис.2,г). Затем сетку опускают в жидкий этан или пропан для быстрой заморозки. Скорость заморозки должна быть высокой, чтобы молекулы воды в суспензии не успели перегруппироваться и образовать кристаллический лед. Кристаллы льда, поглощая электроны, мешают идентифицировать образец, а кроме того, разрушают в ходе своего роста мембраны клеток и макромолекулы.

Разрыв химических связей происходит при любых температурах, следовательно, охлаждение не влияет на первичное повреждение образца. Однако холод замедляет движение молекул, т.е. тормозит вторичное повреждение [5]. Низкие температуры позволяют улучшить разрешение в диапазоне от 20 до 60 Å, однако для более высокого разрешения это правило не действует. Как показывает практика, использовать в эксперименте температуры ниже температуры жидкого азота не имеет смысла, так как в этом случае меняется качество льда и быстро падает контраст [6].

К сожалению, в приготовленных указанным способом препаратах неизбежно *третьичное повреждение* белков — из-за образования газовых пузырей (рис.3). Последние порождаются появляющимся в замороженном образце газообразным водородом [7]. Сначала под действием пучка электронов происходит радиолиз воды:  $H_2O \Rightarrow H\cdot + OH\cdot$ . В толще льда эти радикалы объединяются обратно в  $H_2O$ , однако вблизи белковых молекул они вступают в реакцию с атомами водорода из этих органических соедине-

ний:  $OH\cdot + R-H \Rightarrow RO\cdot + H_2$ . Пузыри образуются предпочтительнее близ поверхности молекулы, соприкасающейся со льдом, нежели внутри белка [8]. Газ выделяется в таких количествах, что давление внутри пузыря может достигать тысячи атмосфер [7]!

С развитием детекторов электронов и разработкой устройств с возможностью прямой регистрации частиц (Direct detectors) появился новый способ минимизировать электронно-лучевые повреждения образца. Устройства с прямой регистрацией электронов позволяют получить за секундную выдержку от 16 до 400 кадров. Благодаря специальной процедуре обработки можно выровнять и сложить изображения одной и той же белковой частицы со всех полученных кадров (рис.4). Таким образом компенсируется движение частиц во льду, происходящее за время длительной выдержки. С помощью данной методики получения изображений можно корректировать не только вызываемый пучком электронов сдвиг частиц, но и эффекты лучевого повреждения. Для этого из всего набора полученных за время выдержки изображений берут для дальнейших расчетов лишь несколько первых, суммарное время экспозиции которых мало. Комбинация этих двух подходов позволила в последние два-три года существенно улучшить разрешение получаемых трехмерных реконструкций — до 3–4 Å [10].

Опыт показывает: наиболее чувствительны к лучевому повреждению остатки цистеина, аспартата и глутамата (рис.5). Некоторые из дисульфидных

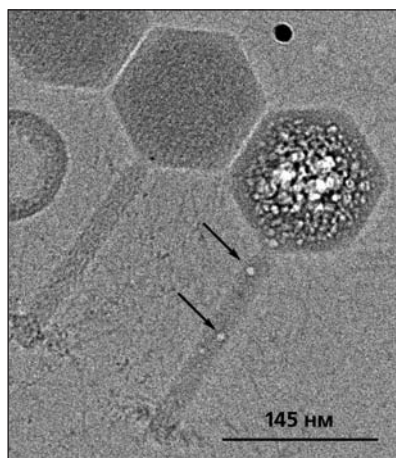


Рис.3. Электронно-лучевое повреждение образца в криомикроскопии. Бактериофаги EL, замороженные в аморфном льде: без повреждений (левый) и идентичный бактериофаг после облучения высокой дозой электронов (правый). Заметны пузыри газообразного водорода (стрелки).



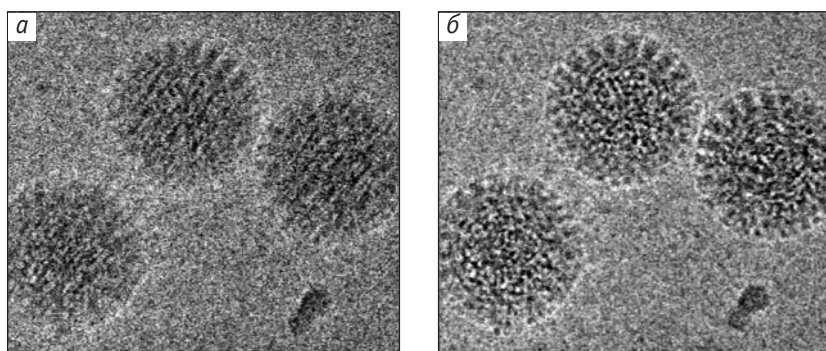


Рис.4. Кривоизображения вирусов с высокой четкостью, полученные благодаря коррекции смещения частиц. Суммарное изображение 60 последовательных кадров с ротавирусом DLPs без коррекции (а) и после коррекции сдвига и поворота (б). Диаметр вирусной частицы — 80 нм. [9].

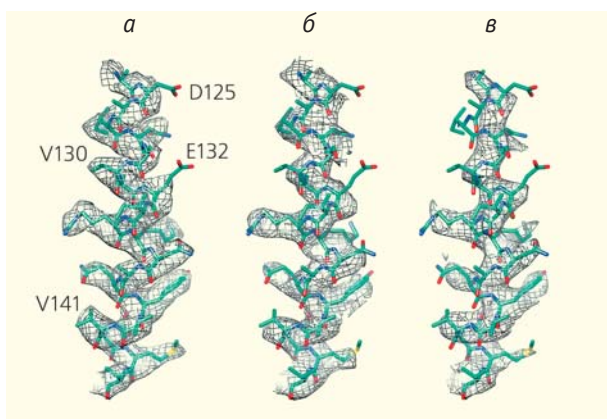


Рис.5. Влияние лучевого повреждения на разрешение трехмерной реконструкции белковой молекулы. Реконструкция 124—144 аминокислот альфа-спирали F420-гидрогеназы, рассчитанная с применением изображений, полученных с низкой дозой электронов  $\approx 10 \text{ e}/\text{Å}^2$  (а, разрешение 3.36 Å), увеличенной дозой  $\approx 24 \text{ e}/\text{Å}^2$  (б, разрешение 3.94 Å), высокой дозой  $\approx 49 \text{ e}/\text{Å}^2$  (в, разрешение 4.16 Å). Боковые цепи аминокислот Asp125 и Glu132 подверглись повреждению уже при первом облучении [10].

связей в белке повреждаются уже при электронной дозе в  $5 \text{ e}/\text{Å}^2$  и при ускоряющем напряжении в 1 МэВ. Каталитические центры ферментов также подвержены повреждениям, так как находятся в конформациях с измененной геометрией белка, которая дестабилизирует структуру аминокислот.

### Неожиданная польза

Интересно отметить, что в противовес вышеописанному негативному влиянию на электронно-микроскопические изображения лучевые повреждения в некоторых случаях могут предоставить ценную структурную информацию. Это касается комплексов, образованных белковыми молекула-

ми с нуклеиновыми кислотами. Было замечено, что при облучении таких гетерогенных комплексов повышенной дозой электронов ( $\approx 40\text{--}50 \text{ e}/\text{Å}^2$ ) газовые пузыри образуются быстрее и при более низкой дозе, чем при облучении белок-белковых комплексов. Это может быть связано с тем, что нуклеиновые кислоты, находясь в тесном контакте с белком, нарушают диффузию продуктов радиолиза от места образования, приводя к их быстрому локальному накоплению [11]. В результате газовые пузыри образуют специфический паттерн, повторяю-

щий очертания белково-нуклеинового комплекса. Если теми же самыми дозами электронов облучать свободные нуклеиновые кислоты, пузырей не наблюдается. В ситуациях, когда белок неразличим на фоне окружающей его нуклеиновой кислоты, картина лучевого повреждения, хорошо видимая на криоизображениях, позволяет судить о наличии и размерах расположенных внутри белковых частиц. Некоторые авторы предложили для подобного явления термин «bubblegram», или «круговые паттерны горения».

Подобные паттерны наблюдались при изучении строения капсидов бактериофагов, содержащих ДНК. Так, был подробно изучен процесс зарождения газовых пузырьков при облучении частиц бактериофага T7 высокими дозами электронов [11], и оказалось, что выделение газа начинается только после накопления критической концентрации продуктов радиолиза. Мощность дозы электронов влияет на возникновение пузырьков, и ее необходимо оценивать заранее для минимизации повреждения. Другой параметр, который необходимо учитывать, — температура. Диффузия продуктов радиолиза от места их образования идет тем медленнее, чем температура ниже. Поэтому при гелиевых температурах накопление продуктов радиолиза может привести к более раннему электронно-лучевому повреждению, чем при температуре жидкого азота. Повреждения такого рода наблюдались при томографических экспериментах.

В заключение приведем еще один любопытный пример информационной пользы картины повреждений. Гигантские phiKZ-подобные бактериофаги содержат внутри капсида белковое «внутреннее тело», вокруг которого плотно упакована ДНК вируса. Оно имеет вытянутую, предположительно цилиндрическую, форму, однако детально определить структуру внутреннего тела до недавнего времени не представлялось возможным. Помог случай: делая пару снимков одной и той же частицы phiKZ с низкой дозой электронов ( $\approx 10\text{--}20 \text{ e}/\text{Å}^2$ ) и с дозой в несколько раз большей, ученые замети-

ли, что на первом изображении (рис.6,а) частицы не повреждены и внутреннее тело незаметно на фоне окружающей его ДНК. А на втором изображении внутри того же капсида видны образующиеся пузырьки, формирующие характерную продолговатую фигуру паттерна горения (рис.6,б). Линейные размеры области, в которой происходит выделение пузырей, позволяют реконструировать приблизительные размеры и расположение внутреннего белкового тела. По паттерну горения, образующемуся после облучения высокой дозой электронов, определяют углы ориентации внутреннего тела в неповрежденном капсиде. Эти углы используют в дальнейшем для расчета трехмерной реконструкции внутреннего тела [13].

Итак, электронно-лучевое повреждение, с одной стороны, накладывает ограничения на разрешение, получаемое при исследовании биологических образцов. С другой стороны, совершенствование приборной базы позволяет криоэлектронной микроскопии получать изображения, содер-

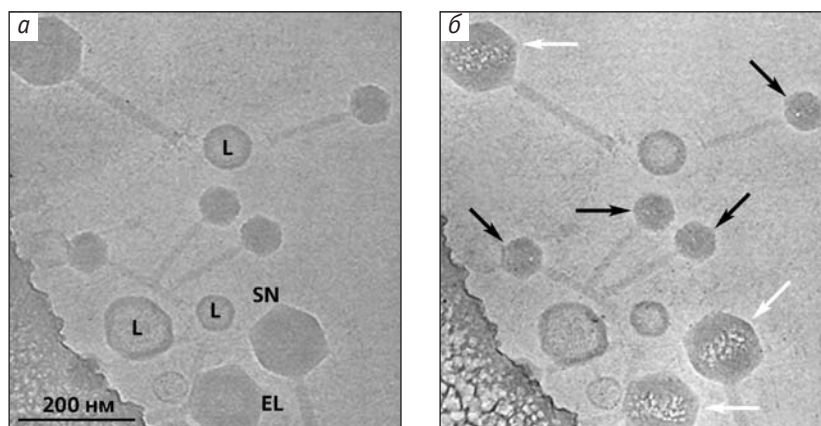


Рис.6. Визуализация внутреннего тела в капсиде бактериофага EL с помощью облучения высокой дозой электронов. Изображение смеси фагов EL (большие частицы) и фагов SN (малые частицы), снятое в режиме низкой дозы электронов ( $\approx 10\text{--}20 \text{ e}/\text{\AA}^2$ , а). То же поле зрения после дополнительной экспозиции (доза  $\approx 40\text{--}60 \text{ e}/\text{\AA}^2$ , б). Белые стрелки указывают на повреждение в области внутреннего тела в фагах EL. Фаги SN, не имеющие внутреннего тела, повреждаются в вершинах капсида (черные стрелки). L — липосомы [12].

жащие информацию о все более и более мелких деталях структуры. Благодаря появлению новых подходов к обработке изображений стало возможным зло обратить во благо — использовать лучевое повреждение для локализации объекта и уточнения его трехмерной структуры. ■

**Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00031).**

## Литература

1. Orlova E.V., Saibil H.R. Methods for three-dimensional reconstruction of heterogeneous assemblies // *Methods in enzymology*. 2010. V.482. P.321—341.
2. Henderson R. 1995. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules // *Q. Rev. Biophys.* 1995. V.28. P.171—193.
3. Langmore J.P., Smith M.F. 1992. Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice // *Ultramicroscopy*. 1992. V.46. P.349—373.
4. Wang L., Sigworth F.J. Cryo-EM and single particles // *Physiology (Bethesda)*. 2006. V.21. P.13—18.
5. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A. et al. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy // *J. Mol. Biol.* 1990. V.213. P.899—929.
6. Wright E.R., Iancu C.V., Tivol W.F., Jensen G.J. Observations on the behavior of vitreous ice at approximately 82 and approximately 12 K // *J. Struct. Biol.* 2006. V.153. P.241—252.
7. Leapman R.D., Sun S. Cryo-electron energy loss spectroscopy: observations on vitrified hydrated specimens and radiation damage // *Ultramicroscopy*. 1995. V.59. P.71—79.
8. Hankamer B., Glaeser R., Stahlberg H. 2007. Electron crystallography of membrane proteins // *J. Struct. Biol.* 2007. V.160. P.263—264.
9. Brilot A.F., Chen J.Z., Cheng A. et al. Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film // *J. Struct. Biol.* 2012. V.177. P.630—637.
10. Allegretti M., Mills D.J., McMullan G. et al. Atomic model of the F420-reducing [NiFe] hydrogenase by electron cryo-microscopy using a direct electron detector // *eLife*. 2014. V.3:e01963.
11. Cheng N., Wu W., Watts N.R., Steven A.C. Exploiting radiation damage to map proteins in nucleoprotein complexes: the internal structure of bacteriophage T7 // *J. Struct. Biol.* 2014. V.185. P.250—256.
12. Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V. et al. 2014. Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa* // *Virology*. 2014. V.468—470. P.472—478.
13. Wu W., Thomas J.A., Cheng N. et al. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage phiKZ // *Science*. 2012. V.335. P.182.