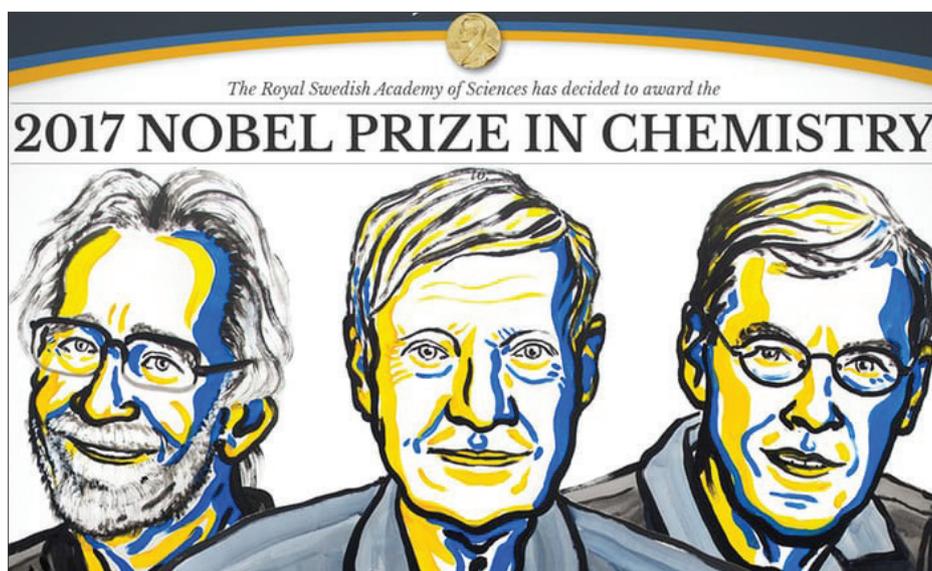


PAOLO SWUEC^A, NADIA SANTO^B, MARTINO BOLOGNESI^A^ADIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE E CENTRO PER LA RICERCA PEDIATRICA
"ROMEO ED ENRICA INVERNIZZI", UNIVERSITÀ DI MILANO^BUNITECH NOLIMITS, PIATTAFORME TECNOLOGICHE DI ATENEO, UNIVERSITÀ DI MILANO
MARTINO.BOLOGNESI@UNIMI.IT

CRIO-MICROSCOPIA ELETTRONICA DI BIO-MACROMOLECOLE. IL NOBEL PER LA CHIMICA 2017

Il Premio Nobel per la Chimica 2017 riconosce la spettacolare e recente evoluzione della crio-microscopia elettronica. La messa a punto di tecniche sperimentali, algoritmi di calcolo e la disponibilità di nuovi detectors ad alta sensibilità consente lo studio della struttura tridimensionale di macromolecole biologiche con risoluzione quasi atomica. Bersagli significativi sono le proteine di membrana, complessi tra proteine o proteine/acidi nucleici e particelle subcellulari, quali il ribosoma.



Microscopia elettronica di macromolecole biologiche

Considerato che la comprensione a livello molecolare di ogni processo biologico implica capire come atomi diversi interagiscano tra loro in uno specifico intorno macromolecolare, o come si formino/rompano legami covalenti, lo studio delle proteine, degli

acidi nucleici e di altre (macro) molecole biologiche a risoluzione atomica costituisce lo scopo fondamentale della *Biologia Strutturale*. Metodi sviluppati a questo fine nel corso degli ultimi decenni, e riconosciuti da numerosi premi Nobel, includono la cristallografia a raggi X e la risonanza magnetica nucleare (NMR). Tali metodi, che negli anni hanno mietuto evidenti successi sia come diffusione sia come significatività dei risultati conseguiti (si veda ad esempio il data-base Protein Data Bank: www.rcsb.org/pdb),

si basano su principi fisici e particolarità operative diverse. Da un lato, l'approccio cristallografico, che richiede l'uso di cristalli (non sempre facilmente ottenibili per alcune classi di macromolecole biologiche, o per loro complessi), può portare a risoluzioni molto alte (<1,5 Å), in grado di distinguere con precisione gli atomi nel sito attivo di un





enzima. Dall'altro, l'NMR, che opera in soluzione, è particolarmente informativo sulla dinamica delle macromolecole, ma è spesso limitato a sistemi con massa molecolare inferiore a 50 kDa.

Oggetti molto piccoli possono essere studiati con un microscopio ottico, ma, come noto, la risoluzione dei dettagli cade in difetto quando il campione da analizzare è di dimensioni inferiori a quelle della lunghezza d'onda della luce visibile.

Il fisico francese Louis-Victor de Broglie (1892-1987) formulò l'ipotesi che particelle cariche in movimento potessero comportarsi come fasci di luce, ed essere quindi dotate di proprietà ondulatorie; infatti, inviando un fascio di elettroni sul campione, è possibile ricavare figure di diffrazione. La scoperta che un fascio di elettroni è assimilabile ad un'onda aprì quindi nuove opportunità di indagine, colte successivamente da Ernst Ruska che scoprì che il campo magnetico generato da un solenoide attraversato da corrente può focalizzare un fascio di elettroni e costruì insieme a Max Knoll il primo prototipo di microscopio elettronico nel 1931. Tale scoperta gli varrà il Nobel per la Fisica nel 1986 [1]. Ruska ed altri ricercatori perfezionarono lo strumento negli anni successivi fino ad arrivare a un modello "commerciale" nel 1939 da parte di Siemens.

Alla luce di quanto sopra descritto, e dei successivi sviluppi tecnologici, la microscopia elettronica introduce quindi una sorta di nuovo paradigma nella Biologia Strutturale. Gli elettroni infatti interagiscono con gli atomi in maniera più efficiente dei raggi X, possono essere focalizzati con lenti elettromagnetiche, presentano lunghezze d'onda molto brevi dal punto di vista ondulatorio ed offrono il vantaggio di esaminare i campioni in soluzione, sotto condizioni native prossime a quelle delle macromolecole *in vivo*. In particolare, considerato che gli elettroni vengono accelerati nel sistema ottico del microscopio (circa al 70% della velocità della luce) con potenziali dell'ordine di 200-300 kV, secondo l'equazione di de Broglie, la lunghezza d'onda della radiazione associata al moto di queste particelle cariche è dell'ordine di qualche centesimo di Å, in linea di principio più che adatta a risolvere atomi di carbonio legati covalentemente in una proteina o in una molecola di DNA (Fig. 1).

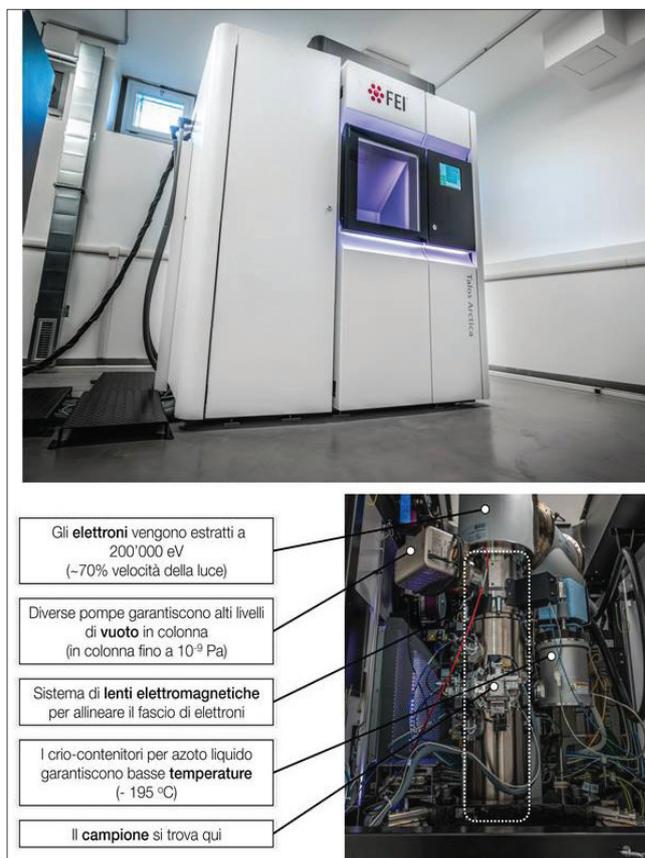


Fig. 1 - Immagine di un moderno crio-microscopio elettronico, il ThermoFisher Scientific™ Talos™ Arctica S/TEM (200 kV FEG) in dotazione all'Università degli Studi di Milano e parte del Centro per la Ricerca Pediatrica "Romeo ed Enrica Invernizzi". Nel pannello inferiore, interno del microscopio elettronico con caratteristiche associate al suo funzionamento

Nonostante queste interessanti proprietà, l'applicazione della microscopia elettronica a campioni biologici non è del tutto scontata, come osservato fin dal 1933 da Ladislaus Marton [2], il quale contestava l'applicabilità del "super-microscopio" allo studio di materiale biologico principalmente per due motivi. L'energia degli elettroni depositata sul materiale organico durante l'interazione (definita da Marton come un fenomeno di "bombardamento elettronico") avrebbe causato la distruzione dello stesso campione. Inoltre, per permettere la corretta emissione del fascio elettronico, la camera interna del microscopio deve essere mantenuta ad elevati livelli di vuoto ($<10^{-7}$ Pa), da cui la difficoltà di preservare durante la misura le molecole d'acqua intrinsecamente associate al campione biologico.

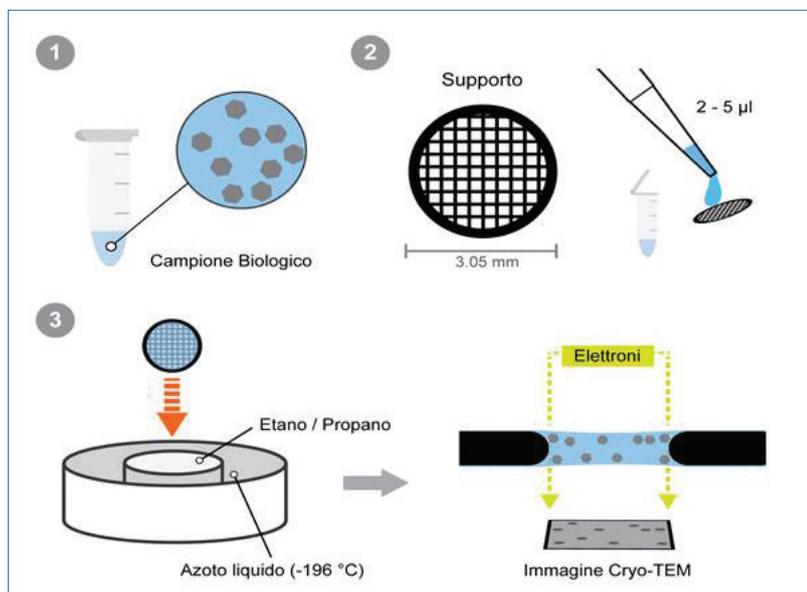


Fig. 2 - Rappresentazione del processo di vitrificazione del campione biologico:
 1) la soluzione contenente il campione biologico opportunamente purificato;
 2) pochi microlitri della soluzione contenente il campione vengono applicati al supporto metallico (*grid*); 3) il supporto viene rapidamente immerso nel liquido criogenico, tipicamente etano liquido tenuto in temperatura da azoto liquido contenuto nella camera circostante, in modo da ottenere uno strato vitreo in cui le singole macro-molecole sono sospese

Diverse furono le soluzioni esplorate al fine di superare queste criticità. Dal 1940 in poi, si sviluppò una modalità di preparazione del campione che consentiva di ottenere immagini ad alto contrasto conferendo al campione biologico una maggiore resistenza al danno da radiazione elettronica. Questa tecnica, tutt'ora in uso, ed altrimenti nota come *negative staining EM*, consiste nell'applicare al campione una soluzione di sali di metalli pesanti (tipicamente acetato di uranile) che agisce da agente di contrasto, e fissaggio [3-5]. Nel 1968, lo sviluppo di questa tecnica permise a David DeRosier e Aaron Klug di risolvere la prima struttura 3-D di un complesso multiproteico, la coda del fago T4 [6]. Sebbene le immagini prodotte tramite *negative staining EM* presentino un elevato contrasto, l'informazione strutturale estraibile dipende grosso modo da deposizione e granulosità dell'agente di contrasto. Superare il limite risolutivo imposto dall'utilizzo di soluzioni contenenti metalli pesanti implicava disporre di un campione nel suo stato idratato nativo, ovvero non fissato, e comunque richiedeva la protezione dello stesso campione dal danno da radiazione. Da questa esigenza nacque l'idea di congelare il campione biologico nel suo stesso tampone, in modo da minimizzare l'evapora-

zione delle molecole d'acqua e attenuare i danni della radiazione elettronica. A partire dal 1950 si sviluppò la *cryo-electron microscopy* (Cryo-EM), metodo secondo cui il campione biologico in soluzione è rapidamente congelato per immersione in opportuno agente criogenico, un processo definito come "vitrificazione" [7-9]. Si ottenne così un sostanziale progresso nella qualità dell'informazione proveniente dal campione, informazione che non dipendeva più (e indirettamente) dall'agente di contrasto, ma derivava direttamente dalla differenza tra le proprietà della macromolecola in studio e quelle del suo intorno nei confronti degli elettroni incidenti.

Il 1990 vide un passo cruciale per la Cryo-EM: Richard Henderson dimostrò la possibilità di ottenere la struttura 3-D di una macromolecola biologica, in assenza di agenti di contrasto e a temperature criogeniche. Per ottenere la struttura 3-D della proteina batteriorodopsina ad una risoluzione di 7 Å, Henderson intuì che raccogliendo migliaia di immagini singole della proteina stessa (intesa come "*single particle*") e sommandole secondo la loro orientazione si poteva aumentare il rapporto segnale/rumore, ottimizzando l'informazione ricercata [10]. Negli anni a seguire diverse furono le strutture con risoluzioni dell'ordine di 1 nm ottenute per campioni biologici preparati per vitrificazione a temperature criogeniche [11-14]. Al 2010, la Cryo-EM si affermava quindi come parte integrata del processo di caratterizzazione morfologica, strutturale e funzionale di composti biologici, materiali organici e nano-particolati.

La "Single Particle Cryo-Electron Microscopy"

L'esperienza internazionale maturata tra il 1990 e il 2010, tuttavia, non risolveva interamente il problema del danno alle molecole di campione indotto dalla radiazione elettronica. Di fatto, si stima che per ogni elettrone che concorre alla formazione dell'immagine nel microscopio, altri tre dissiperanno la loro energia sotto forma di diversi eventi, portando alla rottura di legami e alla frammentazione irreversibile della struttura molecolare in esame. Per arrivare alla



“single particle cryo-EM”, che ha valso il Premio Nobel per la Chimica 2017, sono stati necessari progressi sia nelle tecniche di crio-congelamento che nello sviluppo di detector particolarmente sensibili (quest’ultima una conquista degli ultimi 5 anni).

Crio-congelamento

L’intero processo sperimentale della crio-microscopia elettronica dipende dall’abilità di congelare la soluzione tampone acquosa così rapidamente da assicurare che l’acqua solidifichi in forma amorfa (Fig. 2). Ancora oggi, il metodo si basa su quanto sviluppato da Dubochet e colleghi, ossia nella rapida immersione del campione biologico in un liquido criogeno, a temperature prossime a quelle di ebollizione dell’azoto liquido (-196 °C). Tra i criogeni più utilizzati vi è l’etano liquido per via del suo punto di fusione (-183 °C) appena superiore a quello di ebollizione dell’azoto liquido e per la sua capacità termica (68,5 J/mol·K) simile a quella dell’acqua (74,5 J/mol·K). Generalmente, il processo di vitrificazione di un campione biologico ai fini dell’analisi Cryo-EM ha inizio con la scelta del supporto, detto *grid* (per la sua struttura finemente reticolata), consistente in un disco metallico (rame, oro, nichel, molibdeno, tra i più adoperati) del diametro di 3,05 mm coperto da un sottile strato di carbonio amorfo, o meno comunemente da grafene, oro o altri materiali (SiN, SiC, SiO₂ o lega TiSi). Al supporto vengono applicati 2-5 microlitri della soluzione contenente il campione biologico da analizzare a concentrazioni 0,05-5 micromolare (Fig. 2). Una volta applicato il campione al supporto, si rimuove il volume in eccesso con carta da filtro e si immerge rapidamente la grid nel liquido criogenico. Onde evitare la nucleazione delle molecole d’acqua in cristalli di ghiaccio è necessario che la temperatura scenda molto rapidamente (10⁵-10⁶ K/s). Le successive fasi di trasferimento del campione, caricamento nel microscopio e acquisizione delle immagini delle macro-molecole sospese nel sottile strato di ghiaccio vitreo avvengono tutte a temperature criogeniche (azoto liquido; Fig. 2).

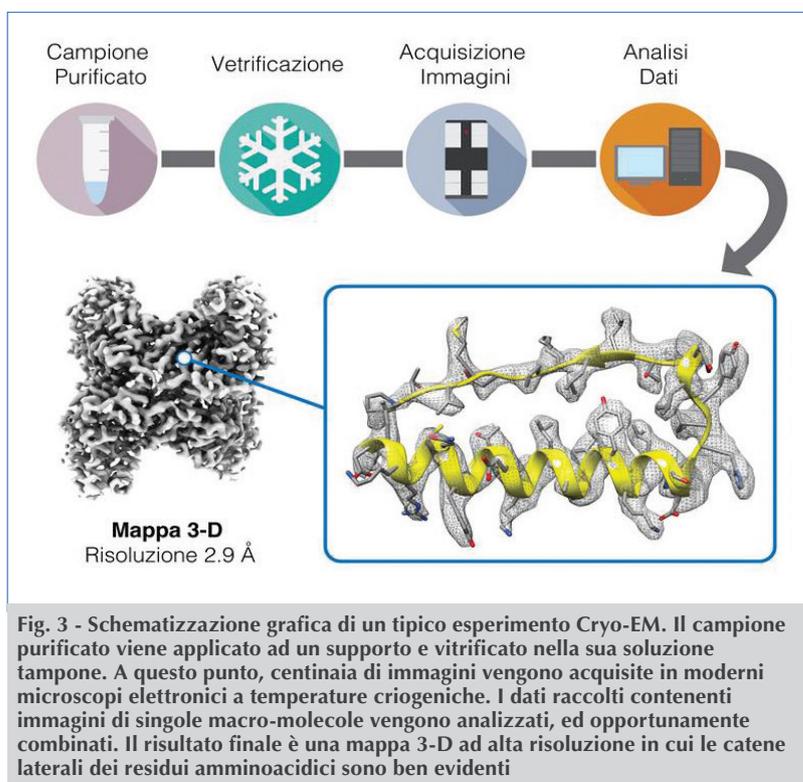


Fig. 3 - Schematizzazione grafica di un tipico esperimento Cryo-EM. Il campione purificato viene applicato ad un supporto e vitrificato nella sua soluzione tampone. A questo punto, centinaia di immagini vengono acquisite in moderni microscopi elettronici a temperature criogeniche. I dati raccolti contenenti immagini di singole macro-molecole vengono analizzati, ed opportunamente combinati. Il risultato finale è una mappa 3-D ad alta risoluzione in cui le catene laterali dei residui aminoacidici sono ben evidenti

Electron counting detectors

Le prime acquisizioni d’immagini da microscopio elettronico furono effettuate utilizzando lastre fotografiche. Il supporto fotografico fornisce ampie visuali del campione analizzato assicurando una buona integrazione del segnale; l’energia dell’elettrone viene, infatti, direttamente trasferita ai microscopici cristalli d’alogenuro d’argento. L’uso delle lastre fotografiche imponeva però un’analisi del campione in differita, poiché ogni lastra doveva essere sviluppata e successivamente scannerizzata. Per questo motivo nel 1990 i microscopisti elettronici accolsero con grande entusiasmo i primi dispositivi CCD (*Charge-Coupled Device*) che permettevano una risposta immediata, e quindi maggiore controllo delle condizioni sperimentali, a scapito dell’efficienza nell’acquisizione del segnale e della qualità dell’immagine. La vera “rivoluzione nella risoluzione” in Cryo-EM avvenne nel 2012 con l’entrata nel mercato di una nuova generazione di dispositivi, meglio conosciuti come *Direct Electron Detectors* (DED), che combinavano l’immediatezza della risposta in fase di analisi all’elevata efficienza nel registrare il segnale. A differenza dei dispositivi CCD, in un DED l’elettrone si deposita direttamente sul sensore (senza subire con-

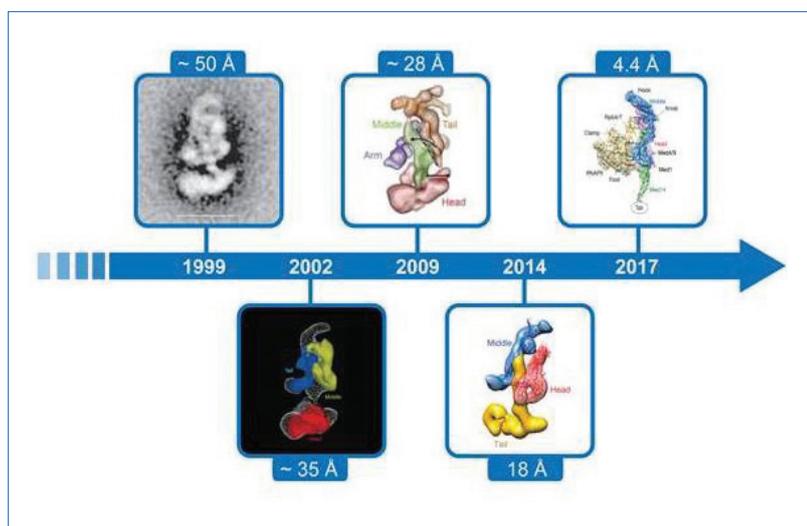


Fig. 4 - L'evoluzione del potere risolutivo della microscopia elettronica negli anni ha permesso la caratterizzazione ad alta risoluzione dell'architettura del complesso mediatore, il fattore di regolazione della trascrizione del DNA nella cellule eucariotiche

versioni tramite scintillatore e fibra ottica) costituito da un sottile strato di ossidi metallici semiconduttori (15-75 μm). Inoltre, la velocità d'acquisizione dei DED permette di raccogliere numerosi fotogrammi per una sola esposizione, dando luogo ad una sorta di filmato in cui la (bassa) dose elettronica cui è sottoposto il campione è distribuita uniformemente sui singoli fotogrammi. Tale modalità di acquisizione è fondamentale per permettere la correzione, in fase di analisi computazionale, dello spostamento e del danno subito dalle singole molecole, fenomeni ambidue indotti dalla radiazione elettronica.

Supporti algoritmici e di computing

In un esperimento Cryo-EM (Fig. 3) migliaia d'immagini, dette *micrographs*, vengono acquisite al microscopio elettronico (tipicamente 1-5 Tb di dati grezzi per esperimento); ognuna di esse contenente centinaia di singole macromolecole, dette *particles*, distribuite nello strato vitreo (tipicamente 50-200 *particles per micrograph*). Il risultato finale è un insieme contenente centinaia di migliaia d'immagini di singole molecole da analizzare e combinare secondo l'orientazione e la conformazione assunta da ciascuna, con lo scopo di sommare il segnale e minimizzare il rumore di fondo. Una tale analisi comporta elevati carichi computazionali, sia per quanto riguarda il calcolo che per l'archiviazione dei dati (Fig. 3). Al fine di superare queste criticità, da alcuni anni i processi di calcolo

più intensi vengono affidati a server basati su più unità d'elaborazione grafica (GPU, dall'inglese *graphic processing unit*) in considerazione della loro elevata velocità di "number crunching". L'implementazione del calcolo su GPU permette di ottenere mappe 3-D ad alta risoluzione in tempi tipicamente inferiori ai due giorni.

I contributi dei tre Premi Nobel

Il Premio Nobel per la Chimica 2017 è stato conferito a Jacques Dubochet (Università di Losanna), Joachim Frank (Columbia University, New York) e Richard Henderson (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) "for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution" (Fig. 4).

Jacques Dubochet

Nel 1975, al fine di limitare il danno prodotto dalla radiazione elettronica e limitare i processi di disidratazione del campione, Henderson tentò di sostituire il tampone acquoso con una soluzione contenente glucosio [15]. Questo espediente sperimentale ebbe però vita breve essendo di difficile applicazione per macromolecole biologiche idrosolubili. Unica via praticabile fu quindi quella del congelamento del campione nella sua stessa soluzione tampone. Nel 1980 Jacques Dubochet (allora all'European Molecular Biology, EMBL, di Heidelberg), intuì che per evitare la nucleazione/formazione di cristalli di ghiaccio occorreva congelare il campione in maniera estremamente rapida [16-17]. Il prodotto finale atteso per questo processo era una sospensione della macromolecola in studio in un sottile strato di acqua vitrificata, attraverso cui il fascio di elettroni potesse viaggiare uniformemente. Dopo svariate sperimentazioni, nel 1981 Dubochet scelse come agente criogenico etano o propano liquido, raffreddato con azoto liquido alla temperatura di circa $-190\text{ }^\circ\text{C}$ e ottenne così un sottile strato di acqua (15-100 nm) allo stato vetroso in cui le macromolecole o corpuscoli subcellulari (ad esempio proteine, complessi o ribosomi) rimanevano omogeneamente sospesi. Questa tecnica risulta facilmente accessibile e riproducibile, ed è ad oggi utilizzata universalmente nei laboratori di microscopia elettronica moderni.

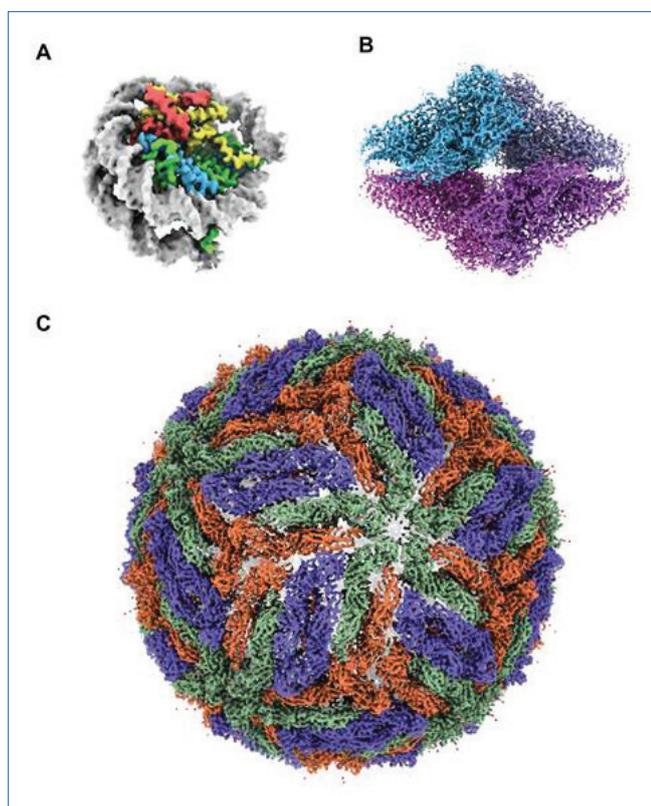


Fig. 5 - Alcuni esempi significativi di strutture tridimensionali ad alta risoluzione ottenuti tramite crio-EM: A) struttura del nucleosoma alla risoluzione di 3,9 Å, in grigio la doppia elica di DNA, in colore le proteine istoniche; B) struttura dell'enzima beta-galattosidasi alla risoluzione di 2,2 Å, uno degli esempi di massima risoluzione raggiunti tramite crio-EM; C) struttura del capsido del virus Zika ad una risoluzione di 3,8 Å

Joachim Frank

Sebbene l'intuizione e gli sforzi di Dubochet permettessero di ottenere il campione biologico sospeso nella sua stessa soluzione tampone vitrificata, come poter generare modelli 3-D ad alta risoluzione di molecole che sono distribuite ed orientate casualmente nel sottile strato vitreo rimaneva una questione irrisolta. A questo dilemma si dedicò per più di una decade Joachim Frank. Fin dal 1975, Frank propose una strategia teorica secondo cui, combinando le proiezioni bidimensionali della macromolecola campione (le immagini acquisite al microscopio elettronico), si sarebbe potuto estrarre l'informazione mancante nella terza dimensione, arrivando a un vero modello tridimensionale della macromolecola. La strategia di Frank si fondava sull'utilizzo di algoritmi che permettevano di identificare ed analizzare le immagini-proiezione ottenute per ogni singola molecola/particella nel campione. Molecole aventi la

stessa orientazione (in 2-D) venivano unite in un unico gruppo e le singole immagini sommate. La nuova immagine somma (il rapporto segnale/rumore cresce con $(N)^{1/2}$, ove N è il numero delle singole immagini sommate), definita come un'unica classe 2-D, ottimizzava il contrasto tra la molecola campione e il suo intorno vitrificato, portando quindi ad ottenere diverse immagini ad alta risoluzione e contrasto della stessa macromolecola, vista da diverse angolazioni. Successivamente, Frank propose un metodo per risalire all'orientazione relativa in tre dimensioni partendo da proiezioni bidimensionali di molecole asimmetriche. Il metodo, conosciuto come *Random Conical Tilt*, gli permise di ottenere il primo modello 3-D del ribosoma combinando le diverse proiezioni bidimensionali, gettando le basi per la diffusione e applicazione della *single particle cryo-EM*.

Richard Henderson

Henderson rappresenta la figura del ricercatore sperimentale e teorico che da almeno tre decenni aveva previsto le potenzialità delle microscopia elettronica applicata allo studio della struttura delle proteine e degli acidi nucleici. Il suo contributo storico sulla struttura della batteriorodopsina (una proteina integrale di membrana) è stato una sorta di banco di prova per mezzo del quale, negli anni, le nuove metodologie sono state validate e la risoluzione dei modelli molecolari derivati è stata estesa. Henderson si è occupato inoltre dell'evoluzione degli strumenti, in particolare dei *direct electron detectors*, il cui sviluppo è una colonna portante della cryo-EM. Gli studi di Henderson non hanno trascurato l'aspetto del danno da radiazione che interessa i campioni analizzati tramite cryo-EM; le sue indagini sono fondamentali nel comprendere come l'interazione elettroni:campione si traduce in eventi secondari e nel danneggiamento. Infine, il costante impegno di questo ricercatore nello studio dei processi alla base della formazione e trattamento dell'immagine nel microscopio elettronico costituisce tutt'ora una fonte di idee e informazioni per lo sviluppo dei principali pacchetti di software dedicati alla *single particle cryo-EM*.

Gli spettacolari sviluppi sopra descritti [18] (Fig. 4) hanno trovato riscontro in una rapida diffusione della *single particle cryo-EM* in ambito accademico, ma anche industriale. In particolare, due appaiono es-

sere le principali forze traenti di questo sviluppo. *In primis*, è noto che gran parte della funzione biologica discende da processi di riconoscimento molecolare e dalla interatomica (la capacità delle macromolecole biologiche di assemblarsi in complessi multi-molecolari, stabili o transienti, spesso eccedenti i 10^6 Da [19]; Fig. 5). La comprensione dei processi di riconoscimento e di trasmissione di segnali da parte di questi complessi è essenziale per espandere le nostre conoscenze di biochimica di base e di biologia cellulare [20]. In secondo luogo, è noto che più del 30% dei bersagli interessanti per lo sviluppo di nuovi farmaci sono proteine di membrana, le cui strutture 3-D nell'interazione con potenziali 'drug leads' sono difficilmente accessibili attraverso altri metodi della Biologia Strutturale [21].

Il Premio Nobel 2017 per la Chimica assegnato a Dubochet, Frank e Henderson riconosce lo sviluppo spettacolare che la *single particle cryo-EM* ha registrato in meno di cinque anni (si vedano alcune statistiche presenti nell'Electron Microscopy Data Bank: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>). La scala di tempi attraverso cui ognuno dei 'Nobel Laureates' ha contribuito a questo sviluppo è decisamente più lunga e, come in molti rami della scienza, è stata dettata oltre che dalla genialità dei singoli, dai progressi e dalla disponibilità di nuove tecnologie, sperimentali e informatiche. È opinione di chi scrive che la selezione di un Premio Nobel per la Chimica, in questo caso, sia particolarmente lungimirante in quanto valorizza l'essenza chimica dei più complicati processi cellulari verso cui la potenza analitica della Chimica si sta rivolgendo significativamente, e riconosce alla *single particle cryo-EM* un valore specifico in un dominio della scienza in cui Chimica, Fisica e Biologia si incontrano in modi complementari e sinergici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Ruska, Nobel Lectures, Physics 1981-1990, Tore Frängsmyr and Gösta Ekspong (Eds.), 1993, World Scientific Publishing, Singapore.
- [2] L. Marton, *Nature*, 1934, **133**, 911.
- [3] C.E. Hall, M.A. Jakus, F.O. Schmitt, *J. Applied Physics*, 1945, **16**, 459.
- [4] S. Brenner, R.W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **34**, 103.
- [5] H.E. Huxley, G. Zubay, *J. Biophys. Biochem. Cytology*, 1961, **11**, 273.
- [6] D.J. DeRosier, A. Klug, *Nature*, 1968, **217**, 130.
- [7] H. Fernández-Morán, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1960, **85**, 689.
- [8] D.J. Haas, M.G. Rossmann, *Acta Crystallogr.*, 1970, **B26**, 998.
- [9] K.A. Taylor, R.M. Glaeser, *Science*, 1974, **186**, 1036.
- [10] R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceska et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, **213**, 899.
- [11] W. Kühlbrandt, Wang, Y. Fujiyoshi, *Nature*, 1994, **367**, 614.
- [12] D.N. Wang, W. Kühlbrandt, *J. Mol. Biol.*, 1991, **217**, 691.
- [13] E. Nogales, S.G. Wolf, K.H. Downing, *Nature*, 1998, **391**, 199.
- [14] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hiral et al., *Nature*, 2000, **407**, 599.
- [15] P.N.T. Unwin, R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, 1975, **94**, 425.
- [16] J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang et al., *Q. Rev. Biophys.*, 1988, **21**, 129.
- [17] J. Dubochet, A.W. McDowell, *J. Microsc.*, 1981, **124**, 3.
- [18] W. Kühlbrandt, *Science*, 2014, **343**, 1443.
- [19] W.P. Galej, M.E. Wilkinson, S.M. Fica et al., *Nature*, 2016, **537**, 197.
- [20] C.-H. Lee, R. MacKinnon, *Cell*, 2017, **168**, 111.
- [21] M. Baidya, H. Dwivedi, A.K. Shukla, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2017, **24**, 500.

Cryo-Electron Microscopy of Biological Macromolecules - The 2017 Nobel Prize for Chemistry

The 2017 Nobel Prize for Chemistry acknowledges the spectacular and recent developments of cryo-electron microscopy. The current experimental and computational approaches, together with the availability of high sensitivity detectors allow the study of three-dimensional structures of biological macromolecules at near-atomic resolution. Significant targets of such studies are membrane proteins, protein and protein/nucleic acids complexes and subcellular particles such as the ribosome.