

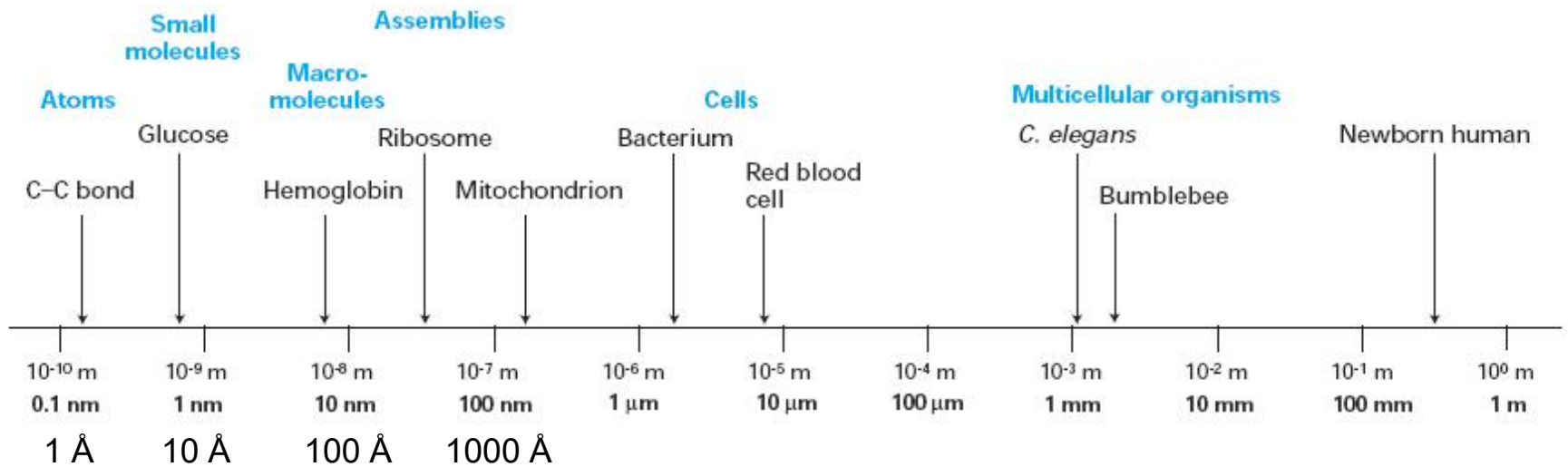
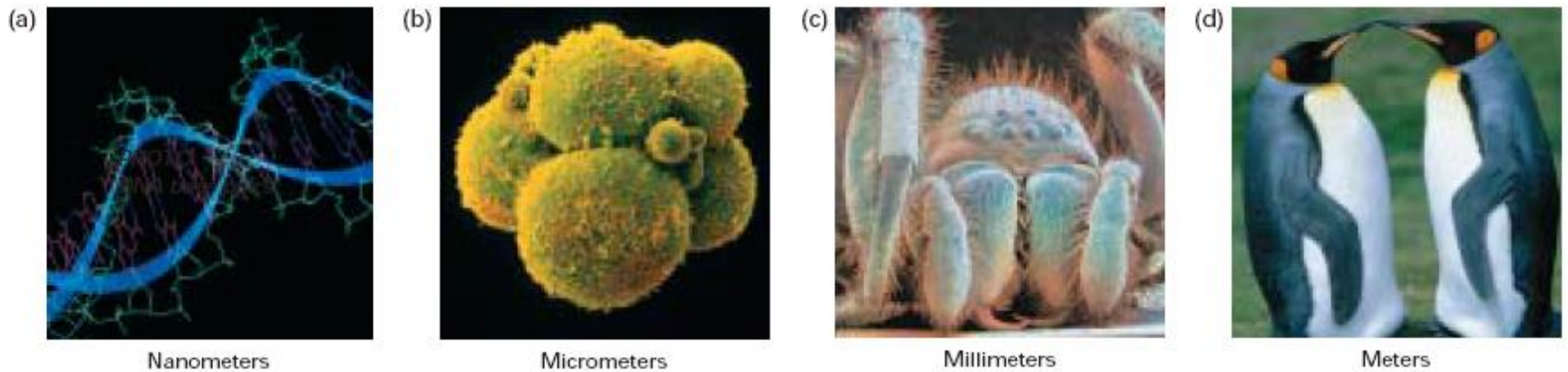
Biologia strukturalna

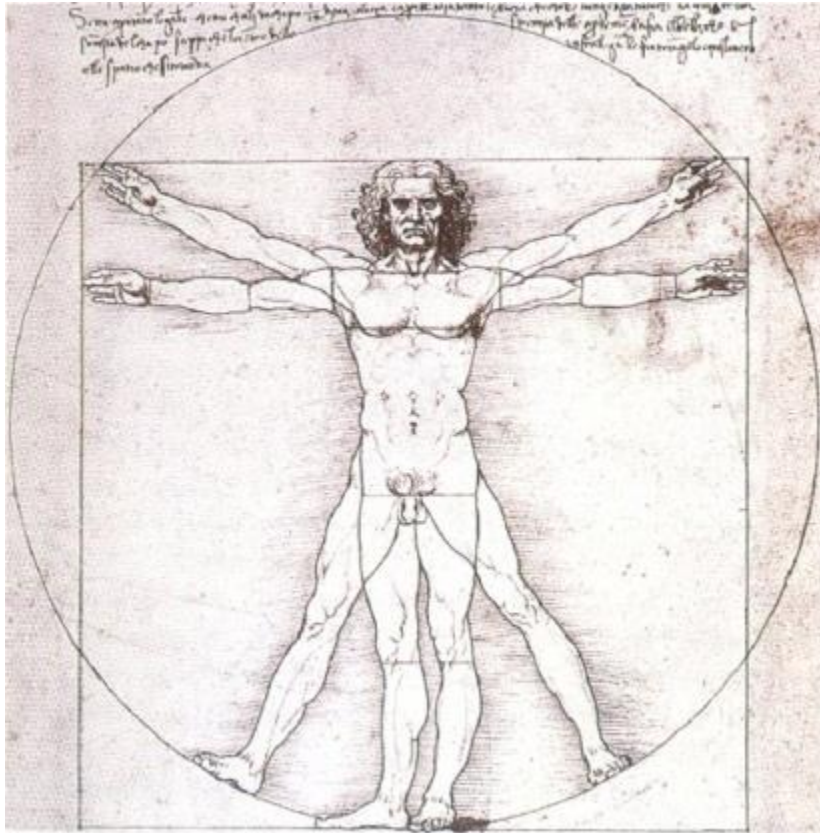
Badania kształtu i architektury makrocząsteczek biologicznych, w tym w szczególności białek i kwasów nukleinowych



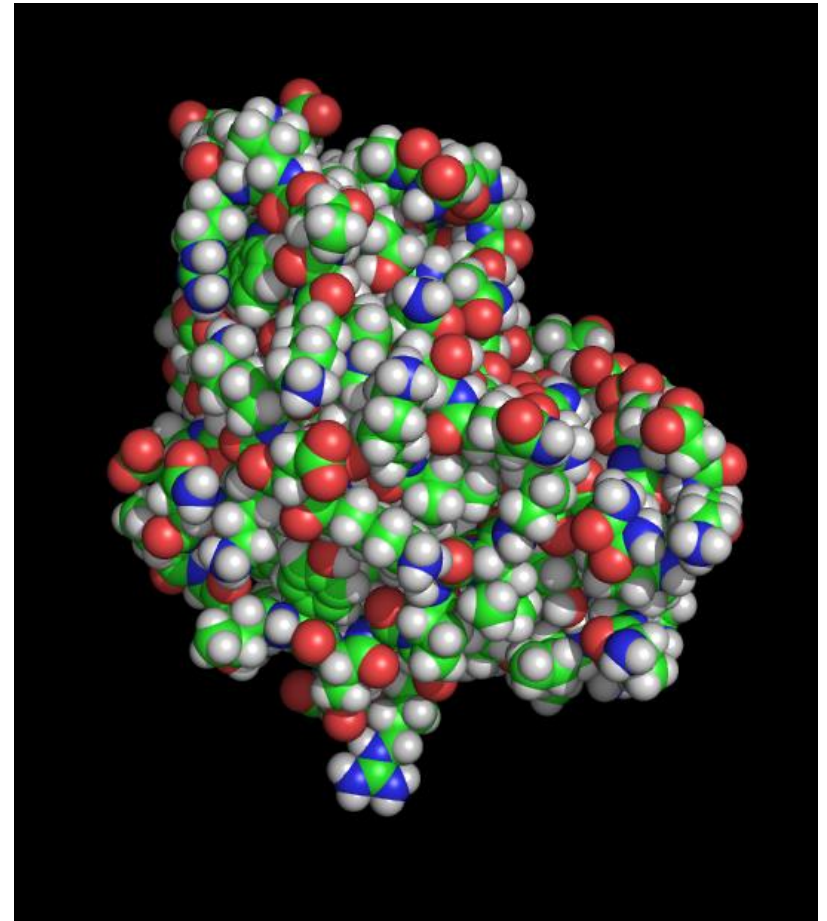
Właściwe funkcjonowanie makromolekuł (RNA) wymaga aby przyjęły one właściwą strukturę przestrzenną

Makromolekuły są zdolne do wypełniania swoich funkcji dzięki precyzyjnemu ułożeniu grup chemicznych w ich strukturze

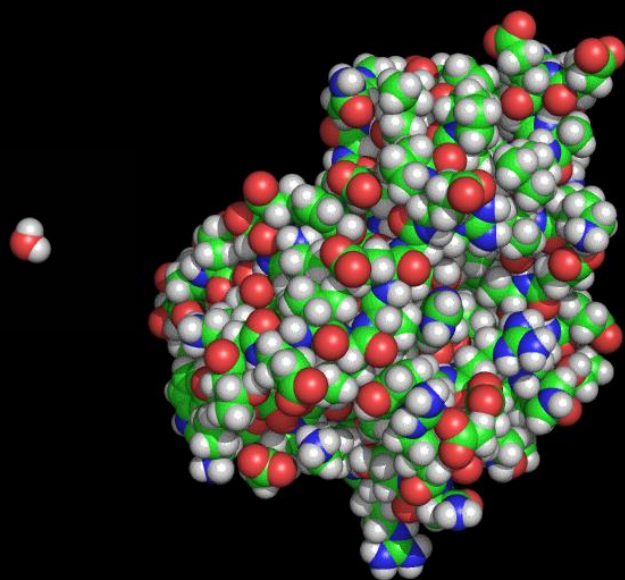




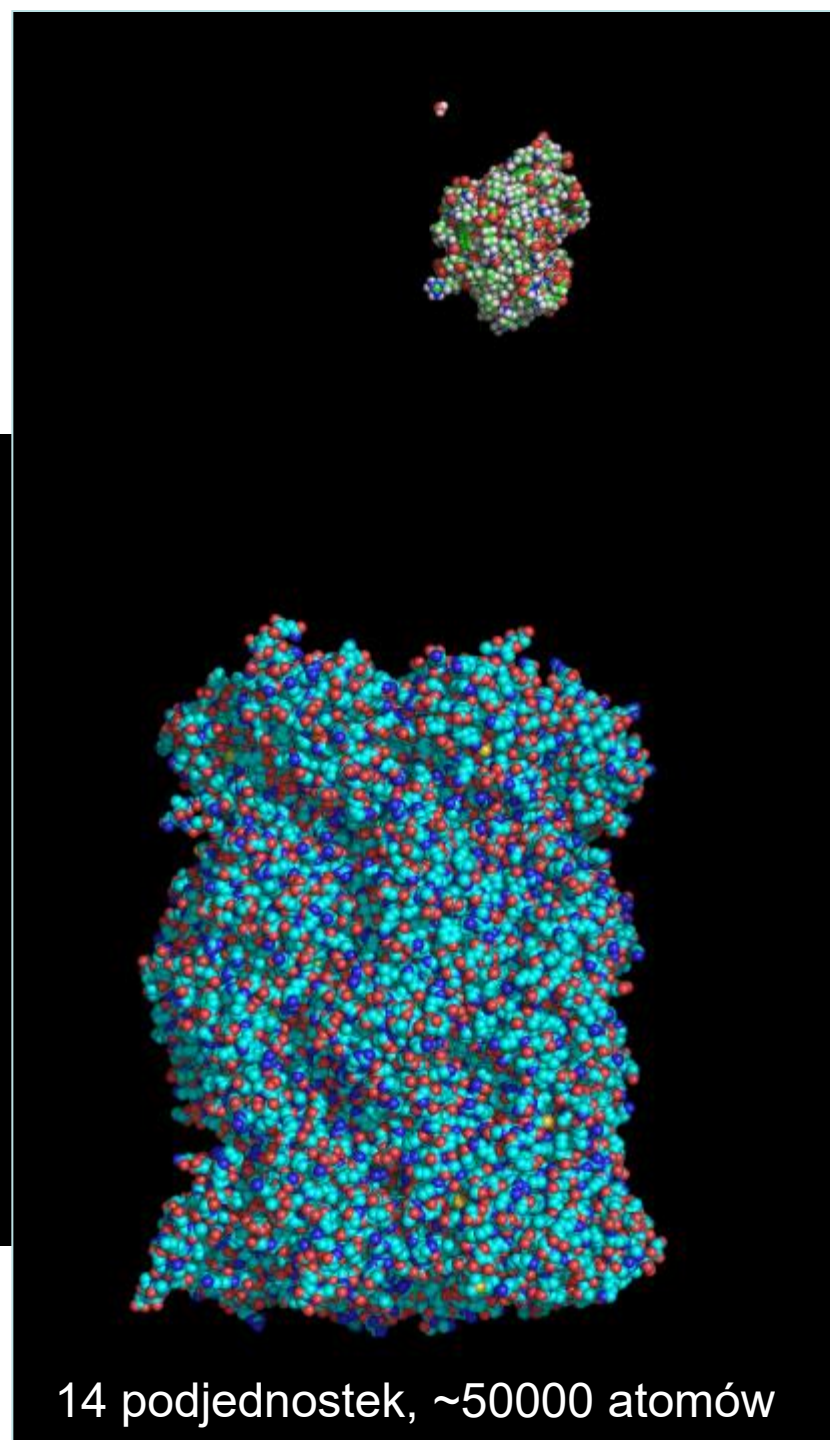
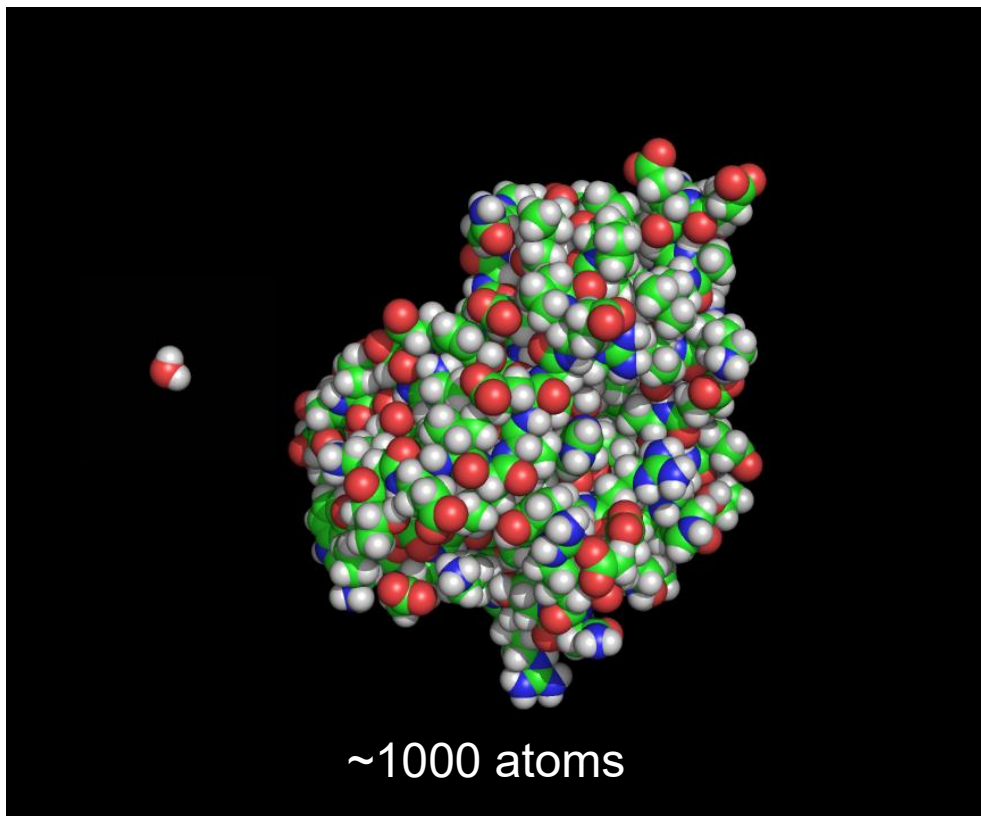
20 000 km

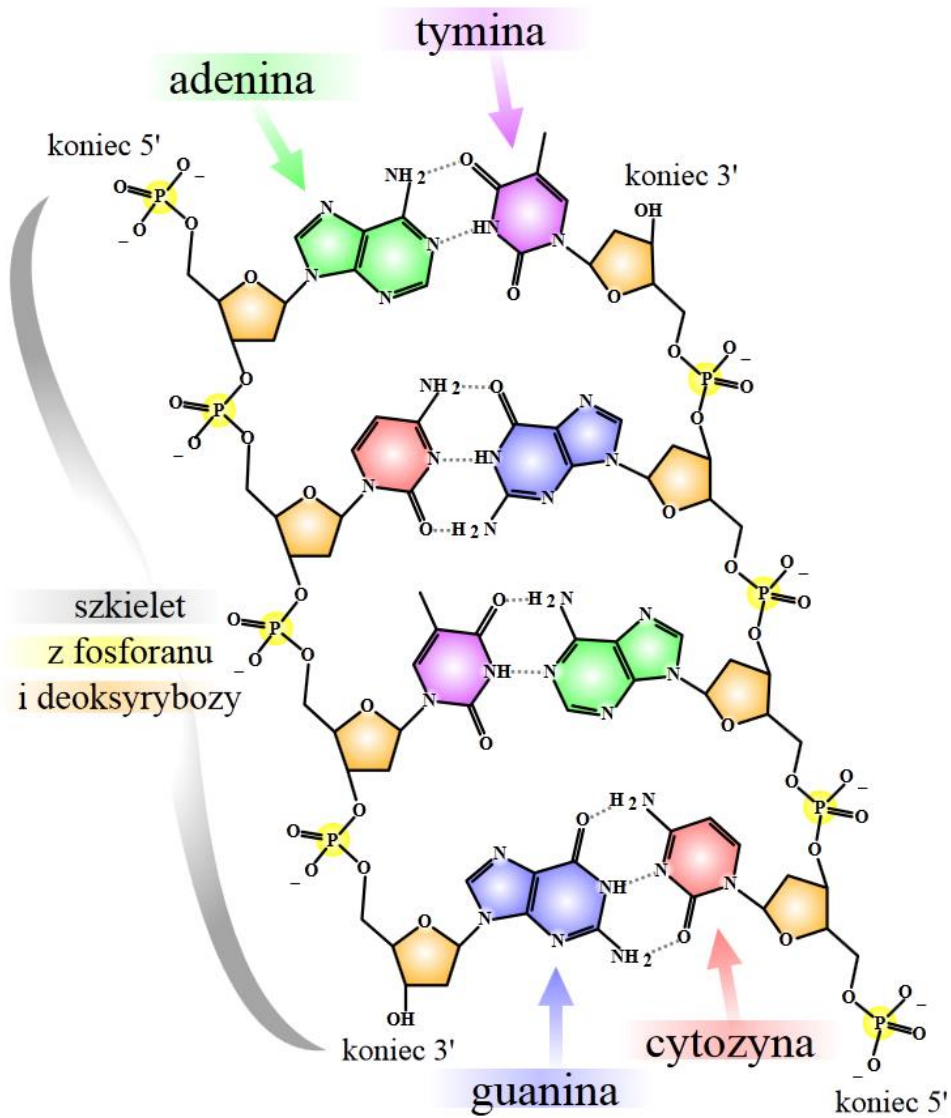


5 cm

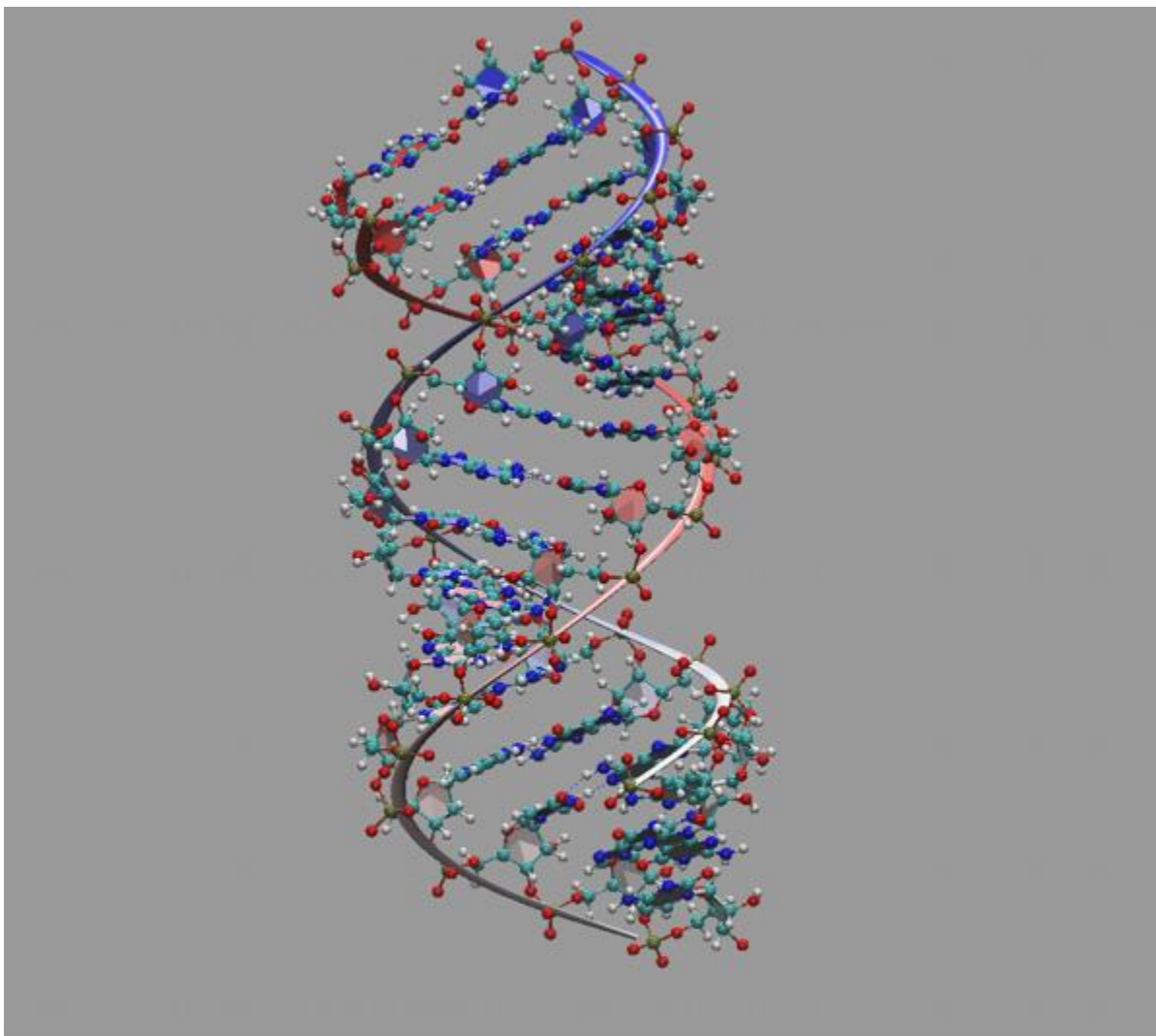


~1000 atomów



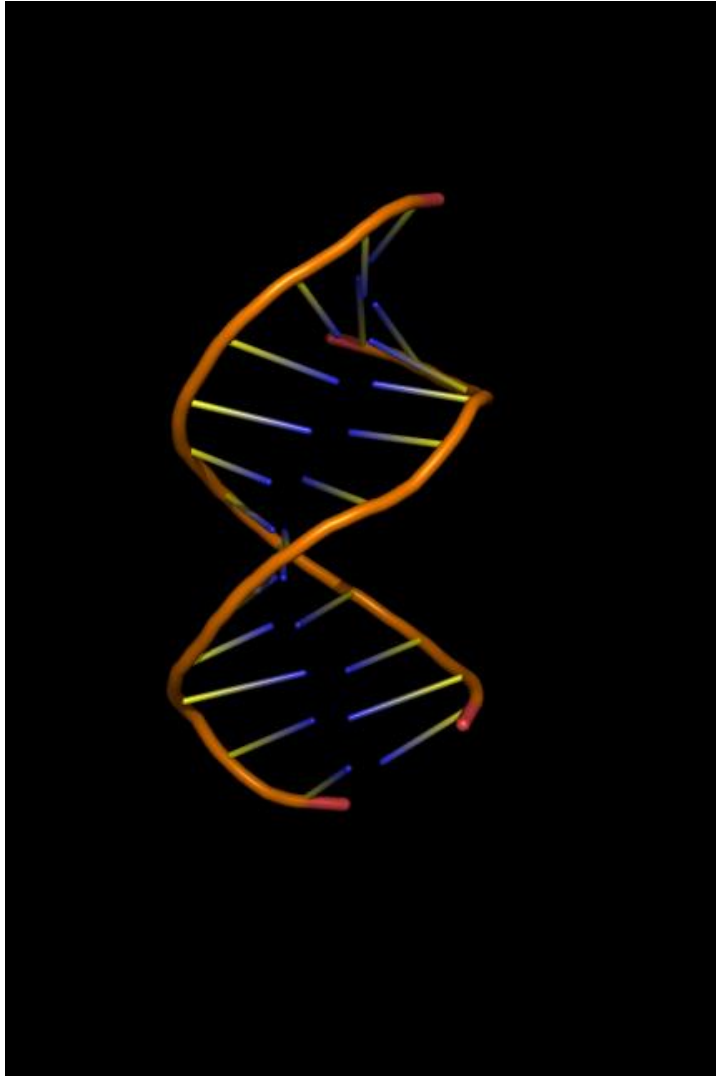


Podstawy struktury RNA

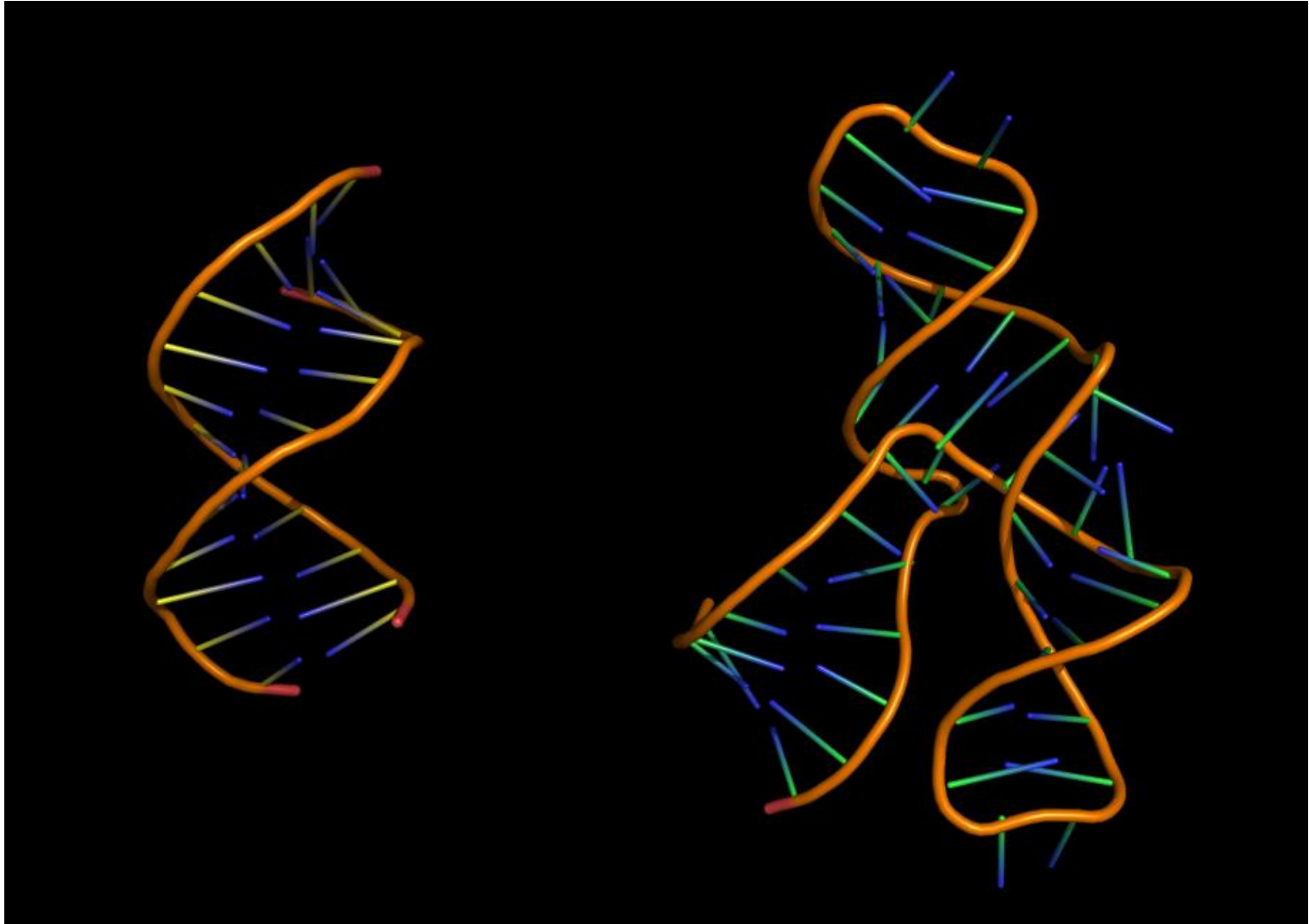


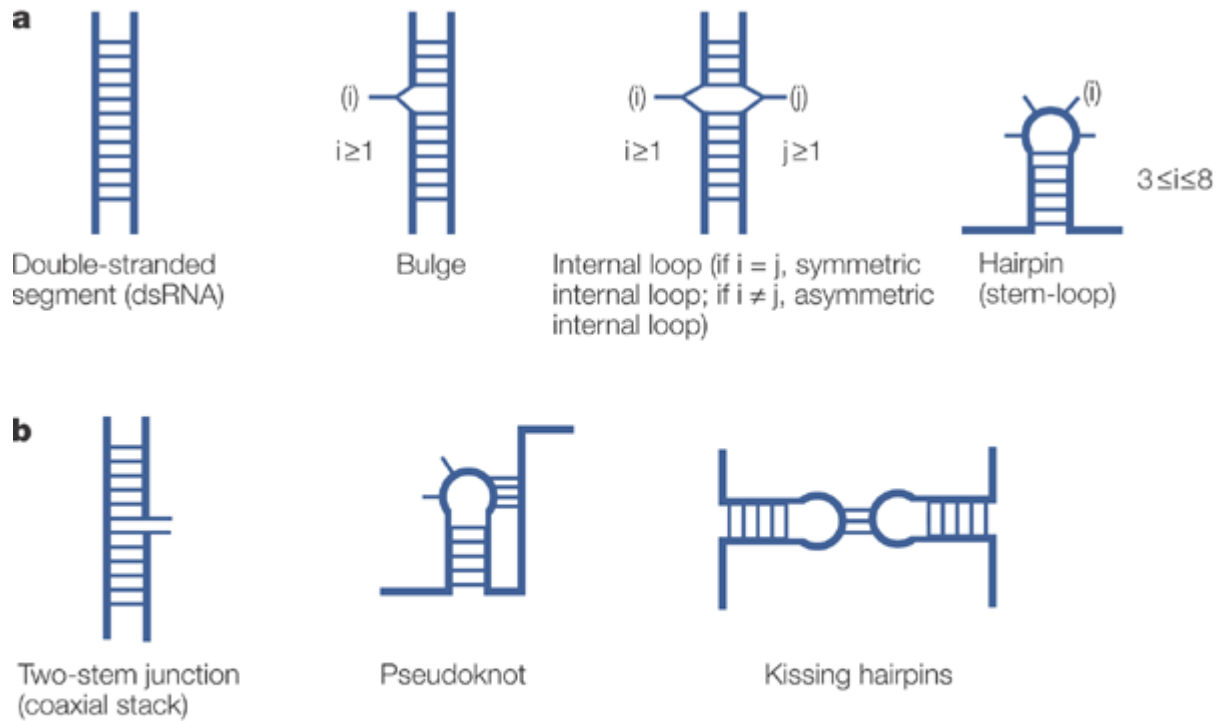
Graphic by M. Orozco (IRB Barcelona)

Rybozym



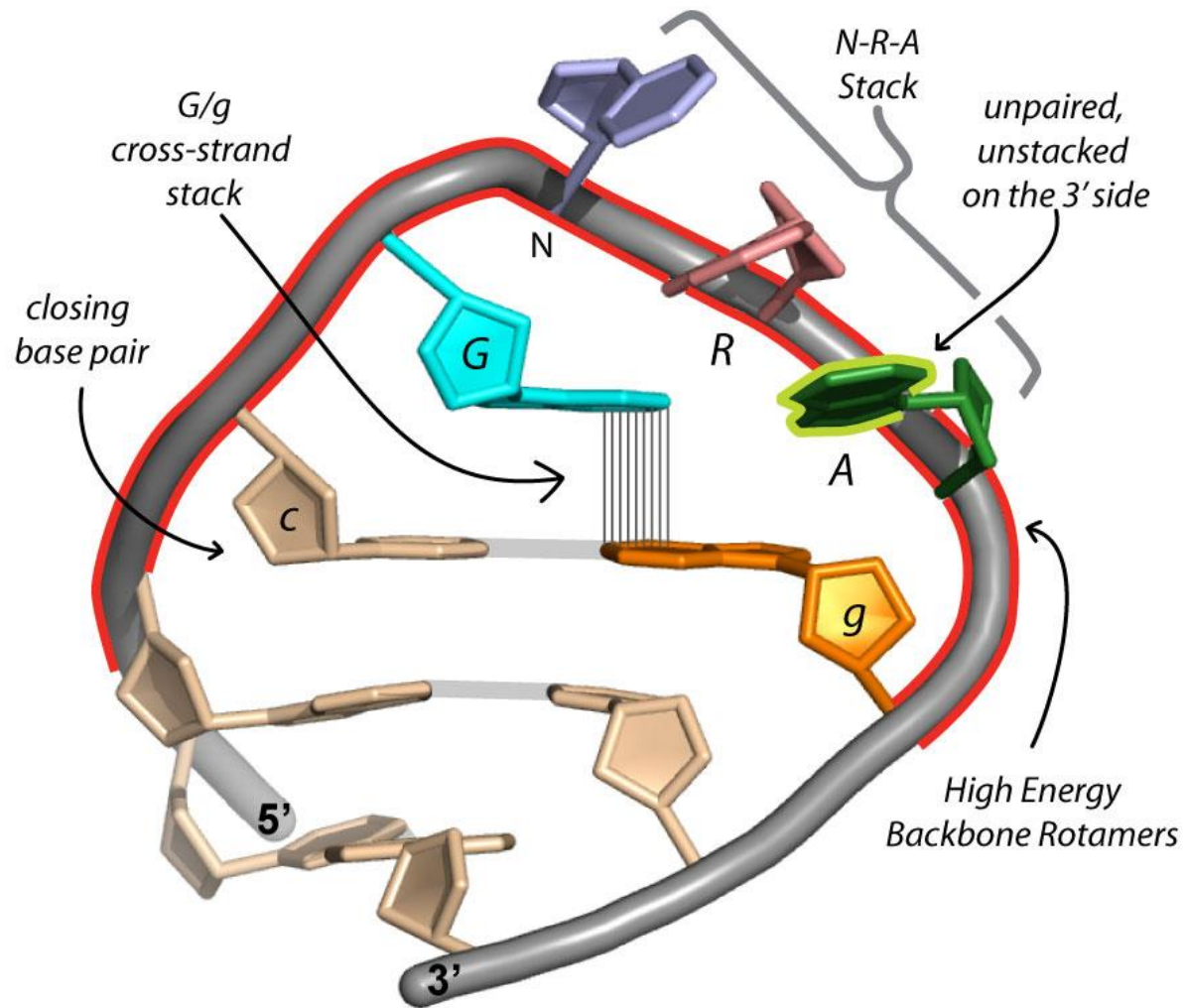
Rybozym

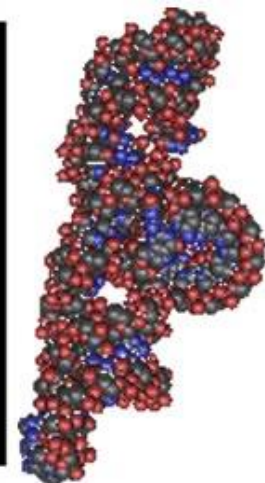
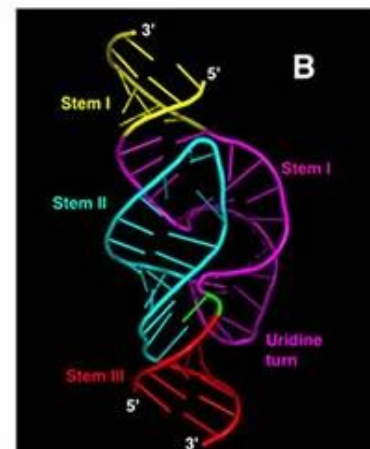
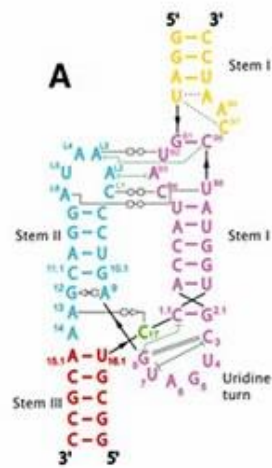
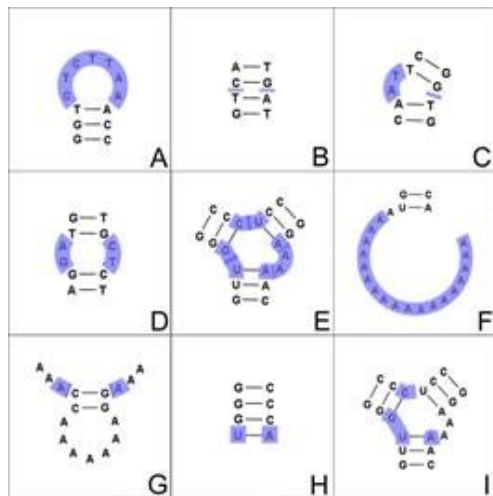




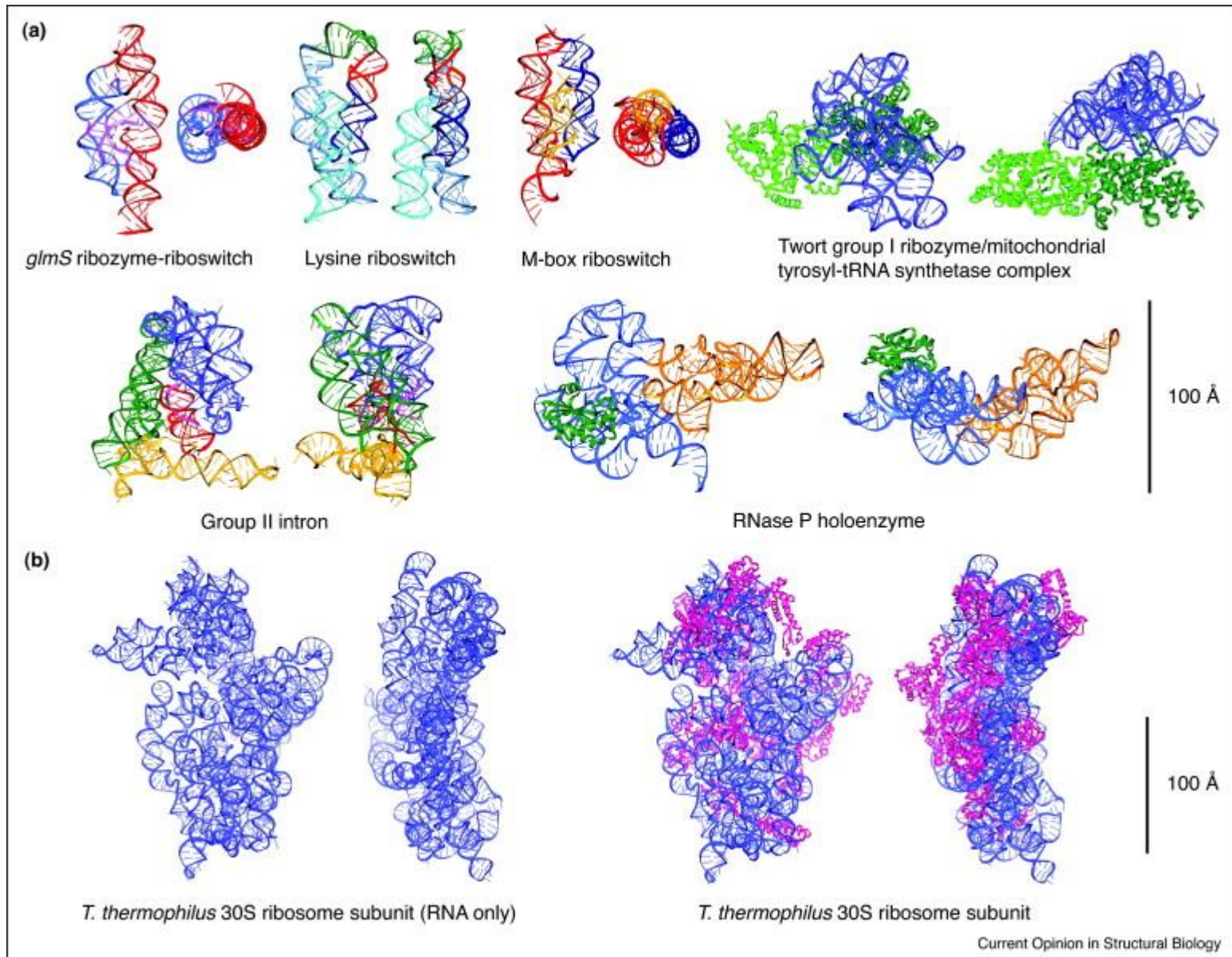
Nature Reviews | [Molecular Cell Biology](#)

Dodatkowo: miejsca wiązania jonów metali

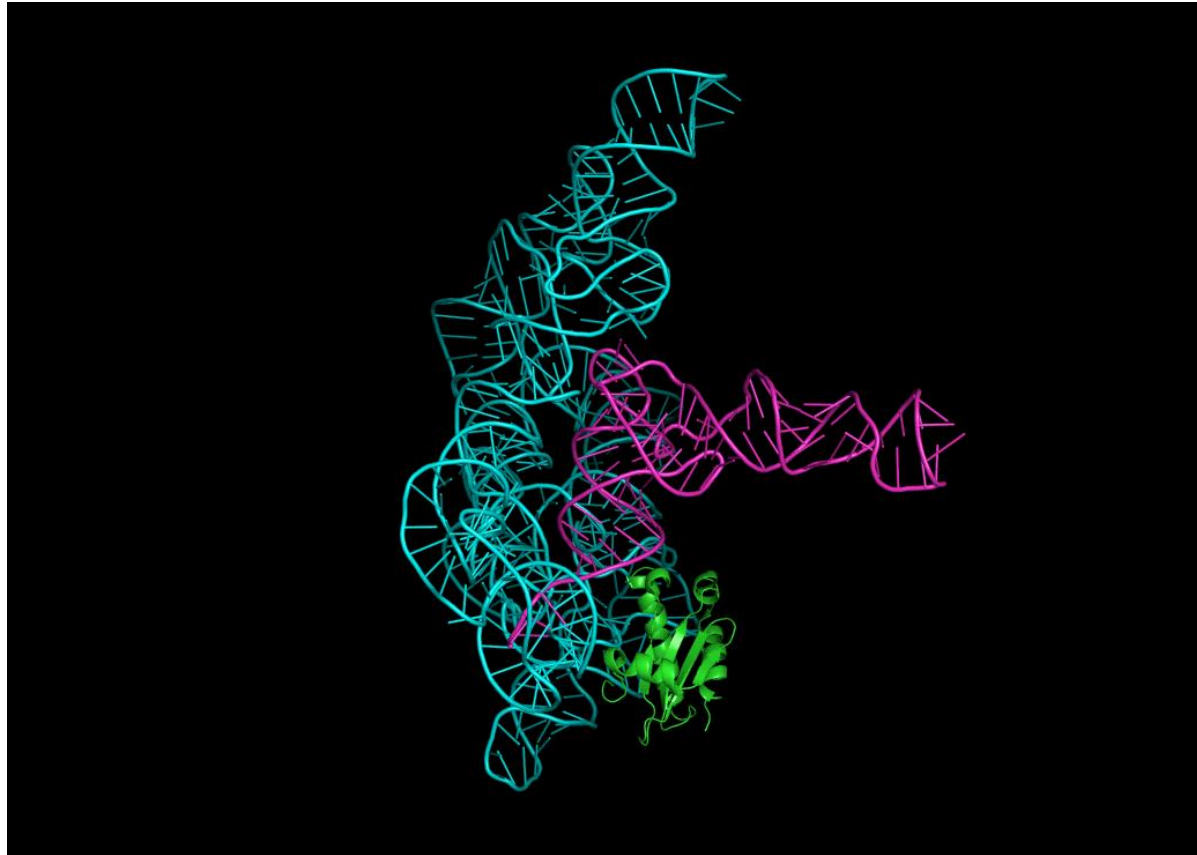




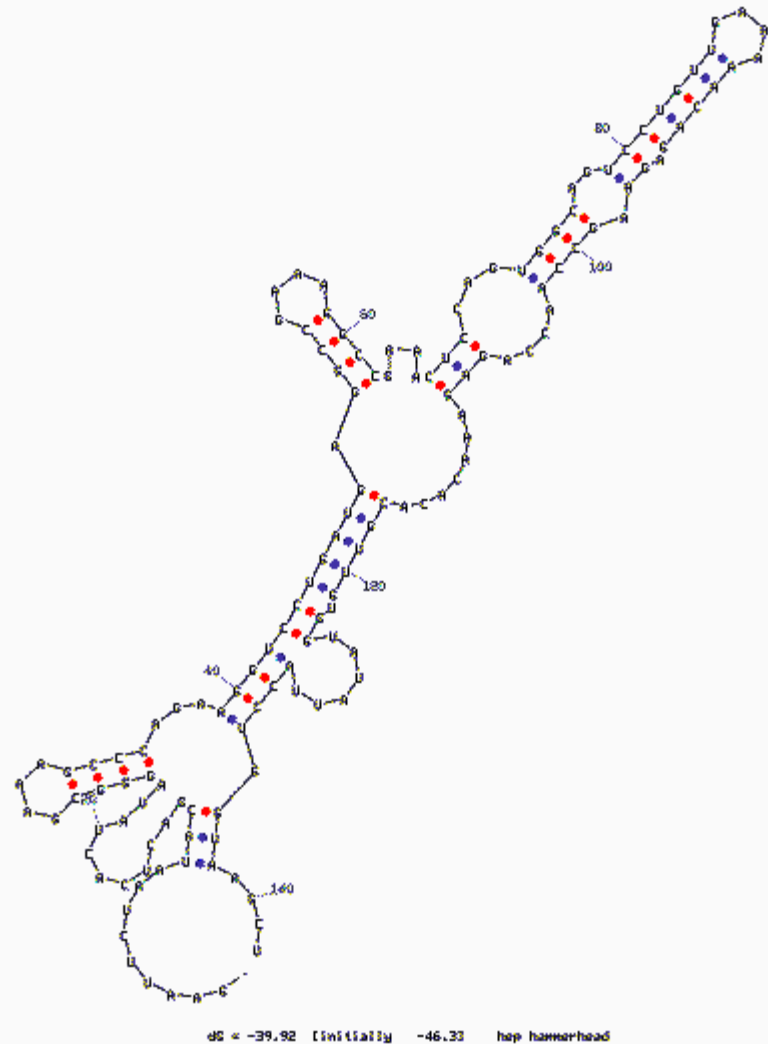
Podstawy struktury RNA



RNase P



Struktura drugorzędowa RNA może być stosunkowo precyzyjnie przewidziana na podstawie porównania sekwencji lub metod termodynamicznych



Metody chemiczne

Niskokątowe rozpraszanie promieniowania Rentgena (SAXS)

Mikroskopia elektronowa (EM)

Jądrowy Rezonans Magnetyczny (NMR)

Krystalografia

Metody obliczeniowe

Metody wyspecjalizowane (np. FRET)

Produkcja RNA:

Synteza (do kilku dziesięciu nukleotydów)

Transkrypcja *in vitro*

Źródła naturalne

Oczyszczanie w warunkach denaturujących:

HPLC

Żele sekwencyjne

Oczyszczanie w warunkach natywnych:

Metody chromatograficzne (filtracja żelowa)

Chemiczne metody badania RNA (chemical probing)

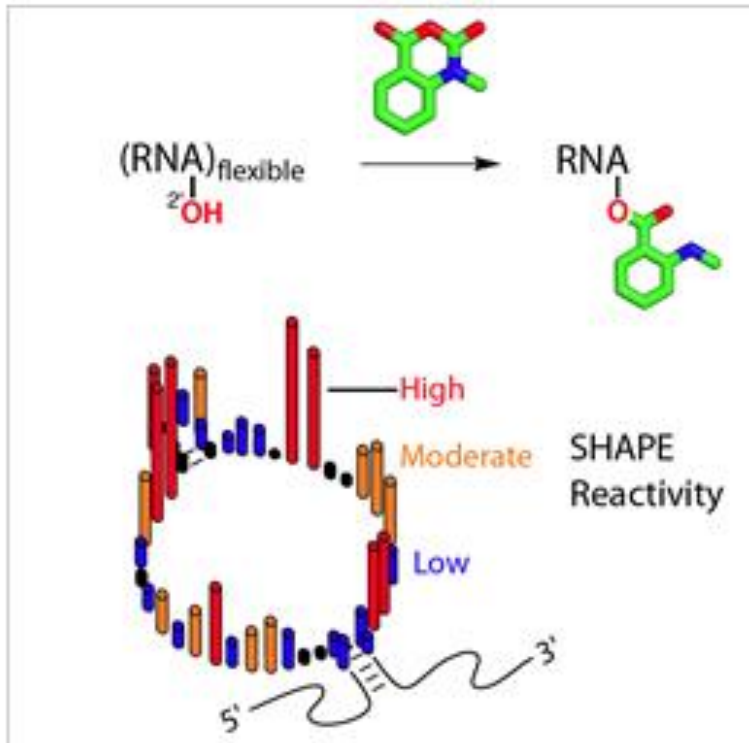
Enzymy

Nukleaza S1	dostępne nukleotydy w regionach jednoniciowych
Rybonukleaza V1	nukleotydy w tworzące oddziaływania stacking lub sparowane
Rybonukleaza T1	dostępne (niesparowane) guaniny, sekwencjonowanie dla guanin (w warunkach denaturujących)
Rybonukleaza U2	Dostępne (niesparowane) adeniny, sekwencjonowanie dla adenin (w warunkach denturujących)

Odczynniki chemiczne

Imidazol	Dostępne regiony jednoniciowe
Ołów	Dostępne regiony jednoniciowe
EthylNitrosourea ENU	Etyluje dostępne fosforany
Rodniki hydroksylowe	(reakcja Fe(II)-EDTA z NaOH lub promieniowanie synchrotronowe) - przecinają główny łańcuch RNA tam gdzie dostępne są C1' lub C4' rybozy
Dimethylsulfate DMS	Metyluje dostępne N1 adeniny, N3 cytozyny, N7 guaniny
CMCT	Modyfikuje dostępne N3 urydyny, N1 guaniny
DEPC	Dostępne N7 adeniny
Kethoxal	Dostępne N1 i N2 guaniny

SHAPE



Reaktywność niezależna od rodzaju zasady, ale silnie zależna od ruchliwości/dostępności nukleotydu.

Powstawanie produktu reakcji wykrywa się poprzez zatrzymanie reakcji wydłużania primera DNA przy zastosowaniu odwrotnej transkryptazy i porównanie z niemodyfikowaną kontrolą

1-methyl-7-nitroisatoic anhydride

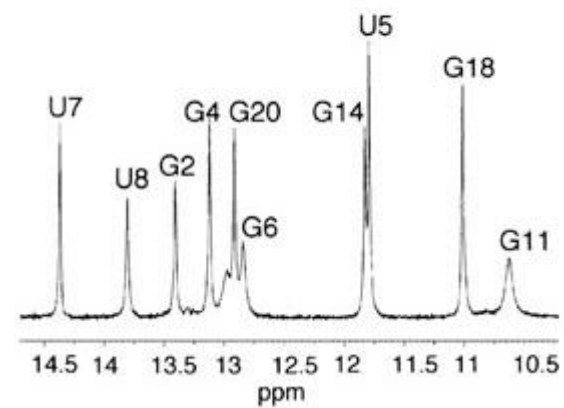
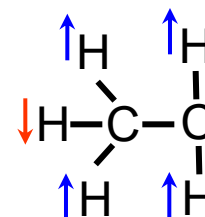
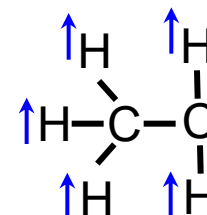
Chemiczne metody są używane do potwierdzenia poprawności struktur krystalograficznych

Ich zaletą jest stosowanie w roztworze w warunkach fizjologicznych

Zastosowano te metody w całych komórkach (mapowanie struktury 16S rRNA oraz RNazy P w bakteriach (Adilkshmi, NAR, 2006))

NMR

Rezonans magnetyczny

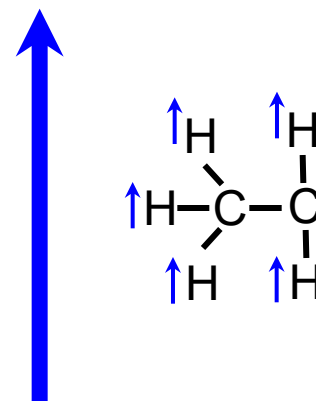


Niektóre jądra atomowe posiadają moment magnetyczny:

- Ten moment jest równoległy i proporcjonalny do spinu jądra
- Dla spinu $\frac{1}{2}$ możliwe są dwa stany energetyczne – równoległy i antyrównoległy do zewnętrznego pola magnetycznego
- Przejścia między tymi dwoma stanami są obserwowane z NMR
- częstotliwość odpowiadająca przechodzeniu między tymi dwoma stanami jest nazwana częstotliwością Larmora

Przesunięcia chemiczne

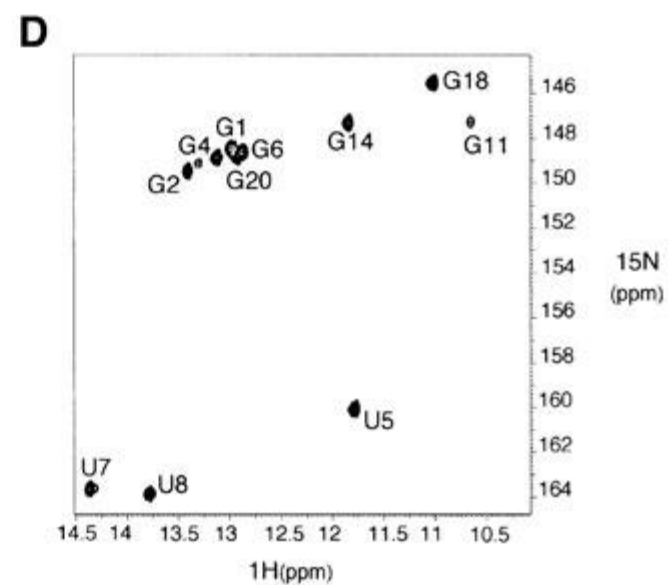
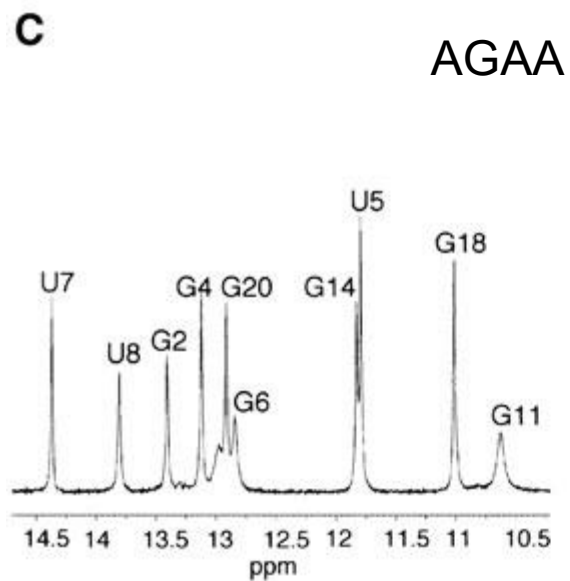
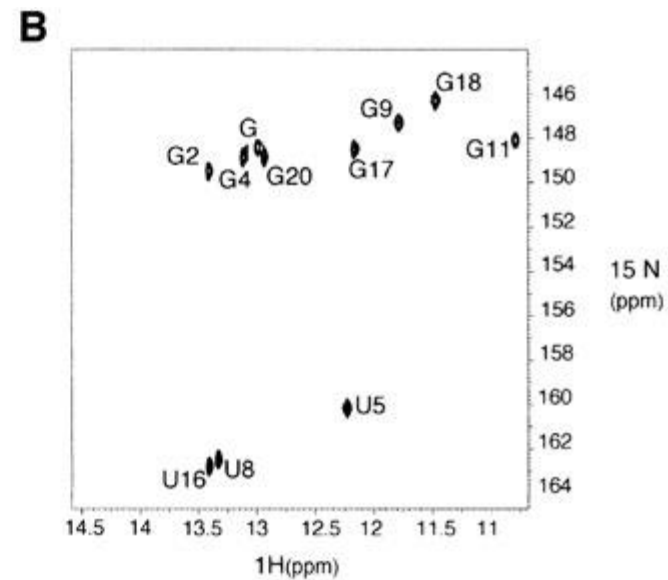
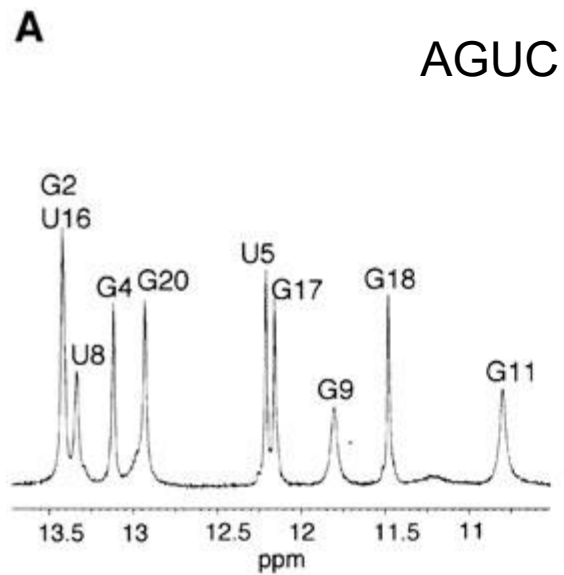
Prądy generowane przez chmury elektronowe osłaniają jądro od zewnętrznego pola magnetycznego modyfikując częstotliwości Larmora o milionowe części.



Jedynie ^1H , ^{13}C , ^{15}N , oraz ^{31}P mogą być zastosowane w NMR

Jednowymiarowe widma dla tetrapętli (region protonów iminowych)

Dwuwymiarowe widma HSQC



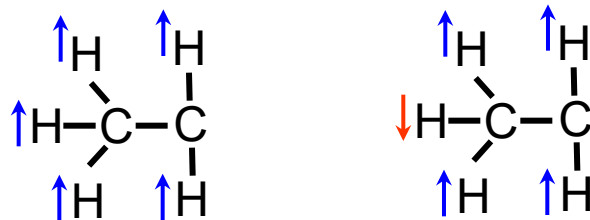
Stałe sprzężenia

W najprostszym przypadku oczekujemy pojedynczych sygnałów od poszczególnych protonów w cząsteczce.

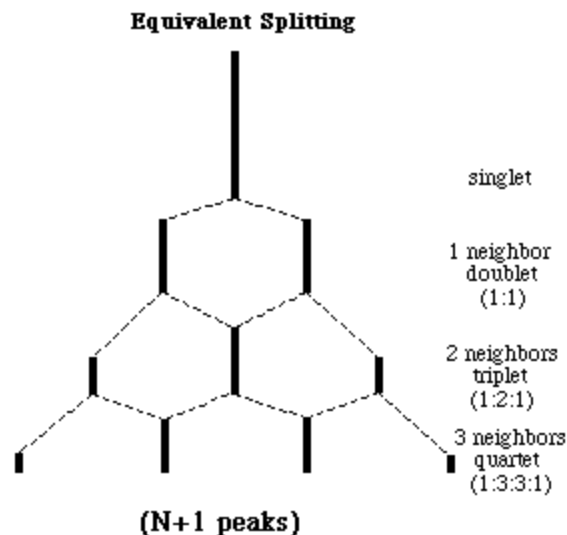
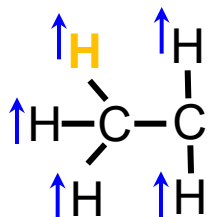
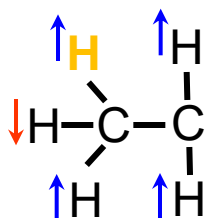
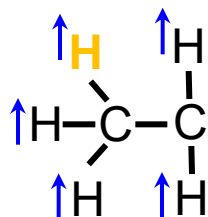
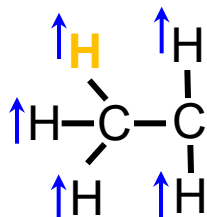
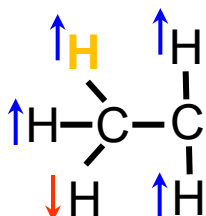
Proton, który obserwujemy (H_A) znajduje się w pobliżu innego protonu (H_B). Moment magnetyczny H_B jest również ułożony równolegle lub antyrównolegle ułożony względem pola zewnętrznego. Połowa H_A będzie się znajdować obok H_B ułożonego równolegle do pola i „odczuwa” nieco większe pole, a połowa obok H_B ułożonego antyrównolegle i „odczuwa” nieco mniejsze pole.

Stała sprzężenia (coupling constant) mierzona w Hz opisuje oddzielenie składników multipletu

Pośrednie sprzężenia spinowo-spinowe w NMR są przenoszone wiązania między atomami (dwa lub trzy; sprzężenia przez cztery wiązania są często poniżej poziomu detekcji).



Obserwowane rezonanse występują w multipletach - singlet, dublet, kwartet itd.



Duże znaczenie dla określania struktury przestrzennej cząsteczek mają też stałe sprzężenia wicynalne (przez trzy wiązania), których pomiar pozwala na określanie kątów dwuściennych w cząsteczkach poprzez tzw. równanie Karplusa

Innym mechanizmem sprzężenia pomiędzy momentami magnetycznymi jąder jest **bezpośrednie sprzężenie spinowo-spinowe** lub dipolowe (stała tego sprzężenia jest oznaczana D), która zachodzi przez przestrzeń. W cieczy, ruchy cząsteczki powodują, że sprzężenie bezpośrednie ulega uśrednieniu do zera

Zależne od odległości jąder - $\sim 1/r^6$

Można ją jednak mierzyć jako tzw. resztkowe sprzężenie dipolowe w częściowo zorientowanych cieczach (np. zawierających polimery, wirusy etc.)

Sprzężenia dipolowe prowadzą również do zmian intensywności sygnałów NMR – jądrowy efekt Overhausera, którego wielkość jest odwrotnie proporcjonalna do odległości dwóch protonów ($<6 \text{ \AA}$)

Nagroda Nobla - Kurt Wutrich 2002

Doświadczenia rozpoczynają się od przygotowania cząsteczek wyznakowanych izotopami ^{13}C and ^{15}N .

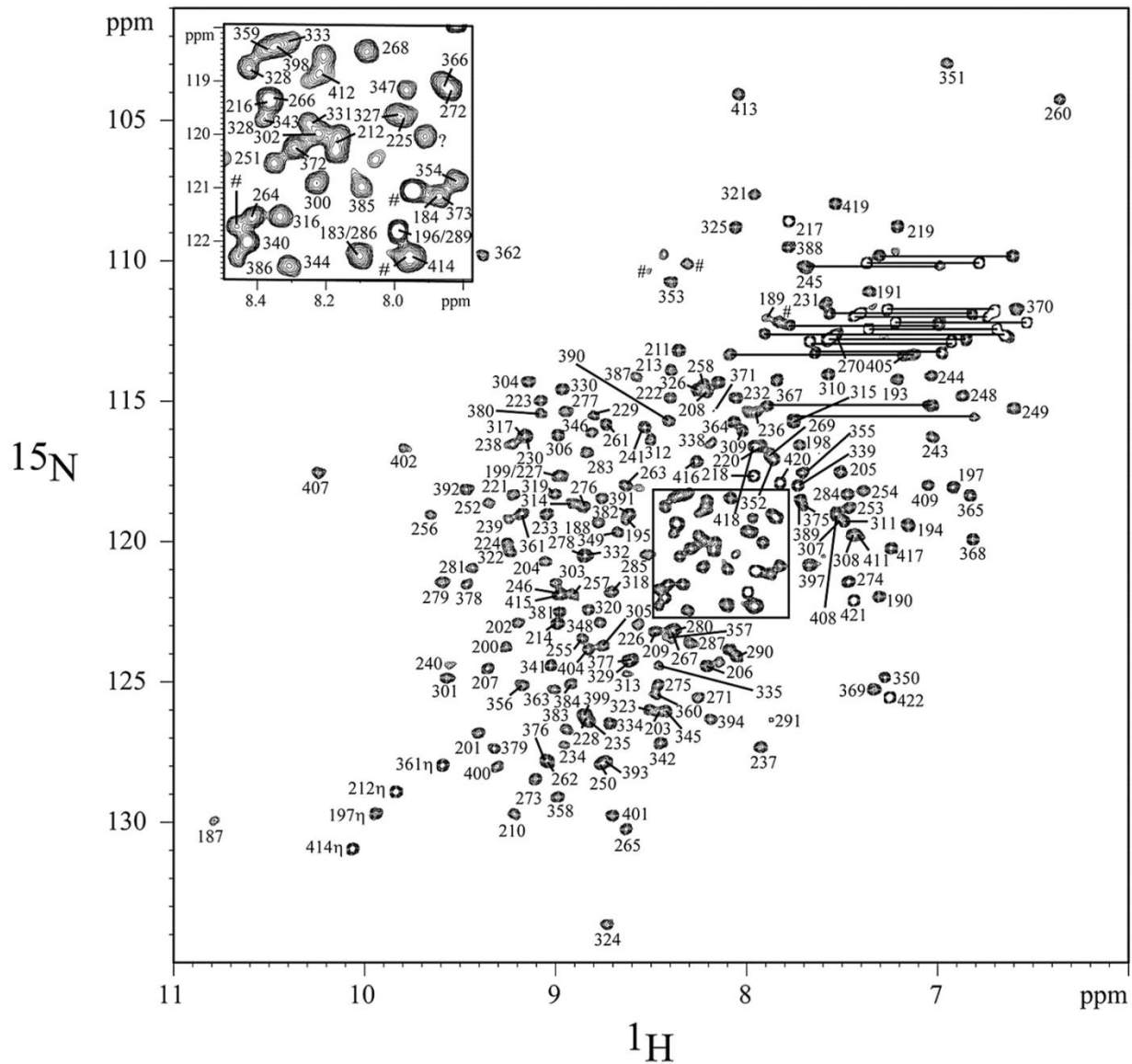
Widma dwu- i trójwymiarowe są rejestrowane, aby zidentyfikować systemy spinowe i przypisać sygnały do poszczególnych reszt

Informacja strukturalna jest uzyskana przez pomiar tzw. efektu jądrowego Overhausera (NOESY)

Pomiary stałych sprzężeń pozwalają zmierzyć kąty w szkielecie fosforanowym RNA

Zmierzone więzy są następnie użyte w protokole minimalizacji struktury dynamiki molekularnej z simulated annealing

Wygenerowana zostaje grupa struktur (ensemble), która spełnia założone więzy



Doświadczenia rozpoczynają się od przygotowania cząsteczek wyznakowanych izotopami ^{13}C and ^{15}N .

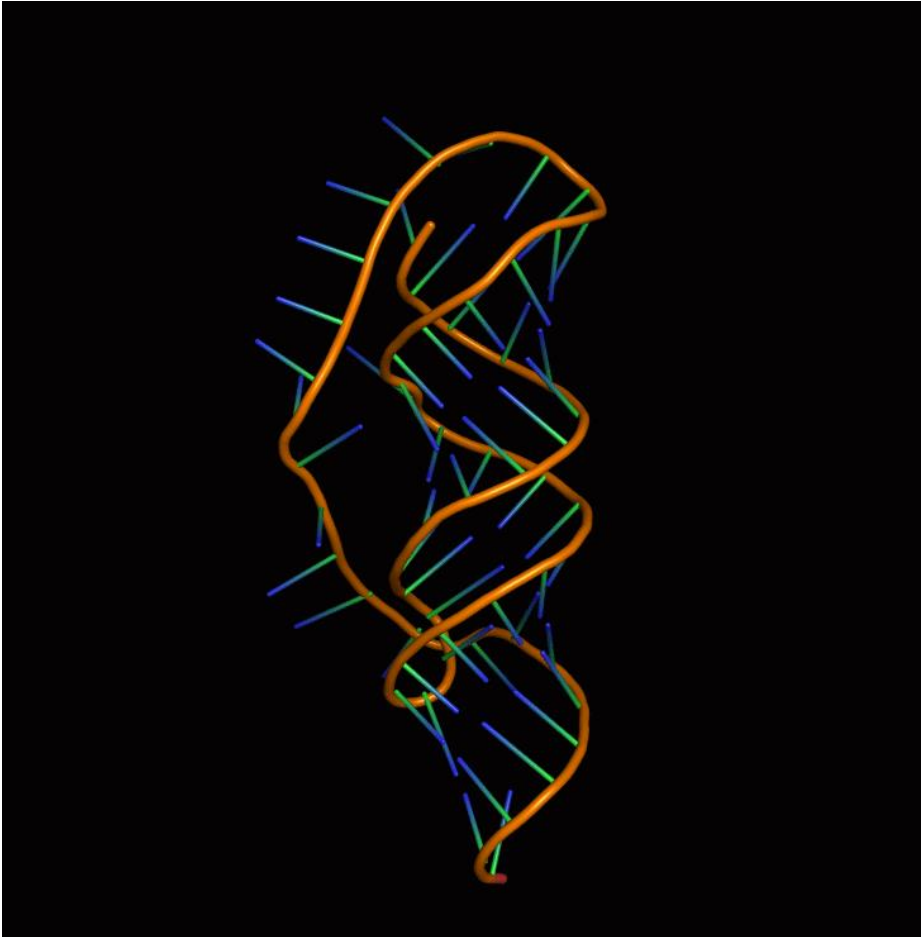
Widma dwu- i trójwymiarowe są rejestrowane, aby zidentyfikować systemy spinowe i przypisać sygnały do poszczególnych reszt

Informacja strukturalna jest uzyskana przez pomiar tzw. efektu jądrowego Overhausera (NOESY)

Pomiary stałych sprzężeń pozwalają zmierzyć kąty w szkielecie fosforanowym RNA

Zmierzone więzy są następnie użyte w protokole minimalizacji struktury dynamiki molekularnej z simulated annealing

Wygenerowana zostaje grupa struktur (ensemble), która spełnia założone więzy



„Klasyczny” NMR dla RNA – ograniczenie do ok. 15 kDa

Ostatnie udoskonalenia NMR dla RNA to zastosowanie resztkowych sprzężeń dipolowych oraz selektywne izotopowe znakowanie RNA – obecny limit to 30 kDa (ok. 100 nukleotydów)

Zaletą NMR jest badanie cząsteczek w roztworze oraz możliwość badania ich dynamiki

Pierwsze struktury RNA rozwiązane NMR-em - 1991

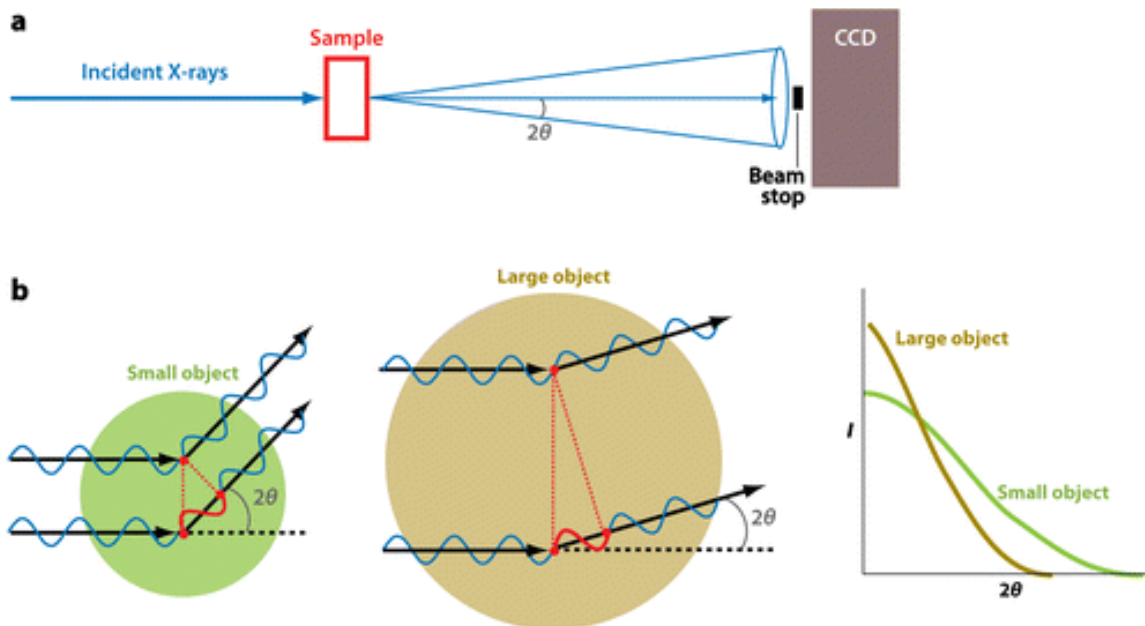
W ogromnej większości dostępne struktury RNA NMRowe to krótkie fragmenty (dupleksy itp.)

SAXS

SAXS

Dostarcza niskorozdzielczej informacji strukturalnej

Zalety: w roztworze, prosty pomiar, pomiary możliwe od kilkunastu kDa do kilku Mda.



Możliwe typy analiz:

Porównanie
teoretycznej krzywej
SAXS z krzywą
doświadczalną

Obliczenie kształtu
cząsteczki

Dokowanie modelu
RNA do kształtu

Określenie kształtu ab initio

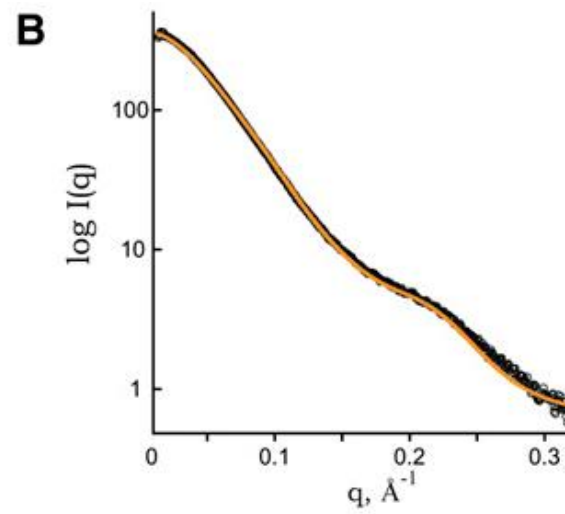
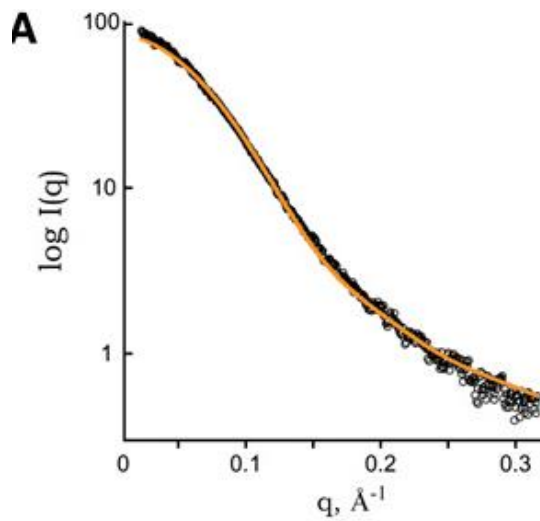
Dana objętość jest wypełniona sferami.

Każda sfera może być przypisana do cząsteczki lub roztworu.

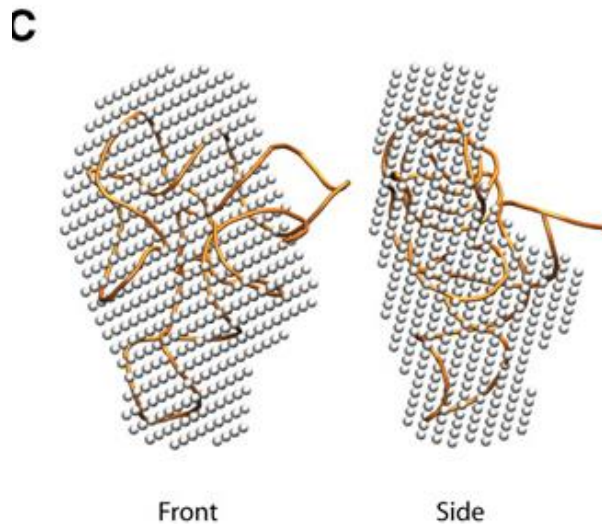
Początkowe przypisania są losowe.

Przypisania są losowo przesuwane, aż zostanie uzyskany kształt odpowiadający krzywej doświadczalnej.

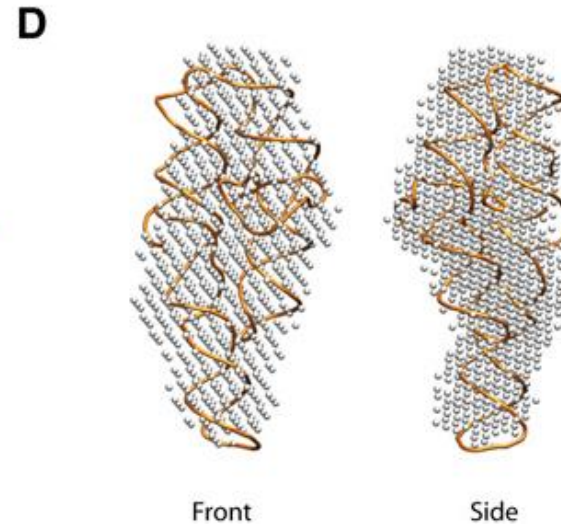
Narzucone mogą warunki, które zapewniają zwartość cząsteczki



$$q = 4\pi(\sin \Theta)/\lambda$$

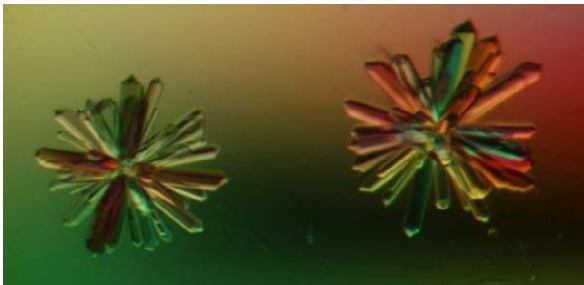
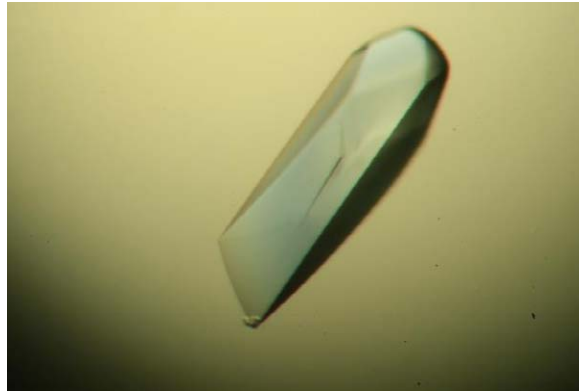
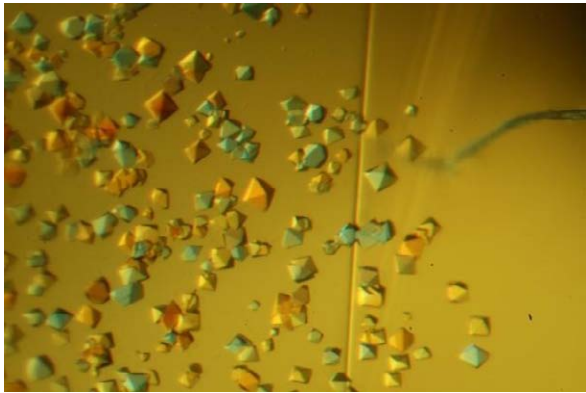


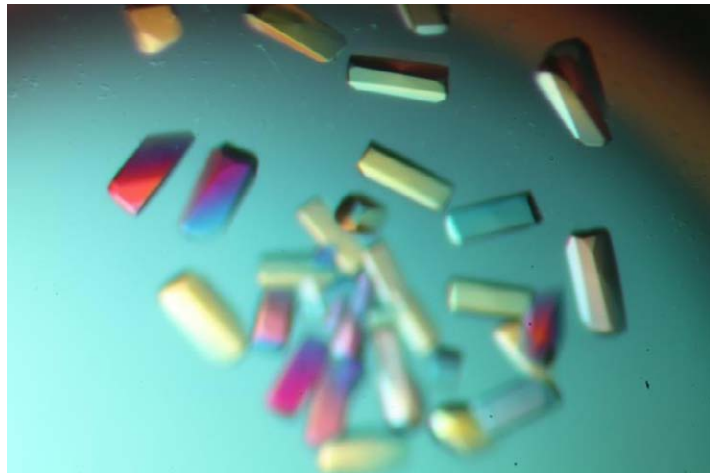
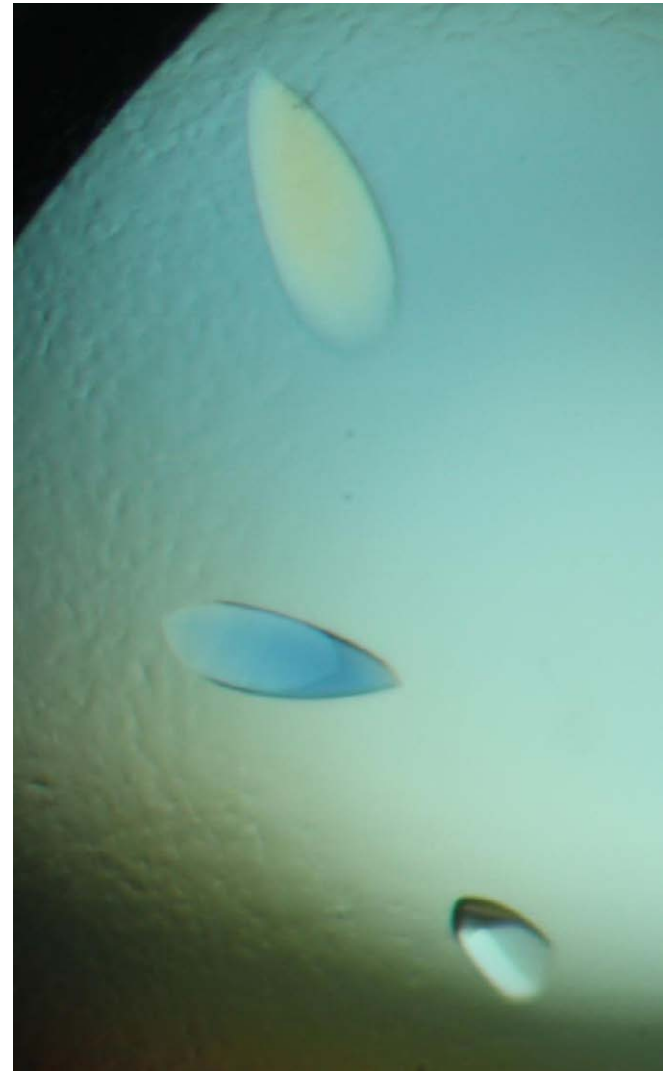
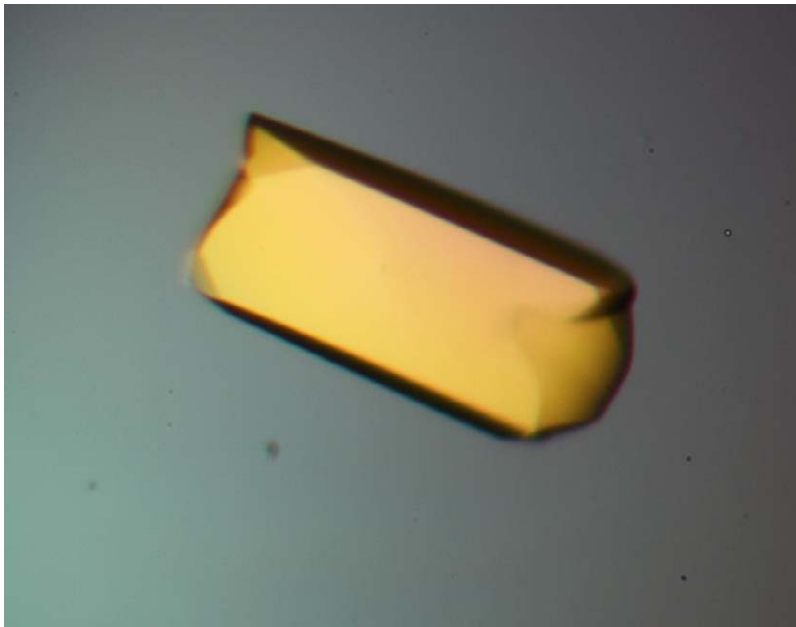
SAM-I
riboswitch

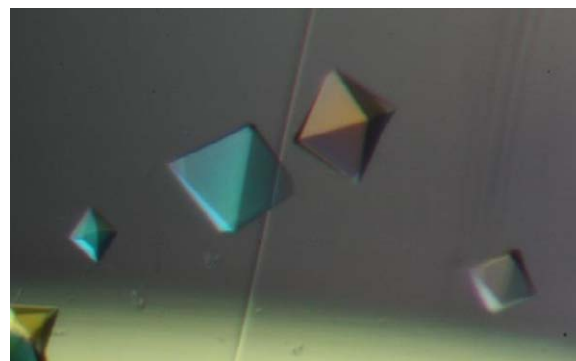
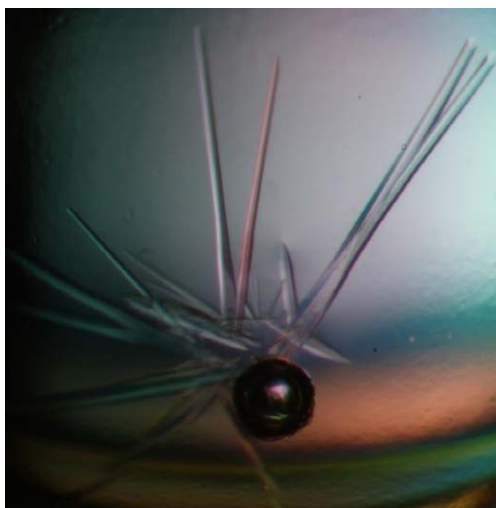
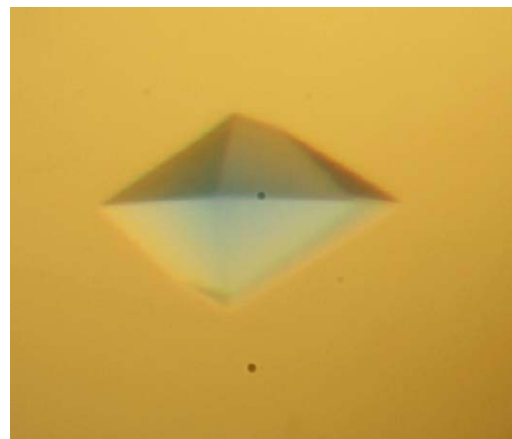
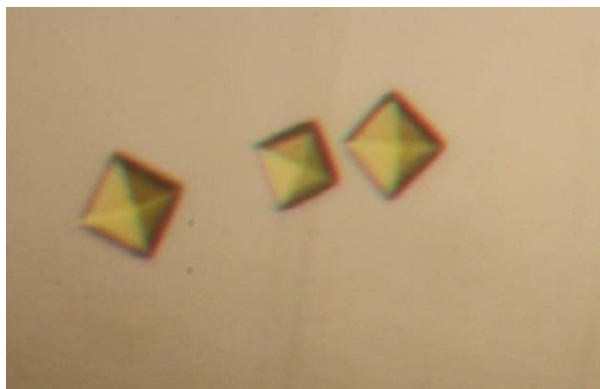


D(C209)P4-P6 domain
of the group I intron

KRYSTALOGRAFIA



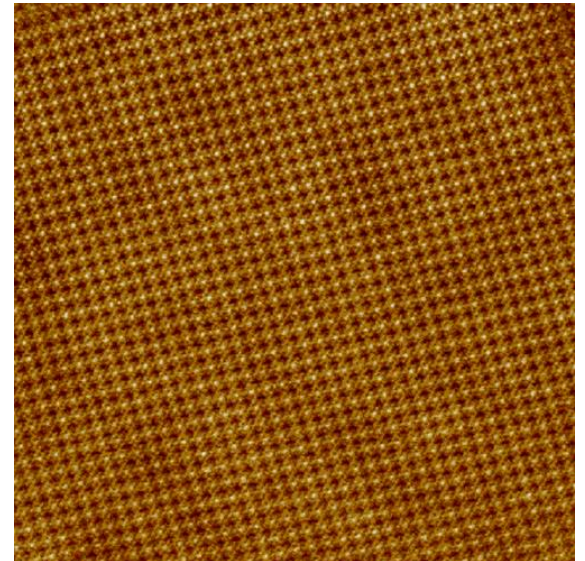
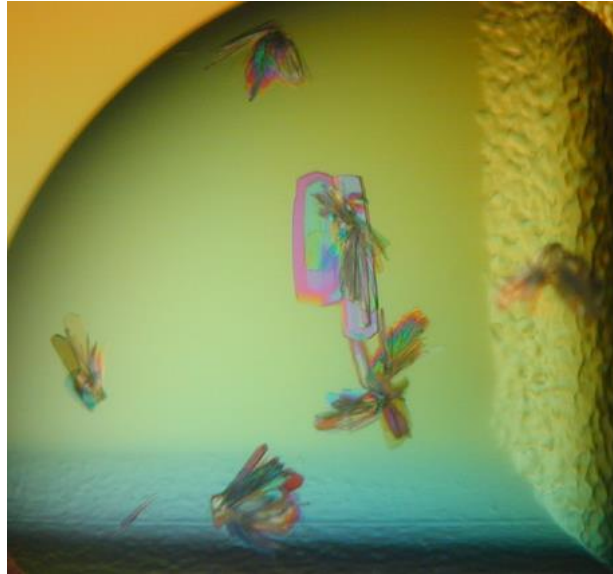
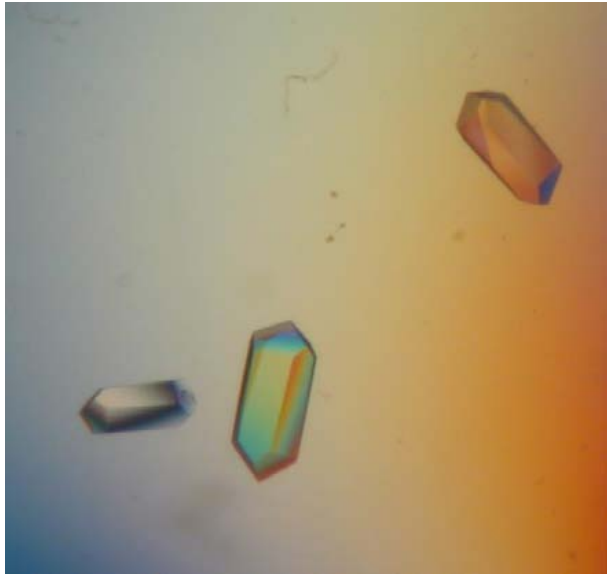




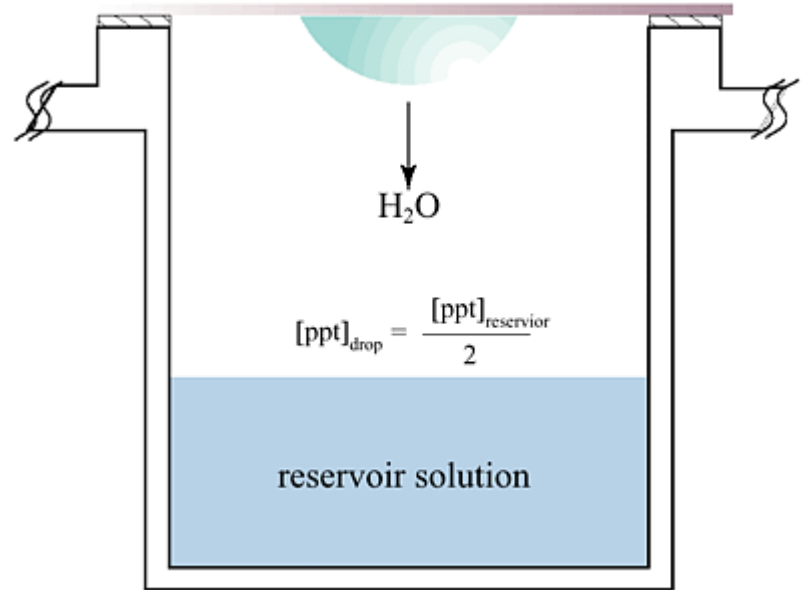
Kryształy dużej podjednostki rybosomu



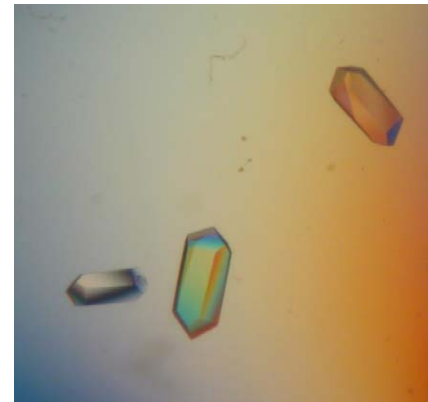
Crystals

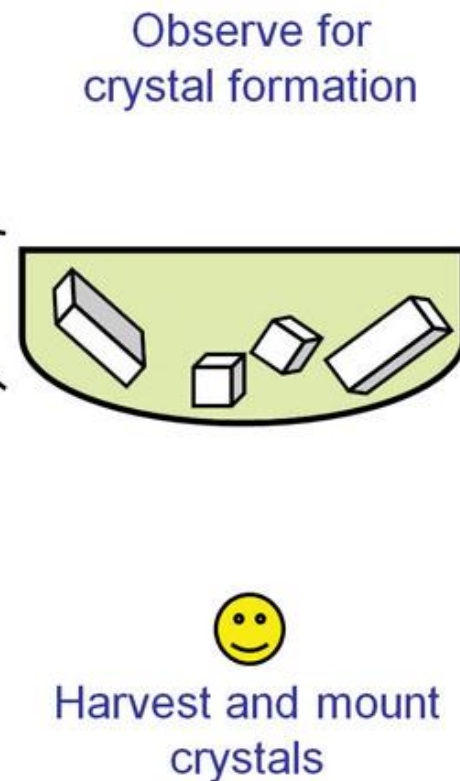
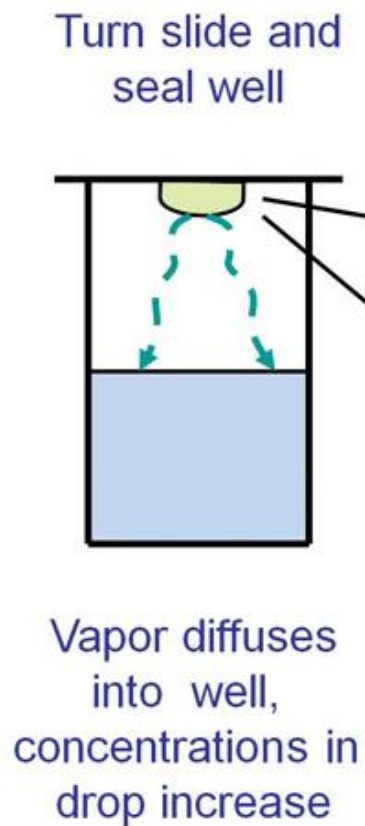
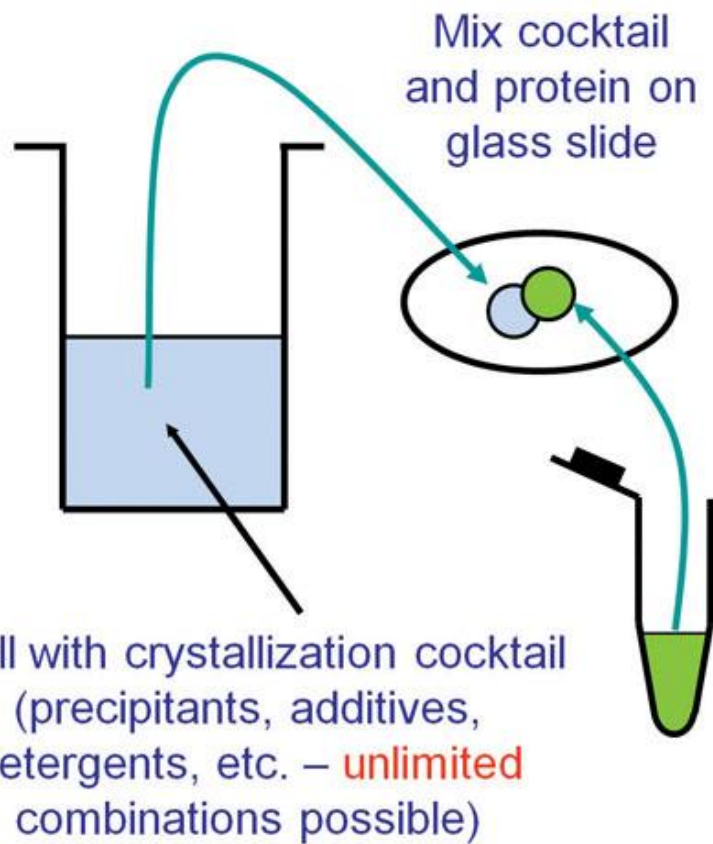


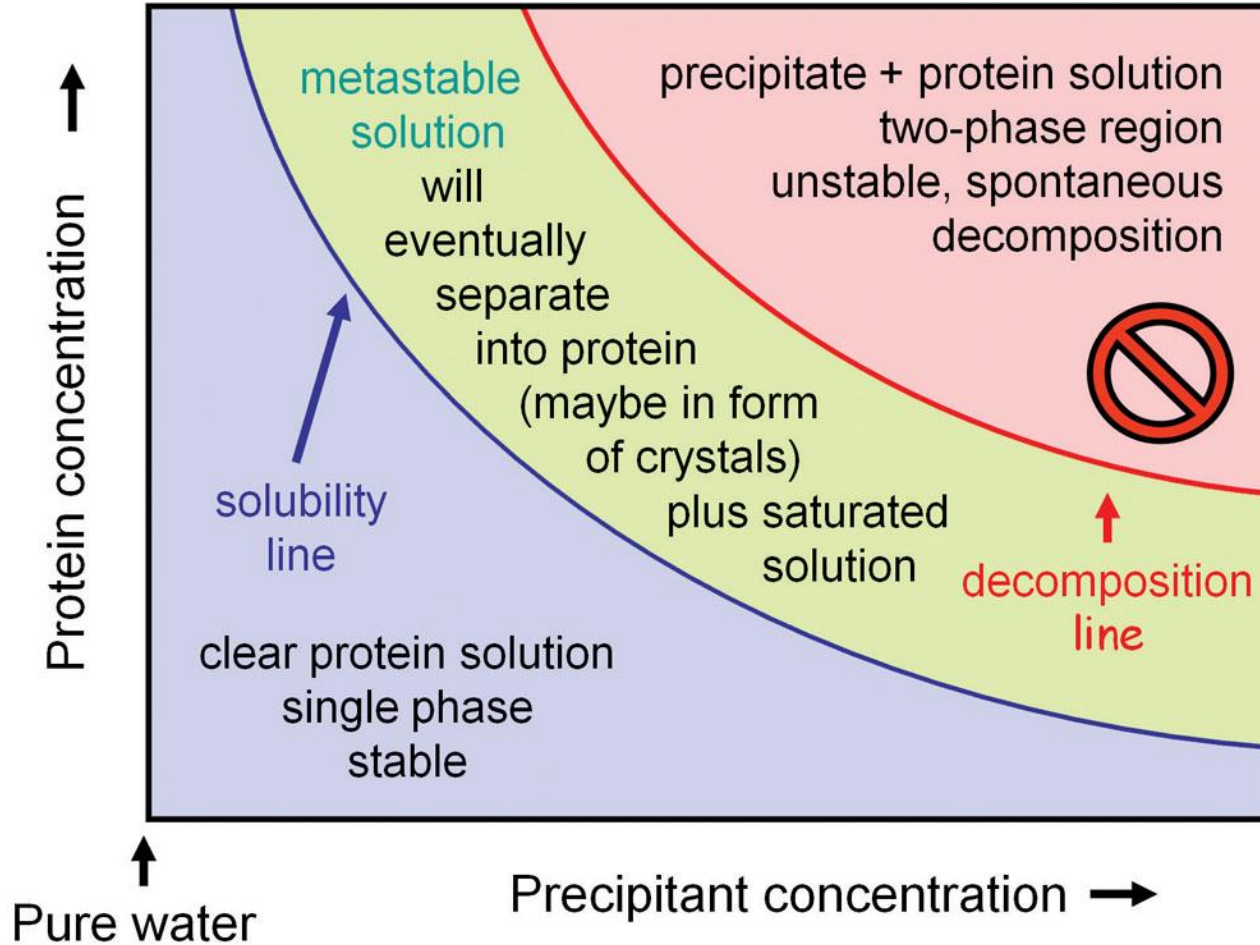
Crystallization



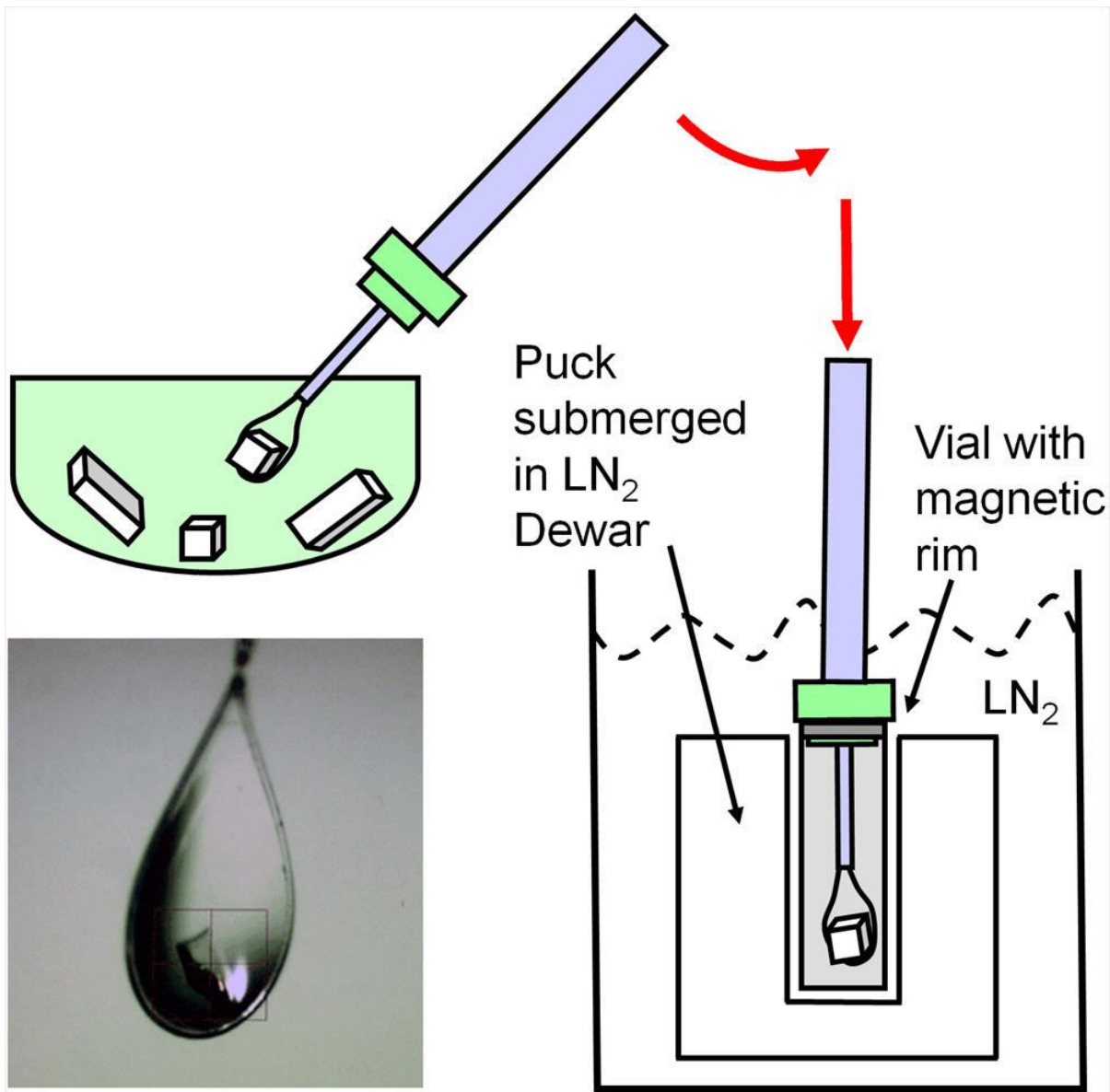
Precipitants:
salts
PEGs
organic solvents







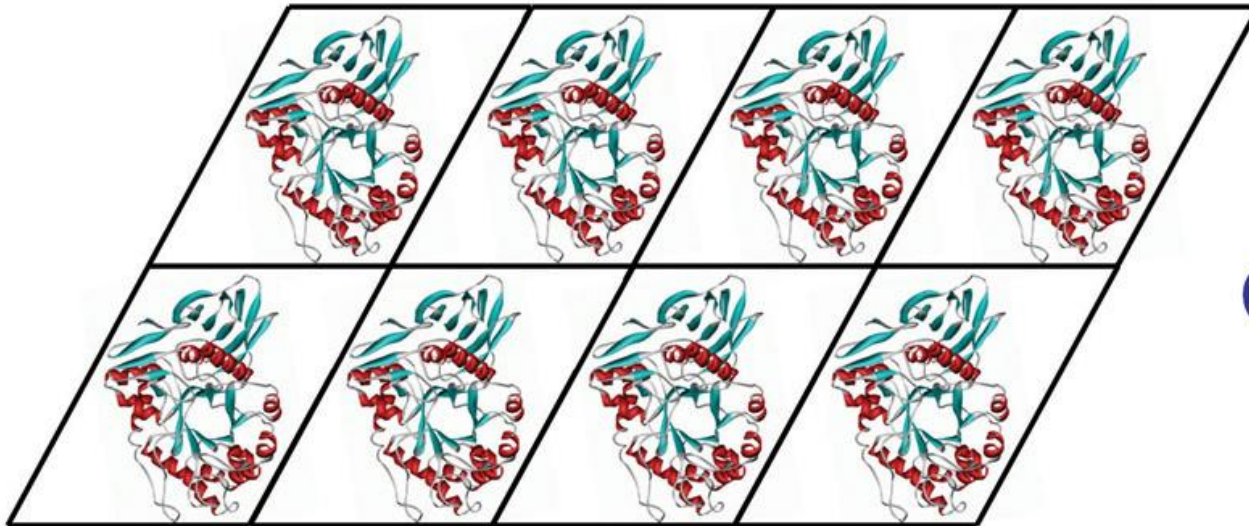
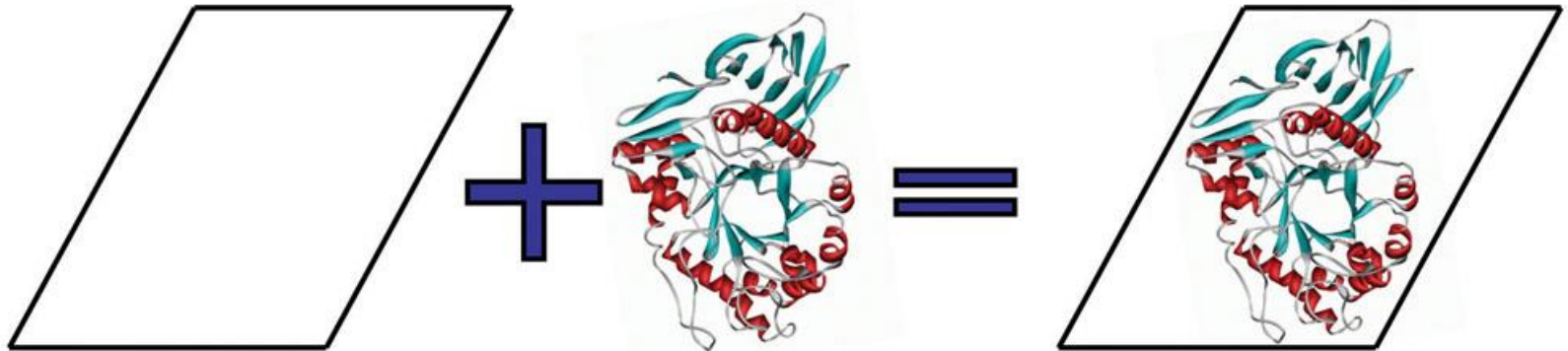




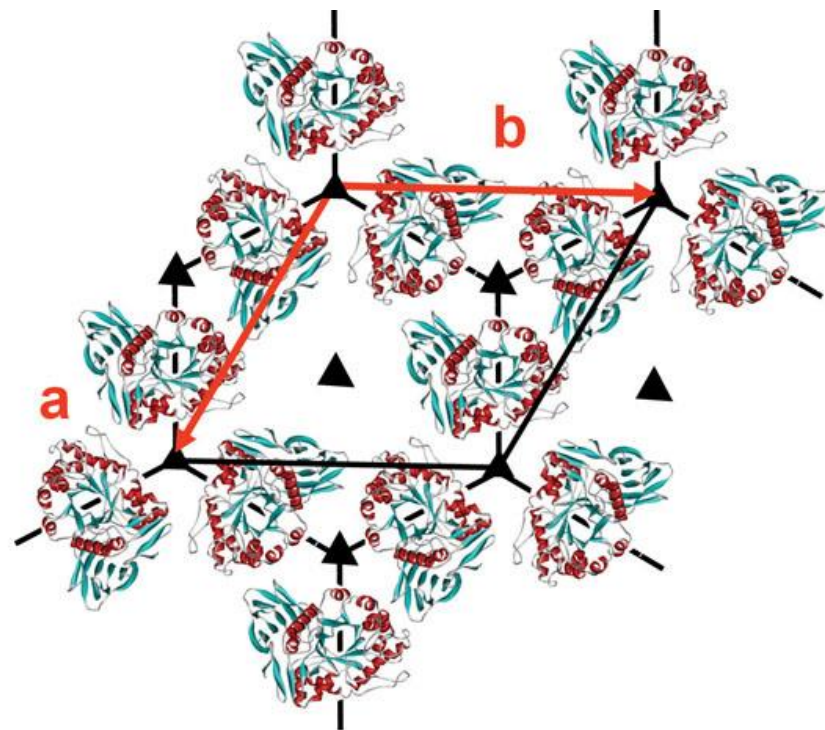
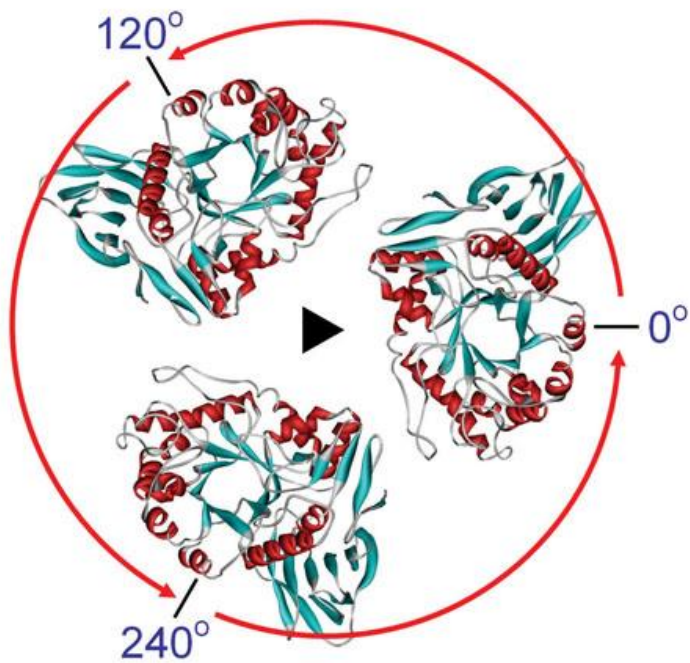
Unit lattice

Motif

Unit cell



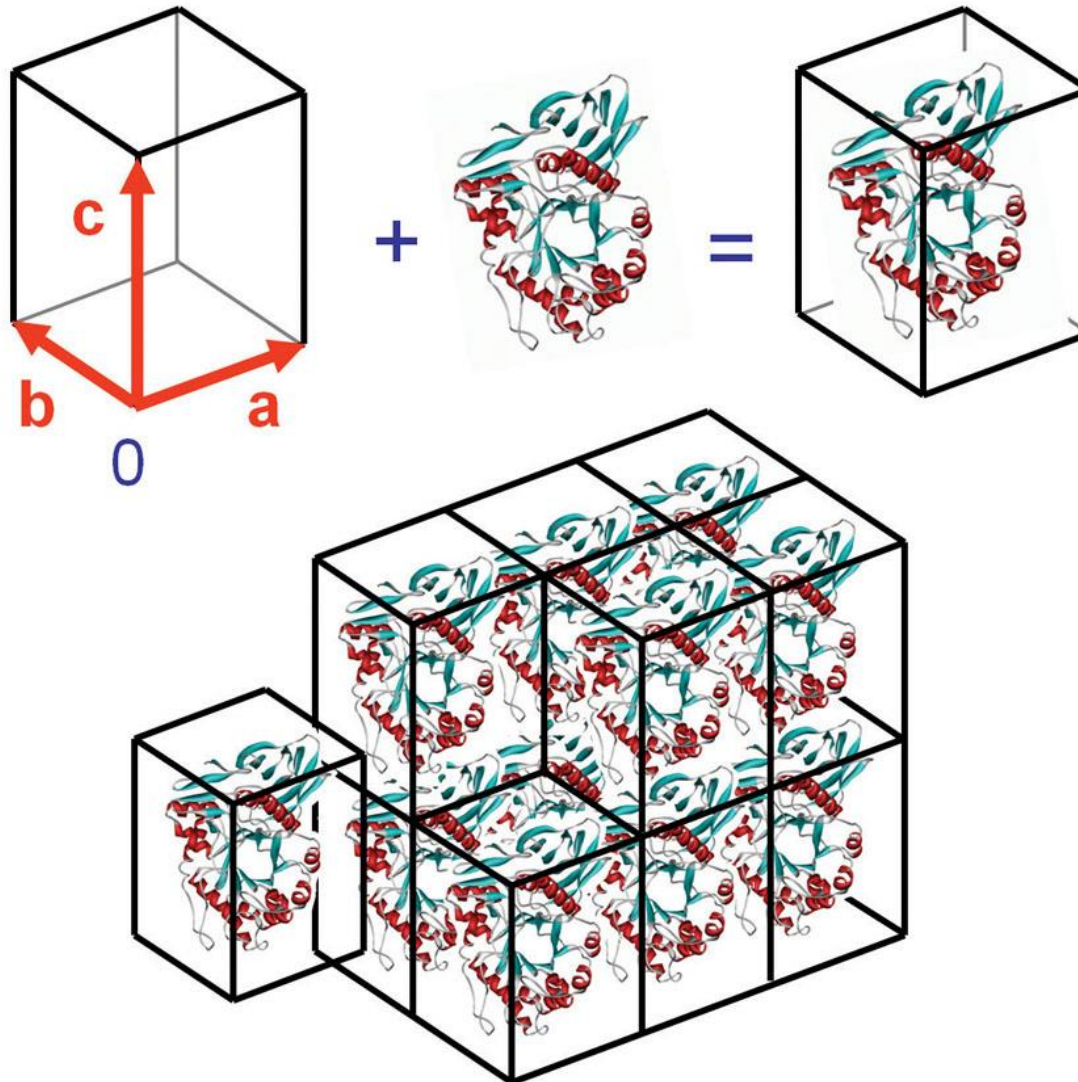
Crystal

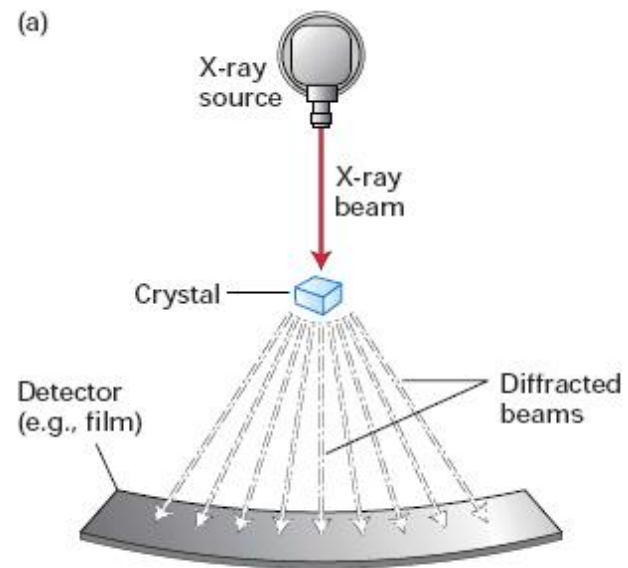
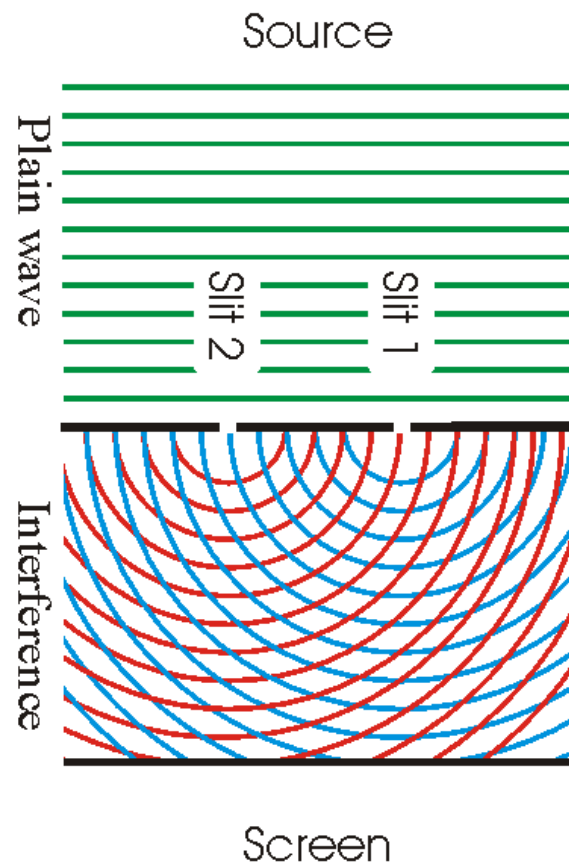


Unit lattice

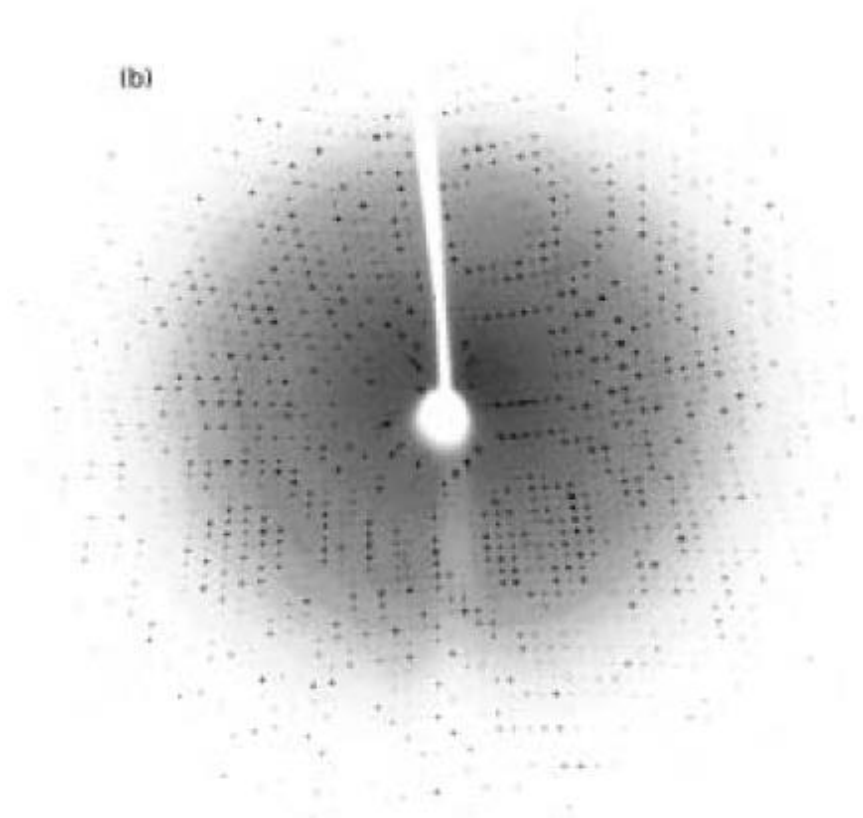
Motif

Unit cell



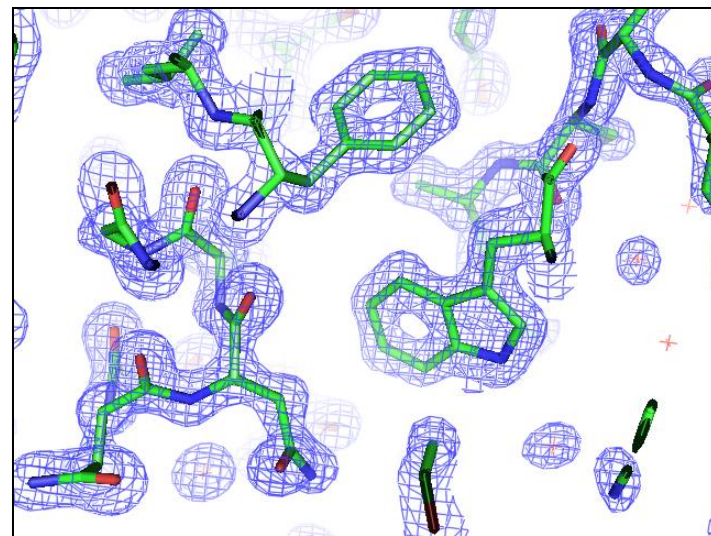
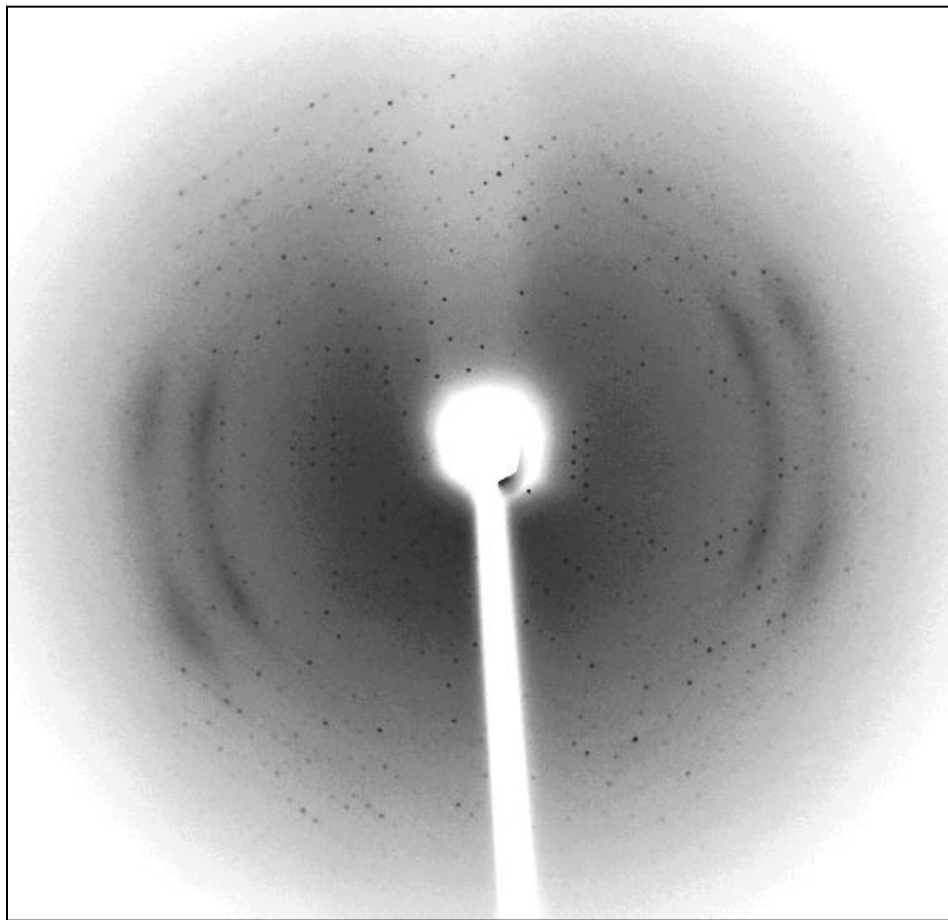


(b)

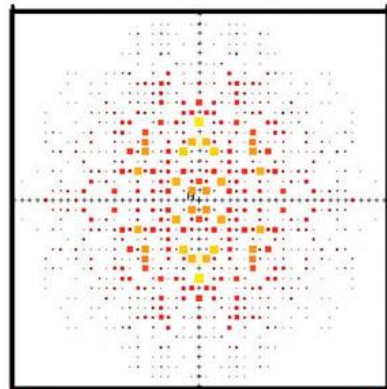
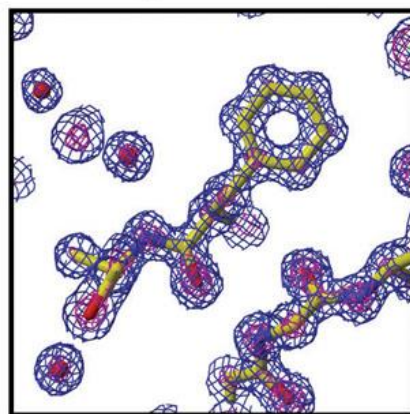
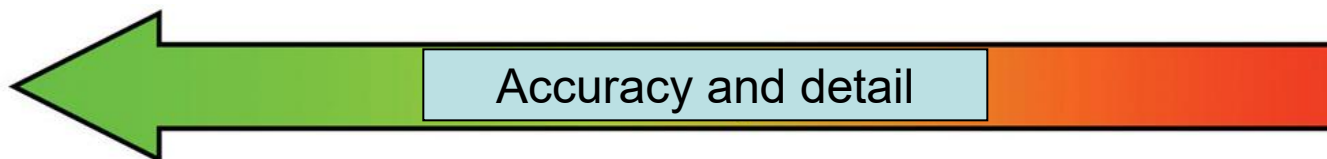




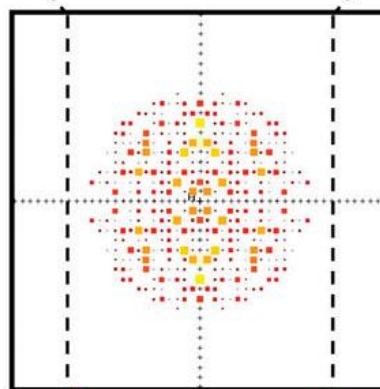
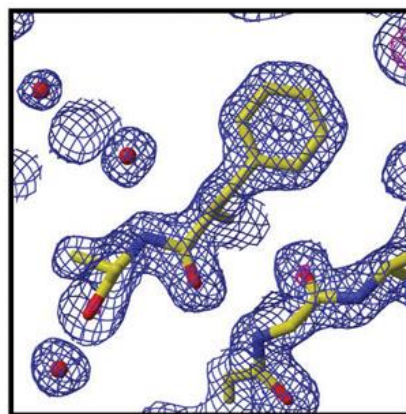
Crystallography



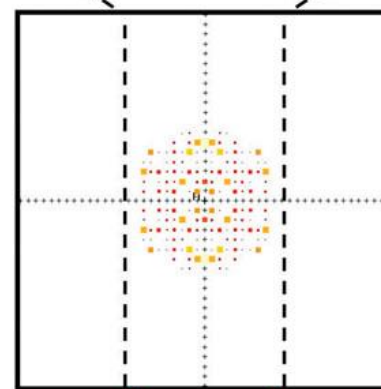
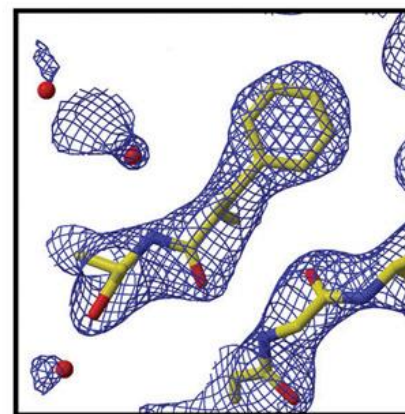
Rozdzielczość: 1,5 Å



1,2 Å



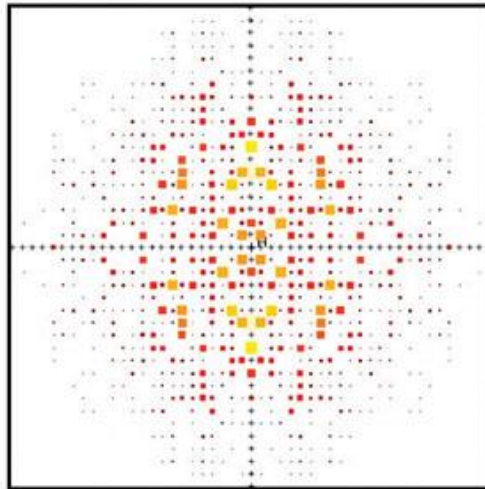
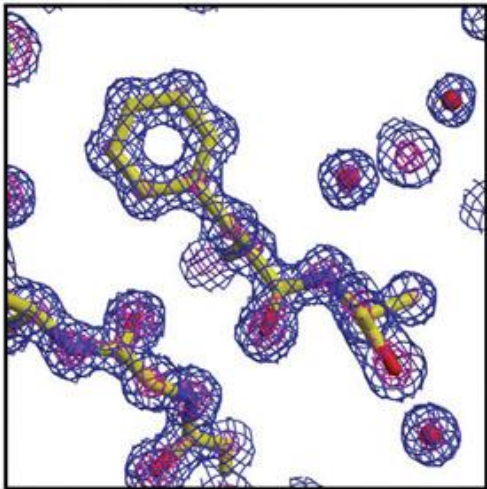
2 Å



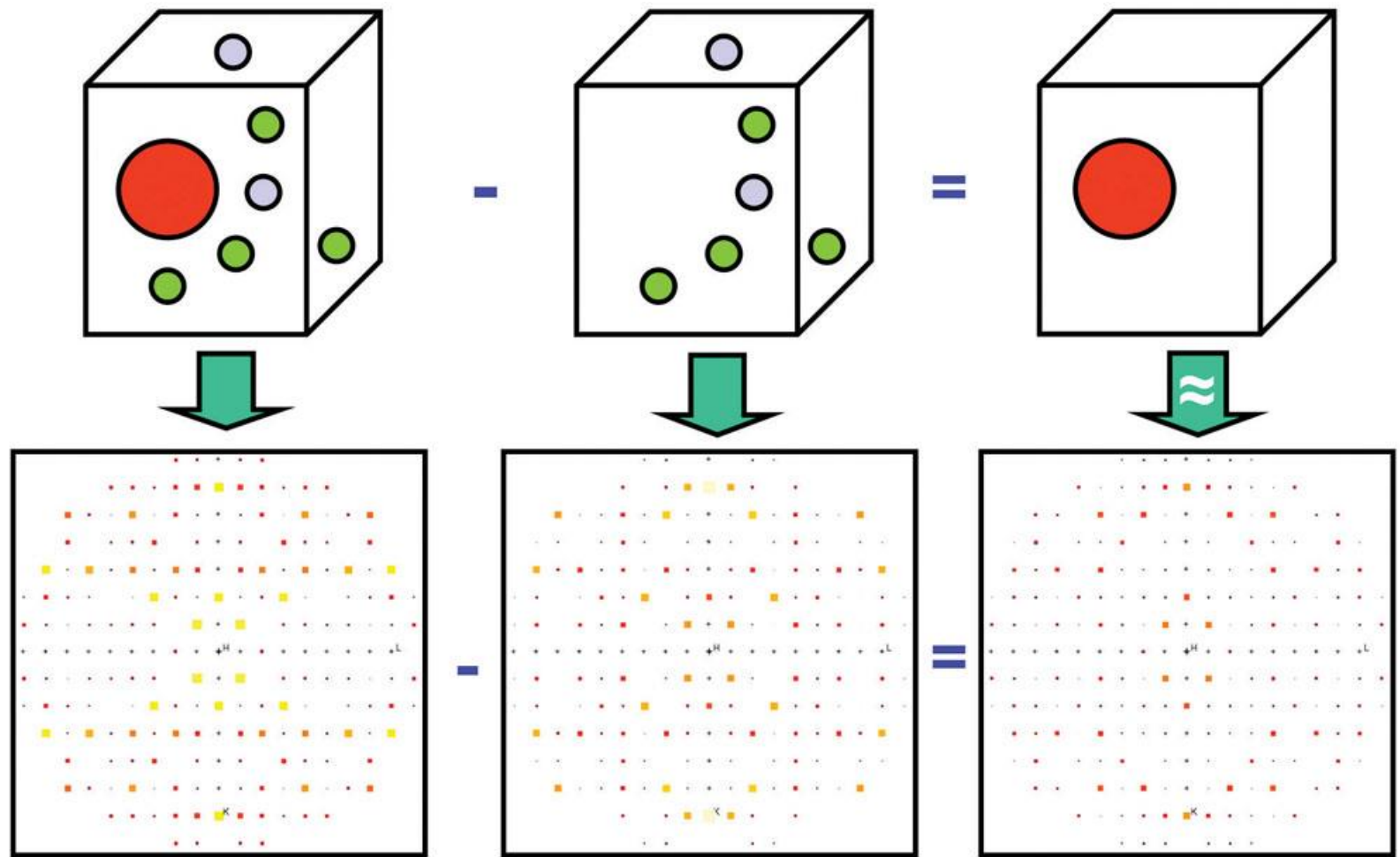
3 Å



$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{-h}^h \sum_{-k}^k \sum_{-l}^l F_{hkl} \cdot \exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})]$$

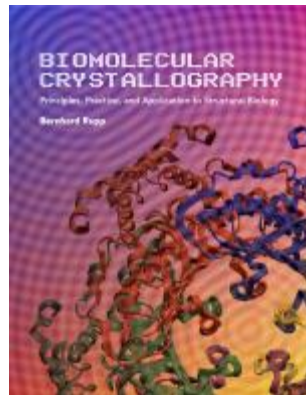


**The crystallographic
phase problem**



Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology

Bernhard Rupp



Krystalografia RNA

Pierwsza struktura – tRNA (1974)

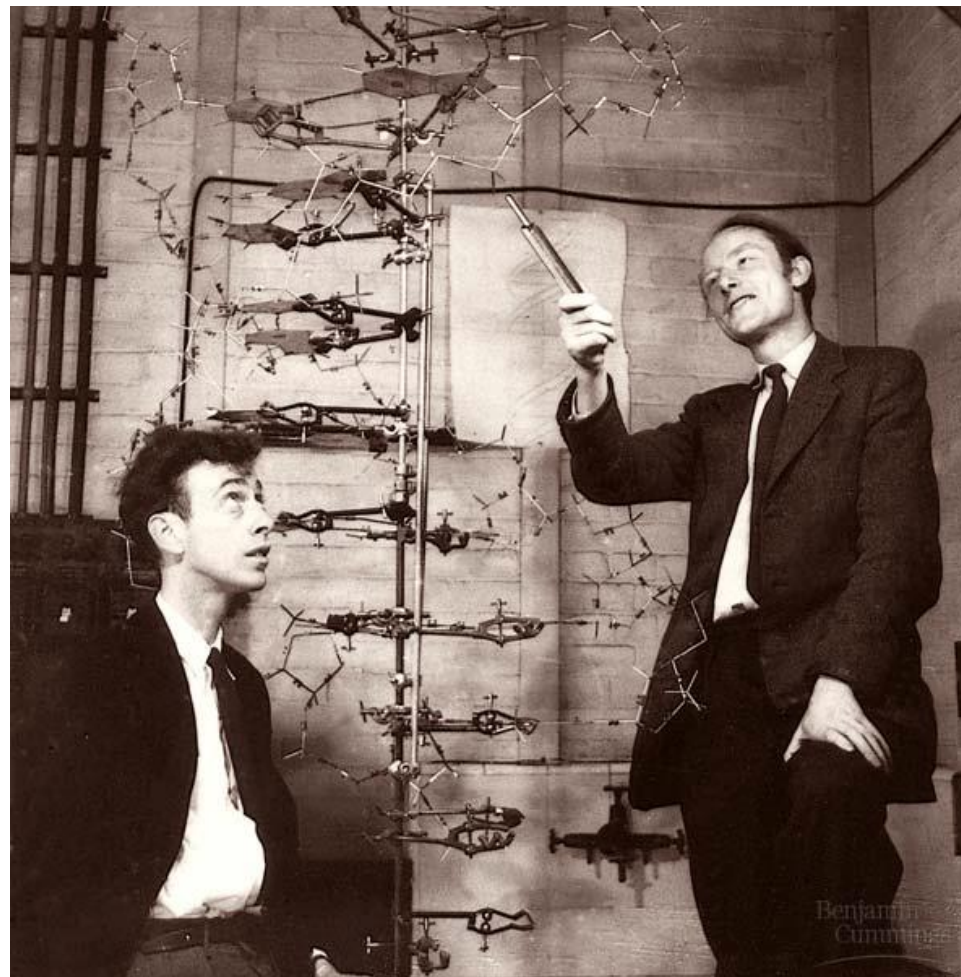
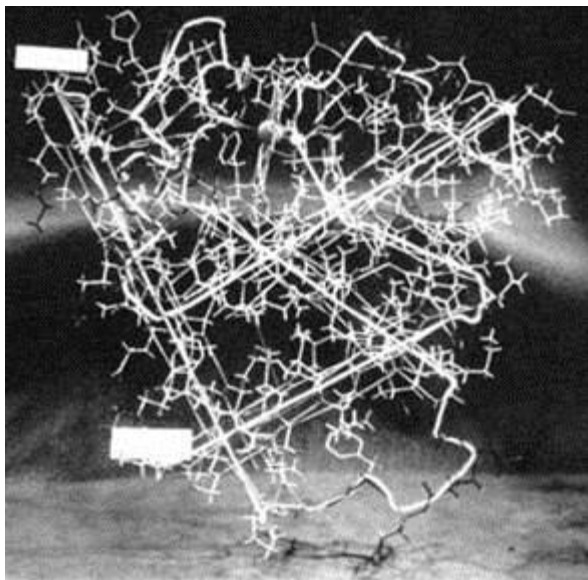
Po roku 2000 – rybosomy, introny grupy I, rybonukleaza P

Ograniczeniem krystalografii jest heterogenność konformacji RNA, co często uniemożliwia uzyskanie kryształów

Krystalizacja RNA trudna – z około 80000 rozwiązanych struktur około 1000 samego RNA oraz 1000 kompleksów RNA-białko

Dedykowana baza struktur kwasów nukleinowych Nucleic Acid Database (ndbserver.rutgers.edu)

Pozwala na identyfikację powtarzających się motywów



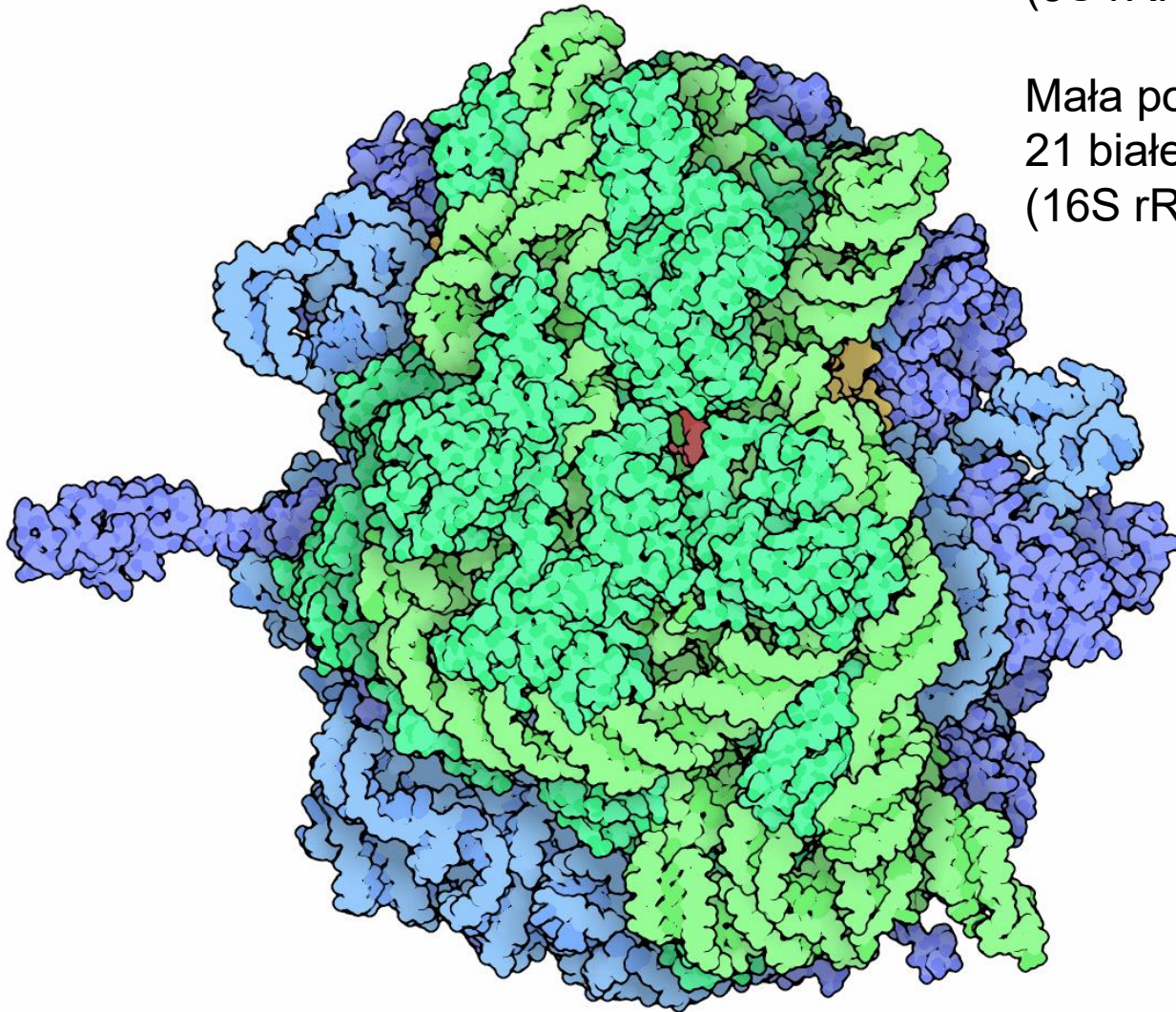
PRZYKŁADY

Rybosom

U prokariotów występują
rybosomy 70S

Duża podjednostka (50S) zawiera
34 białka i dwie cząsteczki rRNA
(5S rRNA i 23S rRNA),

Mała podjednostka (30S) zawiera
21 białek i jedną cząsteczkę rRNA
(16S rRNA).



Rybosom

Bakteryjny rybosom złożony z podjednostek 30S i 50S

Elastyczna nanomaszyna, która przyjmuje wiele konformacji podczas cyklu syntezy wiązania peptydowego

Pierwsze rekonstrukcje struktury rybosomu na podstawie EM w latach 70-tych, pierwsze szczegółowe ok. roku 1995 (Joachim Frank, Holger Stark)

EM dostarczyło wiele informacji o kompleksach rybosomu z tRNA, mRNA czynnikami elongacji oraz o zmianach konformacji rybosomu podczas jego cyklu

Struktury EM dostępne są obecnie dla m. in. dla bakteryjnych, drożdżowych, a także ssaczych rybosomów

Pierwsze kryształy rybosomów bakteryjnych rozpraszających promieniowanie Rentgena uzyskano w późnych latach 80-tych (Ada Yonath)

W roku 1991 zaprezentowano kryształy 50S, które rozpraszają do ok. 3 Å.

W roku 2000 opublikowano pierwszą strukturę dużej podjednostki z *H. marismortui* (T. Steitz)

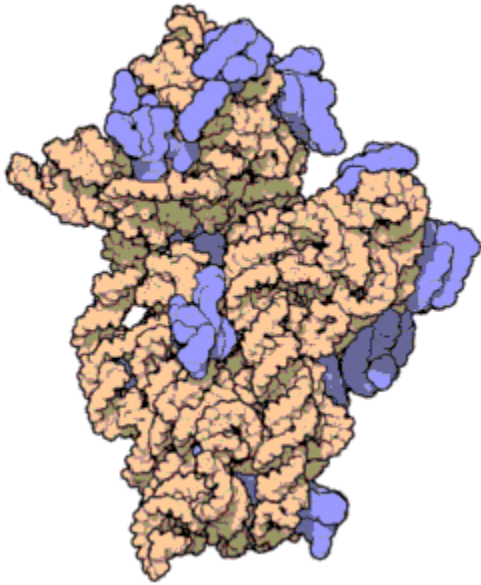
W roku 2001 struktura całego rybosomu z *T. thermophilus* (H. Noller)

Obecnie dostępne wiele struktur kompleksów z tRNA, czynnikami pomocniczymi oraz antybiotykami

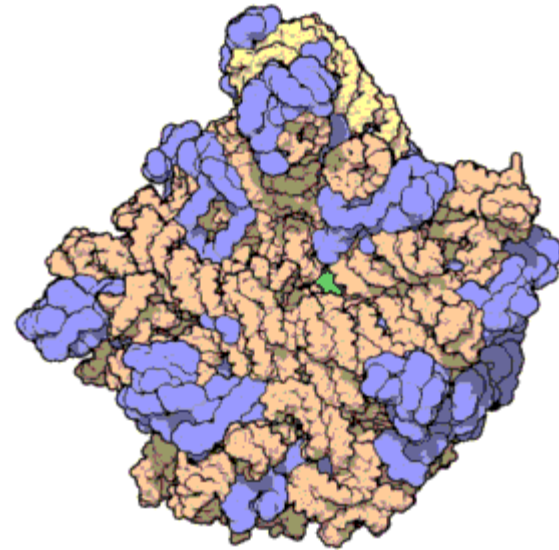
Nagoda Nobla 2009 – Steitz, Yonath, Ramakrishnan

2010 – Struktury rybosomów eukariotycznych

2014 – Struktury rybosomów mitochondrialnych



Atomic structure of the 30S Subunit from [*Thermus thermophilus*](#). Proteins are shown in blue and the single RNA strand in orange. It is found by MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England.



Atomic structure of the 50S Subunit from [*Haloarcula marismortui*](#). Proteins are shown in blue and the two RNA strands in orange and yellow.^[13] The small patch of green in the center of the subunit is the active site.

THE RACE TO DECIPHER
THE SECRETS OF THE
RIBOSOME

GENE MACHINE

VENKI
RAMAKRISHNAN

WINNER OF THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY

"Ramakrishnan's writing is so honest, lucid, and engaging
that I could not put this book down until I had read to the very end."

—SIDDHARTHA MUKHERJEE

Projektowanie leków

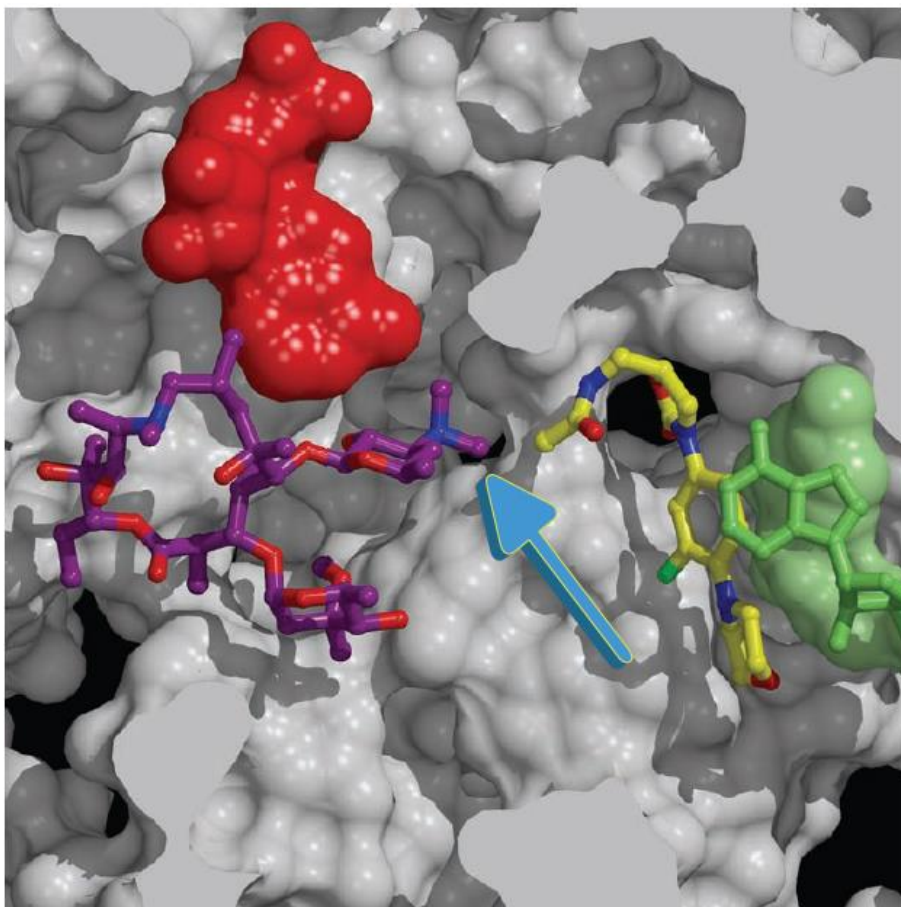


Fig 1. The x-ray crystallographic structures of azithromycin (purple) and linezolid (yellow) as bound to the 50S ribosomal subunit. The arrow indicates the key chemical handle, the nitrogen of the desosamine sugar.

Melinta Therapeutics

MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

Główną siłą EM jest możliwość wizualizowania dużych, mobilnych kompleksów – nie ma górnej granicy rozmiaru

Możliwa jest analiza mobilnych kompleksów – klasyfikowanie różnych konformacji cząsteczek

Dla cryo-EM osiągane są rozdzielczości do 2.2 Å

EM okazało się bardzo przydatnym narzędziem do badań rybosomów, w tym szczególności ich ruchów w cyklu syntezy wiązania peptydowego

Szczególnie użyteczne mogą być metody hybrydowe – połączenie niskorozdzielczych struktur EM i wysokorozdzielczych struktur krystalograficznych

Rewolucja w EM od roku 2012

Electron microscopy

2017 Nobel Prize in Chemistry



Richard Henderson

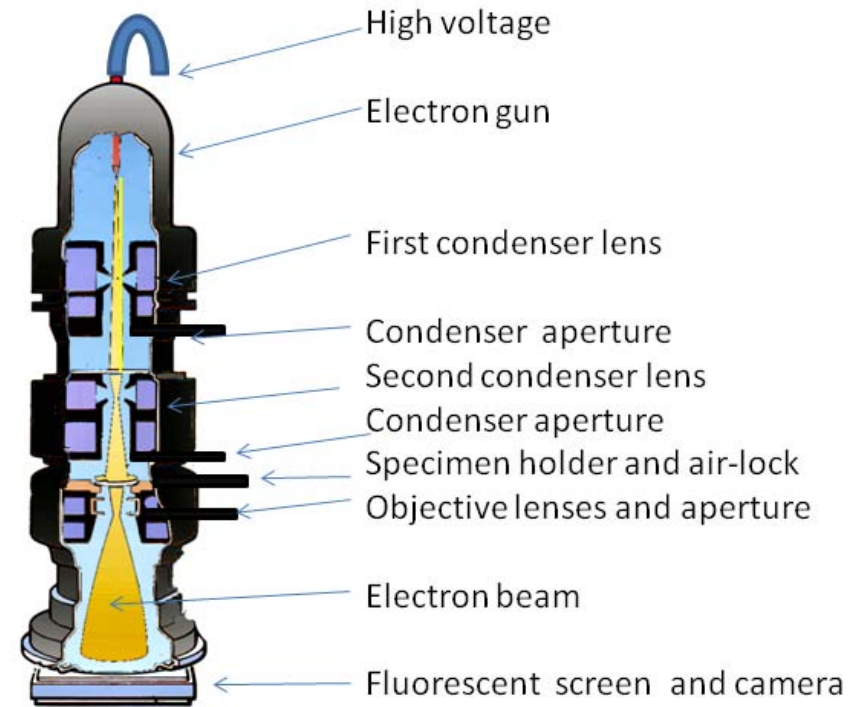


Joachim Frank



Jacques Dubochet





Transmission Electron Microscope

TEM microscope at 300 kV – corresponding wavelength 0.2 Å

EM lenses are poor



JEOL CRYO ARM 300



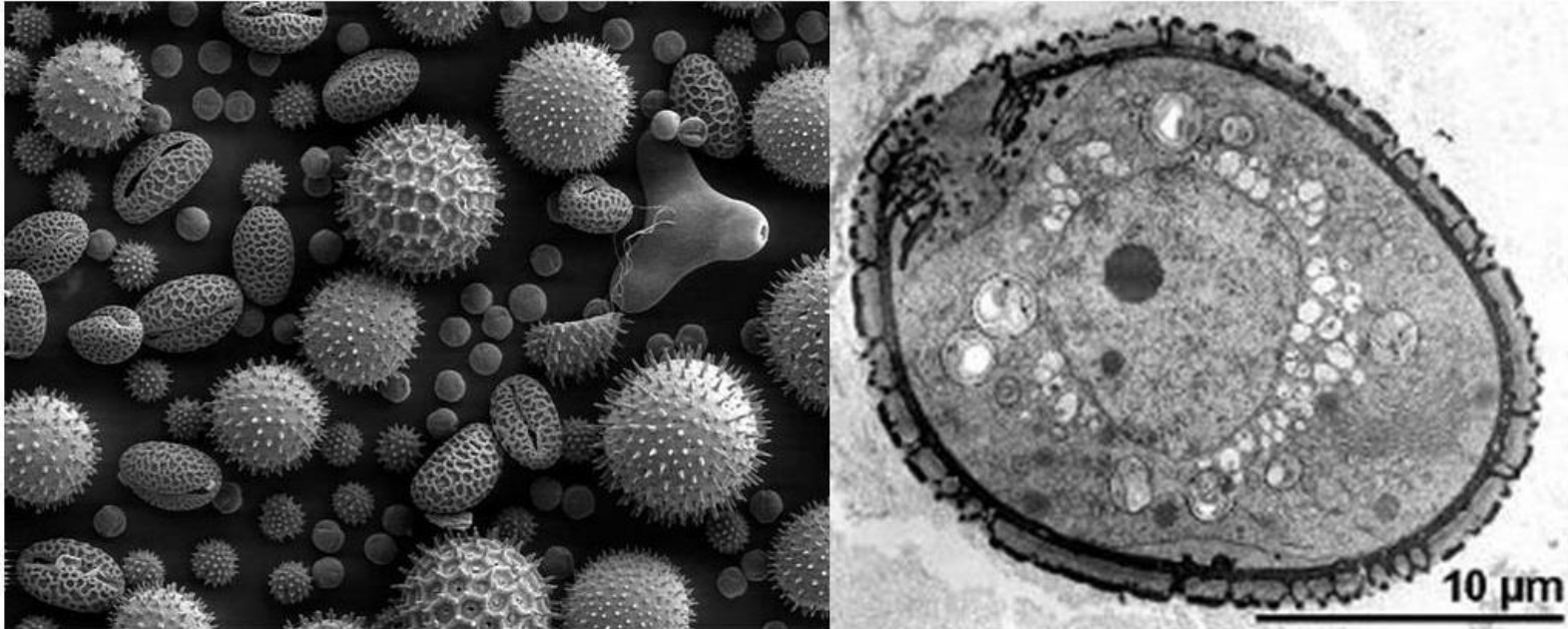
FEI TALOS ARCTICA



TITAN KRIOS

TEM vs SEM

Pollen grain under SEM and TEM



Scanning Electron Microscope (SEM) vs Transmission Electron Microscope(TEM)

www.majordifferences.com

SEM (Scanning Electron Microscope):

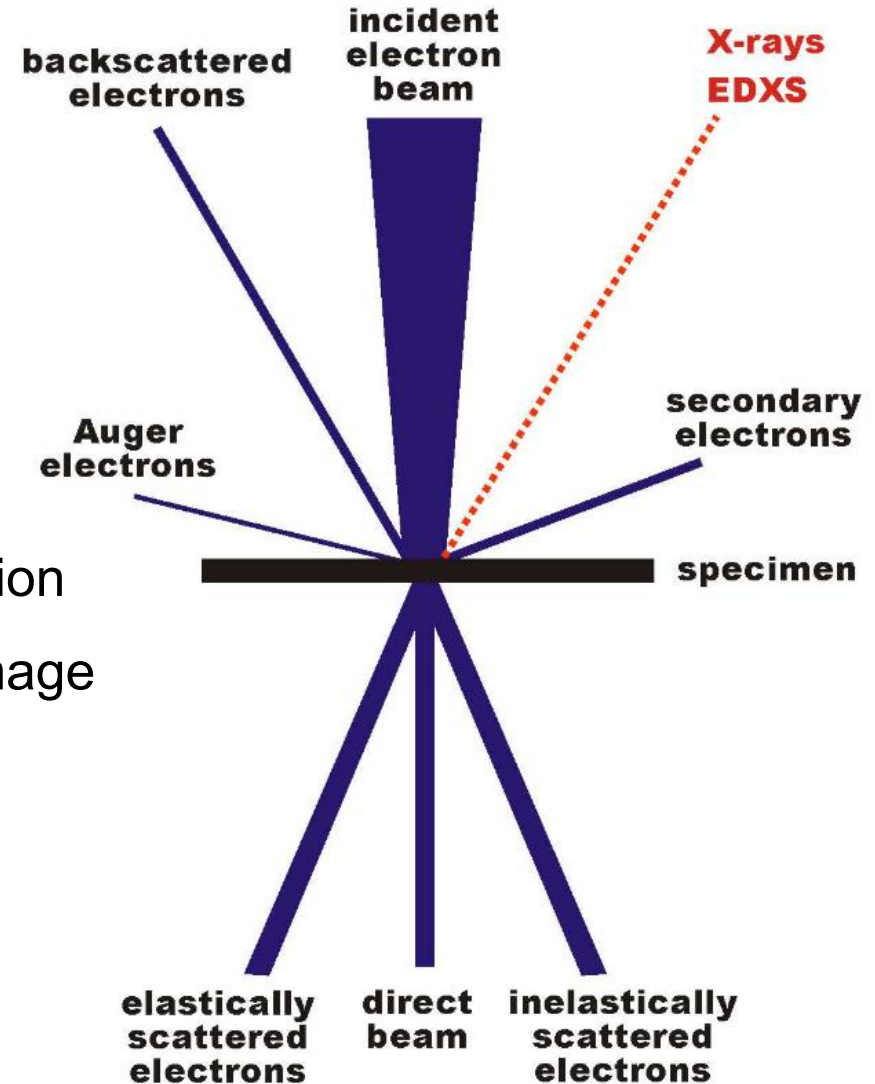
- Based on scattered electrons
- surface and composition
- 3D shape
- Lower resolution

TEM (Transmission Electron Microscope):

- Based on transmitted electrons
- Internal structure/composition
- 2D projection
- Higher resolution

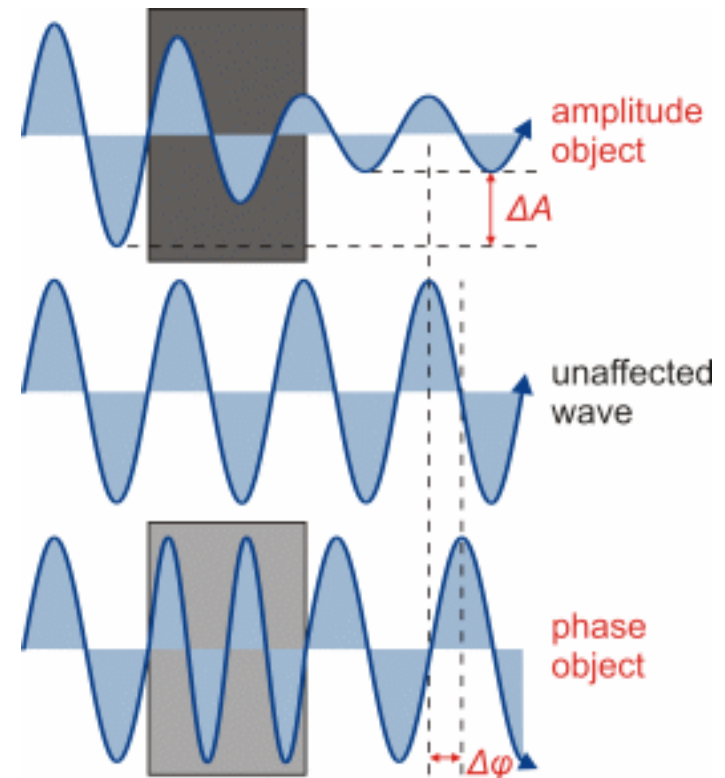
Electrons vs matter

- Coulombic interactions
 - with electrons AND nucleus
- SEM:
 - secondary electrons
- TEM: electrons scattered:
 - elastically → image formation
 - inelastically → radiation damage
- Sources of contrast in TEM:
 - Amplitude contrast
 - Phase contrast

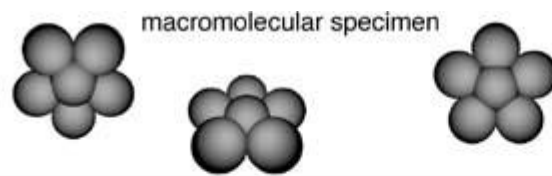


Contrast – summary

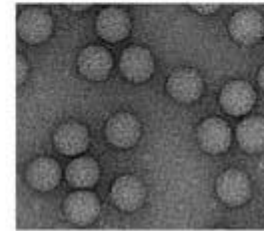
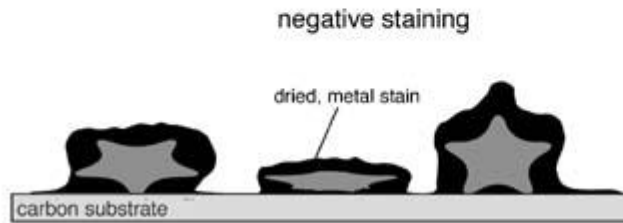
- Amplitude contrast (=mass/scattering contrast)
 - deflected electrons lead to regions of reduced amplitude
 - applicable to strongly scattering and thick samples
- Phase contrast
 - changes in the wavefront phases
- Detectors can only record amplitudes
 - in a in focus and perfect (aberration free) optical system phase objects are invisible to detectors
 - amplitude contrast can be achieved by introducing interferences in the wavefront
 - → defocus!!!



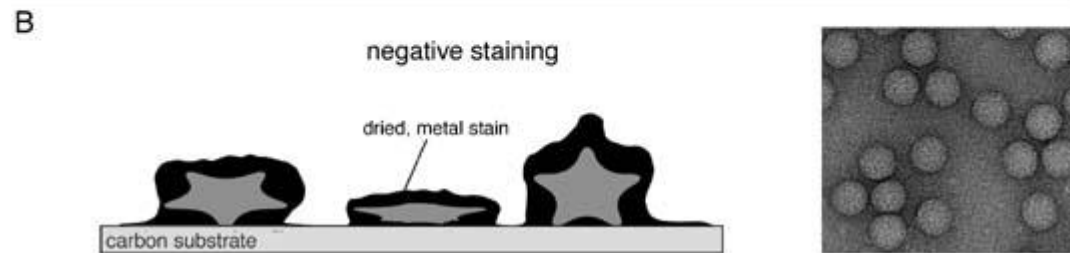
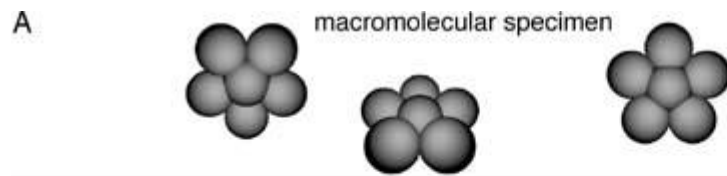
A



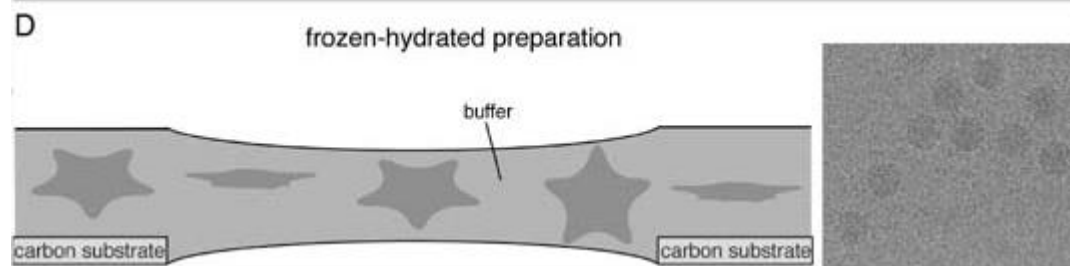
B



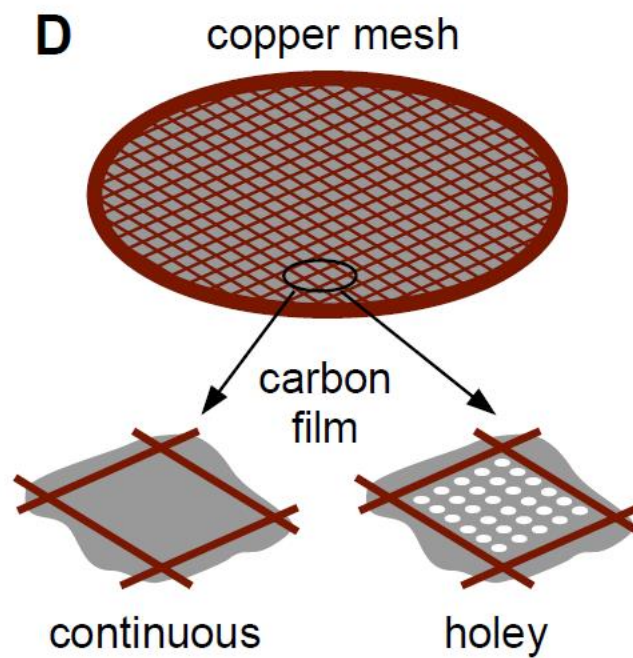
Negative stain



Negative stain

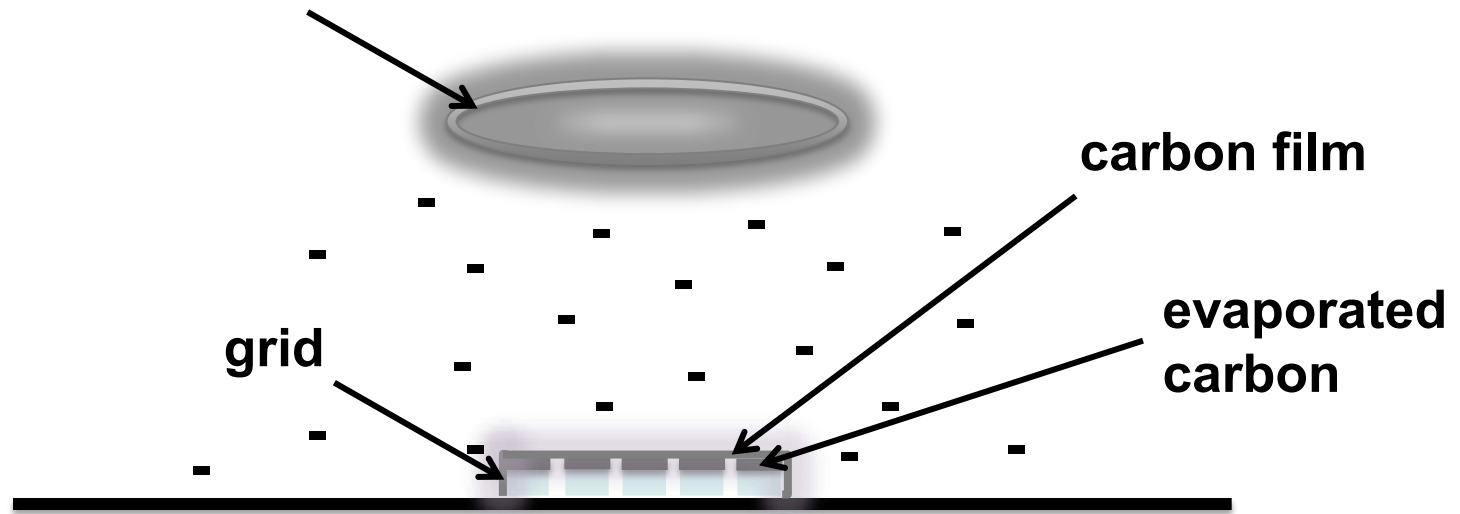


Cryo-EM

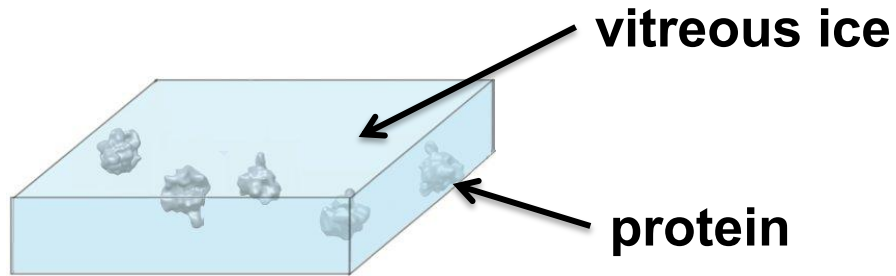


Grid pretreatment – glow discharge

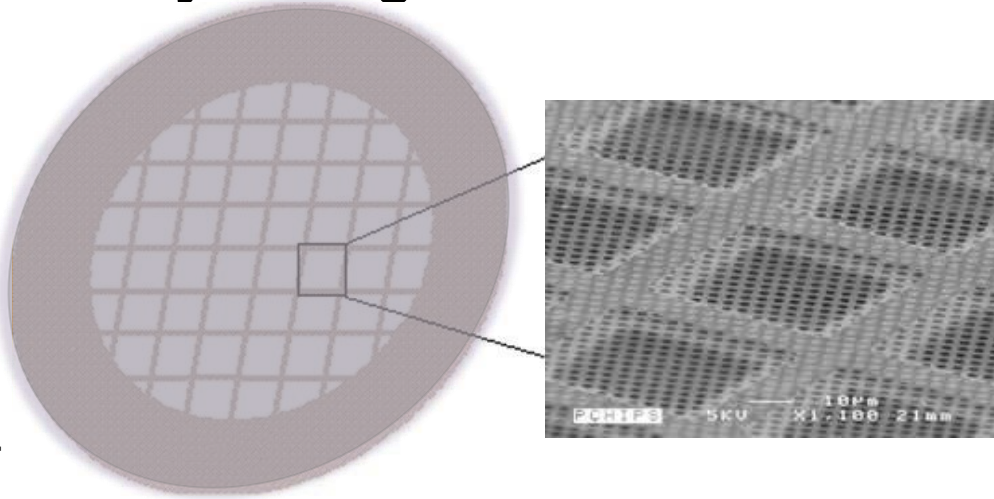
glowing loop



Preparation of cryo-EM specimen

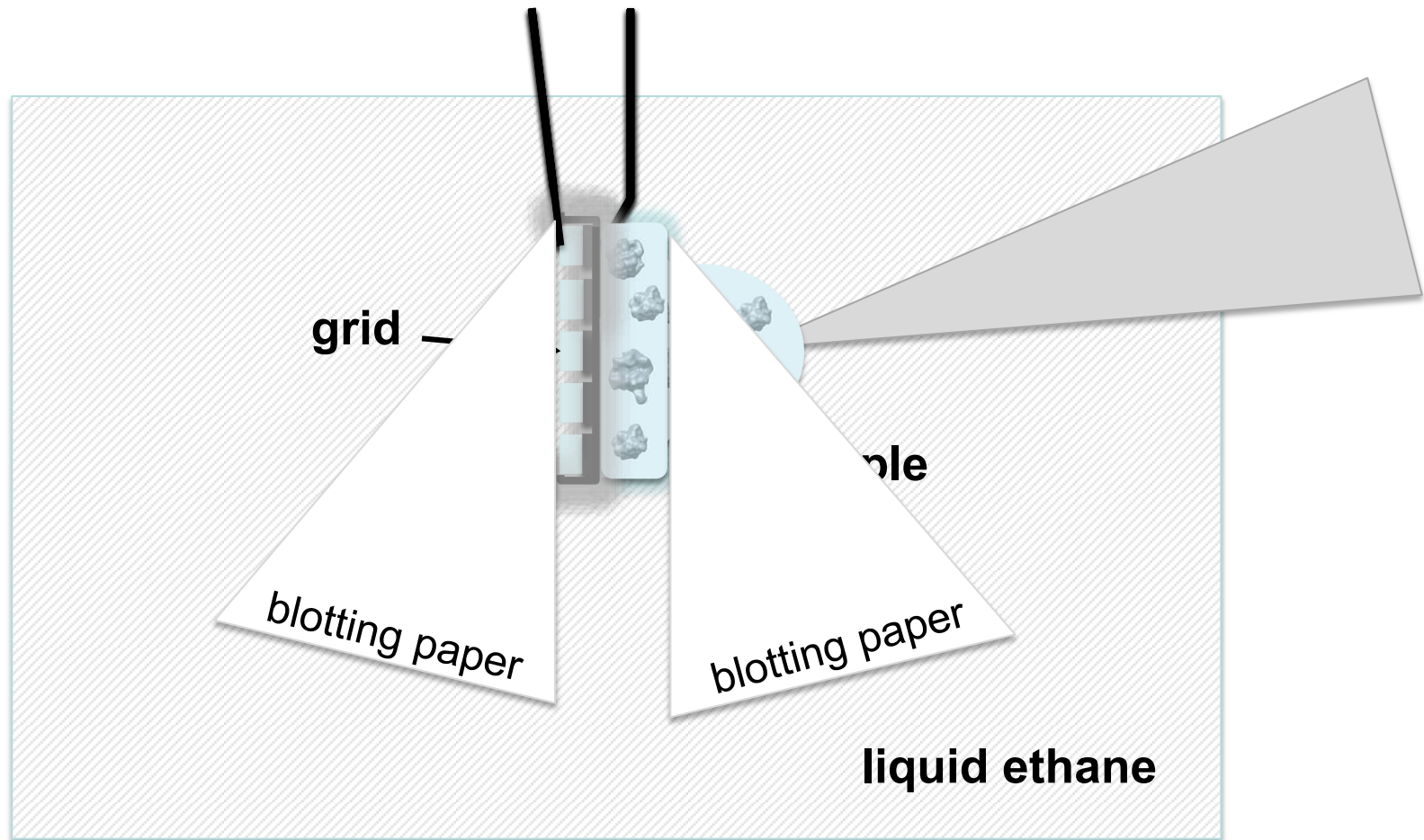


Cryo-EM grid



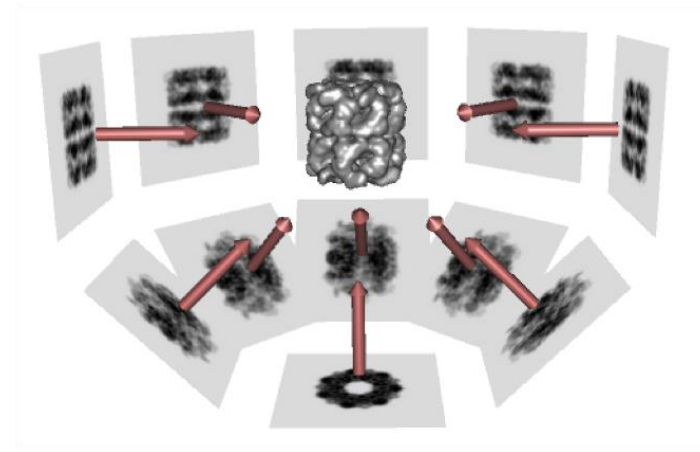
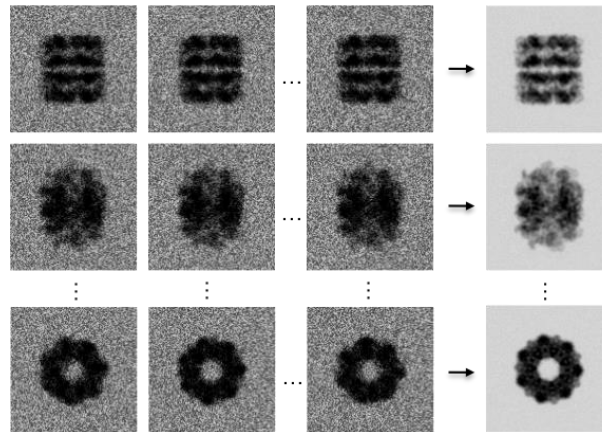
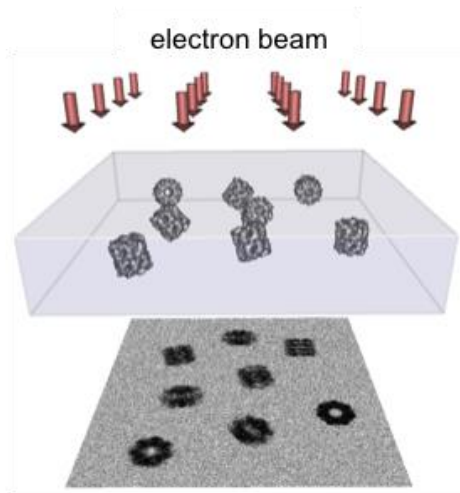
Ania Piasecka

Cryo-EM specimen preparation



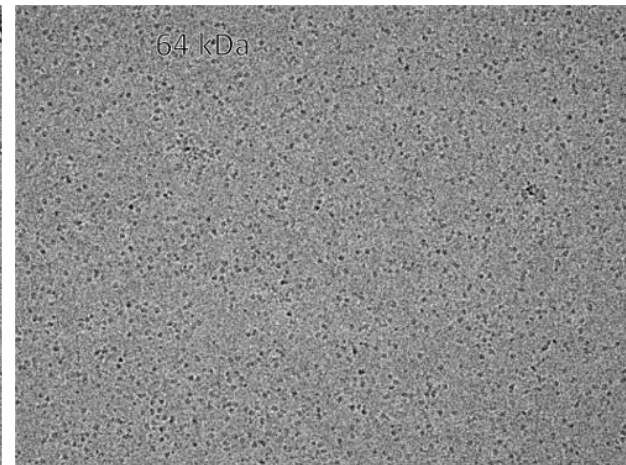
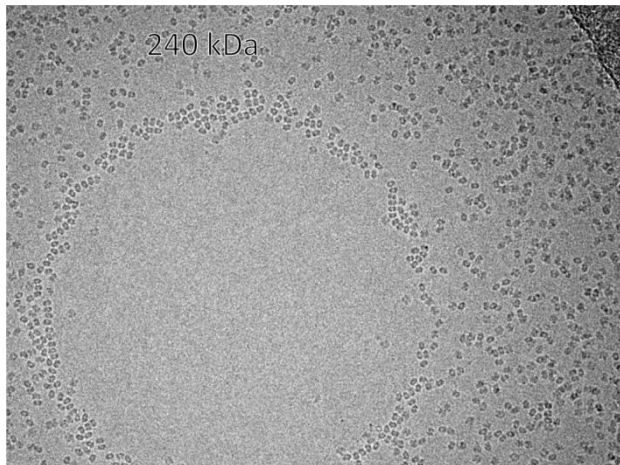
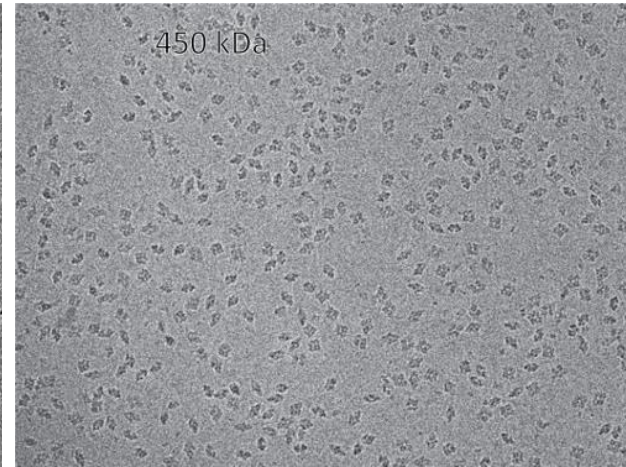
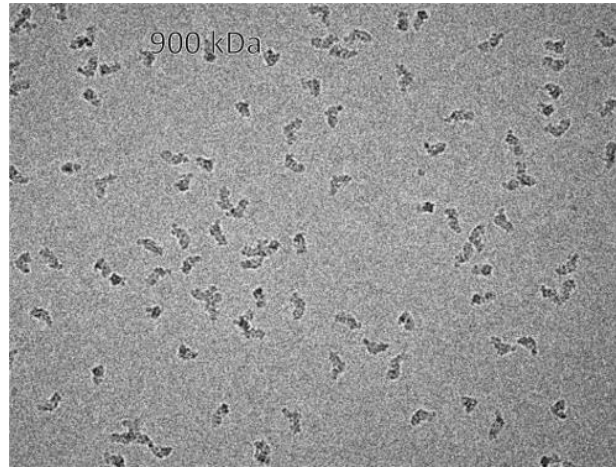
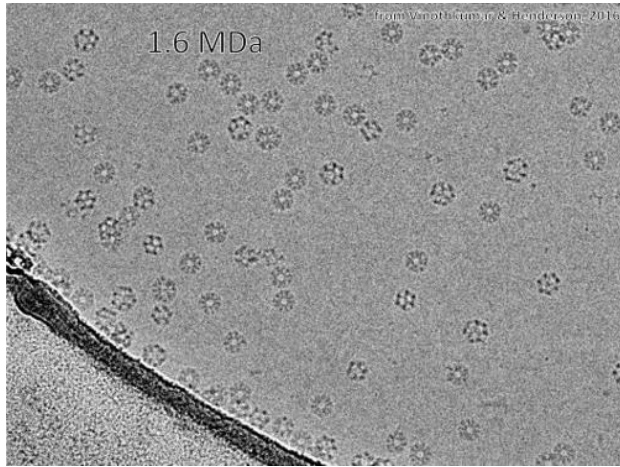
SPR – principles

- TEM images: projections of particles
- What kind of projections do we need?
 - many projections of identical particles with different, known orientations





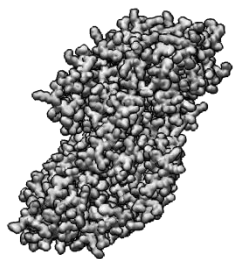
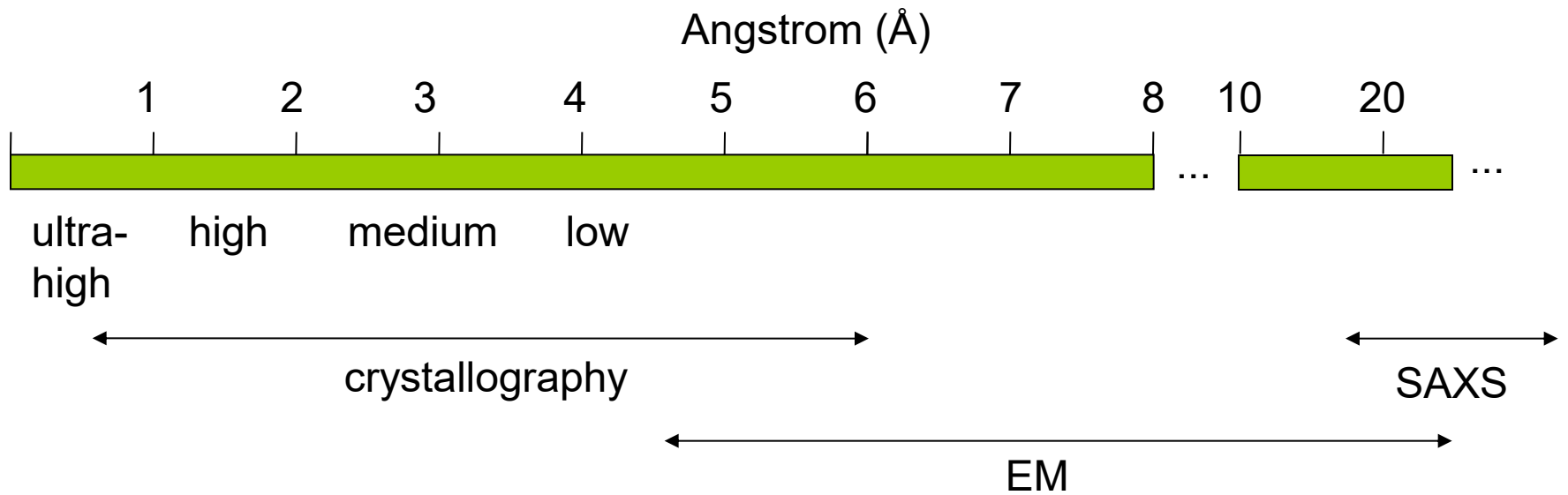
SPR – size limits



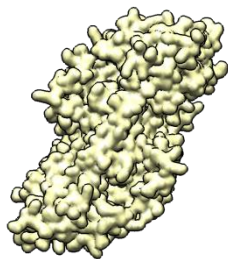
PROBLEMS:

- Low contrast of biological samples
- Radiation damage
- Sample vibrations

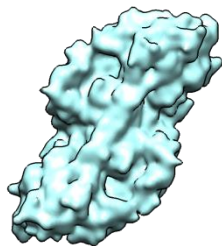
Resolution



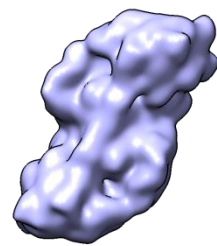
2.5 $\text{\AA}$



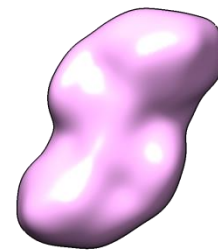
4 $\text{\AA}$



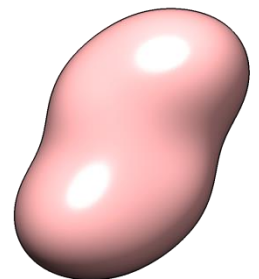
8 $\text{\AA}$



12 $\text{\AA}$

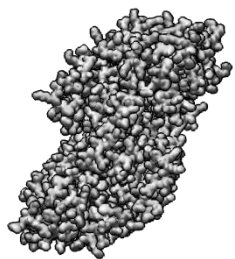
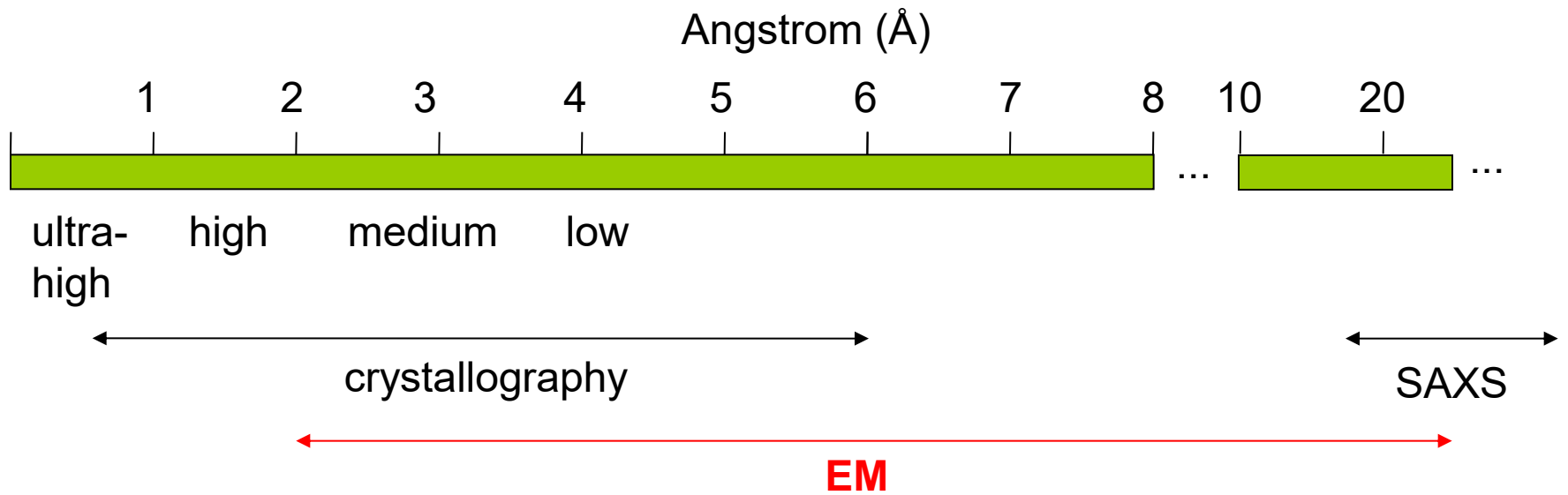


25 $\text{\AA}$

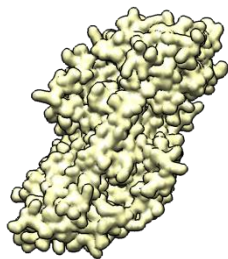


50 $\text{\AA}$

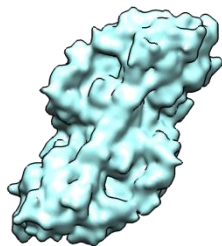
Resolution



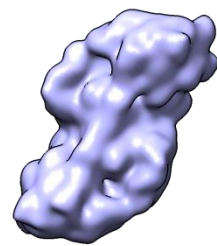
2.5 Å



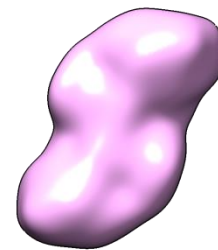
4 Å



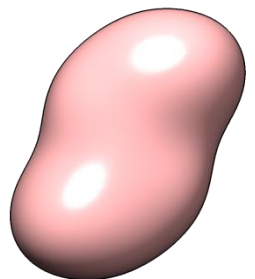
8 Å



12 Å

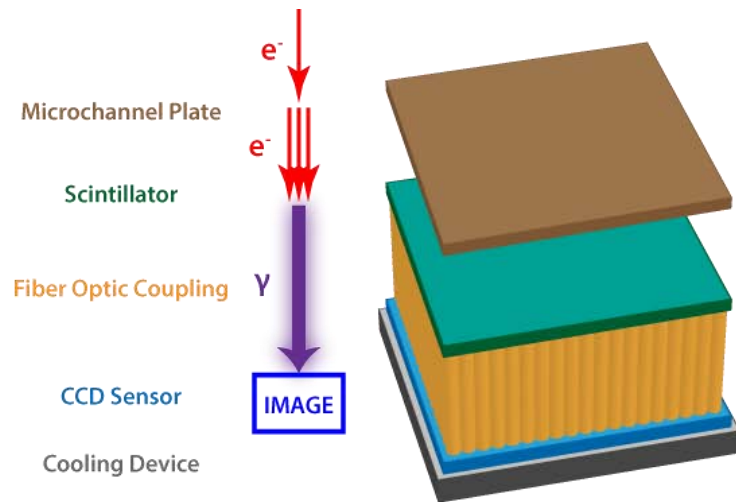


25 Å

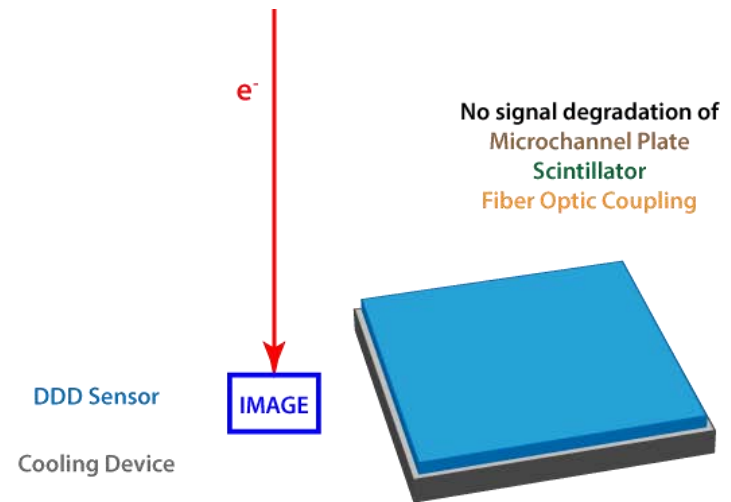


50 Å

Direct detectors



MCP + CCD

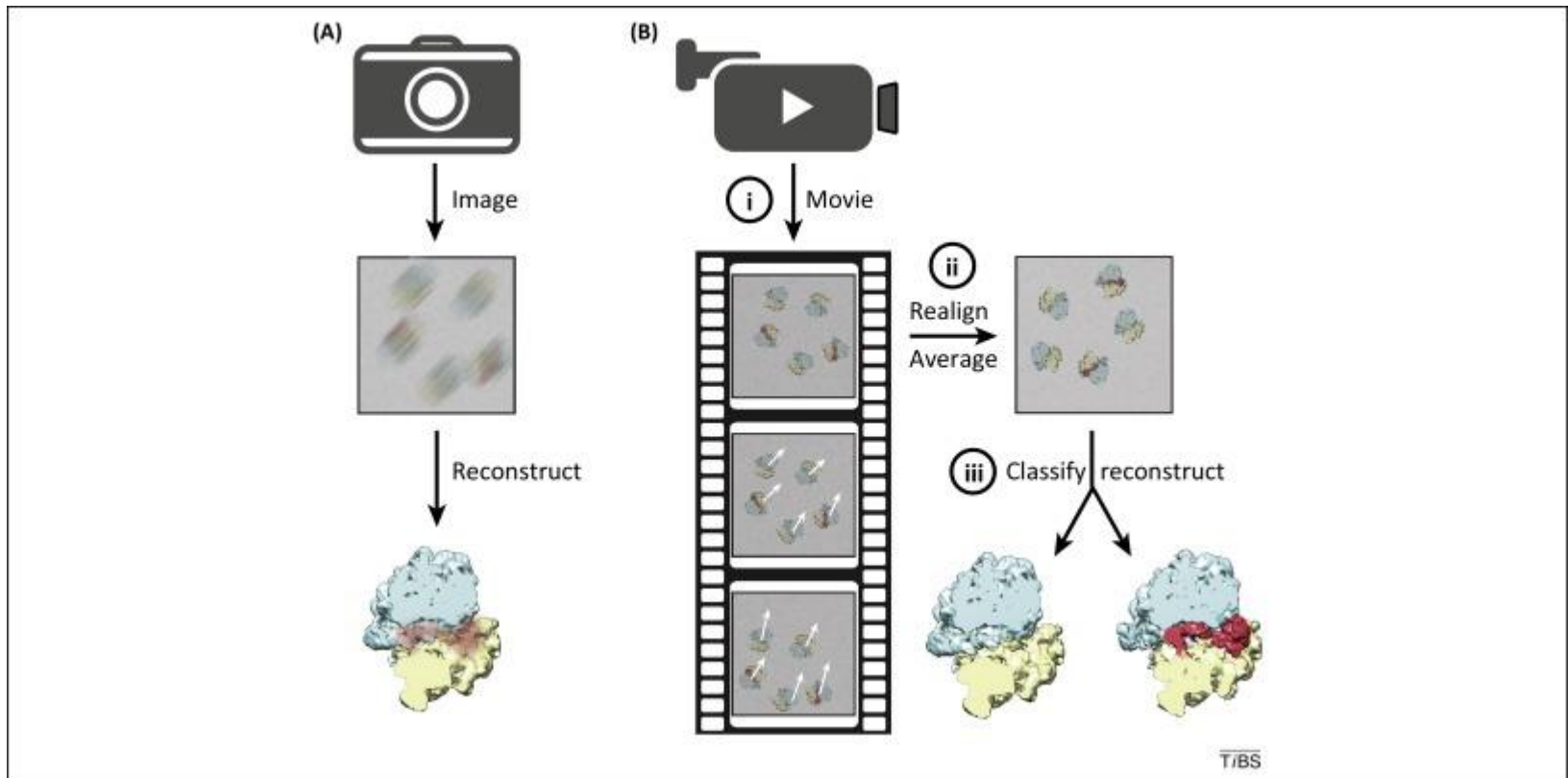


Direct Detection Camera

PROBLEMS:

- Radiation damage
- Sample vibrations

MOVIES



Software packages

- CryoSPARC (very fast commercial software)
- cisTEM (Computational Imaging System for Transmission Electron Microscopy)
- SIMPLE (Single-particle IMage Processing Linux Engine)
- RELION REgularized LIkelihood Optimization

source: https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/statistics_software.html/

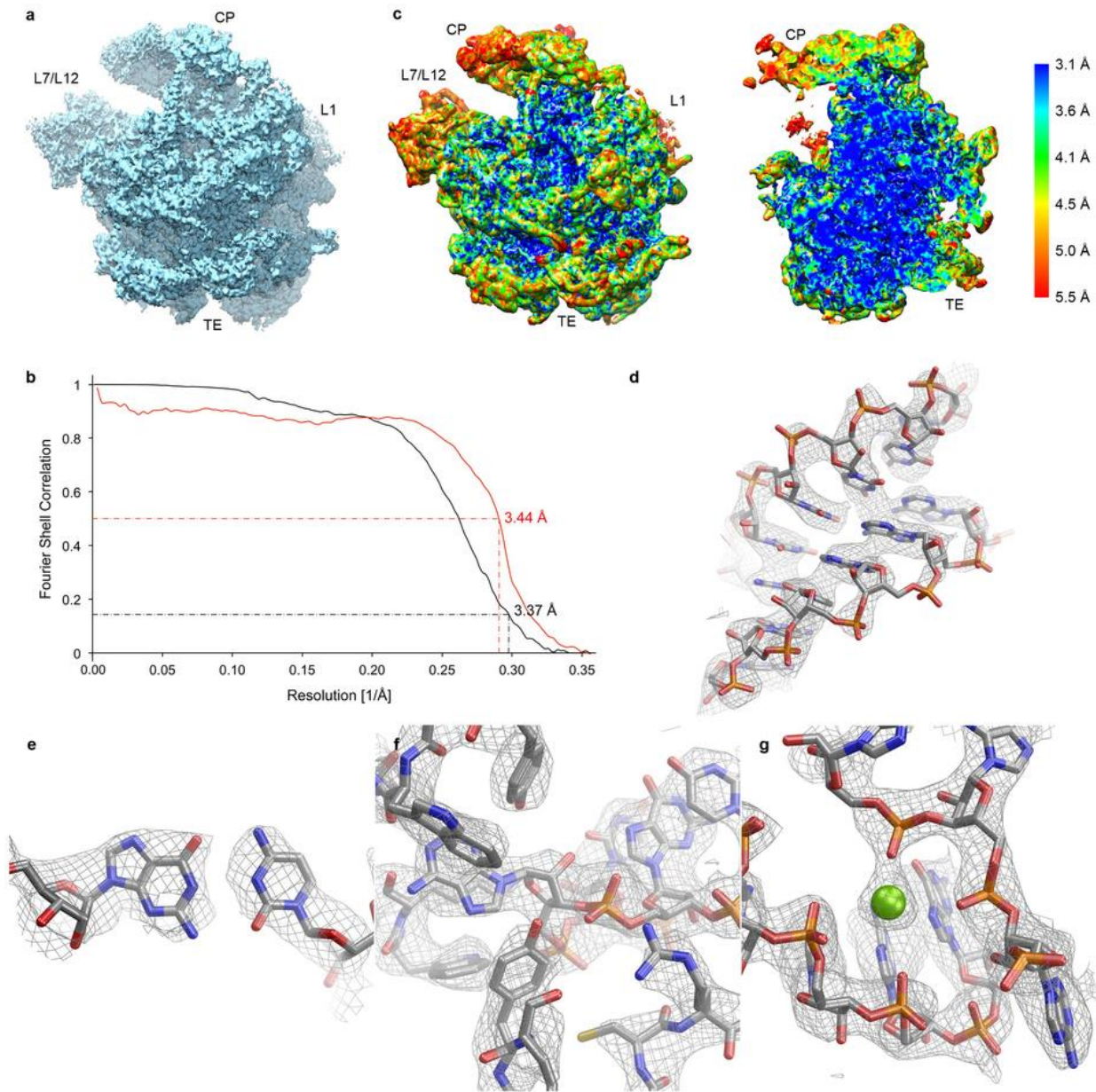
more info:

https://en.wikibooks.org/wiki/Software_Tools_For_Molecular_Microscopy

<http://www.emdatabank.org/emsoftware.html>

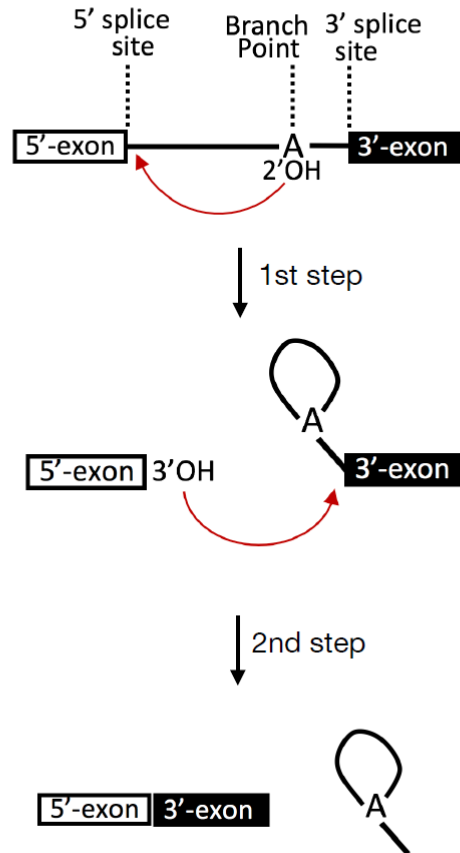
Time-consuming steps

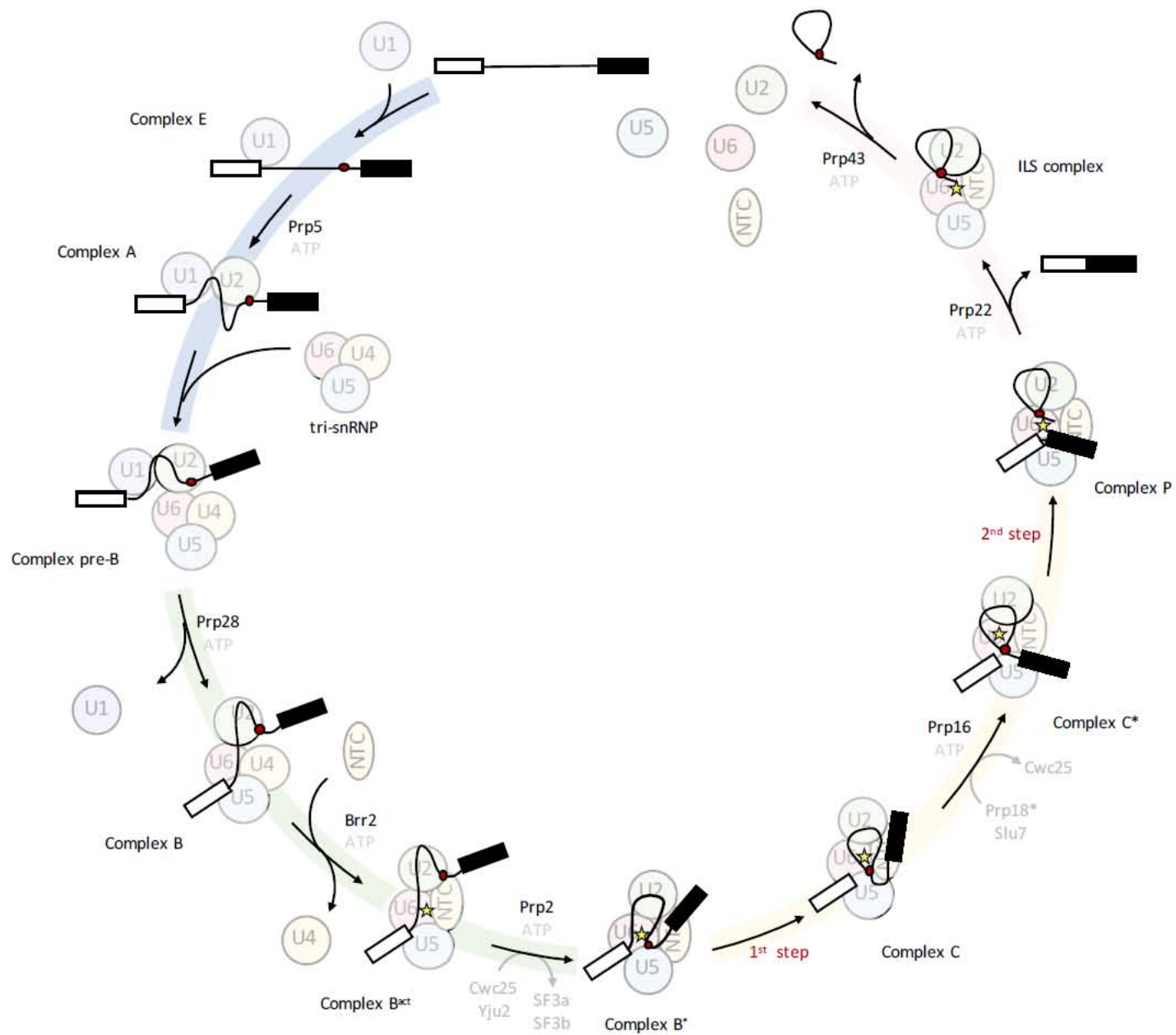
- Data transfer :) many hours
- Motion correction GPU: few hours
- CTF GPU: few hours
- Particle picking GPU: few hours
- Manual inspection hours-days
- 2D classification GPU: few hours
- 3D classification GPU: few hours (or more)
- 3D refinement GPU: hours/days (or more)
 - Up to 100 000 CPU hours!

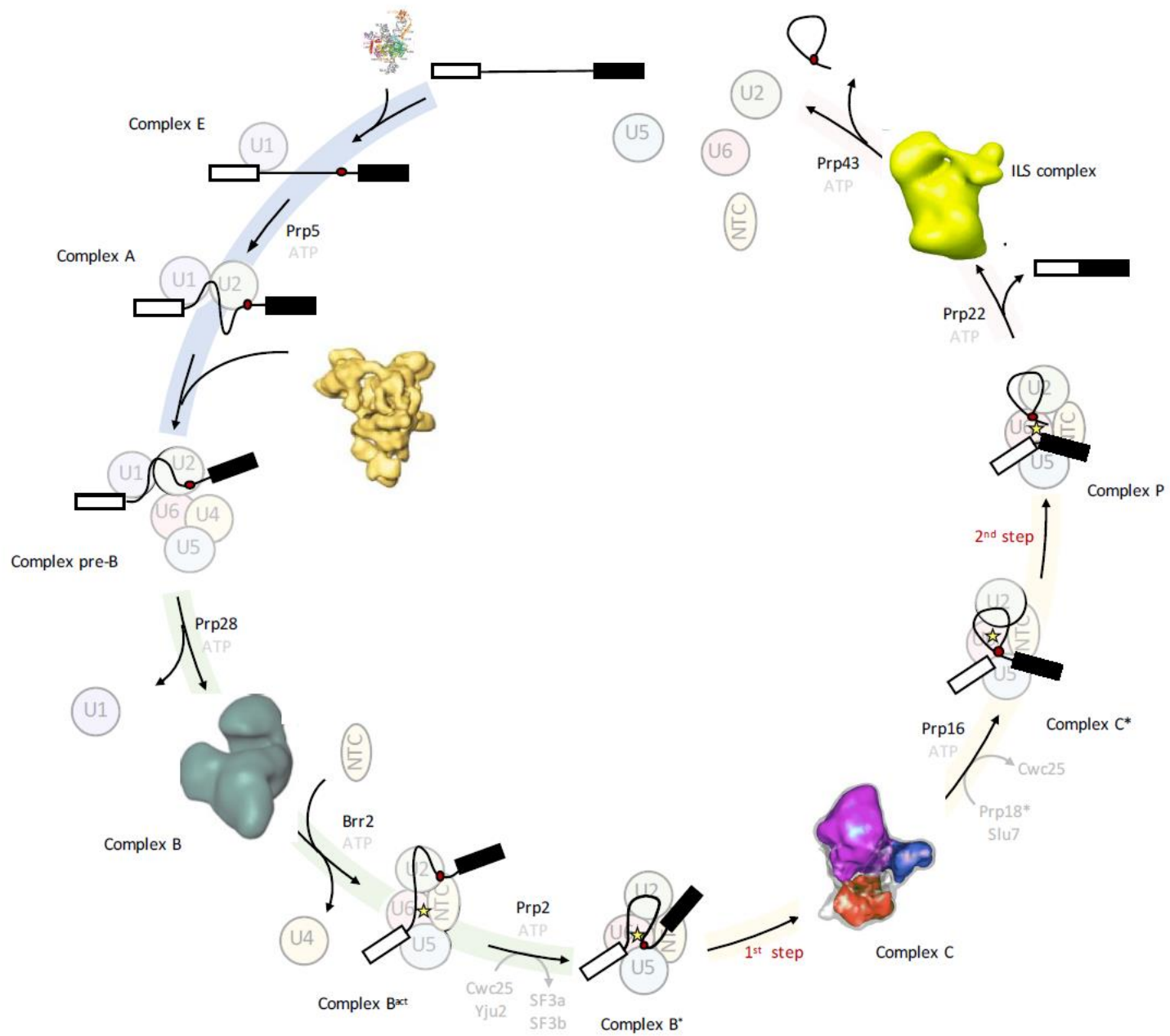


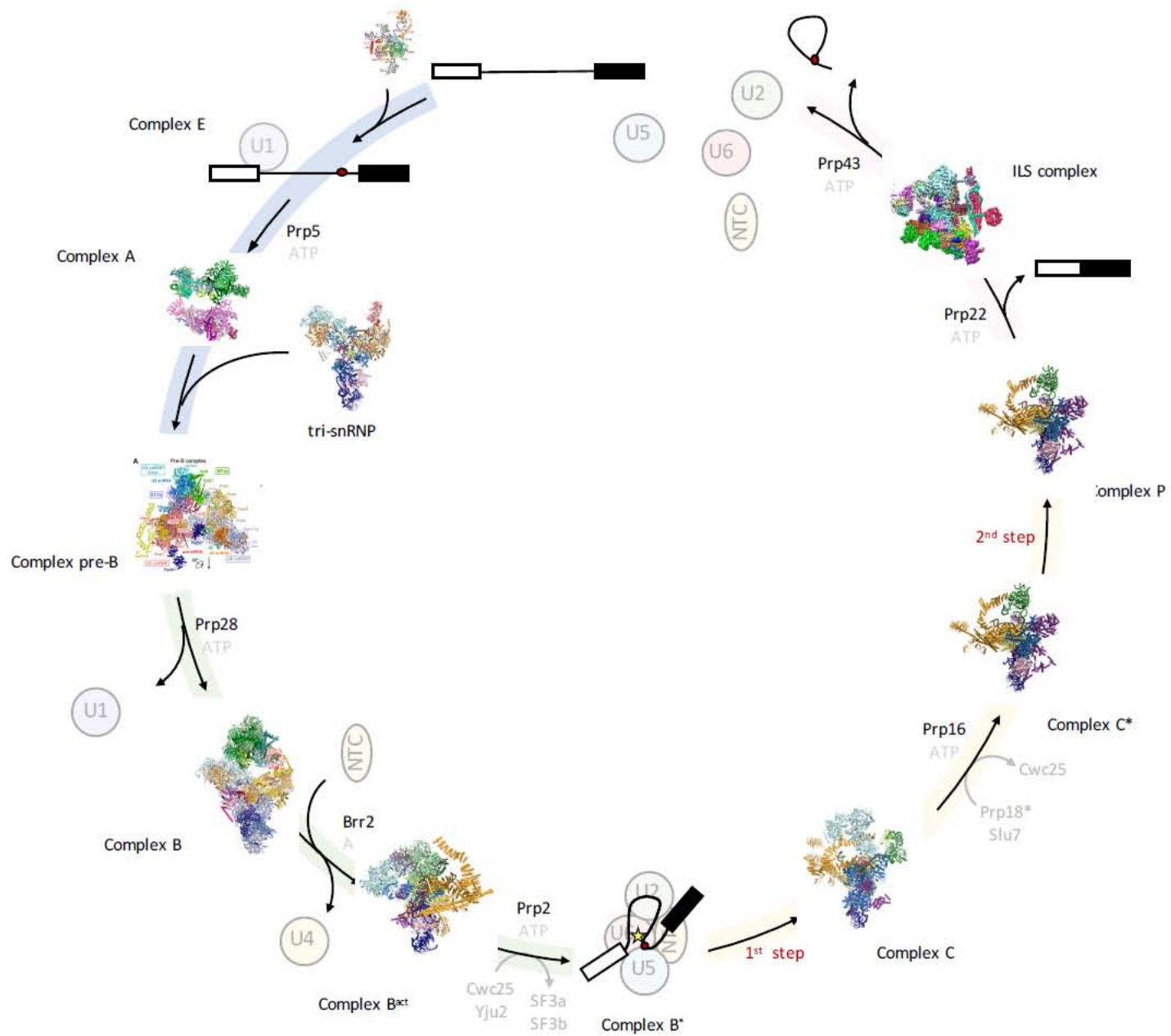
Basil J. Greber, et al. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome
Nature 515, 283–286 (13 November 2014)

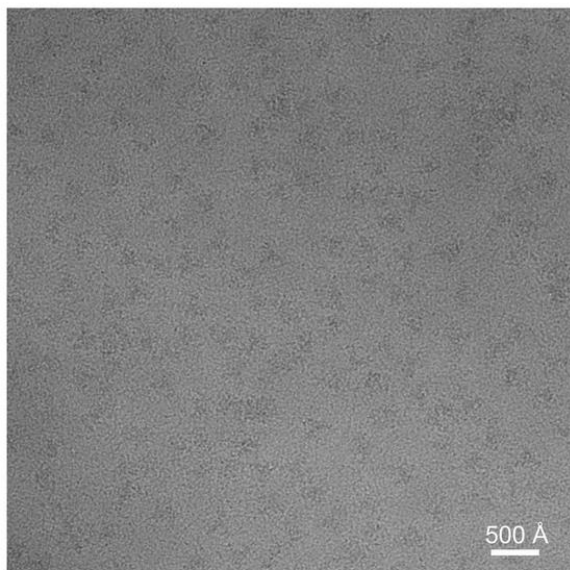
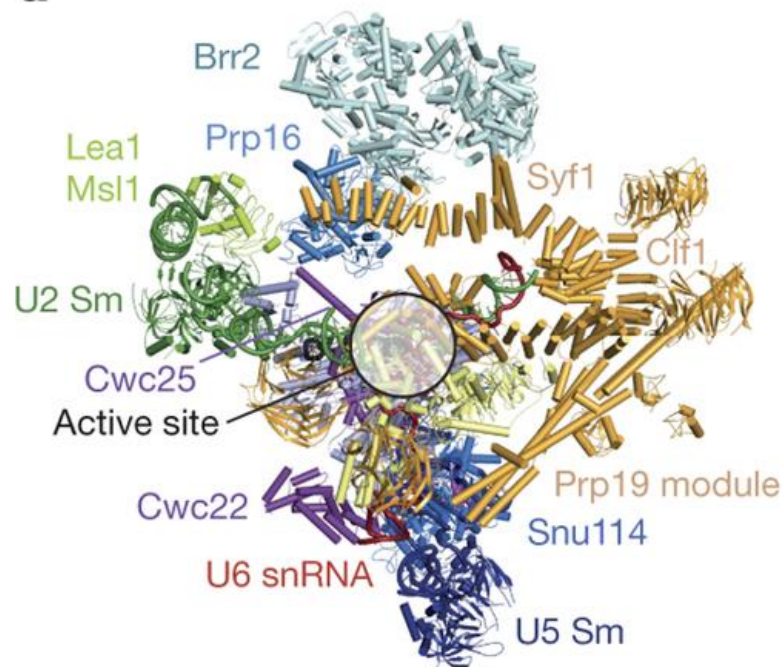
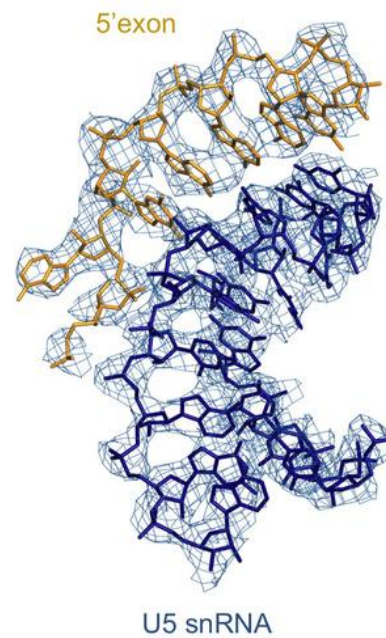
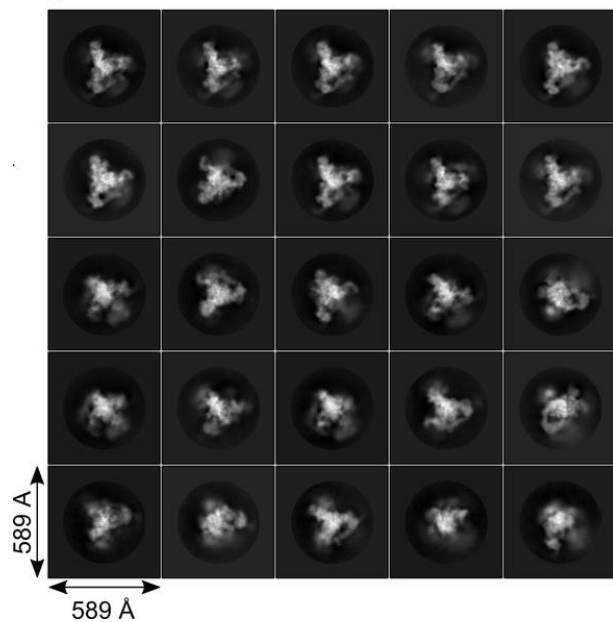
pre-mRNA splicing



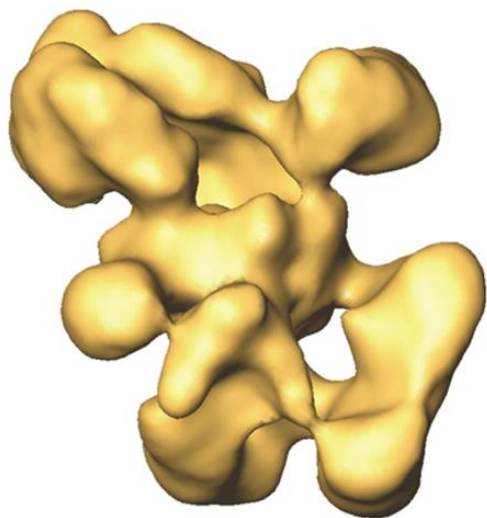






c**a****d**

Galej W, Nature, 2016



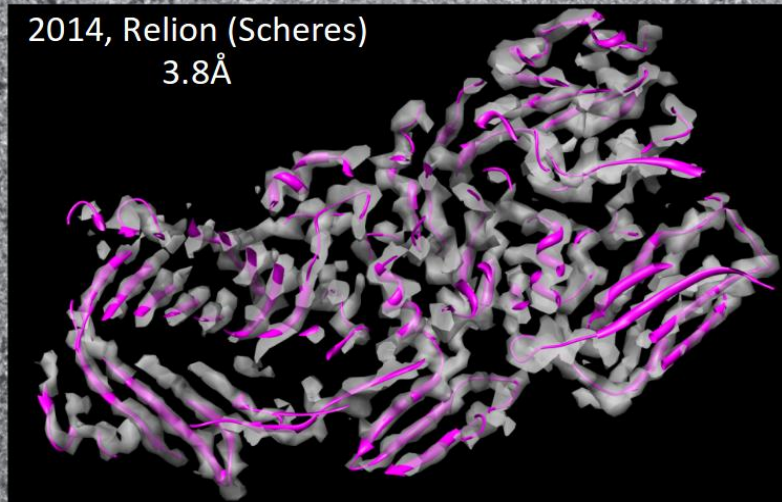
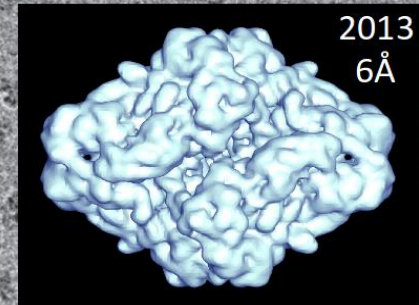
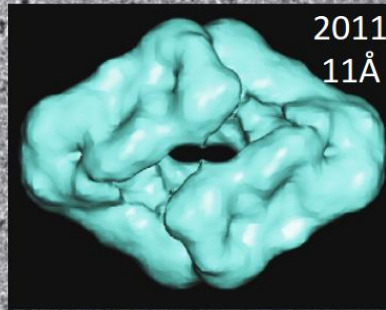
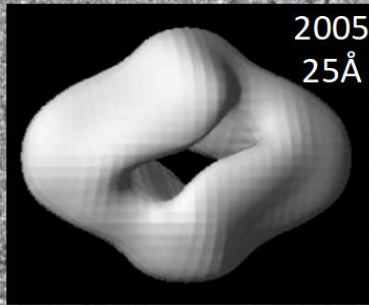
Golas MM, Mol Cell, 2010



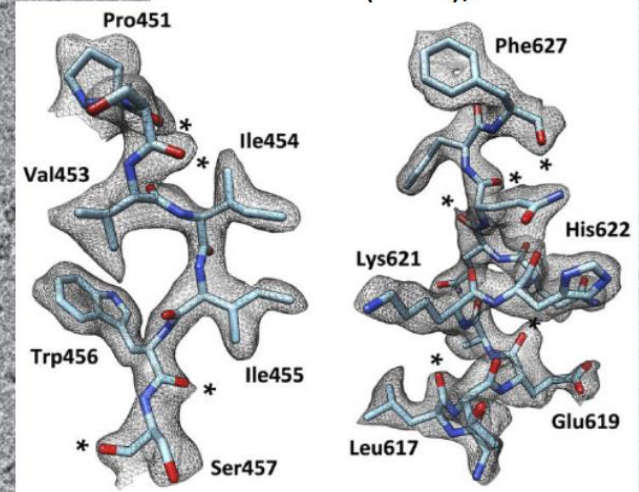
Galej W, Nature, 2016

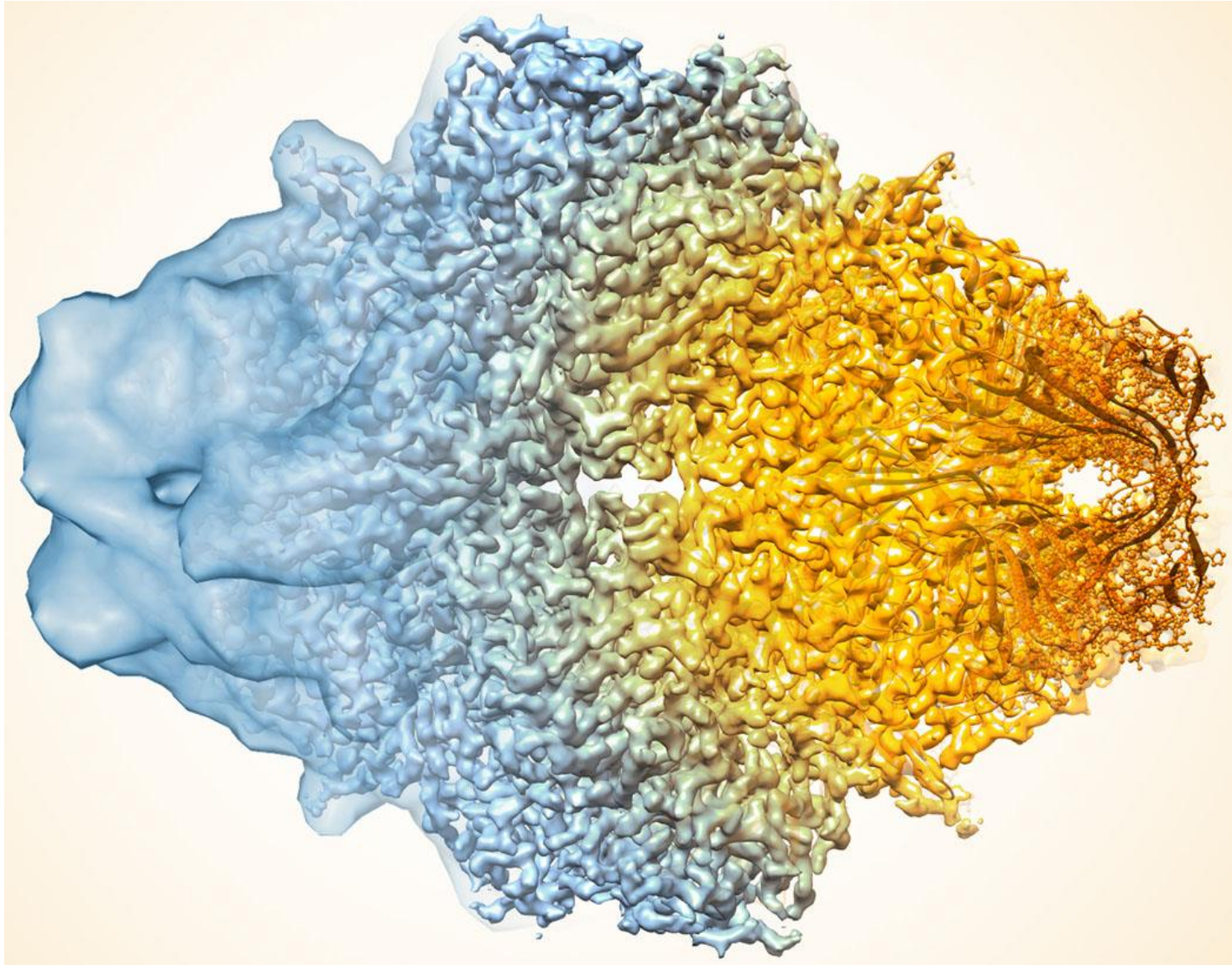
<https://www.annualreviews.org/doi/suppl/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>

SPR – progress



Bartesaghi et al+Subramaniam
Science (2015), 2.2Å





Challenges

- Improve the contrast – phase plates
- Reduce sample movements
- Quality criterion (equivalent of R_{free})
- Further developement of cryo-EM tomography

Electron cryotomographic analysis of a single *Bdellovibrio bacteriovorus* cell

highlighting several distinct features and showing how, in a growing number of cases, atomic models can now be positioned where they belong within the cell

Jensen lab, Caltech/HHMI

Introduction to high-resolution cryo-electron microscopy

ABSTRACT

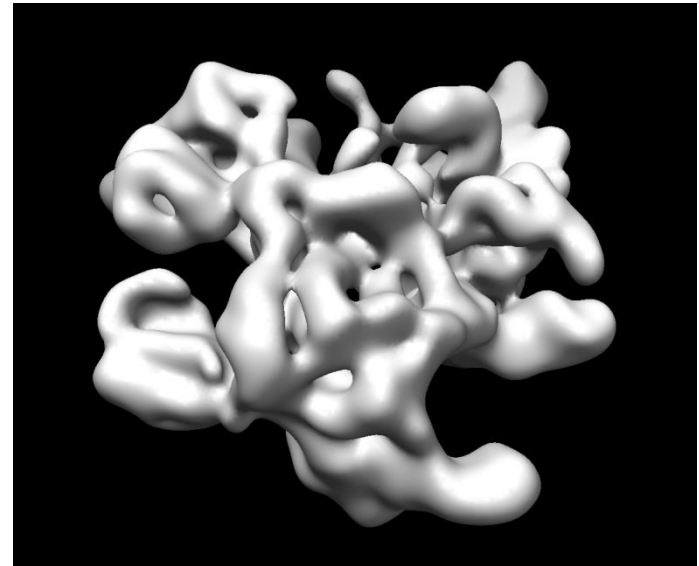
For many years two techniques have dominated structural biology – X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Traditional cryo-electron microscopy of biological macromolecules produced macromolecular reconstructions at resolution limited to 6–10 Å. Recent development of transmission electron microscopes, in particular the development of direct electron detectors, and continuous improvements in the available software, have led to the “resolution revolution” in cryo-EM. It is now possible to routinely obtain near-atomic-resolution 3D maps of intact biological macromolecules as small as ~100 kDa. Thus, cryo-EM is now becoming the method of choice for structural analysis of many complex assemblies that are unsuitable for structure determination by other methods.

Mariusz Czarnocki-Cieciura

Marcin Nowotny✉

Laboratory of Protein Structure, International
Institute of Molecular and Cell Biology, 4 Ks.
Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

Cryo-EM





Protein Data Bank

www.pdb.org

PyMOL

<http://pymol.org>

http://www.imb-jena.de/www_bioc/

