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



chemical structures of DNA and RNA: similar or different?



ribose

One strand forming... what exactly?

RNA can form canonical A-U & C-G pairs and fold into helical regions divided by loops





RNA can form non-canonical A-U & C-G pairs



PDB ID 6PQ7

Canonical and non-canonical pairs and other interactions lead to complex 3D motifs



RNA molecules can form alternative, different structures

5'-GGCGUUUUCGCCUUCGGGCGAUUUUUUAUCGCU-3'



RNA molecules can form alternative, different structures



Thoughts on how to think (and talk) about RNA structure Quentin Vicens, Jeffrey S Kieft, Proc Natl Acad Sci U S A, 2022 Apr 26;119(17):e2112677119.

Functional RNAs have undergone evolutionary selection to form a restricted number of relatively stable structures



Cordero P, Das R Rich RNA structure landscapes revealed by mutate-and-map analysis PLoS Comput Biol 11(11): e1004473.

Dynamic RNA structures play important roles in biological processes



Ganser LR, Kelly ML, Herschlag D, Al-Hashimi HM The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs Nature Rev Mol Cell Biol 2019, 20, 474–489 Struktura RNA jest stabilizowana głównie przez oddziaływania warstwowe

Ustrukturalizowane RNA nie jest statyczne

RNA jest często kompaktowe

Parowanie Watsona-Cricka jest ważne, ale nie jedyne

Niekanoniczne pary zasad odgrywaja kluczową rolę

Proste diagramy w oparciu o pary W-C - traktować ostrożnie

Thoughts on how to think (and talk) about RNA structure Quentin Vicens, Jeffrey S Kieft, Proc Natl Acad Sci U S A, 2022 Apr 26;119(17):e2112677119.

Rybozym



Rybozym





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)

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 dla adenin (w warunkach denturujących) 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







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

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





Negative stain



Negative stain



Cryo-EM





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



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



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

Cryo-EM









Protein Data Bank

www.pdb.org

PyMOL

http:// pymol.org

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