Pozsgai Imre

Krio-elektronmikroszkópia a fehérjék szerkezetének és az Alzheimer-kór kutatásában, továbbá a gyógyszertervezésben

FIZIKA FELSŐFOKON

TYPOTEX

Pozsgai Imre

Krio-elektronmikroszkópia a fehérjék szerkezetének és az Alzheimer-kór kutatásában, továbbá a gyógyszertervezésben

Pozsgai Imre

Krio-elektronmikroszkópia a fehérjék szerkezetének és az Alzheimer-kór kutatásában, továbbá a gyógyszertervezésben

Kézirat

TYPOTEX

© Pozsgai Imre, Typotex, Budapest, 2026

Tartalomjegyzék

Előszó 7

I. A krio-elektronmikroszkópiáról dióhéjban 8

Irodalom 14

II. Makromolekulák krio-EM és röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatának összehasonlítása 17

Irodalom 22

III. Újabb krio-EM fejlesztések 23

III.1. 100-200 kV-os krio-EM direkt elektron detektorral 23

III.2. 300 kV-os krio-EM direkt elektron detektorral 27

III.2.1. 100 kV, 200 kV és 300 kV-os gyorsítófeszültségű krio-EM-ek összehasonlítása 28

III.3. Műszaki háttér: direkt elektron detektorok (DED) 29

III.3.1. Monolitikus (MAPS) és hibrid pixeles direkt elektron detektorok 30

III.3.2. Nyquist elmélete 33

III.3.3. Képkockaalapú (frame-based) és eseményalapú (event-based) adatkiolvasás a direkt elektron detektorokban 35

Irodalom 36

IV. Fehérjék krio-EM SPA vizsgálatának gyakorlati vonatkozásai 38

IV.1. Krio-EM SPA minták szűrővizsgálata 38

IV.2. Krio-EM rostély-előkészítés 40

IV.3. Adatgyűjtés 44

IV.4. A krio-EM felbontása 46

Irodalom 48

V. Sejtmembránok krio-EM SPA szerkezetvizsgálata 50

V.1. A sejtmembrán 50

V.2. Membránfehérjék előkészítése krio-EM SPA-ra 51

V.2.1. Felületaktív anyagok 51

V.2.2. Amfipolok, nanodiszkek 52
V.2.3. Felületaktív anyagok hatása az elektronmikroszkópos kép minőségére 55
V.3. Ioncsatornák szerkezetének krio-EM SPA vizsgálata 56
V.3.1. Transzmembrán fehérje 175, (TMEM175), K^+ szelektív lizoszómális ioncsatorna 59
V.3.2. TMEM 87A (GolpHCat) ioncsatorna krio-EM SPA vizsgálata 63
V.4. G-protein-kapcsolt receptorok krio-EM vizsgálata 68
V.4.1. Kalciumérzékelő receptorok krio-EM vizsgálata 70
Irodalom 82
VI. Krio-EM az Alzheimer-kór kutatásában 86
VI.1. Amiloid-béta 42 (Aβ42) fibrillek krio-EM vizsgálata 88
VI.1.1. Aβ42 krio-EM vizsgálata Yang (2022) 88
VI.1.2. Aβ42 krio-EM vizsgálata Lee (2023) 94
VI.2. Az amiloid-β 40 fibrillek krio-EM vizsgálata 100
VI.2.1. Aβ40 krio-EM vizsgálata, Kollmer (2019) 100
VI.2.2. Aβ40 krio-EM vizsgálata, Yang (2023) 102
VI.3. Krio-EM és tau fehérje 107
VI.3.1. Alzheimer-kóros agyból származó tau filamentek krio-EM vizsgálata (Fitzpatrick 2017) 109
Irodalom 113
VII. A krio-elektronmikroszkópia szerepe a gyógyszertervezésben 116
VII.1. GLP-1 receptor agonisták 118
Irodalom 124
VIII. Függelék 126
Néhány rövidítés angol és magyar jelentése 129

Előszó

A könyvben gyakran fordulnak elő zárójeles kifejezések, amelyek célja, hogy könnyítsék az olvasást. Alkalmazásuk a következő esetekben fordul elő:

- (NAGYBETŰ SZÁM) formátum az idézett irodalomra vonatkozik. Ezek egy része folyóiratokban fellelhető cikkek, ekkor a „NAGYBETŰ” az első szerző nevét, a „SZÁM” szó a cikk megjelenésének évét jelenti. Amikor a „NAGYBETŰ” intézményekre, cégekre vonatkozik, akkor az évszám hiányzik, mert a cégek az esetek túlnyomó többségében nem közölnek évszámot. A harmadik lehetőség az, hogy a „NAGYBETŰ” a YouTube-ra vagy a Wikipediára utal, ekkor az évszám hiányát az információnak az internetről való letöltési ideje helyettesíti. A könyv mindegyik fejezetéhez külön irodalom jegyzék tartozik.
- (kisbetűs zárójeles angol kifejezés) célja az, hogy az interneten utána lehessen keresni a szóban forgó témának angol nyelven. Másrészt számos olyan angol kifejezéssel találkozunk, amelynek eddig nem volt a magyar megfelelője. Ilyenkor az angol kifejezés kapcsolatot létesít az angol és a magyar szakirodalom között.

A gyakrabban előforduló rövidítések angol és magyar kifejtése a könyv végén megtalálható.

Jó szórakozást!

A szerző

I. A krio-elektronmikroszkópiáról dióhéjban

A krio-elektronmikroszkópia alatt a biológiai minták nagyon alacsony hőmérsékletű, nagyfelbontású, transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatát fogjuk érteni. A „nagyon alacsony hőmérsékletek" kifejezés a cseppfolyós nitrogén forráspontja (-196 ^{o}C) körüli hőmérsékletekre vonatkozik. A legmagasabb megengedett mintahőmérséklet a mikroszkópban -140 ^{o}C körül van, mert ennél magasabb hőmérsékleten az amorf állapotú jég kristályosba megy át és ez károsítja a minta szerkezetét. Krio-hőmérsékleten végeznek reflexiós üzemmódú pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatokat is, de ezekkel nem foglalkozunk, tekintettel arra a nagy felbontásra, amit csak a transzmissziós elektron mikroszkóp ad meg.

A krio-elektronmikroszkópos (továbbiakban krio-EM) vizsgálatok célja háromdimenziós rekonstrukció és atom modell készítése kétdimenziós elektronmikroszkópos képekből, hogy szerkezeti információt nyújtsanak a szerkezetbiológusoknak a sejtek vagy molekulák működésének megértéséhez. A krio-EM-en belül megkülönböztetünk egyedi részecskék analízisét (SPA, Single Particle Analysis), krio-elektrontomográfiát (krio-ET) és mikro-elektrondiffrakciót (mikro-ED). (A mikro-ED nem azonos transzmissziós elektronmikroszkópiából ismert mikrodiffrakcióval, ugyanis ez utóbbi esetben a mikro- előtag a vizsgált terület méretére, a mikro-ED-nél pedig a vizsgált kristály méretére vonatkozik). A krio-EM-ről már jelent meg magyar nyelvű tankönyv (POZSGAI 2023).

Mi ebben a könyvben csak az egyedi részecskék analízisével (SPA) fogunk foglalkozni. Vizsgálódásunkat a fehérjék, azon belül is a membrán fehérjék szerkezetének és az Alzheimer-kórnak a kutatására koncentráljuk, de megmutajuk a krio-EM hasznosságát a gyógyszertervezésben is.

Az egyedi részecskék analízise (SPA) az elnevezéstől eltérően nem egyetlen részecske, hanem sok azonos tulajdonságú makromolekula (pl. fehérjék, vírusok stb.) vizsgálatát jelenti. Biokémiai minta-előkészítéssel igyekeznek elérni, hogy csak azonos tulajdonságú részecskék fordulhassanak elő a mintában. Viszont megengedett, hogy az azonos tulajdonságú molekulák és konformációs változataik egyidejűleg előforduljanak. Ez nagy előny a röntgendiffrakcióval szemben. A biológiai makromolekulák dinamikus szerkezetváltozásai nyomon követhetők az SPA-val, ami növeli az esélyt, hogy a szerkezetből a működésre lehessen következtetéseket levonni.

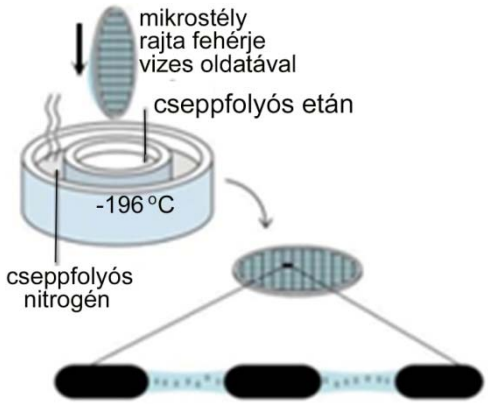
A minták oldat formájában kerülnek fel a mintatartó mikrostélyra. Bár közel natív állapotban őrződnek meg a gyors fagyasztás folyamán, a vizsgálat *in vitro* jellegű, mert a vizsgált molekulák a környezetükből kiszakítva vannak jelen.

Az egyedi részecskék analízise nem tételez fel kristályos mintaszerkezetet és többek között ez az, ami a krio-elektronmikroszkópia létjogosultságát indokolja a röntgenkrisztallográfia mellett a biológiai makromolekulák szerkezetének vizsgálatában. Fontos továbbá, hogy az egyedi részecskék mikroszkópos vizsgálata szimmetrikus mintaszerkezetet sem tételez fel. Ha a mintában mégis vannak szimmetria tulajdonságok, akkor azok megkönnyítik a vizsgálatot: sokkal kevesebb képet kell készíteni a szimmetriák miatt.

A krio-EM SPA folyamán sok (zajos és kis kontrasztú) képet a számítógép először csoportokba rakja. Majd a csoporton belül a képek összegzésével és átlagolásával növeli a kontrasztot. Az eltérő csoportok eltérő orientációban felfekvő részecskéknek felelnek meg. Ezekből a különböző orientációjú kétdimenziós képekből generálja a számítógép a háromdimenziós objektumot. A hétköznapokban ismert CT (röntgen komputer tomográfia) is sok kétdimenziós képből alkot három dimenziósat.

A fagyasztásról

A krio-EM kulcsfontosságú vonása a minta olyan ultragyors merítéses fagyasztása, hogy közel natív állapotban maradjon meg, víztartalma amorf jég formájába fagyjon meg. (1.1. ábra).

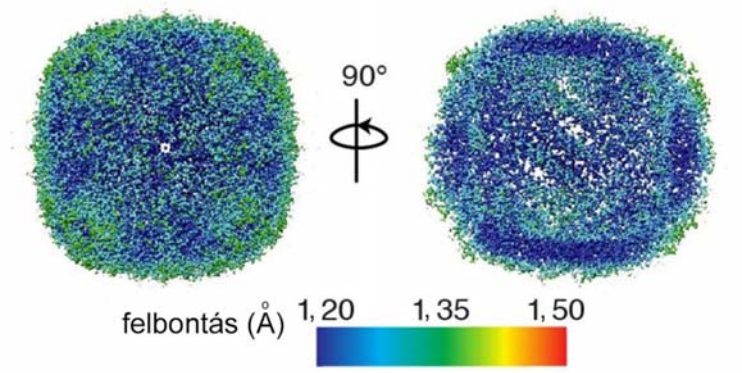


1.1. ábra. *Az ultragyors merítéses fagyasztás (angolul plunge freezing) sémája. A cseppfolyós etánt cseppfolyós nitrogén hűti* (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017)

A második fontos tényező a szférikus aberrációra korrigált elektronmikroszkóp (ROSE 1994), a harmadik pedig a direkt elektron detektorok (Direct Electron Detectors, DED) kifejlesztése volt.

A felbontásról

A szférikus aberrációval korrigált transzmissziós elektronmikroszkóp 0,5 Å felbontásra képes, sajnos egyelőre csak nem biológiai mintákon, a később részletezendő okok miatt. Biológiai mintákon a felbontási rekord 1,15 Å humán apoferritinen (YIP 2020) (1.2. ábra).



1.2. ábra. *Humán apoferritin krio-EM térképe. A felbontás változik a molekulán belül* (YIP 2020)

Az 1.2. ábra tanúsága szerint a felbontás egyetlen makromolekulán belül sem homogén: pl. a fehérje központi részében, ahol a peptid váz fix, jobb a felbontás, de az oldalágak végződéseinél rugalmas kötések miatt a felbontás elromlik 1,2 Å-ről 1,35 Å-re.

A béta-galaktozidáz krio-EM térképe alapján azt mondhatjuk, hogy ~15 Å-ös felbontásnál jól látszik a molekula alakja, ~10 Å-nél a fehérje feltekeredése, ~5 Å-nél a polipeptid lánc, ~3 Å-nél az oldalláncok, ~2,5 Å-nél a vízmolekulák, és ~ 2 Å-nél a karbonil csoportok (BECKERS 2021).

A mikroszkóp felbontása kulcsfontosságú volt a krio-EM fontos szerephez jutásában. A 2013-as esztendő volt az, amikor sikerült a felbontást 4 Å alá szorítani, TRPV1 fehérjét vizsgálva 3,4 Å-t értek el (LIAO 2013, CAO 2013). A 2,5 Å–4 Å közötti felbontást szokás közel atomi felbontásnak (near atomic resolution) nevezni (QUENTIN 2018). 2,5 Å alatt atomi felbontásról beszélünk és ez már a krio-EM jelene. 3 Å-ös felbontáskor már lehet atom modellt készíteni a krio-EM térképből.

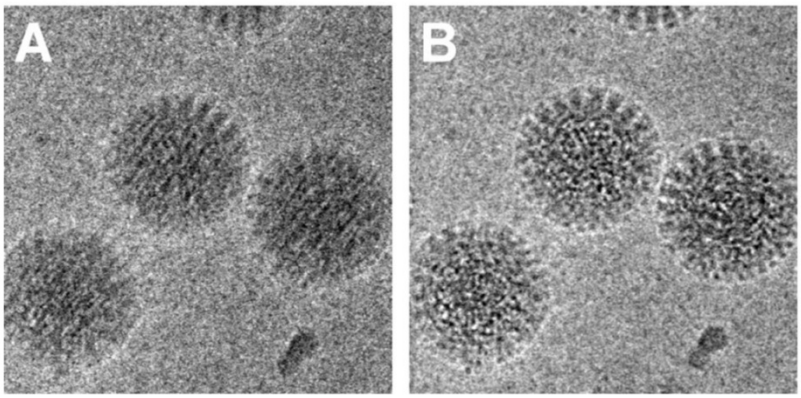
Az elektronmikroszkópos képek a mintában uralkodó Coulomb-potenciál eloszlását tükrözik. A potenciál eloszlási térképek (röviden térképek) felbontását úgy kell elképzelnünk, hogy legalább 9 Å-ös felbontásra van szükség, hogy az α-hélixek láthatók legyenek, 4,8 Å a béta lemezekhez, és ha a peptid vázak aminosav oldalágait is látni akarjuk, akkor legalább 3,5 Å felbontásra van szükségünk.

Még egy támpont adat a felbontáshoz: a szerves anyagokban a szén-szén kötés távolsága 1,54 Å.

A direkt elektron detektorokról (DED)

A direkt elektronok megalkotása hozta meg az igazi forradalmat a krio-EM-ben (KÜHLBRANDT 2014). A direkt DED nem állít elő az elektronokból fényt, majd a fényből ismét elektronokat, mint az addig használatos CCD-kamerák, hanem közvetlenül detektálja az elektronokat. Jelentősen javította a képekben a jel/zaj viszonyt a korábbi detektortípusokhoz képest és ez által járult hozzá a felbontóképesség javulásához (lásd a 3.2. és a 3.3. fejezetet). Hangsúlyozandó a direkt elektron detektoroknak a sugárzással szembeni nagyobb ellenálló képessége a CCD kamerákhoz képest.

A DED-k nagy sebessége lehetővé tesz egy mozgófilm („movie") üzemmódot, amikor a detektor egy kép helyett képsorozatot vesz fel, amelyeknek elemei külön-külön felhasználhatók. Ily módon az elektronsugár okozta mintamozgás és a mintatartó instabilitásai miatti bemozdulás korrigálhatóvá válik az egyes képkockák összehasonlításával (1.3. ábra). Míg a CCD kamerával csak egy konformációt, a DED-del két konformációt lehetett azonosítani. A direkt elektron detektorokkal részletesen foglalkoztunk a már idézett magyar nyelvű tankönyvben.



1.3. ábra. *Mozgáskorrekció rotavírus mintán. Az „A" kép a mozgáskorrekció nélküli, a „B" kép az elmozdulásra van korrigálva. Az elmozdulásra korrigált képben jól látható minőségjavulás következett be* (BRILOT 2012)

A krio-EM, mint a röntgenkrisztallográfia lehetséges alternatívája, különösen népszerűvé vált a direkt elektron detektorok 2013 utáni elterjedését követően. A krio-EM jelentőségét a biológusok felsőfokon említik, és gyakorta nevezik forradalminak (BAI 2015, CEBI 2024). A fehérjék szerkezetét az elmúlt 60 évben röntgensugarakkal tanulmányozták, amihez a fehérjéket ki kell kristályosítani. Azonban sok fehérje nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható. Ez motiválta a krio-elektronmikroszkópos fejlesztéseket, tekintettel arra, hogy

a krio-EM-hez nem szükséges, hogy a vizsgálandó minta kristályos legyen. A röntgenkrisztallográfia és a krio-EM összehasonlításának külön fejezetet (II. fejezet) szentelünk. Anyagtudományi mintákon sokkal jobb felbontást lehet elérni, mint biológiai mintákon, mert a biológiai minták az elektron nyaláb alatt sugárkárosodást szenvednek, másrészt elveszítik víztartalmukat, (dehidratálódnak) az elektronmikroszkóp vákuumának hatására. A sugárkárosodás különösen a nagy nagyításoknál játszik szerepet, mert ekkor nagy áramsűrűséggel kell dolgozni, hogy elfogadható kontrasztú képet kapjunk. A minta fagyasztása sokáig nem oldotta meg a biológiai mintáknak a vákuumban bekövetkező vízvesztési problémáját. Ugyanis fagyasztáskor a vizsgálandó mintában keletkező kristályos jég, (a hangsúly a kristályoson van) ugyanúgy tönkreteszi a mintát, mint a víztartalom elvesztése.

Nobel-díjat érő felfedezés (2017 kémiai Nobel-díj) volt, amikor Dubochet megtalálta annak a módját, hogyan kell biológiai mintát úgy preparálni, hogy az közel natív, hidratált állapotban megmaradjon az elektronmikroszkópos vizsgálat alatt (DUBOCHET 1982, ADRIAN és DUBOCHET 1984).

A minta ultragyors, merítéses fagyasztása (angolul plunge freezing) folyékony etánban azt eredményezi, hogy a minta víztartalma amorf jég formájában fagy meg. Szokás ezt a jégmódosulatot üvegszerű jégnek is nevezni (vitreous ice) utalva az üveg amorf szerkezetére, és a vitrifikálás kifejezés ezt a gyors fagyasztási folyamatot jelöli (DUBOCHET 1984, 2018).

A 2017-es kémiai Nobel-díj a krio-elektronmikroszkópia kifejlesztéséért és az oldatban lévő biomolekulák nagyfelbontású szerkezetmeghatározásáért (Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson) ráirányította a világ figyelmét arra, hogy itt valami nagyon jelentős dologról van szó. Dubochet a mintapreparálást, Frank a háromdimenziós elektronmikroszkópiát fejlesztette, Henderson pedig a biológiai minták elektronmikroszkópos szerkezetvizsgálatának élharcosa volt a kezdetektől fogva és az ún. direkt elektron detektor kifejlesztésében is tevékenyen részt vett.

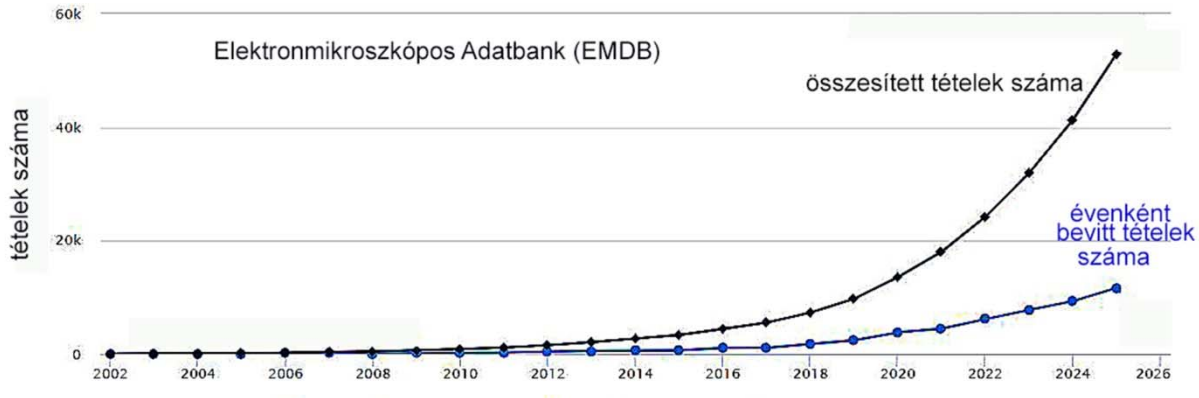
A krio-elektronmikroszkópia gyakorlati haszna szembeszökően jelentkezett a nem szakemberek számára is 2019-es koronavírus járvány idején. A kórokozó SARS-CoV-2 vírus szerkezetét leíró első négy közlemény krio-elektronmikroszkópos vizsgálatokról szólt (WRAPP 2020, WALLS 2020, LIU 2020, YAN 2020).

A krio-EM a gyógyszeriparnak is fontos segédeszköze. Az igen magas krio-EM ár és fenntartási költségek ellenére, van olyan gyógyszergyár, amelynek három 300 kV-os krio-EM-je van. A fehérjék és a potenciális hatóanyagok kölcsönhatásának vizsgálata jelentős szerepet tölt be a gyógyszerfejlesztésben. Az orvostudomány számára pedig elengedhetetlen, hogy értsük a fehérjék működését; ehhez pedig ismerni kell a szerkezetüket.

A biológiai mintáknál az említett két hatás, az elektronnyaláb okozta sugárkárosodás, valamint az elektronmikroszkóp vákuumának dehidratáló hatása, korlátokat szab a felbontóképességnek.

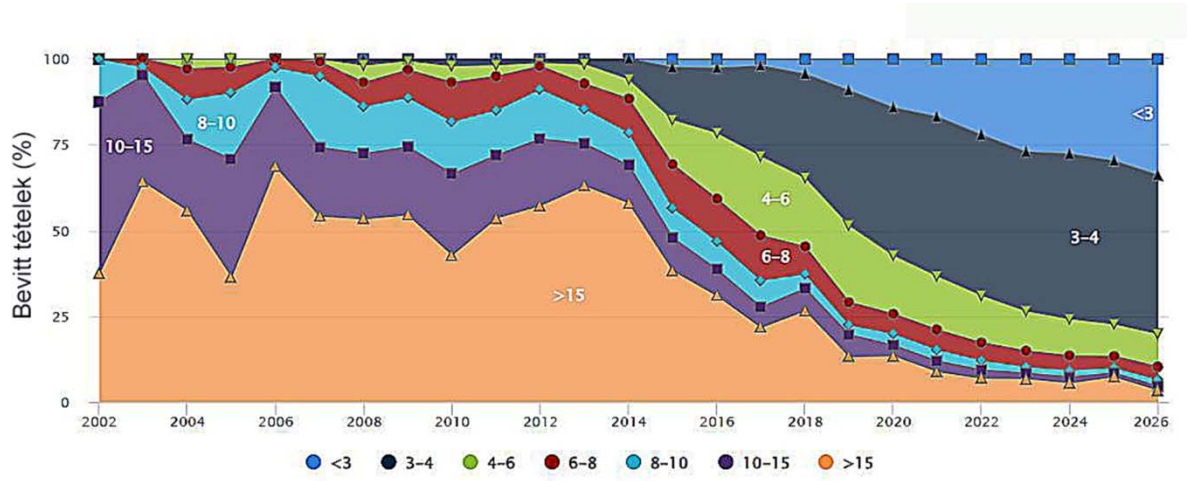
Biológiai mintákon a felbontóképességet 35 Å-ről 3,5 Å-re javítani 30 évbe tellett (DUBOCHET 2016). A negatív festésű mintákat a krio-EM vizsgálatokat megelőzően manapság is használják információgyűjtésre, mert a negatív festés a kis felbontású információkat kontrasztosabban adja, mint a krio-EM, viszont felbontásban elmarad a krio-EM mögött.

A krio-EM gyors fejlődési ütemét jól mutatja az Elektronmikroszkópos Adatbank évenként bekerült új tételek száma (1.4. ábra).



1.4. ábra. *Az Elektronmikroszkópos Adatbankba (Electron Microscopy Data Bank, EMDB) került, feltérképezett szerkezetek száma az évek függvényében* (EMDB 2026)

Hasonlóképpen a gyors fejlődést tükrözi az EMDB-be bevitt tételek (Å-ben megadott) felbontásának évenkénti javulása (1.5. ábra). Az ábra jobb felső sarkában kékkel jelzett terület, a 3 Å-nél jobb felbontás ad lehetőséget a biológiai minták atom modelljének elkészítéséhez.



1.5. ábra. *Az EMDB-be került tételek Å-ben megadott felbontásának változása az évek függvényében* (EMDB 2026)

A krio-EM-ről számos jól megírt összefoglaló cikk jelent meg (CHENG 2015, HENDERSON 2015, NOGALES 2015, SKINIOTIS 2016, VINOTHKUMAR 2016, WU 2016, MARTYNOWYCZ 2018, MURATA 2018, QUENTIN 2018, SATO 2018, LYUMKIS 2019, GUAITA 2022, SAIBIL 2022, CHUA 2022)

Irodalom

ADRIAN, M., DUBOCHET, J. et al. (1984): Cryo-electron microscopy of viruses, *Nature* 308, 32-36.

BAI, X. et al. (2015): How cryo-EM is revolutionizing structural biology, *Trends in Biochemical Sciences* 1-9, http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005.

BECKERS, M. et al. (2021): Structural interpretation of cryo-EM image reconstructions, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 160, 28-36.

CAO, E. et al. (2013): TRPV1 structures in distinct conformations reveal mechanims of activations, *Nature*, 504(7478), 113-118.

BRILOT, A.F. et al. (2012): Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film, *Journal of Structural Biology* 177, 630-637.

CEBI, E. et al. (2024): Cryo-electron microscopy-based drug design, *Frontiers in Molecular Biosciences,*11:1342179.

CHENG, Y. et al. (2015): A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy, *Cell* 161, 438-448.

CHUA, E.Y.D. (2022): Better, faster, cheaper: Recent advances in cryo-electron microscopy, *Annu Rev Biochem,*91: 1-32.

DUBOCHET, J. (2016): A Reminiscene about Early Times of Vitreous Water in Electron Cryomicroscopy, *Biophysical Journal* 110, 756-757.

DUBOCHET, J (2017) Nobel-lecture-slides, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/dubochet-lecture-slides.pdf

DUBOCHET, J. (2018): On the Development of Electron Cryo-Microscopy (Nobel-lecture), *Angewandte Chemie International Edition* 57 (34), https://doi.org/10.1002/anie.201804280

DUBOCHET, J. et al. (1982): Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *Journal of Microscopy* 128, (3), 219-237.

DUBOCHET, J. et al. (1988): Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Quarterly Review of Biophysics* 21, (2) 129-228.

HENDERSON, R. (2015): Overview and future of single particele electron cryomicroscopy, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581, 19-24.

GUAITA, M. et al. (2022): Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy, *Current opinion in Structural Biology* 77:102484.

KÉMIAI NOBELDÍJ 2017 1, https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/popular-chemistryprize2017.pdf

KÜHLBRANDT, W. (2014): The Resolution Revolution, *Science* 343, 1443-1444.

LIU, C. et al. (2020): Viral Architecture of SARS-CoV-2 with Post-Fusion Spike Revealed by Cryo-EM, *bioRxiv,* doi: https:/doi.org/10.1101/2020.03.02.972927

LYUMKIS, D.(2019): Challenges and Opportunities in Cryo-EM Single-Particle Analysis, *JBC,* 10.1074/jbc.REV118.005602

MARTYNOWYCZ, M.W. et al. (2018): From electron crystallography of 2D crystals to MicroED of 3D crystals, *Current Opinion in Interface Sci.* 34, 9-16.

MURATA, K. et al. (2018): Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules, *BBA General Subjects* 1862, 324-334. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.020

NOGALES, E. et al. (2015): Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity, *Molecular Cell* 58, 677-688.

POZSGAI, I. (2023): A krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus, Typotex, Budapest, ISBN 978 963 493 070 9

QUENTIN, D. et al. (2018): Electron cryomicroscopy as a powerful tool in biomedical research, *J. Mol. Med. (Berl)* 96 (6) 483-493.

ROSE H. (1994): Corrections of aberrations, a promising means for improving the spatial and energy resolutions of energy-filtering electron microscopes, *Ultramicroscopy,*56, 11-25.

SAIBIL, H. R. (2022): Cryo-EM in molecular and cellular biology, *Molecular Cell*, 82, 274-284.

SATO, C. (2018): Structural Biology Using Electron Microscopy, in *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*, (eds) Hejátko J., Hakoshima T., https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_13

SKINIOTIS, G. et al. (2016): Single-particle cryo-electron microscopy of macromolecular complexes, *Microscopy* 9-22, https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5895108/

WRAPP, D. et al. (2020): Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, Published online 19 February 2020, doi: 10.1126/science. abb2507. Nyomtatásban *Science* 367, 1260-1263.

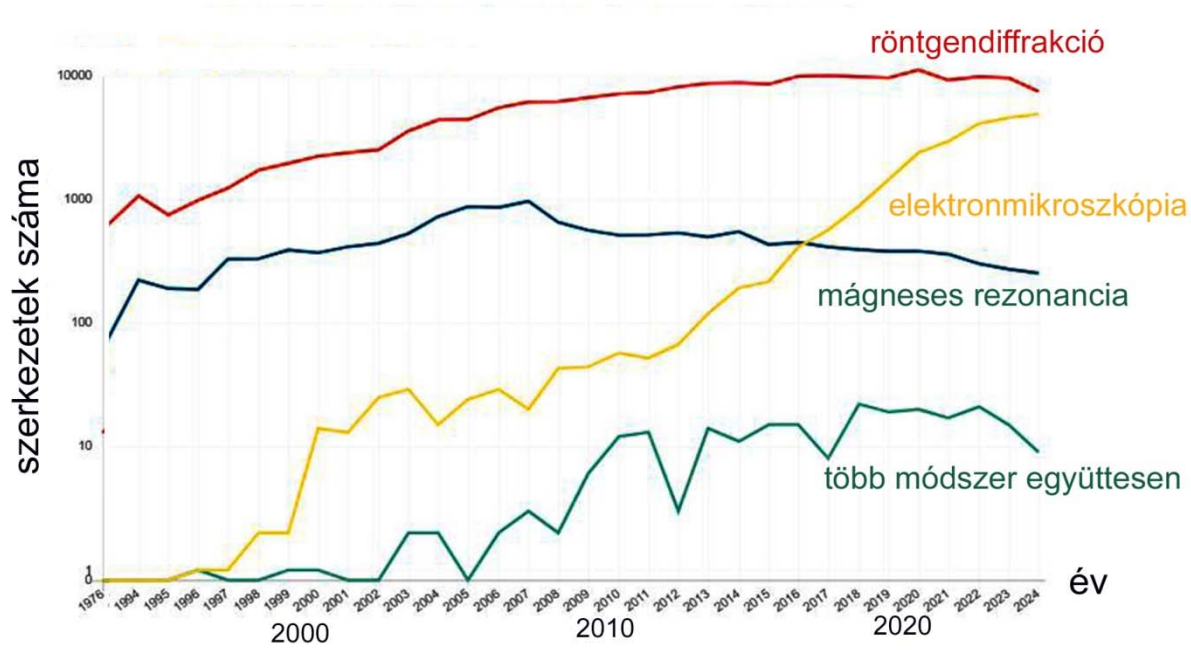
WU, S. et al. (2016): Single-particle cryo-EM data acquisition by using direct electron detection camera, *Microscopy* 65 (1) 35-41. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4749049/

YAN, R. et. al. (2020): Supplementary Materials, https://science.sciencemag.org/content/367/6485/1444/suppl/DC1

YIP, K. M. et al. (2020): Breaking the next Cryo-EM resolution barrier - Atomic resolution determination of proteins, bioRxiv, preprint, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.21.106740v1

II. Makromolekulák krio-EM és röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatának összehasonlítása

A molekuláris biológiában három szerkezet vizsgálati módszert alkalmaznak a leggyakrabban: a röntgendiffrakciót, a mágneses rezonancia vizsgálatot és a krio-elektronmikroszkópiát. A legrégebben, több mint 60 éve, a röntgendiffrakciót használják molekula szerkezet vizsgálatra, így a Protein Adatbankban (Protein Data Bank, PDB) szereplő legtöbb fehérje szerkezetét röntgensugár segítségével határozták meg. A mágneses magrezonancia mérések is régebben vannak alkalmazásban, mint a krio-elektronmikroszkópia, így ez szolgáltatja a második legnagyobb számú fehérje szerkezetet a PDB-ben. A krio-elektronmikroszkópia az adatok számosságát tekintve a harmadik helyen van, tekintettel arra, hogy gyakorlatilag csak 2013 után voltak szerkezetbiológusok számára használható (4 Å-nél jobb) felbontás elérhetők. A kiindulási évek torzító hatása a módszerek összehasonlításában csökkenthető, ha az egyes módszerek „évenkénti teljesítményét” tekintjük a PDB-ben leközölt szerkezetek alapján (2.1. ábra).



2.1. ábra. *A PDB-be felvett szerkezetek száma az évek függvényében*

A 2.1. ábra alapján a röntgenkrisztallográfia előnye az évenkénti adatok számosságát illetően is vitathatatlan. A krio-EM a 2013-as kezdés után nagyon gyors fellendülésbe kezdett és 2017-ben utolérte, majd gyorsan elhagyta a mágneses rezonanciát (NMR). Az NMR alkalmazása

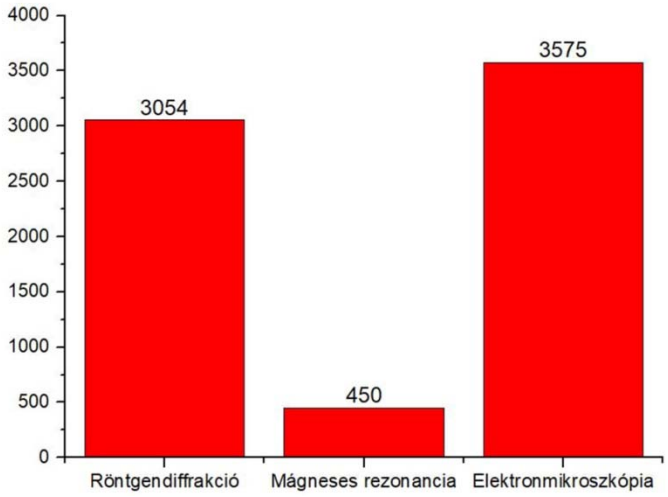
éppen abban a molekulasúly-tartományban (<40-50 kDa) előnyös, ahol a krio-EM kevésbé jól működik.

A röntgenkrisztallográfia előnye a krio-EM-hez képest a jobb felbontás. Ha a felbontás szerinti eloszlások maximumát tekintjük a fehérje adatbázisban (PBD-ben) a 2023-as esztendőben, akkor ez a röntgenkrisztallográfia esetén az 1,5-2,0 Å tartományba, a krio-EM esetén a 3,0-3,5 Å közzé esik. A két módszer felbontása közötti különbség egyre csökkenő tendenciát mutat az évek múlásával. A röntgenkrisztallográfiával 1 Å-nél is jobb felbontást is értek már el, míg a krio-EM rekordja 1,25 Å.

A krio-EM alkalmazásainak felfutását az hozta, hogy vannak olyan alkalmazási területek, ahol a röntgenkrisztallográfia számára nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható fehérjék találhatók: ilyenek a membránfehérjék és a nagy molekulasúlyú protein komplexek.

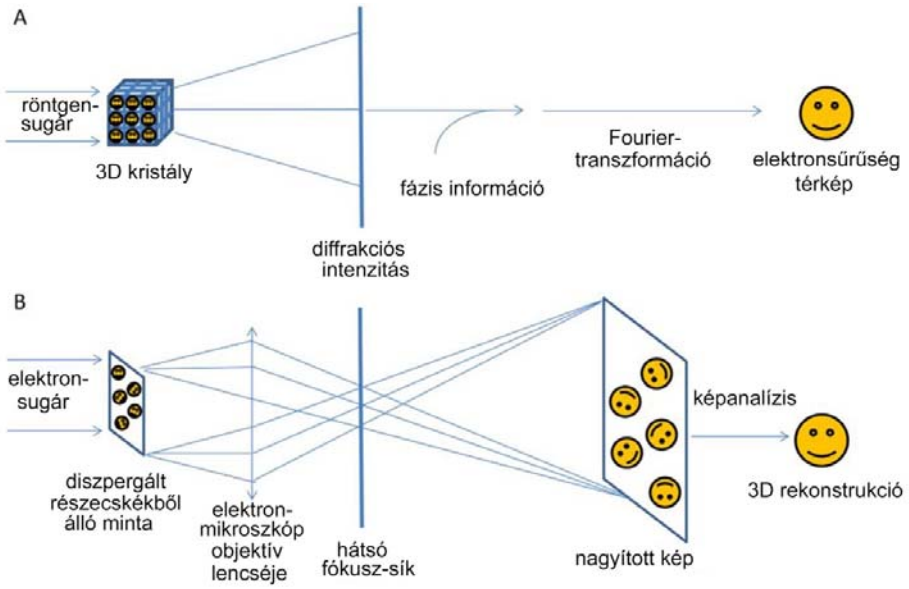
A membránfehérjék több szempontból fontosak: a humán fehérjék kb. 25%-át membránfehérjék alkotják (FAGERBERG 2010) és ezek képezik a forgalomban lévő gyógyszerek kb. 60%-ának célpontját (OVERINGTON 2006).

Ez az utóbbi két adat együttesen szól amellett, hogy a krio-EM-t a membránfehérjék szempontjából tárgyaljuk. Mint a 2.2. ábrán látható, a krio-EM alkalmazásának gyakorisága a membránfehérjék szerkezetének meghatározásában már megelőzte a röntgenkrisztallográfiát.



2.2. ábra. *Membránfehérje szerkezetek száma a PDB-ben 2024. nov. 1-ig*

A röntgenkrisztallográfia és az krio-EM egyedi részecskék analízise közötti különbségeket szemlélteti a következő ábra:



2.3. ábra. *Technikai különbségek a röntgenkrisztallográfia és a krio-EM egyedi részecskék analízise (SPA) között* (WANG 2017)

Az A/ ábrán látható, hogy a röntgenkrisztallográfiában a Fourier-transzformációhoz hiányzó fázisinformációt más forrásból kell bejuttatni. A B/ ábrán a krio-EM SPA-ban a fázisinformáció benne van a képben és onnan fényoptikai lencsével vagy számítógéppel végzett Fourier-transzformációval kinyerhető. Ez a felismerés későbbi Nobel-díjas Aaron Klugtól származik 1968-ból. A mikroszkópos képben azért őrződik meg a fázis, mert a diffraktált elektronnyalábokat veszteség nélkül lehet a mikroszkópos képbe fókuszálni.

A röntgenkrisztallográfiát és krio-EM–t néhány eltérő vonástól eltekintve sok minden egybeköti (WANG 2017). Erre utal az idézett közlemény címe is: „Hogyan egészítik ki egymást a kiro-EM és a röntgenkrisztallográfia”. A két módszer előnyös tulajdonságairól már szóltunk. De mindkét módszernek vannak gyenge pontjai: a röntgenkrisztallográfiában a diffrakciós kép nem rögzíti a sugárzás fázisát, ami a 3D rekonstrukcióhoz szükséges (ezt fázisproblémának nevezik), a krio-EM-ben a kiindulási 2D térkép meghatározása ütközik nehézségbe.

Mindazonáltal a két módszert komplementernek, egymást kiegészítőnek tekintik. A röntgenkrisztallográfia fázisproblémáját meg lehet oldani krio-EM képek segítségével. A nem nagy felbontású krio-EM képekből a fázis meghatározható a nagy felbontású röntgen diffrakció számára. (ZENG 2018). Másrészt a kis felbontású 3D krio-EM térképbe nagyfelbontású, röntgensugárzással meghatározott atommodellek dokkolhatók be az egyes részegységek helyére az egész molekula szerkezetének meghatározásához (WRIGGERS 1999, ROSSMANN 2000).

A krio-EM a röntgenkrisztallográfiával szemben közel natív állapotban tartja meg a molekulákat és megengedi a dinamikus szerkezeti változások (konformációs változások) azonosítását egy és ugyanazon mintán belül. A röntgendiffrakció statikus képet ad a molekuláról.

A röntgensugárzás az atomok elektronhéján történik, (az atommagokon a szórás elhanyagolható), a krio-EM képek az atommagokon való szóráson alapulnak. (A nagyfelbontású krio-EM kép olyan fáziskontrasztkép, amelyet a nem szórt és az atommagokon rugalmasan szórt elektronnyaláb szuperpozíciója hoz létre.)

Az elektronsugárnak az anyaggal való kölcsönhatása (szórási hatáskeresztmetszete) 100 000 vagy 1 000 000-szor erősebb, mint a röntgensugaraké. Következésképpen elektronsugárral olyan kis mintákon is lehet jól értékelhető mikro-elektrondiffrakciós képet (mikro-ED) készíteni, amelyeken röntgensugarakkal nem lehetséges.

A krio-EM képekre kezdetben átvették a röntgenkrisztallográfiából az elektronsűrűség térkép elnevezést, később a helyesebb elektrosztatikus sűrűségtérkép (Coulomb potenciáltérkép) elnevezést választották. Ezt az elnevezést egyszerűsítve krio-EM sűrűségtérképnek vagy még egyszerűbben krio-EM térképnek nevezik (ROSENTHAL 2019, BECKERS 2021).

A röntgenkrisztallográfiában és krio-EM-ben használt berendezések nagyon eltérőek. A röntgenkrisztallográfiában főként a szinkrotron sugárzást használják gerjesztésre annak nagy intenzitása miatt, a krio-EM-ben pedig többnyire 300 kV gyorsító feszültségű elektronmikroszkópot. Ez utóbbi meglehetősen drága (minimum 5 millió dollár) (MCCORMICK 2023), amihez egy szintén drága infrastruktúra és üzemeltetési költség is járul. 2023 végén jelent meg olyan közlemény, amely sokkal olcsóbb (1 millió dollár alatti) 100 keV-os krio-elektronmikroszkóp kifejlesztéséről szól. Ennek a felbontóképessége viszont 10-25%-kal gyengébb, mint a 300 keV-os mikroszkópé (MCCORMICK 2023), ami még mindig jól felhasználható a szerkezetbiológiában. A gyengébb felbontás annak tulajdonítható, hogy eddig nem sikerült olyan jó minőségű direkt elektron detektort készíteni 100 kV-os gyorsító feszültségre, mint 300 kV-ra.

A szerkezetmeghatározáshoz szükséges minta tömeg vagy térfogat tekintetében is eltér a két módszer. A röntgenkrisztallográfiában több anyagra van szükség, mint a krio-EM-ben. Ez utóbbi esetben néha néhány pikoliter anyag elegendő (VENIEN-BRYAN 2023).

Röviden összehasonlítjuk a röntgen krisztallográfiát és a krio-EM-et a következő táblázatban:

	Röntgen krisztallográfia	Krio-elektronmikroszkópia
Minta	kristályos kell, hogy legyen	nem szükséges kristályos minta
Molekula méret	nincs korlátozás, de a nagy molekulasúlyú molekulák nehezebben kristályosíthatók	nehézségek 60 kDa-nál kisebb molekuláknál, (scaffolding technikával az alsó határ javítható)
Minta tömeg	milligramm	mikrogramm,
Minta homogenitása	nagy tisztaságú homogén minta szükséges	heterogén minta is lehetséges
Felbontás	akár 1 Å-nél is jobb lehet leggyakoribb felbontás 1,5-2,0 Å a PDB-ben	a legjobb érték is csak 1,25 Å leggyakoribb felbontás 3,0-3,5 Å a PDB-ben

Részletesebb összehasonlítást a következő cikkben találhatunk (CEBI 2024).

Nagy hasonlóságot mutat a felbontóképesség meghatározása a krio-EM-ben és a röntgenkrisztallográfiában. A rendelkezésre álló mérési adatokat két részre bontják és a két térfogat Fourier-héjainak hasonlóságát (korrelációját, Fourier Shell Correlation, FSC) vizsgálják egy iterációs folyamatban. Végül a krio-EM felbontás értékének a „gold-standardnak" nevezett eljárásban azt a felbontás értéket fogadták el, ahol az FSC= 0,143 azért, hogy teljes összhangban legyen a krio-EM és röntgenkrisztallográfiai felbontás (SCHERES 2012). A kétféle módszer összehasonlításához az adott támpontot, hogy három olyan makromolekulának a krio-EM felbontását határozták meg, amelynek a nagyfelbontású kristályszerkezeti adatai már rendelkezésre álltak röntgendiffrakcióból (SCHERES 2012).

Részletes összehasonlítást ad Garcia-Nafria a krio-EM-ről és röntgenkrisztallográfiáról a G-protein-kapcsolt receptorok (G-protein coupled receptors, GPCR) szerkezetvizsgálata kapcsán (GARCIA-NAFRIA 2021). A GPCR molekula mérete a kritikus tényező: míg az inaktív állapotú 35-45 kDa molekulasúlyú GPCR szerkezetének krio-EM meghatározását nem tartja reálisnak, addig az aktív állapotú C osztályú ~180 kDa tömegű dimer molekula szerkezetének sikeres meghatározásáról számol be.

Összefoglalva azt mondhatjuk a két szerkezetmeghatározó módszerről, hogy egymást kiegészítik. Közöttük a kristályosíthatóság a vízválasztó tényező, azt követi a molekula méret és ezután még számos más tényező szerepe mérlegelendő.

Irodalom

BECKERS, M. et al. (2021): Structural interpretation of cryo-EM image reconstructions, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 160, 28-36.

CEBI, E. et al. (2024): Cryo-electron microscopy-based drug design, *Frontiers in Molecular Biosciences,* 11:1342179.

FABERBERG, L. et al. (2010): Prediction of human membrane proteome, *Proteomics* 10, 1141-1149.

MCCORMICK, D. (2023): Cryo-electron microscopy at just one-tenth the cost, *IEEE Spectrum* 23 Dec. 2023.

OVERINGTON, J.P. et al. (2006): How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (12), 993-996.

ROSENTHAL, P.B. (2019): Interpreting the cryo-EM map, *IUCrJ* 6, 3-4.

ROSSMANN, M.G. (2000): Fitting atomic models into electron-microscopy maps, *Biological Crystallography* 56,10, 1341-1349.

SCHERES, S.H.W. (2012): RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination, *J. Struct. Biol.* 180(3) 519-530.

GARCIA-NAFRIA, J. et al. (2021): Structure determination of GPCRs: cryo-EM compared with X–ray crystallography, *Biochemical Society Transactions* 49, 2345-2355.

VENIEN-BRYAN, C. et al. (2023): Overview of membrane protein sample preparation for single-particle cryo-electron microscopy analysis, *Int. J. Mol. Sci*. 24, 14785.

WANG, H-W. et al. (2017): How cryo-electron microscopy and X-rax crystallography complement each other, *Protein Science* 26, 32-39.

WRIGGERS, W. et al. (1999): Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy, *Journal of Structural Biology* 125, 185-195.

ZENG, L. et al. (2018): Using cryo-electron microscopy maps for X-ray structure determination, *IUCrJ* 5, 382-389.

III. Újabb krio-EM fejlesztések

A 2023-ban megjelent magyar nyelvű a krio-EM-ről szóló könyvben már írtunk a biológiai minták elektronmikroszkópiájáról, a krio-elektronmikroszkópról, segéd berendezéseiről és az egyedi részecskék analíziséről (SPA). (POZSGAI 2023.) Most olyan fejlesztésekről írunk, amelyek azóta történtek, vagy amelyek a fehérjék szerkezetvizsgálata szempontjából fontosak.

III.1. 100-200 kV-os krio-EM direkt elektron detektorral

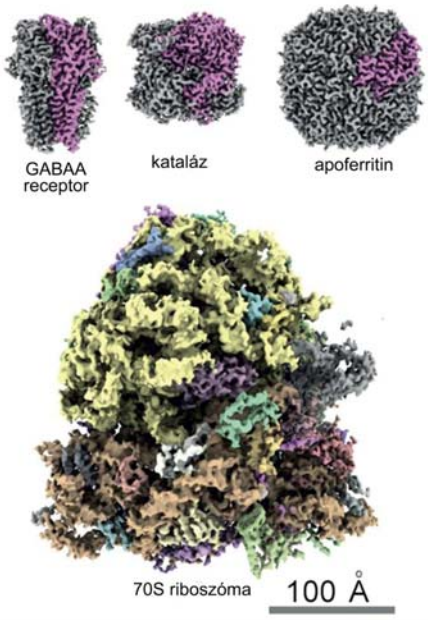
A krio-EM elterjedésének nagy akadálya volt, a 300 kV gyorsítófeszültségű krio-elektronmikroszkóp magas ára (5-7 millió US dollár a kiépítéstől függően), a költséges infrastruktúra és a magas üzemeltetési költségek. A krio-elektronmikroszkópiáért Nobel-díjat kapott Richard Henderson és munkatársai kezdettől fogva harcoltak a krio-EM „demokratizálásáért", ami alatt a sokkal olcsóbb és nagy tömegek számára elérhető 100 kV-os krio-EM-t értették.

Korábbi ismeretek szerint a (képminőséget meghatározó) rugalmas szórás hatáskeresztmetszete párhuzamosan fut a (sugárkárosodást kiváltó) rugalmatlan szórás hatáskeresztmetszetével a 100 kV és 300 kV gyorsítófeszültség közötti tartományban. A pontosabb mérések azt mutatták (PEET 2019), hogy egy adott vastagságú biológiai mintán, 100 kV-on kedvezőbb mértékben (2,01x) javul a rugalmas szórás 300 kV-hoz képest, mint amilyen mértékben (1,57x) nő a sugárkárosodás. Azaz pénzügyi okokon kívül is előnyös lenne 100 kV-on végezni az SPA-t. Minthogy 100 kV-os mikroszkópokkal a 2 Å-ös felbontás elérése nem ütközött nehézségbe, a feladat a 100 kV-on jól teljesítő elektron detektorok kifejlesztésére redukálódott.

Henderson munkatársai sikeresen alkalmazták a DECTRIS cég által kifejlesztett 1 megapixeles Singla nevű hibrid pixeles elektron detektort egyedi részecskék analízisére 100 kV-on (McMULLAN 2023). Egy laboratóriumi krio-EM cél-berendezést fejlesztettek ki, amelynek a fő elemei voltak: a mikroszkóp Schottky-téremissziós katódja, a kis kromatikus aberrációjú objektív lencse (C_c = 1,9 mm) és a kedvező detektálási kvantumhatásfokkal (DQE) rendelkező hibrid pixeles Singla elektron detektor.

A hibrid pixeles detektor újdonságnak számított az addig ismert ún. monolitikus direkt elektrondetektorokkal szemben, amelyek csak 300 kV-os mikroszkóp feszültség mellett teljesítettek jól. A hibrid pixeles detektorok **(**amelyek szintén direkt elektron detektorok) és a monolitikus direkt elektron detektorok összehasonlítására a Műszaki háttér fejezetben térünk ki.

A hibrid pixeles detektorok felbontása 100 kV-on (2,6 Å-4,5 Å) 10-25%-kal elmaradt a 300 kV-on alkalmazott monolitikus direkt elektron detektorok felbontásától (McMULLAN 2023), de elvi jelentőségű az a tény, hogy ezek a detektorok krio-EM-ben egyedi részecskék analízisére már 100 kV-on is jól használhatók. A szerzők 11 molekulán mutatták be a 100 kV-os krio-EM-jük képességeit, ebből mi itt négyet mutatunk. A molekulákon belüli aldomének különböző színekkel vannak színezve. A célberendezés kereskedelmi forgalomba történő bevezetéséről nincs információ.



3.1. ábra. *100 kV-os krio-EM célberendezéssel (nem kereskedelmi termék) vizsgált molekulák térképei* (McMULLAN 2023)

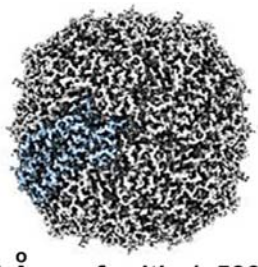
Kereskedelmi forgalomban a három cég árul monolitikus direkt elektron detektorokat: a Thermo Fisher Scientific (TFS), a Gatan és a Direct Electron.

A TFS Tundra néven forgalmaz egy 100 kV gyorsítófeszültségű krio-EM-et Falcon C nevű direkt elektron detektorral fehérjék és makromolekula komplexek vizsgálatára. Felbontóképessége jobb, mint 3 Å.

A Tundra krio-EM mikroszkóp X-FEG katóddal (extrém fényességű téremissziós katód) készült és fix 100 kV-os feszültségen működik. Külön mintatároló állomása van, amely tárolja a napi méréshez szükséges mintákat. Félautomatikus mintabetöltője gyors és szennyezésmentes mintacserét tesz lehetővé. A mikroszkóp nagymértékben automatizálva van és ehhez még a mesterséges intelligenciát is bevetették. 1 millió dollár körüli ára jelentős különbséget jelent a 300 kV-os Krios-hoz képes. Alapértelmezésben a mikroszkópot a kisebb felbontóképességű

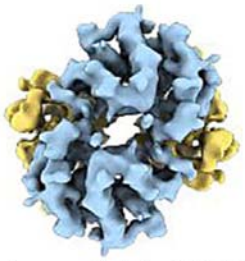
Ceta F nevű szcintillátoros (indirekt) detektorral árulják, de kapható Falcon C direkt elektron detektorral is.

A Falcon C magas kvantum hatásfokkal (DQE) működik, különösen alacsony frekvenciájú képkomponenseknél jó kontrasztot és jó minőségű képeket eredményez. Nagyon jól használható fehérjék és makromolekulák szerkezetének vizsgálatához. A 3.2. ábrán látható, hogy hány képet, mennyi részecskét és mennyi idő alatt kellett összegyűjteni ahhoz, hogy az adott felbontású 3D térképet létre lehessen hozni. Az ábrán egy kis és egy nagy molekulasúlyú molekulát mutatunk, mert a molekulasúly befolyásolja az elérhető felbontást. A kisebb molekulasúlyú hemoglobin szerkezetének meghatározása jelentősen több időt vett igénybe, mint a nagyobb molekulasúlyú apoferritiné, ami felbontási referenciának számít a krio-EM-ben.



2,1 Å, apoferritin (~500 kDa)

- Képek száma: 5418
- Részecskék száma: 249 808 (oktahedrális)
- Képgyűjtési idő: 18 óra
- Detektor: Falcon C

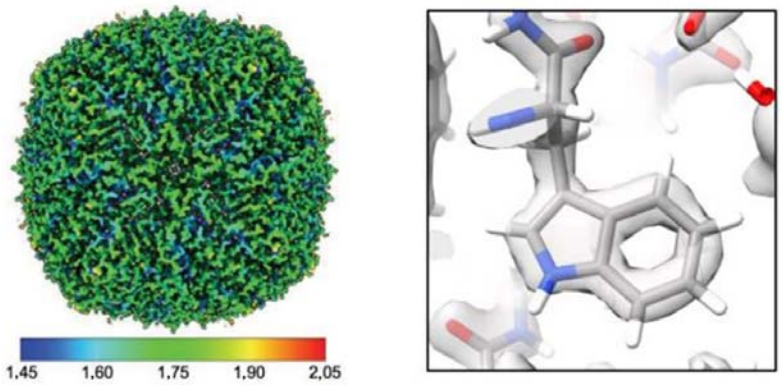


5 Å, hemoglobin (64 kDa)

- Képek száma: 5399
- Részecskék száma: 60 381 (D2 szimmetria)
- Képgyűjtési idő: 42 óra
- Detektor: Falcon C

3.2. ábra. *Nagy molekulasúlyú apoferritin és kis molekulasúlyú hemoglobin térképe Tundra krio-EM-mel felvéve 100 kV-os gyorsítófeszültségen Falcon C direkt elektrondetektorral.*

A Gatan cég egy Alpine elnevezésű direkt elektron detektort forgalmaz 100 kV és 200 kV-os gyorsítófeszültségre. 2 Å-nél jobb felbontóképességet értek el apoferritinen 120 kV és 200 kV gyorsítófeszültségen a (Termo Fisher Scientific) Glacios 2 krio-elektron-mikroszkóppal való kombinációban (3.3. ábra).



3.3. ábra. *Gatan Alpine direkt elektron detektor felbontóképességének demonstrálása apoferritinen a Thermo Fisher Scientific Glacios 2 krio-EM-jével 120 kV-os gyorsítófeszültségen. Felbontás ~1,92 Å. Mint látható, a felbontóképesség a molekulán belül helyfüggő. Az ábra jobb oldalán a bal oldali térképből készült atommodell egy részlete (pl. benzol gyűrű az oldal láncban) látható* (CHAN 2024)

Megj. 2026-ban a Szegedi Tudományegyetemen már működik egy 100 kV-os Tundra és egy 200 kV-os Glacios 2 krio-elektronmikroszkóp.

LaB6-os katódú krio-elektronmikroszkóp

Szem előtt tartva a további költségcsökkentést, a Tundra krio-mikroszkópnál lényegesen olcsóbb (és ezért szerényebb képességű) 120 kV-os, LaB6 katódú Tecnai G2 Spirit mikroszkópot (Thermo Fisher Scientific) szereltek fel Gatan Alpine direkt elektron detektorral (VENUGOPAL 2025). A mérés apoferritin tesztmintán a képmegmunkálások után a 2,65 Å-ös felbontóképességű 3D szerkezetet eredményezett. A mérés adatai:

3.1. táblázat. *Krio-EM SPA adatgyűjtés apoferritinen 120kV-os LaB6-os katódú elektronmikroszkóppal* (VENUGOPAL 2025)

Nagyítás	60700x
Gyorsítófeszültség (kV)	120
Dózissebesség (elektron/pixel/s)	5,25
Elektron expozíció („dózis”) (elektron/Å^2)	50,3
Defókuszálási tartomány (µm)	0,4-0,8
Mozgó felvételek száma	923
Képkockák száma	52
Mérési idő (óra)	5,45
Részecskék száma kezdetben	387893
Feldolgozott részecskék száma	127128
Térkép felbontása (Å)	2,65

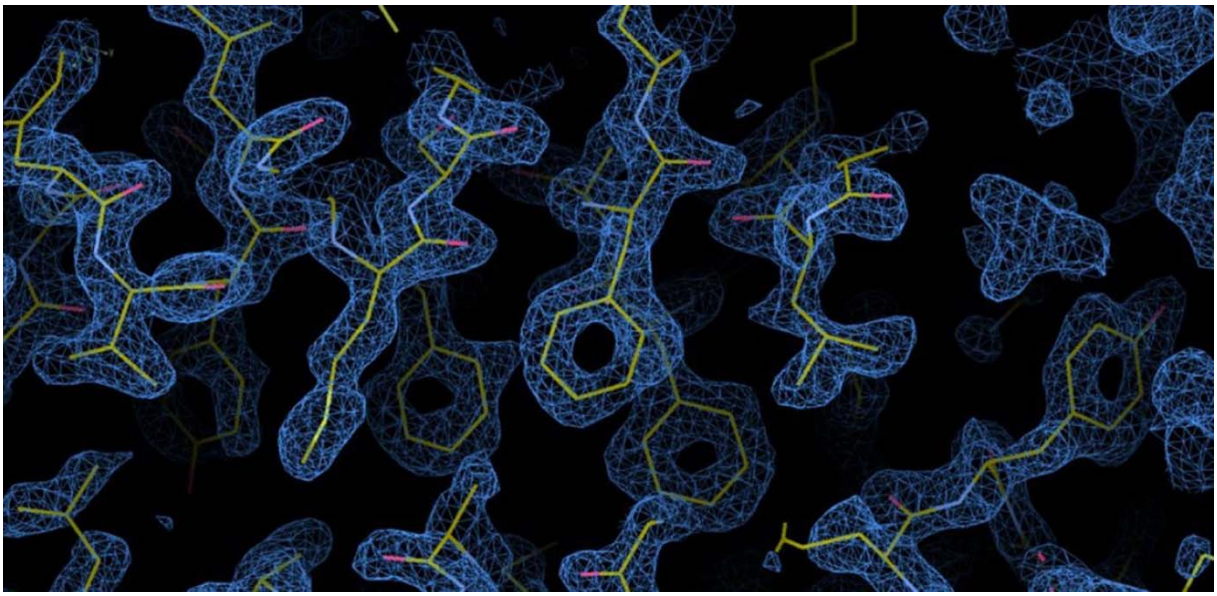
A 64 kDa molekulasúlyú hemoglobinra 4,33 Å, egy 153 kDa-os aszimmetrikus membrán fehérjére (GPCR-re) 4,4 Å-ös felbontást értek el. A szerzők azt a következtetést vonták le, hogy egy ilyen olcsóbb konfiguráció alkalmas a nagyfelbontású krio-EM-et megelőző szűrővizsgálatokra, illetve hosszabb mérésidővel, 3 Å felbontás elérése után, alkalmas 3D modell készítésére is.

A Direct Electron vállalat 2021 óta forgalmaz egy Apollo elnevezésű direkt elektron detektort, amely a 100 kV-200 kV tartományra van optimalizálva. Deklaráltan krio-EM célokat szolgál. Ezt azért fontos hangsúlyozni, mert a vállalat már 2015-ben kibocsátott egy LV-126 típusú direkt elektron detektort alacsony feszültségű elektronmikroszkópiára (15-40 kV tartományra optimalizálva), de az nem a krio-EM céljait szolgálta.

A kereskedelmi forgalomban DED-et árusító mindhárom cég monolitikus direkt elektron detektora (lásd III.3.3. fejezetet) működik elektronszámláló üzemmódban is.

III.2. 300 kV-os krio-EM direkt elektron detektorral

A legjobb felbontás és a leggyorsabb adatgyűjtés továbbra is a direkt elektron detektorral felszerelt 300 kV-os krio-elektronmikroszkópokkal érhető el. A 300 kV-on működő detektorokat is tovább fejlesztették az elmúlt években: TFS Falcon 4 detektora tízszer gyorsabb, mint az elődje, majd azt követte a Falcon 4i detektor. A Falcon 4 detektor sebességére jellemző a 3.4. ábra:

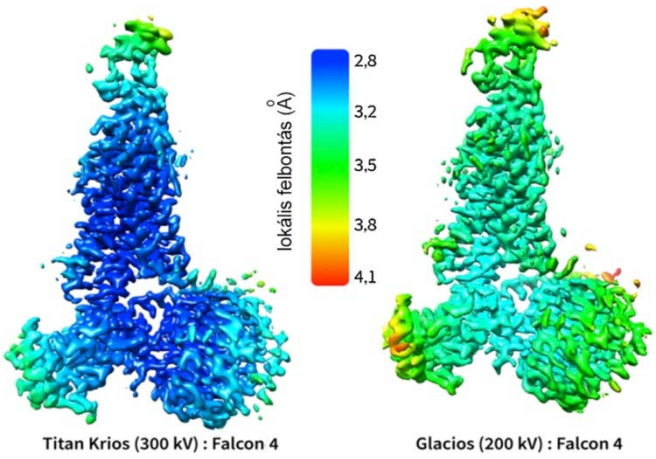


3.4. ábra. *A Falcon 4 direkt elektron detektor gyorsaságának illusztrálása. Apoferritinen Krios 4 mikroszkóppal 10 perc alatt felvett képekből készült 2,0 Å felbontású rekonstrukció* (THERMO FISHER SCIENTIFIC FALCON 4 DATASHEET)

A piacon a TFS és a JEOL 300 kV-os krio-EM-jei kaphatók. Az előbbi Falcon 4, az utóbbi Gatan K3 direkt elektron detektorral van felszerelve. Részletesebb adatok a műszaki háttér fejezetben.

III.2.1. 100 kV, 200 kV és 300 kV-os gyorsítófeszültségű krio-EM-ek összehasonlítása

A direkt elektron detektorok magasabb gyorsítófeszültségen jobb felbontásra képesek. Ennek illusztrálására mutatunk be GPCR-ről készült krio-EM térképeket 200, illetve 300 kV-os gyorsító feszültségen. A lokális felbontás a molekula vázán belül jobb, mint a rugalmas peremen, továbbá a 300 kV-on, a Falcon 4 detektor felbontása jobb, mint 200 kV-on. (3.5. ábra)



3.5. ábra. *200 kV-os és 300 kV-os krio-EM felbontásának összehasonlítása ugyanazon detektor* (Falcon 4) *mellett GPCR mintán* (ZHANG 2021)

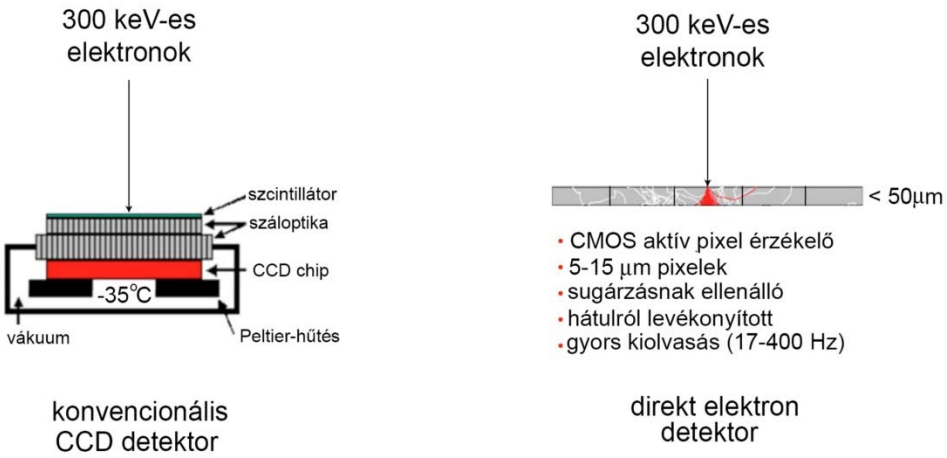
Aki 100 kV-os gyorsítófeszültségű krio-EM-et vásárol, annak nem csak kisebb felbontással, de hosszabb adatgyűjtési időkkel is kell számolni, mint a 300 kV-os mikroszkópok esetén. Az alábbi példában az apoferritinen 300 kV-on 2,1 Å-ös felbontást 10 perc gyűjtési idő alatt lehet elérni, szemben a 100 kV-on mért 18 órához képest (lásd a 3.2. ábrát). A 100 kV-on elérhető felbontóképesség sok biológiai szerkezet tisztázására elegendő. A TFS három krio-EM-jének összehasonlítása 100 kV, 200 kV és 300 kV gyorsítófeszültségen az alábbi táblázatban látható.

3.2. táblázat. *100 kV, 200 kV, és 300 kV krio-EM-ek összehasonlítása*

	Tundra, 100 kV	Glacios 2, 200kV	Krios G4, 300 kV
Legjobb felbontás	2,1 Å	1,6 Å	1,22 Å
Adatgyűjtési idő apoferritin 2,5 Å-ös felbontásához	24 óra	30 perc	néhány perc

III.3. Műszaki háttér: direkt elektron detektorok (DED)

A direkt elektrondetektorok megalkotása előtt, olyan CCD alapú, szcintillátorokkal működő elektron detektorokat használtak (3.6. ábra), amelyek az elektronokat fénnyé konvertálták, majd azt vissza elektromos jellé. A krio-EM sikerét 2013-tól kezdve a direkt elektronok hozták meg, amelyek az elektronokat közvetlenül detektálták.

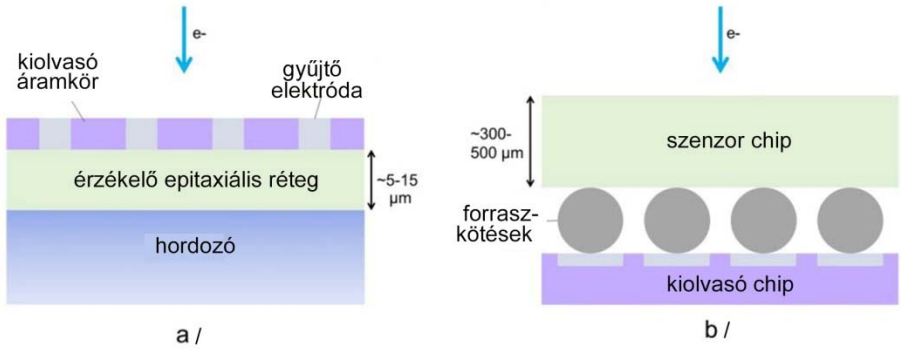


3.6. ábra. *A szcintillátoron és száloptikai csatoláson alapuló (indirekt) CCD kamera és a direkt elektron detektor összehasonlítása*

A 3.6. ábrán mutatott elven működő CCD kamera alkalmazásra kerül pl. a 100 kV-os Tundra krio-EM-ben. A CCD-architektúra (CCD, Charge-Coupled Device, töltéscsatolt eszköz) érzékeny a sugárkárosodásra, ezért volt szükség a száloptikai csatolásra. A később kifejlesztett (CMOS-architektúrájú) (CMOS, Complementary Metal Oxid Semiconductor, komplementer fém-oxid-félvezető), direkt elektron detektorok a jobb jel/zaj viszony miatt felülkerekedtek az indirekt detektoroknak. A jobb jel/zaj viszonyok tükröződnek a DQE-görbékben (lásd a 3.10. ábrát), és mint látható, a Tundrához opcionálisan megvásárolható Falcon C direkt elektron detektor jobb, mint a Ceta F indirekt detektor.

III.3.1. Monolitikus (MAPS) és hibrid pixeles direkt elektron detektorok

A direkt elektron detektorok nevüket onnan kaphatták, hogy az elektronokat nem szcintillátorok segítségével, hanem közvetlenül detektálják. Kétféle típusuk van: a monolitikus aktív pixeles (MAPS, Monolitic Active Pixel Sensor) és a hibrid pixeles (HPAD, Hybrid Pixel Array Detector), (3.7. ábra).



3.7. ábra. *A direkt elektron detektorok (DED) két típusa: a/ monolitikus aktív pixeles detektor (MAPS), b/ hibrid pixeles detektor (HPAD)* (LEVIN 2021)

A hibrid elnevezés onnan származik, hogy a detektor szenzor része különválik a kiolvasó áramkörtől. A másik jellemző különbség, hogy a MAPS-ban az érzékelő réteg jelentősen vékonyabb (5-15 µm), mint a hibrid DED szenzorban (300-500 µm). A vékonyabb szenzorral jobb felbontást lehet elérni, tekintettel a szenzor rétegben végbemenő elektronszóródási folyamatokra. Következésképpen kisebb pixelméretekkel dolgoznak a MAPS-ban (5-15 µm), mint a HPAD-ben (55-150 µm) és a pixelek száma is nagyobb lehet (4096 x 4096).

A kétféle DED az elektronmikroszkópia különböző területein alkalmazható: a nagyobb pixelméretű hibrid pixeles detektorok főként a nagyobb dózissebességgel járó technikáknál (pl. elektrondifffrakció, EELS, ultragyors TEM stb.), a kisebb pixelméretű MAPS detektorok az alacsony dózissebességű krio-EM-nél (pl. SPA, krio-elektron tomográfia) alkalmazzák.

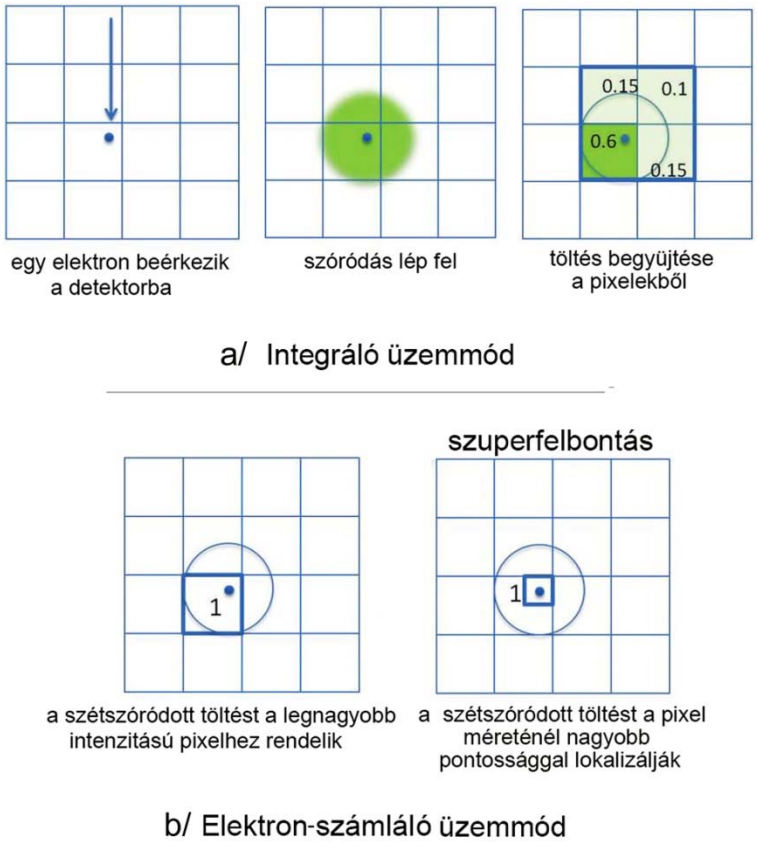
Minket a krio-EM SPA érdekel, ott pedig főként a MAPS-ot alkalmazzák. (Kivétel a McMullan cikkében szereplő DECTRIS Singla, amely 1K x 1K méretű hibrid pixeles detektor)

A direkt elektron detektorok a nagy képfelvételi sebességük miatt lehetővé tesznek egy mozgófilm („movie") üzemmódot, amikor a detektor egy kép helyett képsorozatot vesz fel, amelyeknek elemei külön-külön is felhasználhatók. Ily módon az elektronsugár okozta mintamozgás és a mintatartó instabilitásai miatti bemozdulás korrigálhatóvá válik az egyes képkockák összehasonlításával. A mozgókép üzemmód hasznosítható dózisfrakcionálásra is: ha pl. a megengedett dózis 20 elektron/pixel másodpercenként, akkor azt fel lehet osztani 20 darab 1 elektron/pixeles képre, amelyek expozíciós ideje egyenként 50 msec.

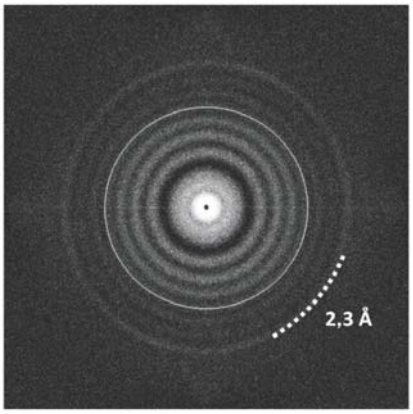
A DED-k integráló és elektronszámláló üzemmódban is működhetnek. A kettő között az a különbség, hogy az integráló módban pixelenként kiolvassák az analóg feszültség jelet (pl. egy 4K x 4K pixelszámú detektorban), majd digitalizálják, és ez adja a képet. (McMULLAN 2009). Az elektronszámláló üzemmódban a beérkező elektron helyét azonosítják és az analóg jel helyett egyetlen diszkrét impulzust rendelnek a legnagyobb intenzitású pixelhez. (3.8. ábra).

Azáltal, hogy meghatározzák az elektronok „landolási” pontját és ezt egyetlen impulzussal helyettesítik, javul a detektálási hatásfok valamennyi frekvencián.

A szuperfelbontású üzemmódban (3.8.b. ábra). a detektorba érkező detektorok landolási helyének pontos meghatározására a pixelméretet szoftveres úton egynegyed méretre csökkentik miközben a pixelek fizikai mérete változatlan marad. Ennek következtében tovább javul a detektálási hatásfok, viszont a felvételi sebesség lecsökken a normál felbontású elektronszámláláshoz képest.



3.8. ábra. *Integráló és elektronszámláló üzemmód közötti különbség, továbbá a szuperfelbontás szemléltetése* (BOOTH 2013)



3.9. ábra. A direkt elektron detektor szuperfelbontásának szemléltetése (Thon-gyűrűk). A legkülső fehér kör a detektor pixel méretnek megfelelő információs határ (Nyquist-frekvencia, lásd alább) (3,4 Å). A szaggatott fehér körív a szuperfelbontással kapott 2,3 Å-ös felbontást jelöli (BOOTH 2013)

A szuperfelbontás hatását egy platina-iridium rétegen felvett elektronmikroszkópos kép Fourier-transzformáltjával szemléltetjük (3.9. ábra)

A detektorokat első sorban a detektálási kvantum hatásfokkal (DQE, Detective Quantum Efficiency) jellemzik. Mielőtt a DQE-ről írnánk, meg kell ismerkednünk az úgy nevezett Nyquist-frekvenciával, mert a DQE-t és az MTF-et is a Nyquist-frekvencia (Nq) függvényében ábrázolják.

III.3.2. Nyquist elmélete

A Fourier-analízis elméletéből ismeretes, hogy a képek különböző szinusz hullámok összegéből állíthatók elő. Ezek közül a legnagyobb frekvenciájú hullám határozza meg, hogy milyen lesz a felbontás.

Nyquist elmélete a mintavételezések gyakoriságára ad támpontot. A mintavételezésnek legalább kétszer gyakoribbnak kell lenni, mint a képen előforduló legnagyobb (térbeli!) frekvencia, azaz a legfinomabb képrészlet, ahhoz, hogy azt a részletet fel lehessen bontani. Tehát ahhoz, hogy egy *d* felbontást elérjünk, a mintavételezés távolságának *d*/2-nek vagy annál kisebbnek kell lenni. Viszont a mintavételezési pontok távolságát a detektor pixeleinek mérete korlátozza. Nyquist elmélete szerint legalább két detektáló pixelre van szükség egy vonalpár (egy fekete és egy fehér vonal) felbontására.

$$\text{Nyquist-frekvencia (Nq)} = \frac{1}{2 * pixel\ méret} \tag{3.1}$$

A pixelméret csökkentése gyakoribb mintavételezést, nagyobb detektor felbontást tesz lehetővé, de csökkenő kontrasztot eredményez. A detektor összes pixeleinek a száma a látómező méretét határozza meg.

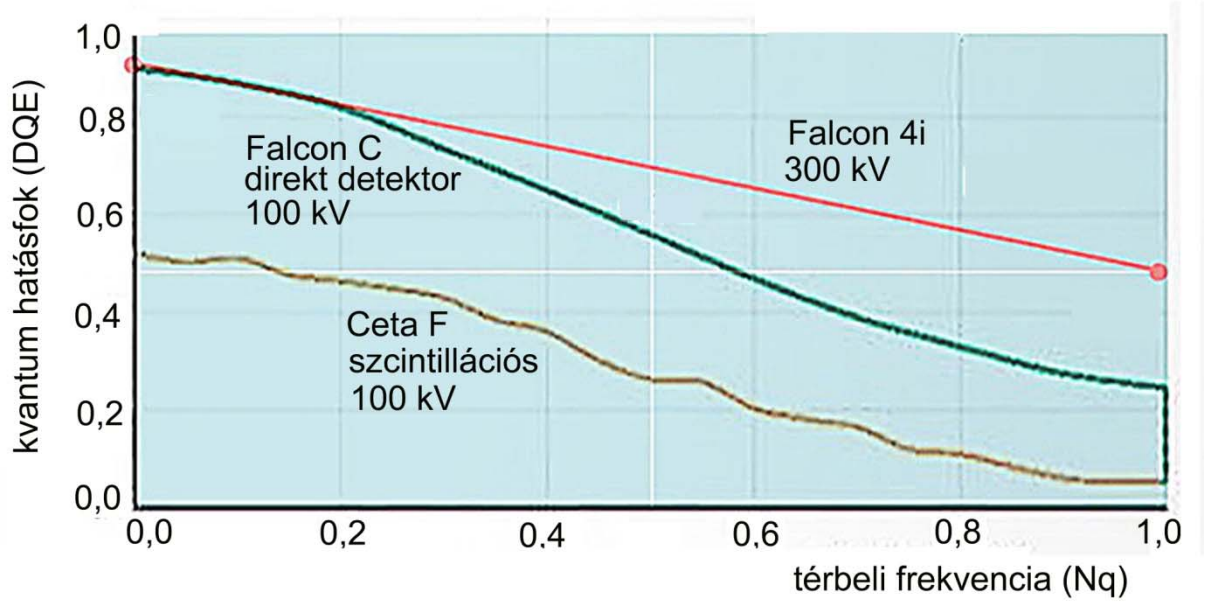
Ha két különböző pixelméretű detektor kvantumhatásfokát akarják összehasonlítani, akkor azt térbeli (!) frekvencia, a Nyquist-frekvencia (Nq) függvényében szokás megadni.

Detektálási kvantum hatásfok

Visszatérve eredeti témánkhoz, a detektorokat a detektálási kvantum hatásfokkal (DQE, Detective Quantum Efficiency) szokás jellemezni, amely a detektorral kapott kép jel/zaj viszonyát (S/N, signal/noise) hasonlítja össze a beérkező jelnek jel/zaj viszonyával:

$$DQE = \frac{\left(S/N\right)^2_{ki}}{\left(S/N\right)^2_{be}} \tag{3.2}$$

Nagyobb DQE jobb minőségű képet jelent. A tökéletes detektor hatásfoka DQE=1. A valóságban DQE ennél kisebb és függ a térbeli frekvenciától. A DQE reprezentatív értékeként gyakran a 0,5 Nq-nál mérhető DQE (0,5Nq) értéket adják meg.



3.10. ábra. *A Falcon C direkt elektron detektor és a Ceta F szcintillációs alapú indirekt detektor összehasonlítása a detektálási kvantum hatásfok (DQE) szempontjából 100 kV-os mikroszkóp feszültségnél. A Falcon 4i detektor görbéje 300 kV gyorsítófeszültségre vonatkozik*
(Thermo Fisher Scientific adatai alapján)

A 3.10. ábra azt mutatja, hogy a direkt elektronok nagyobb hatásfokkal működnek, mint a CCD alapú indirekt detektorok, továbbá azt is, hogy a Falcon 4i detektor 300 kV-on még kedvezőbb DQE-t mutat, mint a 100 kV-on működő Falcon C detektor.

Az integráló üzemmódra jellemző: a rövid expozíció, nagy dózissebesség (10-50 elektron/pixel/s), és az elektronszámláláshoz viszonyított alacsonyabb DQE.

Az elektronszámlálásra jellemző: a nagyon gyors képkocka sebességek, nagyon alacsony dózissebesség (0,5-5 elektron/pixel/s), hosszú expozíciós idő, és az integráló üzemmódhoz viszonyított magasabb kvantumhatásfok.

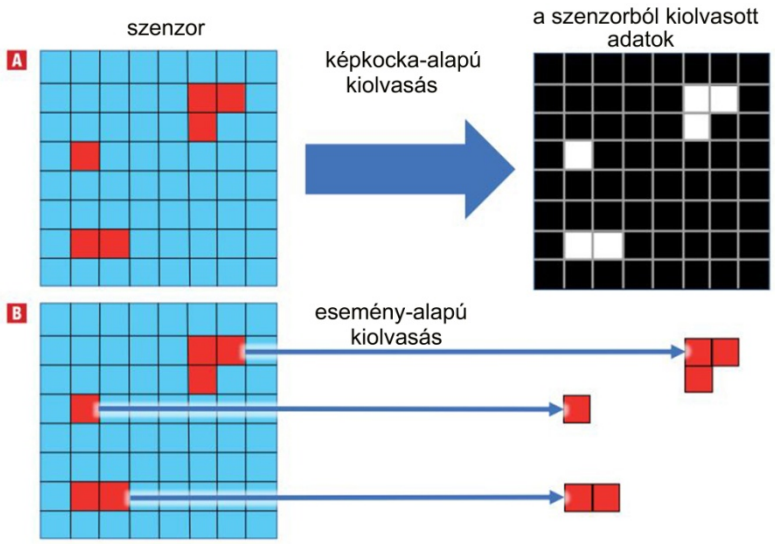
A Direct Electron, a Thermo Fisher Scientific és a Gatan cégek detektorai képesek az integráló és elektronszámláló üzemmódra is.

III.3.3. Képkockaalapú (frame-based) és eseményalapú (event-based) adatkiolvasás a direkt elektron detektorokban

Először is definiáljuk mit értünk „esemény” alatt: egy elektron beérkezése a detektorba eseménynek számit. Az eddigiekben láttuk, hogy a DED-ből kiolvasott adatok képkockánként lettek kiolvasva. Képkockát képezhetett a detektor egész felülete vagy annak egy jól meghatározott pixelszámú tartománya. Mint a 3.11. ábra mutatja, egy-egy képkocka kiolvasása sokkal több adat továbbításával jár, mint az, ha nem olvasnak ki minden pixelt a detektorból, hanem csak azokat, amelyekbe elektron érkezett be. Gondoljunk arra, hogy elektronszámláló üzemmódban gyakran 20 és 100 között lehet azon pixelek száma, amelybe összesen egy elektron érkezik.

Eseményalapú üzemmódban működhetnek mind a monolitikus (MAPS), mind pedig a hibrid pixeles DED-ek.

Az eseményalapú adatkiolvasással működő MAPS detektorok az alacsony dózisú leképezésekkor és a nagy időbeli felbontású alkalmazásoknál játszanak kritikus szerepet, és a krio-EM SPA pont ilyen alkalmazási terület.



3.11. ábra. *Képkockaalapú és eseményalapú adatkiolvasás a direkt elektron detektorból* (LEVIN 2023)

Az eseményalapú adatkiolvasáshoz társul egy EER (Electron Event Representation) (szabadalmazás alatt álló) tömörített fájl formátum. (Thermo Fisher Scientific)

3.3. táblázat. *Néhány adat a Falcon C és Falcon 4i detektorok specifikációjából*

	Falcon C direkt elektron detektor	Falcon 4i direkt elektron detektor
Szenzor mérete	2048 x 2048 pixel 5,7 x 5,7 cm^2	4096 x 4096 pixel 5,7 x 5,7 cm^2
Pixelméret	28 x 28 μm^2	14 x 14 μm^2
TEM gyorsítófeszültség	100 kV	200 kV, 300 kV
Képkocka sebessége tároláshoz	240 képkocka /sec (EER mód)	320 képkocka / sec (EER mód)
Működési módok	Elektronszámláló és gyors lineáris mód	Elektronszámláló és gyors lineáris mód

Irodalom

BOOTH, C. et al. (2013): Applications of electron-counting direct-detection cameras in high resolution cryo-electron microscopy, *Microscopy and Analysis* 2013 Sept., 13-21.

CHAN, L.M. et al. (2024): High-resolution single-particle imaging at 100-200 keV with Gatan Alpine direct electron detector, *Journal of Structural Biology* 216, 108108.

LEVIN, B.D.A. (2021): Direct detectors and their applications in electron microscopy for materials science, *J. Phys. Mater.* 4, 042005.

LEVIN, B.D.A. et al. (2023): Even-based direct detectors and their applications in electron microscopy, *Wiley Analytical Sciences,* 6 Febr. 2023.

McMULLAN, G. et al. (2009): Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy, *Ultramicroscopy* 109, 1126-1143.

McMULLAN, G. et al. (2023): Structure determination by cryo-EM at 100 keV, *PNAS* 120, 49, e2312905120.

PEET, M.J. et al. (2019): The energy dependence of contrast and damage in electron cryomicroscopy of biological molecules, *Ultramicroscopy* 203, 125-131.

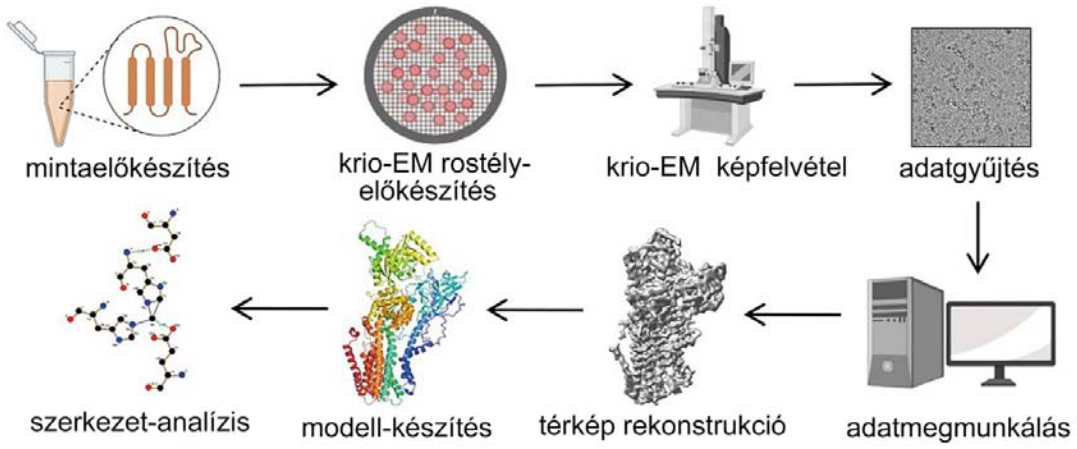
POZSGAI, I. (2023): A krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus, Typotex, Budapest, ISBN 978 963 493 070 9

VENUGOPAL, H. et al. (2025): High-resolution cryo-EM using common LaB_6 120-keV electron microscope equipped with a sub-200-keV direct electron detector, *Sci.Adv.* 11, eadr0438.

ZHANG, X. et al. (2021): Evolving cryo-EM structural approaches for GPCR drug discovery, *Structure* 29, 963-974.

IV. Fehérjék krio-EM SPA vizsgálatának gyakorlati vonatkozásai

A krio-EM egyedi részecskék analízisének (SPA) munkafolyamatát az alábbi ábrával szemléltetjük (4.1. ábra)



4.1. ábra. *A krio-EM egyedi részecskék analízisének (SPA) munkafolyamata* (ZHU 2023)

A krio-EM egyedi részecskék analízisének (SPA) és a krio-elektron-tomográfiának kísérleti és elméleti aspektusairól jelent már meg magyar nyelvű tankönyv (POZSGAI 2023). Itt a krio-EM SPA-nak azokat a vonatkozásait foglaljuk össze röviden, amelyek vagy újabb keletűek vagy a fehérjék vizsgálata szempontjából fontosak.

IV.1. Krio-EM SPA minták szűrővizsgálata

A krio-EM egyedi részecskék analízisekor (SPA) a fehérjék (vagy egyéb makromolekulák) vizes oldatát használják, amelyet a vizsgálat előtt nagy sebességgel megfagyasztanak egy mikrostélyra (vitrifikálás). A vízből a gyors hűtés következtében amorf jég képződik, amely megvédi a mintát az elektron nyalábtól és a vákuumtól. (Lassú fagyasztáskor a vízből kristályos jég képződik, ami roncsolja a mintát.) A fehérje oldatnak nagy tisztaságúnak és homogének kell lennie. Ezt szűrővizsgálatokkal ellenőrzik így kímélve időt és pénzt. (A krio-EM gépideje költséges.)

A fehérjék szétválasztására a szennyezőktől és a fragmentektől való megtisztítására gélelektroforézist alkalmazhatnak, amely molekulatömeg alapján választja szét a molekulákat gélközegben elektromos tér segítségével (SDS-PAGE, WIKIPEDIA). Az elválasztás másik módja a méretkizárásos kromatográfia (SEC, WIKIPEDIA) illetve annak fényszórással (https://en.wikipedia.org/wiki/Multiangle_light_scattering) kombinált változata a SEC-MALS. A molekulák méreteloszlását a dinamikus fényszórással (DLS, WIKIPEDIA) ellenőrzik. Végül a vizsgálatra kiválasztott fehérjék tömegét tömegspektrométerrel mérik. Nagy tömegű,

megadalton tömegtartományba eső minták esetén a tömeg/töltés hányados nem elegendő a tömeg meghatározására, ilyenkor a töltést külön is kell mérni (töltésdetektáló tömegspektrometria, charge detection mass spectrometry), (MS, WIKIPEDIA).

A krio-EM SPA vizsgálatokat rendszeresen megelőzi egy negatív festésű, szobahőmérsékletű transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat is, amely gyors és a fehérje molekulákat nagyobb kontraszttal mutatja, mint a krio-EM. A negatív festésű képek felbontása nem jobb, mint 15 Å (a nehézfémsókkal való festés miatt), de sok hasznos információ tartalmaznak az agglomerálódásra vonatkozóan, és például kezdeti 3D modell generálására is használhatók. A negatív festésű minták krio-EM-re már nem alkalmasak. A tényleges krio-EM vizsgálatok előtt még egy olcsóbb krio-EM-et is használnak, amelyikkel megnézik a jégréteg vastagságát a fehérjék sűrűségét stb. olyan laboratóriumokban, ahol ezt anyagilag megengedhetik.

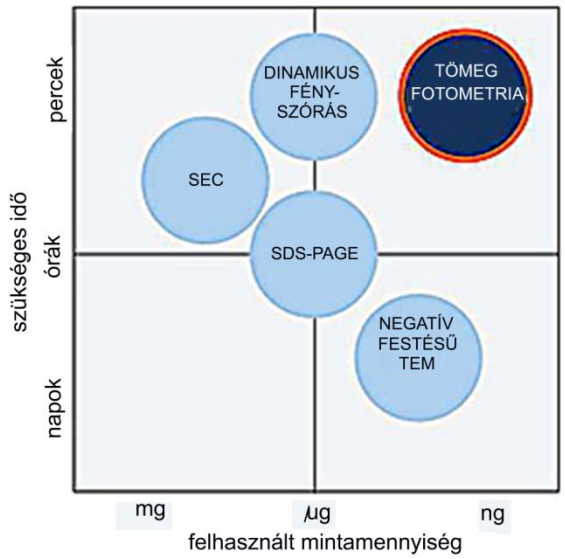
Nem régen jött be a mintaszűrés gyakorlatába a tömegfotometria (mass photometry, MP), amely a fent felsorolt vizsgálatoknál alkalmasabbnak bizonyult a krio-EM minták szűrésére (YOUNG 2018, SOLTERMANN 2020).

A tömegfotometria olyan bioanalitikai módszer, amely az oldatban lévő egyes részecskék tömegét méri nagy pontossággal, anélkül, hogy a részecskéket jelöléssel kellene ellátni (REFEYN).



4.2. ábra. *A tömegfotometria elvéhez* (REFEYN Mass Photometry explained videóból)
Az ábrán alulról jön a lézerfényes megvilágítás. A részecskék felülről ülepednek az oldatból az üveg fedőlemezre. A fényesebb világoszöld vonal a fedőlemezről visszavert fényt, a sötétzöld vonal a részecskéről szórt fény jelzi. A visszavert és szórt fény interferenciájából adódó jel egyenesen arányos a részecske tömegével.
(https://www.youtube.com/watch?v=JizlWM8NC_8)

MP-vel meghatározható az oldatban lévő fehérjék tömege széles tömegtartományban (30 kDa - 6 MDa), azok tisztasága, stabilitása, más fehérjékkel való kölcsönhatása.



4.3. ábra. *Krio-EM minták szűrésére használt módszerek összehasonlítása SEC- méretkizárásos kromatográfia, SDS-PAGE- fényszórással kombinált méretkizárásos kromatográfia* (M&A 2025 szept.)

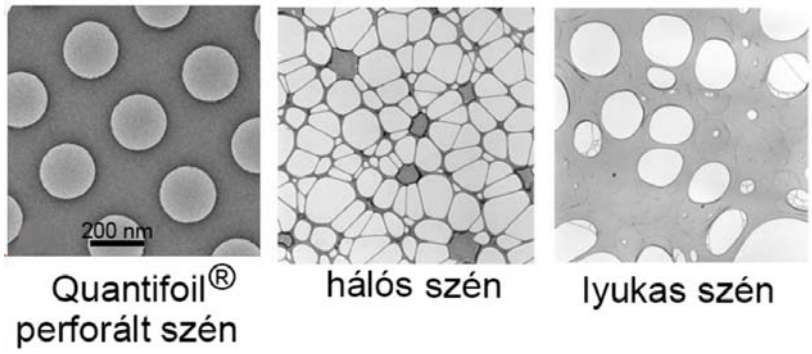
A 4.3. ábra szerint az MP a legkevésbé időigényes és a legkevesebb mintatömeg (10-20 µL) szükséges a vizsgálathoz. A 4.3. ábrán bemutatott módszereken az MP-n kívül csak a negatív festésű elektronmikroszkópia ad még egyedi részekre vonatkozó információt, viszont idő igényesebb és a tömegfotometriához elegendő oldatkoncentrációnál (100 pm - 100 nM) nagyobb koncentrációjú oldatokat igényel. Az MP-hez szükséges tömegspektrométer a Refeyn cég terméke. (REFEYN)

IV.2. Krio-EM rostély-előkészítés

A 3 mm átmérőjű mintatartó rács (mikrostély, angolul grid) és az azt bevonó hordozó fólia kiválasztása fontos kérdés.

A rostély anyaga valamilyen fém, többnyire réz vagy arany. A rostélyra felvisznek egy vékony amorf szén vagy arany fóliát. Néha a hordozó fóliára még egy vékony filmet is felvisznek, azért, hogy a fólia felületi tulajdonságait megváltoztassák. A film anyagok közt is a leggyakoribb az amorf szén, de néha grafént vagy grafén-oxidot alkalmaznak (FAN 2022).

Az amorf szénhártyát fedő grafén megszünteti a vizsgálandó molekuláknak a levegő-víz határfelületen történő felhalmozódását.

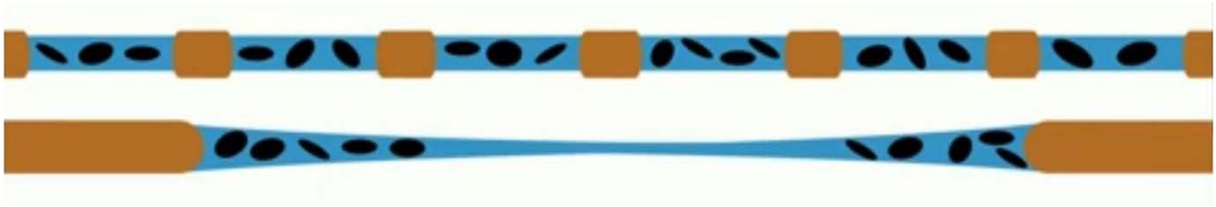


4.4. ábra. *A mintatartó rostélyon alkalmazott szénhordozók szerkezeti formái. A képeken a rostély egyetlen hálószemén (mesh) belüli szerkezetek láthatók* (PASSMORE 2014)

A mikrostély és a hordozó fólia elektromosan vezetők kell, hogy legyenek, ne töltődjenek fel, a besugárzó elektron nyaláb ne indukáljon mintaelmozdulást. Legyenek hidrofilek, hogy a minta egyenletesen szétterüljön rajta. Az amorf szénhártya plazmasugaras kezeléssel hidrofillé tehető.

A 4.4. ábrán mutatott Quantifoil® mikrostély olyan változata is létezik, amelynél a mikrostély és a hordozó fólia is aranyból van, márkaneve UltrAuFoil®. Ez a mikrostély meglehetősen nagy stabilitást (kis elmozdulást) biztosít az elektronnyaláb alatt (RUSSO 2014).

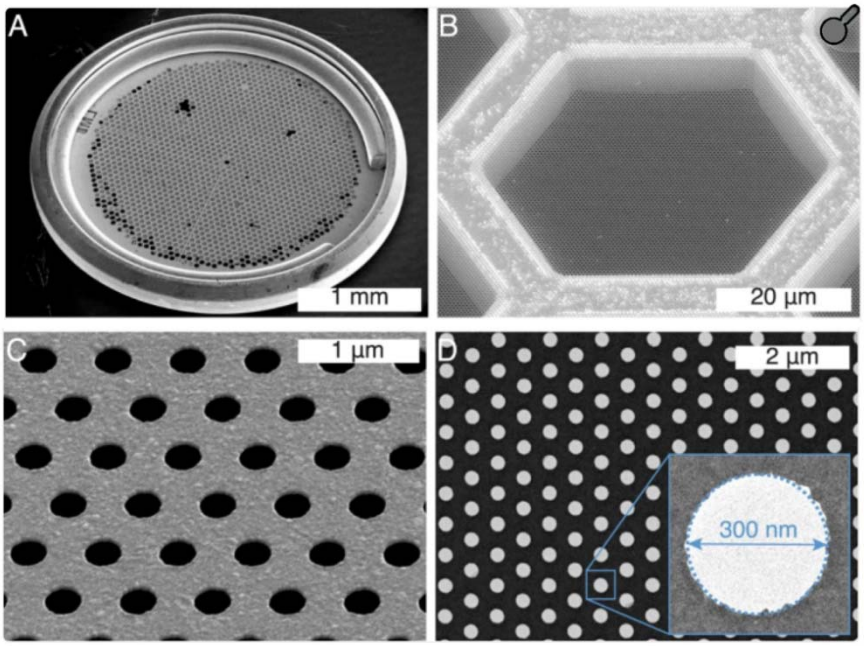
Az alábbi ábrából látható, hogy a jégréteg egyenletessége függ a lyukmérettől (4.5. ábra).



4.5. ábra. *A mikrostély lyukmérete befolyásolja a jégréteg egyenletességét* (NAYDENOVA 2023)

Az UltrAuFoil® egyik kifejlesztője Russo is társszerzője annak az új mikrostély konstrukciónak, amelynél az elektronnyaláb indukálta elmozdulás 1 Å-nél kisebb. (4.6. ábra) (NAYDENOVA 2020 és 2022). Kísérleti és elméleti kutatások révén megállapították, hogy az arany fóliában lévő lyukak átmérőjének legfeljebb tízszer szabad nagyobbnak lenni a jégréteg (és egyben az Au fólia) vastagságánál, ahhoz, hogy a jégréteg ne púposodjon fel a nagyon gyors hűtés következtében. A szokásos 300 Å jégréteg vastagságot tekintve a lyuk átmérőjének 300 nm-nek vagy annál kisebbnek kell lennie.

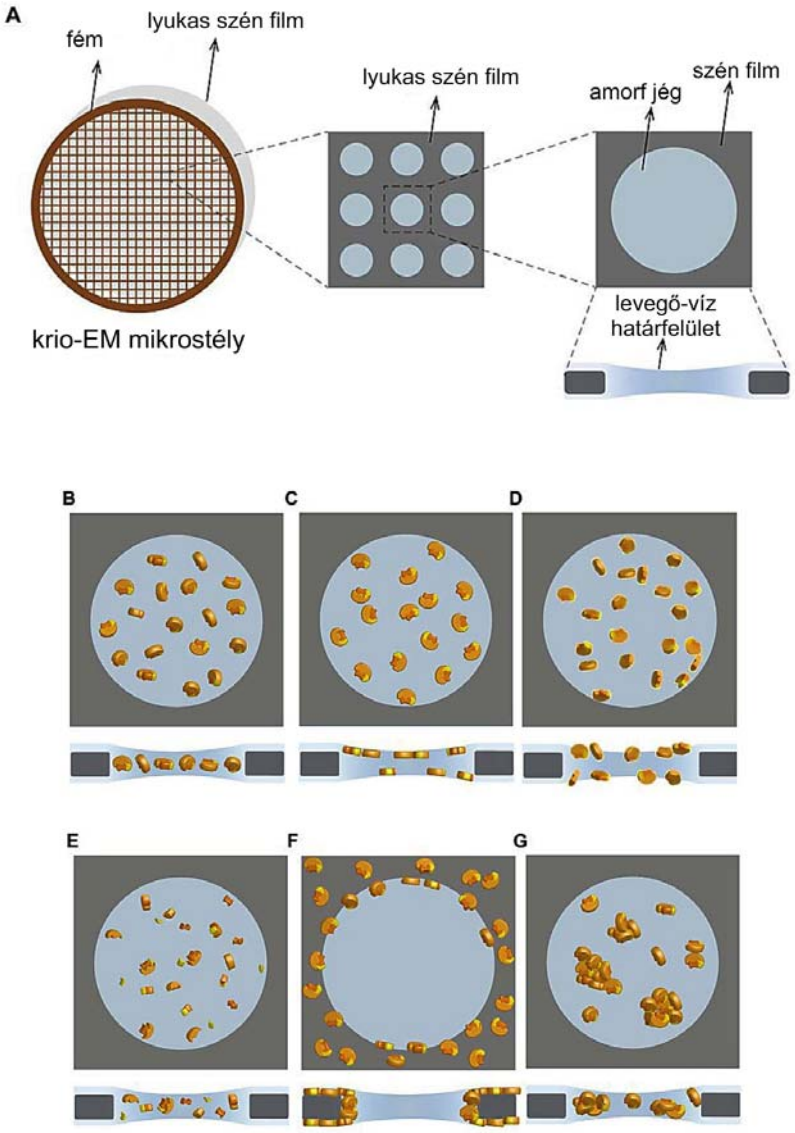
Minthogy kis atomtömegű fehérjék vizsgálatához 300 Å-nél vékonyabb jégréteget alkalmaznak, ezért készítettek egy olyan mikrostély változatot is, amelyben az arany fóliában lévő lyukak átmérője 200 nm.



4.6. ábra. *A HexAuFoil krio-EM mintatartó rostély. A/ a 3 mm-es Au mikrostély, B/ egyetlen hatszögletű hálószem a rostélyon belül, C/ a B/ ábra közepén lévő Au fólia nagyobb nagyításban, D/ a C/ felvételnél még nagyobb nagyítás és fóliában lévő egyetlen lyuk az inzertben* (NAYDENOVA 2022)

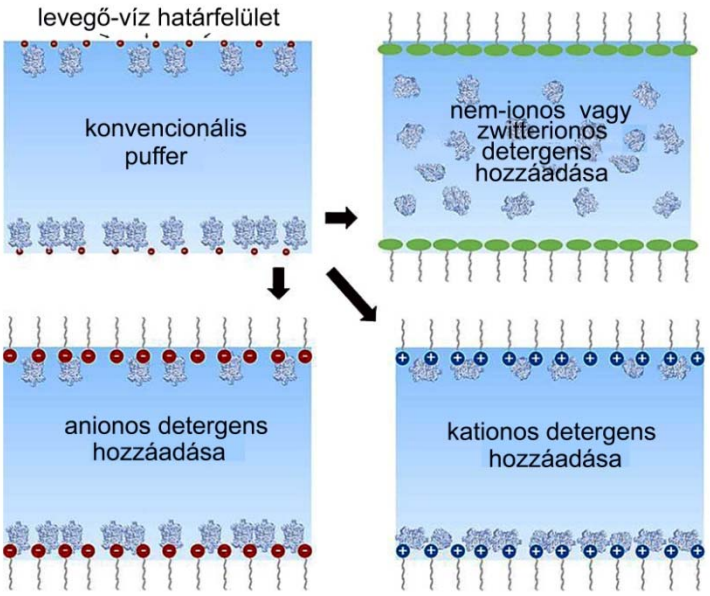
A HexAuFoil-nak elnevezett mikrostély érdekessége, hogy UV-sugaras mikrolitográfiával készül szilícium lapka felszínén és csak utána választják le a szilíciumról. A készítési eljárás ipari méretekre alkalmas gyártást tesz lehetővé.

A minta-előkészítéskor számos probléma léphet fel, ami veszélyeztetheti a mérés sikerét. Az alábbi ábra öt olyan esetet mutat be, amely minta-előkészítéskor elkerülendő (4.7. ábra).



4.7. ábra. *Krio-EM SPA minta-előkészítés. A/ Szokásos elrendezés: fém mikrostély, rajta lyukas szén hártya, a hártya-lyukakban van a vizsgálandó mintát tartalmazó vizes oldat, amorf jég formájában. B/ ábra jól előkészített mintát mutat. C/- G/-ig nem kívánatos jelenségek láthatók. C/ kitüntetett orientációban vannak a molekulák. D/ a fehérje denaturálódott. E/ a minta „szétesett". F/ a minta a szénhártyára került. G/ a minta aggregálódott* (XU 2022)

A C/ ábrán látható jelenség, a levegő-víz határfelület zavaró hatása, mint említettük grafén fólia alkalmazásával elkerülhető. Egy másik lehetséges megoldás detergens alkalmazása a mintát tartalmazó vizes oldatban (4.8. ábra).



4.8. ábra. *Nem ionos vagy zwitterionos detergens hozzáadása a puffer oldathoz, annak megakadályozására, hogy a fehérjék a levegő-víz határfelületen kössenek ki* (LI 2021)

A nem ionos vagy zwitterionos detergensek megszüntethetik a fehérje molekuláknak a levegő víz határfelülethez való kötődésüket és az ennek következtében létrejövő kitüntetett orientációt. Ezek közzé a detergensek közzé tartozik a DDM, digotin CHAPS, FC10, GDN, LMNG.

Az anionos detergenseknek nincs hatása a fehérjék elhelyezkedésére, a kationos detergensek pedig legfeljebb a fehérjék orientációját változtatják meg, de változatlanul a határfelületen maradnak (LI 2021).

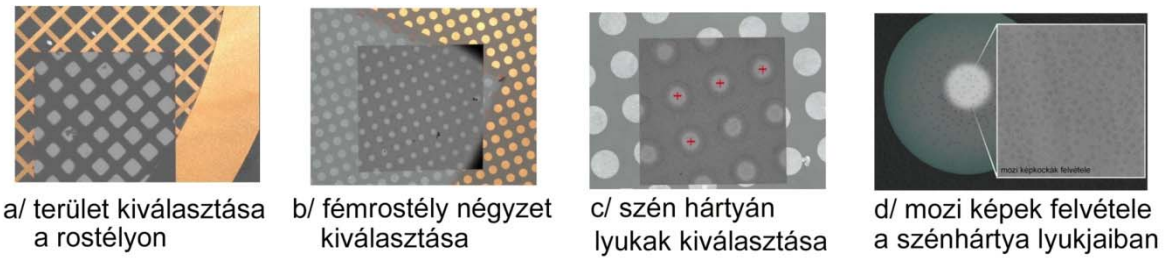
IV.3. Adatgyűjtés

A krio-EM SPA-nál adatgyűjtéskor több paraméterre kell figyelni. Az első az, hogy alacsony dózisú üzemmódban dolgozzunk, hogy az érzékeny fehérjéket megkíméljük a sugárkárosodástól. A teljes dózist (angolul fluence) a felületegységre jutó elektronok számával mérik $e^-/Å^2$ egységekben. Ez a molekulák méretétől függően 30-60 $e^-/Å^2$.

Minthogy a direkt elektron detektorok moziképeket vesznek fel, a teljes dózis eloszlik a képkockák között. Ezt dózisfrakcionálásnak nevezik és az egy képre eső dózissal adják meg $e^-/Å^2$/képkocka egységekben. Ennek a frakciónak az értéke 0,5-1,5 $e^-/Å^2$/képkocka szokott lenni.

Szintén a minták kímélését jelenti, hogy a fókuszálást nem az exponálandó molekulán, hanem attól távolabb végzik el.

A krio-EM SPA képek a moziképek átlagolásából jön ki. Az első lépésben kis nagyítású felvételek sorozatát készítik el a mikrostélyról, majd egyetlen képpé egyesítik. Ezt hívják atlasznak. A további lépéseket a 4.9. ábrával szemléltetjük.

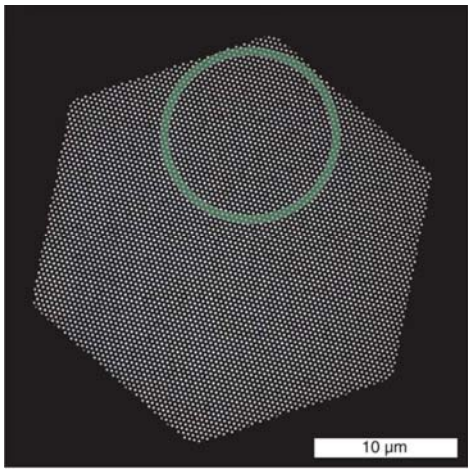


4.9. ábra. *A krio-EM SPA adatgyűjtéséhez* (www.vimeo.com/492721036 videó alapján)

A 4.9. a/ ábráján az atlaszból kiválasztják azt a területet, amelyen a jégréteg vastagsága megfelelő a felvételkészítéshez. A b/ ábrán a nagyítás növelésével kiválasztható a fémrács egyetlen négyzete (szürke ferde négyzet). A nagyítás további növelésével a kerek jégréteg válik láthatóvá a szénrétegben. d/ Végül a megfelelő fólialyukak (jégbezárt fehérje) kiválasztása után elkezdődhet a direkt elektron detektor mozifelvételeinek a készítése (www.vimeo.com/492721036 videó alapján).

A mikroszkópos három stratégiát követhet a vizsgálatokhoz: a szén fólián belüli egyetlen lyukban egy vagy több felvételt készít, vagy a harmadik lehetősége, hogy több lyukban készít automatikusan felvételeket. Az első eset akkor ajánlatos, amikor 2 Å-nél jobb felbontást akar elérni. A második és harmadik stratégiánál 2,5-3 Å-ös felbontást még el lehet érni, viszont nagymértékben megnő az időegység alatt elkészíthető felvételek száma. A mikroszkópos vizsgáló nem a mintatartó asztal pozícióját változtatja, hanem a képet tolja el elektronikusan (beam-image shift). A kép eltolásakor megnő a leképezési hiba (kóma), de ezt mikroszkóp konstrukciótól függően hardveresen vagy szoftveresen kompenzálják. A Thermo Fisher Scientific Krios 5 mikroszkópban ezt aberration-free image shift-nek (AFIS) nevezik. Ezzel a megoldással akár 22000 felvétel is készíthető 24 óra alatt.

A korábban bemutatott HexAuFoil (4.6. ábra) esetén a 200 vagy 300 nm-es lyukátmérő miatt sok fólialyuk kerül közel egymáshoz, így nagyszámú felvételt lehet készíteni automatikus üzemmódban a mintatartó asztal megmozdítása nélkül (4.10. ábra).



4.10. ábra. *3 mm átmérőjű HexAuFoil grid ~ 800 hexagont tartalmaz. Az ábrán zölden bekeretezett egyetlen hexagonon belül pedig több mint 800 fólialyuk található. Emiatt nagy sebességgel sok nagyfelbontású kép készíthető képeltolás segítségével* (NAYDENOVA 2020)

Fontos tényező az adatgyűjtéskor a defókuszálás. Ugyanis a fókuszált képben legkisebb a kontraszt. A kontraszt növelésekor -0,5 µm és -2.0 µm közötti alulfókuszálást alkalmaznak. Túl nagy fókuszálás csökkenti a nagyfrekvenciás komponenseket és ez által a felbontást.

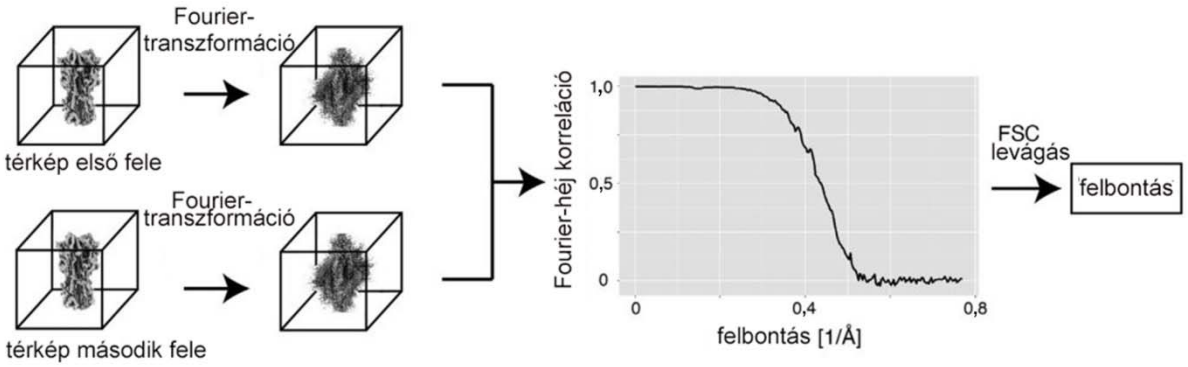
Az objektív apertúra beállítását is meg kell említeni. A krio-EM kép ugyanis fáziskontraszt kép szemben a konvencionális TEM kép amplitúdó kontrasztjával. Ez utóbbi esetben kisebb, a fáziskontraszthoz nagyobb (70 vagy 100 µm-es) aperturára van szükség.

Manapság az adatgyűjtés nagymértékben automatizálva van: a Thermo Fisher Scientific EPU programjával a Krios mikroszkópokon, a JEOL CryoARM300 mikroszkópon pedig a SerialEM program segítségével. A vizsgáló személynek annyi feladata van, hogy kiválasztja az első terepet a szén fólián belüli lyukon, de az sem kizárt, hogy a mesterséges intelligencia határozza meg mélytanulás alapján, hogy melyik terepeken megfelelő a jégréteg vastagsága.

Az EPU program nem ingyenes és csak a TFS mikroszkópjaival működik együtt. A SerialEM program ingyenes, és nemcsak a JEOL mikroszkópjaival, de más cégek mikroszkópjaival, beleértve a TFS-t is együtt tud működni.

IV.4. A krio-EM felbontása

A krio-EM felbontását úgy határozzák meg, hogy a rendelkezésre álló adatokat két egyenlő félre osztják, veszik mindkettő Fourier transzformáltját és megnézik, hogyan korrelálnak az adatok. Ahogy egyre nagyobb felbontás felé közeledünk, az egyre finomabb részletek egyre kevésbé korrelálnak és a korrelációban egy bizonyos levágási pontnál megállapodnak, hogy az ehhez tartozó felbontási értéket tekintsék felbontásnak.



4.11. ábra. *A felbontás kiszámolásához* (BECKERS 2021)

A Fourier Shell Correlation (Fourier-héj korreláció) elnevezés értelmet nyer, ha arra gondolunk, hogy a felbontás a két dimenzióban a diffrakciós gyűrűk segítségével kerül megbecslésre. A legnagyobb átmérőjű, még látható diffrakciós gyűrű a felbontás mértéke. A gyűrűk viszont a mikroszkópos kép Fourier-transzformáltjai. Három dimenzióban nem Fourier-gyűrűkről, hanem Fourier gömbhéjakról beszélünk. A krio-EM SPA-ban ezeknek a Fourier-héjaknak a tulajdonságait vetjük össze úgy, hogy a rendelkezésünkre álló mérési adatokat két egyenlő részre választottuk. A 4.11. ábrán látható görbe úgy értelmezhető, hogy amíg kevésbé finom részleteket hasonlítunk össze, addig a két fél adathalmazban az egyezés jó, a korreláció 1. Amint egyre finomodó mintarészleteket hasonlítunk össze, a korreláció egyre csökken. A kutatókra várt a döntés, hogy melyik legyen az a nagyfelbontású részletekhez tartozó (kis értékű) korrelációs koefficiens, amihez definíció szerint hozzá rendelik a felbontást. Ennek az értéke FSC=0,143 (Fourier Shell Correlatoon) és ekkor a röntgenkrisztallográfiában és a krio-EM SPA-ban megadott felbontás összhangban van.

2023-ban jelent meg egy közlemény a Thermo Fisher Scientific Titan Krios 4 és a JEOL CRYO ARM 300-as mikroszkóp felbontóképességének összehasonlításáról. Az előbbi 2,12 Å, az utóbbié 2, 18 Å volt humán 80S riboszómán). Mi ennek a közleménynek a táblázatát használjuk fel arra, hogy milyen adatgyűjtési paraméterek mellett működött a két mikroszkóp (FRECHIN 2023)

4.1. táblázat. Termo Fisher Scientific Titan Krios 4 és JEOL CRYO ARM 300 összehasonlítása

Mikroszkóp	Titan Krios 4	CRYO ARM 300
Elektronforrás	E-CFEG	CFEG
Energiaszűrő	Selectris-X	Omega
Rés szélesség (eV)	10	20
Kromatikus hiba (eV)	< 0,3	< 0,35
Gyorsító feszültség (kV)	300	300
C2 kondenzor apertúra (µm)	50	50
Objektív apertúra (µm)	-	-
Direkt elektron detektor	Falcon 4	Gatan K3
Fizikai pixel méret (µm)	14	5
Kép formátum/mód	EER	CDS
Névleges nagyítás	165 000	60 000
Látótér ($Å^2$)	$8,7x10^6$	$15,9x10^6$
Automatizáló szoftver	EPU	SerialEM
Pixel méret (Å)	0,72 (0,36 super-resolution)	0,82 (0,41 super-resolution)
Névleges defókusz tartomány	-0,5 től -1,1 (µm)	-1,0-tól -2,0 (µm)
Felvételek száma	13624	4580
Kép/ lyuk szám	3	4
Nyaláb átmérő (µm)	0,65	1,1
Várakozási idő (s)	20 (fókuszálás előtt)	10 (fókuszálás alatt)
Expozíció/asztal pozíció	~24	36
Adatgyűjtési sebesség	309 kép/óra	400-500 kép/óra
Teljes elektron dózis ($e^-/Å^2$)	30	40
Expozíciós idő (s)	3,58	3,0

Irodalom

DLS, WIKIPEDIA, https://hu.wikipedia.org/wiki/Dinamikus_f%C3%A9nysz%C3%B3r%C3%A1s,

FAN, H. et al. (2022): Developing graphene grids for cryoelectron microscopy, *Front. Mol. Biosci.* 9:937253.

FRECHIN, L. et al. (2023): High-resolution cryo-EM performance comparison of two latest-generation cryo electron microscopes on the human ribosome, *Journal of Structural Biology* 215,1, 10.1016/j.jsb.2022.107905, hal-04076613.

LI, B. et al. (2021): Effect of charge on protein preferred orientation at air-water interface in cryo-electron microscopy, *Journal of Structural Biology* 213, 4, 107783.

M&A 2025, https://analyticalscience.wiley.com/content/article-do/mass-photometry-saves-time-and-money-cryo-em-experiments

MS, WIKIPEDIA, https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry

NAYDENOVA, K. (2023): Specimen preparation for cryo-EM, https://www.youtube.com/watch?v=hF17d6XjV98

NAYDENOVA, K. et al. (2020): Cryo-EM with sub-1 Å specimen movement, Science 370, 223-226.

NAYDENOVA, K. et al. (2022): Integrated wafer-scale manufacturing of electron cryomicroscopy specimen supports, *Ultramicroscopy,*

PASSMORE, L. (2014): Cryo-EM course by MRC, 4th. lecture, Sample preparation.

REFEYN, https://refeyn.com/post/enhancing-cryo-em-workflows-with-mass-photometry-a-smarter-pre-screening-approach/?v=a672068055fa

RUSSO, C. (2014): EM Course 2014 of the MRC Laboratory of Molecular Biology, (Cambridge, UK) 3. lecture, Electron Microscopy Physics and Optics

SDS-PAGE, WIKIPEDIA, https://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE

SEC, WIKIPEDIA, https://en.wikipedia.org/wiki/Size-exclusion_chromatography

SOLTERMANN, F. et al. (2020): Quantifying protein-protein interactions by molecular counting with mass photometry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 10774-79

XU, Y. et al. (2022): Recent technical advances in sample preparation for single-particle cryo-EM*, Front. Mol. Biosci*. 9:892459.

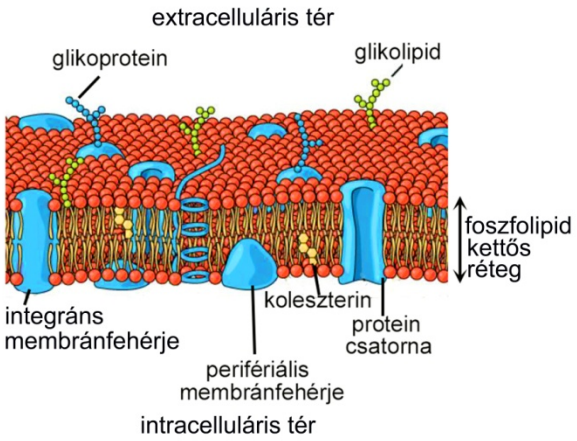
YOUNG, G. et al. (2018): Quantitative mass imaging of single biological macromolecules, *Science* 360, 423-427.

ZHU, K-F. et al. (2023): Applications and prospects of cryo-EM in drug discovery, Military Medical Research 10:10.

V. Sejtmembránok krio-EM SPA szerkezetvizsgálata

V.1. A sejtmembrán

A sejtmembrán (vagy plazmamembrán) választja el a sejtet a külső környezetétől. Feladata a sejt belső terének a külső környezettel való kapcsolatának biztosítása. Ebbe a kapcsolatkörbe bele tartozik a sejtek közötti kommunikáció, a táplálékfelvétel, a kiválasztás, a homeosztázis fenntartása és még sok egyéb. A sejtmembránt kettős foszfolipid réteg alkotja, amelyben az amfipatikus foszfolipid molekulák hidrofób farok részei a sejt belseje felé, a hidrofil fejei (az 5.1. ábrán pirossal jelölve) kifelé néznek. A membránfehérjék három csoportba oszthatók: az integráns fehérjék, amelyek a membrán belsejében találhatók, a transzmembrán fehérjék, amelyek a teljes membránon keresztül hatolnak, és a perifériás fehérjék, amelyek a membrán felületén helyezkednek el. Maga a sejtmembrán egy dinamikusan változó szerkezet, amelyben a foszfolipid molekulák folyadékot alkotnak, és oldalirányban el tudnak mozdulni.



5.1. ábra. *Sejtmembrán vázlatos képe*
(https://teachmephysiology.com/histology/cell-structures/cell-membrane/)

A membránfehérjék szerkezetének tanulmányozása hosszú ideje röntgenkrisztallográfiával történik, de bizonyos nehézségekbe ütközik, mert ezek a fehérjék vagy nem, vagy pedig nem olyan minőségben kristályosíthatók, mint ami a röntgenkrisztallográfia igényeinek megfelelne. További probléma, hogy a membránfehérjék konformációs változásai a kristályosítás miatt nem követhetők nyomon. A 2.1. ábrán látható az óriási eredmény, amit az évtizedek során a röntgenkrisztallográfiával a fehérjék vizsgálatában fel lehet mutatni. A membránfehérjék szerkezetének kutatásában nagy változást hozott a krio-elektronmikroszkópia, mert ehhez nem

szükséges a fehérjék kikristályosítása és a konformációs változások egyetlen analízisen belül is kimutathatók (lásd a 2.1. ábrát).

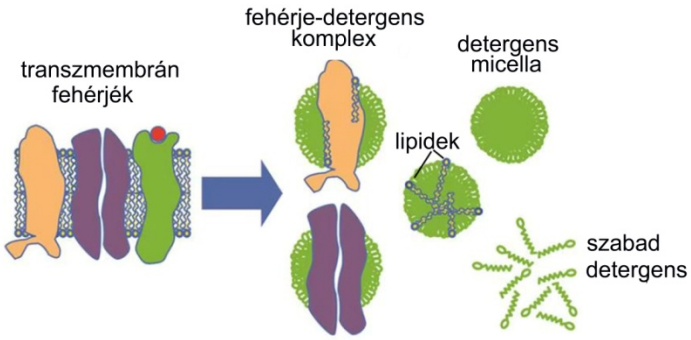
A membránfehérjék több szempontból fontosak, tekintettel arra, hogy a humán fehérjék kb. 25%-át membránfehérjék alkotják (FAGERBERG 2010), és ezek képezik a forgalomban lévő gyógyszerek kb. 60%-ának célpontját (OVERINGTON 2006).

A membránfehérjék vízben oldhatatlanok és szolubilizálásukat úgy kell elvégezni, hogy natív szerkezetük ne változzon meg. Tanulmányozásuk technikailag a szerkezetbiológia egyik legnagyobb kihívása (KRISHNARJUNA 2022).

V.2. Membránfehérjék előkészítése krio-EM SPA-ra

V.2.1. Felületaktív anyagok

Detergensek alkalmazása a membránfehérjék szolubilizálására már sok éve a röntgenkrisztallográfiai minta-előkészítés kapcsán is bevett gyakorlat volt. A detergensek olyan amfifil vegyületek, amelyekben minden egyes molekula egy poláris hidrofil fejből és egy apoláris hidrofób farokból áll. Ez a szerkezet lehetővé teszi zsíroknak és olajoknak vízzel való keveredését. A detergensek vizes közegben micellaszerkezetükkel a sejtmembránok szerkezetét „utánozzák". Felbontják a membrán foszfolipid kettősrétegét, a membránfehérjéket és lipideket a saját micellájukba foglalják bele (5.2. ábra). A detergensek koncentrációjának egy kritikus micellakoncentráció (CMC) felett kell az oldatban jelen lenniük, hogy megakadályozzák a micellafehérje komplex felbomlását (TATE 2010, PRIVE 2007).



5.2. ábra. *A detergensek működési mechanizmusa* (SIGMA-ALDRICH)

Az 5.2. ábra azt szemlélteti, hogy a detergens a membránfehérjével és a membrán lipid tartalmával is külön-külön vízoldható komplexet képez.

A membránfehérjéknek a membránból való extrakciójára és szolubilizálására leggyakrabban használt detergensek listáját az idézett közleményben találjuk meg (KRISHNARJUNA 2022).

A detergensek hátránya, hogy megszüntetik a fehérjék natív lipid környezetét és micella szerkezetük nem kellően „utánozza” a membrán lipid kettősréteget (ZHOU 2013, DÖRR 2016). A membránfehérjék detergenssel való szolubilizálás után, vizes közegben hajlamosak az aggregálódásra és a denaturálódásra (SGRO 2018, VENIEN-BRYAN 2023).

A detergensek két csoportra oszthatók a krio-EM SPA szempontból, attól függően, hogy melyeket alkalmazzák a membránfehérjéknek a membránból való extrakciójához és az azt követő fehérjetisztításhoz és melyeket a vitrifikációhoz. Az elsőt tisztítási detergensnek (purification surfactant) a másodikat vitrifikációs detergensnek (vitrification surfactant) nevezik. Ugyanis néhány membránfehérje előkészítése krio-EM SPA-ra nem működik detergens alkalmazása nélkül, ezért egy második lépésben lecserélik az extrakciós detergenst egy másik lágyabb detergensre vagy amfipolra, vagy nanodiszkre, amely a fehérjeszerkezet megőrzése vagy helyreállítása szempontjából kedvezőbben viselkedik. A detergensek közül a maltozid DDM-t (N-dodecil β-D-maltozid) alkalmazzák leggyakrabban a fehérjéknek a sejtmembránból való extrakciójára, majd az alkalmazás gyakoriságát illetően ezt követi az MNG (maltozid-neopentil glikol) és a digitonin. A DDM-ben tisztított detergenseket gyakran cserélik le a vitrifikáláshoz vázprotein alapú MSP nanodiszkekre, amfipolokra, digitoninra vagy GDN-re. (GDN gliko-diozgenin). A vitrifikáláskor használt detergensek között a digitonin vezet, a maltozidok (pl. DDM) és az MSP nanodiszkek előtt az alkalmazások gyakoriságát illetően (BON 2021). Egy másik szerző szerint a krio-EM SPA-hoz a vitrifikációt megelőzően statisztikailag többnyire kevert detergenseket (LMNG lauril maltoz neopentil glikol és GDN keverékét) vagy (vázprotein alapú) MSP nanodiszkeket használnak (VENIEN-BRYAN 2023).

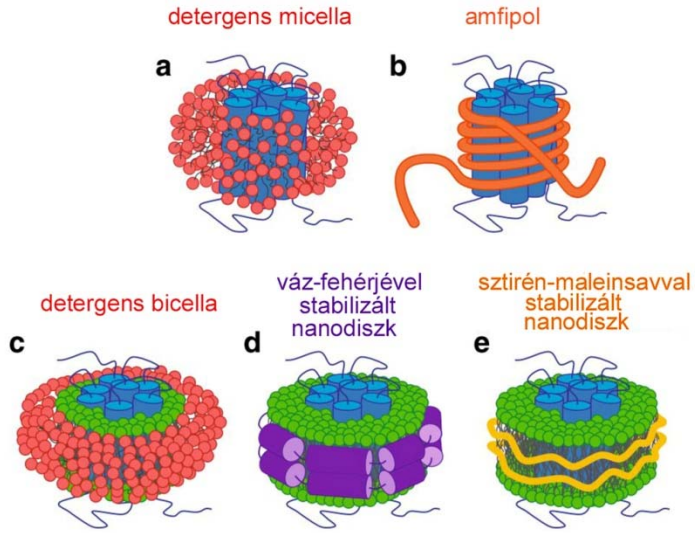
V.2.2. Amfipolok, nanodiszkek

Az amfipolok (TRIBET 1996) olyan polimerek, amelyek detergensek nélkül is képesek a membránfehérjéket (natív állapotban) oldott formában megtartani (POPOT 2011). Az amfipolok, amfifil polimerek; APols összefoglaló néven hivatkoznak rájuk a szakirodalomban (WIKIPEDIA, AMPHIPOLS).

Detergensben oldott membránfehérjékhez amfipolt hozzá adva, az amfipolok lehelyettesítik a detergenst. A detergenst ezután eltávolítják. A keletkező fehérje-polimer komplexek vízben jól oldhatóak és az esetek többségében stabilabbak, mint amilyenek a detergensben voltak (BON 2014). Az amfipolok vissza tudják állítani a detergens által denaturált fehérjéket natív állapotukba (ZOONEN 2014).

Kezdetben (a 2000. év előtt) a membránból való fehérje extrakcióhoz mindenképp detergensre volt szükség. Ma már léteznek olyan amfipolok, amelyek detergensek nélkül is

képesek szolubilizálni és vizes oldatban stabilizálni a membránfehérjét, a körülvevő natív lipid réteggel együtt (pl. Ultrasolute® amfipol) (CUBE BIOTECH). A membránfehérjét körülvevő lipidek megtartása a fehérjék funkcionalitása szempontjából fontos.



5.3. ábra. *Fehérjéket stabilizáló közegek kettős réteg nélkül (a/ és b/ ábra) és kettős réteggel (c/, d/ és e/ ábra)* (DÖRR 2016)

a/ A detergens micellák gömbszerű szupramolekuláris aggregátumok, amelyek önállóan képződnek a detergensnek vizes oldatában egy kritikus micellakoncentráció felett (CMC). A micellákban a detergens molekulák hidrofób lábai befelé, a hidrofil fejei kifelé néznek (a membrán fehérje kékkel jelölve)

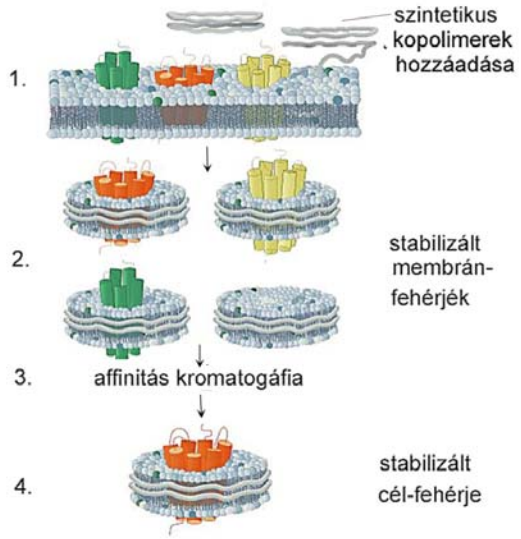
b/ Az amfipol (angolul amphipol) polimer részecskékből áll és veszi körül a membránfehérjét, stabil komplexet képezve vele az oldatban.

c/ A bicellák lipidek (zöld) és detergensek (piros) keverékéből jönnek létre

d/ A vázfehérjével stabilizált MSP nanodiszkekben (MSP, membrane scaffold protein) a lipid kettősréteget egy membrán vázprotein (lila) veszi körül.

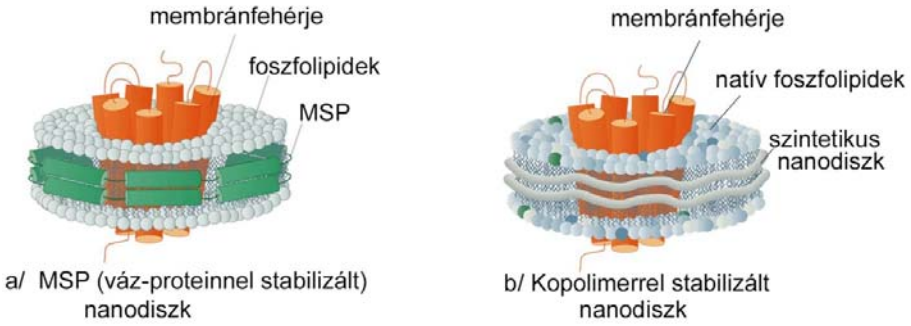
e/ A sztirén-maleinsavval stabilizált SMA nanodiszkben (más néven a SMALP, Styrene – Maleic Acid Lipid Particles, sztirol-maleinsav lipid részecskék) a lipid kettősréteget egy sztirol-maleinsav (SMA, styrene maleic acid) öv veszi körül.

Az amfipolok segítik a membránfehérjék tisztítását is az 5.4. ábra szerint. Ekkor az affinitás kromatográfia az a módszer, amivel a megcélzott membránfehérjét el lehet választani a többi membránfehérjétől.



5.4. ábra. *Fehérjék tisztítása amfipolok segítségével* (CUBE BIOTECH)

A nanodiszkeknek két fajtája van (5.5. ábra): az egyik az MSP nanodiszk (Membrane Scaffold Protein) vagy magyarul vázfehérjével stabilizált nanodiszk (BAYBURT (2002), a másik a kopolimer nanodiszkek. Ez utóbbiak egyik képviselője az SMA (sztirén-maleinsav) nanodiszk (KNOWLES 2009).



5.5. ábra. *Vázproteinnel és kopolimerrel stabilizált nanodiszkek* (CUBE BIOTECH)

Az MSP nanodiszkek mesterséges lipid részecskéket tartalmaznak, a kopolimer (pl. SMA) nanodiszken belül a membrán natív lipid részecskéi maradnak. A lipidet tartalmazó SMA-t SMALP-nak nevezik (SMALP, styrene-maleic acid lipid particles).

Az MSP nanodiszkek mérete 7-17 nm attól függően, hogy milyen vázprotein veszi körül a lipid részecskékek. Méretük eléggé egységes ± 1 nm-en belül. A krio-EM SPA szempontjából ez a csekély méretingadozás kedvező és az is, hogy a vizsgáló a lipid részecskék fajtáját is megválaszthatja. Hátrány, hogy az MSP létrehozása előtt detergensre van szükség a membránfehérje extrakciójához.

A kopolimer nanodiszkek előnye, hogy a membránfehérje natív lipid környezetben stabilizálódik és detergensre nincs szükség a fehérje extrakciójához. A SMALP protokolját itt találjuk meg (KNOWLES 2016).

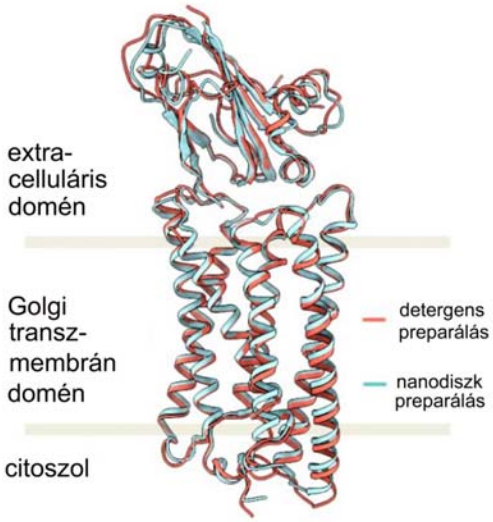
A detergens nélküli membránfehérje izolációra egy olyan módszert dolgoztak ki, amelyben az SMA lineáris oldalláncát ciklikusra cserélték és az így kapott CyclAPols kombináció az SMA kedvező extrakciós tulajdonságait és az amfipolok (APols) jó stabilizáló tulajdonságát mutatja (MARCONNET 2020, HIGGINS 2021). A membránfehérjék detergensmentes izolálásához ajánljuk a következő összefoglaló cikket (KRISHNARJUNA 2022).

V.2.3. Felületaktív anyagok hatása az elektronmikroszkópos kép minőségére

A felületaktív anyagok a vizsgált membránfehérjével együtt kerülnek a krio-EM-be. Eltávolításuk a képből vagy maszkolásuk szoftveres úton történik.

A magas kritikus micella koncentrációjú (CMC) detergensek rontják a kép minőségét, főként a fehérjék stabilitásának befolyásolása révén, de a háttérben lévő micellák is csökkentik a kontrasztot. Alacsony CMC-jű detergensek javítják a felbontást. Az üres nanodiszkeknek vagy amfipoloknak a vitrifikálás előtti eltávolítása méretkizárásos kromatográfiával történhet. Nem ritka, hogy különböző felületaktív anyagokkal párhuzamosan végzett krio-EM SPA mérésekkel döntik el, hogy melyik felületaktív anyag enged jobb felbontást. Az ilyen jellegű méréseknek olyan hozadéka is lehet, hogy a vizsgált membránfehérje esetleg különböző konformációs formában jelenik meg a különböző kísérletekben (BON 2021).

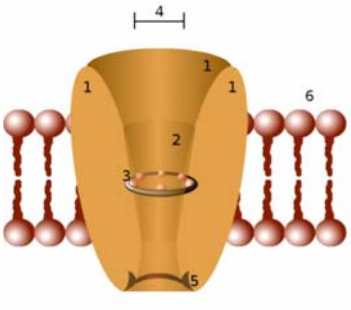
Az OSCA1.2 ioncsatorna krio-EM SPA vizsgálatakor a vázproteinnel stabilizált nanodiszk alkalmazásakor 3.1 Å-ös felbontást, a detergenssel (LMNG, Lauryl Neopenthyl Glycol plusz CHS, Cholesteryl Hemisuccinate) 3,5 Å-ös felbontást értek el (JOJOA-CRUZ 2018).



5.6. ábra. *A humán TMEM87A ioncsatorna két krio-EM szerkezetének összehasonlítása. A világos narancssárga szerkezet LMNG/CHS preparálással készült* (Kang és munkatársaitól származik PDB: 8HSI)*, a világoskék szerkezet nanodiszkes preparáció eredménye* (Hoel és munkatársai PDB: 8CTJ)*. A két szerkezet hasonló, az eltérés r.m.s.d.=1,034 Å* (HOEL 2022, KANG SUPPL. 2024)

V.3. Ioncsatornák szerkezetének krio-EM SPA vizsgálata

Az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, olyan pórusképző fehérjék, amelyek lehetőséget adnak a sejt homeosztázisához szükséges ionoknak a sejtmembránon vagy a sejtszervecskék membránjain keresztül való áthaladásához. Nátrium, kálium, kalcium, klór és más ionok áramlásáról van szó, amelyet a sejtek közötti kommunikáció vagy a táplálékszállítás, netán az elpusztult sejtalkotók kiürítését szolgálják. A mesterséges, fehérjék nélküli foszfolipid kettősréteg gyakorlatilag átjárhatatlan az ionok számára.



5.7. ábra. *Egy ioncsatorna vázlatos képe. 1. A csatornát alkotó fehérje domének (tipikusan csatornánként négy domén). 2. külső előcsarnok, 3. ionszelektív szűrő, 4. a szűrő átmérője, 5. foszforilációs hely, 6. sejtmembrán* (WIKIPEDIA, ION CHANNEL)

Ioncsatornák működését egy elektrokémiai gradiens szabályozza, amely a sejtmembrán két oldala közötti koncentráció, illetve elektromos töltés közötti különbségekből tevődik össze. Az ioncsatornák szabálytalan működése betegségek hosszú sorához vezethet, többek között szív és érrendszeri, idegrendszeri megbetegedésekhez, de a rák kialakulásában is fontos szerepet játszik. Az alább bemutatandó példa, a TMEM175 ioncsatorna, például a Parkinson-kórban játszik szerepet. Vannak hipotézisek, amelyek az ioncsatornáknak az Alzheimer-kór kialakulásában játszott szerepüket tételezi fel (WIKIPEDIA, ION CHANNEL HYPOTHESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE). Így nem meglepő, hogy a G-protein-kapcsolt receptorok (GPCR-ek) után az ioncsatornák képezik a gyógyszerfejlesztések leggyakoribb célpontját.

Az ioncsatornák jellemző tulajdonsága a nyitás és zárás képessége (kapuzás, angolul gating).

Másik fontos tulajdonságuk a szelektivitás: bizonyos ionokat átengednek, másokat nem. Kivételek, azaz nem szelektív ioncsatornák is léteznek.

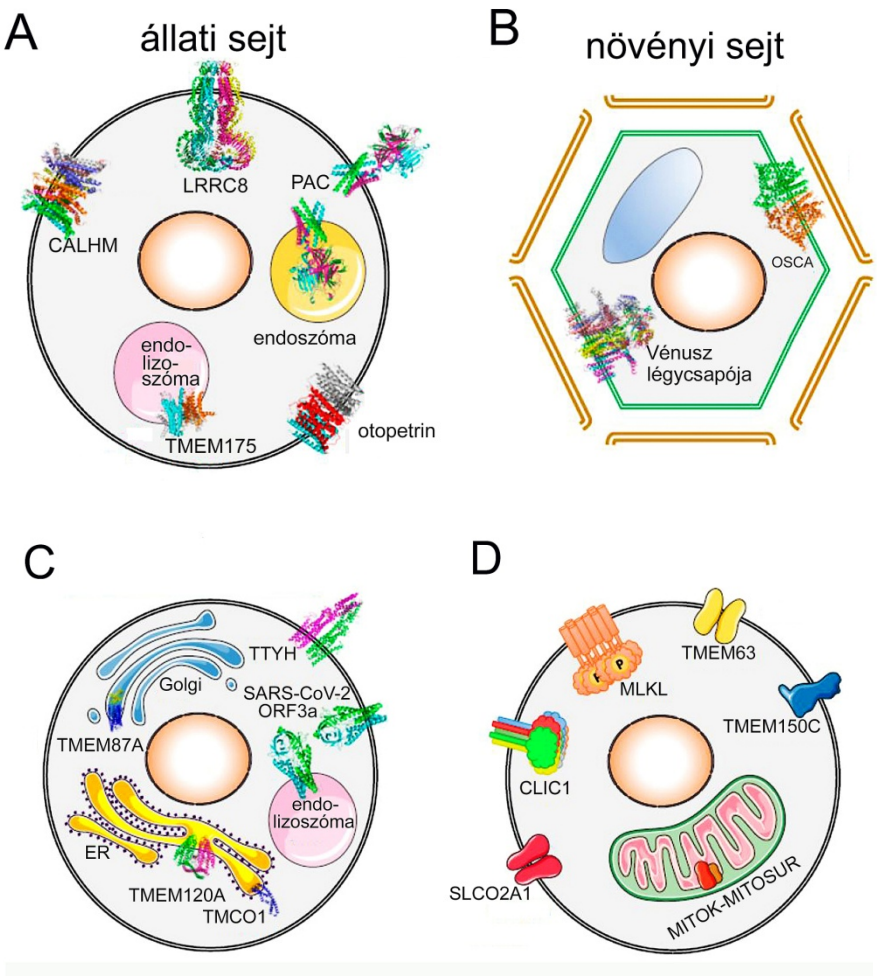
Az ioncsatornák vizsgálatában talán a legfontosabb szerepet az elektrofiziológiai mérések, a patch-clamp technika játszotta (WIKIPEDIA, PATCH CLAMP), de a röntgenkrisztallográfiának is nagy jelentősége volt az ioncsatornák kutatásában. Az ioncsatornáknak patch-clamp technikával való kutatásáért Erwin Neher és Bert Sakmann kapott fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat 1991-ben. Roderick MacKinnon kémiai Nobel-díjat kapott 2003-ban az ioncsatornákkal kapcsolatos munkásságáért. Az ő munkásságában viszont a röntgenkrisztallográfia játszott fontos szerepet.

Ezek után felmerül a kérdés, hogy a két említett módszer mellett juthat-e fontos szerep az ioncsatornák kutatásában a krio-EM-nek. A válasz igen. A röntgenkrisztallográfiával való „versengést" már megválaszoltuk (II. fejezet): a membrán fehérjék többsége nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható és nem igazán alkalmas röntgenkrisztallográfiára. A krio-EM-hez pedig nincs szükség kristályosításra. A patch-clamp technikával szó sem lehet „versengésről", mert a krio-EM az ioncsatornák (transzmembrán fehérjék) szerkezetét mutatja meg, ami alapvetően szükséges az elektrofiziológiai patch-clamp mérések és a biológiai folyamatok megértéséhez.

A genetika fejlődése oly módon járult hozzá az újabb ioncsatornák felfedezéséhez, hogy a már felfedezett ioncsatornák ismert szekvenciáit keresték és homológia alapján találtak újabb ioncsatornákat.

A transzmembrán fehérjékhez (az irodalomban röviden TMEM) nemcsak sejtmembrán, hanem a sejtszervecskék (mitokondriumok, lizoszómák, endoszómák, Golgi-apparátus és endoplazmatikus retikulum) membránfehérjéi is tartoznak.

Chen 2023-as összefoglaló cikkében felsorol olyan közleményeket, amelyek elektrofiziológiai mérések alapján rosszul azonosítottak pórusképző ioncsatorna fehérjéket. (CHEN 2023) A szerző a patch-clamp mérések zaját és nem kívánt kóboráramok meglétét hozza fel lehetséges hibaforrásként. Ennek alapján a krio-EM SPA az elektrofiziológiai módszerek validálásaként is szolgálhat, amennyiben az ioncsatornákra jellemző kritikus szerkezeti elemeket megtalálja vagy azok meglétét vitatja (5.8. ábra).



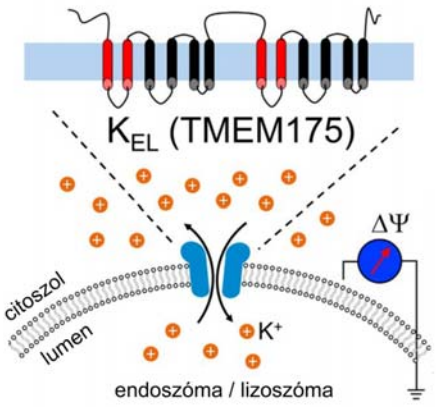
5.8. ábra. *Ioncsatornák krio-EM-mel sikeresnek és vitatottnak minősített esetei.*
A/ és B/ ábra, fehérjék. amelyek ioncsatorna funkcióját a krio-EM alátámasztotta,
C/ fehérjék, amelyek állítólagos ioncsatorna funkcióját a krio-EM vitatja,
D/ javasolt fehérje ioncsatornák, amelyek szerkezetvizsgálatra várnak
(CHEN 2023)

Itt az első példánkban a TMEM175 ioncsatornák kapcsán szemléltetjük, hogy a krio-EM SPA milyen mélységben képes feltárni az ioncsatornák szerkezetét. A második példánk a TMEM87A kapcsán az ioncsatorna krio-EM vizsgálatainak technikai részleteit mutatjuk.

V.3.1. Transzmembrán fehérje 175, (TMEM175), K^+ szelektív lizoszómális ioncsatorna

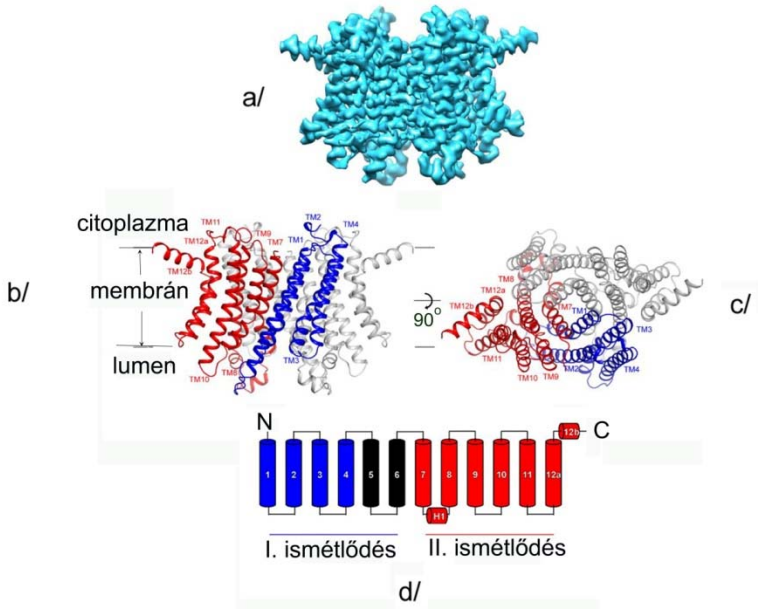
A lizoszómák savas lumennel rendelkező sejtszervecskék, amelyek a sejtek szükségtelen komponenseinek lebontásáért és újrahasznosításáért felelősek. Nagy érdeklődés nyilvánul meg irányukba, amióta jelentőséget tulajdonítanak nekik a rákban és az idegrendszeri megbetegedésekben, különösen a Parkinson-kórban. Az utóbbi években számos összefoglaló cikk jelent a TMEM175 és a Parkinson-kór kapcsolatáról (WU 2023, TANG 2023, SCHULZE 2025).

Gén szűrés alapján azt találták, hogy a TMEM175 fehérje ioncsatornát képezhet. Patch-clamp méréseket alapján megállapították, hogy a TMEM175 szabályozza a lizoszóma membrán potenciálját és pH stabilitását (CANG 2015).



5.9. ábra. *A TMEM175 csatornák topológiájának és a lizoszómán végzett patch-clamp mérések sémája. Cang cikkének grafikus összefoglalója* (CANG 2015)

Oh és munkatársai a patch-clamp mérésekkel párhuzamosan kiterjedt krio-EM SPA méréseket végeztek humán lizoszómális TMEM175 (hTMEM15) ioncsatornákon (OH 2020). A krio-EM méréseket 300 kV-os FEI Titan Krios mikroszkópon végezték, amely Gatan K2 direkt elektron detektorral volt felszerelve. A minta KCl-ban volt tisztítva, hogy a lizoszómában lévő káliumban dús viszonyokat mind jobban utánozzák. Az ioncsatorna kétféle konformációját találták, a nyitott és zárt ioncsatornát.

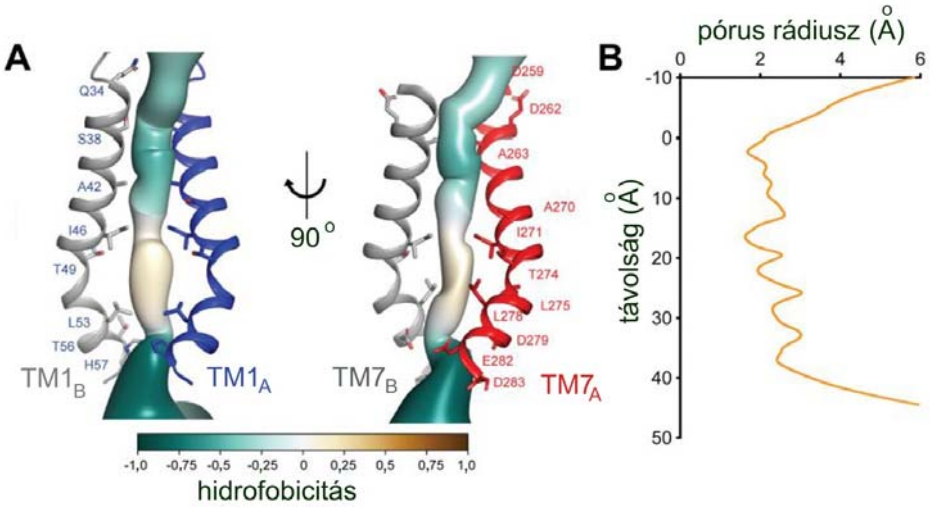


5.10. ábra. *A humán TMEM175 ioncsatorna nyitott állapotban. a/ A krio-EM sűrűségtérkép, b/ A transzmembrán domének (TM) a membrán síkjából nézve, c/ A transzmembrán domének a citoplazma irányából nézve. A TM1 és TM7 domének által gyémánt alakú csatornát vesznek körbe. d/ A ioncsatorna topológiája* (OH 2020)

A terjedelmes vizsgálatok könnyebb követhetősége miatt itt csak a csatorna nyitott konformációjára szorítkozunk, amelyen 2,6 Å-ös felbontást értek el. A 2022-es közleményük már a zárt csatorna analízisére, a nyitott és zárt csatorna összehasonlítására is kiterjed (OH 2022).

A TMEM175 fejlődéstanilag eltér a többi ismert K^+ szelektív ioncsatorna tetramer szerkezetétől, és hiányzik belőle az ismert K^+ csatornákra jellemző Thr, Val, Gly, Tyr, Gly szelektív szűrő (DOYLE 1998). (A lizoszómális TMEM175 homodimer szerkezetű, és mint látni fogjuk a csatorna közepén lévő izoleucin látja el a kapuzáró funkciót).

Az 5.10. d/ ábrán az látható, hogy a 12 transzmembrán (TM) hélix homodimer szerkezetet alkot. A II. hat domén alig tér el az I. hat doméntől. amelyekben az 5. és 6. csak azért nem lett kékkel jelölve, mert nem tudták olyan nagy pontossággal meghatározni, mint a többi tízet.

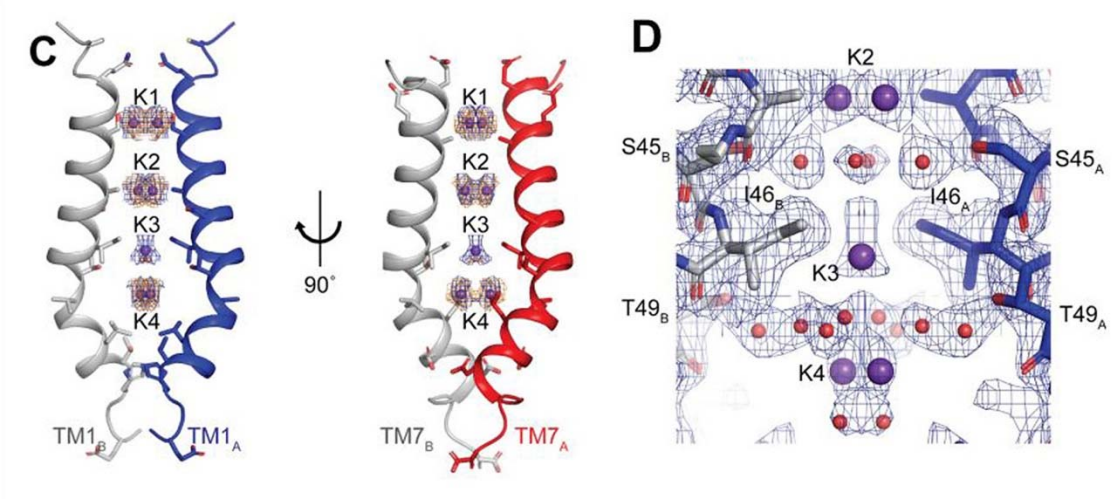


5.11. ábra. *a/ A hidrofób tulajdonság változása a TMEM175 csatorna mentén. b/ A pórusméret változása a csatorna mentén a csatorna nyitott állapotában* (OH 2020)

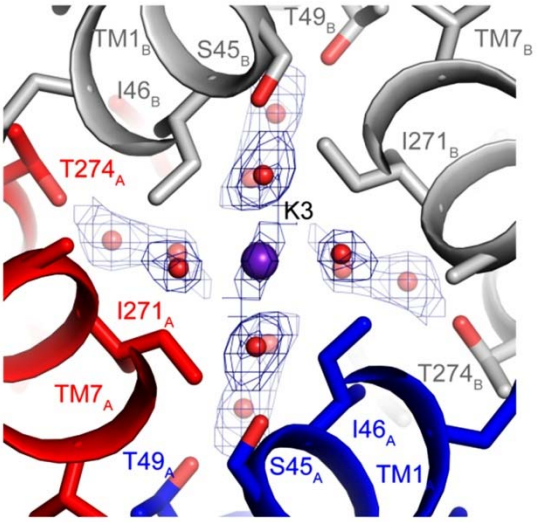
Az ioncsatornák szerepe az, hogy a hidrofób foszfolipid rétegen belül biztosítsanak egy hidrofil csatornát, amelyen keresztül az ionok át tudnak jutni a membránon.

A csatornához legközelebb lévő TM1 és TM7 membrán domének mentén (5.11. ábra) meghatározták a hidrofób tulajdonságok változását a CHAP (Channel Annotation Package) program segítségével (KLESSE 2019). A csatorna közepén helyezkedik el az izoleucin (I46 és I271) amelynek összehúzódása szabályozza az ionáteresztést és ionszelektivitást. Hasonlóképpen a CHAP programmal határozták meg a pórusméret változását a csatorna mentén, nyitott csatornát feltételezve (b/ ábra). Nyitott állapotban is kicsi a pórusátmérő (~2 Å).

Visszatérve a krio-EM SPA-hoz az 5.12 ábrán kálium lilával van jelölve, a víz molekulák pirossal. A szürke háló a 12σ szóráshatárt jelenti a (az elektrosztatikus potenciál) sűrűségeloszlásban. Amikor a sűrűségháló nem volt elég jó a káliumionok és a víz megkülönböztetésére, akkor a kísérletekben nem KCl-lel, hanem CsCl-lel együtt tisztították a membránfehérjét. A káliumnál nagyobb rendszámú cézium nagyobb kontrasztot adott.



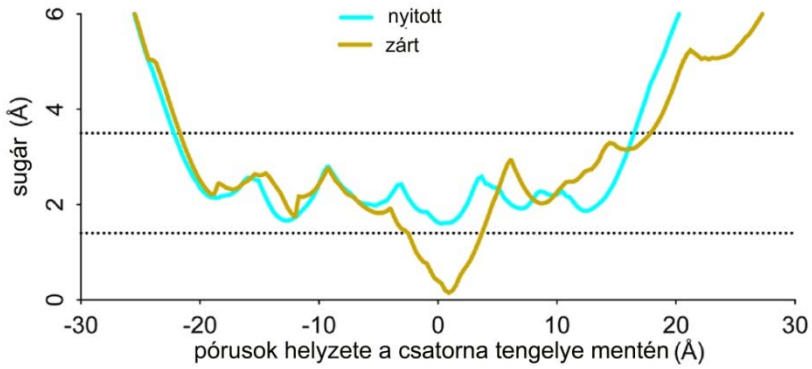
5.12. ábra. *Ionvezetési útvonalak a hTMTEM175 ioncsatornában. K1, K2, K3 és K4 ionkötődési helyeket jelentenek. A D/ ábra a K3 hely körüli részt mutatja kinagyítva. A kálium ionokat lila, a vizet piros körök jelzik. A szürke hálózat a krio-EM sűrűségeloszlásának felel (12σ szórásértékkel) a csatorna felénél, a K3 ionkötő helynél. Az I46 körüli háló az izoleucin szabályozó szerepére utal* (OH 2020)



5.13. ábra. *A K3 ionkötő hely más ábrázolásban. A TM1 és TM7 transzmembrán domén aminosav elemei is jól láthatók* (OH 2020)

Az eddigiek célja volt szemléltetni, hogy a krio-EM SPA milyen részletességgel tudja megmutatni a TMEM175 ioncsatorna szerkezetét. Két évvel későbbi közleményben a szerzők a nyitott csatorna felbontását 2,6 Å-ről 2,45 Å-re, a zárt csatorna felbontást 3,0 Å-ről 2,61 Å-re javították jobb képmegmunkálási technikával (OH 2022). A krio-EM vizsgálatokat molekula dinamikai számításokkal egészítették ki a folyamatok jobb megértése érdekében. Ebből a

közleményből mindössze egy ábrát közlünk, amely a pórusméret eloszlását a csatorna mentén egy ábrán belül mutatja, nyitott és zárt csatornára vonatkozóan.



5.14. ábra. *Pórusméret eloszlás a TMEM175 ioncsatorna mentén a csatorna nyitott (kék) és zárt (sárga) állapotában* (OH 2022)

A krio-EM SPA vizsgálatok mellett szól, hogy a mérései eredményeket az Elektronmikroszkópos Adatbankban (EMDB) illetve a Protein Adatbankba (PDB, Protein Data Bank) le kell adni, a közleményeknek tartalmazni kell ezeknek az adatoknak a PDB vagy EMDB kódszámát, így az adatok bárki számára hozzáférhetők ellenőrzésre és reprodukálásra (EMDB, PDB).

V.3.2. TMEM 87A (GolpHCat) ioncsatorna krio-EM SPA vizsgálata

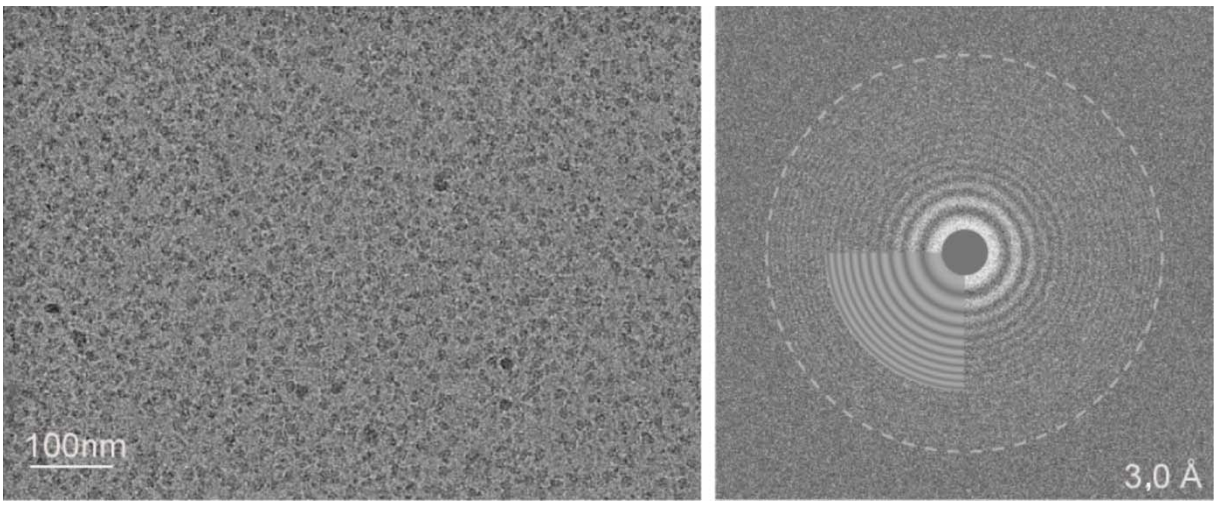
Korábban is ismert volt, hogy a Golgi-apparátus morfológiai megváltozásai (töredezései) kapcsolatban vannak a kognitív károsodással az Alzheimer- és a Parkinson-kórban (FAN 2008, JOSHI 2015, SUNDARAMOORTHY 2015). Az összefüggések megértése és bizonyítása nehézségbe ütközött, mert az ioncsatornák szerkezet nem volt ismert az agysejtek Golgi-apparátusában. A szerzők az itt bemutatandó közleményben azonosítják az asztrocitákban és neuronokban lévő TMEM87A feszültségfüggő kation csatornákat, amelyeket a Golgi-apparátusban betöltött pH szabályozó szerepük és a kationok miatt GolpHCat-nek neveztek el (KANG 2024). Szerkezetvizsgálati előzmény (krio-EM SPA) is volt, de a felbontás (4,7 Å) kívánni valót hagyott maga után (HOEL 2022).

A szerzők célja a TMEM87A minden előzőnél komplexebb vizsgálatával bebizonyítani, hogy a TMEM87A valóban kation ioncsatorna és feltárni az ioncsatorna szerkezetét a biológiai vizsgálatokkal párhuzamos krio-EM SPA vizsgálatokkal. A genetikai, immuncitokémiai, elektrofiziológiai (Golgi-specifikus pH képalkotás, proteoliposzómás egycsatornás patch-clamp mérés), és molekuláris dinamikai modellezés mellett három humán TMEM87-en (izoform 1, glükonáttal blokkolt és A308M-mel blokkolt) végeztek krio-EM vizsgálatokat.

A közleményük mérete a kiegészítéssel (supplement) együtt egy 100 oldalas könyv terjedelmét is meghaladta volna. Mi csak a humán TMEM87A (izoform 1) krio-EM SPA vizsgálatának néhány részletére térünk, amelyek minta-előkészítési vagy munkafolyamat (work-flow) szempontjából érdekesek.

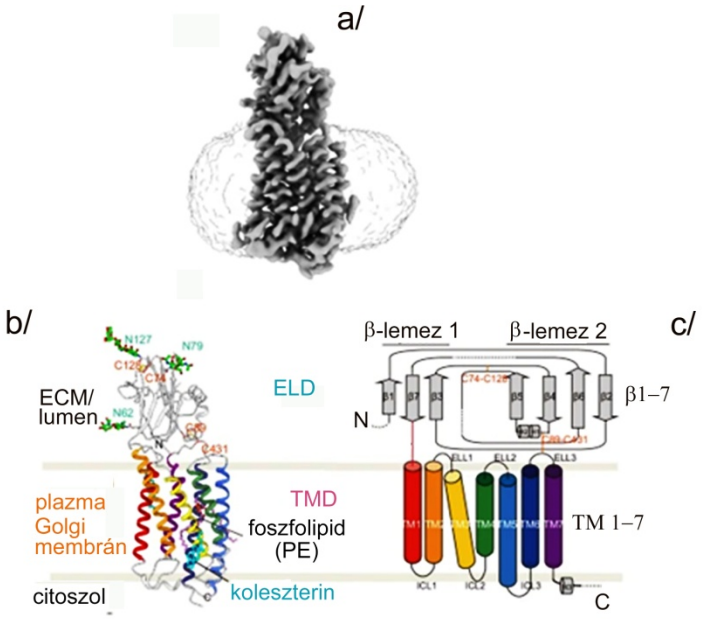
A fehérjét detergenssel (LMNG/CHS) oldották fel, majd PE-vel (foszfatidiletanolamin) együtt tisztították, ismervén, hogy a PE stabilan kötődik a TMEM87A-hoz. Végül is a fehérje nanodiszkbe lett beágyazva. Az említett körülményeknek az a jelentősége, hogy a nanodiszkes stabilizációnál a fehérjét az igényeknek megfelelő körülvevő foszfolipiddel lehet körül venni. (Egy korábbi szerző (HOEL 2022) nem alkalmazott nanodiszkes fehérje stabilizálást. A kétféle módon előkészített mintát az 5.6 ábrán hasonlítottuk össze.) Mérésenként 4 µl fehérjére volt szükség. A felesleges folyadék felitatását a mikrostélyról (blotting) Vitrobot (Thermo Fisher Scientific) automatával végezték.

A vizsgálatokhoz K3 direkt elektron detektorral (Gatan) és GIF (Gatan Image Filter) energiaszűrővel ellátott Titán Krios G4 elektronmikroszkópot használtak 300 kV gyorsító feszültségen. A GIF ebben az esetben azt biztosította, hogy a 20 eV-nál nagyobb energiaveszteséget szenvedett elektronok ne juthassanak a képbe. A Thermo Fisher Scientitic EPU szoftvere irányította az automatikus adatgyűjtést 105000x nagyításon. Egy jellegzetes képet és egy hozzá tartozó teljesítmény spektrumot (power spectrum) mutat az 5.15. ábra:



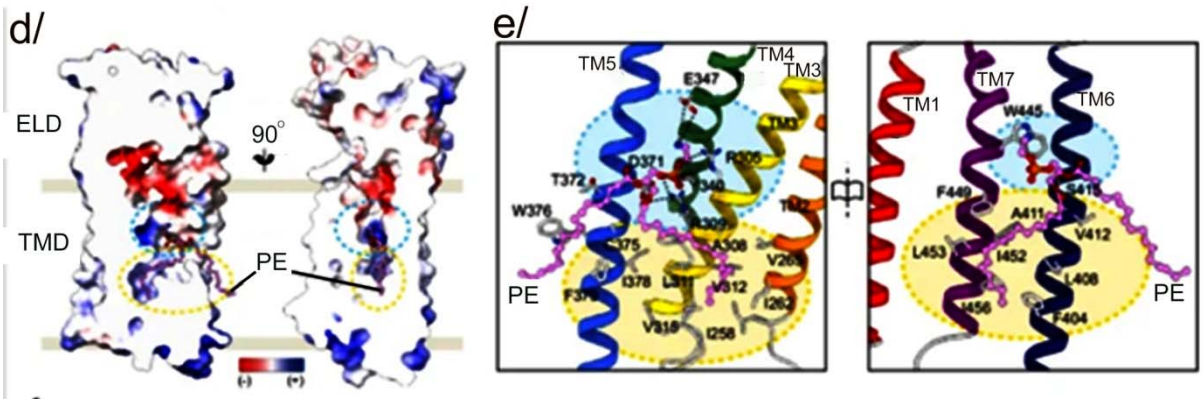
5.15. ábra. *TMEM87A krio-EM képe és a Thon-gyűrűket mutató teljesítmény spektrum* (KANG 2024, SUPPLEMENT)

Az 5.15.a/ ábrán figyelmet érdemel a szemcsék egyenletes eloszlása. Az 5.15.b/ ábra a teljesítmény spektrumot mutatja, ami a baloldalon látható mikroszkópos kép Fourier-transzformáltja. A teljesítmény spektrum a kép minőségnek és felbontásnak legjobb indikátora.



5.16. ábra. *a/ A TMEM87A krio-EM sűrűségtérképe, a beágyazó micellák halványszürkén látszanak. b/ a szerkezet szalagreprezentációban. A c/ ábra a szerkezet topológiája (a rövidítéseket illetően lásd a szöveget)* (KANG 2024)

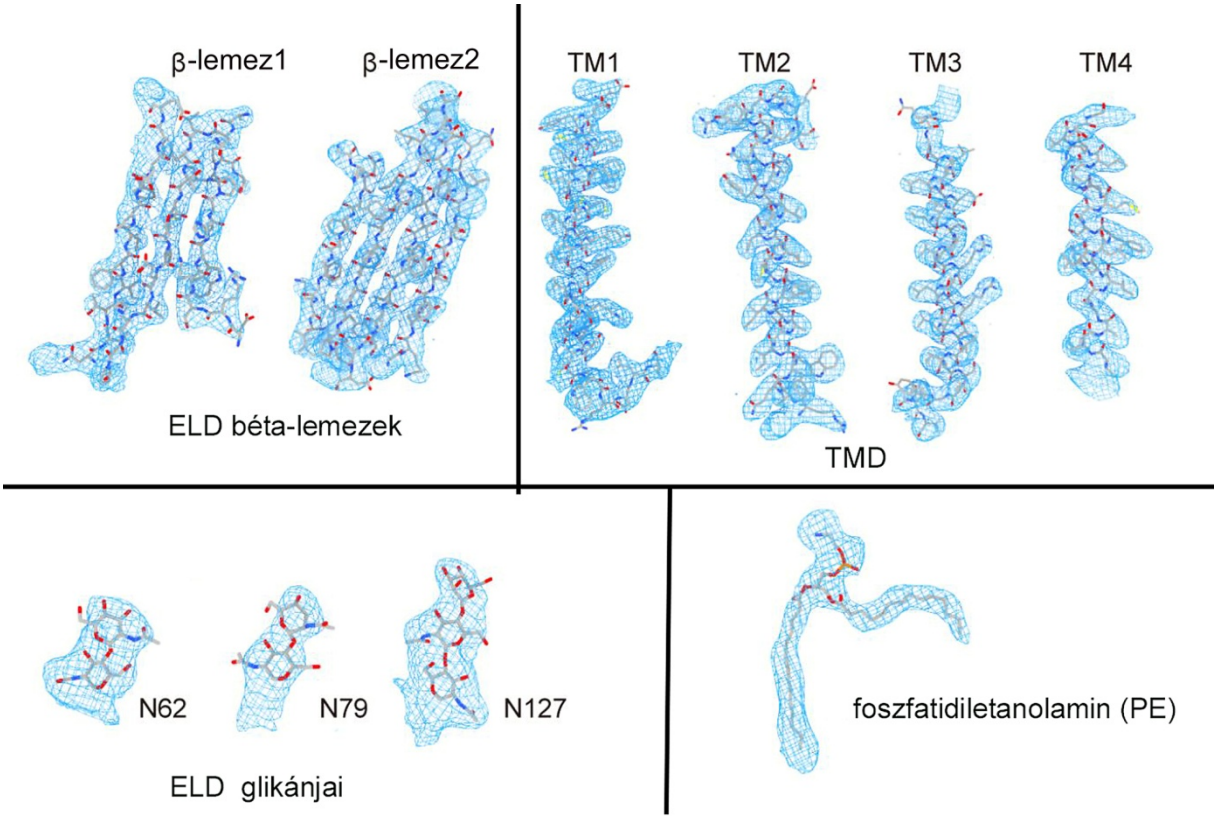
Azt várták, hogy a glicin-tirozin-glicin motívumot tartalmazó TMEM87A ugyanúgy tetramer szerkezetű, mint a többi ilyen motívumot tartalmazó K^+ ioncsatorna. Az 5.16. a/ ábrán látható sűrűségtérkép szerint a TMEM87A a várakozással ellentétben két doménből álló monomer. Az egyik domén az N62, N79 és N127 glikánt tartalmazza, a másik pedig a 7 transzmembrán hélixből (7TM) álló transzmembrán domén (TMD). A glikánokat tartalmazó domént extracellular/luminal doménnek nevezték és azt az ábrán ELD jelzi. A 5.16. b/ ábrán a TMEM87A szerkezet szalagreprezentációja látható. A PE rövidítés az ábrán a foszfatidiletanolamint jelzi, amit a minta-előkészítéshez használtak. Ennek jelenléte biztosítja, hogy a membránból detergenssel eltávolított transzmembrán fehérje renaturálódik és közel natív állapotban van a krio-EM vizsgálatok alatt. A transzmembrán fehérje lumene belenyúlik az extracelluláris térbe, innen az ELD rövidítés. A 5.16. c/ ábra szerint a 7 transzmembrán hélixen kívül két antiparallel elrendezésű β-lemez alkotja még a szerkezetet, amely hét β-fonalat tartalmaz. Három intracelluláris hurok (ICL1-ICL3) és három extracelluláris hurok (ELL1-ELL3) köti össze a 7 transzmembrán hélixet (TM1-TM7).



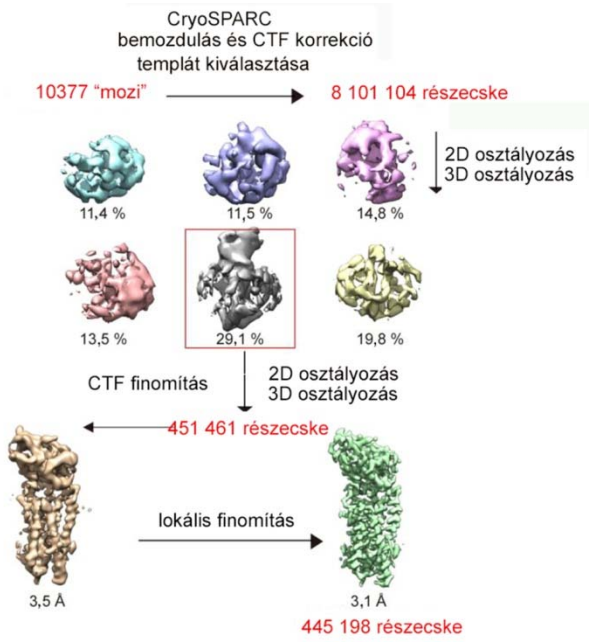
5.17. ábra. *Az előző (5.16.) ábra folytatása. Lásd a szöveget* (KANG 2024)

A 5.17. d/ ábra a transzmembrán domén (TMD) függőleges metszete azon a helyen, ahol a PE-kötőzseb található. A kép a krio-EM-re jellemző elektrosztatikus potenciáleloszlás. A kék, szaggatott vonallal jelölt felső rész a hidrofil, az alsó, sárga szaggatott vonallal behatárolt rész a hidrofób tartomány. e/ A kékkel, illetve sárgával színezett tartomány egy hidrofil, illetve hidrofób üreget jelentenek a TMD-n belül.

A közlemény a TMEM87A minden komponensét megmutatja atom modellel is, mi ezek közül csak néhányat mutatunk meg (5.18. ábra)



5.18. ábra. *A TMEM87A egyes elemeinek atom modelljei* (KANG 2024)

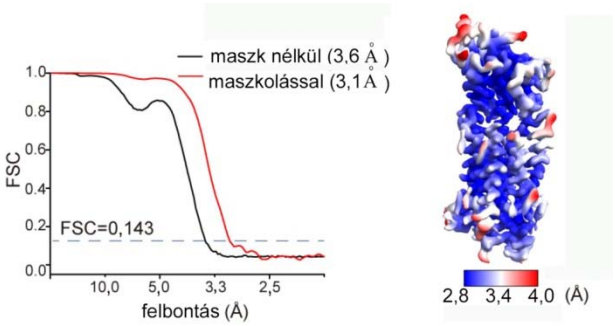


5.19. ábra. *A TMEM87A krio-EM SPA adatfeldolgozási folyamata a cryoSPARC™ programmal* (KANG 2024)

A krio-EM SPA adatfeldolgozási munkafolyamatát az 5.19. ábrán láthatjuk. A Thermo Fisher Scientific az EPU (majd később a smartEPU) programmal végzi az adatgyűjtést, az elmozdulás korrekciót, a CTF korrekciót (CTF Contrast Transfer Function, kontraszt átviteli függvény), a mikroszkóp centrálását és sok minden mást. A cryoSPARC™ (Cryo-EM Single Particle Ab-Initio Reconstruction and Classification) program végzi a 2D és 3D rekonstrukciót és az ezekkel járó finomítási eljárásokat, mindent, ami az 5.19. ábrán látható. A CryoSPARC™ és CryoSPARC Live™ védjegyzett tulajdonosa a Structura Biotechnology Inc. Az említett programok ingyenesek a nonprofit akadémiai intézetek számára (ABOUT CRYOSPARC).

10377 „mozifilmet" vettek fel a direkt elektron detektorral, amely 8 101 104 részecskét tartalmazott. A 2D és 3D osztályozás után 6 osztály keletkezett, amelyből a leggyakrabban (29,1%) előforduló komponenssel folytatták tovább a számolásokat. Újabb 2D és 3D osztályozás, majd CTF korrekció után 451 456 részecske maradt. A CTF korrekciót többször is végrehajtják, a legelején, az összes szemcsén egyszerre, a legvégén szemcsénként egyenként. A helyi finomítás alkalmazásával kapták meg a 3,1 Å-ös felbontást.

Mint korábban jeleztük, a felbontás a molekula különböző részein eltérő lehet: a molekula központi vázán belül a felbontás jobb, a peremen lévő flexibilis részeken rosszabb. Az 5.20. ábrán jelölve van, hogy maszkolás nélkül rosszabb a felbontás, viszont bizonyos zavaró részletek (pl. a minta-előkészítéshez használt nanodiszk) kitakarásával, maszkolásával a felbontás javul.

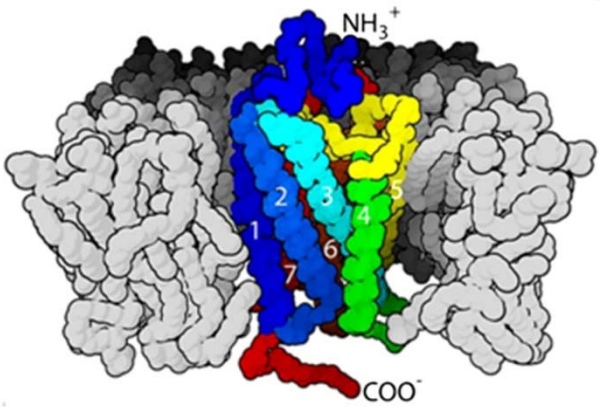


5.20. ábra. *A krio-EM felbontása a TMEM87A ioncsatornán. A felbontás az ioncsatorna külső flexibilis részein rosszabb* (KANG 2024)

Összefoglalva: Kang és munkatársai megállapították, hogy a Golgiban lévő TMEM87A monomer szerkezetű, feszültség- és pH-függő K^+ ioncsatorna, amely hozzájárul a Golgi pH egyensúlyának fenntartásához. Ehhez széleskörű vizsgálatokat végeztek, amelyek egy része a krio-EM SPA volt, és amely a csatorna szerkezet feltárásával hozzájárul a többi módszerrel nyert eredmények értelmezéséhez.

V.4. G-protein-kapcsolt receptorok krio-EM vizsgálata

A G-protein-kapcsolt receptorok (G protein-coupled receptors, GPCR) hét transzmembrán hélixet tartalmazó doménnel (7TM) rendelkeznek. A hélixek a sejtmembránon teljesen keresztül érnek és a sejt belsejét kapcsolják össze a sejten kívüli világgal. Ezek a receptorok a sejten kívülről érkező hatásokra reagálva, változásokat indukálnak a sejt belsejében.

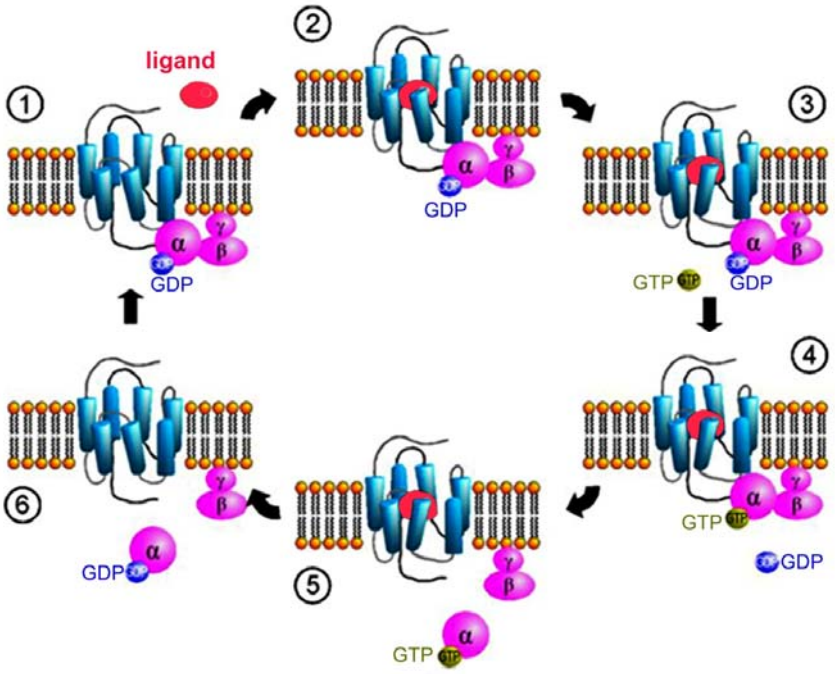


5.21. ábra. *A GPCR receptorok 7 transzmembrán hélixből álló doménje* (WIKIPEDIA, G-protein-coupled receptor)

Több mint 800 GPCR-t azonosítottak a human genomban, így a legnagyobb fehérje szupercsaládot alkotják. A GPCR-ek több mint 90%-a központi idegrendszerbe expresszálódik:

számos funkcióban vesznek részt, mint például az ízlelés, szaglás, látás stb. Az FDA (US Food and Drug Administration) által jóváhagyott gyógyszerek közel 34 %-a GPCR-eket célozzák meg (CASADÓ 2023). Gyógyszertervezés szempontjából az aktivációs mechanizmusaiknak és szerkezetük megismerése rendkívül fontos.

A GPCR-ek aktiválódási folyamatát sematikusan az 5.22. ábra mutatja:



5.22. ábra. *A GPCR aktiválódásának ciklusa* (WIKIPEDIA G protein)

GTP- guanozin-trifoszfát, GDP- guanozin-difoszfát, GRK – G-protein-kapcsolt kinázok, Gα, Gβ, Gγ - a G-protein (guanin nuklotid-kötő protein) alegységei. A β és γ alegységek stabil βγ komplexet képezhetnek

Az 5.22. ábra szerint az inaktív állapotban lévő GPCR egy heterotrimer G protein komplexhez kapcsolódik. A jelátvitelt létrehozó külső ligand konformációs változást hoz létre a receptorban és ennek hatására a G_α aktiválódik és a GDP helyére GTP kerül. Ez kiváltja a Gα alegység leválását a Gβγ alegységről és a receptorról. A szabaddá vált GPCR ezek után képes új komplexet képezni egy másik heterodimer G proteinnel és készen áll egy újabb jelátvitelre.

A GPCR-k szerkezetének vizsgálata 2000-ben kezdődött röntgenkrisztallográfiával, majd 2017-től a krio-EM SPA vált a GPCR-ek gyakoribb vizsgálati eszközévé. (krio-EM SPA, cryo-electron microscopy single particle analysis, egyedi részecskék krio-elektronmikroszkópos analízise). A váltás oka a sejtmembránban lévő foszfolipideknek (a röntgenkrisztallográfiához szükséges) kristályosítással szembeni ellenállásában keresendő.

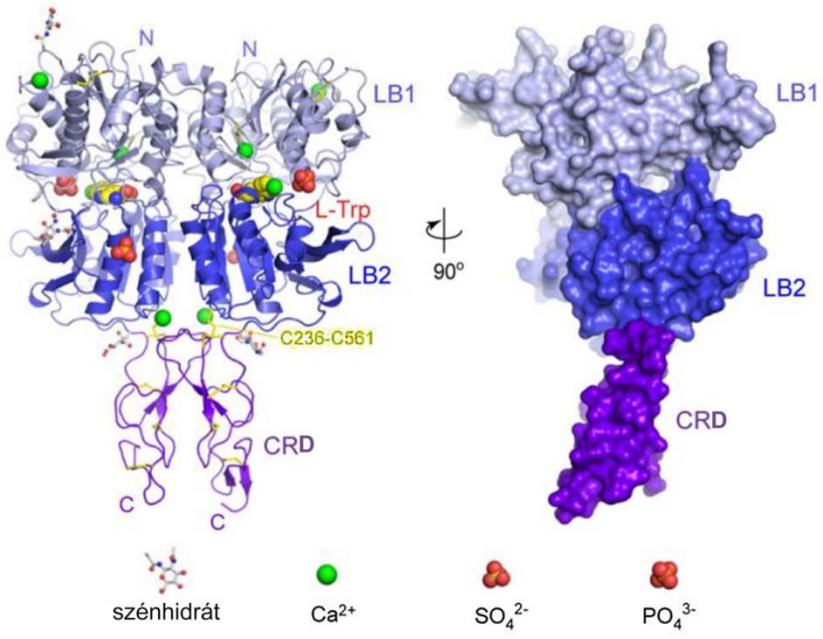
V.4.1. Kalciumérzékelő receptorok krio-EM vizsgálata

A GPCR-ek mint fentebb jeleztük sok formában vannak jelen az emberi szervezetben, ezért közülük egyet választottunk ki, – a kalciumérzékelő receptorokat – annak bemutatására, hogy a krio-elektronmikroszkópia milyen szerepet játszik a GPCR-ek szerkezetének felderítésében.

A kalciumérzékelő receptorok, a továbbiakban CaSR, (Calcium Sensing Receptors) a GCPR-ek C családjába tartoznak, miként a $GABA_B$ (gamma-amino-vajsav B, gamma-aminobutyric acid B) és az mGluR (metabotrop glutamát receptor, metabotropic glutamate receptors) is.

A CaSR olyan homodimer, amelynek két protomerből álló extracelluláris doménje (ECD) van és egy hét hélixből álló transzmembrán (7TM) doménje, amely aktiválja a heterotrimer G-proteint (lásd az 5.22. ábrát).

A kalciumérzékelő receptorok feladata a Ca^{2+} ionok homeosztázisának fenntartása a vérben, paratiroid hormon kiválasztásának szabályozásával és a vesében történő kalcium reabszorpció befolyásolásával. A CaSR rendellenes működése betegségekhez vezethet, hipokalcémiához és a hiperkalcémiához. A hipokalcémia legismertebb formája az oszteoporózis. A CaSR többek között az anyatej kalcium tartalmának szabályozásában is szerepet játszik.



5.23. ábra. *Aktív állapotú humán CaSR homodimer extracelluláris részének szerkezete 10 mM Ca^{2+} és 10 mM L-triptofán jelenlétében, röntgenkrisztallográfiai vizsgálatok alapján. LB lebeny (lobe), CRD ciszteinben gazdag domén (cystein rich domain) A citromsárga vonal (C236-C561) a lebeny és a CRD közötti diszulfid kapcsolatot jelzi* (GENG 2016)

Miként kezdetben a GPCR-ek szerkezetének feltárásában a röntgenkrisztallográfia játszott fontos szerepet, úgy a CaSR vonatkozásában is elmondhatjuk, hogy a röntgenkrisztallográfia segítségével tették meg az első lépéseket. 2016-ban jelent meg két közlemény (GENG 2016, ZHANG 2016), amely a CaSR-nek az extracelluláris térbe eső doménjének (ECD) szerkezetét tárta fel (a membránba eső 7TM szerkezetet nem).

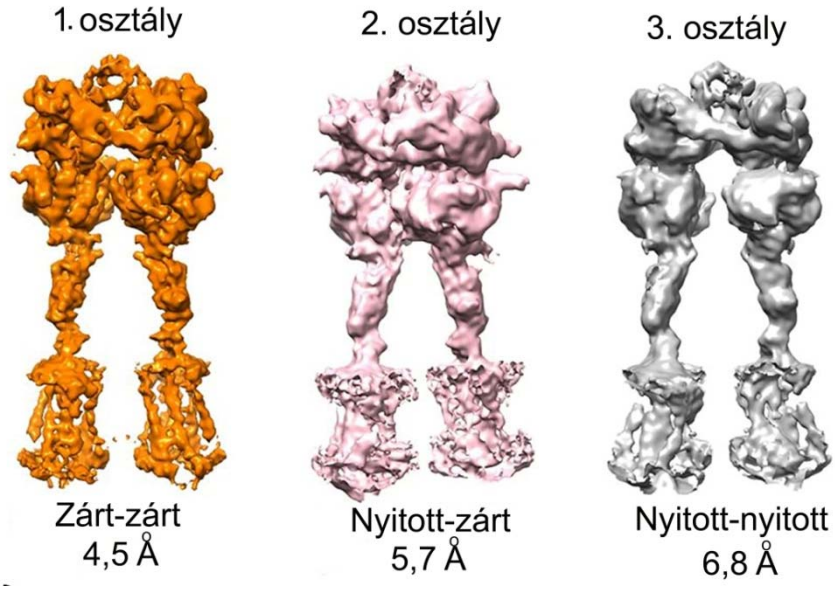
Általános felfogás szerint az extracelluláris Ca^{2+} ionok a CaSR fő agonistái. Mint alább látni fogjuk, ez a kép nem teljesen igaz. A röntgenkrisztallográfiában felhasznált, inaktív állapotú CaSR tartalmazott Ca vagy Mg ionokat is, mert $CaCl_2$ vagy $MgCl_2$ oldat volt szükséges a kristályosításhoz (ZHANG 2016).

2021-ben jelent meg négy közlemény, amely már a teljes vagy közel teljes hosszúságú CaSR-t, beleértve a membránban lévő 7TM domént, vizsgálta krio-elektronmikroszkóppal, az aktivátorok, a pozitív és negatív modulátorok elhelyezkedését és hatását is (LING 2021, WEN 2021, GAO 2021).

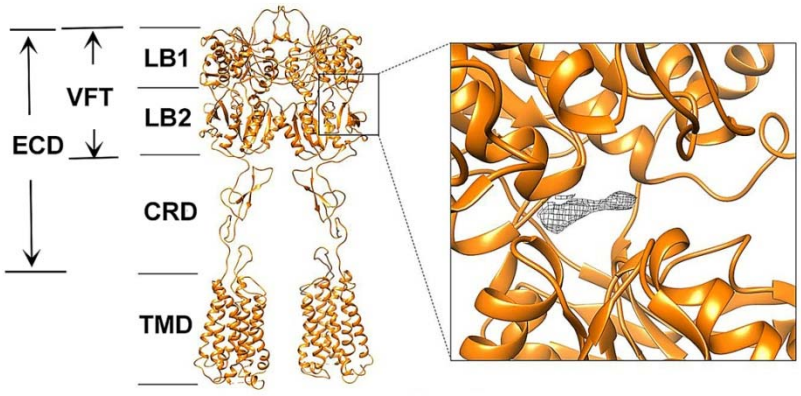
V.4.1.1. Ca^{2+} és L-triptofán együttes szerepe a humán kalciumérzékelő receptor aktiválásában (LING 2021)

Ling krio-EM vizsgálatai az inaktív CaSR-en annyiban tértek el a röntgenkrisztallográfiai vizsgálatoktól (GENG 2016, ZHANG 2016), hogy a krio-EM vizsgálatok előtt a Ca ionokat EDTA-val el tudták távolítani a mintából.

A krio-EM szerkezetvizsgálatokkal párhuzamosan funkcionális vizsgálatokat is végeztek, mint például az intracelluláris IP1 mérését, (inozit monofoszfát, inositol phosphate1) az agonista aktivációjának megfigyelésére. Az inaktív CaSR egyidejűleg három konformációban fordult elő Ling krio-EM kísérleteiben. (5.24. ábra)

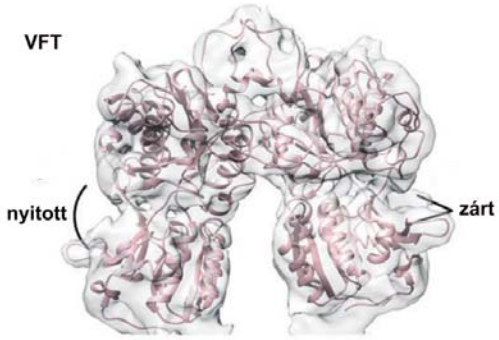


5.24. ábra. *Inaktív humán kalciumérzékelő receptorok krio-EM sűrűség képei (a VFT zártságának megfelelő három különböző konformáció)* (LING 2021)



5.25. ábra. *Az előző ábrán látható inaktív, zárt-zárt konformációjú CaSR krio-EM képe szalagmodell ábrázolásban. Jelölések: ECD - extracelluláris domén, VFT - Venus flytrap domén, LB –lebeny (lobe), CRD ciszteinben gazdag domén (cystein rich domain), TMD - transzmembrán domén*

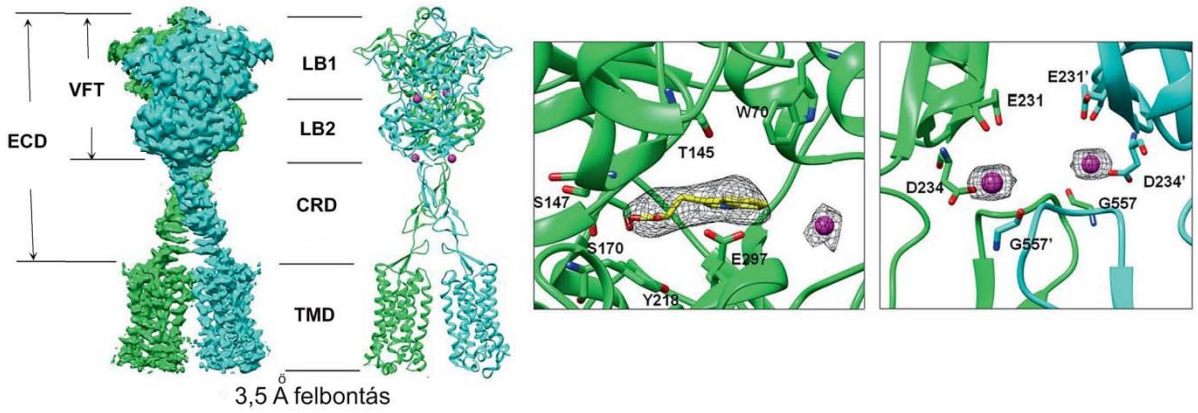
A nyitott és zárt VFT magyarázatához lásd az 5.26. ábrát.



5.26. ábra. *A nyitott és zárt VFT magyarázatához* (LING 2021)

Az inaktív CaSR három konformációjára vonatkozó adatok az Elektronmikroszkópos Adatbázisban EMDB-30856, EMDB-30857 és EMDB 30858, a Protein Adatbázisban PDB 7DTW számokon található meg. Fontos az EMDB és a PDB szerepét hangsúlyozni, mert az ezekben található adatok alapján bárki ellenőrizheti a vizsgálatok helyességét.

Az aktív állapotú, Ca^{2+} és L-triptofánt tartalmazó mintában csak egy konformáció (zárt-zárt VFT) fordult elő a krio-EM felvételek alapján (5.27. ábra).

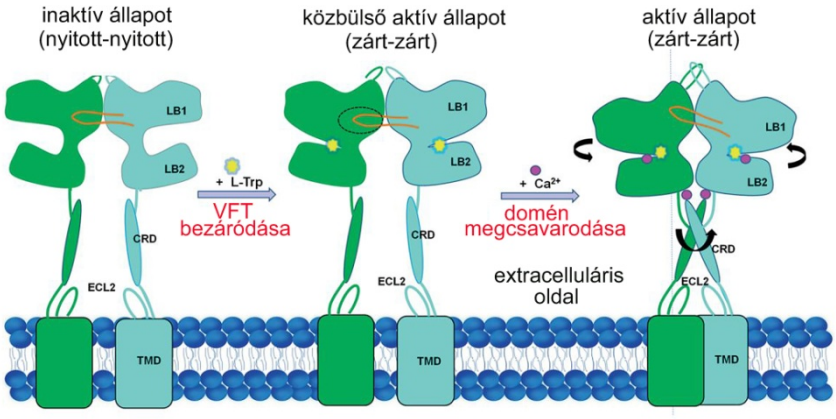


5.27. ábra. *A Ca^{2+}-t és L-triptofánt tartalmazó aktív állapotú CaSR krio-EM sűrűségtérképe baloldalon és tőle jobbra a szalagreprezentációs modell. A homodimer CaSR két alegységét kék, illetve cián szín mutatja. A Ca^{2+} ionokat magenta színű körök, az L-triptofánt sárga pálcikák jelzik a jobb oldali ábrán. A VFT zárt-zárt állapotú* (LING 2021)

Az aktív állapotú CaSR krio-EM vizsgálatának részletes adatai az Elektronmikroszkópos Adatbázisban EMDB-30855, a Protein Adatbázisban PDB 7DTV számon találhatók meg.
A szerzők méréseket végeztek L-triptofánhoz kötött (Ca^{2+} nélkül) és L-triptofán nélküli nagy Ca^{2+} koncentrációjú (20 mM) mintákon az aktivációs mechanizmus kiderítésére. Arra a megállapításra jutottak, hogy az L-triptofán egyedül nem képes aktiválni a CaSR-t csak a VFT domént zárja be és egy közbülső aktív állapothoz vezet, amely a Ca^{2+} ionok hatására válik

teljessé (5.28. ábra). Ez megerősíti Geng 2016-os eredményeit, amely szerint az L-triptofán a primer agonista és szerepet játszik a Venus flytrap bezárásában, a Ca^{2+} ionok pedig stabilizálják az aktív állapotot.

A L-triptofán nélküli nagy koncentrációjú Ca^{2+} esetén a VFT olyan három konformációban (zárt-zárt, nyitott-zárt és nyitott-nyitott) fordult elő, mint azt az inaktív CaSR kapcsán bemutattuk az 5.24. ábrán.



5.28. ábra. *Modell a CaSR-nek aktivációjára, amely a L-triptofán és Ca^{2+} együttes hatására következik be. Az L-triptofán a VFT bezáródását idézi elő, ami egy közbülső részleges aktivációnak tekinthető. A Ca^{2+} hatására teljessé válik az aktiváció, a CaSR alegységei közelebb kerülnek egymáshoz. A TMD-k rotációja következik be és a két TMD között a TM6 hélix közvetítésével egy közös határfelület jön létre, amely elősegíti a jelátvitelt* (LING 2021)

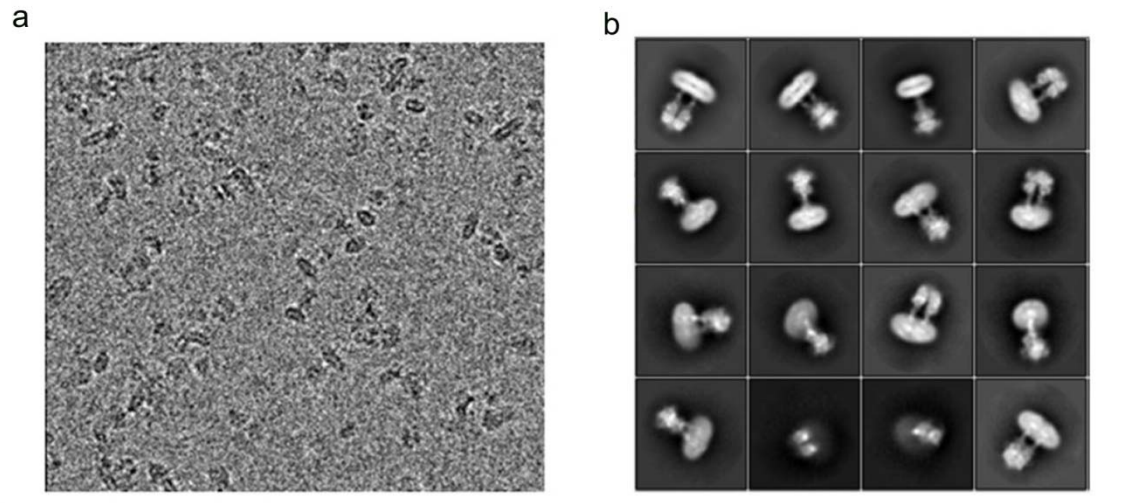
A fent bemutatott krio-EM vizsgálatok olyan bepillantást engednek a CaSR szerkezetébe, amelyek segíthetik a gyógyszertervezést.

A krio-EM vizsgálatok előtt a CaSR mintákat gél-filtrációs kromatográfiával és SDS-PAGE-el tisztították. A krio-EM vizsgálatokban egy-egy mintához 3 µl tisztított CaSR oldatot használtak plazmakezelt, lyukacsos szénnel fedett arany mikrostélyon. A mintát Vitrobot Mark IV (Thermo Fischer Scientific) segítségével fagyasztották. Titán Krios elektronmikroszkóppal készültek a felvételek 300 kV gyorsító feszültségen 29000-szeres nagyításban. Detektorként Gatan K2 és K3 direkt elektron detektorokat használtak elektronszámláló üzemmódban. Az adatgyűjtés és adatfeldolgozás néhány adatát a következő táblázatban mutatjuk aktív CaSR mintára vonatkozóan. Az 5.1. táblázatban látható paramétereknél többet találhatunk meg valamennyi vizsgált aktív és inaktív mintára Ling közleményének Supplementjében.

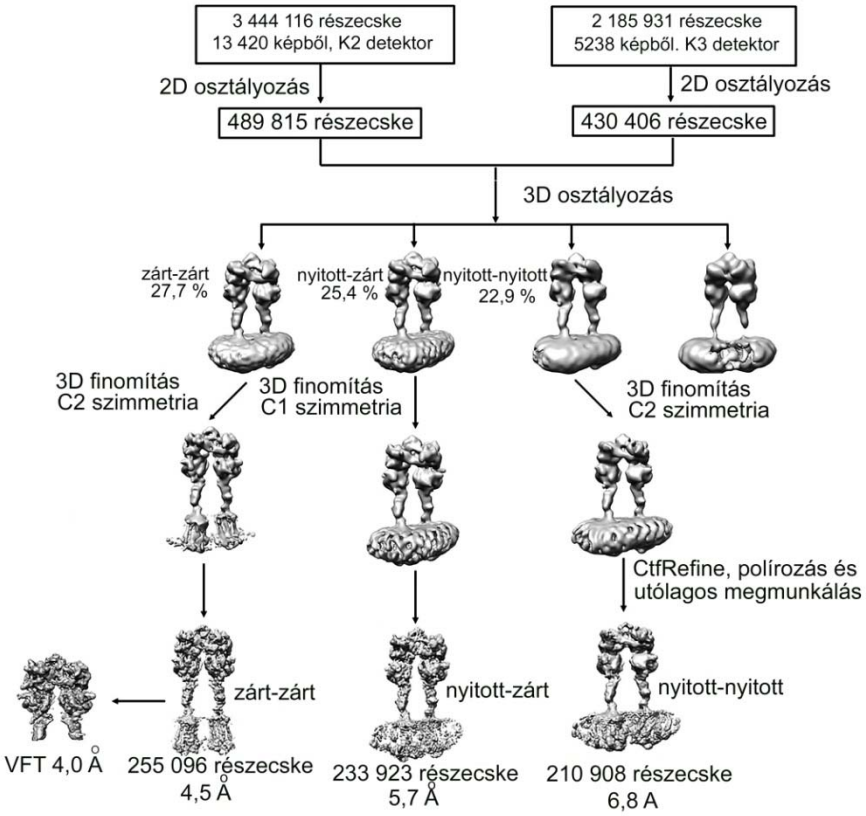
5.1. táblázat. *Krio-EM SPA adatgyűjtés és feldolgozás aktív CaSR mintára* (EMDB-30855)

Nagyítás	29 000x
Gyorsító feszültség (kV)	300
Elektron expozíció ($e^-/Å^2$)	62
Defókuszálási tartomány (µm)	-1,3-tól -2,5-ig
Detektor pixel méret (Å)	1,014
Feltételezett szimmetria	C2
Kezdeti részecske szám	1 382 094
Végső részecske szám	229 926
Felbontás (Å)	3,5
FSC küszöb érték	0.143

Két reprezentatív felvétel mutatja az aktív CaSR képét névleges 29000x-es nagyításban és a képek 2D osztályozását. (5.29. ábra). Mint a vizsgálatok folyamatábrájából látszik, ezek a 2D képek három konformáció azonosítását tették lehetővé.



5.29. ábra. *a/ Inaktív CaSR képe 29000x nagyításban felvéve. b/ A képek 2D osztályozása* (LING SUPPLEMENT 2021)



5.30. ábra. *Inaktív humán CaSR krio-EM SPA folyamat ábrája. A nyitott és zárt jelző a VFT (Venus Flytrap) domén két oldalára vonatkozik* (LING SUPPLEMENT 2021)

A detektorból kijövő „moziképeket” bemozdulászkorrekciónak vetik alá, ami a sugárnyaláb okozta képelmozdulás miatt alapvetően szükséges. Ehhez az UCSF MotionCorr2 programot használták (ZHENG 2017). Ezt követi a kontrasztátviteli függvény (CTF – contrast transfer function) korrekciója a Gctf programmal (ZHANG 2016). A CTF annak a korrigálására szolgál, hogy egy mikroszkóp sohasem képez le tökéletesen. Az automatikus részecske analízishez kb. 3000 képet szelektálnak manuálisan, amelyek segítségével referencia képeket (template) generálnak a RELION programban, majd ezeket felhasználva végzik az automatikus 2D osztályozást. Mint a folyamat ábrából látható a K2 detektorral felvett képekből több, mint 3 millió, a K3 detektor képeiből több mint 2 millió került bele az automatikus osztályozásba.

Az 5.30. ábra megértéséhez szükséges egyedi részecskék analízisét (SPA) a „Krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus” című könyv (POZSGAI 2023) IV.2. fejezetében ismertettük, így azt itt nem ismételjük meg, kivéve a CaSR kiértékeléséhez használt RELION programra vonatkozó, a kezdő felhasználókat bátorító részletet:

A RELION „objektív, jó minőségű adatokat eredményez a felhasználó szakértelme nélkül is” – idézet a RELION honlapjáról (https://www3.mrc-lmb.cam.ac.uk/relion/index.php/Main_Page).

Erről a honlapról nemcsak magán felhasználók, de kereskedelmi cégek is ingyen tölthetik le és módosíthatják is a programot. Mindössze egy hivatkozást várnak el a felhasználóktól az eredmények publikálásakor. Jelenleg a 3. verziónál tart a program fejlesztése (ZIVANOV 2018): újabb, pontosabb algoritmusok és gyorsabb processzorok alkalmazásával 4 óránál rövidebb ideig tart egy adatfeldolgozás. A Relion3-ban a Bayes-elméletet a részecskék elmozdulásának korrigálására is használják, és ezt nevezik a részecskék polírozásának (ZIVANOV 2019). A pontosságon kívül az adatfeldolgozás sebessége, a költségigényesség is szerepel a fejlesztési szempontok között. Már nem csak szakemberek tudják használni a programot és ez sokakat vonz a krio-EM területére. A programot folyamatosan fejlesztik.

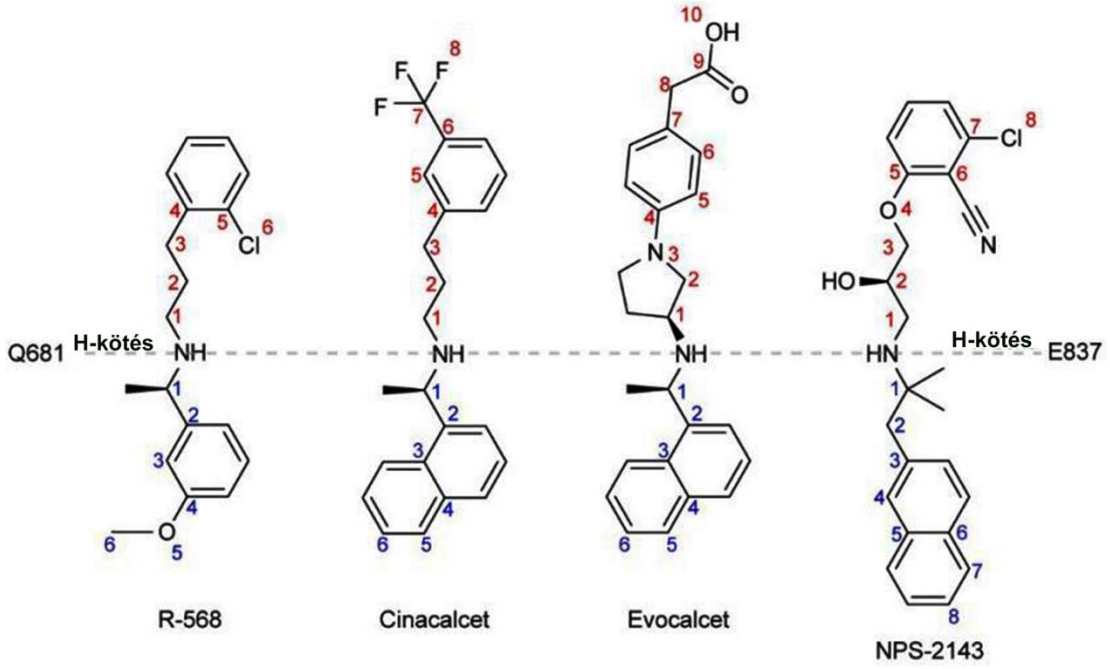
A két legnépszerűbb SPA kiértékelő program (RELION és CryoSPARC) a 2D képekből a 3D rekonstrukcióhoz vagy egy (ismert) kezdeti modellt vesz, vagy az úgy nevezett *ab initio* illetve *de novo* módszert használ, amely a fehérjék harmadlagos szerkezetének meghatározását a primér szerkezetből kiindulva a számolja. (Az 5.30. ábrán mutatott esetben a RELION egy kezdeti modellt használt, amelynek PDB kódja az extracelluláris domén esetében 5k5s és a transzmembrán doménre 6n51.)

A felbontást a „gold standard” FSC=0,143-értéknél (FSC- Fourier Shell Correlation) határozták meg.

V.4.1.2. Humán kalciumérzékelő homodimer receptor aszimmetrikus aktiválásának krio-EM vizsgálata (GAO 2021)

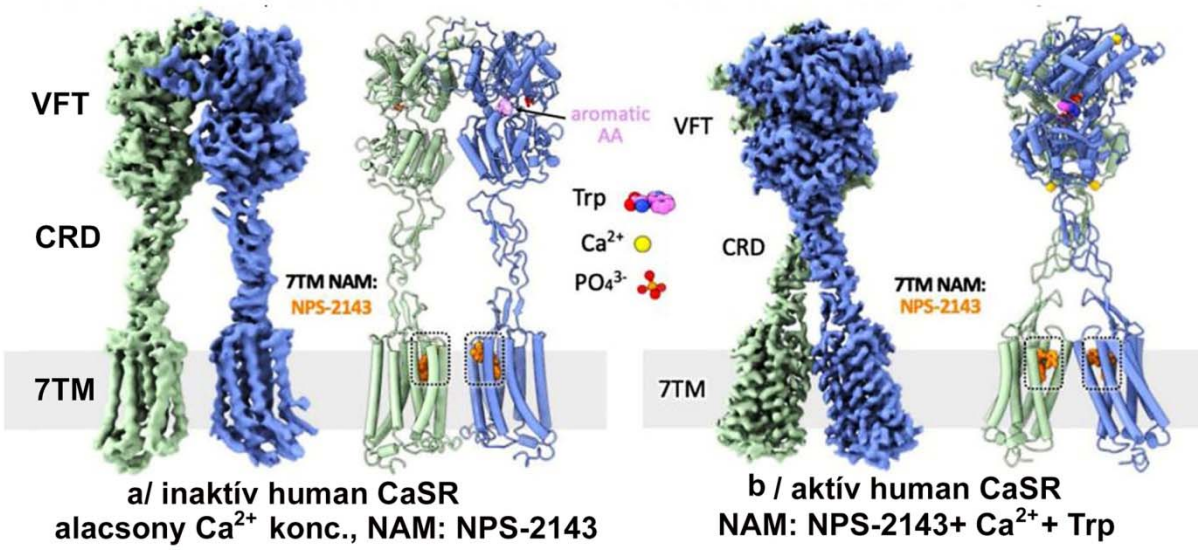
Gao és munkatársai krio-EM SPA-val a csaknem teljes hosszúságú humán CaSR-t vizsgáltak inaktív vagy az aktív állapotban, ez utóbbi esetben Ca^{2+} ionokhoz vagy kalciumot utánzó (calcimimetic) vagy kalciumot bontó (calcilytic) gyógyszer molekulákhoz kapcsolódva (GAO 2021). Azt találták, hogy aktiváció után a homodimerben a 7TM domén olyan aszimmetrikus konfigurációt vesz fel, amely segíti az egyik protomer könnyebb kapcsolódását az intracelluláris G-proteinhez.

A CaSR kapcsán gyógyszer molekulák két olyan csoportját vizsgálták, amelyek vagy pozitív, vagy negatív alloszterikus modulátorok voltak (PAM illetve NAM). A modulátorok csökkentik a kalcium-homeosztázisban lévő rendellenességeket. A PAM növeli az agonisták kapcsolódásának a valószínűségét vagy a receptor aktiválódásának a képességét. A NAM a PAM-mal ellentétes hatású. A PAM csoportból a már klinikailag használt cinacalcet, evocalcet és etelcalcetide hatóanyagokat alkalmazták. A NAM csoportból egyetlen még fejlesztési fázisban lévő hatóanyagot az NPS-2143-t vizsgálták.

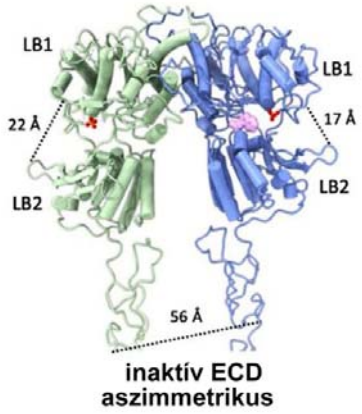


5.31. ábra. *Három pozitív alloszterikus modulátor (PAM) és egy negatív alloszterikus modulátor (NAM NPS-2143)* (PARK SUPPLEMENT 2021)

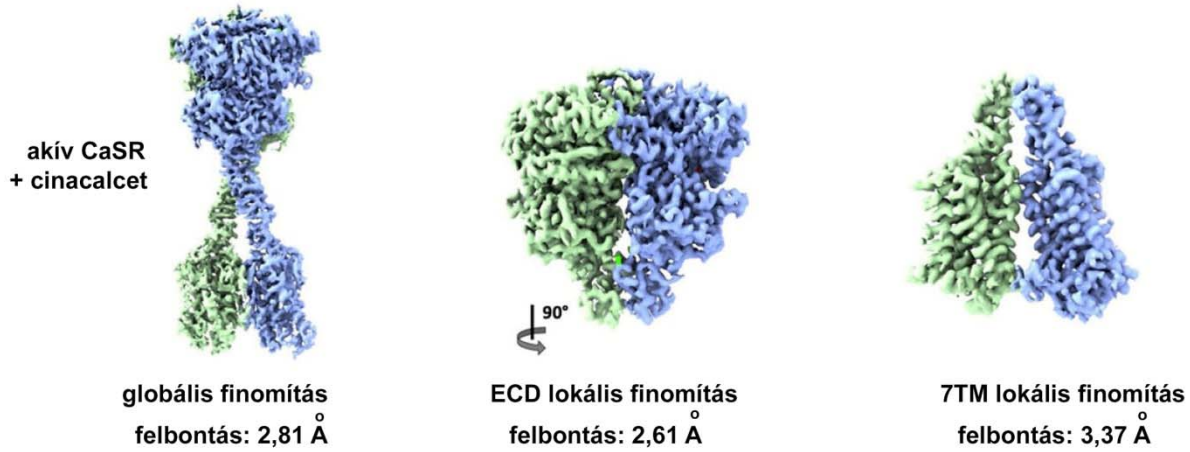
Megállapításaik szerint az aktiváció után aszimmetrikussá vált 7TM konformációt a PAM-ok stabilizálták, míg a NAM az inaktív állapotú szimmetrikus 7TM konfigurációt stabilizálja. Az aktiválás mértékét az IP1 (inotizol monofoszfát) mérésével követik.



5.32. ábra. *NAM-hoz kötött humán CaSR inaktív (a/) és aktív (b/) állapotban. Balra krio-EM sűrűség térképek, jobbra modellek. Az inaktív állapotban alacsony a Ca^{2+} koncentráció, az aktív állapotban magas a Ca^{2+} koncentráció és triptofán is jelen van* (GAO 2021)

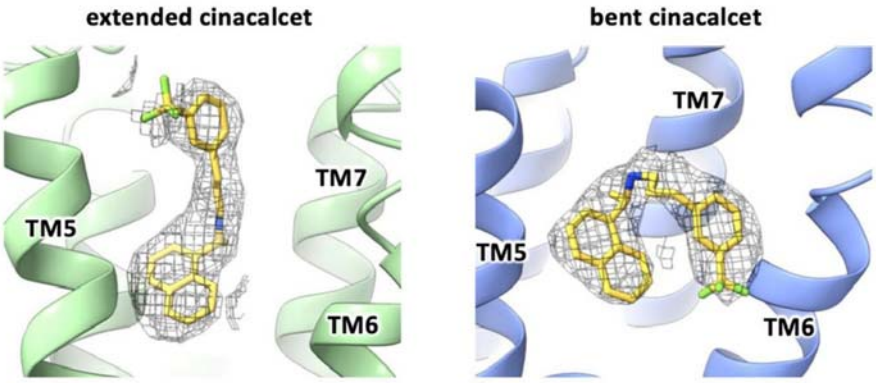


5.33. ábra. *Az 5.32. a/ ábrán mutatott inaktív CaSR (alacsony Ca^{2+} koncentráció +NAM: NPS-2143) aszimmetrikus (nyitott-zárt) ECD-je* (GAO 2021)



5.34. ábra. *A cinacalcet-hez kötött aktív CaSR krio-EM sűrűség térképei. A 7TM protomerjei lényegesen közelebb kerülnek egymáshoz, mint inaktív esetben (az 5.32. ábrán)*

A cinacalcet hatóanyag a 7TM-ben kiterjedt (extended) and hajlott (bent) állapotot vehet fel:



5.35. ábra. *Cinacalcet lehetséges elhelyezkedései a CaSR 7TM-jében (TM5, TM6 és TM7 az 5, 6, illetve 7 számú transzmembrán hélix)*

Gao és társainak krio-EM vizsgálatai feltárják a CaSR alloszterikus modulátorainak szerepét mind a 7TM, mind pedig az extracelluláris domént illetően.

A krio-EM SPA méréseket a korábban ismertetett Ling (2021) mérésekhez hasonló körülmények között végezték. Szintén Titán Krios elektronmikroszkópot alkalmaztak 300 kV-os gyorsító feszültségen és Gatan K3 direkt elektron detektort. A felhasznált adatfeldolgozó szoftver cryoSPARC 3.0 volt és ennek megfelelően nem kezdeti modellt, hanem *ab initio* eljárást alkalmaztak a 3D képek létrehozásához.

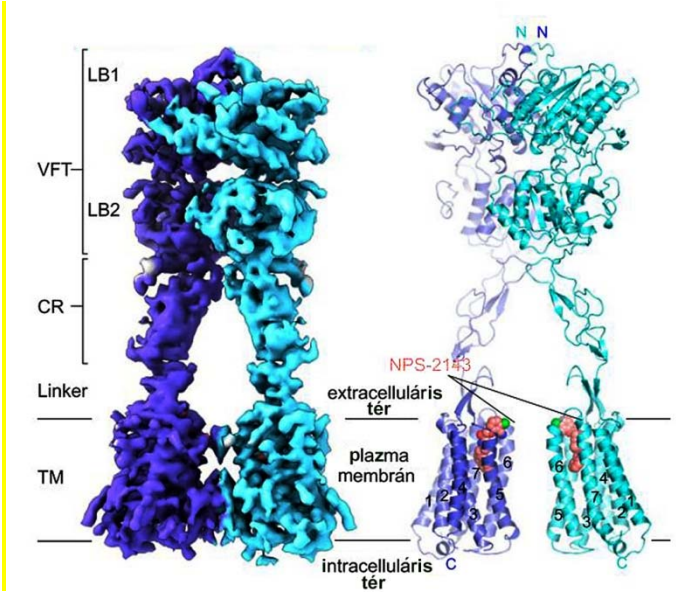
A cinacalcetet tartalmazó aktív CaSR példáját véve, 7863 „mozifilmből” indult ki, amelyek az elmozdulás-korrekció és CTF-korrekció után 2718437 részecskét tartalmaztak 2D osztályozásra. A 2D osztályozás után 834716 részecske maradt. Végül 253836 részecske 3D rekonstrukciója alapján jutottak el a 2,5 Å felbontáshoz.

V.4.1.3. A humán kalciumérzékelő receptor szimmetrikus aktiválása és modulálása (PARK 2021)

Az előző fejezetben idézett Gao és munkatársaink eredményével ellentétes véleményt fogalmaznak meg Park és munkatársai, az állítva, hogy a humán kalciumérzékelő receptor aktiválása és modulálása szimmetrikus (PARK 2021**).**

Bár mindkét közlemény 2021-ben jelent meg, a később megjelent cikk szerzője Park reagálni tudott Gao állítására. Park PAM-hoz kötött és PAM-mentes aktív CaSR-t és NAM-hoz kötött inaktív CaSR-t vizsgált. A PAM-hoz kötött mintáiban ciacalcet helyett R-568 volt (lásd 5.30. ábrát), L triptofán helyett triptofán analóg TNCA (cyclomethyltryptophan), de inaktív CaSR-hez NPS-2143 NAM, ami megegyezett Gao mintájával.

Az egyszerűség kedvéért mi itt csak az inaktív, NAM-hoz kötött CaSR esetében hasonlítjuk össze Gao és Park vizsgálatait.



5.36. ábra. Inaktív CaSR, NPS-2143 NAM-hoz kötött állapotban (PARK 2021).
(Gao hasonló vizsgálatát illetően lásd az 5.32. ábrát)

A két cikk esetében a krio-EM SAP körülményei is hasonlóak voltak: Vitrobot Mark IV–el fagyasztották a mintát, Titan Krios elektronmikroszkópot használtak 300 kV gyorsító feszültségen, Gatan K3 direkt elektron detektorral detektáltak és az elért felbontások (2,7Å-4,0Å az ECD-en, 3,4 Å -4,2 Å a TM-eken) is hasonlók voltak, mint Gao esetében. A CaSR aktiválódását szintén IP1 méréssel detektálták. A CaSR egyes doménjeinek szerkezetét atomi szinten, atommodellekkel dokumentálták. (PARK 2021 SUPPLEMENT). A Park méréseihez hasonlóan változtak meg *Gallus gallusból* származó ECD és TM domének az aktív állapotú teljes hosszúságú CaSR-ben (WEN 2021).

A Gao és Park közleményeiben közölt aszimmetrikus és szimmetrikus változások között biológiai okok lehetnek és nem méréstechnikaiak. Például az, hogy a nagyobb méretű PAM-ok, mint pl. a cinacalcet és evocalcet aszimmetrikus változásokat kívánnak meg a G-protein aktivációjához, míg a kisebb méretű PAM (R-568) vagy PAM nélküli CaSR, szimmetrikus marad aktivációkor. Park azt a következtetést vonta le, hogy végső soron a G-protein- kapcsolt CaSR vizsgálata fogja megmutatni, hogy a szimmetrikus vagy aszimmetrikus dimer a releváns aktivált szerkezet.

5.2. táblázat. *A NAM-hoz kötött inaktív CaSR krio-EM adatai (EMD-25145), PDB (7SIN)*

Nagyítás	105000x
Gyorsító feszültség (kV)	300
Elektron expozíció ($e^-/Å^2$)	58,63
Defókusz tartomány (μ)	-1 től -2,5-ig
Detektor pixel méret (Å)	0,826
Feltételezett szimmetria	C2
Kezdeti részecske szám	1 241 782
Végső részecske szám	161 564
Felbontás (Å) (ECD/TM)	4,0/4,2
FSC küszöb érték	0,143

Irodalom

ABOUT CRYOSPARC, https://guide.cryosparc.com/

BAYBURT, T. H. et al. (2002): Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins, *Nano Letters* 2, 8, 853-856.

BON, C. L. et al. (2014): Labeling and functionalizing amphipols for biological applications. *J. Membr. Biol.* 247(0), 797-814.

BON, C. L. et al. (2021): Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy, *Quarterly reviews of Biophysics 54, e6.*

CANG, C. et al. (2015): TMEM175 is an organelle K^+ channel regulating lysosomal function, *Cell* 162, 1101-1112.

CASADÓ, V. et al. (2023): What are the current trends in G protein-coupled receptor targeted drug discovery?, *Expert opinion on drug discovery,* 18, 8, 815-820.

CHEN, G-L. et al. (2023): To be or not to be an ion channel: cryo-EM structures have a say, *Cells* 12, 1870, https://doi.org/10.3390/cells.

CUBE BIOTECH, https://cube-biotech.com/

DOYLE, A. D. et al. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity, *Science* 280, 69-77.

DÖRR, J.M. et al. (2016): The styrene-maleic copolymer: a versatile tool in membrane research, *Eur Biophys J* 45, 3-21.

EMDB, Electron Microscopy Data Bank, https://www.ebi.ac.uk/emdb/

FABERBERG, L. et al. (2010): Prediction of human membrane proteome, *Proteomics* 10, 1141-1149.

FAN, J. et al. (2008): Golgi apparatus and neurodegenerative diseases, *Int. J. Dev. Neurosci*. 26, 523-534.

GAO, Y. et al. (2021): Asymetric activation of the calcium-sensing receptor homodimer, *Nature*, 595, 7867, 455-459.

GENG, Y. et al. (2016): Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor, *eLife* 5, e13662. DOI: 10.7554/eLife.13662.

HIGGINS. A. J. et al. (2021): Cycloalkane-modified amphiphilic polymers provide direct extraction of membrane proteins for cryoEM analysis, *Communications Biology,* https://doi.org/10.1038/s42003-021-02834-3

HOEL, C. M. et al. (2022): Structure of the GOLD-domain seven-transmembrane helix protein family member TMEM87A, *eLife* 11, e81704, DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.81704

JOJOA-CRUZ, S. et al. (2018): Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA 1.2, *eLife* e41845, DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.41845

JOSHI, G. et al. (2015): Golgi fragmentation in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci*. 9, 340.

KANG, H. et al. (2024): GolpHCat (TMEM87A), a unique voltage-dependent cation channel in Golgi apparatus, contributes to Golgi-pH maintenance and hippocampus-dependent memory, *Nature Communications* 15, 5830.

KANG, H. et al. (2024): SUPPLEMENT

KLESSE, G. et al. (2019): CHAP: A versatile tool for the structural and functional annotation of ion channel pores, *Journal of Molecular Biology* 431, 3353-3365.

KNOWLES, T.J. et al. (2009): Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolimer, *J. Am. Chem. Soc.*131, 7484-7485.

KRISHNARJUNA, B. et al. (2022): Detergent-free isolation of membrane proteins and strategies to study them in a near-native membrane environment, *Biomolecules* 12, 1076.

LING, S. et al. (2021): Structural mechanism of cooperative activation of the human calcium-sensing receptor by Ca^{2+} ions and L-tryptophan, *Cell Research* 31, 383-394.

MARCONNET, A. et al. (2020): Solubilization and stabilization of membrane proteins by cycloalkane-modified amphiphilic polymers, https://hal.science/hal-03018338v1/file/Marconnet-2020.pdf

OH, S. et al. (2022): Differential ion energetics explains selectivity in the non-canonical lysosomal K^+ channel TMEM175, *eLife*, 11, e75122. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.75122

OH, S. et al. (2020): Gating and selectivity mechanisms for the lysosomal K^+ channel TMEM175, *eLife,* 9, 253430. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.53430

OVERINGTON, J. P. et al. (2006): How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (12), 993-996.

PDB, Protein Data Bank, https://www.rcsb.org/

POPOT, J.-L. et al. (2011): Amphipols from A to Z, *Annu. Rev. Biophys.* 40, 379-408.

POZSGAI, I. (2023): A krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus, Typotex, Budapest, ISBN 978 963 493 070 9.

PARK, J. et al. (2021): Symmetric activation and modulation of the human calcium-sensing receptor, *PNAS*, 118, 51, e2115849118.

PRIVE, G. G. (2007): Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins, *ScienceDirect Methods* 41, 388-397.

SCHULZE, T. et al. (2025): Unraveling pH regulation of TMEM175, an endolysosomal cation channel with a role in Parkinson's disease, *Journal of Cellular Physiology* 240:e70008, https://doi.org/10.1002/jcp.70008

SGRO, G.G. et al. (2018): Cryo-EM grid preparation of membrane protein samples for single particle analysis, *Front. Mol. Biosci.* 5, 74.

SIGMA-ALDRICH, https://www.sigmaaldrich.com/HU/hu

SUNDARAMOORTHY, V. et al. (2015): Golgi fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis, an overview of possible triggers and consequences, *Front. Neurosci.* 9, 400.

TANG, T. et al. (2023): Transmembrane protein 175, a lysosomal ion channel related to Parkinson's disease, *Biomolecules,* 13, 802, https://doi.org/10.3390/biom13050802

TATE, C.G. (2010): Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation, Mus-Veteau (ed.) *Heterologous expression of membrane proteins,* Methods in Molecular Biology, vol 601. 187-203.

TRIBET, C. etal. (1996) Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *Biochemistry* 93, 15047-15050.

VENIEN-BRYAN, C. et al. (2023): Overview of membrane protein sample preparation for single-particle cryo-electron microscopy analysis, *Int. J. Mol. Sci*. 24, 14785.

WEN, T. et al. (2021): Structural basis for activation and allosteric modulation of full-length calcium-sensing receptor, *Sci. Adv.* 7, eabg1483.

WIKIPEDIA, AMPHIPOLS, https://en.wikipedia.org/wiki/Amphipols

WU, L. et al. (2023): TMEM175: A lysosomal ion channel associated with neurological diseases, *Neurobiology of Disease* 185, 106244.

ZHANG, C. et al. (2016): Structural basis for regulation of human calcium-sensing receptor by magnesium ions and an unexpected tryptophan derivative co-agonist, *Sci. Adv.* 2, e1600241.

ZHANG, K. (2016): Gctf: Real-time CTF determination and correction, *J. Struct. Biol.* 193, 1-12.

ZHENG, S,Q, et al. (2017): MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy, *Nat. Methods* 14, 331-332.

ZHOU, H-X. et al. (2013): Influences of membrane mimetic environments on membrane protein structures, *Annu. Rev. Biophys.* 42, 361-392.

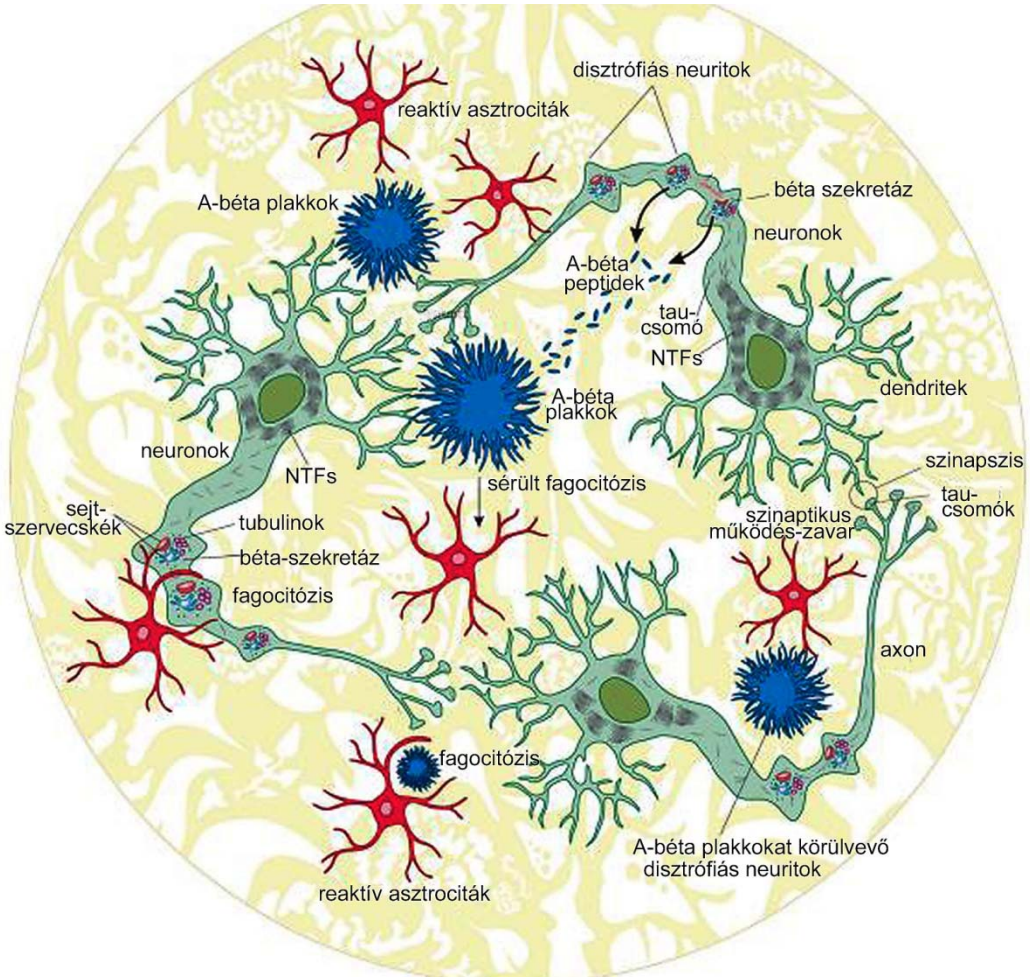
ZIVANOV, J. et al. (2018): New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3, *eLife* 7, e42166.

ZIVANOV, J. et al. (2019): A Bayesian approach to beam-induced motion correction in cryo-EM single-particle analysis, *IUCrJ* 6,1, 5-17.

ZOONEN, M. et al. (2014): Amphipols for each season, *J. Membr. Biol.* 247(0), 759-796.

VI. Krio-EM az Alzheimer-kór kutatásában

Az Alzheimer-kór (AD, Alzheimer's disease) a demencia leggyakoribb formája, amely az emlékezés, gondolkodás, beszédkészség és viselkedés fokozatos, visszafordíthatatlan romlásában nyilvánul meg. Az Alzheimer-kór jellemzője két különböző, szálas morfológiájú amiloid zárvány az agyban: az extracelluláris amiloid β plakkok és intracelluláris neurofibrilláris gubancok (neurofibrillary tangles, NTFs) (LONG 2019).



6.1. ábra. *Az Alzheimer-kóros agy jellemzői* (ABDULKHALIQ 2026).

(Az ábrán A-béta, az amiloid-β rövidítése, NTFs –neurofibrillary tangles, neurofibriláris csomókat jelöl)

2019-es becslések szerint a Földön 51,6 millió ember szenved Alzheimer-kórban (SAFIRI 2024). Vannak az FDA által jóváhagyott gyógyszerek, amelyek a leépülés folyamatát lassítják, de a betegséget nem gyógyítják. Összefoglaló cikkek az AD-ről a közel múltból: BONDI 2017, ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2019, LONG 2019, GAO 2024, SAFIRI 2024, ZHENG 2025.

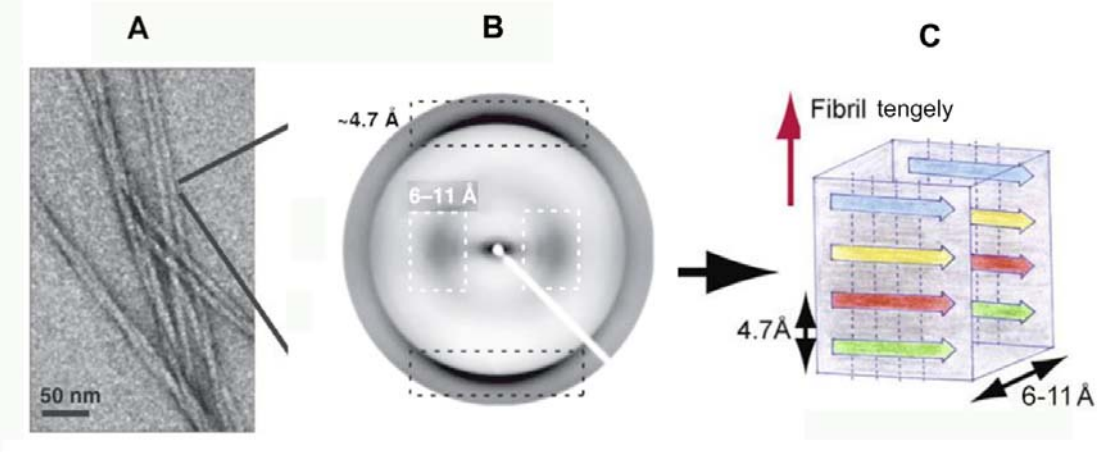
Az Alzheimer-kór 1906 óta ismert (6.2. ábra), az első közlemény 1907-ből való (ALZHEIMER 1907), de mindmáig nem tudott megbirkózni vele az emberiség. A következő ábra néhány fontos időpontot mutat a betegséggel vívott küzdelemben (egyelőre csak a 36-43 aminosavból álló amiloid-béta (Aβ) vonatkozásában). A krio-EM is, mint mérföldkő, helyet kapott benne a 2022-es esztendőben.



6.2. ábra. *Az amiloid β-val kapcsolatos Alzheimer-kutatások mérföldkövei. (*APP-*amiloid prekurzor protein)* (GAO 2024)

Az Alzheimer-kórban központi szerepet betöltő amiloid a szövettani meghatározása szerint egy β-lemezes extracelluláris lerakódás, amelyet a kongó vörös megfest és polarizált fényben sárga-zöld kettőstörést eredményez (WESTERMARK 1999, EANES 1968, JIN 2003). A transzmissziós elektronmikroszkópban jól kivehető szálas szerkezetet mutat, amely amorf szerkezete miatt csak szál röntgen diffrakcióban (WIKIPEDIA, FIBER DIFFRACTION) mutatott mérhető szerkezeti vonásokat (6.3. ábra). A röntgen diffrakcióból származtatták az a szerkezeti modellt, amely szerint az amiloid béta fibrillek szálai (filamentek) a fibril tengelyére merőlegesen futnak egymás mellett ún. kereszt béta-lemezt alkotva (cross-beta sheets) és ezek a lemezek 4,7 Å távolságra vannak egymástól a fibril tengelye mentén. Másrészt a fibril a tengelyével párhuzamosan futó, változó számú filamentből épülhet fel, az ebből álló béta-lemezek egymástól való távolsága 6 és 11 Å között változhat.

Mindezek az ismeretek megelőzték a krio-EM-et, ami az amiloid fibrillek ultraszerkezetének feltárásában bizonyult hasznosnak.

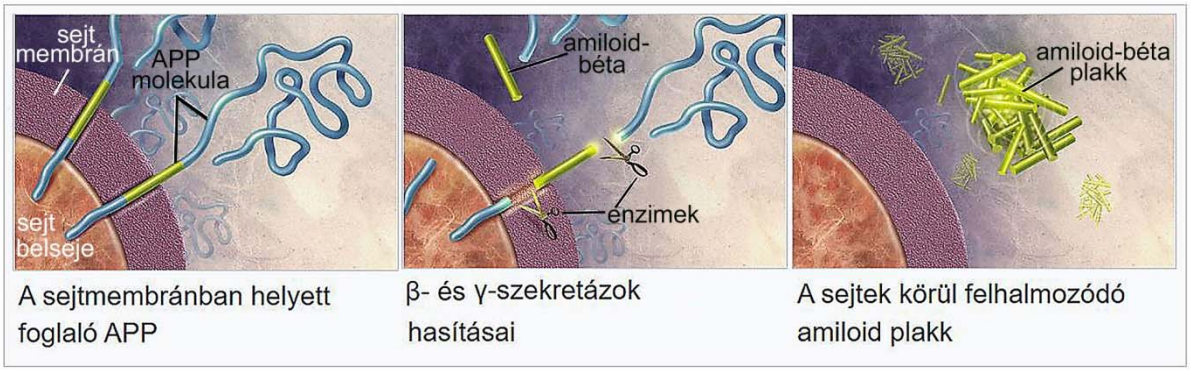


6.3. ábra. *Amiloid-béta fibrillek morfológiája és szerkezete.*
A/ negatív festésű transzmissziós elektronmikroszkópos kép. B/ szál röntgendiffrakciós kép, a szaggatott fekete vonallal jelölt téglalapból vezethető a béta lemezeknek 4,7 Å-ös rétegződési távolsága a fibril tengelye mentén. A fehér szaggatott vonal jelzett téglalapokon belüli intenzitás utal a fibril tengelyével párhuzamos béta-lemezek távolságára (RIEK 2017).
C/ ábra a röntgendiffrakciós képből levezetett modell (MAJI 2009)

VI.1. Amiloid-béta 42 (Aβ42) fibrillek krio-EM vizsgálata

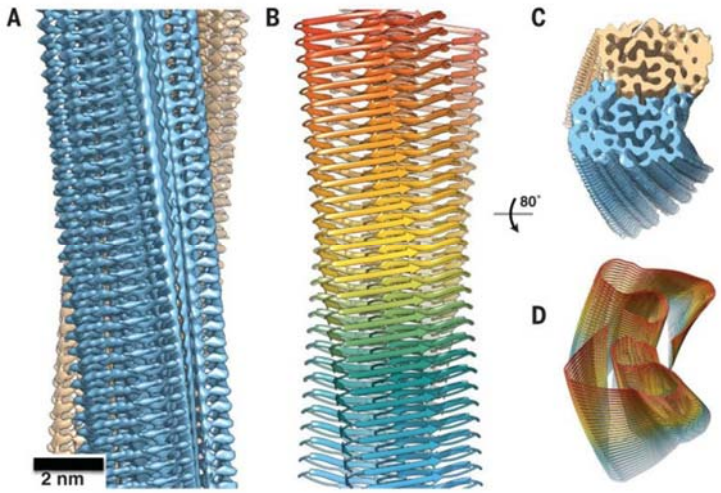
VI.1.1. Aβ42 krio-EM vizsgálata Yang (2022)

A 2022-es év a 6.2. ábrán az alább ismertetendő Yang közleményre utal, amely a humán agyból származó 42-es rezidiumnál végződő amiloid-β peptidek (Aβ42) vizsgálatáról szól. Az Aβ42 rosszabbul oldódik és nagyobb hajlamot mutat az aggregálódásra, mint az Aβ40 és így fontosabb szerepet játszik az AD kialakulásában. Öregedő majmok agyának neuronjaiban az Aβ42 szintje jelentősen megemelkedik, Alzheimer-kórban megbetegedettek neuronjaiban a Aβ42 szint ötször magasabb, mint a kontrol csoportban (GAO 2024).



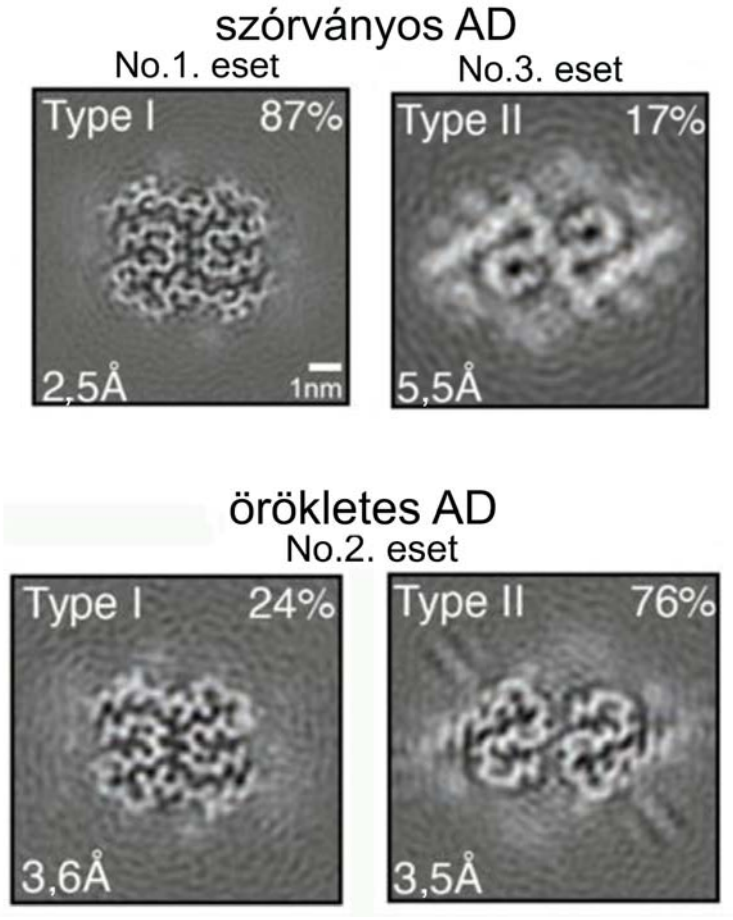
6.4. ábra. *Az extracelluláris amiloid-béta plakkok keletkezése az amiloid prekurzor proteinből (APP) enzimek (β- és γ-szekretázok) hatására* (WIKIPÉDIA, ALZHEIMER-KÓR)

Gremer 2017-ben vizsgálta a rekombinánsan előállított Aβ42 szerkezetét röntgen diffrakcióval, szilárdtest mágneses rezonanciával (ssNMR) és krio-EM-mel, de a krio-EM képek felbontása (4,0 Å) gyengébb, mint Yang 2022-es vizsgálataié (2,5 Å), ezért az utóbbit ismertetjük részletesebben. Viszont Gremer ábrája megérdemel egy szemléltetést (6.5 ábra).



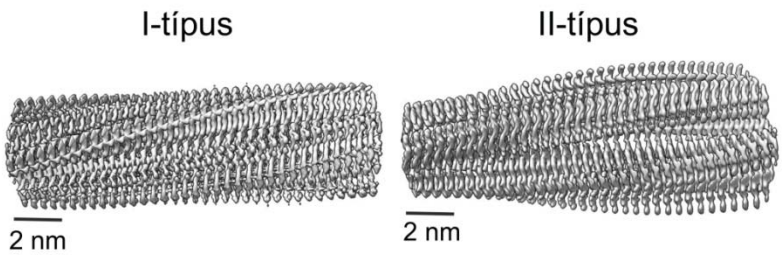
6.5. ábra. *Az amiloid-β (1-42) fibrill szerkezete. (A) krio-EM képekből készült 3D rekonstrukció, amely mutatja két protofilament (kék és barna) egymáshoz viszonyított elhelyezkedését és a β-lemezek egymástól való szeparálódását a fibrill tengelye mentén. (B) A fibrill atommodellje a párhuzamosan futó kereszt-béta szerkezettel (cross-β sheet). (C) A krio-EM sűrűség térképének keresztmetszete, döntött ábrázolásban. (D) Vázmodell (backbone model)* (GREMER 2017)

Yang tíz neurodegeneratív betegségben elhunyt ember agyából vett mintát vizsgált, akik közül három Alzheimer-kórban hunyt el. Ez utóbbi három ember agyának frontális kérgéből vett mintákban két különböző krio-EM mintázatot talált. Mindegyik mintázat előfordult a vizsgált agyakban, de az előfordulási valószínűségük nagyban különbözött, ez adott okot a tipizálásra (6.6. ábra).



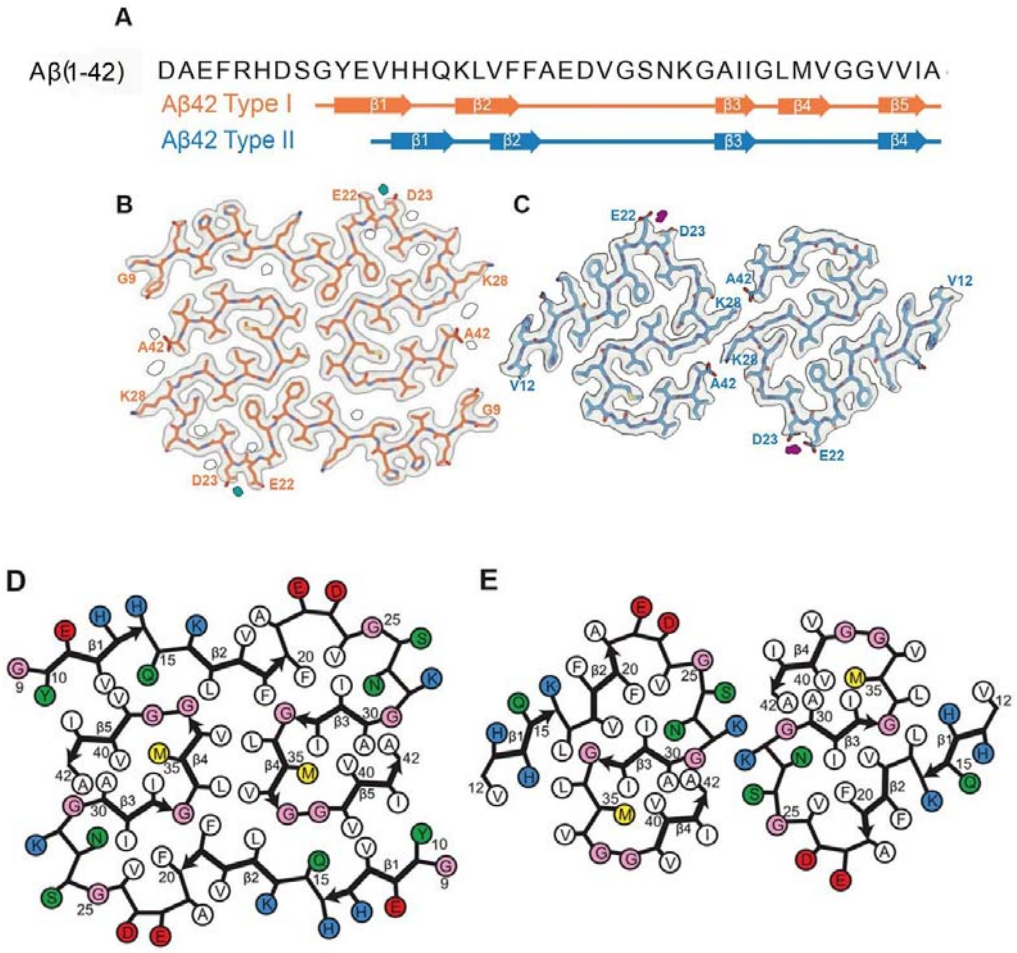
6.6. ábra. *Krio-EM sűrűség térképek az I- és II-típusú Alzheimer-kóros betegek agyából származó Aβ42 filamentekről. A szórványos AD-ben az I-típus dominál, az örökletesben a II-típus* (YANG 2022)

Mint a 6.6. ábrán látható százalékok mutatják, az I-típusú Aβ42 filamentek gyakrabban fordulnak elő a szórványos (sporadic) Alzheimer-kóros betegekben, míg a II-típusú filamentek az örökletes (familial) Alzheimer kórban. Mindkét típusban a filament két S-alakú vagy S-re emlékeztető protofilamentből áll. Mindkét típusú filament csavarodása bal-kezes. A I-típus protofilamentjei 5, a II-típus 4 béta-szálat (β-strand) tartalmaz (lásd a 6.8. ábrát). A két típusú filament 3D rekonstrukciója a következő ábrán látható:



6.7. ábra. *Az Aβ42 filamentek krio-EM 3D rekonstrukciója* (YANG SUPPLEMENT 2022)

A krio-EM lehetőséget ad a filamentek ultraszerkezetének megismerésére (6.8. ábra).



6.8. ábra. *Az (A) ábrán az amiloid-béta-42 (Aβ42) peptid primer és szekunder szerkezete. A két típus primer szerkezete azonos. Az emberi agyból származó (B) és (C) ábrán az Aβ42 filamentek krio-EM sűrűség térképe (átlátszó szürke), benne az atom modell: az I-típus narancs sárga, a II-típus kék színű. A feltételezett fém molekulák zölddel vannak jelölve a baloldali térképen, lilával a jobb oldalin. (D) és (E) ábra: a rezidiumok elhelyezkedésének sémája az Aβ42 I- illetve II-típusában, (készült az atom2svg.py programmal – https://gist.github.com/wiederm/a11eec011f28ff0b77e3d46c1619f127). A körökön belüli betűk az aminosavak rövidítései. A negatívan töltött rezidiumok pirossal, a pozitívak kékkel, a polárisak zölddel, és a nem polárisak fehérrel vannak jelölve. A kén tartalmúak sárgák, a glicinek rózsaszínűek. A nyíllal ellátott vastag fekete vonalak a β-szálakat jelölik, (az I-típusban β1-β5, illetve a II-típusban β1-β4)* (YANG 2022)

Mind az I- és II-típusú amiloid-β 42 filamenteket a típuson belül két azonos protofilament alkotja, viszont a két típus protofilamentje eltér egymástól. Az Aβ42 filamentek szerkezetének ismerte elvezethet olyan inhibitorokhoz, amelyek meggátolják az amiloid plakkok kialakulását.

6.1.táblázat. *Krio-EM adatgyűjtés és feldolgozás* (YANG SUPPLEMENT 2022)

	szórványos AD No.1. eset			szórványos AD No.2. eset	örökletes AD No.1. eset	örökletes AD No. 2 eset	
Mikroszkóp feszültség (kV)	300		300	300	300	300	
Elektronágyú	XFEG			CFEG	XFEG	XFEG	
Detektor	K3		Falcon 4i	K3	K3	K3	
Nagyítás	81 000		165000	10500	81000	81000	
Pixel méret a detektoron (Å/pixel)	0,93		0,727	0,86	0,93	0,93	
Teljes elektron expozíció ($e^-/Å^2$)	40		40	40	40	45	
Defókuszálási tartomány (µm)	-1,0 és -2,8 között		-0,6 és -1,4 között	-1,0 és -2,4 között	-1,0 és -2,8 között	-1,0 és -2,4 között	
Automatizáló szoftver	EPU		EPU	EPU	EPU	EPU	
Energia-szűrő szélessége (eV)	20		10	20	20	20	
Használható mikroszkópos képek	11347		8088	7080	4646	1927	
Szelektált szemcsék száma	1254691		404787	123001	325532	1732195	
	I típus	Ib típus	I típus	I típus	II típus	I típus	II típus
Végső felhasznált szemcsék száma	326938	50990	59961	42013	69707	38192	124026
Más fehérje szemcse	335317		104265	31364	40338	513891	
Kirótt szimmetria	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C2
Térkép-felbontás (Å) (FSC=0,143)	2,9	3,5	2,5	5,0	4,7	3,6	3,5
Térkép-élesítés, B-faktor	-51	-100	-53	-223	-276	-95	-120
Helikális emelkedés (Å)	2,4	2,4	2,4	2,5	2,4	2,4	4,8
Helikális csavarodás (fok)	178,5	179,2	178,4	178,1	178,5	178,4	-2,9

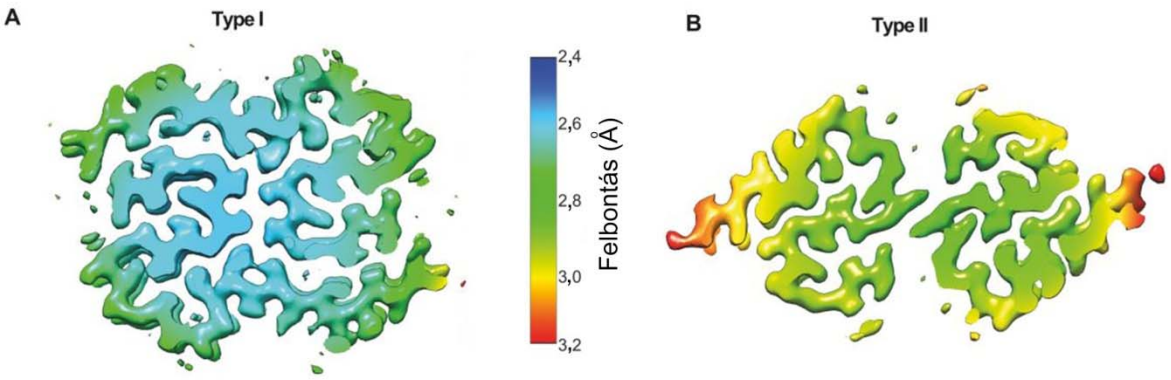
Megjegyzések a táblázathoz

XFEG - fűtött (1700-1800 K), extra fényességű katód, CFEG - Cold Field Emission Gun, hidegkatódú téremissziós ágyú, EPU – a Thermo Fisher Scientific krio-EM automatizáló szoftvere az egyedi részecskék analízisére, FSC- Fourier Shell Correlation, Fourier-héj korreláció.

A táblázat két utolsó sorában a helikális menetemelkedés (helical rise) az ott jelzett helikális csavarodáshoz (helical twist) tartozik és értéke a C1 vagy C2 szimmetria feltételezésétől függ a RELION számításaiban. A C1 modell monomereket, a C2 dimereket (párhuzamosan vagy antipárhuzamosan futó β-szálakat) tételez fel, így a monomerek rétegződési távolsága (stacking distance) (2,4 Å) fele a dimerek értéknek (4,8 Å). A C1 szimmetriához közel 180°-os jobbkezes, a C2 szimmetriához közel 3°-os balkezes helikális csavarodás tartozik.

Az Aβ42-nek krio-EM technikai vonatkozásai (6.1. táblázat) nagyon hasonlóak az e könyvben példaként felhozott többi esethez: automatikus ultragyors fagyasztás (vitrifikálás) a Thermo Fisher Vitrobot Mark IV berendezéssel, vizsgálatok Thermo Fisher Titan Krios G2 és G3 krio-EM-mel, detektálás Gatan K2 és K3 direkt elektron detektorokkal elektronszámláló üzemmódban, Gatan Bioquantum energiaszűrő a rugalmatlanul szórt elektronok eltávolítására 20 eV szélességű energiaablakkal. Készültek felvételek Thermo Fisher Titan Krios G4 krio-EM-mel, Falcon 4i detektorral és Thermo Fisher Selectris X energiaszűrővel is. Adatfeldolgozásra a RELION szoftvert használták (SCHERES 2012), amelyet He tökélesített helikális szerkezetekre (HE 2017) A krio-EM vizsgálatról még több technikai adatot a cikk Supplementjében találhatunk (YANG SUPPLEMENT 2022).

Kiemeljük a vizsgálatok nagyon jó 2,5 Å-ös felbontását (FSC=0,143 feltétel mellett), amely egy filamenten belül nem állandó: a központi merevebb részekre jobb, a periférián lévő lazábban kötött részekre gyengébb (6.9. ábra).



6.9. ábra. *A krio-EM lokális felbontása az Aβ42 különböző részein*
(YANG SUPPLEMENT 2022)

Yang egymondatos összefoglalása: két szerkezetileg rokon típusú protofilament alkotja az I- és II-típusú Aß42 filamenteket.

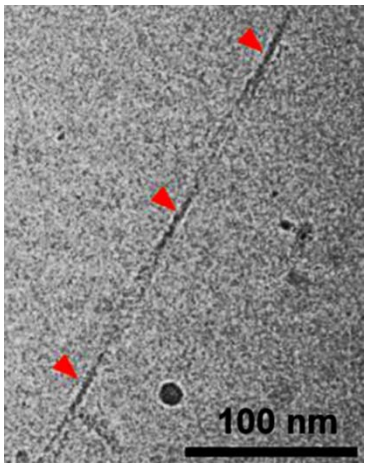
Bár a fentebbi leírásban a krio-EM-szerkezet vizsgálatokra szorítkoztunk, de számos más eljárás is része volt a vizsgálatoknak: pl. szekvenálás, tömegspektrometria (MALDI-TOF, LC-MC/MS), immunaranyfestésű elektronmikroszkópia stb.

VI.1.2. Aβ42 krio-EM vizsgálata Lee (2023)

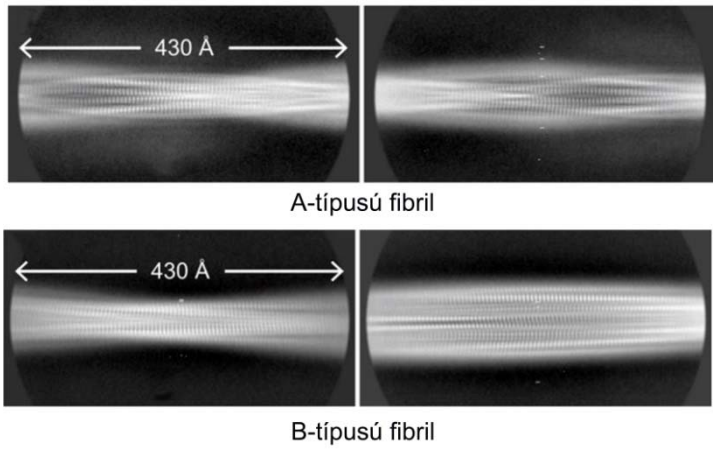
Lee és munkatársai Yanghoz hasonlóan human agyból származó Aβ42-t vizsgált krio-EM-mel, de a korábbiaktól eltérő morfológiákat talált. A korábbi vizsgálatok S vagy fordított S betűre emlékeztettek, Lee a görög nű (ν) és görög üpszilon (υ) betűkre emlékeztető polimorfokat talált, amelyeket A-típusúnak (type-A) illetve B-típusúnak (type-B) nevezett. A különböző szerzők által vizsgált Aβ42 peptidek primér szerkezete megegyezik, miként azt az eddigi és az ezután mutatandó ábrákról leolvashatjuk, de morfológiában eltérhetnek. Az A-típusú fibrill jobbkezes, a B-típusú balkezes helikális csavar.

Lee, Yang-tól eltérően nem egyszeri oltással (seeded growth) növelte meg az agykérgi szövet Aβ42 fibrilljeit, hanem kétszeri oltással, amelyben az első oltásból nyert fibrill „magokat” szintetikus vagy rekombináns Aβ42-vel inkubálta. Az oltással növelt fibrillek igazoltan megtartják a kiindulási anyag morfológiáját (HEERDE 2022). Heerde szerint az ex vivo nyert amiloid fibrillek morfológiája tovább terjed in vitro. (De ez különbözik a csupán in vitro előállított fibrillek morfológiájától.)

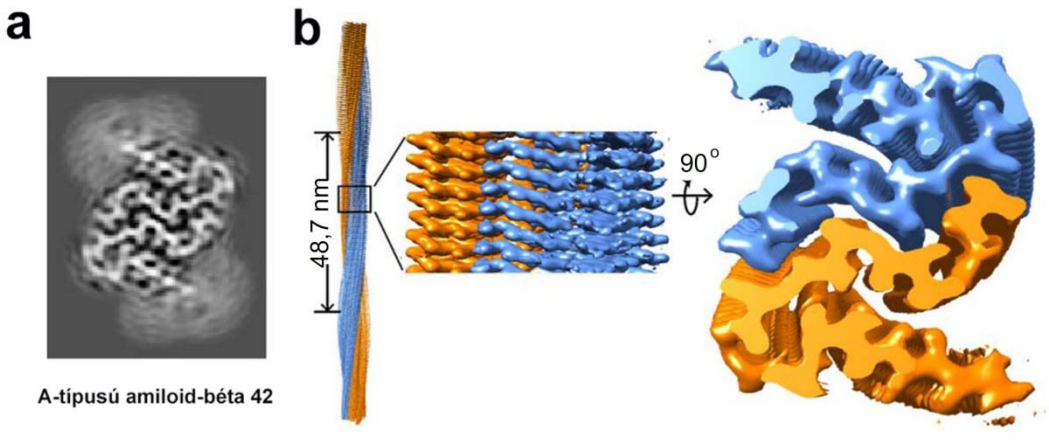
A 6.10. ábra egy szintetikus második oltással előállított Aβ42 fibrill szál krio-EM képét mutatja.



6.10. ábra. *Krio-EM felvétel egy Aβ42 fibrill szálról. A piros nyilak a legkisebb átmérőt (cross-over) jelzik. A felvételt az eredeti közleményben a valóságnak megfelelő nagyon gyenge kontraszttal közlik. Itt mi a jobb láthatóság kedvéért kontrasztosítottuk a felvételt. A krio-EM kép helyett a nagyobb kontrasztú, de kisebb felbontású negatív festésű elektronmikroszkópos képet szokás mutatni* (LEE 2023)



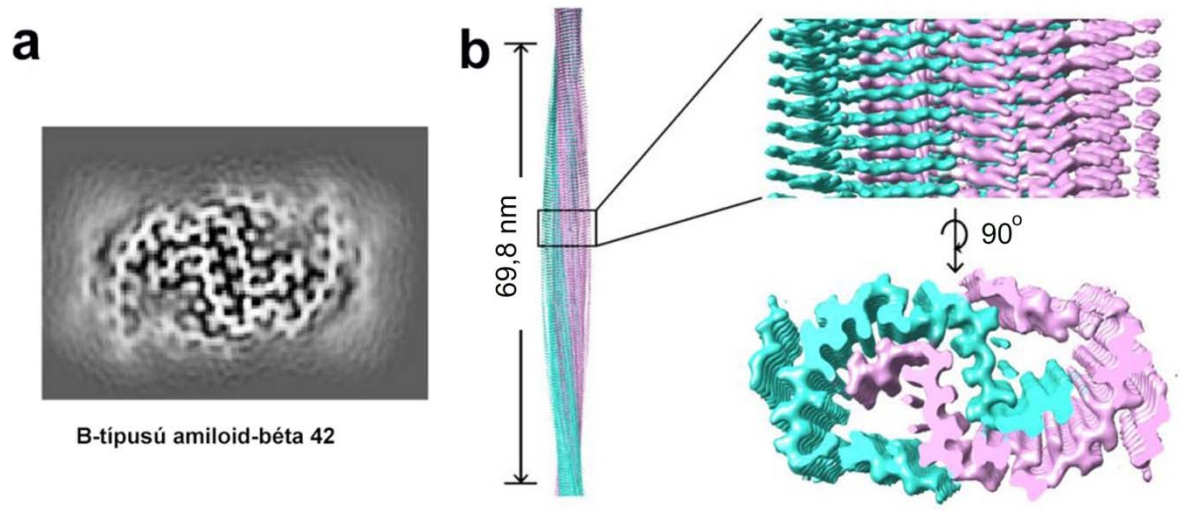
6.11. ábra. *Az A- és B-típusú fibrillek legkisebb és legnagyobb keresztmetszetű szakaszai. (A krio-EM felvételek 2D-osztályozási átlagai láthatók.)* (LEE 2023)



6.12. ábra. *(a) Az A-típusú Aβ42 fibrill krio-EM sűrűség térképe a fibrill tengelyére merőlegesen és a belőle levezetett szerkezeti modell (b)*

Az A-típusú fibrill jobb kezes csavar és gyorsabban csavarodik, mint a B-típusú: két cross-over között a távolság ~49 nm, szemben a B-típusnál mért ~69 nm-el. (A bal és jobb-kezes csavarodás irányát atomerő mikroszkóppal határozták meg.) Ez a különbség a crossover távolságban nem a monomerek axiális helikális emelkedésének, hanem a protofilamentek tekeredési sebességének a következménye. Az Aβ42 gyorsabb csavarodása tömörebb szerkezetet eredményez, mint az Aβ40 szerkezet (lásd később).

A fibrill tengelye mentén mérhető helikális emelkedés 2,46 Å, ami -179,09° helikális elcsavarodáshoz tartozik. A RELION programmal történő adatfeldolgozásnál a He által helikális szerkezetekre tovább fejlesztett verziót használták (HE 2017). A helikális szimmetria mellett még létezhet más szimmetria a fibrill tengelyére vonatkozóan ún. rotációs C_n szimmetriák ($n \geq 2$). A kvázi 2_1 szimmetria megkötésével jobb felbontást érnek el (2,83 Å), mint a szimmetria megkötés nélküli C_1 szimmetriánál. A két kereszt-béta alegység (kék és narancssárga a 6.12. ábrán) a fibrill növekedési tengelyére vonatkoztatva szimmetrikus. Minthogy ez a szimmetria nem tökéletes (a 180°-os rotációt még egy eltolásnak is követni kell) ezért nevezik kvázi (vagy pszeudo) szimmetriának. Az alegységeken belül ún. in-register parallel elrendeződés valósul meg, azaz az egyik béta lemez i-edik eleme a parallelfutó másik béta lemez i-edik eleméhez illeszkedik.



6.13. ábra. *A B-típusú Aβ42 fibrill krio-EM sűrűség térképe a fibrill tengelyére merőlegesen és a belőle levezetett szerkezeti modell*

A B-típusú Aβ42 fibrillek bal-kezes csavarodásúak és lassabban csavarodnak, mint az A-típusú fibrillek, ennek megfelelően cross-over távolságuk nagyobb (~69 nm). Míg az A-típusú fibrill két alegysége csaknem folyamatosan érintkezik, addig a B-típus két alegysége összefonódik. A monomer helikális emelkedése 2,48 *Å* (-179,35° elcsavarodás mellett) gyakorlatilag megegyezik az A-típus monomerjével. (A jobbkezes csavarodás előjele pozitív.)

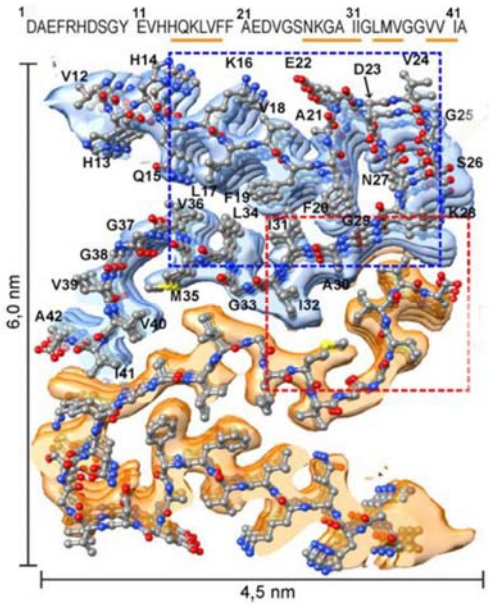
A 3D modell finomításakor kvázi 2_1 szimmetria megkötésével 2,74 Å felbontást értek el. A szimmetriamegkötés elhagyása csak kismértékű felbontásromlást hozott magával (2,91 Å az A-típusnál, 2,79 Å a B-típusnál), viszont szimmetriamegkötés nélkül a finomítás fizikailag értelmezhetetlen eredményekhez is vezethet.

A krio-EM mérések és számolások paramétereit az A- és B-típusú filamentekre összefoglalóan a következő táblázatban mutatjuk.

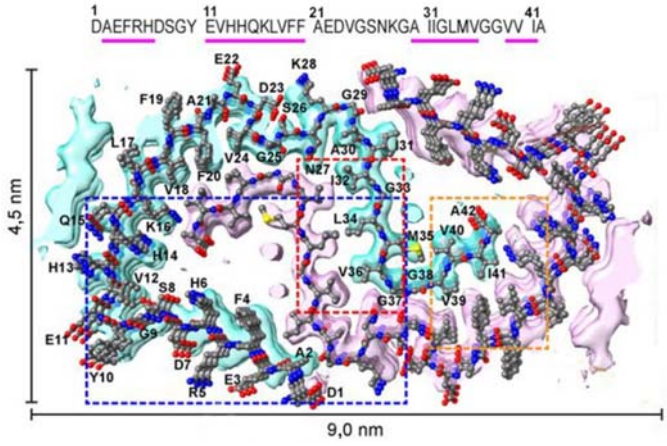
6.2. táblázat. *Krio-EM adatgyűjtési és adatfeldolgozási paraméterei az A- és B-típusú Aβ42 fibrillekre*

Adatgyűjtés		
	A-típus	B-típus
Mikroszkóp	Titan Krios	Titan Krios
Kamera	Gatan K2 Summit	Gatan K2 Summit
Feszültség (kV)	300	300
Nagyítás	105000	105000
Defókusz-tartomány	-0,5 µm-től – 3,0 µm-ig	-0,5 µm-től – 2,5 µm-ig
Pixel méret (Å)	0,86	0,86
Expozíciós idő (s)	1,65	1,65
„Moziképek” száma	22	22
Helikális rekonstrukció		
Mikrográfok száma	3383	5557
Hasznosított részecskék száma	347821	285760
Részecskék száma a 3D rekonstrukcióban	68481	92019
Kirótt szimmetria	kvázi 2_1	kvázi 2_1
Helikális emelkedés/helikális csavarodás	2,46 Å / 179,09°	2,48 Å / 179,35°
Térkép felbontása	2,83 Å	2,76 Å
Térkép-élesítő B faktor	-65,20 $Å^2$	-55,12 $Å^2$

A következő két ábra nem igényel magyarázatot, viszont hasznosításuk annál több szakértelmet fog igényelni.



6.14. ábra. *Az A-típusú Aβ42 krio-EM sűrűség térképe és szerkezeti modellje a fibrill növekedési tengelyére merőleges síkban. Az egyik kereszt-béta alegység kék, a másik narancssárga színű. A szaggatott vonallal bekeretezett két részt az eredeti közlemény kinagyítva, részletesebben mutatja* (LEE 2023)



6.15. ábra. *A B-típusú Aβ42 krio-EM sűrűség térképe és szerkezeti modellje a fibrill növekedési tengelyére merőleges síkban. Az egyik kereszt-béta alegység kék, a másik rózsaszín színű. A szaggatott vonallal bekeretezett három részt az eredeti közlemény kinagyítva, részletesebben mutatja* (LEE 2023)

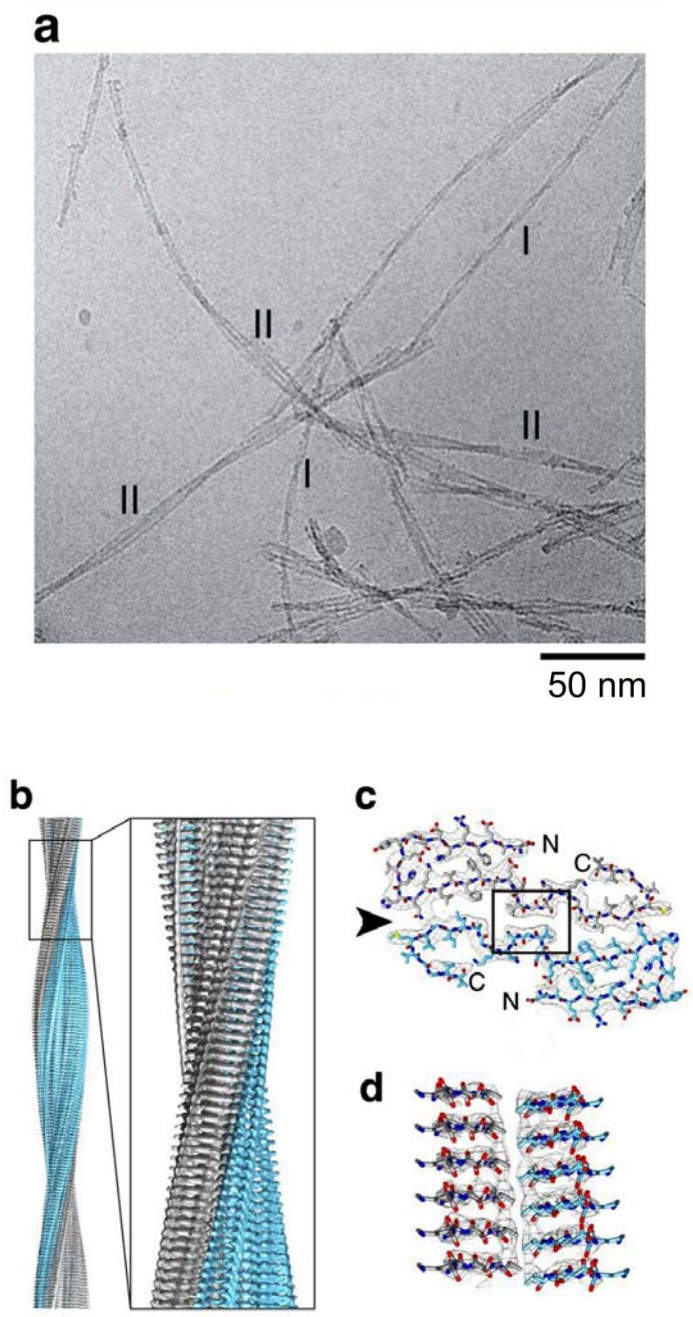
Lee és társai mágneses rezonancia vizsgálatokat is végeztek és bár nem igazolták, de feltételezik, hogy az általuk feltárt A- és B-típusú szerkezetek, amelyeket human agyszövetből kétszeres oltással (seeded growth) hoztak létre, az agyban valóban léteznek, Vizsgálataikkal az amiloidok leképezési technikájának javítását és aggregációjuk meggátolását szeretnék elérni.

VI.2. Az amiloid-β 40 fibrillek krio-EM vizsgálata

VI.2.1. Aβ40 krio-EM vizsgálata, Kollmer (2019)

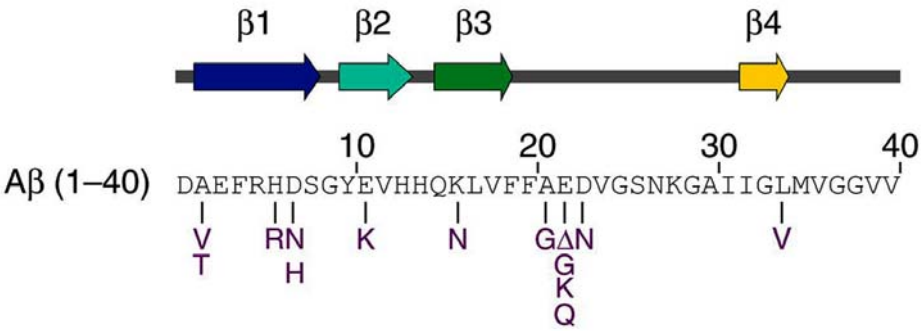
Kollmer krio-EM-es vizsgálatai, amelyben az Aβ40 fibrillek Alzheimer-kórban szenvedett betegek agyhártya szövetéből származtak, azt mutatták, hogy a fibrillek jelentősen eltérnek attól, mint ami a korábbi in vitro vizsgálatok alapján ismert volt. A krio-EM térképek felbontása 4,0-4,5 Å volt és előre jelezzük, hogy az alább tárgyalandó, jobb felbontású (2,7 Å) vizsgálatok (YANG 2023) Kollmer képét tovább finomították. Az olvasó számára tanulságos lehet, hogy ez a felbontásjavulás mennyire változtathatja meg egy peptidről alkotott képet.

A 6.16. a/ ábrán a Aβ40 fibrillek kétféle (I- és II-nek nevezett) morfológiája látható krio-EM felvételen. A 6.16. b/ ábra a I-morfológiájú fibrill rekonstruált 3D képét mutatja oldalnézetben. A c/ ábrán a fibrill tengelyére merőleges metszet látható és ennek a középső bekeretezett része látható a fekete nyíl irányából a d/ ábrán.



6.16. ábra. *Az amiloid-β 40 fibrill morfológiája és csavart, lépcsőzetes szerkezete. a/ I- és II-morfológia krio-EM képe, b./ az I-morfológia rekonstruált 3D képe oldalnézetben. A két egymást követő legkisebb keresztmetszetű rész (cross-over) távolsága 41,5 ± 2,3 nm. c./ metszet a fibrill síkjára merőlegesen, d/ a metszet bekeretezett részének oldal nézete a nyíl irányából* (KOLLMER 2019)

A béta-lemezek elhelyezkedése látható az Aß40 szekvenciájában (6.17. ábra).



6.17. ábra. *A béta lemezek elhelyezkedése az Aβ(1-40) szekvenciájában. Lila színnel a mutációk láthatók* (KOLLMER 2019)

A 6.17. ábra érdekessége abban áll, hogy a későbbi, jobb felbontású képekben (YANG 2023) csak a stabil (rendezett) D1-G38 mag látható, ugyanis a V39 és V40 C-terminális rezidiumok nem voltak feloldhatók a flexibilitásuk miatt. A tömegspektrométeres vizsgálatok Aβ(1-40) és Aβ(1-38) csúcsokat mutattak, de Aβ(1-42) csúcsokat nem. Minden esetben az Aβ(1-40) csúcs volt a legintenzívebb (KOLLMER SUPPLEMENT 2019).

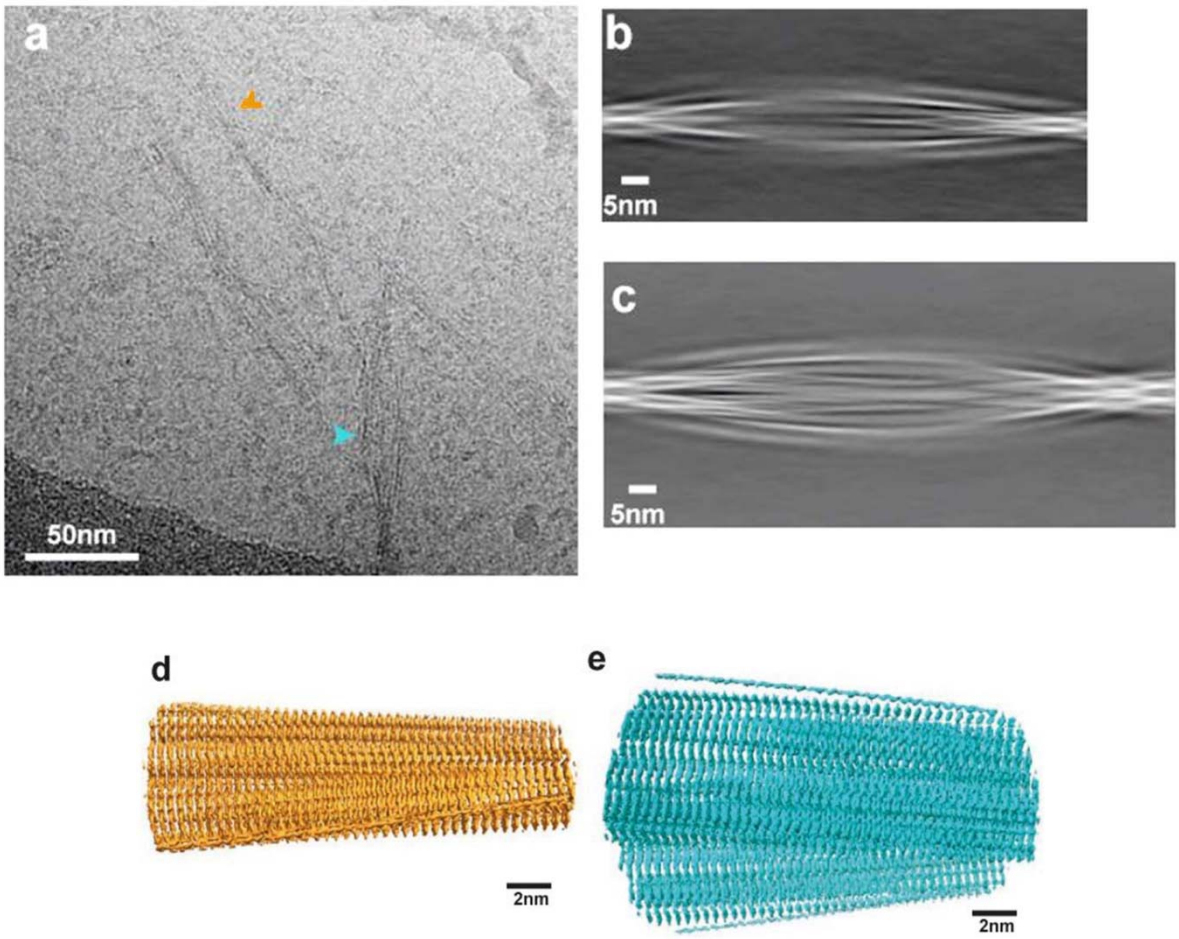
Kollmer Aß40 I-morfológiájának adatai megtalálhatók a Protein Adatbankban 6SHS kódszám alatt.

Megj: a filament és fibrill terminológia eltérő használata Kollmernél és Yangnál zavaró lehet. (Az amiloid filamentek 2-7 nm széles szerkezeti alegységek, míg az amiloid fibrillek jellemzően 7-13 nm ármérőjűek, 1-8 csavart vagy összefonódó filamentből állnak.).

VI.2.2. Aβ40 krio-EM vizsgálata, Yang (2023)

Yang Alzheimer-kóros és agyi amiloid angiopatiás (cerebral amyloid angiopathy, CAA) lágy agyhártyákból származó Aβ40 filamenteket vizsgált krio-EM-mel. A végstádiumú Alzheimer-kórós betegek csaknem fele CAA-ban is szenved, amikor is az Aß40 az agyi véredényekben rakódik le. (JÄKEL 2022) Yang három típusú filament szerkezetet talált és eredményeit összevetette Kollmer eredményeivel. Mint már említettük, Kollmer 2019-es vizsgálatához képest Yang jobb felbontóképességet (2,4 és 2,7Å) ért el. A filamentek olyan protofilament párokból alakultak ki, amelyek stabil (rendezett) magja a D1-G38 rezidiumra korlátozódott.

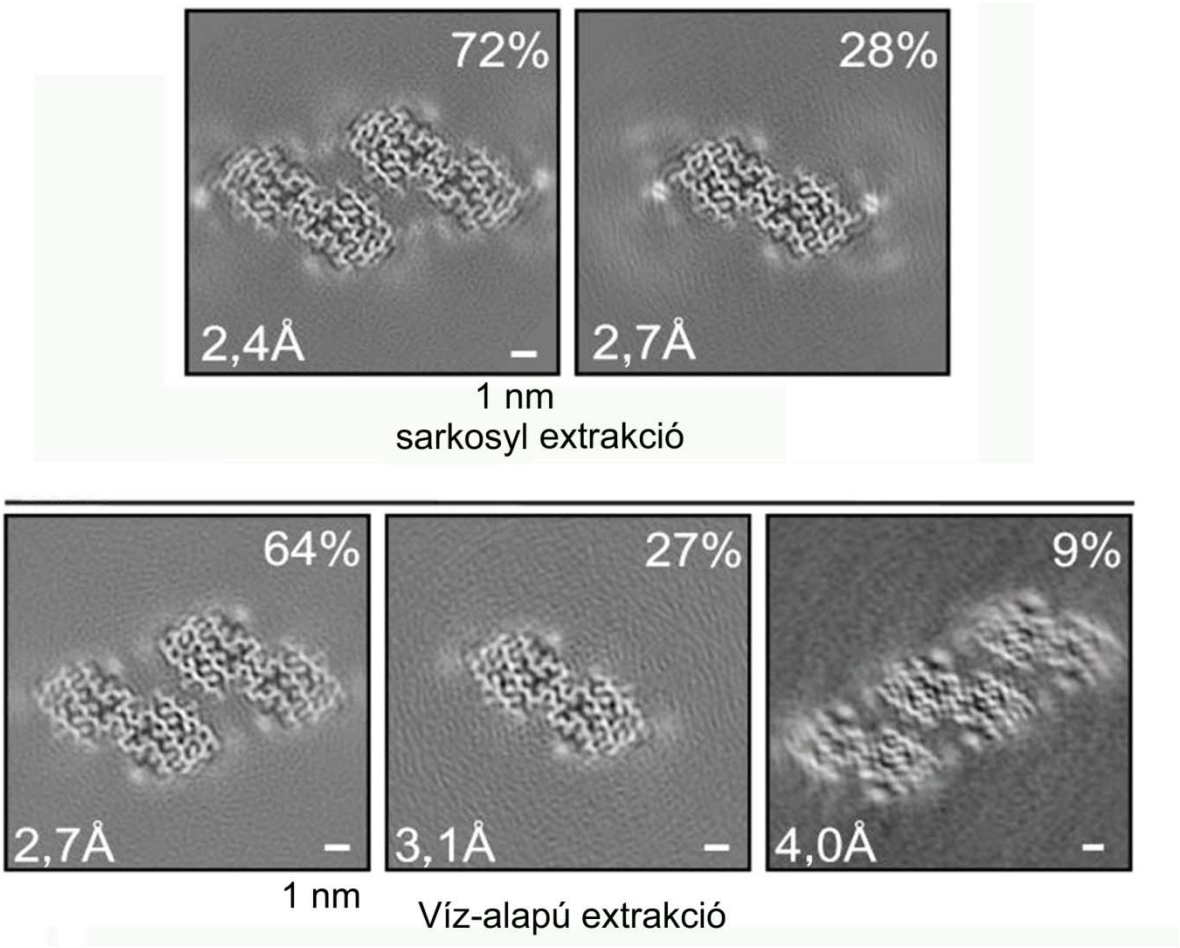
A következő 6.18. a/ ábrán a sarkosyl extrakció (sodium lauryl sarcosinate detergent) oldhatatlan maradékából készült mintából származó Aß40 peptidről felvett krio-EM kép, a képekből készült 2D osztályátlagok, (b/ és c/ ábra), valamint a rekonstruált 3D kép látható az I- és II-típusú filamentekre (d/ és e/ ábra).



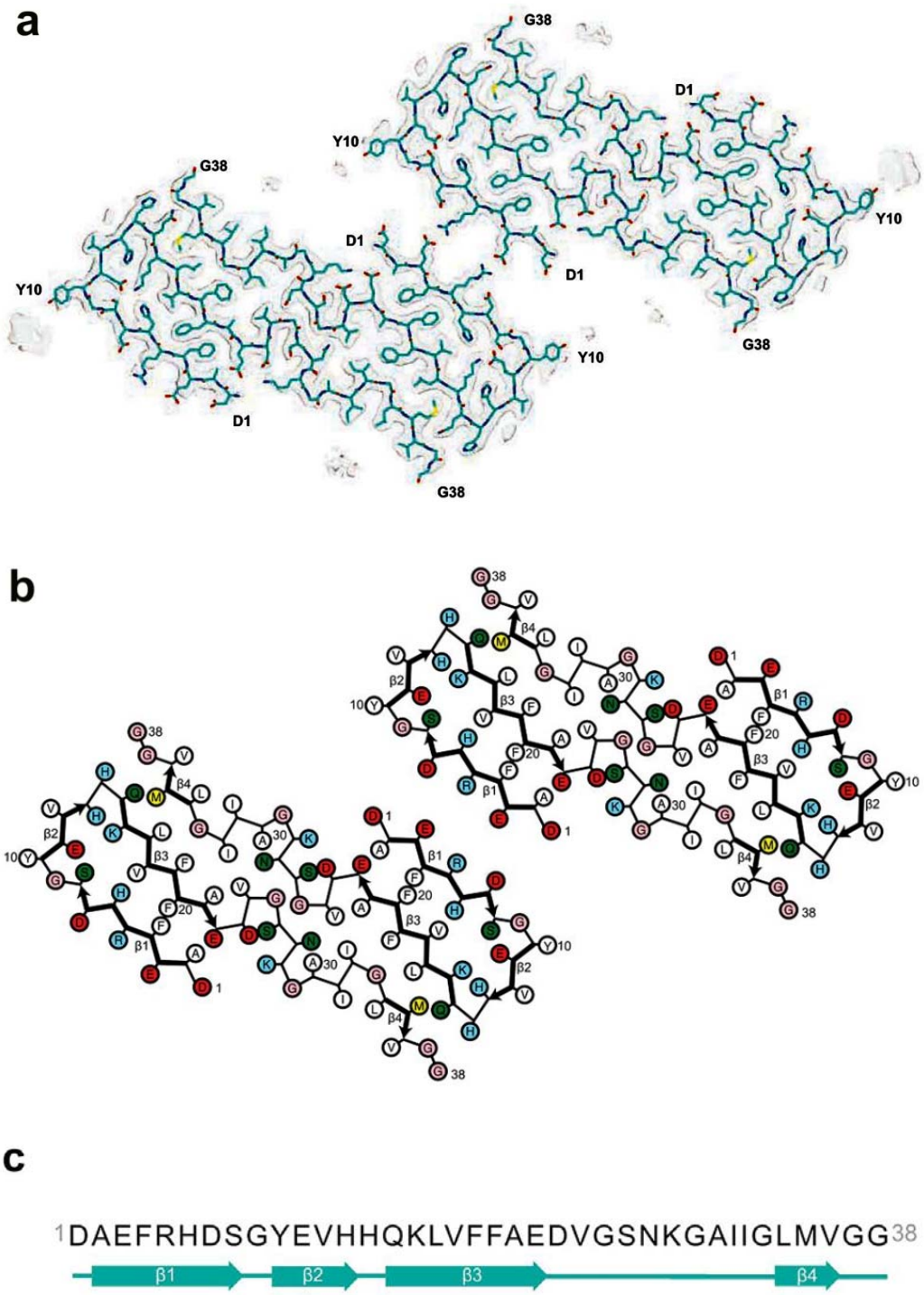
6.18. ábra. *a./ Krio-EM felvétel Aß40 filamentekről a lágy agyhártyából vett mintán sarkosyl extrakció után. A narancs sárga nyíl a I típusú a kék nyíl a II-típusú filamentre mutat. b./ és c./ ábra az I- illetve II-típusú filamentek 2D átlagát mutatja. d./ és e./ábra az I-, illetve II-típusú filamentek 3D rekonstrukciója* (YANG 2023 Supplement)

Yang 2023-as vizsgálataiban kétféle minta előkészítést, sarkosyl extrakciót (YANG 2022) és vizes alapú extrakciót (ANNAMALAI 2016) alkalmazott, amelyeket összehasonlított a kapott szerkezetek szempontjából (6.19. ábra). Mindkét eljárás nagyon hasonló eredményt adott, azt mutatva, hogy a sarkosyl extrakció nem befolyásolja az Aß40 peptidek szerkezetét.

A lágy agyhártyából csak Aß40 filamentek voltak nyerhetők, a 6.19. ábra szerint a filamentekből az I-típusúak fordultak elő nagyobb gyakorisággal, mint a II-típusúak. (Megjegyzés: agy szövetekből Aß42 filamentek (YANG 2022), míg az EG22 mutációból vegyesen fordultak elő Aß40 és Aß42 filamentek sarkosyl extrakció után emberi és egér agyból (YANG 2023 B)).



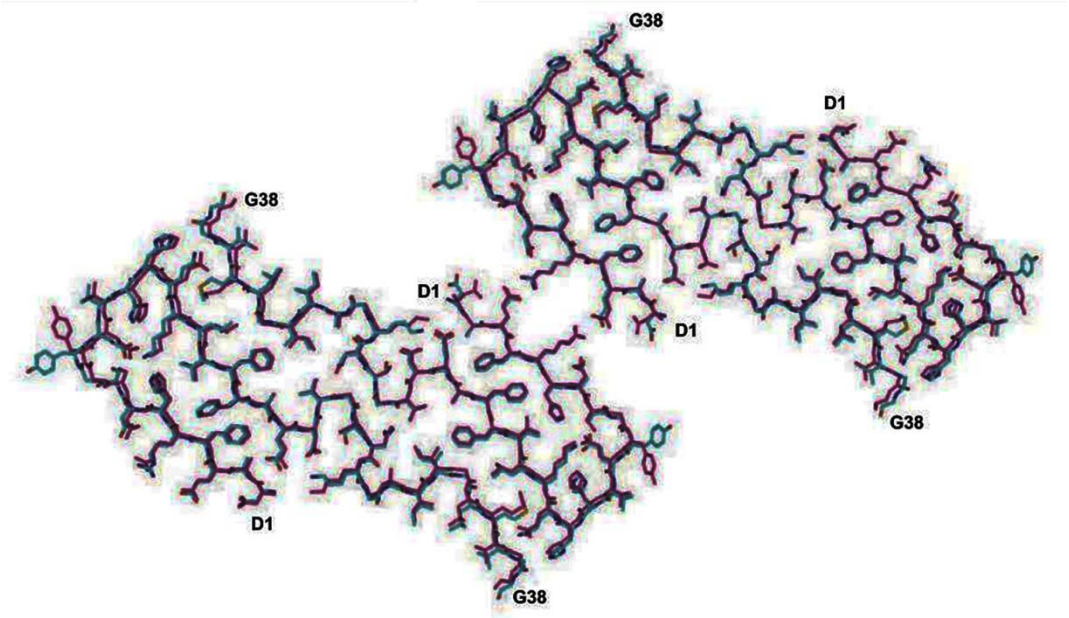
6.19. ábra. *Az 1 esetből származó Aβ40 filamentek összehasonlítása sarkosyl és vizes alapú extrakció után. A 2D térképek a filamentek spirális tengelyére merőleges kb. 1 „lépcsőfok" vastagságú metszetek. A térképek felbontását a képek bal alsó sarkában, az adott szerkezetek előfordulási gyakoriságát a jobb felső sarkokban láthatjuk százalékban megadva. A marker hossza 1 nm* (YANG 2023)



6.20. ábra. *a./ Aβ40 filament krio-EM sűrűség térképe (szürke), benne az atommodell (kék) sarkosyl extrakció után. b./ Az atommodell az aminosavak megjelölésével, c/ primer szerkezet és benne a béta-lemezek elhelyezkedése (fekete nyilak)* (YANG 2023)

A 6.20. a./ ábrán a Y10 rezidium mellett látható denzitás hiányzik a vizes alapú extrakció után kapott (itt nem mutatott) térképen, ami arra utal, hogy az a rezidium elveszhetett a vizes alapú extrakció során. A 6.20. c/ ábra szerint hiányzik a C-terminus V39 és V40 rezidium Kollmer

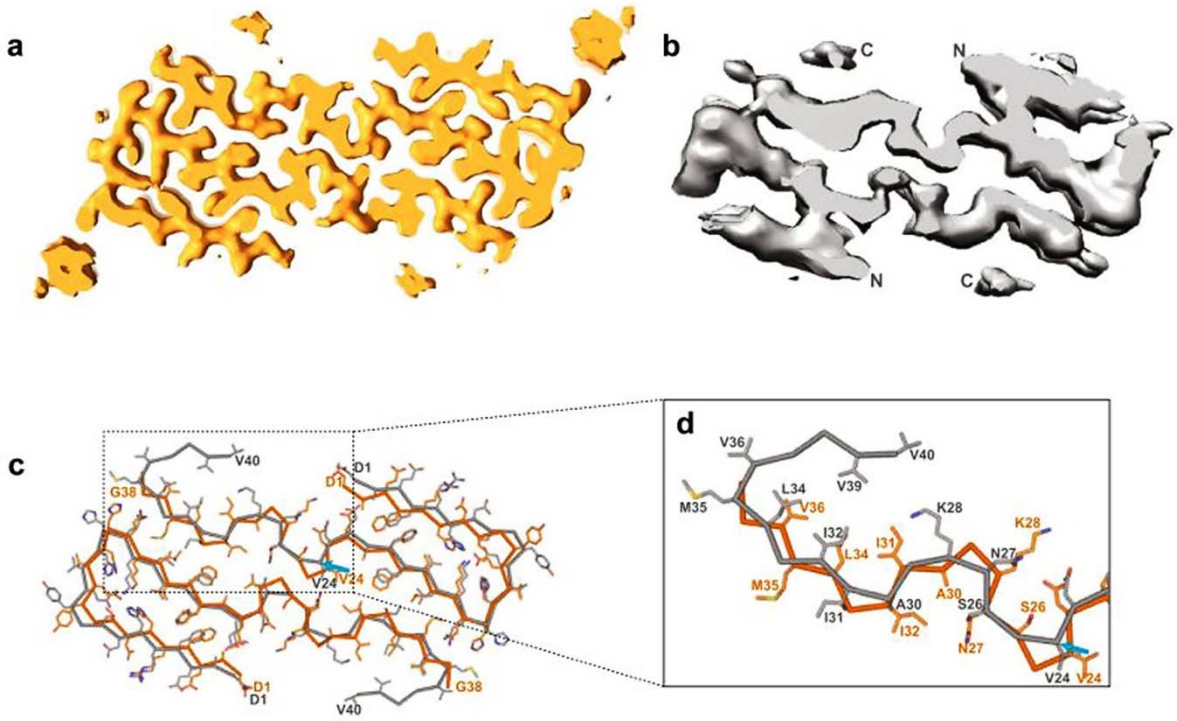
vizsgálataihoz (6.17.ábra) képest. Ezek dinamikus mozgása nem tette lehetővé a nagyfelbontás miatt az Aβ(1-38) peptiddel való együttes ábrázolást. A kétféle minta-előkészítésből adódó atommodellek összehasonlítása a 6.2. ábrán látható.



6.21. ábra. *Aβ40 filament két modelljének összehasonlítása: a sarkosyl extrakció (kék) illetve a vizes alapú extrakció (rózsaszín) után maradt oldhatatlan anyagból* (YANG 2023)

A fenti ábra szerint a kétféle minta-előkészítési módszer nagyon hasonló eredményt ad.

Végül Kollmer és Yang krio-EM eredményeinek Aβ40-re vonatkozó összehasonlítása (6.22. ábra).



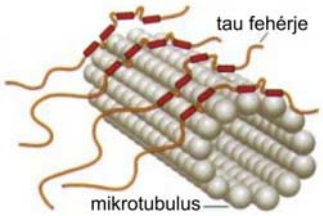
6.22. ábra. *Kollmer és Yang krio-EM eredményeinek összehasonlítása*
a/ sűrűségtérkép Yang (2023), b/ sűrűségtérkép Kollmer (2019)
c/ A sűrűségtérképekből meghatározott atommodellek (Yang narancssárga, Kollmer, szürke)
d/ Az atommodellek kinagyított része. Kék nyíl jelzi az Y24-t, amitől kezdve már a főláncok is eltérnek egymástól

Összefoglalva: az agyszöveti plakkokból származó Aß42 filamentek különböznek a véredényekből származó Aβ40 filamentektől, ami egybevág azzal a nézettel, hogy az Alzheimer-kór és a agyi amiloid angiopátia különböző patológiai folyamatok eredménye. Krio-EM-mel hatékonyan lehet követni a filamentek szerkezeti különbségeit atomi szinten és ezek az ismeretek hozzásegíthetnek új terápiás módszerek kifejlesztéséhez.

VI.3. Krio-EM és tau fehérje

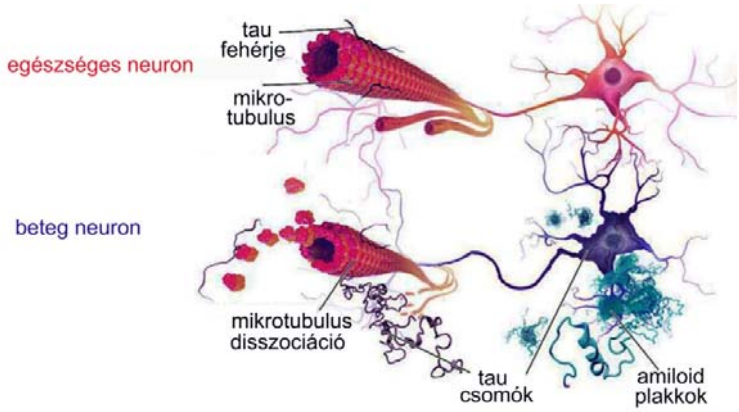
A tau fehérjéket (**t**ubulin **a**ssociated **u**nits, tubulinhoz társult egységek) az Alzheimer-kór egyik fontos jellemzőjeként tartják számon az amiloid-béta plakkok mellett. A tau fehérjék az Alzheimer-kóron kívül számos más neurodegeneratív betegség jellemzői, amelyeket közös néven tauopátiáknak neveznek (SCHERES 2020). Az AD abban különbözik a többi tauopátiától, hogy benne a tau fehérjéken kívül az Aβ plakkok is jelen vannak. Mi itt a tau fehérjéknek csak az Alzheimer-kórral kapcsolatos vonatkozásaival foglalkozunk a további taupátiák tárgyalása messze vezetne.

A tau fehérjék a mikrotubulusok szerkezeti stabilitását biztosítják (microtubule-associated protein, MAP) (6.23. ábra) és különösen nagy mennyiségben megtalálhatok az agykérgi neuronok axonjaiban, de előfordulnak a központi idegrendszer asztrocitáiban és oligodendrocitáiban is. Hat tau izoform ismeretes, amelyek. 352 és 441 közötti aminosavból állnak.



6.23. ábra. *Tau fehérje, benne az ismétlődések (repeat, R) pirossal jelölve* (WIKIPÉDIA)

A jól oldódó tau fehérje rosszul feltekeredve vízoldhatatlanná válik, aggregátumokat képez és az élő sejtek pusztulását okozza. Ezeket a neurofibriláris aggregátumokat tau-csomóknak (angolul tau tangles) nevezik és a szinapszisokon keresztül is tovaterjednek. (6.24. ábra). Az általuk előidézett nagyszámú neurodegeneratív betegség közül az Alzheimer-kór a leggyakoribb, de legalább két tucat más betegséget is okoz, mint pl. az ALS vagy Creutzfeld-Jacobs-kór.



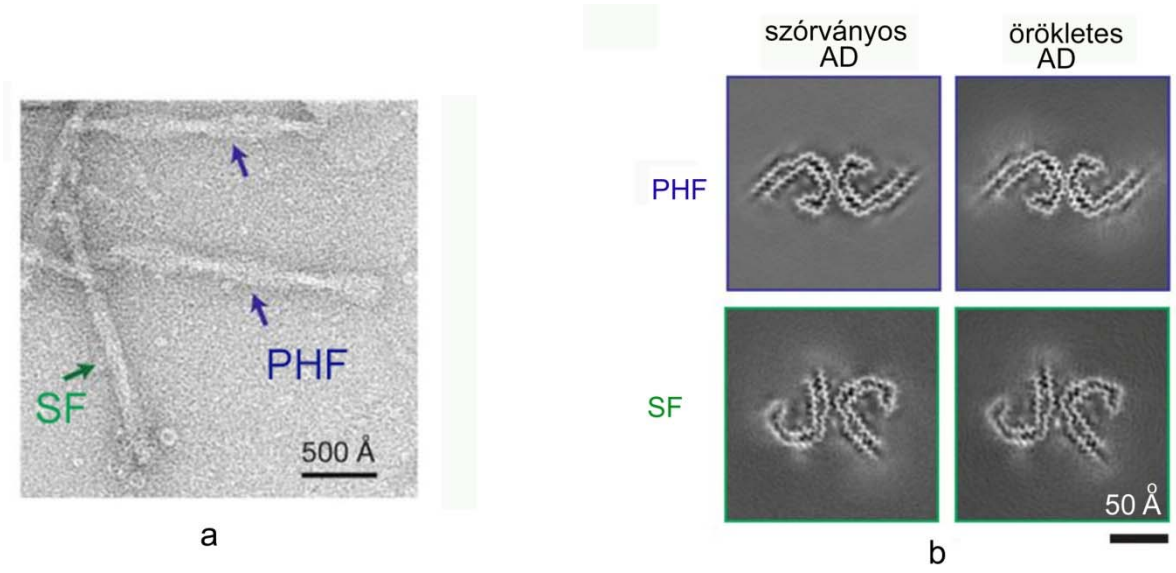
6.24. ábra. *A tau proteinben fellépő rendellenességek hozzájárulhatnak az Alzheimer-kór kialakulásához* (WIKIPEDIA)

A tau fehérjék különösen káros, oldhatatlan formája foszfát csoportok felvétele útján képződik az ún. foszforilált tau (phosphorylated tau), vagy röviden p-tau. Újabban jelentős előrelépés történt az AD diagnosztizálásában a foszforilált tau révén: a p-tau217 meghatározása egyszerű vérvétel útján történik (PAIS 2023, ASHTON 2024, THERRIAULT 2025).

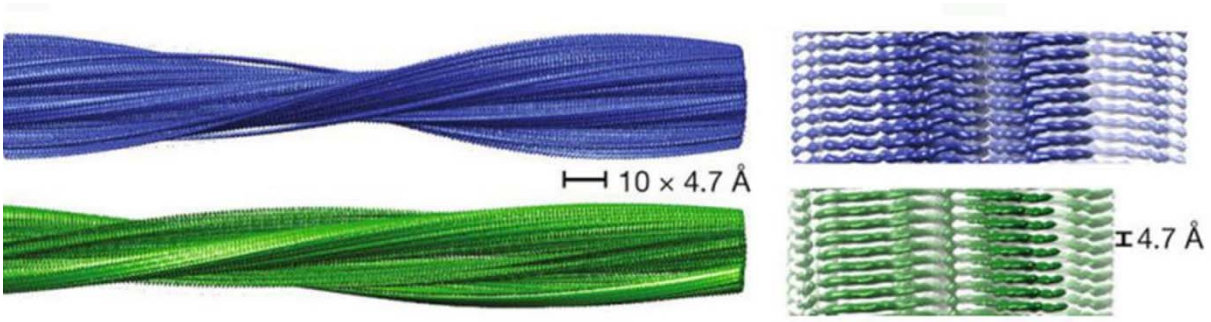
A tau filamentek páros (PHF) és egyenes (SF) formái már régóta ismeretesek (pl. BERRIMAN 2003) a negatív festésű TEM vizsgálatok alapján (PHF, paired helical filaments,). (SF straight filaments) (6.25. ábra).

VI.3.1. Alzheimer-kóros agyból származó tau filamentek krio-EM vizsgálata (Fitzpatrick 2017)

Fitzpatrick 2017-es vizsgálatait megelőzően hiányzott az Alzheimer-kóros agyból származó tau aggregátumok, benne a PHF és SF atomi szintű leírása. Ez megnehezítette a tauopátiák kutatását. A 6.25. ábrán a PHF és SF polimorfok negatív festésű TEM képét és a krio-EM képekből rekonstruált 3D atom modellt mutatjuk. A krio-EM vizsgálatok felbontóképessége 3,4-3,5 Å volt.

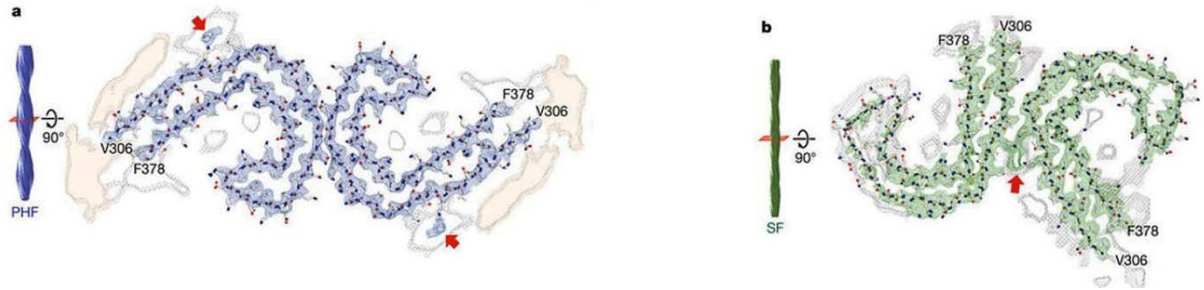


6.25. ábra. *Alzheimer-kóros agyból származó tau filamentek szerkezete. a/ Az egyenes filament (SF) és páros filament (PHF) jól megkülönböztethető a negatív festésű TEM felvételen* (FITZPATRICK 2017). *b/ A szórványos és örökletes AD-ből származó krio-EM keresztmetszetek (2D osztályozások) azonos C-alakú protofilamenteket mutatnak. A b/ ábra szerint nincs jelentős eltérés a szórványos és örökletes AD tau filamentjeinek szerkezetében* (FALCON 2018)



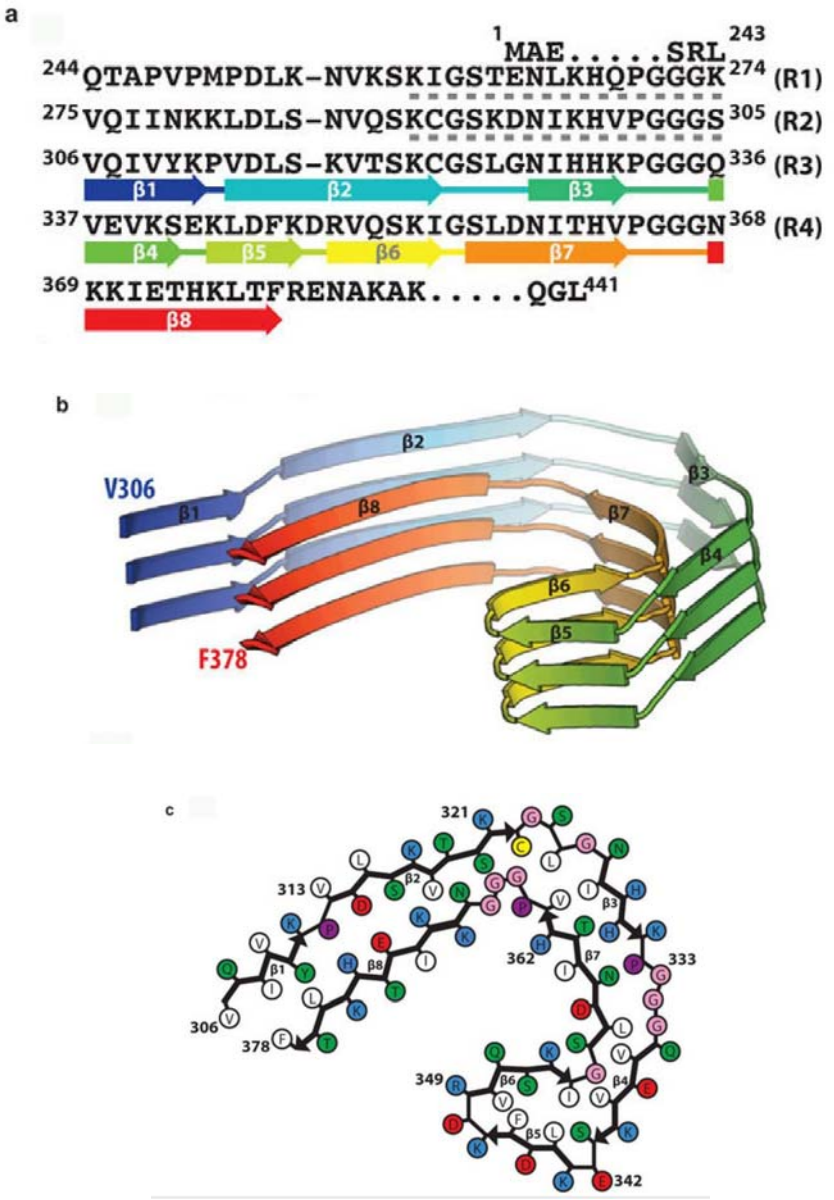
6.26. ábra. *Alzheimer-kóros agyból származó tau filamentek krio-EM 3D rekonstrukciói, SF zöld, PHF kék színnel jelölve. Baloldalon hosszanti, jobb oldalon keresztmetszeti kép* (FITZPATRICK 2017)

Az SF és PHF ultrastrukturális polimorfok, két C-alakú protofilamentből állnak (6.27. ábra). A helikális emelkedés az SF-ben kb. 4,7 Å, a PHF-ben kb. 2,4 Å. Az SF értéke az egyetlen protofilamenten belüli emelkedési távolságot jelenti, míg a PHF érték két anti-parallel futó protofilament közötti távolságot, amely éppen fele az az SF helikális emelkedésnek A krio-EM felbontása a tau filament keresztmetszetében nem egyenletes: a központi stabil magot (306-378 rezidium) jobban fel lehet bontani, mint a perifériás flexibilis részt.



6.27. ábra. *A PHF (a) és SF (b) keresztmetszetének krio-EM sűrűség térképe és atom modellje. A piros nyílak a K317-tel és K321-tel érintkező járulékos sűrűségekre mutatnak. Az élesített sűrűség térképek kék (PHF) illetve zöld (SF) színűek. A nem élesített 4,5 Å felbontású térképek szürkék. A nem élesített narancssárga háttér egy kevésbé rendezett β-lemezre emlékeztet, amely 16 aminosavat tartalmazhat és a 3R tau 259-274 rezidiumai (R1)) és a 4R tau 290-305 rezidiumai (R2)) keverékének felel meg* (FITZPATRICK 2017)

A tau fehérjék közös protofilamentjének négy ismétlődését ((R1)-től (R4)-ig) mutatja a következő ábra, benne a β-szálak elhelyezkedését különböző reprezentációban (6.28. ábra).



6.28. ábra. *A tau filamentek magját képező közös protofilament*

a./ A mikrotubulusokat kötő ismétlések (R1-R4) szekvenciája és amelyben nyolc β-szál van jelezve kéktől piros színig bezárólag. Az R1 vagy R2 16 rezidiuma járulékos β-lemezeket képezhet, ezeket szürke szaggatott vonal jelzi. b/ A filament tengelye mentén három egymást követő „létrafok" benne a másodlagos szerkezet. c/ A protofilament magjának sémája, a béta lemezeket vastag fekete nyílak jelzik (FITZPATRICK 2017)

Az Alzheimeres agyból származó tau filamentek szerkezete, amely kereszt-béta és béta hélixek kombinációjából áll, különbözik azoktól a hajtű szerkezetektől (269-284 és 300-312 rezidiumok), amelyekkel a tau fehérjék eredetileg a mikrotubulusokhoz tapadtak és amelyeket NMR-rel határoztak meg (LU 2013).

A krio-EM vizsgálatok néhány adatgyűjtési és rekonstrukciós paraméterét a 6.3. táblázat mutatja teljes hosszúságú páros (PHF) és egyenes (SF) tau filamentekre.

6.3. táblázat. *Tau filamentek krio-EM vizsgálati paraméterei*

Adatgyűjtés	PHF	SF
Nagyítás	105000x	105000x
Defókusz-tartomány (µm)	-1,0 és -3,0 között	-1,0 és -3,0 között
Feszültség (kV)	300	300
Mikroszkóp	Krios	Krios
Kamera	K2 Summit	K2 Summit
Egy kép expozíciós ideje (s)	0,2	0,2
„moziképek” száma	50	50
Teljes elektron dózis ($e^-/Å^2$)	60	60
Pixel méret (Å)	1,04	1,04

Rekonstrukció	PHF	SF
Boksz méret (pixel)	270	270
Bokszok közti távolság (Å)	28	28
kiválasztott szegmensek száma	214757	84701
szegmensek a 2D osztályozás után	214262	84089
szegmensek a 3D osztályozás után	23086	24689
Felbontás (Å)	3,4	3,4
Térkép élesítési B-faktor	-105	-114
Helikális emelkedés (Å)	2,36	4,74
Helikális elcsavarodás (fok)	179,4	-1,05

A szerzők szerint a páciensekből származó amiloid filamentek atomi léptékű krio-EM-es szerkezetmeghatározása egy egész sor neurodegeneratív betegség tanulmányozásához nyitja meg az utat.

Irodalom

ABDULKHALIQ, A. A. et al. (2026): Amyloid-β and tau in Alzheimer's disease: pathogenesis, mechnisms, and interplay, *Cell Death and Disease*, 17, 21, https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12789470/

ALZHEIMER, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Physisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION (2019): 2019 Alzheimer's disease facts and figures, *Altzheimer's & Dementia* 15, 321-387.

ANNAMALAI, K. et al. (2016): Polymorphism of amyloid fibrils in vivo, *Angew Chem Int Ed* 55, 4822-4825.

ASHTON, N.J. et al. (2024): Diagnostic accuracy of a plasma phosphorylated tau 2017 immunoassay for Alzheimer's disease pathology, *JAMA Neurol*. 81, 3, 255-263.

BERRIMAN, J. et al. (2003): Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-β structure, *PNAS* 100, 15, 9034-9038.

BONDI, M.W. et al. (2017): Alzheimer's disease: past, present and future, *JINS*, 23, 818-831.

EANES, E.D. et al. (1968): X-ray diffraction studies on amyloid filaments, J. Histochem. Cytochem. 16, 673—677.

Fitzpatrick, A.W.P. et al. (2017): Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease brain, *Nature* 547, 7662, 185-190.

GAO, Y. et al. (2024): A closer look at pathogenic amyloid-β in Alzheimer's disease using cryo-electron microscopy: a narrative review, *Adv. Technol. Neurosci.* 1, 2, 177-187.

GREMER, L. et al. (2017): Fibril structure of amyloid-β(1-42) by cryo-electron microscopy, *Science* 06, 358(6359), *Science* 7 sep 2017, Vol 358, Issue 6359, pp. 116-119

HE, S. et al. (2017): Helical reconstruction in RELION, *Journal of Structural Biology 198, 163-176.*

HEERDE, T. et al. (2022): Cryo-EM demonstrates the in vitro proliferation of an ex vivo amyloid fibril morphology ba seeding, Nature Communications 13, 85. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27688-5

JÄKEL, L. et al. (2022): Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: a systematic review and meta-analysis, *Alzheimer's Dement* 18, 10-28.

JIN, L-W. et al. (2003): Imaging lineare birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15294-15298.

KOLLMER, M. et al. (2019): Cryo-EM structure of Aβ40 amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue, *Nature Communications* 10, 4760, www.nature.com/articles/s41467-019-12683-8

LEE, M. et al. (2023): Structures of brain-derived 42-residue amylolid-β fibril polymorphs with unusual molecular conformations and intermolecular interactions, *PNAS* 120, 11, e2218831120.

LONG, J. M. et al. (2019): Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies, *Cell* 179, 312-338.

LU, J. X. et al. (2013): Molecular structure of β-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue, *Cell*, 154, 1257-1268.

MAJI, S. K, et al. (2009): Structure-activity relationship of amyloid fibrils, *FEBS Letters* 583, 2610-2617.

PAIS, M.V. et al. (2023): Plasma biomarkers of Alzheimer's disease: a review of available assays, recent developments, and implications for clinical practice, *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 7, 355-380.

RIEK, R. (2017): The three-dimensional structures of amyloids, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a023572.

SAFIRI, S. et al. (2024): Alzheimer's disease: a comprehensive review of epidemiology, risk factors, symptom diagnosis, management, caregiving, advanced treatments and associated challenges, *Front. Med.* 11, 1474043, doi: 10.3389/fmed.2024.1474043.

SCHERES, S.H.W. (2012): RERLION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination, *Journal of Structural Biology* 180, 519-530.

SCHERES, S.H.W. et al. (2020): Cryo-EM structures of tau filaments, *Current Opinion in Structural Biology* 64, xx-yy. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.011.

THERRIAULT, J. et al. (2025): Blood phosphorylated tau for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol* 24, 740-752.

WESTERMARK, G.T. et al. (1999): Staining methods for identification of amyloid in tissue, *Meth. Enzymol.* 309, 3-25.

YANG, Y. et al. (2022): Cryo-EM structures of amyloid-β 42 filaments from human brain, *Science* 14, 375(6577), 167-172.

YANG, Y. et al. (2023 B): Cryo-EM structures of amyloid-β filaments with Arctic mutation (E22G) from human and mouse brain, *Acta Neuropathologica* 145, 425-333.

YANG, Y. et al. (2023): Cryo-EM structures of Aβ40 filament from the leptomeninges of individuals with Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy, *Acta Neuropathologica Communications* 11, 191. https://doi.org/10.1186/s40478-023-01694-8

ZHENG, Q. et al. (2025): Alzheimer's disease: insight into pathology, molecular mechanisms and therapy, *Protein Cell* 16, 83-120.

VII. A krio-elektronmikroszkópia szerepe a gyógyszertervezésben

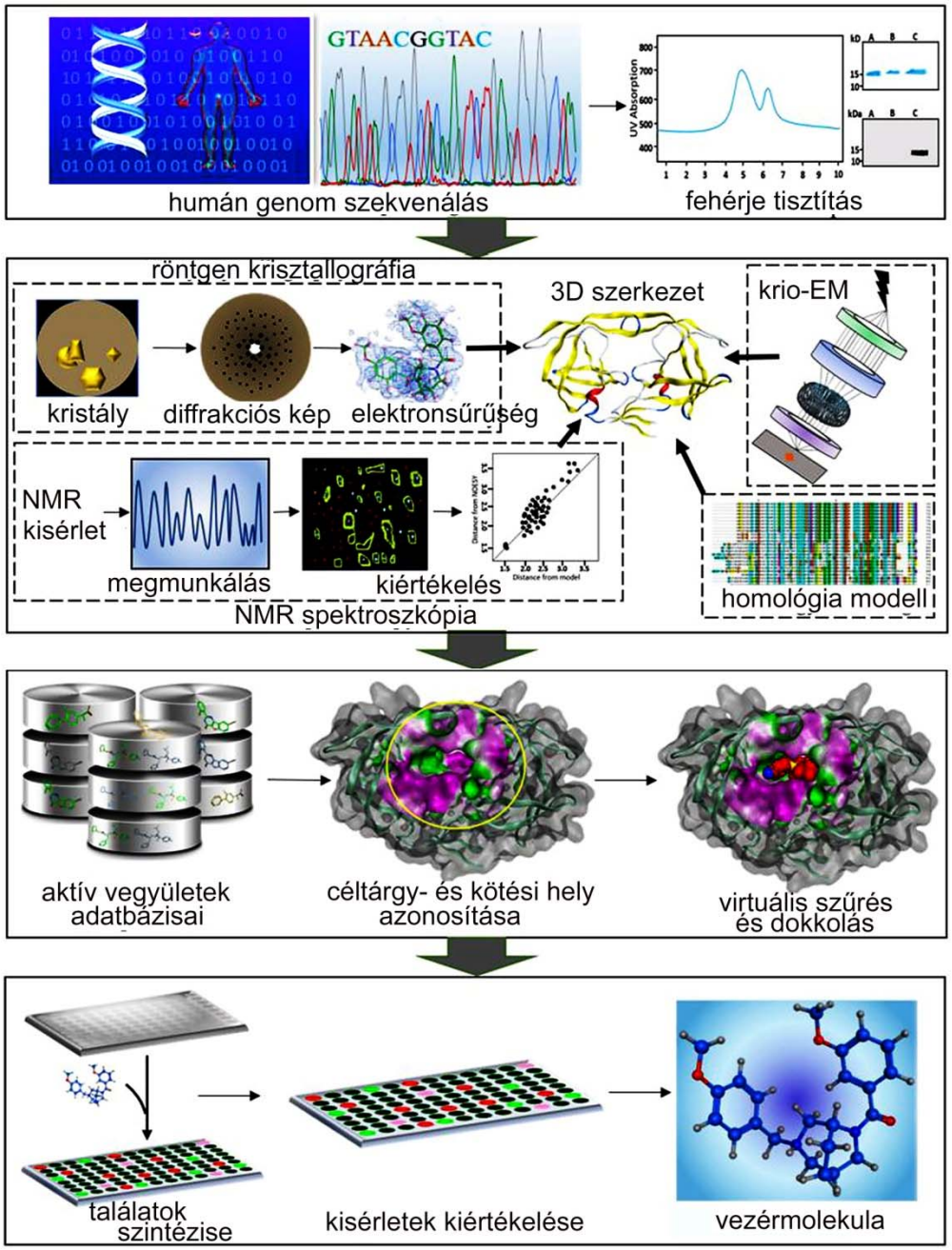
A gyógyszerfejlesztés idő-, költség- és munkaigényes folyamat (KESERŰ 2011). A nehézségek csökkentésében jelentős segítséget nyújthat a krio-elektronmikroszkópia a gyógyszertervezés szakaszában.

Egy-egy gyógyszer kifejlesztése akár 15 évet is igénybe vehet, és a költségek 2020-as becslés szerint a 985 millió és 2,6 milliárd dollár közötti tartományba esnek (WOUTERS 2020, KIRIIRI 2020). A számítógépes gyógyszer-tervezés (computer-aided drug design CADD) beköszöntével a költségek felére csökkenhetnek (OLIVEIRA 2022).

A krio-EM-nek a gyógyszertervezésbe való belépéséhez sok változásnak kellett végbemennie. Először is a klasszikus gyógyszertervezésnek egy paradigmaváltáson kellett keresztül mennie és a fordított (reverse) farmakológián alapuló gyógyszerfejlesztésnek kellett népszerűvé válni. Ez azt jelenti, hogy egy betegség gyógyításához célpontként kitűzött molekula (többnyire fehérje) került a vizsgálat előterébe, szemben a klasszikus, fenotípusra alapozott szűréssel. A klasszikus modellben először a ligandként szóba jövő sok százezer vagy millió molekulát vizsgálnak nagyáteresztő képességű szűréssel (high-throughput screening). Továbbá szükség volt a genetikának oly mértékű fejlődésére, hogy az ígéretes receptor molekula szekvenálását el lehessen végezni. Nem utolsó sorban a krio-EM-nek kellett annyira fejlődnie, hogy a felbontóképessége 4 Å-nél jobb legyen, mert a szerkezetbiológusok csak ekkor voltak képesek a mérési eredményekből jól hasznosítható atommodellt építeni. Ez kb. 2013-2014 körül következett be.

A fordított farmakológiára való áttérést erős anyagi érdekek hajtották. A klasszikus nagyáteresztő képességű szűréshez nagyszámú molekulából álló könyvtárat kellett vásárolni, amelynek szűrése időigényes, még akkor is, ha a szűrés automatikus. A klasszikus szűrés (megfelelő biológiailag aktív anyagnak a megtalálása) hatékonysága kicsi, 0,01% és 2% közzé esik. Nagy a fals pozitívok száma, akár 50%-90%.

A fordított farmakológián alapuló gyógyszerfejlesztés egyben a számítógépek használatán alapuló fejlesztés. Az ígéretes, jól tanulmányozott receptor molekulához a ligandok szűrése már számítógépes virtuális szűréssé vált. A ligandnak kötődnie kell a célmolekulához, enélkül nem lehet belőle gyógyszert fejleszteni. Emellett sok más feltételnek is eleget kell tennie. A receptor molekula tulajdonságainak ismerete vált a fejlesztés kiinduló pontjává. Ez szerkezetvizsgálati módszerek, röntgenkrisztallográfia, mágneses magrezonancia, krio-elektronmikroszkópia segítségével történik.



7.1. ábra. *A szerkezetalapú gyógyszertervezés (SBDD) folyamata (lásd a szöveget)* (BATOOL 2019)

A mai, leginkább előnybe részesített, a szerkezeten alapuló gyógyszertervezés (structure-based drug design SBDD) menetét a 7.1. ábra mutatja (BATOOL 2019, ROBERTSON 2022).

A 7.1. ábra felső panelje szerint a fehérjék szerkezetvizsgálatát megelőzi az ígéretes fehérjék kiválasztása, extrahálása és tisztítása. A konformációs változatok jelenléte a fehérje oldatban megengedett, sőt ezek egyetlen krio-EM SPA vizsgálaton belül azonosíthatók.

A 7.2. ábra felülről második panelje szerint a célfehérje 3D szerkezetét három módon lehet meghatározni: röntgenkrisztallográfiával, NMR-rel és krio-EM-mel. Ha a fenti három szerkezetmeghatározó módszer nem működik, akkor *in silico* módszerekhez, úgy, mint a homológia modellezéshez vagy *ab initio* modellezéshez folyamodnak a 3D szerkezet megjóslásához (SHAKER 2021)

A harmadik panel szerint a ligandok szűrése (SBVS, Structure-Based Virtual Screening) majd a célfehérje kötőzsebébe való dokkolása következik. Ezt követi a találatok (angolul hit) szintetizálása és a mérések kiértékelése. A gyógyszertervezés folyamata a vezérmolekula (angolul lead) megtalálásánál végződik. (A fejlesztés tovább folytatódik.)

Amikor gyógyszerfelfedezésről vagy gyógyszertervezésről beszélünk, akkor kitüntetett szerepet kap a krio-EM (pontosabban a krio-EM SPA), mert

- a nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható membránfehérjék jól vizsgálhatók krio-EM-mel,
- a membránfehérjék képezik a forgalomban lévő gyógyszerek kb. 60%-ának célpontját (OVERINGTON 2006) és az FDA által jóváhagyott gyógyszerek közel 35%-a a G-protein-kapcsolt receptorokat (GPCR) célozzák meg (CASADÓ 2023). A membránfehérjék szerkezetének vizsgálatában a krio-EM előnyösebb, mint a röntgenkrisztallográfia vagy az NMR (lásd a 2.2. ábrát).

Az SBDD-nek az előző 7.1. ábránál egyszerűbb, szemléletes megfogalmazását mutatja a 7.2. ábra:

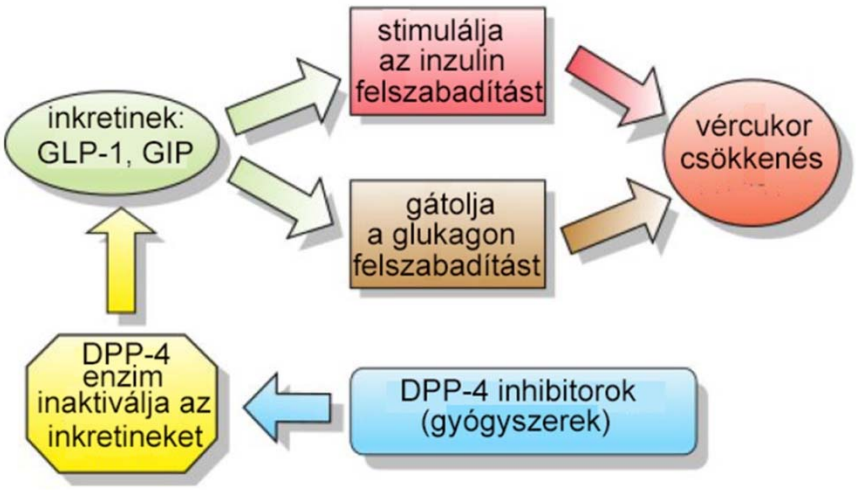


7.2. ábra. *A szerkezeten alapuló gyógyszertervezés menete* (ZHU 2023)

VII.1. GLP-1 receptor agonisták

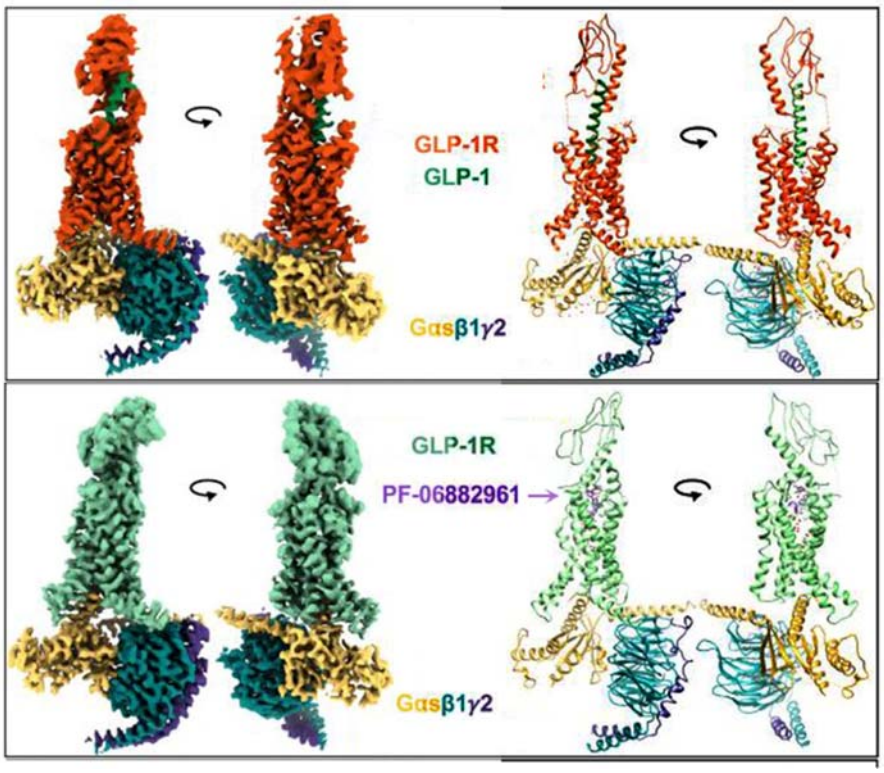
A krio-EM SPA-nak a gyógyszertervezésben betöltött szerepére egy konkrét példán, a 2-típusú diabétesz és az elhízás kezelésére alkalmazott GLP-1 receptor agonisták esetét mutatjuk.

A glukagonszerű peptid-1 receptorok (GLP-1R, glucagon-like peptid-1 receptors) a B osztályú GPCR (G-protein kapcsolt receptorok családjába tartoznak. A GLP-1 (glukagonszerű peptid-1) az inzulin és a glukagon szabályozását végzi a 7.3. ábra szerinti módon: stimulálja az inzulin és gátolja a glukagon felszabadulását, amelyek az vércukorszint csökkenéséhez vezetnek.



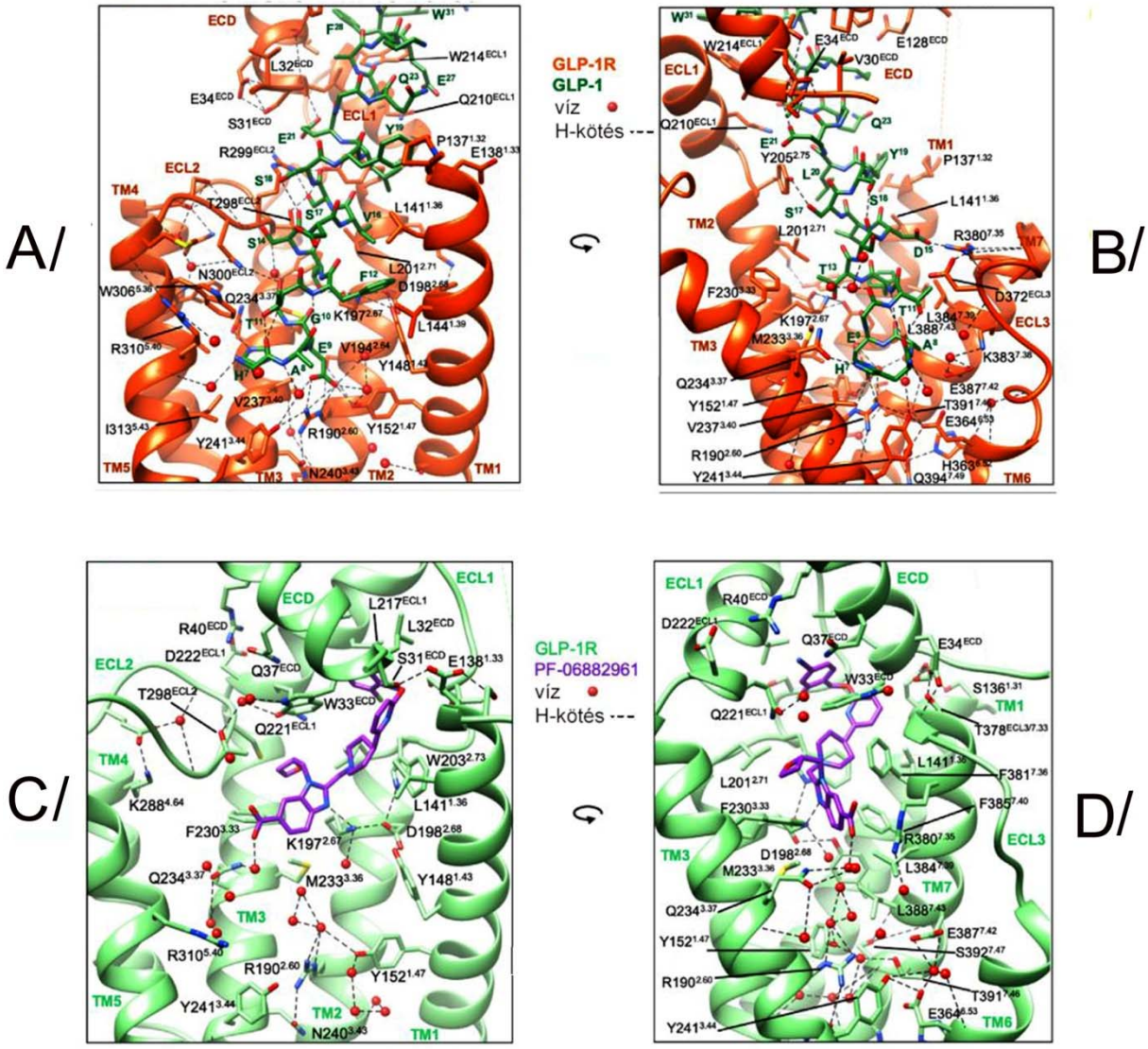
7.3. ábra. *A GLP-1 és a diabétesz (GIP- Glükózdependens Inzulinotrop Polipeptid, DPP-4-Dipeptidil Peptidáz 4)* (WIKIPEDIA, GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1)

A GLP-1 peptid hormonnak a GLP-1 receptorral (GLP-1R) és a stimuláló G_s fehérjével alkotott komplexét már 2017-ben vizsgálta Zhang és munkatársai (ZHANG 2017) krio-EM-mel, de csak közel atomi felbontást (4,1 Å) ért el, ezért a 2020-a munkájukra koncentrálunk (ZHANG 2020), amelyben már a felbontás atomi szintű (2,1 Å). A széleskörű farmakológiai vizsgálatok mellett a közleménynek csak egy részét teszi ki a krio-EM, de mindkettőre szükség volt a cél eléréséhez. Már a közlemény címe (Differential GLP-1 Binding and Activation by Peptide and Non-Peptide Agonist) is mutatja, hogy a cél a peptid és nem-peptid agonisták összehasonlítása volt a GLP-1, GLP-1 receptor és a G-protein kapcsolt komplexben. A nem-peptid agonisták abból a szempontból fontosak, hogy a belőlük készülő gyógyszerek orálisan is szedhetők. Mi, a többféle agonistából csak a Pfizer PF 06882961 agonistáját említjük, amelytől azt várták el, hogy hasonló legyen a natív GLP-1-hez. A többi cég agonistáival való összehasonlításáról eltekintünk, de még az egyszerűsített kép is elég bonyolult marad. Mint a 7.4. ábra mutatja a GLP1-receptor körbeveszi a GLP-1 hormont. A PF-06882961 agonista ugyanazt a kötőhelyet foglalta el az extracelluláris doménben, mint a natív GLP-1.



7.4. ábra. *GLP-1R:G_s komplexek krio-EM szerkezetei: a felső ábrán a GLP-1, az alsó ábrán a nem-peptid PF-06882961 agonista van kötött állapotban. Baloldalon a krio-EM térképek, jobb oldalon a szalagmodelljeik láthatók. A G-protein alegységei különböző színekkel vannak színezve* (ZHANG 2020)

A 7.5. ábrával azt szemléltetjük, hogy a krio-EM nagy felbontása milyen mélységekig képes megvilágítani a szerkezetet.



7.5. ábra. *A GLP-1 és a nem-peptid PF-06882961 agonista kölcsönhatása a GLP-1R receptorral annak kötőüregében. Az A/ és B/ ábra a narancsszínű GLP-1R rezidiumait mutatja, amelyek kölcsönhatásban vannak a zöld pálcikákkal jelölt GLP-1-el, vagy a piros körökkel jelölt vízzel. A C/ és D/ ábrán a GLP-1R receptor zöld színű, a PF-06882961 agonista lila színű. Az A/ és C/ ábrán nincs berajzolva a TM6 és TM7 transzmembrán hélix valamint az ECL3 extracelluláris hurok sem a könnyebb követhetőség miatt. Hasonlóképpen hiányzik a B/ és D/ ábrából a TM4 és TM5 hélix és az ECL2 extracelluláris hurok.*
A szaggatott vonalak hidrogén kötéseket mutatnak, miként azt az UCSF Chimera program meghatározta (ZHANG 2020)

A krio-EM vizsgálatok technikai vonatkozásai

A 3mL térfogatú mintákat UltrAuFoil mikrostélyokon fagyasztották Vitrobot IV automatával (Thermo Fisher Scientific). Titan Krios G3i mikroszkóppal végezték a vizsgálatokat 300 kV

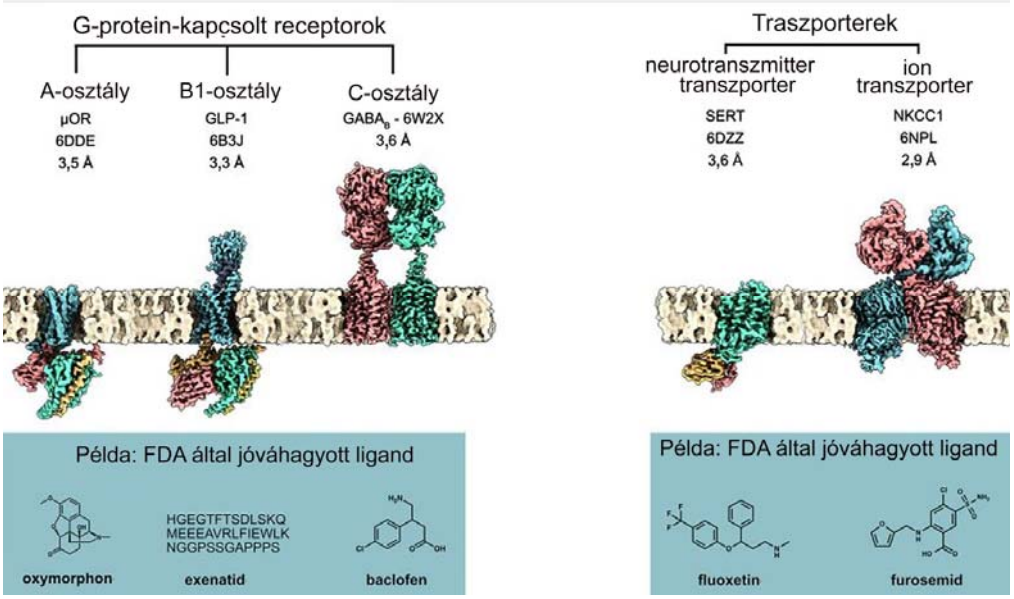
gyorsítófeszültségen, Gatan K3 direkt elektron detektort használva. A detektor előtt egy Gatan BioQuantum energiaszűrő volt elhelyezve.

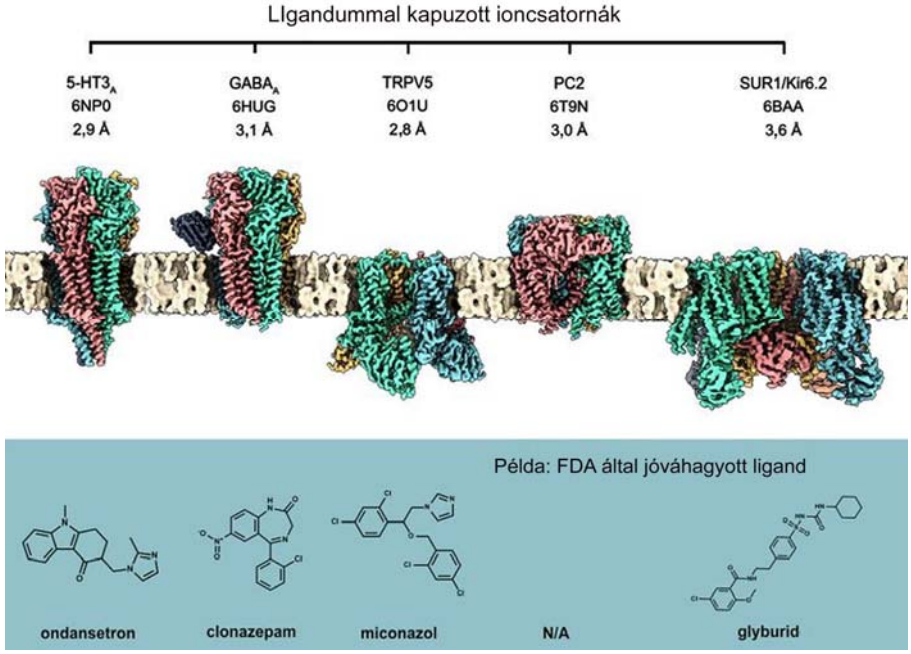
#

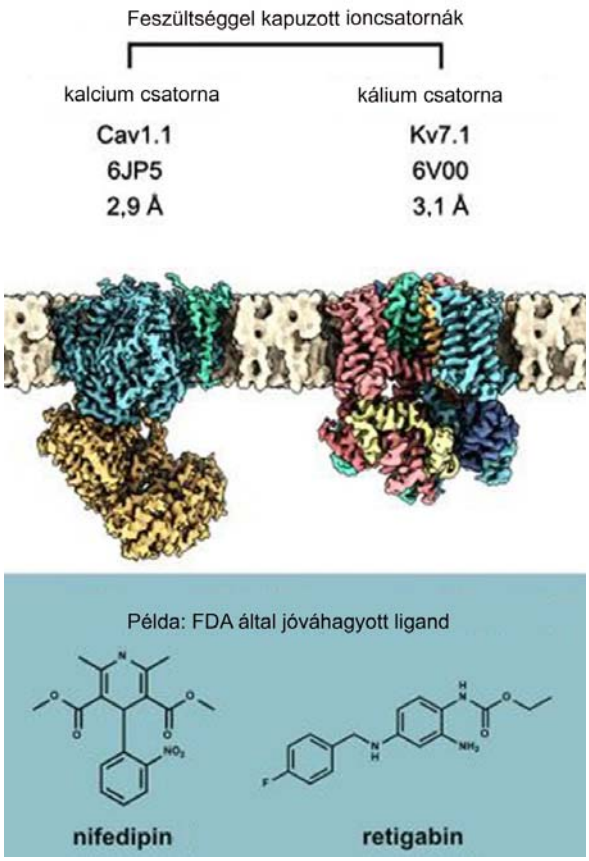
Adatgyűjtés	GLP-1-GLP-1R-Gs	PF-06882961-GLP-1R-Gs
Nagyítás	105 000x	105 000x
Gyorsító feszültség (kV)	300	300
Teljes elektrondózis (e-/Å2)	65,4	60,1
Expozíciós idő (s)	3	3
„Mozi” képkockák száma	75	75
Defókuszálási tartomány (μm)	0,6-1,4	0,5-1,3
Pixel méret (Å)	0,826	0,826
Alkalmazott szimmetria	C1	C1
Leképezett részecskék száma	635785	683444
Felbontás (Å)	2,1	2,5

A GLP-1:GLP-1R:G_s sűrűség térképei az Elektronmikroszkópos Adatbankban EMD-21992 számon, a PF-06882961:GLP-1R:G_s térképei EMD-21994 számon találhatók meg. A GLP-1:GLP-1R:G_s koordinátái PDB: 6X18 számon, a PF-06882961:GLP-1R:Gs koordinátái PDB: 6X1A számon találhatók meg a Fehérje Adatbankban.

A krio-EM-nek a membránfehérjék szerkezetének feltárásában játszott szerepére bemutatunk néhány példát, és néhány az FDA által engedélyezett gyógyszert (7.6. ábra).


G-protein-kapcsolt receptorok
A-osztály
µOR
6DDE
3,5 Å
B1-osztály
GLP-1
6B3J
3,3 Å
C-osztály
GABA$_B$ - 6W2X
3,6 Å
Példa: FDA által jóváhagyott ligand
oxymorphon
HGEGTFTSDLSKQ
MEEEAVRLFIEWLK
NGGPSSGAPPPS
exenatid
baclofen
Traszporterek
neurotranszmitter transzporter
ion transzporter
SERT
6DZZ
3,6 Å
NKCC1
6NPL
2,9 Å
Példa: FDA által jóváhagyott ligand
fluoxetin
furosemid


Ligandummal kapuzott ioncsatornák
5-HT3$_A$
6NP0
2,9 Å
GABA$_A$
6HUG
3,1 Å
TRPV5
6O1U
2,8 Å
PC2
6T9N
3,0 Å
SUR1/Kir6.2
6BAA
3,6 Å
Példa: FDA által jóváhagyott ligand
ondansetron
clonazepam
miconazol
N/A
glyburid



7.6. ábra. *Gyógyszer-célpontként szolgáló membránfehérjék nagyfelbontású krio-EM térképei, amelyek alapul szolgáltak FDA által jóváhagyott gyógyszereknek (A membránfehérje megnevezése alatt annak PDB kódja, azalatt pedig a krio-EM felbontása szerepel.)* (ROBERTSON 2022)

Azért, hogy a krio-EM alkalmazásának körét még szélesebbre tárjuk a Függelékben bemutatjuk azokat az engedélyezett hatóanyagokat, amelyek szerkezetét kizárólag krio-EM segítségével tárták fel, (RUBACH 2025 SUPPLEMENT). Rubach tanulmányának ideéig, azaz 2025-ig, ezeknek a hatóanyagoknak szerkezetét sem röntgenkrisztallográfiával, sem NMR-rel nem határozták meg. A szerző ezzel a megjegyzésével kívánta aláhúzni a krio-EM egyre növekvő szerepét a gyógyszerfelfedezésben.

Irodalom

BATOOL, M. et al. (2019): A structure-based drug discovery paradigm, *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2783.

CASADÓ, V. et al. (2023): What are the current trends in G-protein coupled receptor targeted drug discovery*? Expert Opinion on Drug Discovery* 18,8, 815-820.

KESERŰ, Gy. M. (ed) (2011): *A gyógyszerkutatás kémiája*, 853 old. Akadémiai Kiadó, Budapest, ISBN 978 963 05 9076 1.

KIRIIRI, G. K. et al. (2020): Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 6,1, 27.*

OLIVEIRA, A. M. et al. (2022): Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand-Based Methods to Structure-Based Approaches. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90608-1.00008-3

OVERINGTON, J. P. et al. (2006): How many drug targets are there?, *Nature Reviews, Drug Discovery* 5, 993-996.

ROBERTSON, M.J. et al. (2022): Discovery in the era of cryoEM, *Trends Biochem Sci* 47, 2, 124-135.

RUBACH, P. et al. (2025): Advances in cryo-electron microscopy (cryoEM) for structure-based drug discovery, *Expert Opin Drug Discov*. 20, 2, 163-176.

SHAKER, B. et al. (2021): *In silico* methods and tools for drug discovery, *Computers in Biology and Medicine* 137, 104851

WOUTERS, O.J. et al. (2020): Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018, *JAMA* 323, 9, 844-853.

ZHANG, Y. et al. (2017): Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with G protein, *Nature* 546, 7657, 248-253.

ZHANG, X. et al. (2020): Differential GLP-1R binding and activation by peptide and non-peptide agonists, *Molecular Cell* 80, 485-500.

ZHU, K-F. et al. (2023): Application and prospects of cryo-EM in drug discovery, *Military Medical Research* 10:10, https://doi.org/10.1186/s40779-023-00446-y

VIII. Függelék

Krio-EM-mel szerkezetileg először jellemzett és engedélyezett gyógyszer hatóanyagok (RUBACH 2025)

DrugBank azonosító	Név	PDB Ligand azonosító	Krio-EM PDB azonosító
DB11732	Lasmiditan	05X	7exd
DB08874	Fidaxomicin	FI8	6bzo, 6c06, 7l7b, 6fbv
DB14219	Monomethyl fumarate	UR9	8jhn
DB00206	Reserpine	YHR	8wll, 8tgk, 8tgn, 8jtc, 8tgg, 8tgh, 8tgi, 8tgj, 8tgl, 8tgm, 8ucm, 8t6a
DB00555	Lamotrigine	IYJ	8thh
DB00824	Enprofylline	A1BD3	9e1d
DB11712	Tezacaftor	CV6	7sv7, 8eiq
DB00413	Pramipexole	G6L	7cmu
DB00343	Diltiazem	C9F	6jpb, 8sc2
DB00967	Desloratadine	Y5R	8x64
DB00714	Apomorphine	OR9	7jvq
DB12713	Sotagliflozin	LFL	8hg7
DB00633	Dexmedetomidine	CZX	6k41, 6k42, 9cbm, 7eja
DB06701	Dexmethylphenidate	A1D5U	8y2g
DB05271	Rotigotine	R5F	8iru, 8irr, 8irv, 8irs, 8irt
DB09280	Lumacaftor	VX8	7svr, 8eio, 7svd
DB01202	Levetiracetam	UKX	8jli, 8js8, 8jlc, 8jlh
DB00484	Brimonidine	J59	7ej8
DB08931	Riociguat	GZO	7d9r, 8hbf
DB00261	Anagrelide	J33	7eg0
DB01147	Cloxacillin	CXN	9biu, 9bit
DB04953	Ezogabine	FBX	7bym, 7cr2, 7cr7
DB12005	Nirogacestat	O6U	8kct
DB01039	Fenofibrate	J3O	8k8j

DB00645	Dyclonine	N8R	7ugg
DB11799	Bictegravir	KLQ	7ouh, 6puw, 6rwm, 6rwo
DB06403	Ambrisentan	A1D5J	8xvk
DB06287	Temsirolimus	A4I	7sq9
DB09068	Vortioxetine	VTX	8blb, 8bla, 8aw2
DB15444	Elexacaftor	WJX	8eio, 8eig, 8eiq
DB06803	Niclosamide	VUT	8sur
DB12789	Dinoprost	UGU	8iuk, 8xjl
DB08820	Ivacaftor	VX7	8eiq, 6o2p, 7otg
DB00825	Levomenthol	XUQ	8uxy
DB06274	Alvimopan	NG0	7ul4
DB01012	Cinacalcet	YP4	8wpg, 8szg, 8szf, 7m3f, 8szh, 8wpu
DB08907	Canagliflozin	L3R	8hdh
DB09083	Ivabradine	VNZ	8ofi
DB06218	Lacosamide	LQO	8s9b
DB01002	Levobupivacaine	OJ0	8i5b
DB08934	Sofosbuvir	WG6	8fhs, 8e5b
DB08932	Macitentan	A1D5I	8xvj
DB00437	Allopurinol	A1BD4	9e1f
DB04871	Lorcaserin	T4U	8dpi, 8dph, 8dpf
DB11560	Lesinurad	A1AIL	9jdz, 9b1h
DB00374	Treprostinil	Y9J	8x7a
DB06684	Vilazodone	YG7	7lwd, 8fyl
DB00969	Alosetron	S7Y	6w1j
DB00246	Ziprasidone	XEF	8wty
DB06716	Fospropofol	A1LZU	8yrg
DB06704	Iobenguane	YMN	8xb3
DB11823	Esketamine	JC9	7sac, 7eu8, 7eu7
DB00935	Oxymetazoline	J5C	7ym8, 7ejk
DB12612	Ozanimod	JEU	7ew0
DB01115	Nifedipine	C5U	6jp5
DB00541	Vincristine	R1Q	7a69

DB00904	Ondansetron	S87	6w1m
DB08893	Mirabegron	H6U	7dh5
DB11176	Zeaxanthin	5X6	8wey, 8xls
DB00363	Clozapine	VBU	8jxv
DB00490	Buspirone	YLX	8fyx
DB00289	Atomoxetine	A1LX4	8y92, 8z1l, 8zp2
DB14569	Tedizolid	U7V	6wrs
DB01032	Probenecid	RTO	8sdz, 8rq4, 8bvt
DB05541	Brivaracetam	VLX	8k77, 8yf1
DB06292	Dapagliflozin	LE6	8hez
DB00912	Repaglinide	BJX	7u1s, 7y1n, 7y1k, 7y1j, 7tys, 6jb1, 6pz9, 7y1m, 7u1q, 6jb3, 7tyt, 7y1l
DB00706	Tamsulosin	JGX	7ymj
DB00906	Tiagabine	TGI	7sk2, 8wm3, 7y7z
DB00377	Palonosetron	O7B	6w1y, 6y1z
DB12371	Siponimod	J8C	7td4, 7evy, 7eo4, 7ew1
DB01174	Phenobarbital	UQA	6x3w
DB00425	Zolpidem	R5R	8dd2, 8g5g, 8g4n, 8g5h
DB11859	Brexanolone	Y4B	8g5g, 8g4n, 8g4x, 8g5h, 8g5f, 8foi, 8si9
DB00292	Etomidate	V8D	6x3v, 8f6y, 8pvb
DB01140	Cefadroxil	A1APP	9bir
DB06809	Plerixafor	VH6	8u4p
DB06794	Lodoxamide	WYB	8h8j
DB06691	Mepyramine	Y5E	8x63
DB00345	Aminohippuric acid	ZWD	8sdy
DB00887	Bumetanide	82U	7s1y, 7s1x, 7smp
DB09080	Olodaterol	DZQ	8jjl
DB14881	Oliceridine	WH2	8efb
DB01183	Naloxone	A1APV	9bjk
DB00568	Cinnarizine	N90	7uhf

Néhány rövidítés angol és magyar jelentése

AD, Alzheimer's disease, Alzheimer–kór

Aβ40, 40-es rezidiumnál végződő amiloid-β peptid

Aβ42, 42-es rezidiumnál végződő amiloid-β peptid

CADD, computer-aided drug design, számítógépes gyógyszertervezés

CaSR, Calcium Sensing Receptors, kalciumérzékelő receptor

CCD, Charge-Coupled Device, töltéscsatolt eszköz

CFEG, cold field emission gun, hidegkatódos téremissziós ágyú

CHS, cholesteryl hemisuccinate

CMOS, Complementary Metal Oxid Semiconductor, komplementer fém-oxid-félvezető

CRD, cystein rich domain, cisztreinben gazdag domén

CTF, Contrast Transfer Function, kontraszt átviteli függvény

DDM, N-dodecil β-D-maltozid

DED, Direct Electron Detector, direkt elektron detektor

DQE. detective quantum efficiency, detektálási kvantum hatásfok

ECD, extracelluláris domén

ECL extracellular loop, extracelllurális hurok

E-CFEG, low-energy-spread cold field emission gun, kis energiaszélességű hideg, téremissziós ágyú

EER, Electron Event Representation, eseményalapú adat-kiolvasáshoz tartozó tömörített fájl-formátum

ELD, extracellular/luminal domén

ELL, extracelluláris hurok, extracellular loop

EMDB, Electron Microscopy Data Bank, elektronmikroszkópos adatbank

EPU, a Thermo Fisher Scientific krio-EM automatizáló szoftvere az egyedi részecskék analízisére

FDA, US Food and Drug Administration, Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala

FSC, Fourier Shell Correlation, Fourier-héj korreláció

GDN gliko-diozgenin

GDP, guanozin-difoszfát

GLP-1R, glucagon-like peptid-1 receptors, glukagonszerű peptid-1 receptorok

GPCR, G-protein coupled receptor, G-protein-kapcsolt receptor

GRK, G-protein-kapcsolt kináz

GTP, guanozin-trifoszfát

HPAD, Hybrid Pixel Array Detector, a hibrid pixeles mátrix detektor

ICL, intracelluláris hurok

JEOL, Japanese Electron Optical Laboratory

krio-EM, krio-elektronmikroszkópia, krio-elektronmikroszkóp

LB, lobe, lebeny

LMNG. lauryl meopenthyl glycol, lauril maltoz neopentil glikol

MALS multi-angle light scattering, szögben mért fényszórás

MAPS, Monolitic Active Pixel Sensor, monolitikus aktív pixeles érzékelő

MNG, maltozid-neopentil glikol

MP, mass photometry, fotometriás tömegmérés

MSP, membrane scaffold protein, membrán vázprotein

NAM, negatív alloszterikus modulátor

NTFs. neurofibrillary tangles, neurofibrilláris gubancok

PAM, pozitív alloszterikus modulátor

PDB, Protein Data Bank, protein adatbankban

PE, foszfatidiletanolamin

PHF, paired helical filament, páros helikális filament

SBDD, structure-based drug design, szerkezeten alapuló gyógyszertervezés

SBVS, structure-based virtual screening, szerkezeten alapuló virtuális szűrés

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacryamide gel electrophoresis, gél elektroforézis

SEC, size-exclusion chromatography, méretkizárásos kromatográfia

SEC-MALS, a SEC és MALS kombinációja

SF, straight filament, egyenes helikális filament

SMA, styrene maleic acid, sztirol-maleinsav

SMALP, styrene – maleic acid lipid particles, sztirol-maleinsav lipid részecskék

SPA, Single Particle Analysis, egyedi részecskék analízise

TFS, Thermo Fisher Scientific vállalat

TM, transzmembrán hélix

TMD, transzmembrán domén

TMEM, transzmembrán fehérje

X-FEG, extrém fényességű téremissziós ágyu

X-FEG, standard Shottky field emission gun, standard Shottky téremissziós ágyú