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



Nanometers



Micrometers



Millimeters



Meters



(a)





20 000 km

5 cm







14 podjednostek, ~50000 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



6 = -39.92 [initially -46.33 hep-hannerhead

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)

sparowane

dostępne nukleotydy w regionach jednoniciowych

nukleotydy w tworzące oddziaływania stacking lub

dla guanin (w warunkach denaturujących)

dla adenin (w warunkach denturujących)

dostępne (niesparowane) guaniny, sekwencjonowanie

Dostępne (niesparowane) adeniny, sekwencjonowanie

<u>Enzymy</u>

Nukleaza S1 Rybonukleaza V1

Rybonukleaza T1

Rybonukleaza U2

Odczynniki chemiczne

Imidazol Ołów Ethylnitrosourea ENU Rodniki hydroksylowe

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

SHAPE



1-methyl-7-nitroisatoic anhydride

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 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 ½ 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, ¹³C, ¹⁵N, oraz ³¹P mogą być zastosowane w NMR

∱H	1
tu_≻	⊢
TH ↑H	–∪ ĭ 1

Jednowymiariowe widma dla tetrapętli (region protonów Dwuwymiarowe iminowych) widma HSQC Α в AGUC G18 146 G9, 148 G11⁰ G2 G2 G17 150 G2 U16 152 U5 154 15 N G4 G20 G18 G17 (ppm) 156 U8 158 G11 G9 160 ♦U5 162 U16¹⁰U8 164 12.5 12 13.5 12.5 12 11.5 11 14.5 14 13.5 13 11.5 11 13 ppm 1H(ppm) С D AGAA •G18 146 . G11 G14 148 150 G20 G2 U5 152 G18 15N 154 U7 G4 G20 G14 (ppm) 156 U8 G2 158 G6 160 •U5 G11 162 U7 U8 164 14.5 14 13.5 13 12.5 12 11.5 11 10.5 14.5 14 13.5 13 12.5 12 11.5 11 10.5 ppm 1H(ppm)

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 HB 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 - ~ 1/r6

Można ja 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 Å)

Nagroda Nobla - Kurt Wutrich 2002

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

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 ¹³C and ¹⁵N.

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 NMRem - 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 możliwie 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


KRYSTALOGRAFIA

























Kryształy dużej podjednostki rybosomu



Crystals







Crystallization



Precipitants: salts PEGs organic solvents





















Screen







Crystallography





Rozdzielczość: 1,5 Å



Garland Science ©





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 prokariontów 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 70tych, 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 rozpraszały do ok. 3 Å.

W roku 2000 opublikowano pierwsza 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 <u>Thermus thermophilus</u>. 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 REBOSONE **GENE** MACHINE

RAMAKRISHNAN

WINNER OF THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY

Remakrishmen's writing is so honesil, tecid, and engaging that I could not put this book down until Thid read to the very end." —SIDDHARTHA MUKHERIBE

Projektowanie leków



Melinta Therapeutics

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.

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 1.0 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)

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

X-rays electron backscattered Coulombic interactions beam EDXS electrons with electrons AND nucleus SEM: secondary electrons secondary Auger electrons electrons TEM: electrons scattered: – elastically \rightarrow image formation specimen inelastically \rightarrow radiation damage Sources of contrast in TEM: Amplitude contrast Phase contrast direct inelastically elastically beam scattered scattered electrons electrons

> source: Frank Krumeich; Properties of Electrons, their Interactions with Matter and Applications in Electron Microscopy; www.microscopy.ethz.ch

incident

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
 - $\quad \rightarrow \text{defocus} \texttt{!!!}$



source: http://home.uni-leipzig.de/pwm/web/?section=introduction&page=phasecontrast



Negative stain



Negative stain



Cryo-EM





Grid pretreatment – glow discharge





Preparation of cryo-EM specimen





Ania Piasecka

Cryo-EM specimen preparation



Ania Piasecka

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



source: Cryo-EM17 Lecture 01 Past Present Future; Richard Henderson, MRC Lab, 2017

PROBLEMS:

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

Resolution



Resolution



Direct detectors



MCP + CCD

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

Time-consuming steps

- Data transfer :)
- Motion correction
- CTF
- Particle picking
- Manual inspection
- 2D classification
- 3D classification
- 3D refinement
 - Up to 100 000 CPU hours!

many hours

GPU: few hours

GPU: few hours

GPU: few hours

hours-days

GPU: few hours

GPU: few hours (or more)

GPU: hours/days (or more)



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



Will and Lührmann (2011)





Year 2014



Year 2018







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



source: Cryo-EM17 Lecture 01 Past Present Future; Richard Henderson, MRC Lab, 2017



Challenges

- Improve the contrast phase plates
- Reduce sample movements
- Quality cirterion (equivalent of R_{free})
- Further development 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



Protein Data Bank

www.pdb.org

PyMOL

http:// pymol.org

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