NATIONAL INSTITUTE OF CHEMISTRY
SI-1001 Ljubljana
Hajdrihova 19, POBox 660
Phone: +386 (0)1/476 02 00
Fax: +386 (0)1/476 03 00
http://www.ki.si

Minisimpozij z nobelovcem in inavguracija krio-TEM

6. september, 2019

Velika predavalnica na Kemijskem inštitutu

VPRAŠANJA IN ODGOVORI

1. Kakšen je naziv novega mikroskopa?

Krio-transmisijski elektronski mikroskop (krio-TEM). Proizvajalec je Thermo Fisher Scientific. Gre za najnovejši model mikroskopa, ki deluje pri 200 kV in se komercialno imenuje Thermo Scientific™ Glacios™.

2. Kaj je krio-elektronska mikroskopija?

Krio-elektronska mikroskopija (krio-EM) je ena izmed metod, ki se uporablja v strukturni biologiji za določanje tridimenzionalnih struktur molekulskih sistemov, kjer meritve potekajo v območju kriogenih temperatur (cca. –180°). Vzorci, pripravljeni v zamrznjenih (vitrificiranih) oblikah so obsevani z visokoenergetskim žarkom elektronov. Nastali sipani elektroni nato prehajajo skozi lečo in posledično dobimo na detektorju povečane slike naših vzorcev. Iz teh slik nato rekonstruiramo strukture opazovanih molekulskih sistemov v treh dimenzijah pri visokih ločljivostih, blizu atomskim.

Ključna prednost te metode je, da omogoča določanje strukture molekul v zelo širokem velikostnem območju in v naravni obliki, ter tudi opazovanje različnih strukturnih stanj, v katerih se lahko nahaja ena molekula (dinamika molekul) . Na osnovi tega lahko dobimo natančnejši vpogled v mehanizem delovanja opazovanih molekul ter njihovo biološko funkcijo. S to tehniko lahko vidimo položaje posameznih atomov in tudi vezavo majhnih molekul na biološke tarče, kar je še posebej pomembno pri razvoju zdravil, torej za farmacevtsko industrijo. To tehniko pa lahko uporabljamo tudi za opazovanje drugih, tudi nebioloških molekulskih sistemov, ki jih razvijamo v sintetski biologiji, ter raznih hibridnih materialov, ki se lahko uporabljajo v nanotehnolgiji.

3. Zakaj je pomembna krioelektronska mikroskopija?

Eno ključnih spoznanj strukturne biologije je, da tridimenzionalna struktura molekul določa njihovo funkcijo. Začetki elektronske mikroskopije segajo v prvo polovico prejšnjega stoletja, v zadnjem desetletju pa je ta tehnika izjemno napredovala predvsem zaradi razvoja postopkov priprave kakovostnih vzorcev za delo pri nizkih temperaturah, tehnološkega razvoja mikroskopov in detektorjev, pa tudi zaradi programske opreme za obdelavo podatkov. V strokovni literaturi se za ta izjemen napredek v krio-EM zelo pogosto uporablja izraz »revolucija v ločljivosti«.

S krio-EM danes pri visoki ločljivosti določamo strukture velikih bioloških molekul in molekularnih strojev, kot je denimo kromatin, pa tudi strukture različnih tipov nukelinskih kislin, intracelularnih veziklov, membranskih por, jedrnih por, ribosomov, proteasomov, ionskih kanalčkov, virusov itd. Poleg tega prihaja v zadnjem času tudi do velikega napredka pri določanju struktur (vse manjših)

SI-1001 Ljubljana
Hajdrihova 19, POBox 660
Phone: +386 (0)1/476 02 00
Fax: +386 (0)1/476 03 00
http://www.ki.si

posameznih bioloških molekul. Še več, s to metodo lahko pridobimo informacije o različnih konformacijah iste molekule. To omogoča izdelavo animacij, ki ponazarjajo, kako molekule v procesu delovanja znotraj celice spreminjajo svojo strukturo. Nedavno so znanstveniki pokazali, da s krio-EM lahko spremljamo tudi vezavo zdravilnih učinkovin na biološke tarče, kar je zelo pomembno za farmacevtsko industrijo ter za razvoj zdravilnih učinkovin.

Prednost krio-EM je torej, da lahko določamo strukturo molekul v zelo širokem velikostnem območju. Spodnja meja velikosti molekul, ki jih lahko določamo s krio-EM, se nenehno pomika navzdol in je danes že pod 60 kDa in se še niža. Vsekakor pa je krio-EM edinstvena metoda za določanje struktur velikih bioloških molekul oziroma njihovih kompleksov. Poleg tega omogoča, da proteini v procesu meritev ostanejo blizu svojega nativnega stanja, kar omogoča bolj verodostojen vpogled v njihovo funkcijo. Omogoča pa tudi opazovanje molekul v kontekstu celic in tkiv.

4. Kaj vse omogoča novi krioelektronski mikroskop?

Krio-EM se v glavnem deli v dva dela: na analizo posameznih delcev (ang. single-particle analysis) ter krio-EM tomografijo. Pri analizi posameznih delcev izmerimo posamezne dvodimenzionalne projekcije tisočih, tudi milijonov, bioloških objektov iste vrste, ki so naključno porazdeljeni v zamrznjenem vzorcu (vitrificiranem ledu). S pomočjo matematičnih algoritmov nato izberemo, prerazporedimo in povprečimo te dvodimenzionalne projekcije, kar nam omogoči izgradnjo končne tridimenzionalne strukture.

Drugi pristop, krio-EM tomografija, pa zajema zbiranje več slik istega objekta. S premikanjem kota opazovanja tega objekta relativno na elektronski žarek, lahko zgradimo tridimenzionalno strukturo opazovanega objekta. Ta metoda se veliko uporablja v primeru zelo velikih objektov, kot so celični organeli in same celice. Oba pristopa sta medsebojno komplementarna, torej ju je možno tudi kombinirati.

Naš novi mikroskop Glacios pa bo imel še eno možnost, ki jo imajo trenutno le redki mikroskopi te vrste. Ustrezna konfiguracija mikroskopa bo omogočala sipanje elektronov na mikrokristalih molekul, podobno kot je pri x-žarkovni kristalografiji sipanje x-žarkov na kristalih. To bo dalo mikroskopu še eno posebno dimenzijo, saj bomo na ta način lahko določali strukture tako majhnih kakor velikih molekul, bioloških in nebioloških, celo iz mešanice kristalov. Ta metoda je lahko zelo uporabna tudi za farmacevtsko industrijo (npr. analiza vsebnosti komponent v zdravilih ipd).

5. Katerih znanstvenih raziskav si na KI in v Sloveniji brez krioelektronske mikroskopije danes ne moremo več predstavljati?

Krio-EM je pomemben predvsem za proučevanje velikih bioloških molekulskih sistemov v naravnem stanju. Ti sistemi so velikokrat strukturno dinamični, v mnogih primerih so vezani tudi na celične membrane, zato jih ni mogoče proučevati z drugimi pristopi strukturne biologije, kot sta x-žarkovna kristalografija in jedrska magnetna resonanca. Raziskave na Kemijskem inštitutu in tudi drugod po Sloveniji postajajo vse bolj kompleksne, osredotočajo se tako na velike biološke komplekse kot na dinamične strukture, tako na biološke, kot na tiste, ki so pripravljene na osnovi sintetične biologije. Naše raziskave hkrati postajajo tudi vse bolj interdisciplinarne. Pri tem ustvarjamo razne hibridne (nano)materiale, ki so sestavljeni iz sintetičnih in naravnih komponent, in ki jih lahko opazujemo v glavnem samo s krio-EM. Poleg tega pa lahko s to metodo tudi proučujemo vezavo (majhnih) molekul (npr. potencialnih inhibitorjev delovanja) na velike biološke molekule, kar je prav tako zanimivo za farmacevtsko industrijo. Velik delež naših raziskav torej potrebuje pristop krio-EM.

NATIONAL INSTITUTE OF CHEMISTRY
SI-1001 Ljubljana
Hajdrihova 19, POBox 660
Phone: +386 (0)1/476 02 00
Fax: +386 (0)1/476 03 00
http://www.ki.si

Naj poudarimo še, da določenih eksperimentov doslej sploh nismo mogli izvajati ali pa smo jih lahko izvajali le na osnovi sodelovanja z drugimi raziskovalnimi institucijami, kar pa tudi ni tako samoumevno. Prav zato je dosegljivost take visokotehnološke opreme v neposredni bližini naših laboratorijev ključen dejavnik za uspešen in hiter razvoj slovenske znanosti.

6. Kakšne je cena novega mikroskopa in kdo je financiral nakup?

Ta investicija, ki je vključevala mikroskop, dve napravi za pripravo vzorcev, nekaj manjših komponent za normalno delovanje mikroskopa, ter potrebne manjše posege v prostor, kjer je mikroskop nameščen, je vredna približno 2,5 mio EUR. Večji delež je financiral Kemijski inštitut, približno petino Agencija za Raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), manjše deleže pa so prispevale še Fakulteta za Kemijo in kemijsko tehnologijo UL, Fakulteta za farmacijo UL ter Nacionalni inštitut za Biologijo.

7. Kakšni so bili pogoji za namestitev novega mikroskopa? So bili potrebni novi, posebej prilagojeni prostori?

Novi mikroskop se nahaja v kletnih prostorih Preglovega raziskovalnega centra (PRC) na Kemijskem inštitutu. Celotna zgradba PRC, še posebej njeni kletni prostori, so bili zgrajeni namensko za namestitev različnih kompleksnih raziskovalnih metodologij kot so elektronska mikroskopija in jedrska magnetna resonanca. Te aparature so zelo občutljive in zahtevajo ustrezno temperaturo, vlago, izolacijo od mehanskih, magnetnih, električnih in ostalih okoljskih vplivov. Prostora, ki ju potrebujemo za namene krio-EM, sta bila torej že v veliki meri pripravljena, morali smo ju le še dodatno opremiti z dodatnim prezračevanjem, pregradno steno in potrebnimi napeljavami.

8. Kdo je Joachim Frank, Nobelov nagrajenec, ki je eden od začetnikov razvoja krioelektronske mikroskopije, in ki ga bomo gostili na Kemijskem inštitutu?

Prof. dr. Joachim Frank, ki bo častni gost in osrednji predavatelj tokratnega minisimpozija, je dobitnik Nobelove nagrade za kemijo leta 2017. To prestižno nagrado si je prislužil s ključnim prispevkom pri razvoju krio-eleketronske mikroskopije, revolucionarne metode za določanje strukture biomolekul v nativni obliki pri visoki ločljivosti. Joachim Frank, ki je doktoriral na Tehniški univerzi v Münchnu, je profesor na Odseku za biokemijo in molekulsko biofiziko ter na Odseku za biološke znanosti na Univerzi Columbia s sedežem v New Yorku. Je tudi član ameriške Nacionalne akademije za znanost. Še več podatkov o Frankovem življenju in delu najdete na povezavah:

https://www.ki.si/novice/single-prikaz/novice/novica/preglov-kolokvij-prof-dr-joachim-frank-nobelov-nagrajenec/

https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/frank/facts/

Kontakt za medije:

Nataša Jager Radin, natasa.jager.radin@ki.si, 031 336 838 ali 01 476 04 78

Brigita Pirc, brigita.pirc@ki.si, 041 960 396 ali 01 4760 225