

Towards more dose efficient cryogenic electron microscopy of biological samples

Citation for published version (APA):

Zhang, Y. (2023). *Towards more dose efficient cryogenic electron microscopy of biological samples*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230605yz>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20230605yz](https://doi.org/10.26481/dis.20230605yz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

7.3 SUMMARY

The five studies presented in this thesis all aim to contribute towards to more dose-efficient imaging and diffraction techniques in cryo-EM such that the SPA limits could be pushed towards smaller or more heterogeneous samples.

For any cryo-EM development, it is crucial to have a suitable workhorse protein. In **Chapter 2**, we introduced *Mycobacterium tuberculosis* ferritin as an excellent model protein due to its good stability and straightforward purification protocol. The protein's octahedral symmetry, good solubility, and appropriate size (~490 kDa) make it possible to determine its structure with just a few micrographs, enabling rapid characterisation of, for example, new microscopes, detectors, or grid preparation techniques. Also, better understanding of mycobacterial proteins in general could help, ultimately, in fighting tuberculosis which still awaits the development of a better vaccine.

Cryo-EM is advancing in the direction of solving smaller proteins, given that 50% of animal and plant proteins have a size of less than 50 kDa, and many of these proteins are relevant drug targets. Recent progress in cryo-EM has resulted in the successful reconstruction of a haemoglobin heterodimer at 32 kDa, surpassing the previously estimated theoretical limitation (38 kDa). What could be the ultimate capabilities of cryo-EM in this field? In **chapter 3**, we simulated single particle data sets using realistic parameters for ice layer, dose, detector performance, and beam characteristics for samples that were ideal in terms of homogeneity, distribution, and stability. Our simulations indicate that, with an ideal phase plate, a protein as small as hen egg white lysozyme (14kDa) could be resolved by cryo-EM.

In **chapter 4**, we discuss the effects of charging and its potential impact on SNR and the ability to achieve high-resolution reconstructions. Charging not only causes image distortions but also motion of the sample due to build-up of electrostatic forces. By deploying a layer of graphene on regular EM grids, we could mitigate charging. These observations were made both in diffraction and imaging mode. Use of graphene could further improve the throughput of routine data collection by inclusion of the middle of the hole. This approach could also reduce beam-induced motions of the sample, thereby further improve the image quality. Mitigating charging might prove to be crucial for STEM based techniques, such as ptychography and iDPC.

In **chapter 5**, a detector with high time resolution and dynamic range, the Timepix3, was integrated in an automated cryo-EM workflow. The Timepix3 setup has been built in Maastricht together with Amsterdam Scientific Instruments. We characterised the Timepix3 in terms of MTF, NNPS, DQE at 200 keV. Using this event-driven HPD in electron counting mode with high hit rates and CNN-based event localisation, high-quality SPA reconstructions of BfrB (chapter 2) at 3 Å have been obtained.

We discuss various techniques that potentially have higher dose efficiency in **chapter 6**. Laser phase plate could become a nearly ideal phase plate for TEM as it is matter free and gives tuneable phase shifts. Such a phase plate could be helpful to further push the size limit of cryo-EM. MPTEM gives possibilities to boost the SNR by having the same electron passing through the specimen multiple times. However, this technique is still far from routine for a multitude of reasons. Primarily, it is the lack of high-voltage electron mirrors. Dose efficient phase retrieval of the exit wave can be achieved through holography, ptychography, and iDPC (not discussed in **chapter 6**), which offer significant advantages. Both ptychography and iDPC are STEM techniques which involves using a small convergent beam scanning through the specimen. The studies in **chapter 4** and **chapter 5** addressed critical challenges when applying these techniques to biological specimens. For instance, charging can limit the achievable resolution, and a high-speed detector capable of operating in diffraction mode is required. The use of a sorter in EM is an entirely novel approach of discriminating particles based on the orbital angular momentum of the exit-wave in a highly dose-efficient manner.

Combined, these approaches could help to expand the limits of cryo-EM in structural biology, thereby enabling the visualisation of a larger range of macromolecular structures, at higher resolutions, in more conformational states. Over the last decade, cryo-EM has revolutionised the field of structural biology, providing insights into the structure-function relationships of many biomolecules which previously failed to be revealed by other techniques. In the decade to come, cryo-EM has the potential to revolutionise structural biology yet again. We hope that our research will contribute a small but valuable contribution towards this goal.

7.4 SAMENVATTING

De vijf in dit proefschrift beschreven studies hebben als doel om een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van efficiëntere beeldvormings- en diffractietechnieken in cryo-EM. Hierdoor wordt het in toekomst mogelijk om kleinere eiwitten en meer heterogene complexen van eiwitten structureel te karakteriseren en begrijpen.

Voor de ontwikkeling van cryo-EM is het belangrijk om een geschikt model eiwit te hebben. In **hoofdstuk 2** hebben wij het eiwit ferritine van *Mycobacterium tuberculosis* geïntroduceerd als model eiwit. We laten zien dat dit eiwit eenvoudig te produceren en te purificeren is. Bovendien is het eiwit stabiel, goed te bewaren en kan het prachtige cryo-EM afbeeldingen geven. De octahedrale symmetrie van het eiwit, de goede oplosbaarheid en de geschikte grootte (~490 kDa) maken het mogelijk de structuur te bepalen met slechts enkele opnames, waardoor een snelle karakterisering van bijvoorbeeld nieuwe microscopen, detectoren of technieken voor preparaatvoorbereiding mogelijk wordt. Daarnaast zou een beter begrip van mycobacteriële eiwitten uiteindelijk kunnen helpen bij het ontwikkelen van nieuwe vaccins, die nog steeds hoognodig zijn voor de bestrijding van tuberculose.

Cryo-EM ontwikkelt zich in de richting van het oplossen van steeds kleinere eiwitten. Maar liefst de helft van alle dierlijke en plantaardige eiwitten zijn kleiner dan 50 kDa. Veel van deze eiwitten zijn relevant om medicijnen mee te maken. Recente ontwikkelingen in de cryo-EM hebben ertoe geleid dat de structuur van een heterodimeer van hemoglobine van 32 kDa succesvol bepaald kon worden. Dit is kleiner dan de eerder geschatte theoretische limiet (38 kDa). De vraag is hoe ver cryo-EM uiteindelijk kan komen in het bepalen van steeds kleinere structuren. In **hoofdstuk 3** hebben wij datasets met afzonderlijke deeltjes gesimuleerd met behulp van realistische parameters voor de eigenschappen van de ijslaag, de detector en de elektronenbundel voor preparaten die ideaal waren wat betreft homogeniteit, distributie en stabiliteit. Onze simulaties geven aan dat met een ideale faseplaat, de structuur van een eiwit zo klein als lysozyme (uit een kippenei geïsoleerd) (14kDa) kan worden bepaald met cryo-EM.

In **hoofdstuk 4** bespreken we een fundamenteel effect in cryo-EM: het elektrostatich opladen van de preparaten en het effect daarvan op de beeldvorming en de signaal-ruisverhouding van de data. Elektrostatich opladen veroorzaakt niet alleen beeldvervalsingen, maar kan ook het preparaat daadwerkelijk laten bewegen door het samenspel van de elektrostatiche krachten. We laten in dit hoofdstuk zien dat de effecten van het opladen teniet gedaan kunnen worden door een laag grafeen aan te brengen op het EM-grid. Deze waarnemingen zijn zowel in de diffractie- als in de beeldvormingsmodus gedaan. Het gebruik van grafeen maakt het mogelijk om meer data te verkrijgen van een preparaat vergeleken met de meest gebruikte technieken. We laten zien dat het nu ook mogelijk is om met een kleine elektronenbundel data op te nemen wanneer deze gericht wordt op het midden van een gat in de folie op een EM-grid. Deze aanpak zou ook de bewegingen van het preparaat kunnen verminderen, wat de beeldkwaliteit verder zou

verbeteren. Onze ontdekking zou bovendien van belang kunnen zijn voor STEM technieken, zoals ptychografie en iDPC.

In **hoofdstuk 5** hebben we een detector met een extreem hoge tijdsresolutie en dynamisch bereik, de Timepix3, geïntegreerd in een geautomatiseerde cryo-EM workflow. Deze opstelling is in samenwerking met Amsterdam Scientific Instruments in Maastricht gebouwd. We hebben de Timepix3 gekarakteriseerd in termen van MTF, NNPS, DQE bij 200 keV. Met deze gebeurtenis-gedreven HPD in elektronen-telmodus en CNN-gebaseerde gebeurtenislokalisatie konden hoogwaardige SPA-reconstructies van BfrB (**hoofdstuk 2**) van 3 Å worden verkregen.

In **hoofdstuk 6** bespreken we verschillende technieken die mogelijk een hogere dosisefficiëntie hebben. Een laserfaseplaat zou een bijna ideale faseplaat voor TEM kunnen zijn, omdat deze vrij is van materie en een afstembare faseverschuiving geeft. Een dergelijke faseplaat zou nuttig kunnen zijn om de grenzen van de cryo-EM verder te verleggen. MPTEM maakt het mogelijk om de signaal-ruisverhouding te verhogen door hetzelfde elektron meerdere malen door het preparaat te laten gaan. Om tal van redenen is deze techniek echter nog verre van gebruikelijk. Een van de belangrijkste redenen is het ontbreken van een spiegel voor hoogspanningselektronen. Het bepalen van de fase van de uitgangsgolf kan ook bereikt worden door holografie, ptychografie en iDPC (niet besproken in **hoofdstuk 6**). Deze technieken zouden daardoor dosis-efficiënter kunnen zijn. Zowel ptychografie als iDPC zijn STEM-technieken waarbij een kleine convergente bundel punt-voor-punt het preparaat scant. De studies in **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5** behandelen de belangrijke uitdagingen bij de toepassing van deze technieken op biologische preparaten. Zo kan het statisch opladen de maximaal haalbare resolutie beperken, en is een snelle detector nodig die in diffractiemodus kan werken.

Gecombineerd zouden bovengenoemde technieken kunnen helpen om de grenzen van cryo-EM in de structuurbiologie te verleggen. Hierdoor kan een groter scala van macromoleculaire structuren, bij hogere resoluties en in meer conformatietoestanden worden gevisualiseerd. In de afgelopen tien jaar heeft cryo-EM een revolutie teweeggebracht op het gebied van de structuurbiologie, door inzichten te verschaffen in de structuur-functie relatie van biomoleculen die voorheen niet met andere technieken konden worden bepaald. Cryo-EM heeft de potentie om in het komende decennium de structuurbiologie opnieuw in een stroomversnelling te brengen. Wij hopen dat ons onderzoek een waardevolle bijdrage aan dit doel levert.