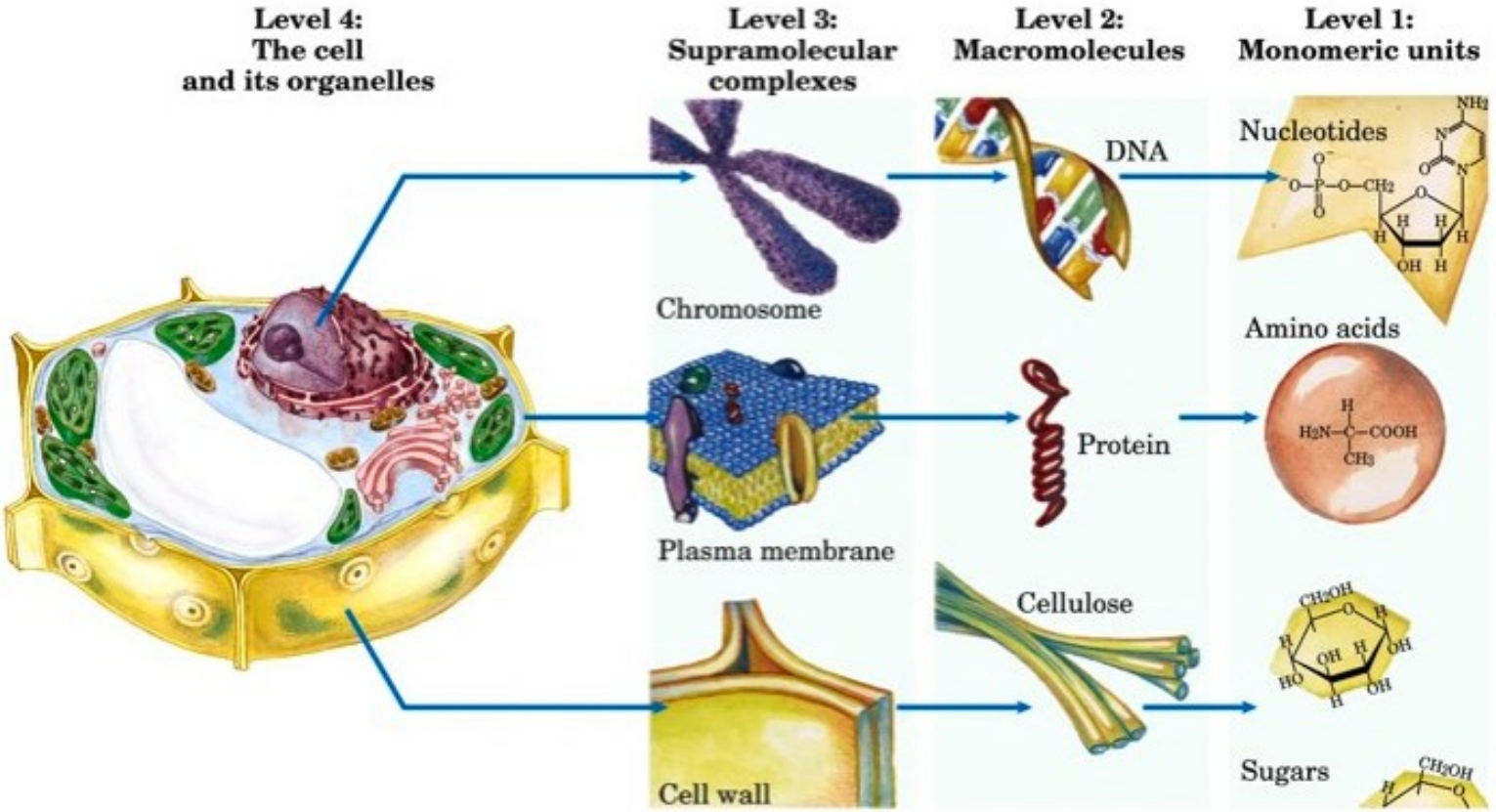
Lezione 2

Come si studiano le strutture proteiche

IBPM CNR
National Research Council of Italy

Osservare la MATERIA



Scopi della biologia strutturale

• Relazioni tra struttura e funzione nelle macromolecole biologiche

• Comprensione dei processi metabolici

• Disegno di farmaci basati sulla struttura

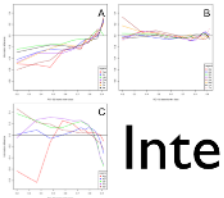
• determinazione di nuovi ripiegamenti strutturali, utili per la costruzione di modelli e di strutture ignote attraverso metodi bioinformatici

Metodologie

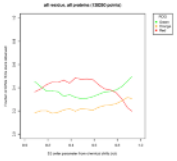
- Microscopia elettronica
- Risonanza magnetica nucleare (NMR)
- Cristallografia a raggi X

Metodi di visualizzazione diretta

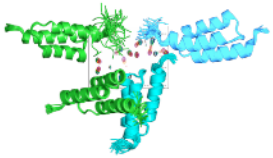
Metodi di visualizzazione indiretta



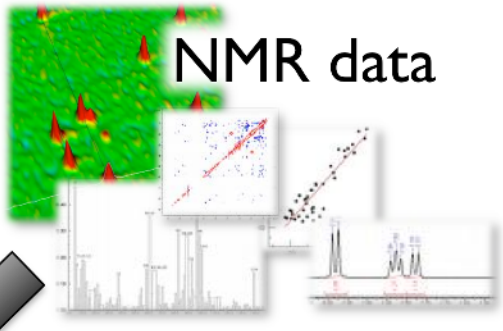
Interpretation



Per-residue mobility and conformation from experimental data



NMR data

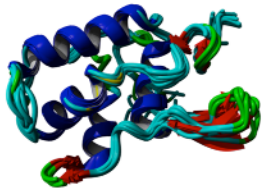


Statistical analysis

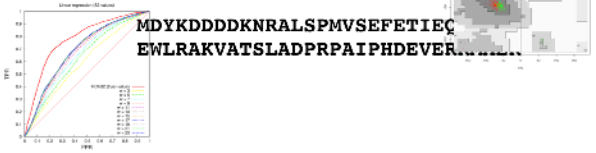


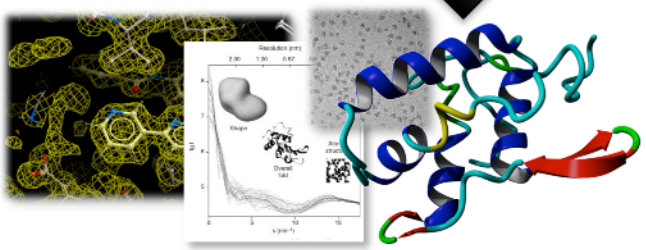
WORLDWIDE PDB
PROTEIN DATA BANK

Prediction



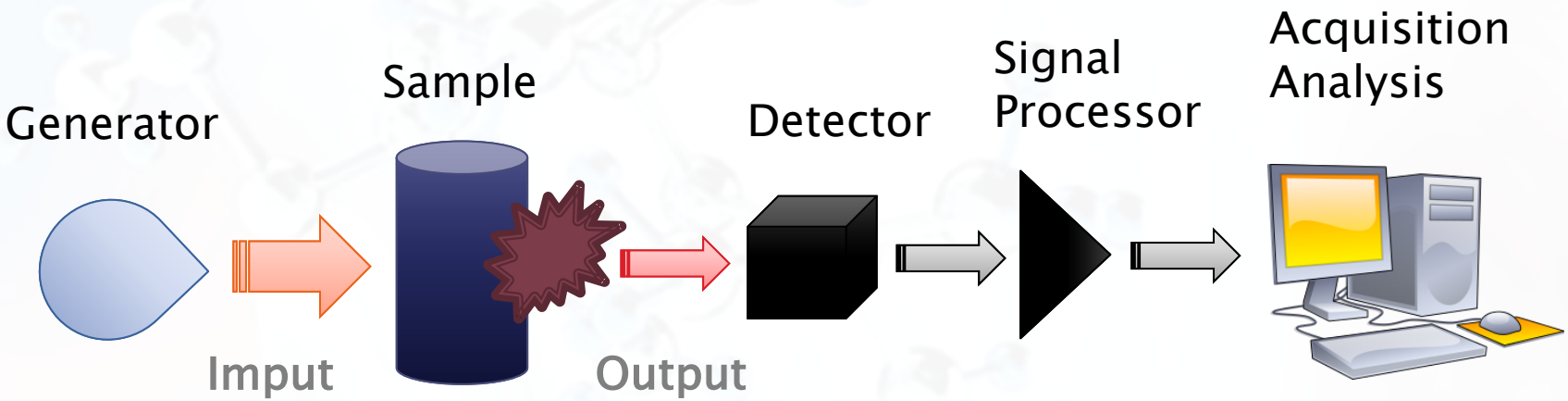
Per-residue mobility and conformation from sequence and structure





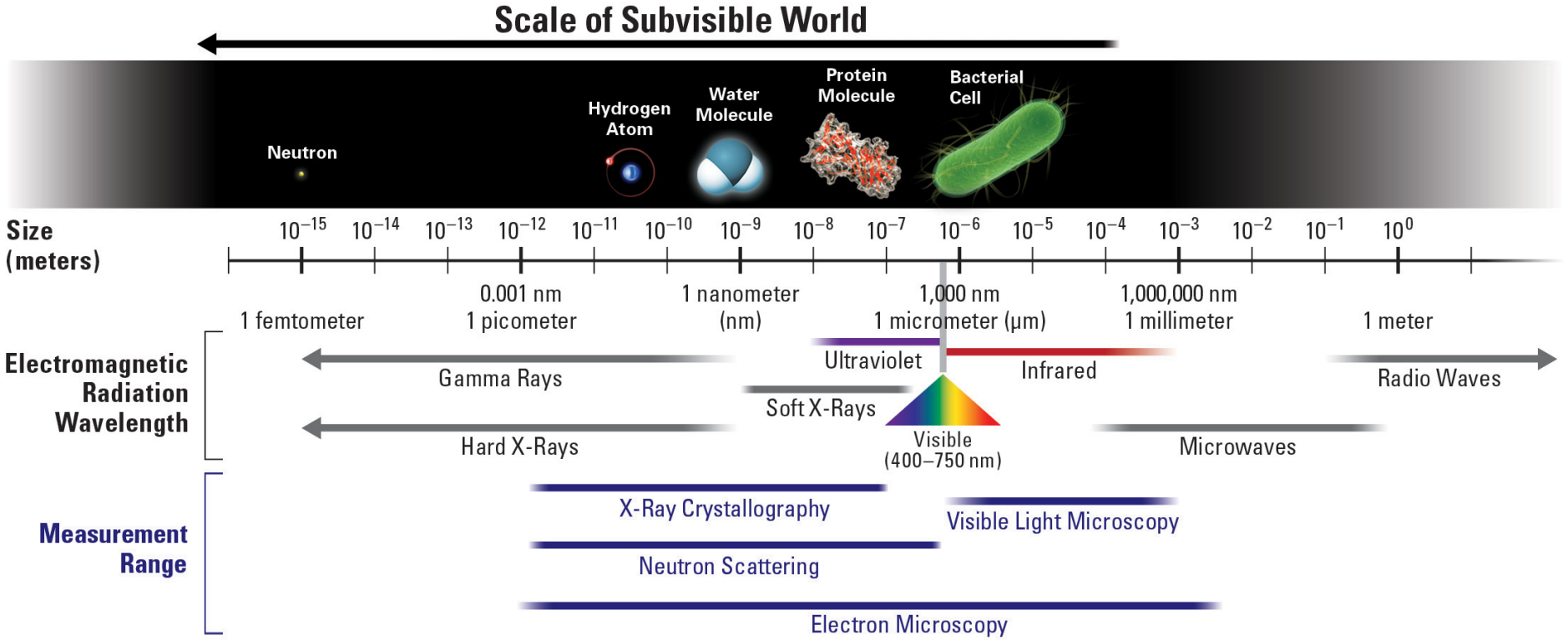
X-ray, SAXS, EM, …

Schema generale di uno strumento di misura

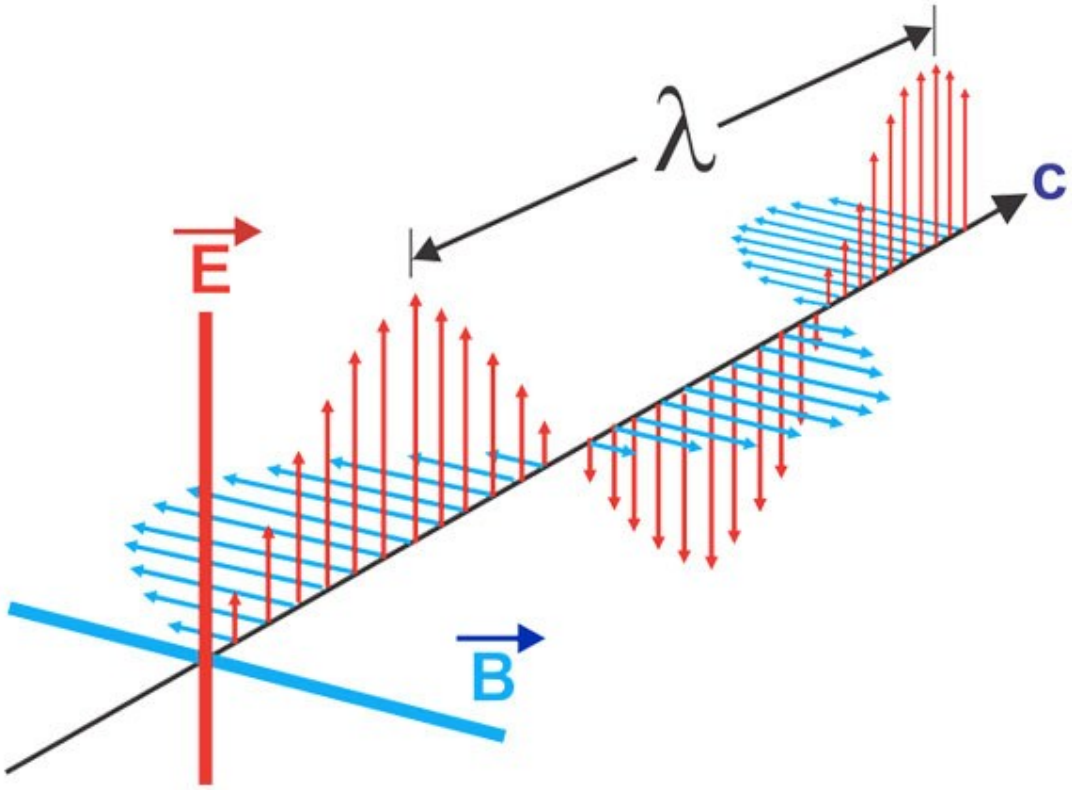


Interaction with Sample and Modification

Per osservare la materia al devo "ILLUMINARE"



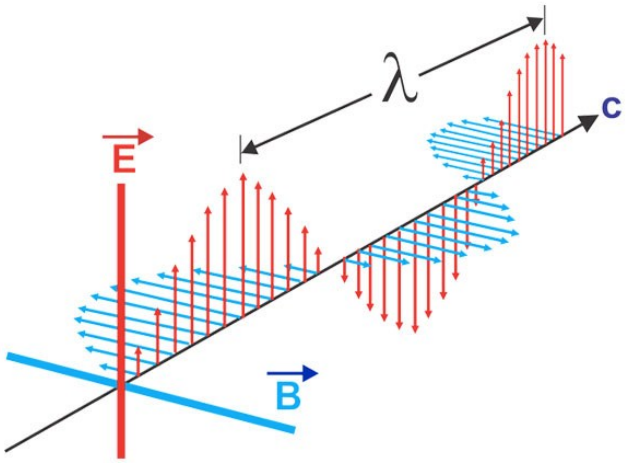
Onde elettromagnetiche



In fisica la **radiazione elettromagnetica** è la propagazione nello spazio dell'energia del campo elettromagnetico

Secondo l'elettrodinamica classica, consiste di onde elettromagnetiche, costituite da oscillazioni sincronizzate di campi elettrici e magnetici che nel vuoto viaggiano alla velocità della luce.

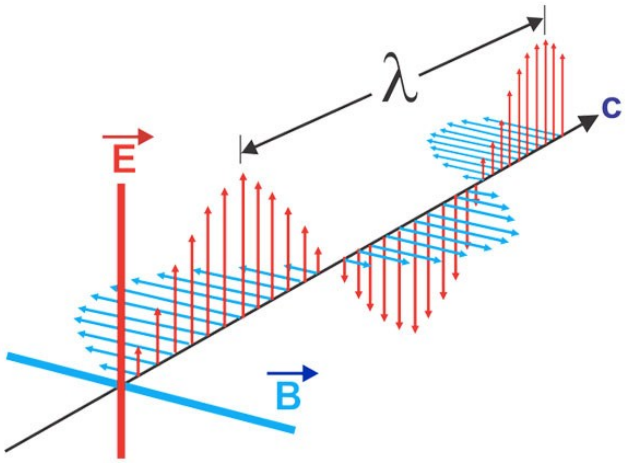
Onde elettromagnetiche



ONDE E PARTICELLE

- Ad un'onda elettromagnetica si può associare una particella chiamata fotone. Sia il fotone che l'onda elettromagnetica si muovono lungo una linea retta. In entrambe le descrizioni della radiazione luminosa (onda o particella) essa porta una certa quantità di energia.
- L' onda elettromagnetica è formata da un campo magnetico ed un camo elettrico che oscillano lungo direzioni perpendicolari tra loro.
- La luce si muove nel vuoto ad una velocità approssimativa pari a: 2.99×10^8 m/s.
- La luce si muove lungo una retta chiamata raggio e non ha bisogno di un mezzo per propagarsi. Un raggio è la linea retta che rappresenta la direzione lungo cui si ropaga l'onda elettromagnetica.
- Un «fascio» di luce è un insieme di raggi.

Onde elettromagnetiche

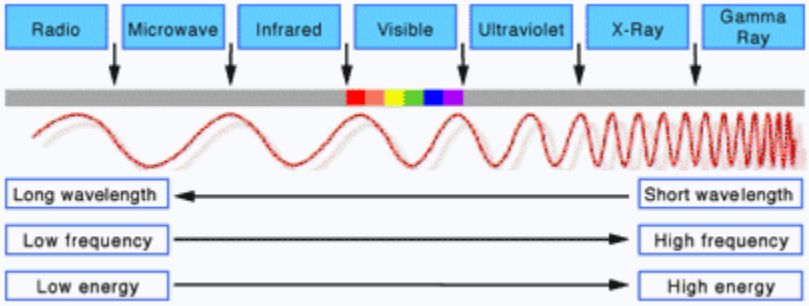


Lunghezza d'onda e frequenza

- La lunghezza d'onda e la frequenza sono inversamente proporzionali
- Ne deriva che i **raggi gamma** hanno l' energia **più alta** mentre **le radio onde** l'energia **più bassa.**
- Riguardo la radiazione luminosa il violetto rappresenta l'energia più alta mentre il rosso quella più bassa.
- L'intero range della **radiazione elettromagnetica** è chiamato **spettro elettromagnetico**.
- La sola differenza tra I diversi tipi di onda elettromagnetica è l'energia associate ad esse.

La luce solare consiste nell'intero spettro elettromagnetico.

La luce che siamo in grado di rilevare con Ii nostri occhi rappresenta solo una piccola parte dello spettro elettromagnetico



Energia dell'onda elettromagnetica

Le onde elettromagnetiche trasportano energia mediante i "fotoni",

L'energia di un fotone è proporzionale alla frequenza dell'onda, La frequenza e la lunghezza d'onda sono inversamente proporzionali:

$$E = h\nu;\ \nu = c/\lambda\ (c=2.99\cdot10^{8}\ m/s)$$

(con $h = 6.6\cdot10^{-34}$ J·s, costante di Planck).

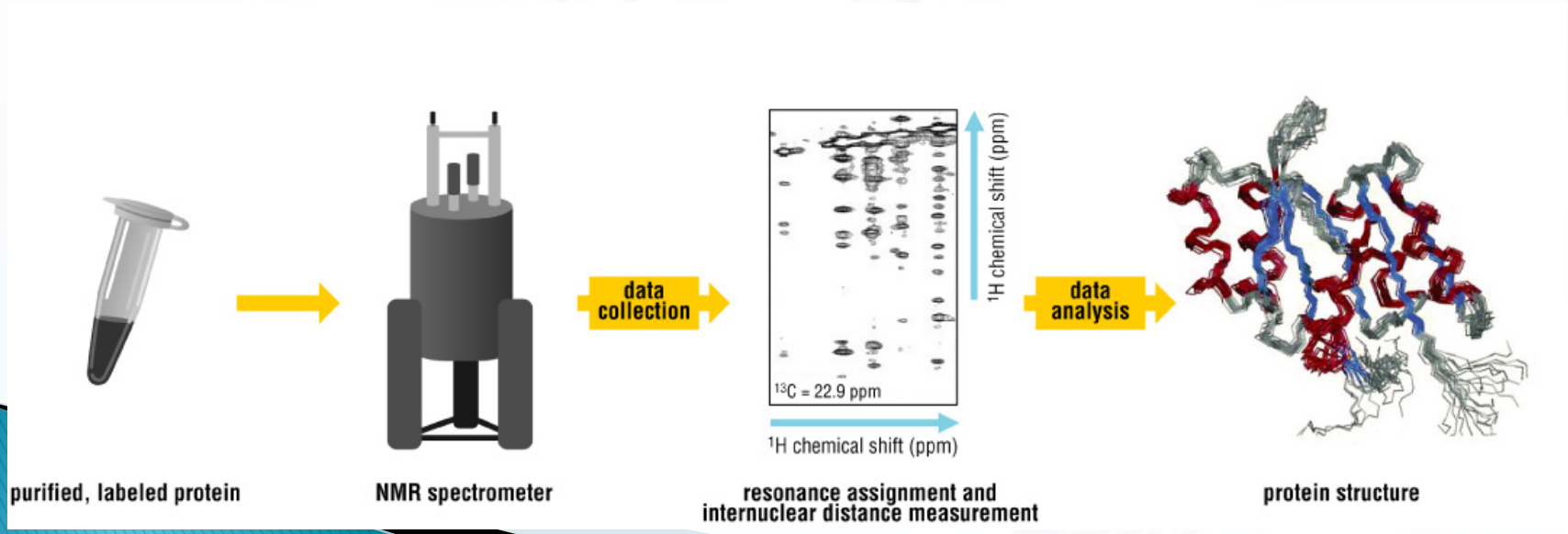
Per la luce visibile, l'emissione o assorbimento dei fotoni determina il colore dei corpi:
bianco = emissione di tutte le frequenze visibili
nero = assorbimento di tutte le frequenze visibili

Risonanza Magnetica Nucleare - NMR



NMR: Risonanza Magnetica Nucleare

- Tecnica spettroscopica per lo studio della struttura a **risoluzione atomica**
- Il campione viene analizzato **in soluzione e in condizioni fisiologiche**
- **Metodo indiretto:** l'immagine 3D è ricostruita
- **Limitata a campioni ≤100 kDa** (limite dipendente dalla potenza di calcolo)
- Produce **informazioni** oltre che sulla struttura anche sulla **dinamica, sulle conformazioni, sul folding e sulle interazioni intermolecolari**

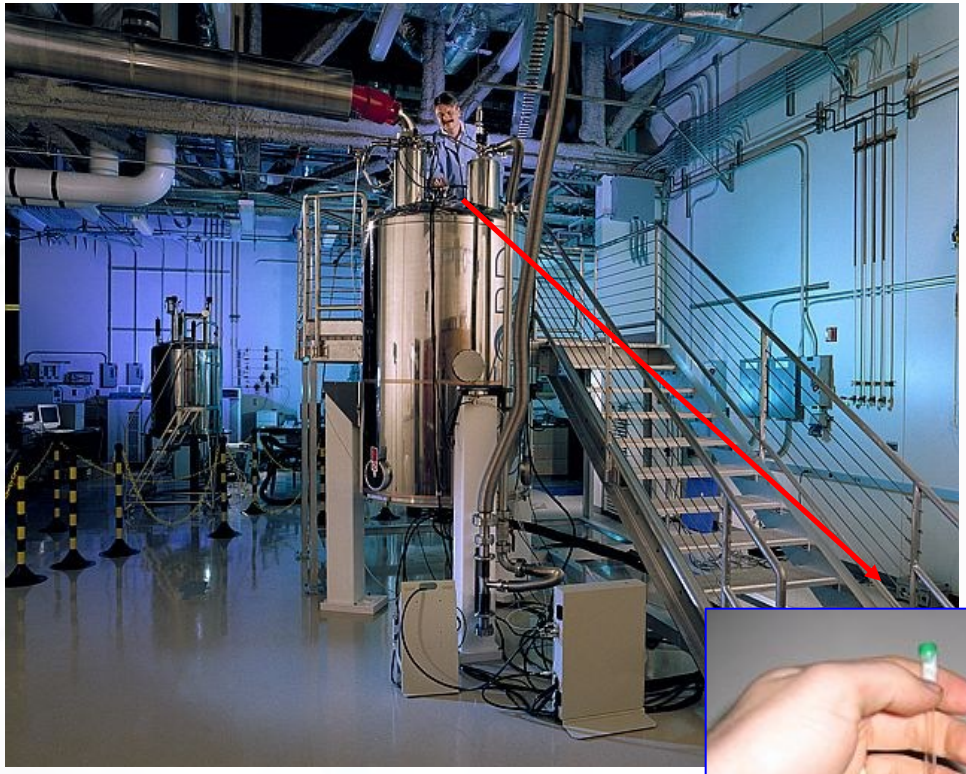


NMR: principio di funzionamento

La tecnica si basa sull'interazione dei singoli **nuclei atomici magneticamente attivi – ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C e ^{31}P – con un campo magnetico esterno variabile e con i campi magnetici dei nuclei adiacenti.**

Apparato sperimentale:

- **Magnete superconduttore** (50–900MHz) che genera un forte campo elettromagnetico
- **Console computerizzata** che genera impulsi elettromagnetici appropriati
- Cella di vetro (**cuvetta**) per l'alloggiamento del campione



(800 MHz) NMR spectrometer



campione

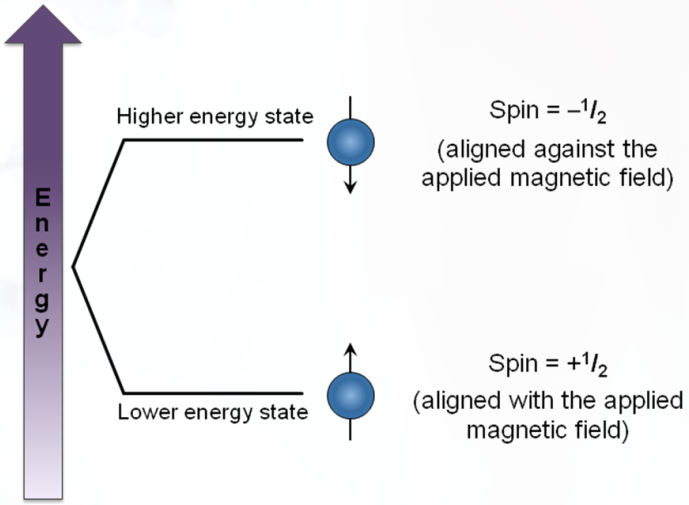
NMR: principio di funzionamento

- Sono osservabili con NMR solo i nuclei che hanno un momento magnetico nucleare di spin diverso da 0: $\mu = \gamma \boldsymbol{I} h/2\pi$
- γ è il rapporto giromagnetico (q/2m), h è la costante di Plank, **I è il numero quantico di spin nucleare.**
- I protoni e i neutroni si comportano come particelle ruotanti e possono avere numero di spin pari a $\pm 1/2$.
- I nuclei magneticamente attivi sono quelli con $I \neq 0$

1.Se i protoni e i neutroni sono entrambi pari, allora il nucleo ha spin zero come ad esempio ^{12}C e ^{16}O

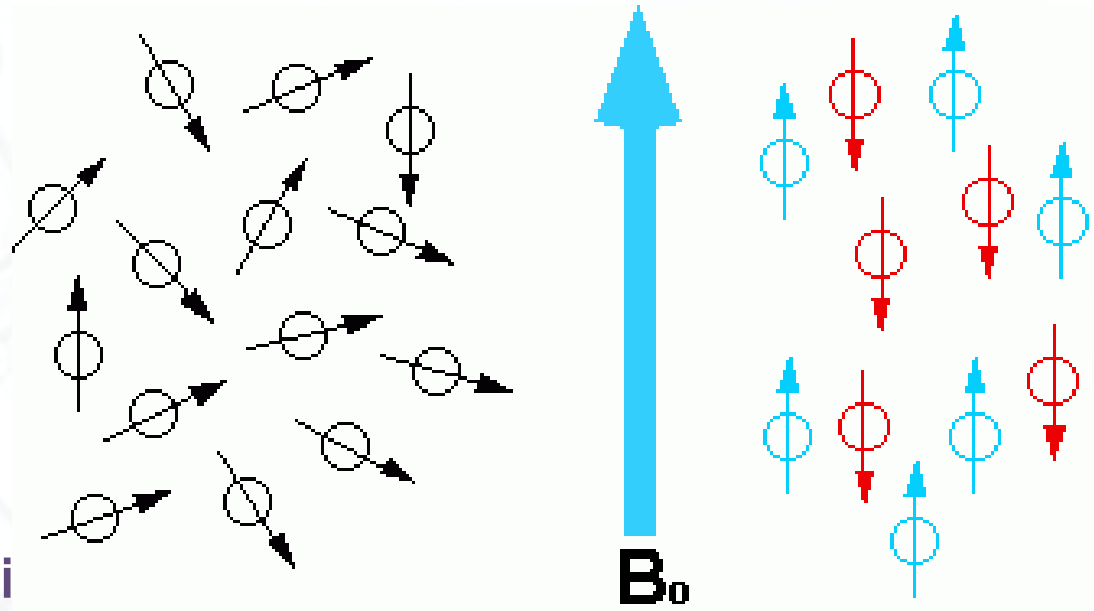
2. Se i protoni e i neutroni sono gli uni pari e gli altri dispari, allora il nucleo ha spin semi intero come ^{1}H, ^{19}F, ^{13}C, ^{31}P e ^{15}N che hanno $I = 1/2$

3. Se i protoni e i neutroni sono entrambi dispari, allora il nucleo ha spin intero . Rientrano nel terzo caso ^{2}H e ^{14}N che hanno $I = 1$ e quindi anche questi sono osservabili all'NMR.



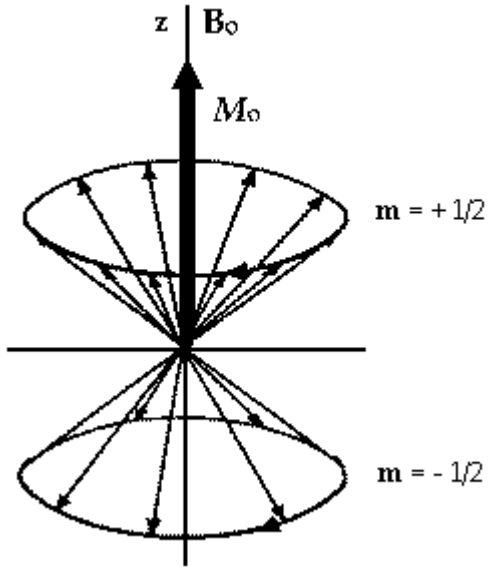
NMR: principio di funzionamento

- Un nucleo dotato di spin immerso in un campo magnetico esterno B_0, si orienta in senso parallelo (bassa energia) o antiparallelo ad esso (alta energia)



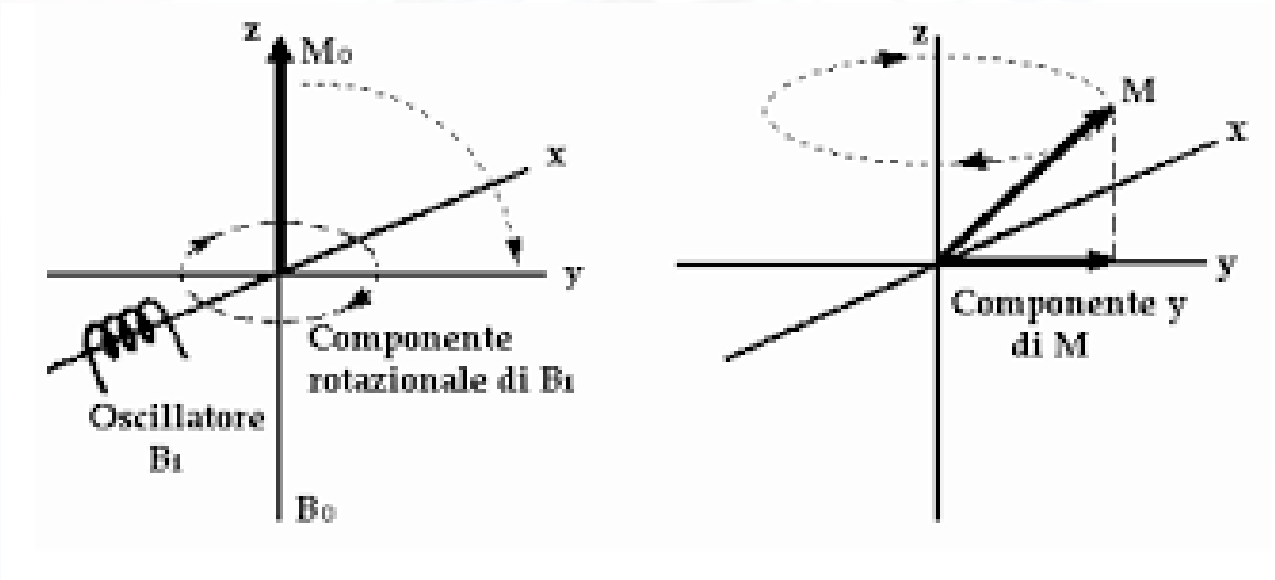
- Con l'NMR si esaminano direttamente i nuclei atomici magneticamente attivi:
  ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C e ^{31}P

- La somma dei momenti magnetici è il vettore Magnetizzazione M_0 che è orientato lungo la direzione del campo magnetico fisso



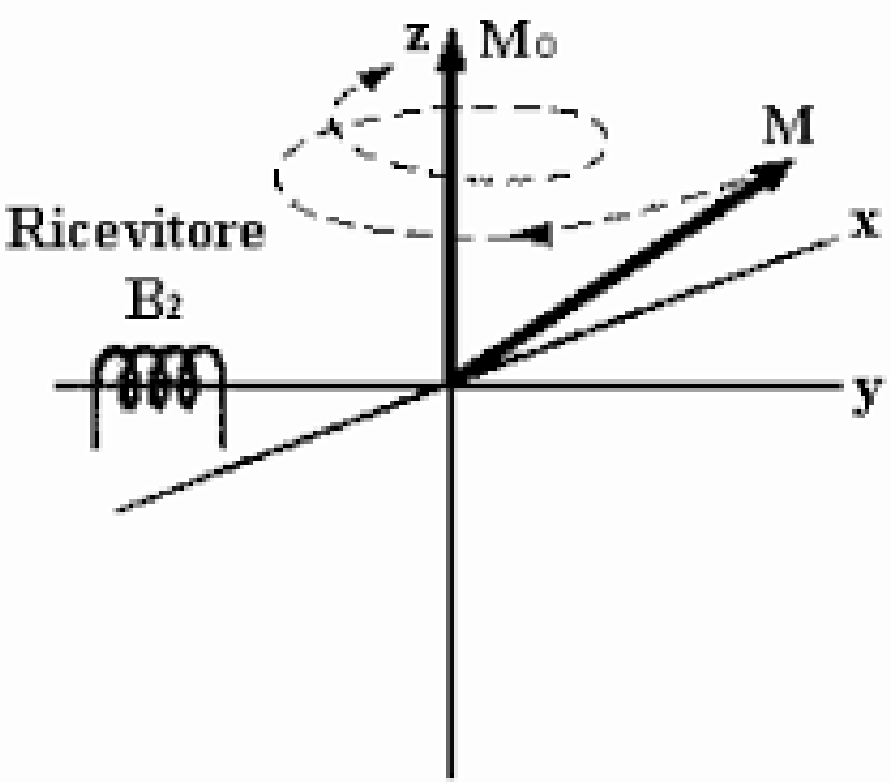
PRODUZIONE DEL SEGNALE NMR – Tecniche ad impulsi

1. Si applica un campo Magnetico fisso per generare il vettore magnetizzazione M_0. Negli strumenti moderni si ricorre ad un campo magnetico generato da correnti elettriche (per un segnale intorno ai 300 MHz servono 7 Tesla)
2. I nuclei vengono sottoposti ad un campo magnetico B_1 transiente perpendicolare a B_0 (impulso di radiofrequenza) (orientato lungo l'asse x). La magnetizzazione si avvicinerà al piano xy iniziando un moto di precessione intorno all'asse z con una **frequenza detta frequenza di Larmor.**



RILEVAZIONE DEL SEGNALE

Il rivelatore rileva la componente della magnetizzazione lungo l'asse y che diventa 0 quando la magnetizzazione si orienta lungo l'asse z.



LE BASI DEL SEGNALE NMR

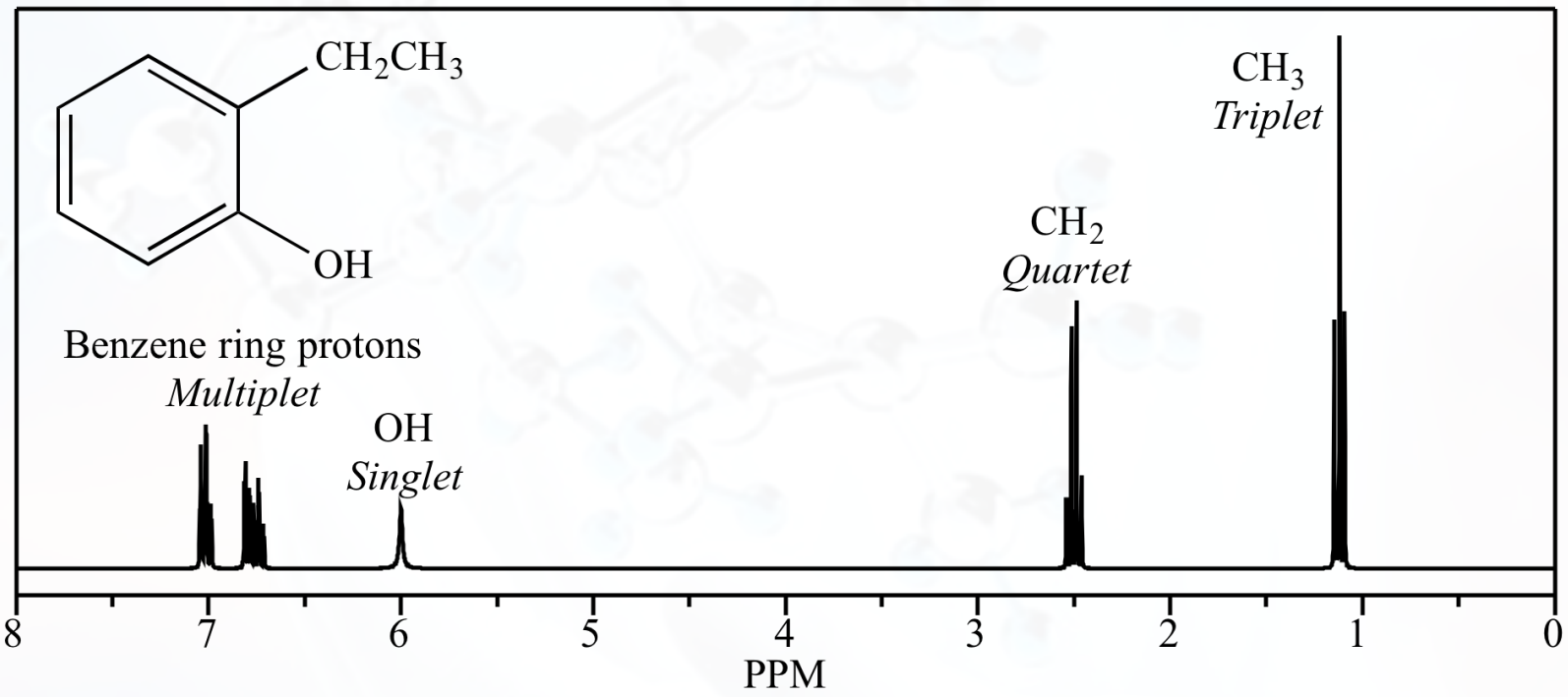
Dato che il dipolo magnetico μ di un certo nucleo è una costante, si potrebbe prevedere che tutti i nuclei di un certo tipo debbano risuonare esattamente alla stessa frequenza in un determinato campo magnetico applicato. Se le cose stessero così, la spettroscopia NMR sarebbe del tutto inutile perchè nello spettro avremmo un unico segnale.

Per fortuna, nelle molecole reali, questo fatto accade molto raramente. Infatti il segnale NMR di un certo nucleo risulta spostato nello spettro a frequenze più alte o più basse a seconda del suo intorno chimico.

Questo accade perché gli elettroni sono particelle cariche e come tali, quando vengono immersi in un campo magnetico Bo, si muovono e generano un piccolo campo magnetico opposto a quello molto più forte applicato. Questo campo magnetico secondario scherma il nucleo dalla piena forza del campo applicato.
Tanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà questa schermatura, **così i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni, sentiranno un campo magnetico più basso e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni.**
Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo è detto spostamento chimico (chemical shift) e, in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati quindi sentono un campo magnetico applicato più intenso e subiscono transizione a frequenze maggiori e, nello spettro, si trovano ad uno spostamento chimico più alto .

NMR: principio di funzionamento

Posso interpretare facilmente uno spettro NMR 1D per piccole molecole

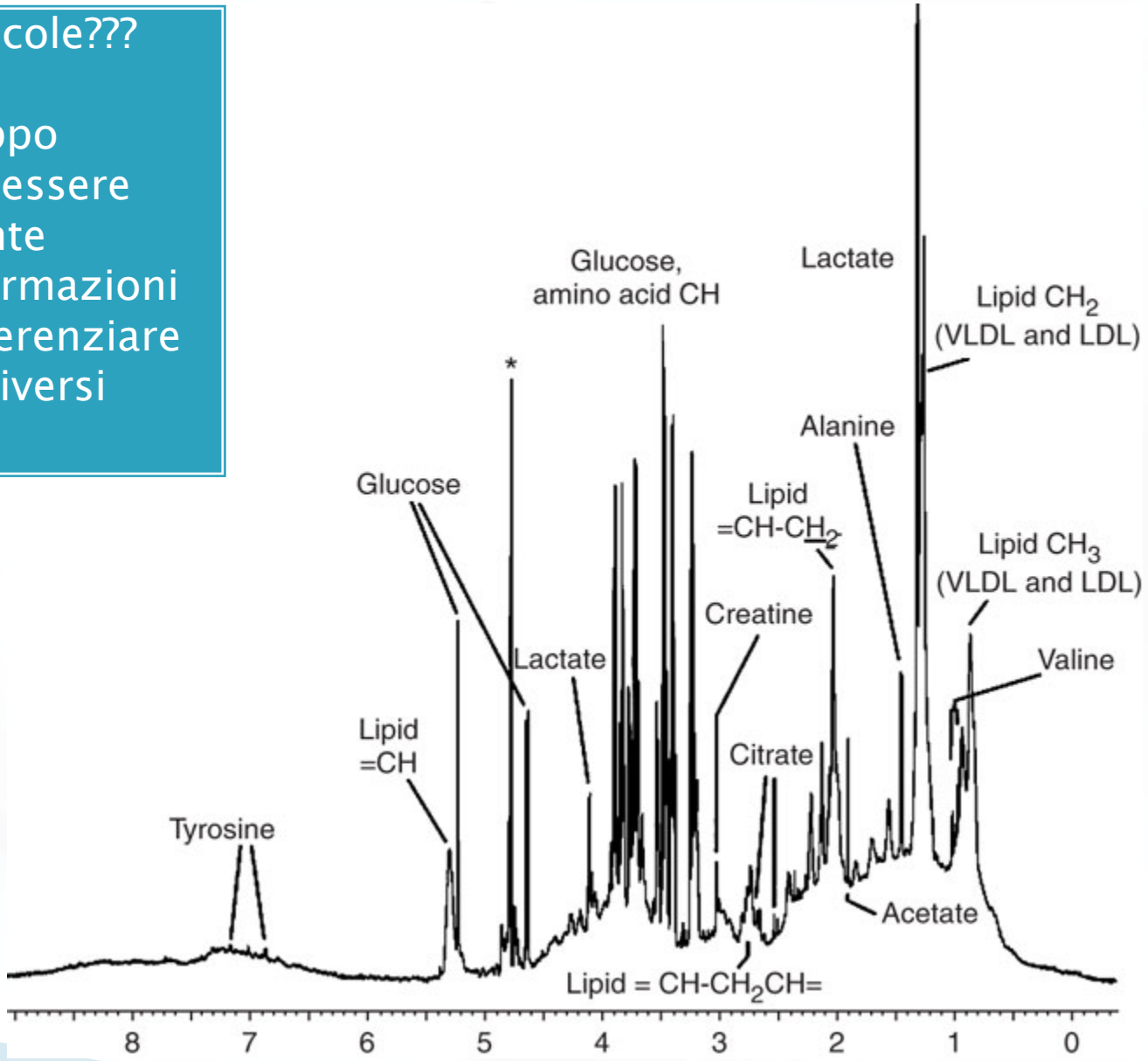


Ref=TMS= tetramethylsilane

$$\delta = \frac{\nu_{\text{sample}} - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}},$$

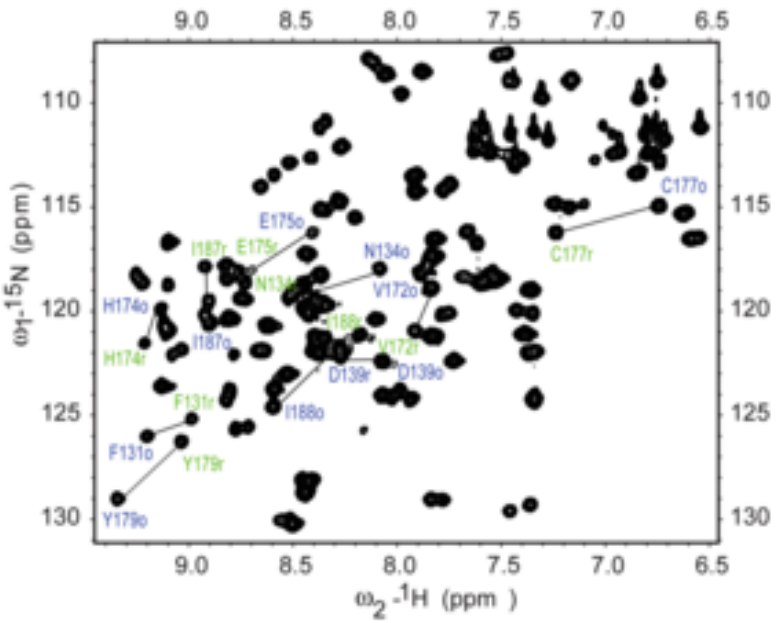
NMR: principio di funzionamento

Ma per le Macro molecole???
Uno spettro NMR di macromolecole è troppo complicato per poter essere analizzato direttamente
…mi servono più informazioni e la possibilità di differenziare meglio i segnali dei diversi atomi



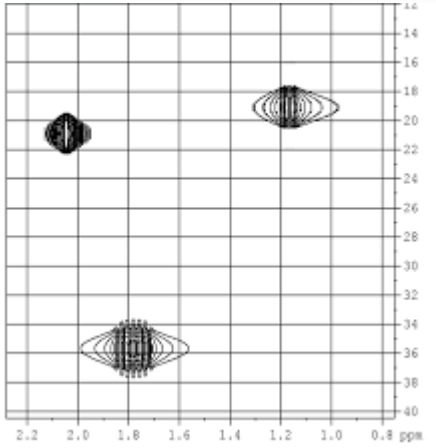
SPETTRI BIDIMENSIONALI

È possibile realizzare anche spettri NMR in cui l'intensità è funzione di due frequenze (indicate con ν1 e ν2 o, più spesso, F1 e F2). Si parla in questo caso di NMR bidimensionale o 2D NMR.



Le due frequenze sono spesso (ma non sempre) chemical shift

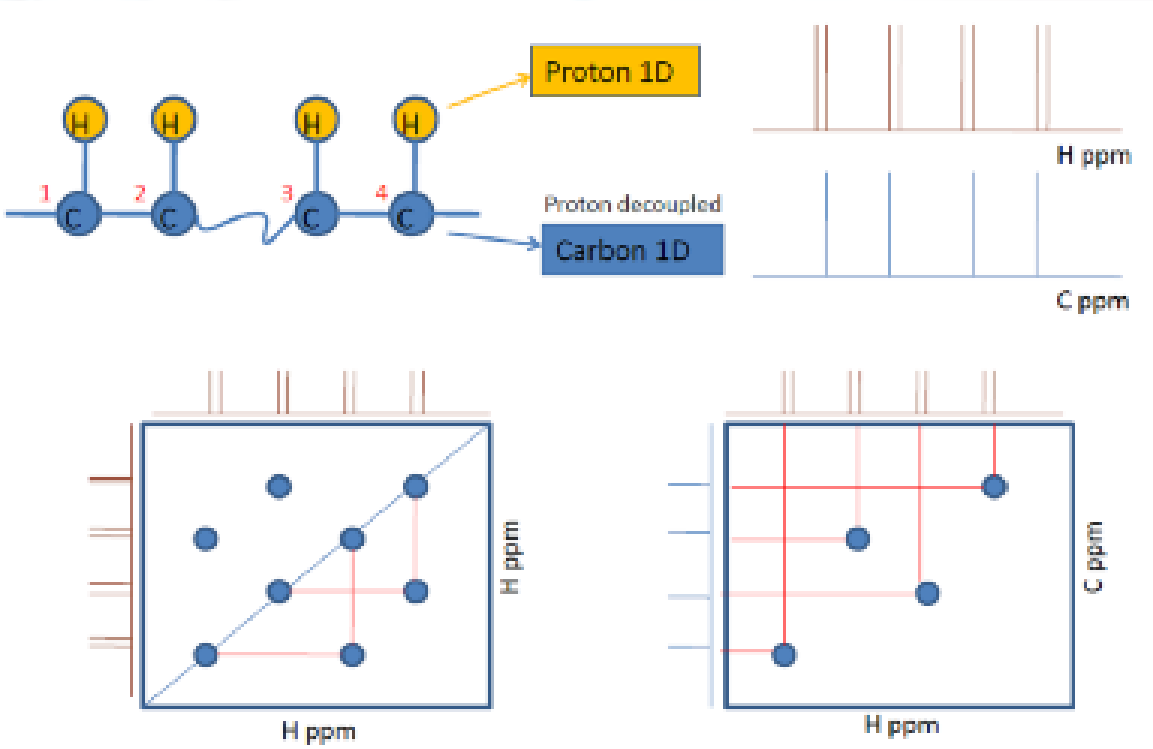
E L'intensita del segnale ?
L'intensità del segnale sarebbe rappresentato su una terza dimensione (asse z). Si preferisce però rappresentare l'intensità con curve di livello (come se si vedesse lo spettro dall'alto)



Spettri: COSY (Correlation SpectroscopY)

- Sia F1 che F2 appartengono allo stesso nucleo (^{1}H)
- Sulla diagonale abbiamo lo spettro normale
- Al di fuori della diagonale ci sono i cross peak che sono dovuti all'accoppiamento di due idrogeni .

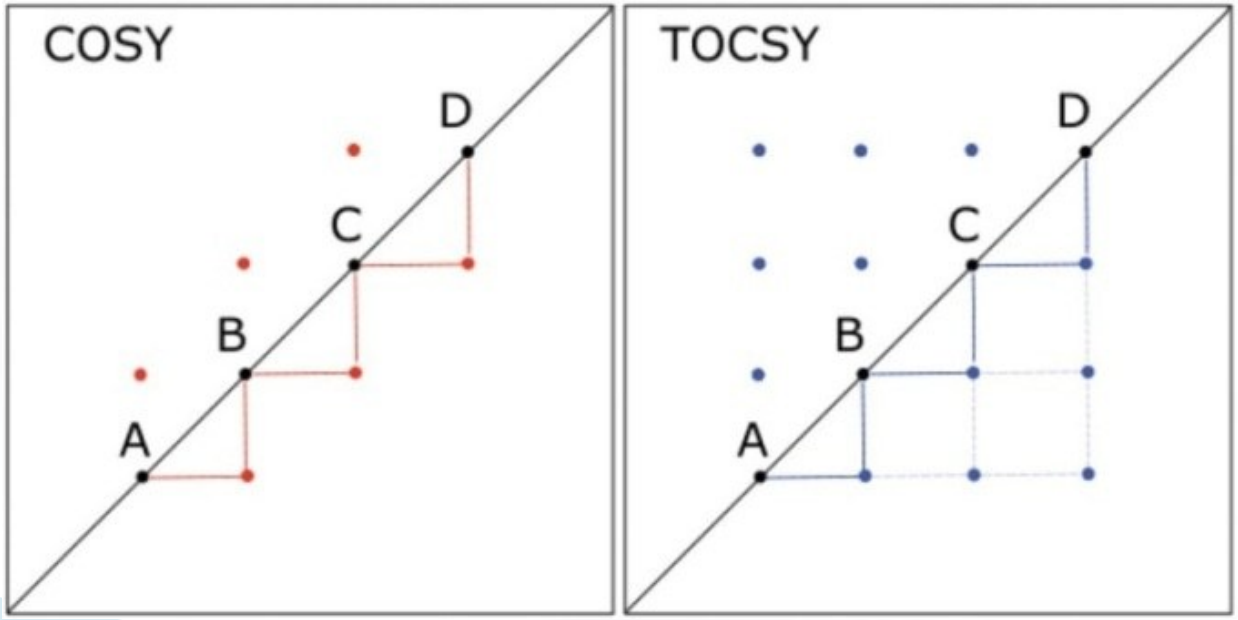
La spettroscopia di correlazione (CoSY) sfrutta il trasferimento di magnetizzazione through-bond rivela atomi adiacenti in sequenza



Spettri TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

- **Interazione indiretta (through-bond, accoppiamento spin-spin)**

- **La spettroscopia di correlazione Totale (ToCSY - *Total correlation spectroscopy*)** la spettroscopia ToCSY è sempre **bidimensionale (2D) ed omo-nucleare,** cioè rileva l'accoppiamento tra nuclei uguali (es. H-H) ma a differenza della COSY, che rivela solo nuclei adiacenti, essa **rivela l'accoppiamento di spin tra nulcei anche NON ADIACENTI.**

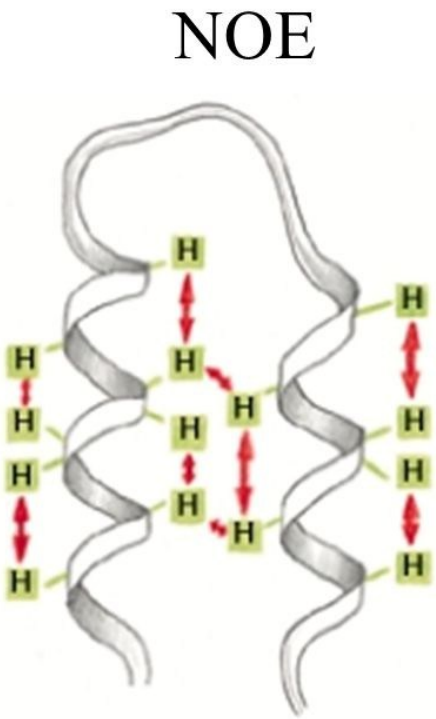


Spettri NOESY (NOE SpectroscopY)

- **Interazione diretta (through-space, Nuclear Overhauser Effect NOE)**

- **La spettroscopia NOESY** sfrutta il trasferimento through-space della magnetizzazione tra atomi a max 5 Å di distanza rivela atomi vicini nello spazio **informazioni sul folding**

Negli spettri NOESY, I picchi di correlazione sono tra nuclei vicini nello spazio

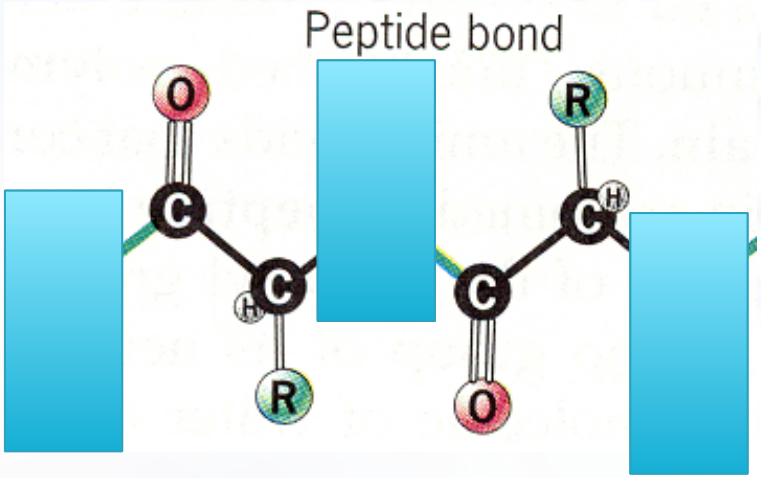


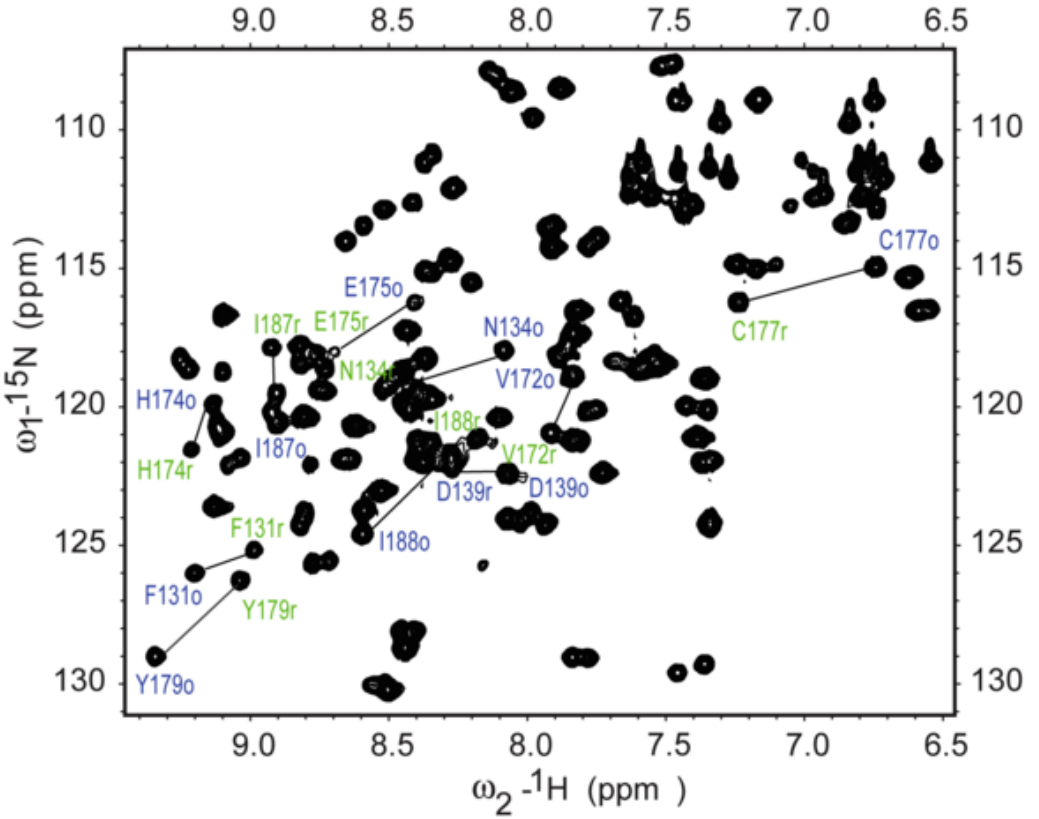
- NOE NMR experiments give signals that correspond to hydrogen atoms that are close together in space (less than 5 Å), even though they may be far apart in the amino acid sequence. Both secondary and tertiary structures of small protein molecules can be derived from a collection of such signals, which define distance constraints between a number of hydrogen atoms along the polypeptide chain.

Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

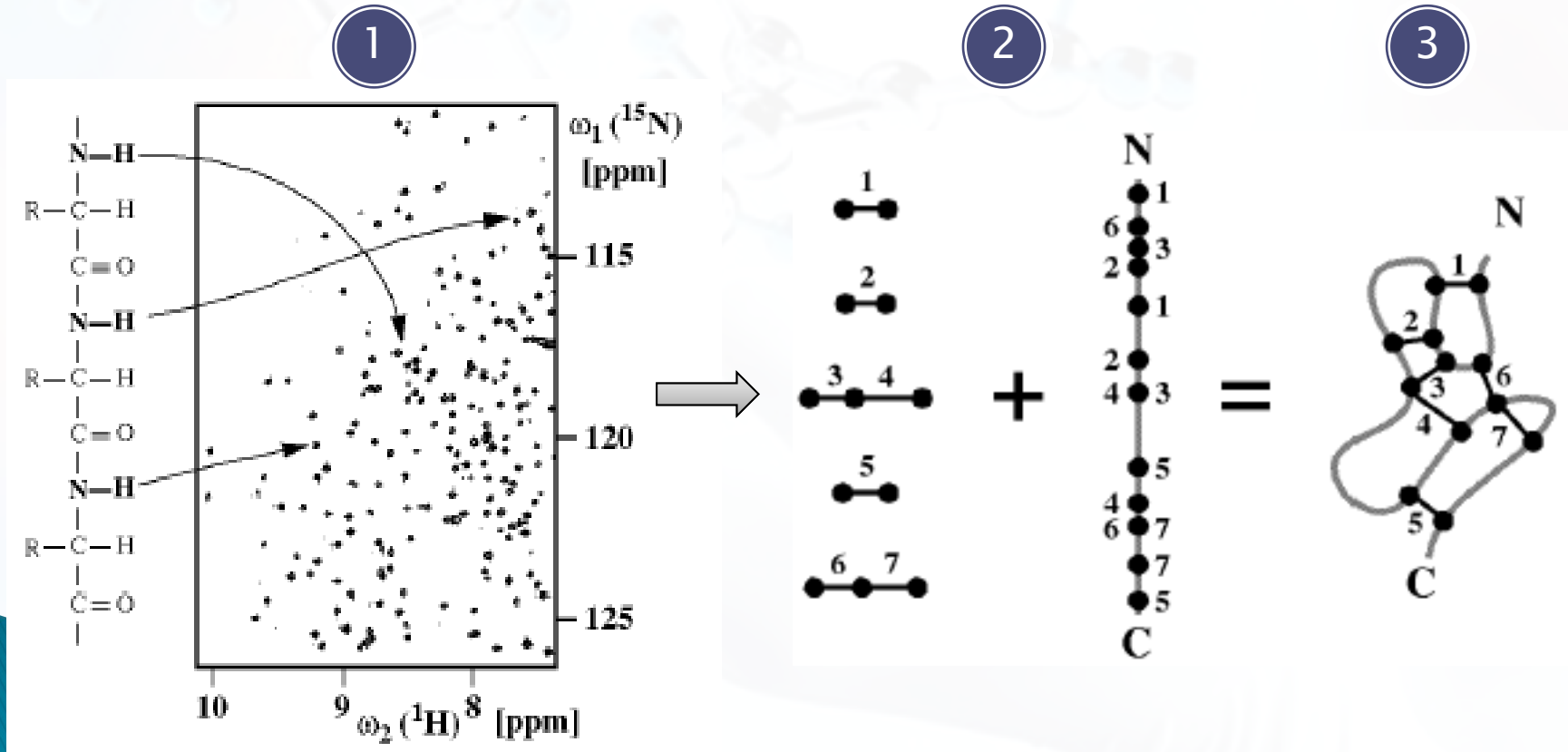
- Interazione indiretta (through-bond, accoppiamento spin-spin)

- Nella Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC) lo spettro bidimensionale ha un asse per i protoni ed uno per un atomo magneticamente attivo come ^{13}C o ^{15}N e sfrutta l'accoppiamento tra nuclei differenti legati tra loro (ad es. ^{1}H e ^{15}N). Tipico per le proteine





1. **Assegnazione dei picchi ai singoli atomi della molecola** analisi dei chemical shift
2. **Assegnazione delle distanze** di legame inter- e intra-molecolari insieme delle conformazioni
3. **Calcolo dell'insieme delle strutture 3D** e cicli di affinamento dell'insieme di strutture fino a convergenza



NMR: solid state NMR structure solution of SOD

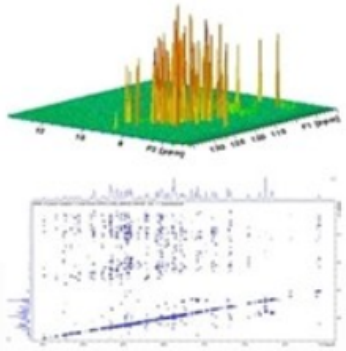


Industry News: Bruker announces world's first 1.2 GHz high-resolution protein NMR data

30 Aug 2019

LinkedIn Facebook Twitter WeChat Email More

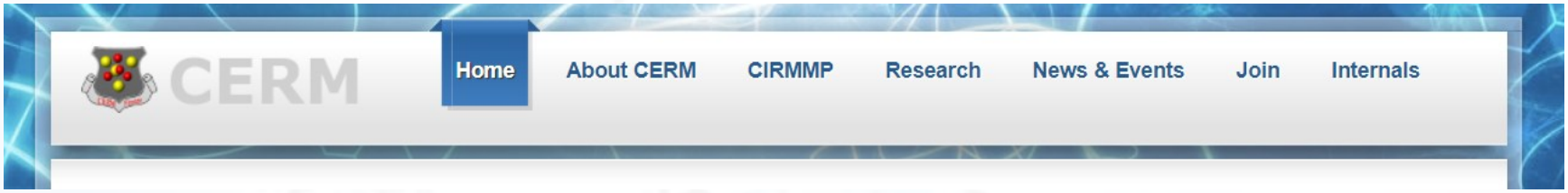
At EUROISMAR 2019, Bruker Corporation announced the world's first 1.2 GHz high-resolution, protein nuclear magnetic resonance (NMR) data. Two 1.2 GHz superconducting magnets have now reached full field at Bruker's Swiss magnet factory, setting the world record for stable, homogeneous NMR magnets for high-resolution and solid-state protein NMR applications in structural biology and for the study of intrinsically disordered proteins (IDPs).



At EUROISMAR 2019, Bruker and its scientific collaborators presented 1.2 GHz high-resolution NMR data that has been acquired using a new 1.2 GHz 3 mm triple-inverse TCI CryoProbe. Bruker's unique 1.2 GHz ultra-high field NMR magnets utilize a novel hybrid design with high-temperature superconductor (HTS) inserts inside advanced, low-temperature superconductor (LTS) outserts, which together provide the extremely demanding stability and homogeneity for high-resolution protein NMR.

Professors Lucia Banci and Claudio Luchinat at the University of Florence, Italy, are expected to be the first customers to receive a 1.2 GHz NMR spectrometer, once further systems development and factory testing has been completed, a process that is expected to take several more months. After initial data acquisition of CERM test samples on one of the 1.2 GHz systems, they stated: "At Bruker's UHF facility in Switzerland, high resolution spectra have been acquired on alpha-synuclein, which is an intrinsically disordered protein that has been linked to diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. In addition, we have also been able to review first 1.2 GHz NMR spectra of a protein which is associated with several types of cancer. Without a doubt, the improved resolution of the 1.2 GHz instrument - made possible by the increased dispersion at high magnetic fields - will help to advance important fields of research, such as structural biology. We look forward to receiving the 1.2 GHz NMR spectrometer in our laboratory once final developments and factory evaluation have been completed."

NMR: in ITALIA

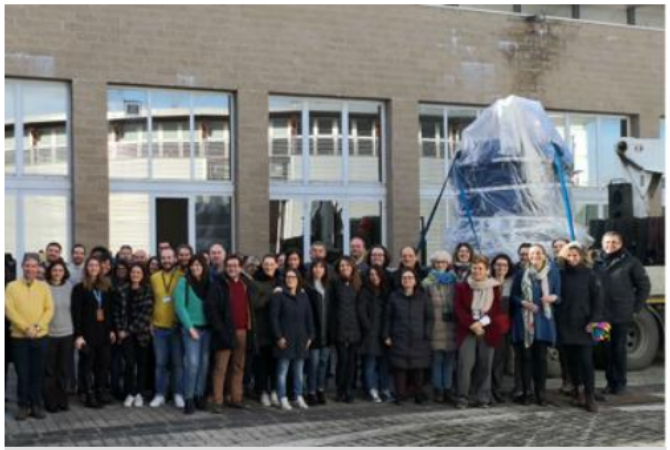


http://www.cerm.unifi.it/

Ecco la risonanza magnetica più potente al mondo

CRONACA

Mi piace 98 Condividi Tweet Share



Pubblicato il: 13/02/2020 17:39

E' il Centro di Risonanze Magnetiche (Cerm) dell'Università di Firenze **il primo istituto di ricerca al mondo a ricevere lo strumento di risonanza magnetica nucleare (Nmr) più potente che esista**. Il grande macchinario è giunto oggi al campus di Sesto Fiorentino dove il Cerm ha sede. Ad attenderlo Lucia Banci e Claudio Luchinat, direttori della struttura e il team del centro.

Lo spettrometro Nmr a più alto campo magnetico al mondo è stato sviluppato da Bruker BioSpin, l'azienda multinazionale leader nel mondo nel settore, e **ha un costo di 15 milioni di euro**. E' stato acquisito con fondi del Ministero dell'Università e della Ricerca, della Regione Toscana, di progetti europei e con un contributo di Fondazione Cr Firenze che, per l'importanza dell'operazione, ha iniziato i finanziamenti fin dalle prime fasi. L'attrezzatura apre nuove prospettive per la ricerca, specialmente applicata a sistemi biologici e cellulari, e per la comprensione dei processi funzionali alla base della vita.

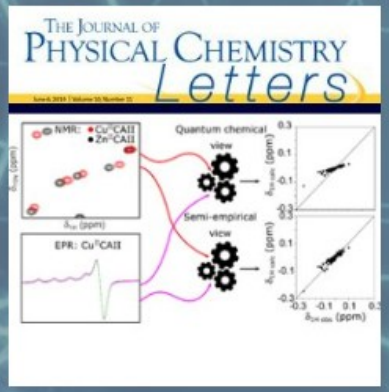
NMR: in ITALIA

http://www.cerm.unifi.it/

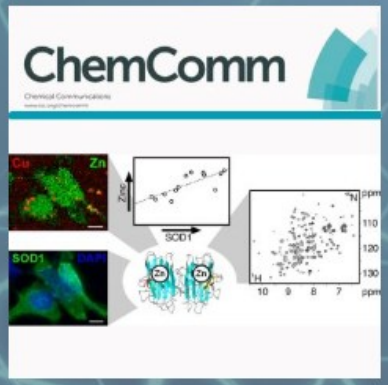
CERM

Home | About CERM | CIRMMP | Research | News & Events | Join | Internals

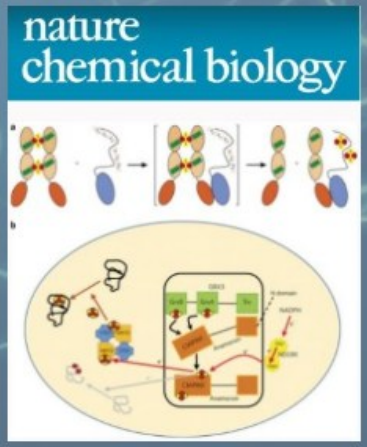
Publications | Protein Structures | NMR Methods | Software Development | CERM Research at Conferences



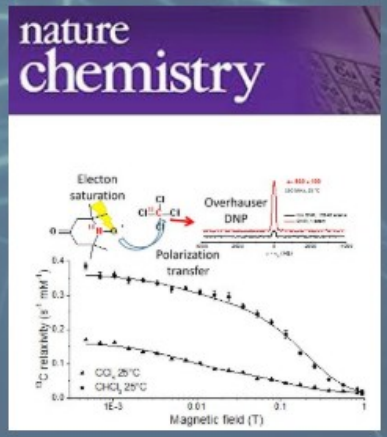
The first-principles approach for the analysis of pseudocontact shifts (PCSs) is questioned by comparing the experimental g values of copper(II) proteins with those derived from the anisotropy tensor obtained from the PCSs. Read More



An integrated approach which combines in-cell NMR spectroscopy with optical and X-ray fluorescence microscopy was developed to describe the intracellular maturation state of human Cu,Zn-SOD1. Read More



Structural and biophysical evidences define the early steps of iron-sulfur protein maturation in the cytosol, demonstrating that glutaredoxin-3 passes [2Fe-2S] clusters to anamorsin during a protein-protein interaction mediated by their N-terminal domains. Read More



Dynamic nuclear polarization (DNP) in liquid solutions can enhance 13C NMR signals at magnetic fields of 3 T and room temperature up to three orders of magnitude. Read More

Highlighted in Angewandte Chemie

NMR: in ITALIA

http://www.cerm.unifi.it/

CERM

Home | About CERM | CIRMMP | Research | News & Events | Join | Internals

Publications | Protein Structures | NMR Methods | Software Development | CERM Research at Conferences

Methodological Advancements in Solution and Solid-State NMR

The laboratory is very active in the proposal of methodological advancements for high-resolution NMR. Recently, attention has been concentrated on **^{13}C direct-detection** applied to the study of macromolecules of biological interest. With an increase in the complexity of the analyzed macromolecules, direct acquisition of the spectra of ^{13}C allows us to push the boundaries of research possible with ^{1}H NMR spectroscopy only.

In this field CERM has contributed to the fine-tuning of a series of ^{13}C-^{13}C and ^{13}C-^{15}N experiments in 2D and 3D at high resolution for the sequence-specific assignment of proteins that are particularly difficult to study using conventional methods.

In the case of proteins containing a **paramagnetic metal ion**, pseudocontact shifts and residual dipolar couplings are used to refine protein structures and to investigate the extent of the conformational heterogeneity of the system through the **maximum occurrence** approach.

The results that have been obtained are due in part to an intense collaboration with **Bruker**, a major company producing NMR instrumentation, which has allowed us to test accessories at the forefront of technology.

Another recent ambition of research at CERM is the study of metalloproteins in the solid phase (**solid-state NMR** or SS NMR), made possible through the acquisition of an NMR instrument for solid state experiments at 700 MHz (wide-bore magnet). We are finding that large proteins and paramagnetic proteins are potentially better studied in the solid phase than in solution.

Recent studies carried out at CERM have demonstrated that in the solid phase it is possible to observe a paramagnetic shift in metalloproteins analogous to that which is observed in solution, and that this can be used to study structures in the solid phase. These studies have been carried out on a wide-bore 700 MHz instrument using an MAS probe in triple resonance 4mm capable of keeping the specimen in rotation up to 15 kHz. An MAS triple resonance 3.2 mm probe that permits operation at a higher speed (up to 25 kHz) has recently been acquired.

Additionally, low field NMR (**relaxometry**) has been in continuous development to facilitate the understanding of the fine details

NMR Methods

- NMR Pulse Sequences
- 13C Direct Detection Experiments
- Maximum Occurrence
- Pseudocontact Shifts
- Contact Shifts
- Heme Methyl Chemical Shifts
- Anisotropies in LS Fe(III)
- Relaxation Rates
- Cross Correlations Between Curie and Dipolar Relaxation
- Residual Dipolar Couplings
- Ramachandran Potentials

VANTAGGI



- **Alta Risoluzione** (risoluzione atomica)
- Consente lo studio del campione in **condizioni fisiologiche**
- **Informativa anche sulle zone dinamiche (mobili) della struttura**

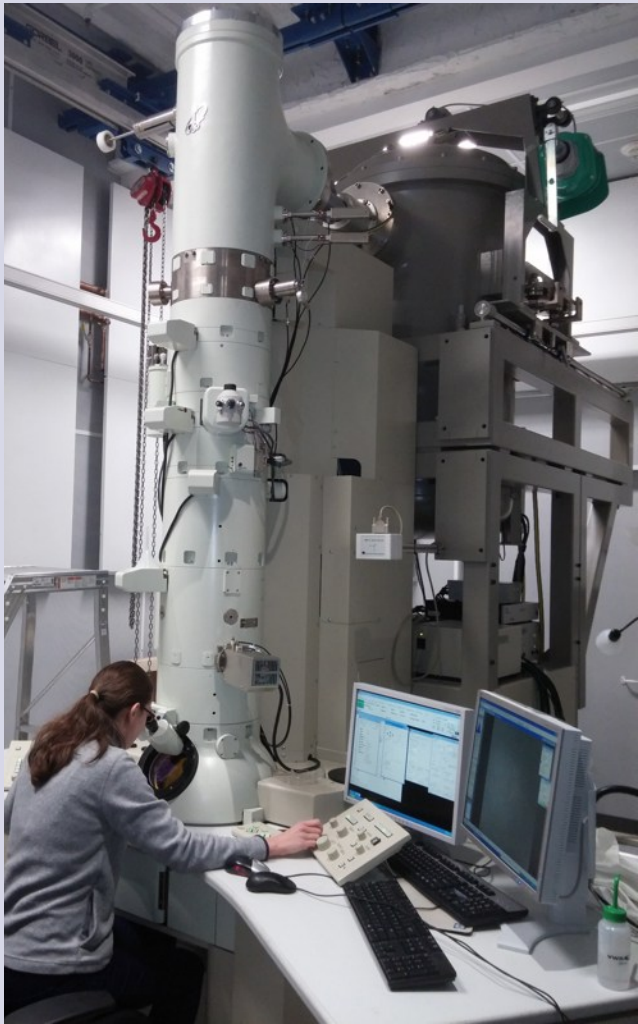
SVANTAGGI



- Metodo **indiretto**
- Limitata a **proteine piccole** (< 100 KDa circa)
- Il campione deve essere:
  - **puro >98% e omogeneo**
  - Solubile – concentrazioni di lavoro > **0.8mM**
  - Se > **10kDa**, deve essere **arricchito** in ^{13}C e ^{15}N
  - Se > **28kDa**, deve essere anche **deuterato**
  - **Espressione eterologa limitata** a *E. coli* e *P. pastoris*

Microscopia Elettronica - EM



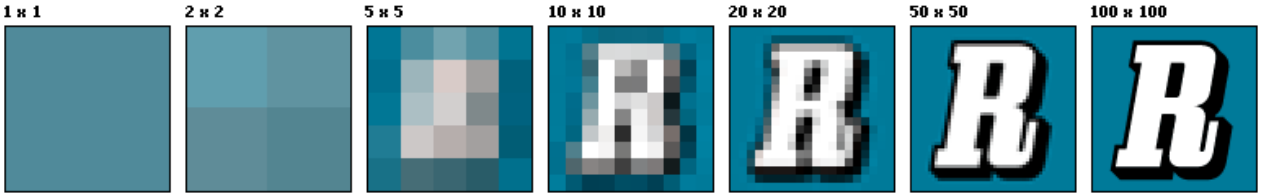


Miscoscopia elettronica con metodi criogenici
Cryo-electron microscopy (Cryo-EM)

1. E’ un metodo diretto
2 Consente di osservare direttamente la molecola in tutte le sue possibili conformazioni
3. L’analisi dei dati è molto complessa e richiede grande potenza di calcolo

Murata and Wolf 2018 BBA - General Subjects 1862 (2018) 324–334)

• Cryo-EM su singola molecola



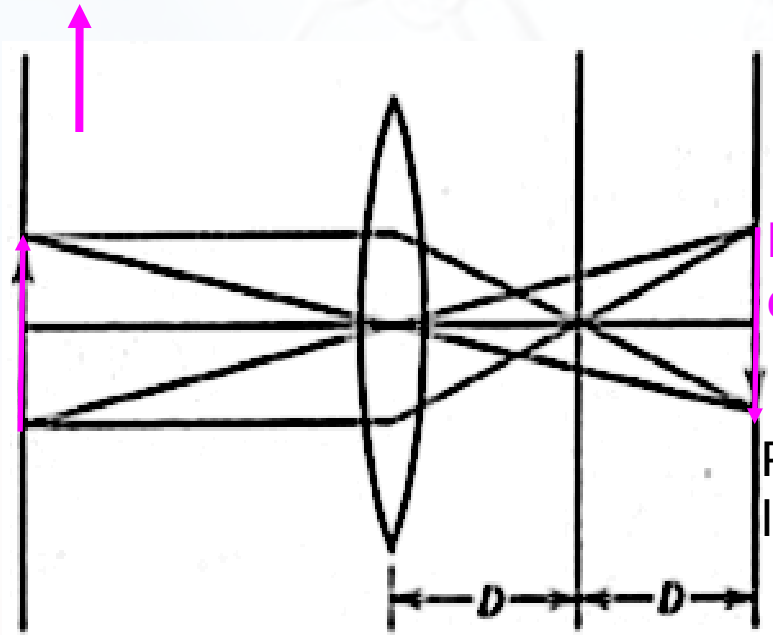
Equazione di Abbe

Qualsiasi onda elettromagnetica con una lunghezza d'onda λ
E che si propaga in un mezzo con indice di rifrazione n e viene
Diffusa con un angolo 2 θ avrà una distanza minima risolvibile pari a

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}$$

Dove NA è chiamata l'apertura numerica

Formazione di un' immagine ottica



L'immagine dell'oggetto e l'immagine di diffrazione sono in relazione tra di loro tramite una **trasformata di Fourier (TF)**

Piano focale, contenente l' immagine di diffrazione

Formazione di un' immagine ottica

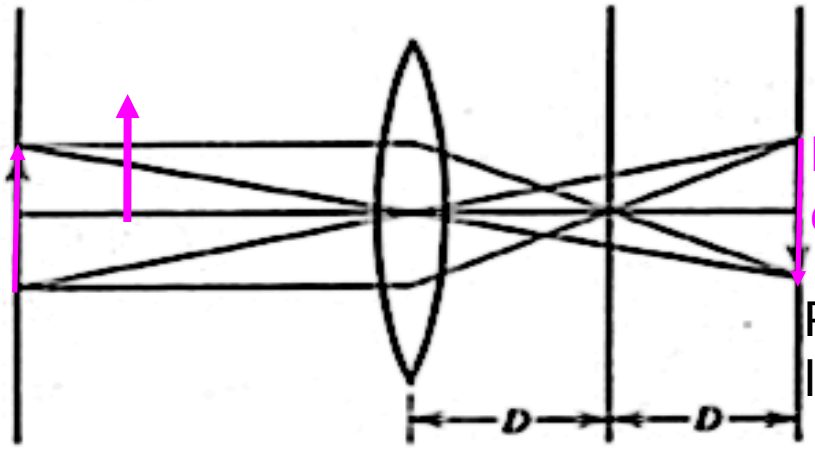


Immagine dell' oggetto

Piano del- l' immagine

L' immagine dell' oggetto e l' immagine di diffrazione sono in relazione tra di loro tramite una **trasformata di Fourier (TF)**

Ora, separiamo la lente in due metà:

L' immagine dell' oggetto è una TF della diffrazione
La diffrazione è una TF dell' oggetto

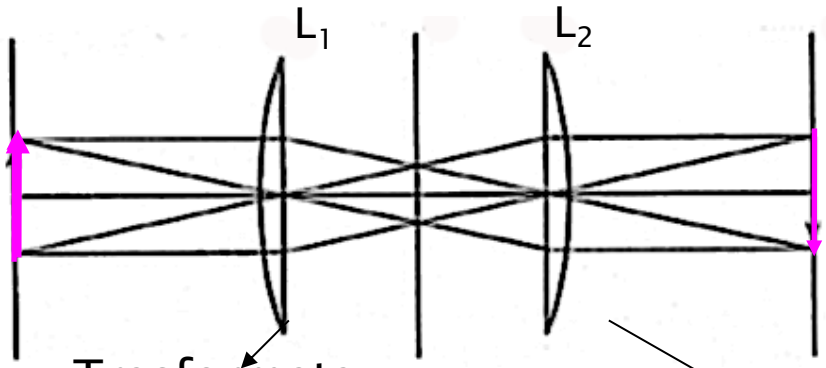


Immagine dell' oggetto (diffrazione di una diffrazione)

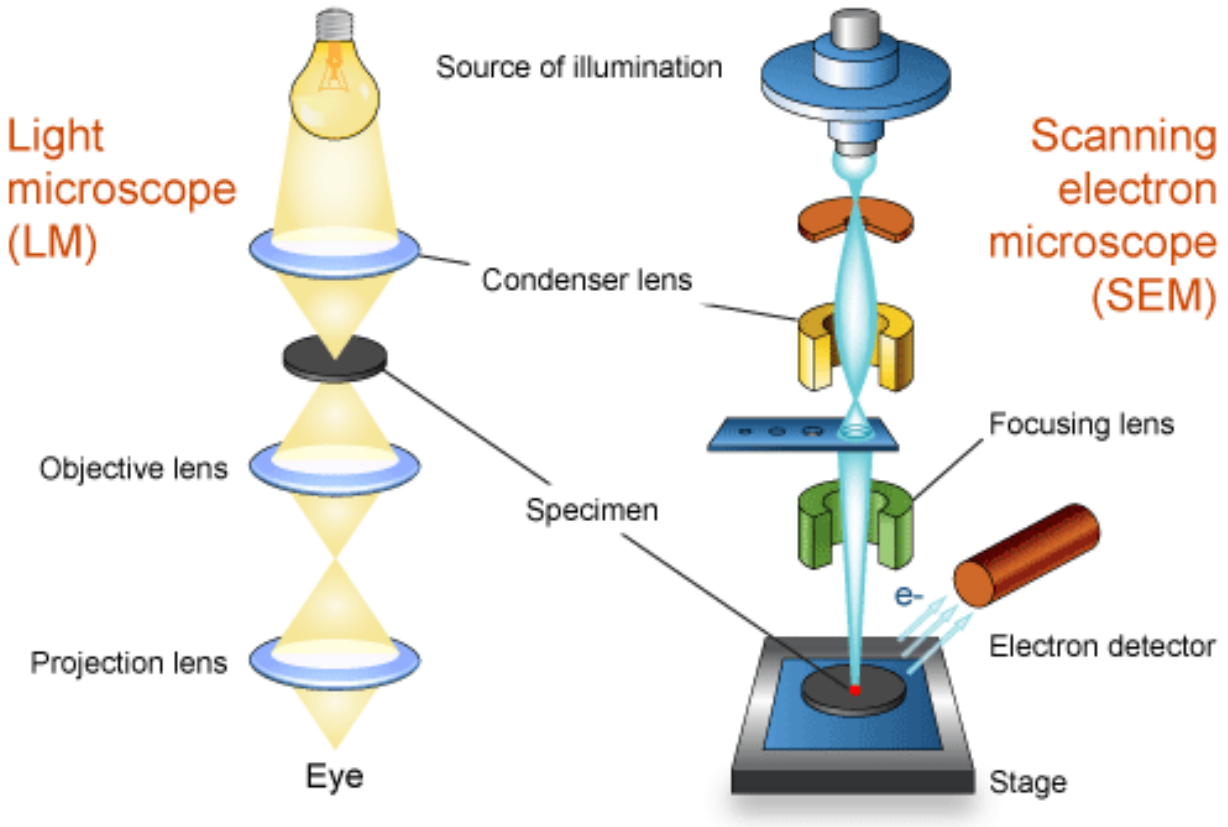
Trasformata di Fourier "fisica"

Piano focale, contenente l' immagine di diffrazione

Trasformata di Fourier "matematica"

EM – caratteristiche principali

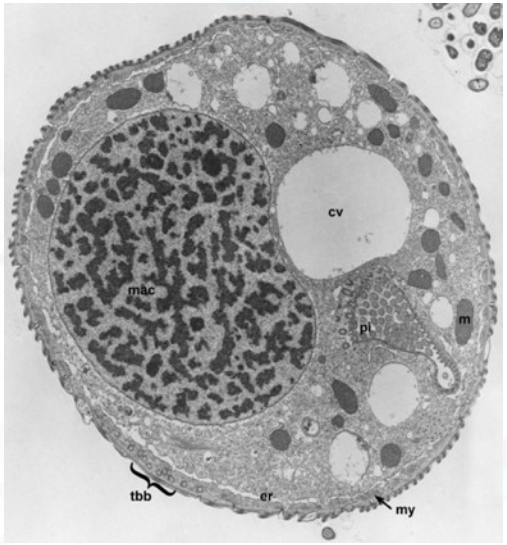
- **Metodo diretto**: Il campione viene visualizzato direttamente perché i fasci di elettroni possono essere focalizzati da **LENTI ELETTROMAGNETICHE**
- Richiede **alto vuoto**
- Richiede una **preparazione specifica del campione** a seconda della tecnica utilizzata
- Campione osservato **in condizioni fisiologiche**

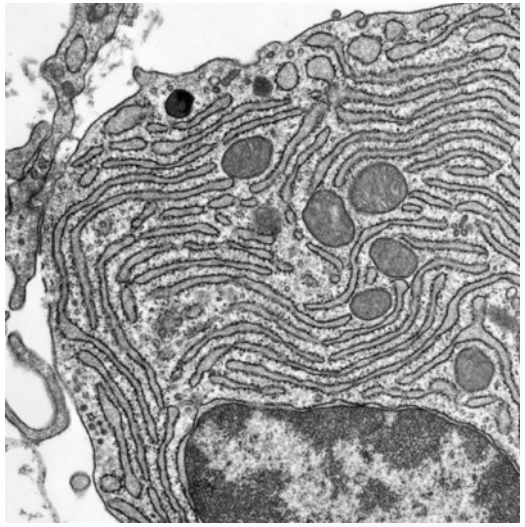


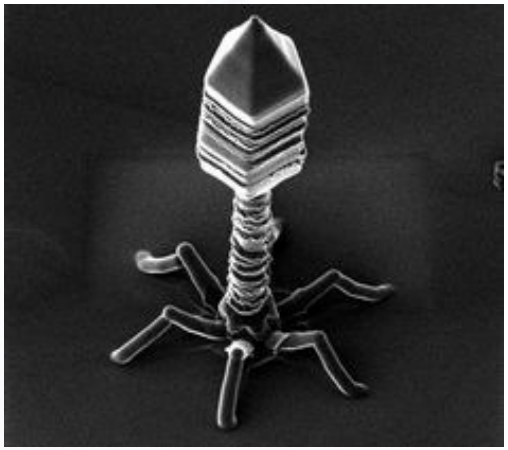
EM – CLASSICA

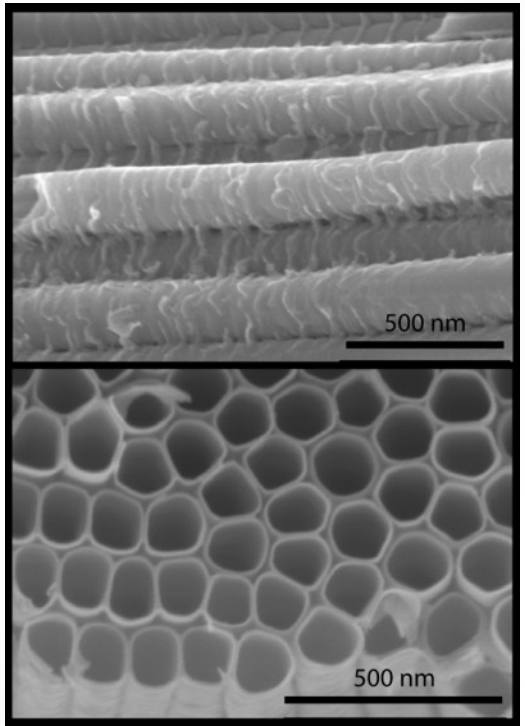
Tecnica elettiva per lo studio di

- Cellule
- strutture subcellulari
- particelle virali
- Nano materiali (nano tecnologie)

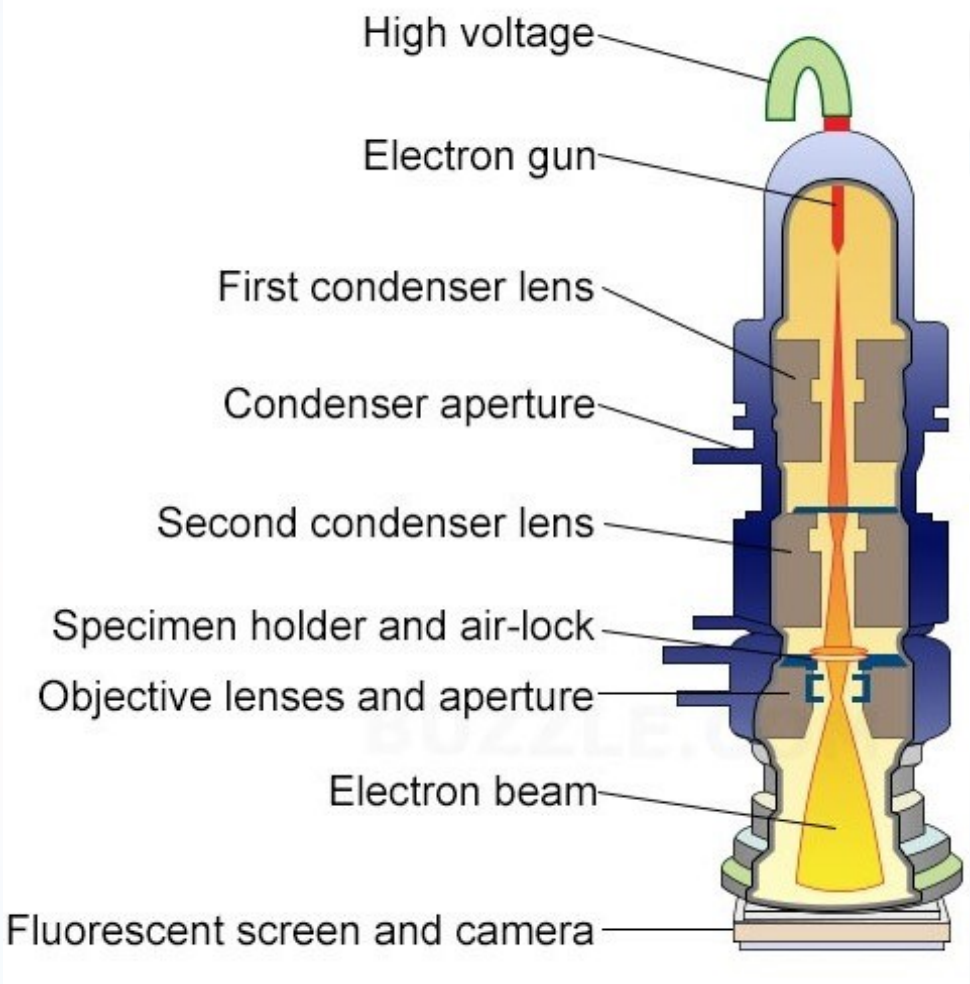








Microscopio Elettronico a Trasmissione: TEM

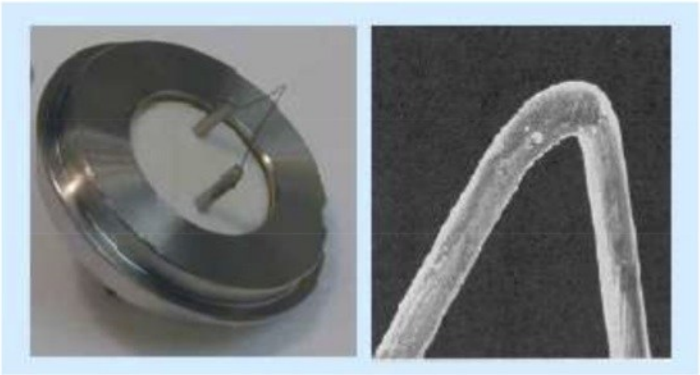


- Gli elettroni vengono emessi da un filamento incandescente (>2500K)
- Le lenti di collimazione del fascio e di ingrandimento sono magnetiche e filtrano una sola lunghezza d'onda del fascio di *elettroni*, collimandolo e rendendolo più coerente
- Le aperture servono per migliorare il contrasto perché filtrano gli elettroni a seconda dell'angolo di riflessione
- Il computer serve a controllare l'allineamento, la collimazione e la brillantezza del raggio, il movimento del campione, la messa a fuoco e l'ingrandimento

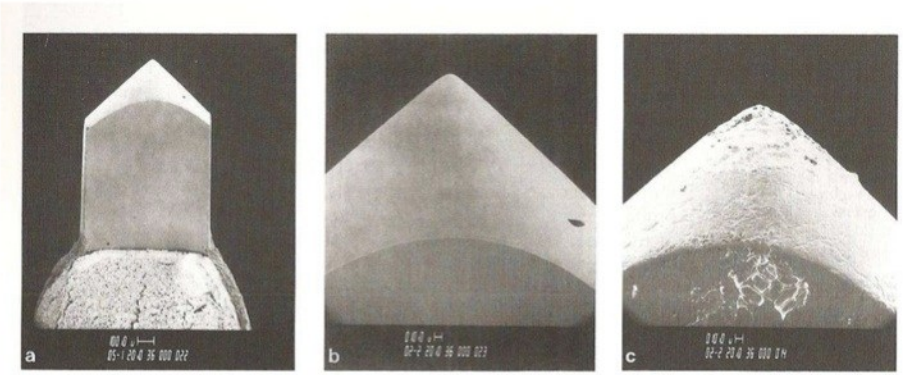
The electron source

SciLifeLab

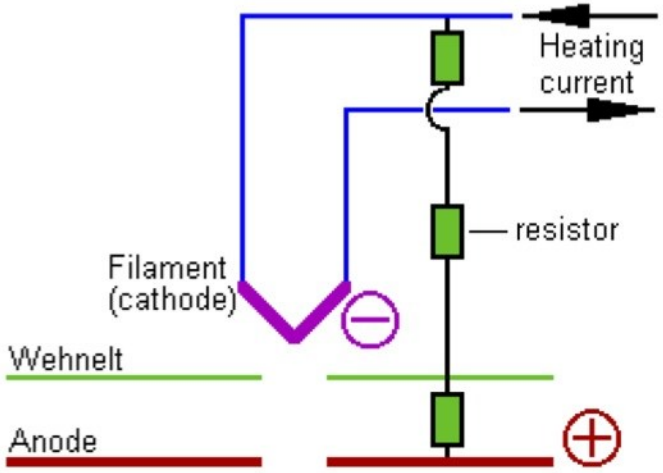
Tungsten filament



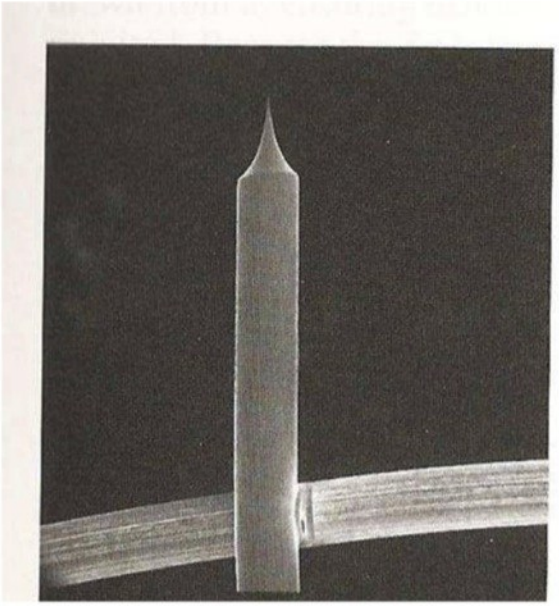
Lanthanum hexaborate (LaB_6)



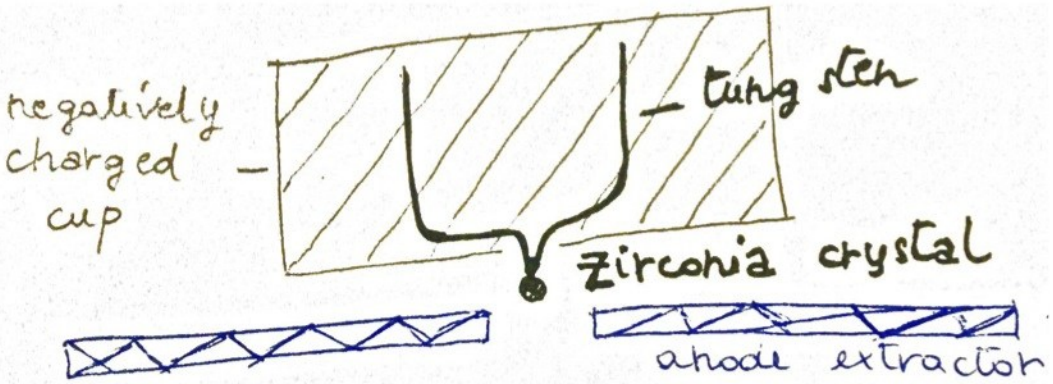
Thermionic source

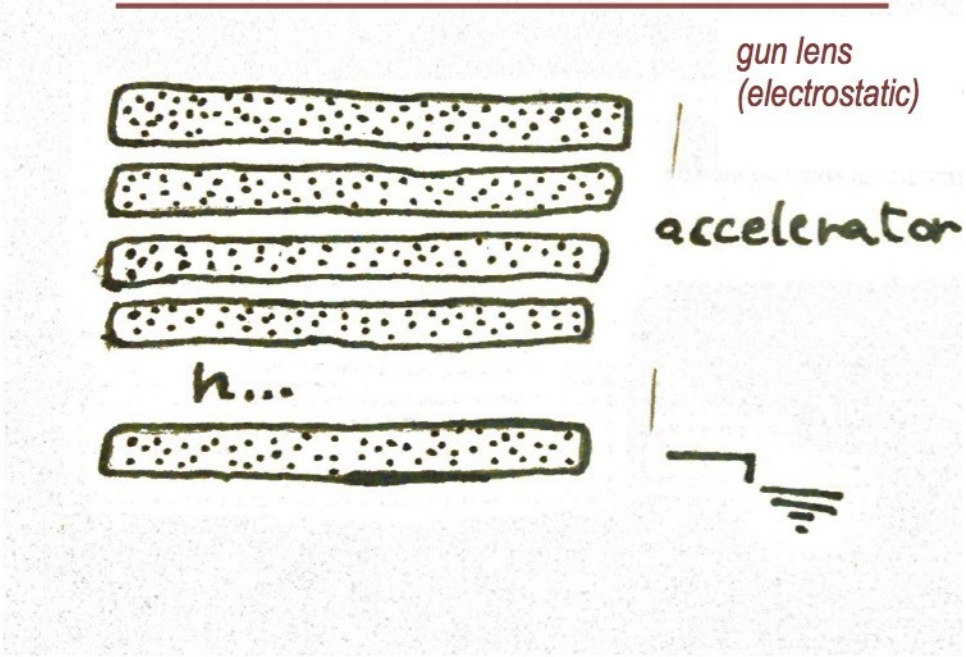


Field emission gun (FEG)

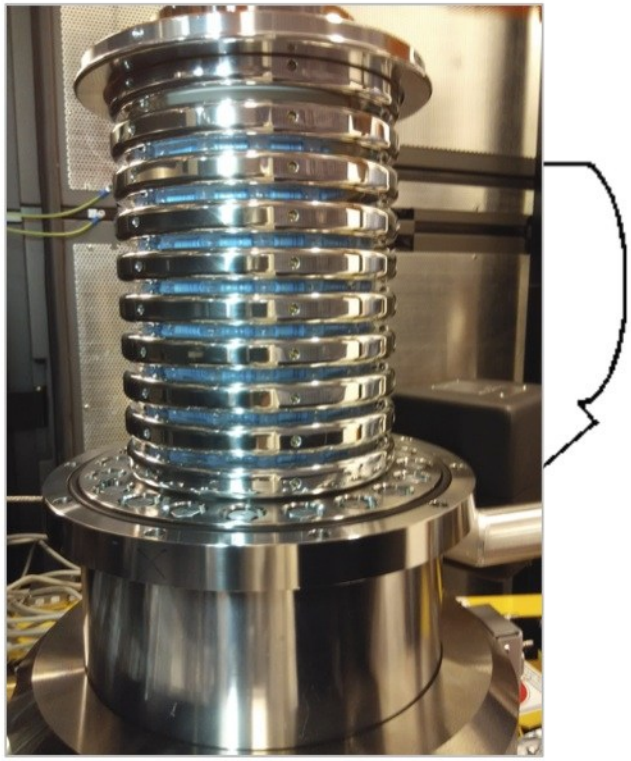


The FEG


negatively charged cup
tungsten
Zirconia crystal
anode
extraction

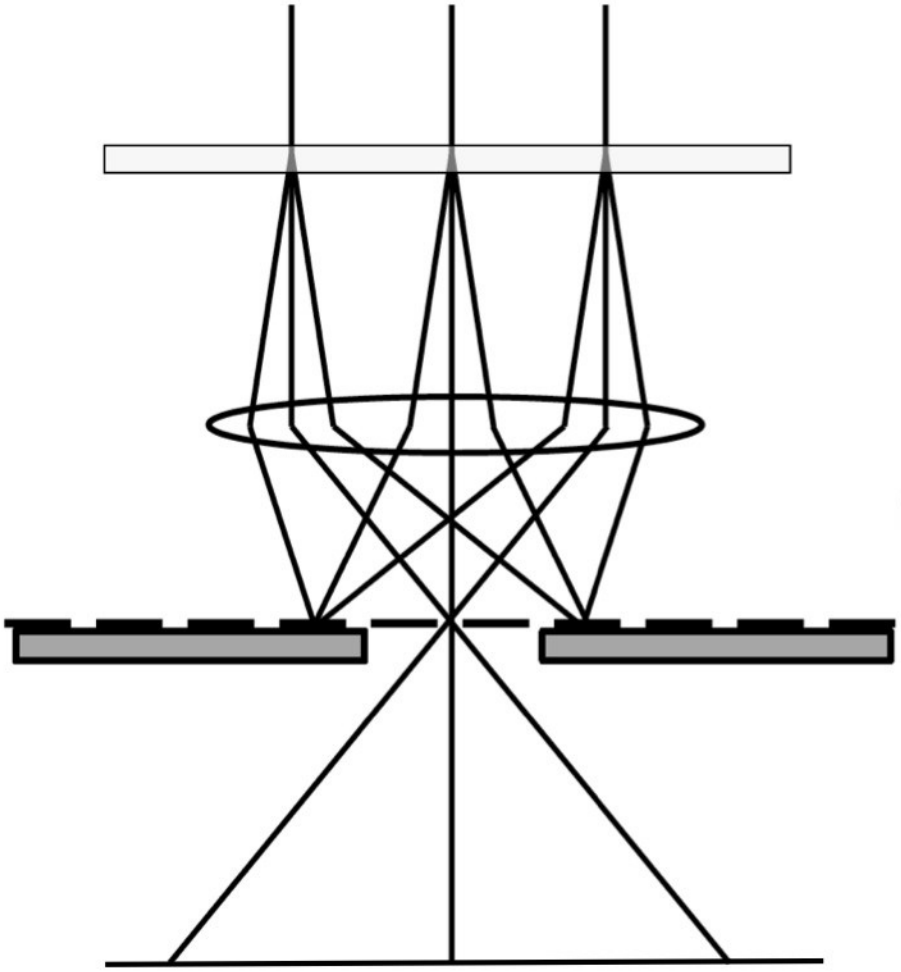

gun lens (electrostatic)
accelerator
n...



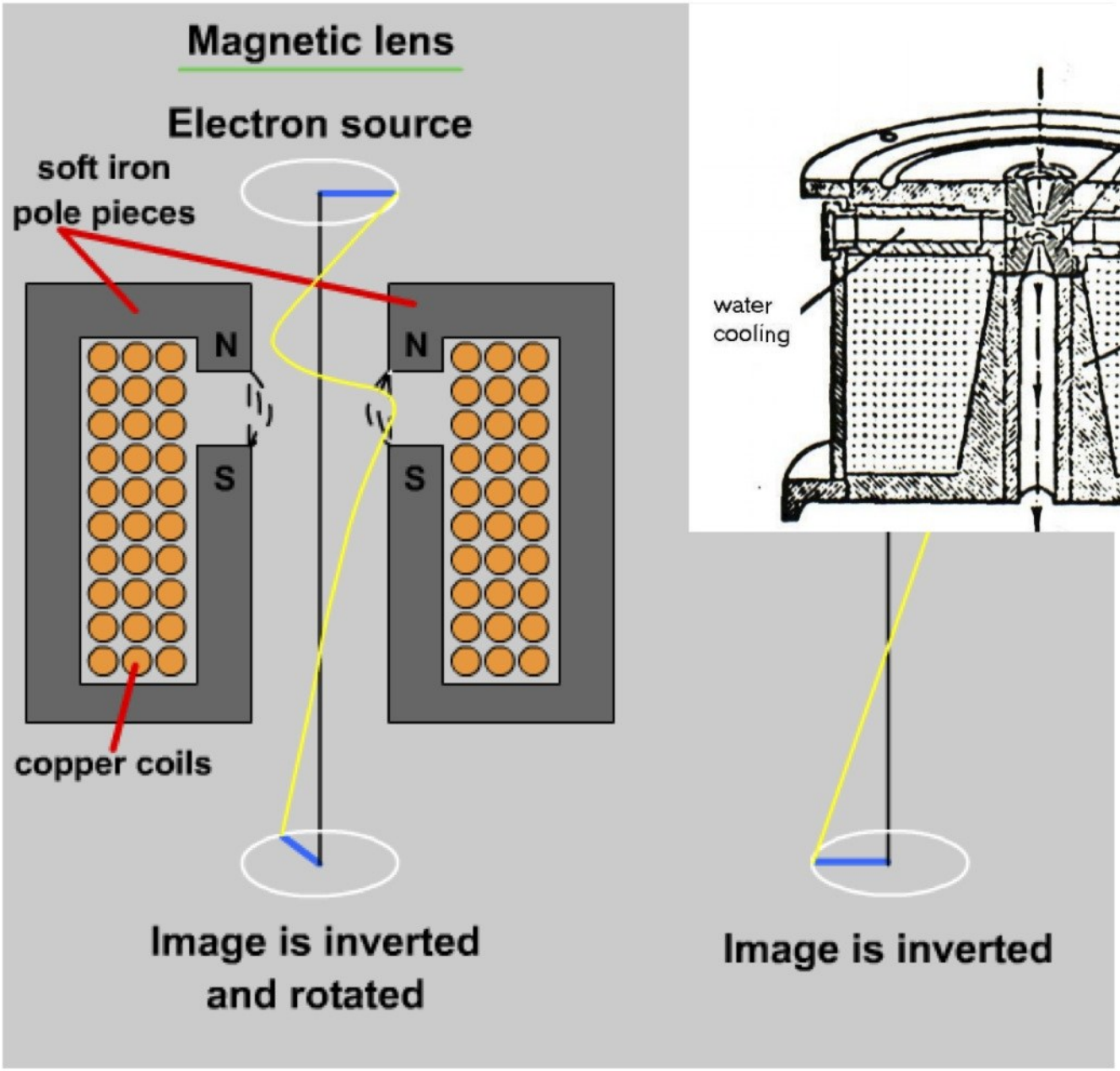


Apertures




Sample
Objective lens
Back-focal plane
Aperture
Diffraction plane
Image plane

Electromagnetic lenses

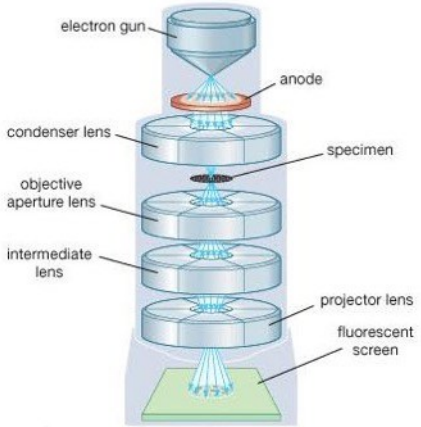


Egerton, 2005

Microscopio Elettronico a Trasmissione: TEM



Transmission electron microscope



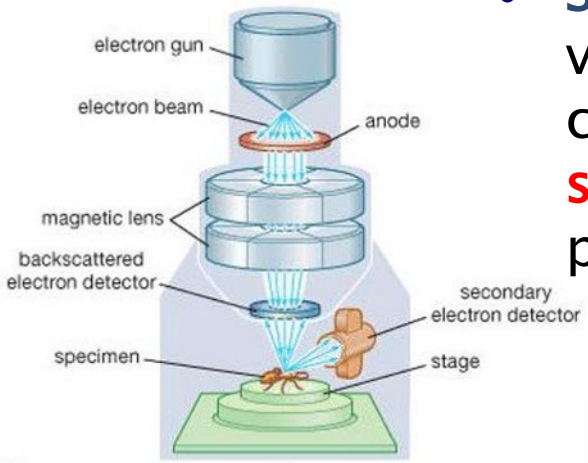
Key components of TEM

- TEM: gli **elettroni attraversano** il campione.
  - Informazioni anche sull'interno del campione
  - Il campione deve essere piccolo e sottile

Microscopio Elettronico a Scansione: SEM



Scanning electron microscope



Key components in SEM

- SEM: gli **elettroni** vengono **diffratti** dal campione che viene **scansionato** punto per punto
  - Informazioni topografica
  - Il campione può essere più grande e complesso

EM – preparazione del campione

Le macromolecole biologiche hanno poco contrasto con il fondo
Inoltre gli elettroni provocano un alto danno radiologico

↓ segnale/rumore

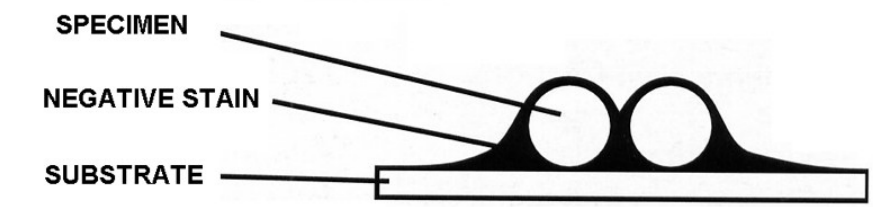
bisogna utilizzare dei metodi per evidenziarle rispetto al solvente

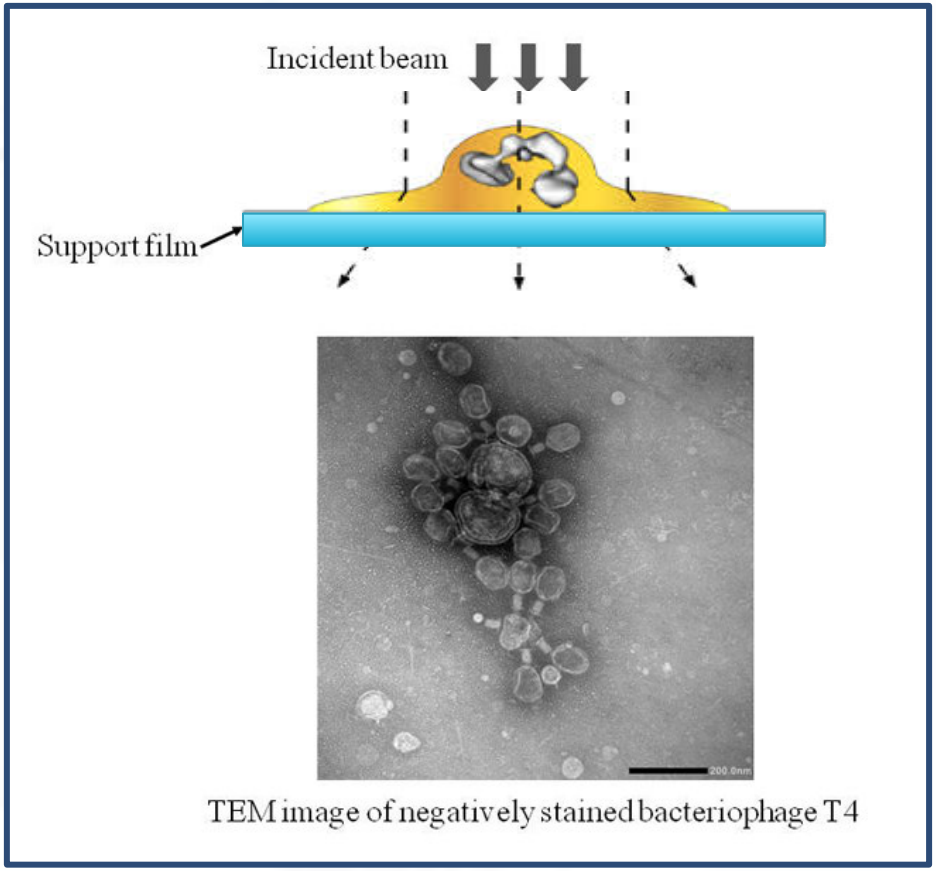
Colorazione (negative or positive staining)

Colorazione (negative staining)

NEGATIVE STAINING

- Sali di **metalli pesanti** (cioè ricchi di elettroni; Uranio, Molibdeno, Tungsteno) vengono **spruzzati sul campione**, depositato su una griglia di grafite, formando uno **strato metallico uniforme**.
- Il fascio di ***e*⁻ vengono diffratti** (deviati) dallo strato metallico
- Lo strato è meno denso **dove c'è il campione** e quindi **il fascio viene deviato di meno**
- Cambiando le aperture, si possono escludere i fasci troppo deviati e quindi aumentare il contrasto e la risoluzione dell'immagine





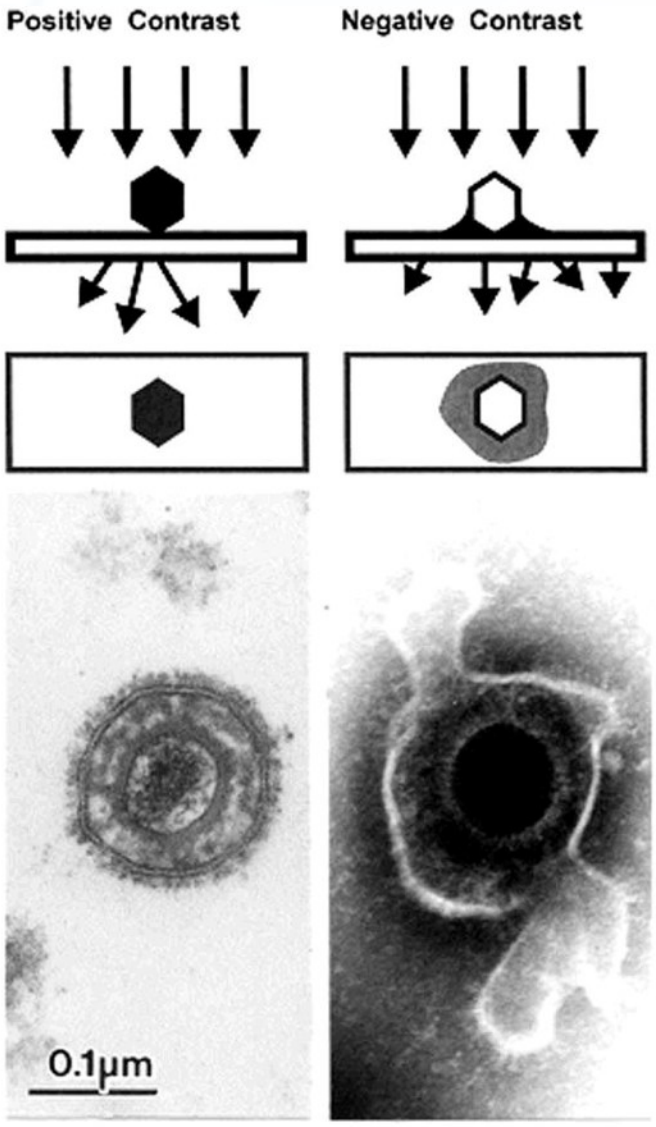
TEM image of negatively stained bacteriophage T4

Colorazione (positive staining)

POSITIVE STAINING

- Si basa sullo stesso principio ma invece di depositare uno strato di metalli pesanti sul campione, utilizzo **ossidi e sali di metalli pesanti per derivatizzare i gruppi funzionali reattivi del campione** biologico (doppi legami, –OH, gruppi aldeidici etc..)

I metalli pesanti ricchi di elettroni danno un segnale più forte



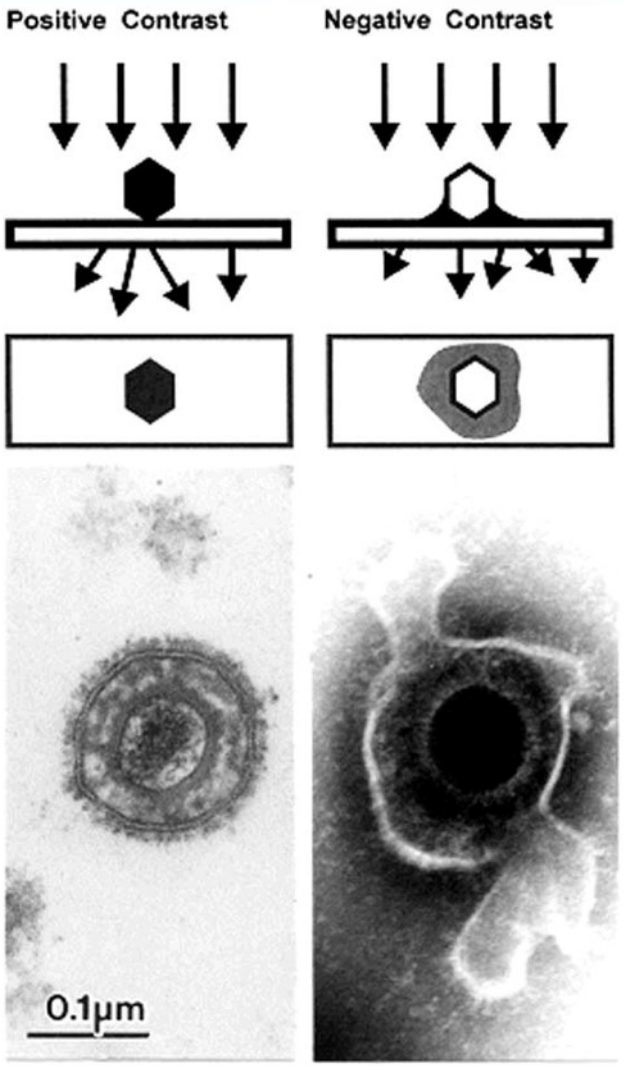
Colorazione (positive staining)

VANTAGGI staining

- Alto contrasto
- Basso danno radiologico
- Rapidità e basso costo

SVANTAGGI staining

- Risoluzione limitata a 20 Å
- Possibilità di artefatti se la colorazione non è uniforme
- A volte il campione viene deformato durante il processo di staining
  - Ad es. per depositare il film bisogna eliminare il solvente in eccesso e lo strato di solvatazione della macromolecola, che può collassare e cambiare forma



RISOLUZIONE

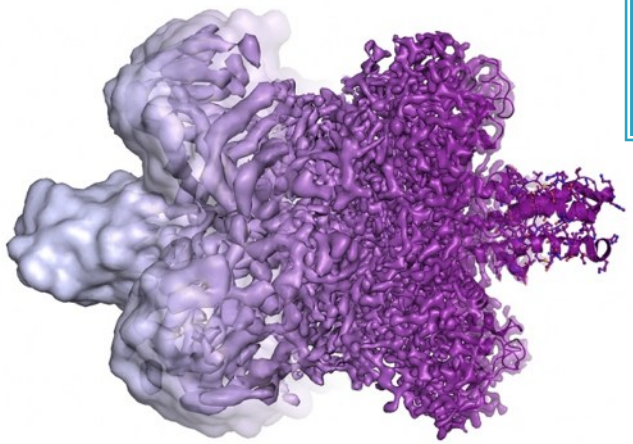
1–2 Å

2–6 Å

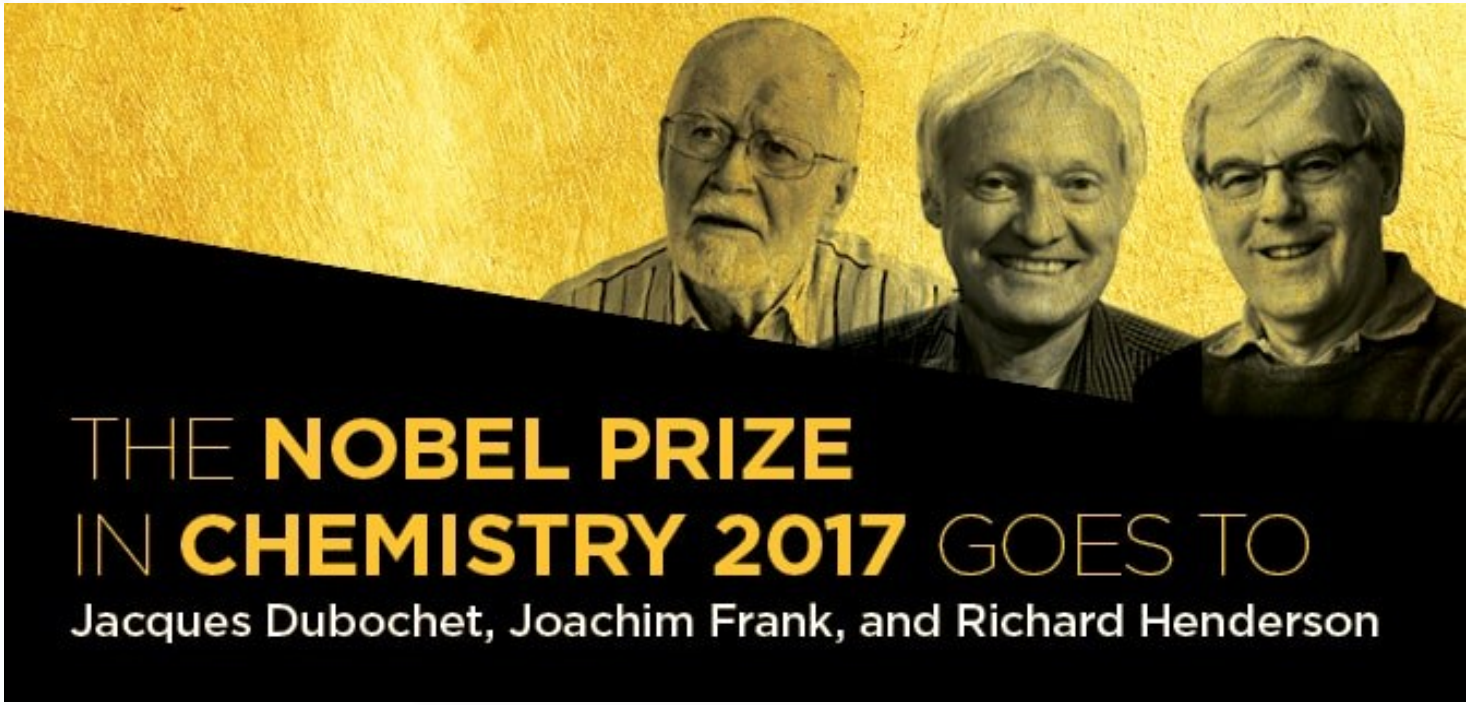
10–20 Å

Congelamento (cryo-EM)

2013



2017



https://www.youtube.com/watch?v=026rzTXb1zw

RESOLUTION REVOLUTION

Le innovazioni che hanno reso possibile l'uso della microscopia elettronica per la determinazione della struttura delle proteine sono essenzialmente:

1. Il metodo criogenico, introdotto da Dubochet nel 1980 che consente di congelare le proteine in una matrice vetrosa molto sottile con l'azoto liquido
2. Il metodo di processamento delle immagini bidimensionali del microscopio inventato da Joachim Frank tra il 1975 e il 1986 che consente di ricostruire l'immagine tridimensionale della proteina
3. L'impiego di «direct electron detectors» (DED) che consentono di misurare l'intensità del raggio direttamente ad alta velocità senza l'utilizzo di uno shutter meccanico.

Si pensava che comunque il raggio elettronico distruggesse il campione biologico fino a quando Richard Henderson ottenne nel 1990 la struttura della batteriorodopsina a 3.5 Å di risoluzione

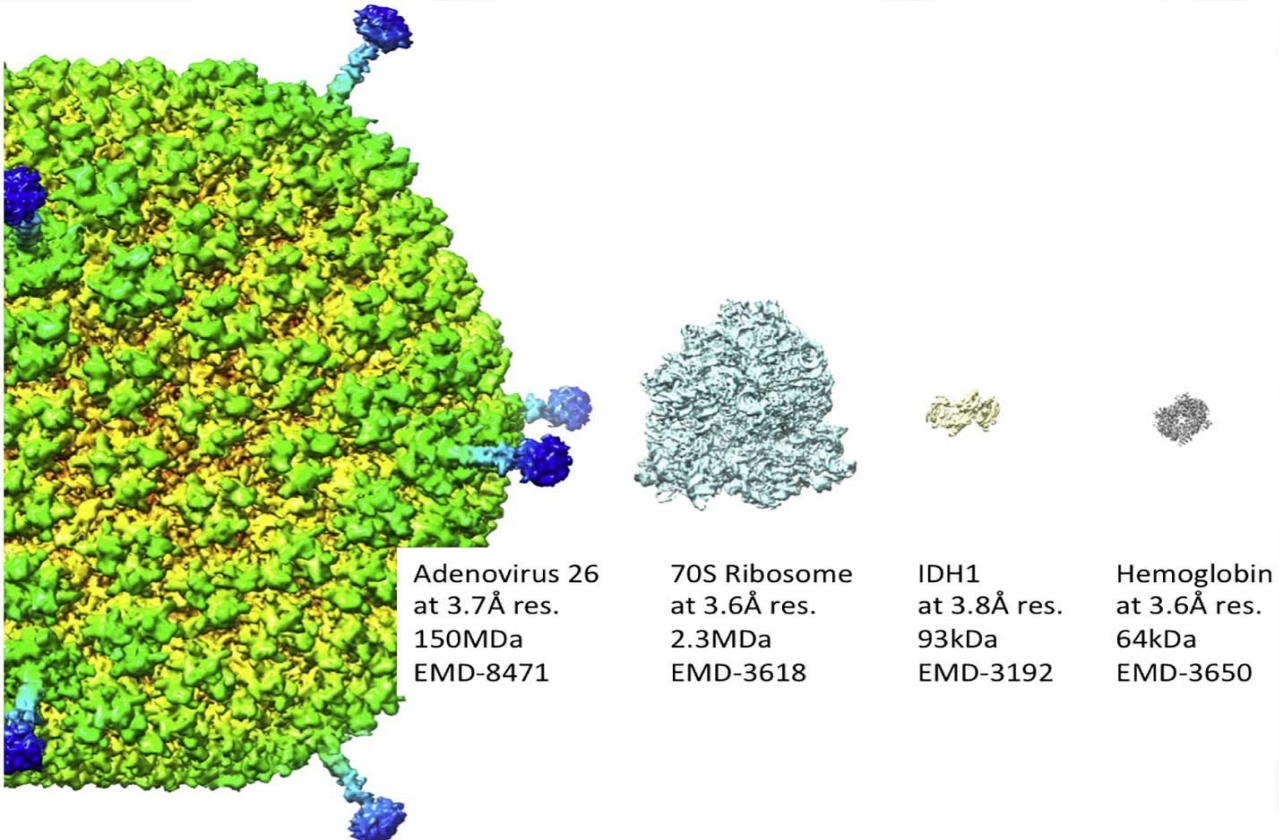
R Henderson 1, J M Baldwin, T A Ceska, F Zemlin, E Beckmann, K H Downing Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy 1990 Jun 20;213(4):899-929

Dubochet, Frank e Henderson premi Nobel per la chimica nel 2017

1. La dimensione massima dell'oggetto osservabile è limitata solo dallo spessore della specie osservata che può essere attraversata dal fascio di elettroni, che a sua volta dipende dal cammino libero medio (la distanza media percorsa da un elettrone fra due urti successivi)

Questo valore è circa 500 nm per microscopi a trasmissione elettronica (TEM) da 300kV

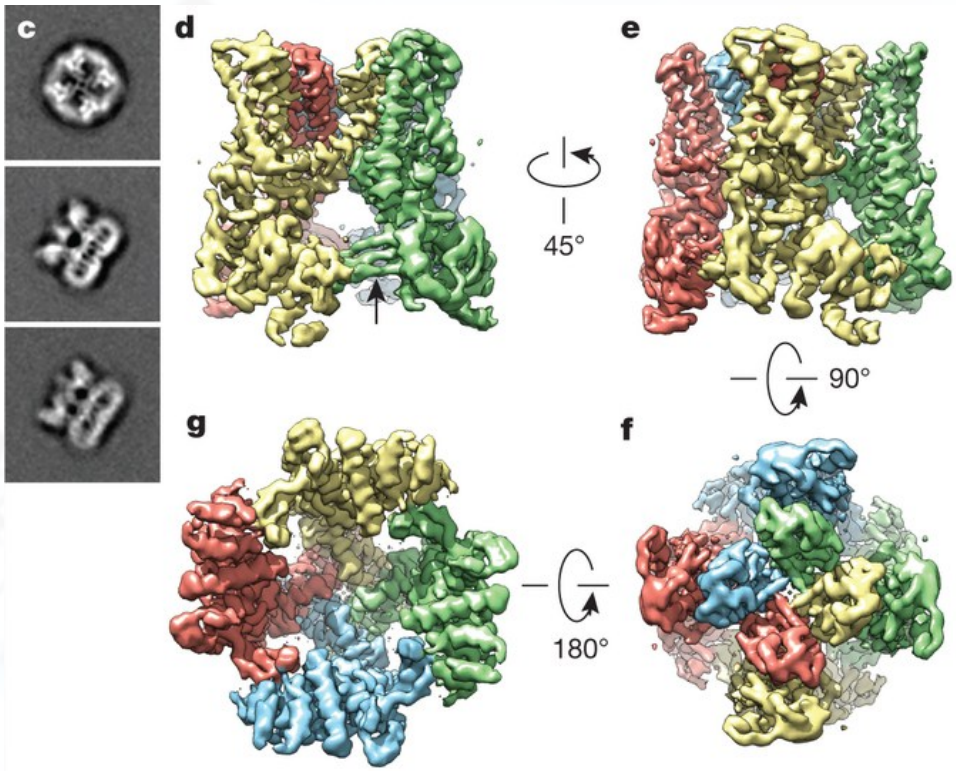
2. La grandezza minima in termini di peso molecolare per la molecola che può essere visualizzata con la cryoEM è di circa 38 kDa



Le specie che possono essere osservate vanno dai Virus che può avere un peso molecolare di centinaia di megadalton alle proteine singole che pesano decine di kilodalton

CRYO-EM: ATTUALMENTE IN FORTE ESPANSIONE

- Tecnica elettiva per lo studio di **macromolecole, complessi macromolecolari > 200kDa, Proteine di membrana**
- Nuove metodologie:
  - Cristallografia elettronica
  - Tomografia elettronica a temperature crioscopiche (cryoEM)
  - EM su singola molecola (single particle cyro-EM)



structure of a mammalian TRP channel, TRPV1, at **3.4 Å resolution**, breaking the side-chain resolution barrier for membrane proteins without crystallization

Nature 504, 107–112 (05 December 2013)
doi:10.1038/nature12822

ATTUALMENTE IN FORTE ESPANSIONE

- Tecnica elettiva per lo studio di **macromolecole, complessi macromolecolari > 200kDa, Proteine di membrana**

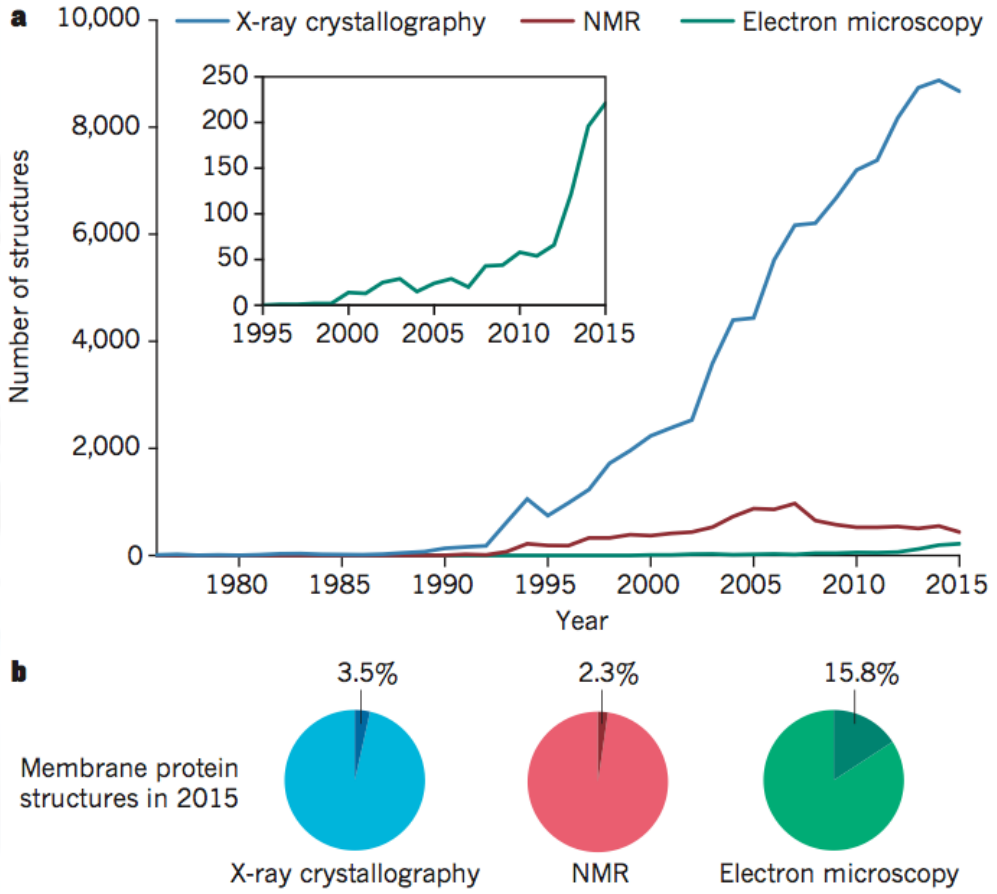
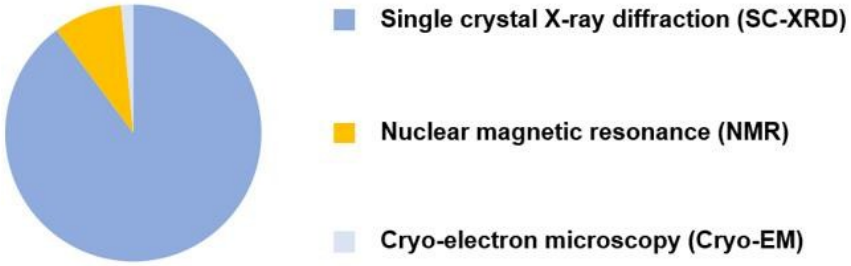
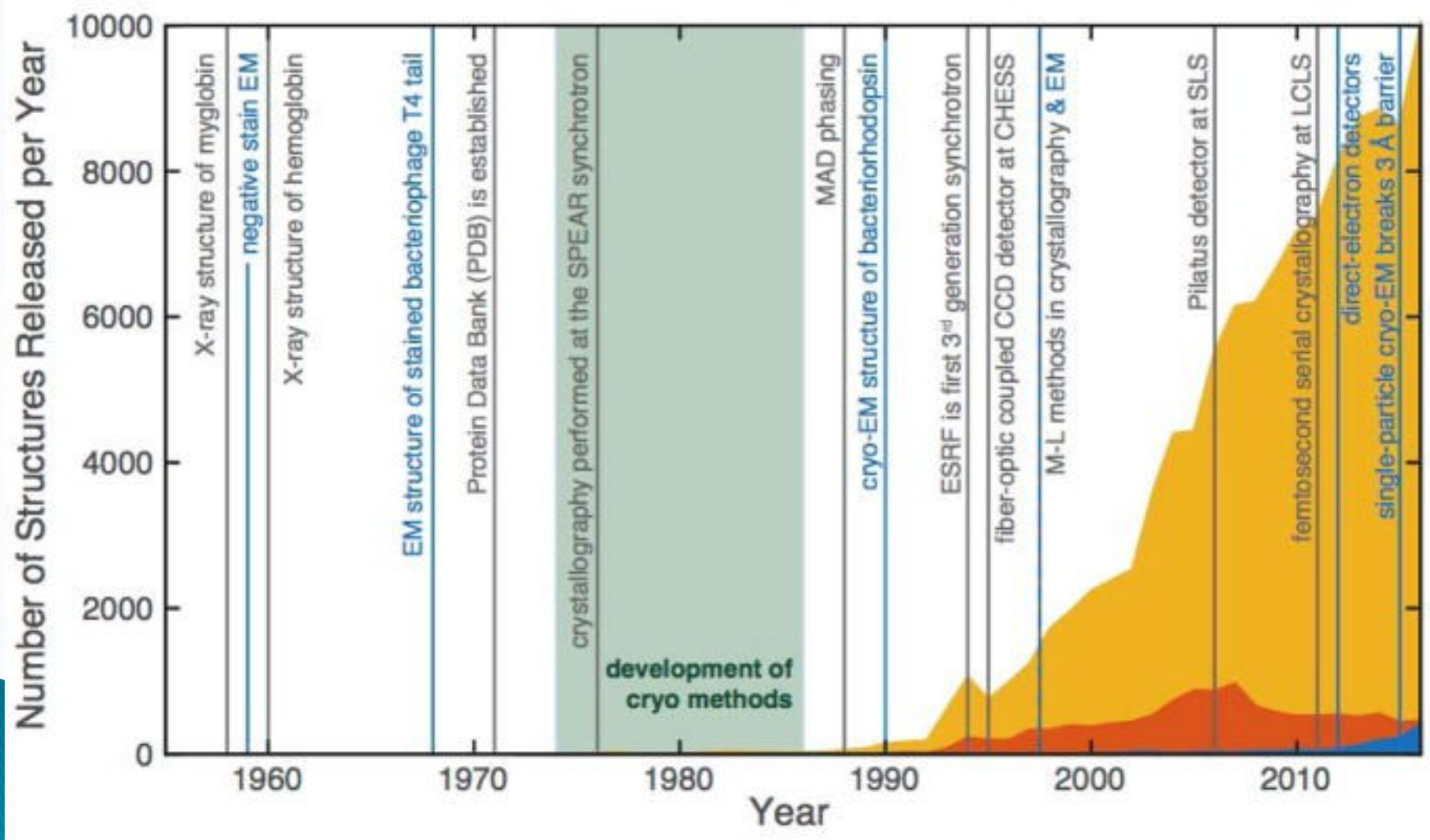


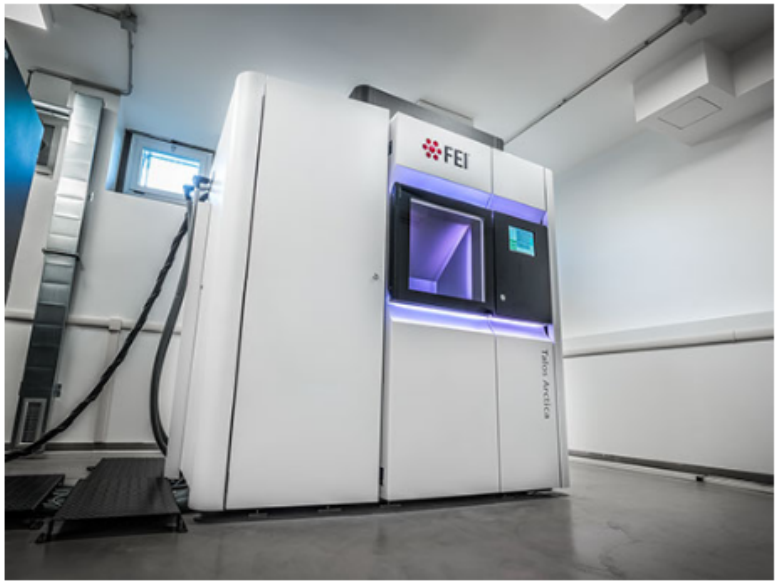
Figure 1 | Growth in structural biology over the past 40 years. **a**, The number of structures recorded in the PDB, as determined by the techniques of X-ray crystallography (blue), NMR (red) and electron microscopy (green) between 1975 and 2015. The number of structures that were determined by electron microscopy between 1995 and 2015 is also shown (inset), which highlights the recent growth in structure determination using this method. **b**, The percentage of membrane protein structures discovered in 2015 using each of the three techniques.


Single crystal X-ray diffraction (SC-XRD)
Nuclear magnetic resonance (NMR)
Cryo-electron microscopy (Cryo-EM)


Number of Structures Released per Year
10000
8000
6000
4000
2000
0
1960
1970
1980
1990
2000
2010
Year
X-ray structure of myglobin
negative stain EM
X-ray structure of hemoglobin
EM structure of stained bacteriophage T4 tail
Protein Data Bank (PDB) is established
crystallography performed at the SPEAR synchrotron
development of cryo methods
MAD phasing
cryo-EM structure of bacteriorhodopsin
ESRF is first 3rd generation synchrotron
fiber-optic coupled CCD detector at CHESS
M-L methods in crystallography & EM
Pilatus detector at SLS
femtosecond serial crystallography at LCLS
direct-electron detectors
single-particle cryo-EM breaks 3 Å barrier

Cryo-Electron Microscopy (EM)

Lab Staff: Prof. Martino Bolognesi and Dr. Paolo Swuec



Cryo Electron Microscopy Lab Description

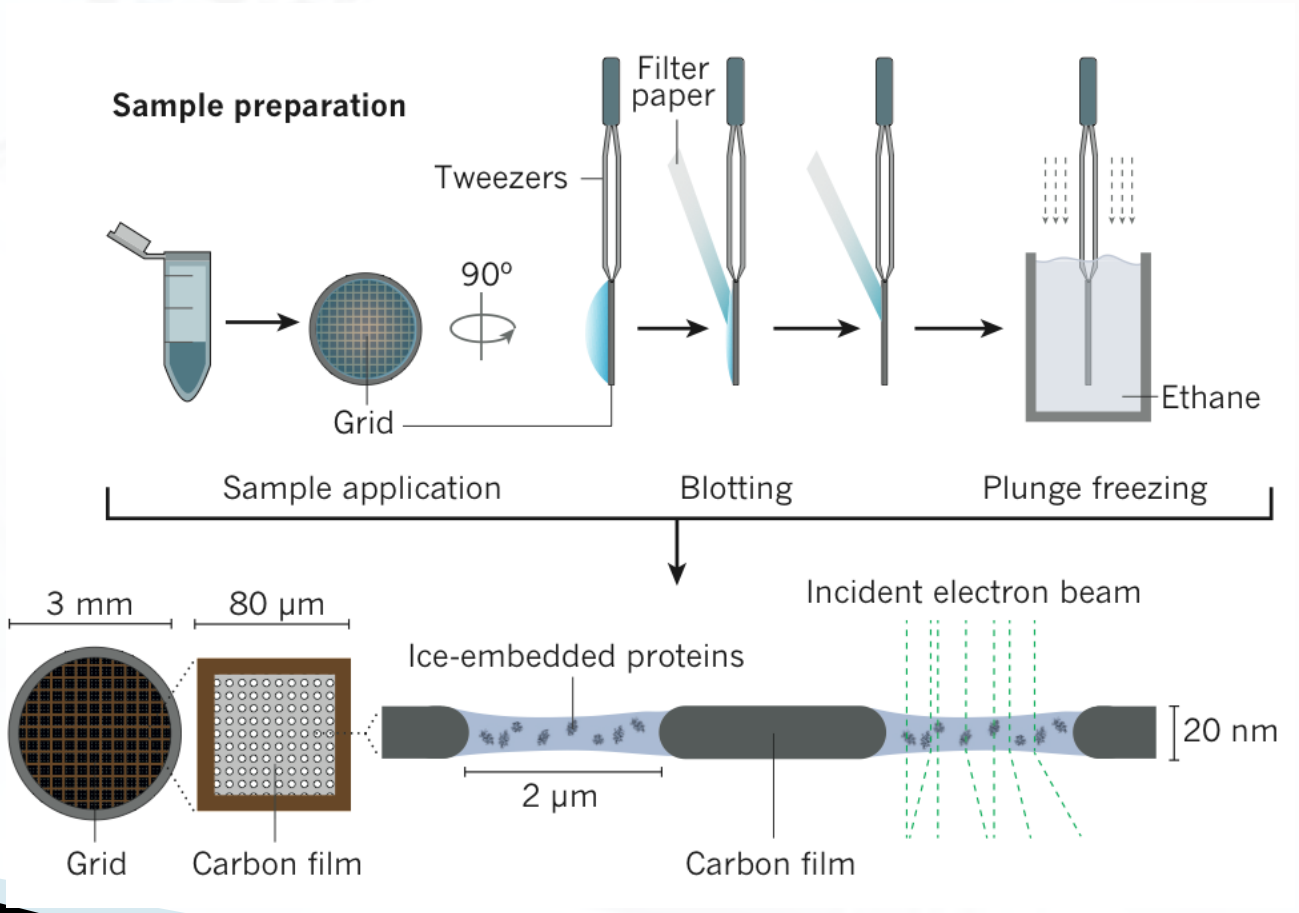
The Cryo-EM Laboratory focusses on the architectural characterization of macromolecular complexes as targets for a deeper understanding of the molecular bases of disease; as a result of such structural investigations, the mechanisms of drug action can be dissected, and the design of innovative drugs carried over. Pivotal to the experimental investigations carried out in the lab is the installation of a new FEI Talos Arctica 200 kV FEG electron microscope equipped with a state-of-the-art FEI Falcon 3EC direct electron detector and Volta Phase-plate. The Cryo-EM Lab also benefits from a dedicated sample preparation room to ensure the highest specimen quality and a GPU-based computing cluster for efficient and hustle-free data analysis. The Cryo-EM Lab aims at unraveling the three-dimensional structure and dynamics of large molecular machines at sub-nanometer resolution. The installation, the first of this kind in Italy, is supported by the University of Milano and by the Fondazione Invernizzi. Current lab staff are Prof. Martino Bolognesi and Dr. Paolo Swuec. A technician position is scheduled for the end of 2017.

Cryo-EM facility official website

Congelamento (cryo-EM)

CONGELAMENTO (CRYO-EM)

- Il campione depositato sulla griglia di grafite viene **congelato ad alte pressioni e a bassissime temperature** per **vitrificare l'acqua** e preservare lo stato nativo delle macromolecole



Congelamento (cryo-EM)

TIPOLOGIA DEI CAMPIONI

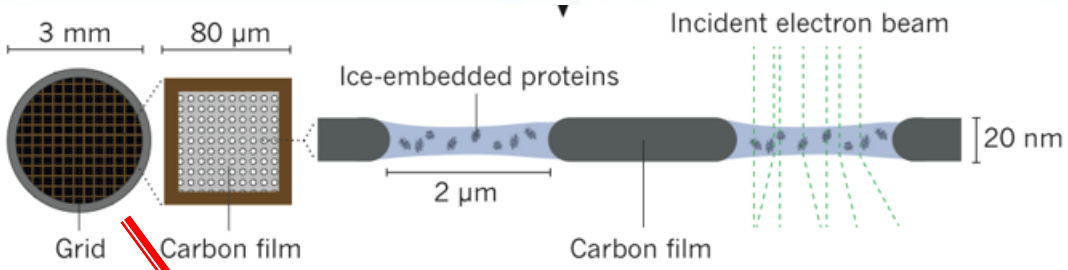
- Cristalli 2D
- **Proteine di membrana**
- Filamenti elicoidali
- Virus
- Macchine macromolecolari

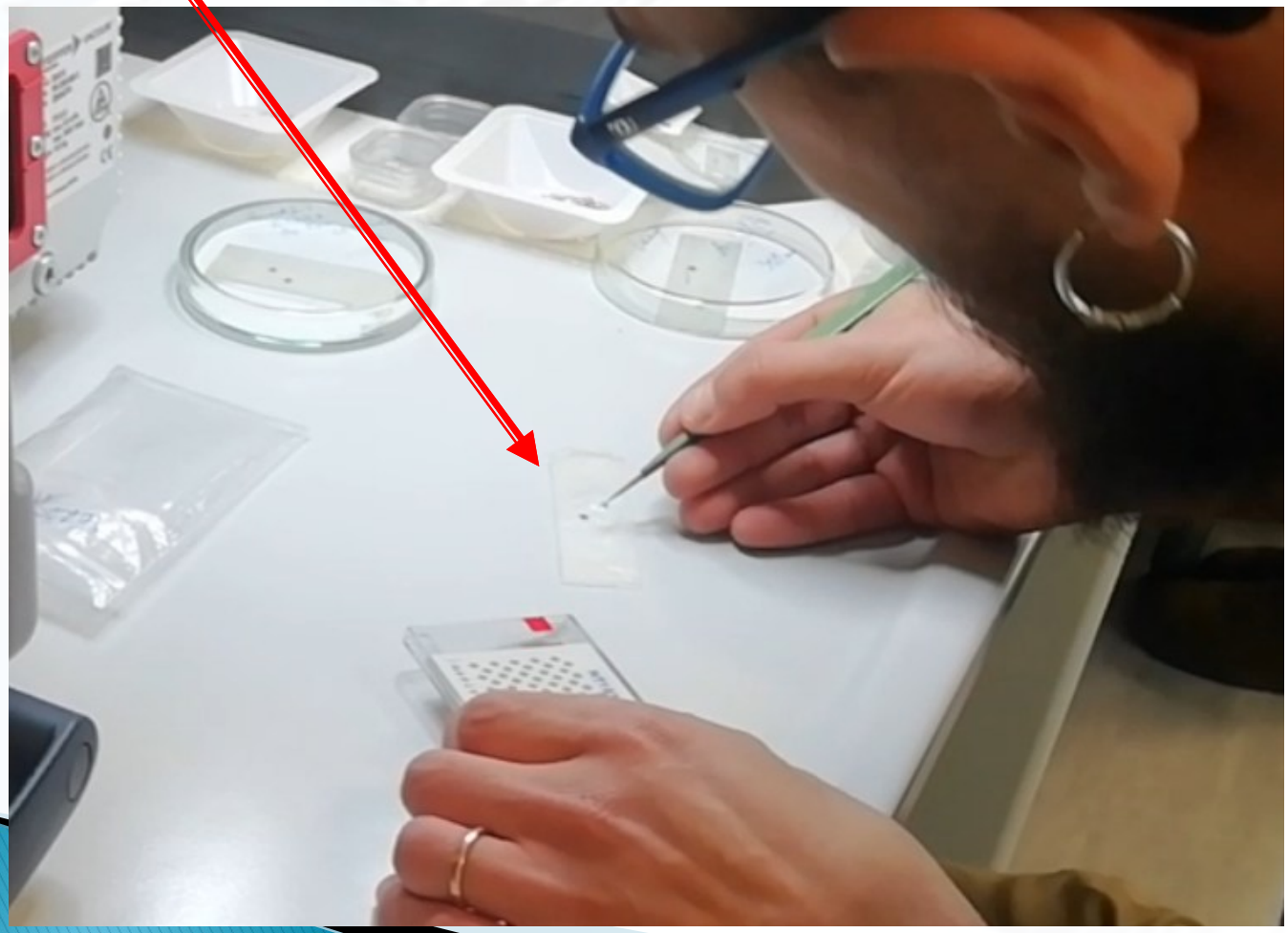
Tutti **congelati** istantaneamente in **etano liquido**, dopo essere stati depositati sulla griglia di grafite



Cryo-EM – preparazione del campione

Congelamento (cryo-EM)





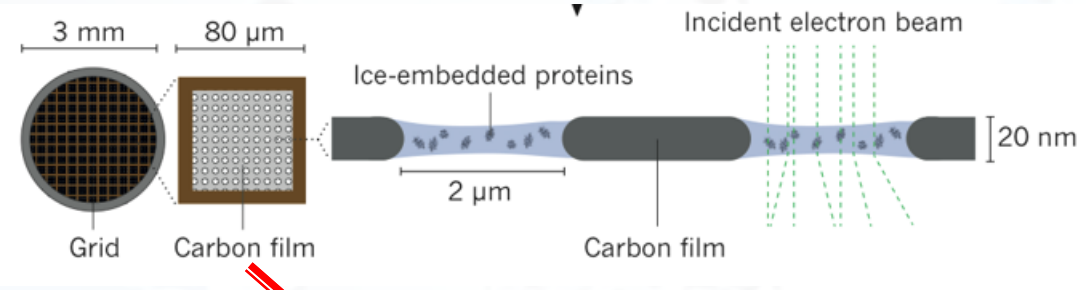
Cryo-EM – preparazione del campione

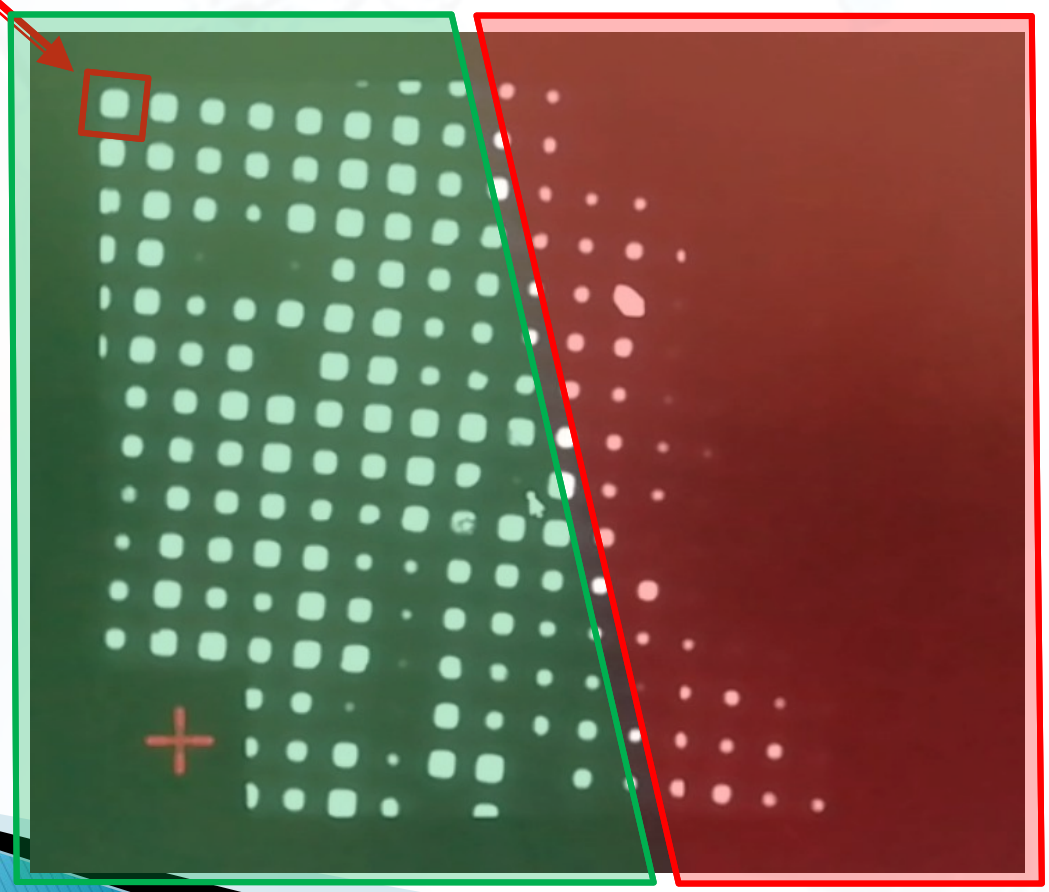
Congelamento (cryo-EM)



EM – preparazione del campione

Congelamento (cryo-EM)



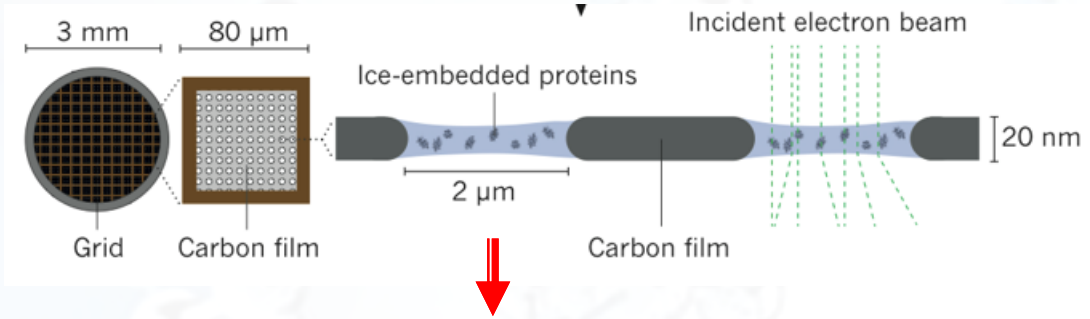


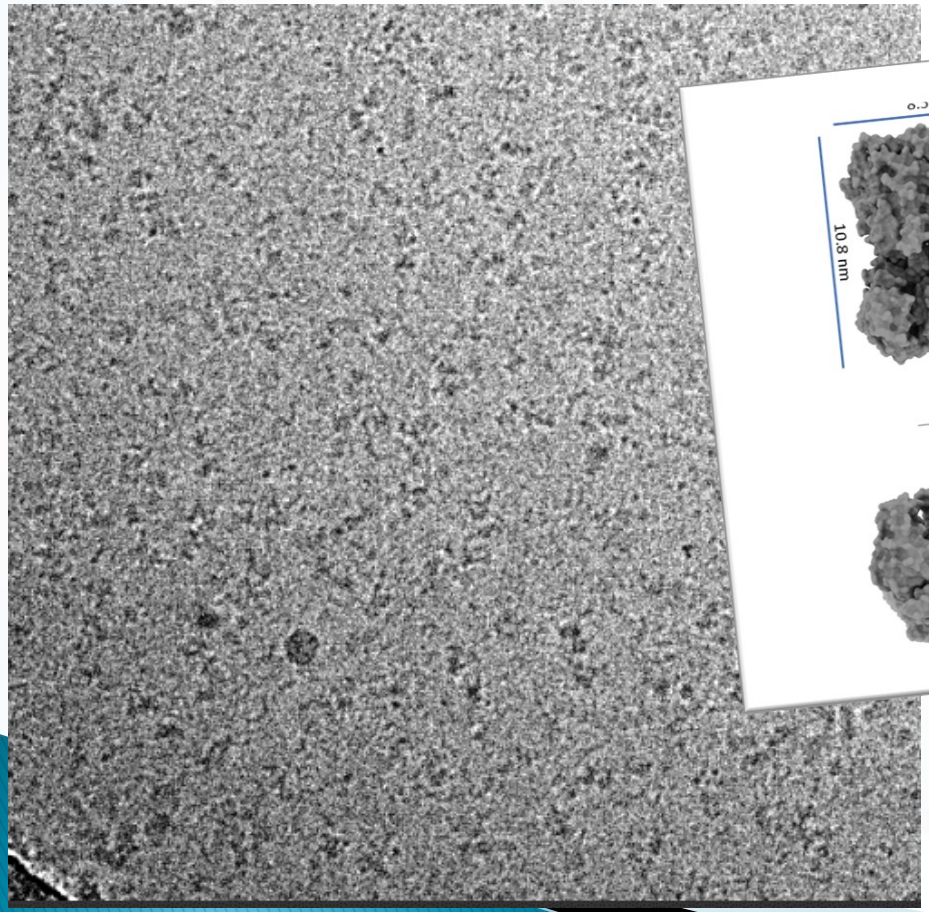
Ghiaccio buono

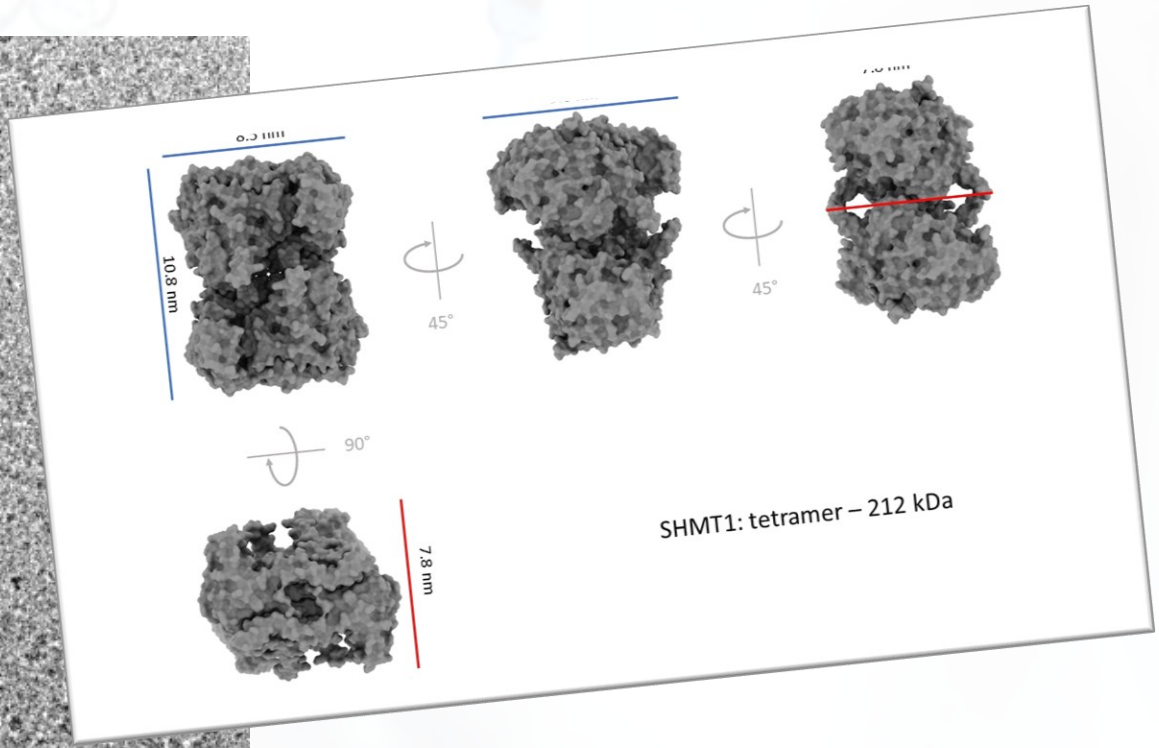
Ghiaccio troppo spesso

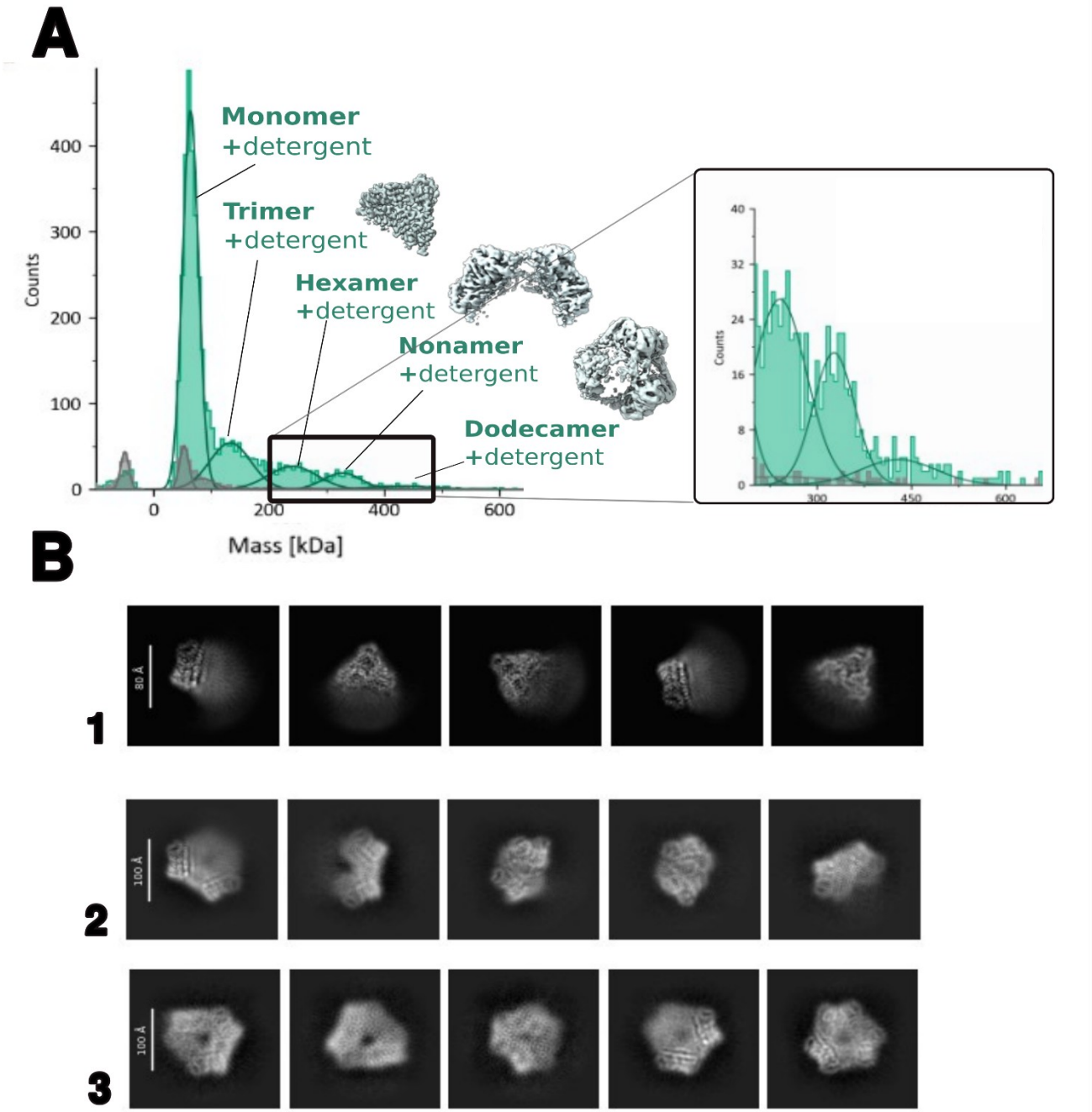
EM – preparazione del campione

Congelamento (cryo-EM)








A
Monomer
+detergent
Trimer
+detergent
Hexamer
+detergent
Nonamer
+detergent
Dodecamer
+detergent
Counts
Mass [kDa]
B
1
2
3
80 Å
100 Å
100 Å

Congelamento (cryo-freezing)

VANTAGGI



- Il campione è sempre in soluzione
- Non si creano artefatti
- Bassa dose di e^- ⇒ basso danno radiologico

SVANTAGGI



- Basso contrasto (basso rapporto segnale/rumore)
- Procedura laboriosa e, se il protocollo non è buono, si forma ghiaccio

Congelamento (cryo-EM)

Le strategie di raccolta dati sono diverse a seconda del metodo che si usa per ricostruire le immagini 3D da proiezioni 2D

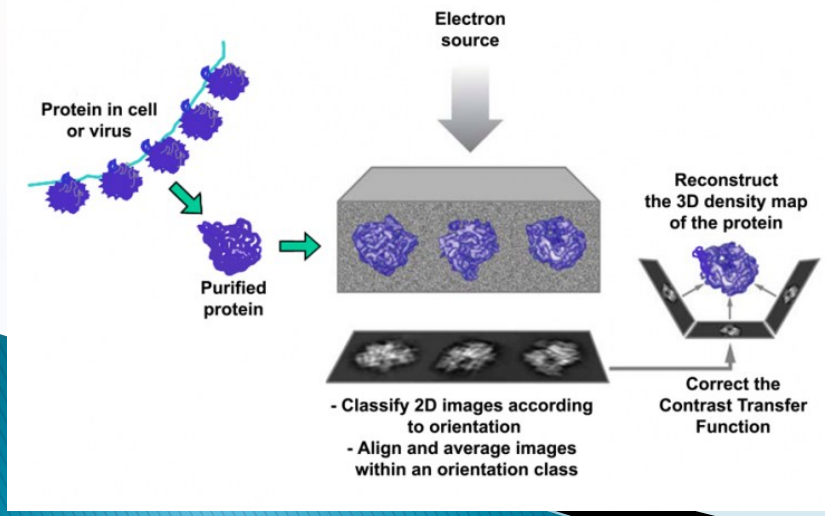
EM su singola molecola (Single Particle Reconstruction – SPR)

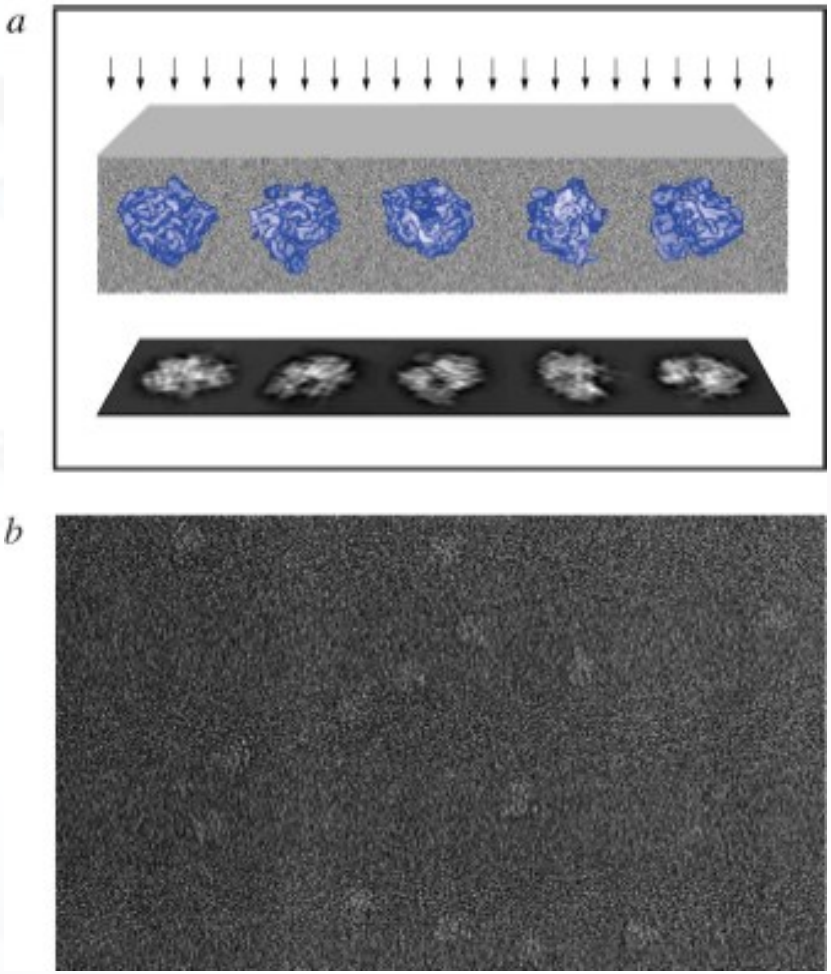
Tomografia elettronica (cryoET)

Single Particle Reconstruction –

Cryo-EM: SPR

- Il campione, sia nel caso di cristalli 2D che di singole molecole, viene bombardato con **max 10 elettroni/Å^2** (problema del danno da radiazione)
- Le **diverse proiezioni** del campione vengono registrate o su micrografie su camere CCD (charged coupled devices)

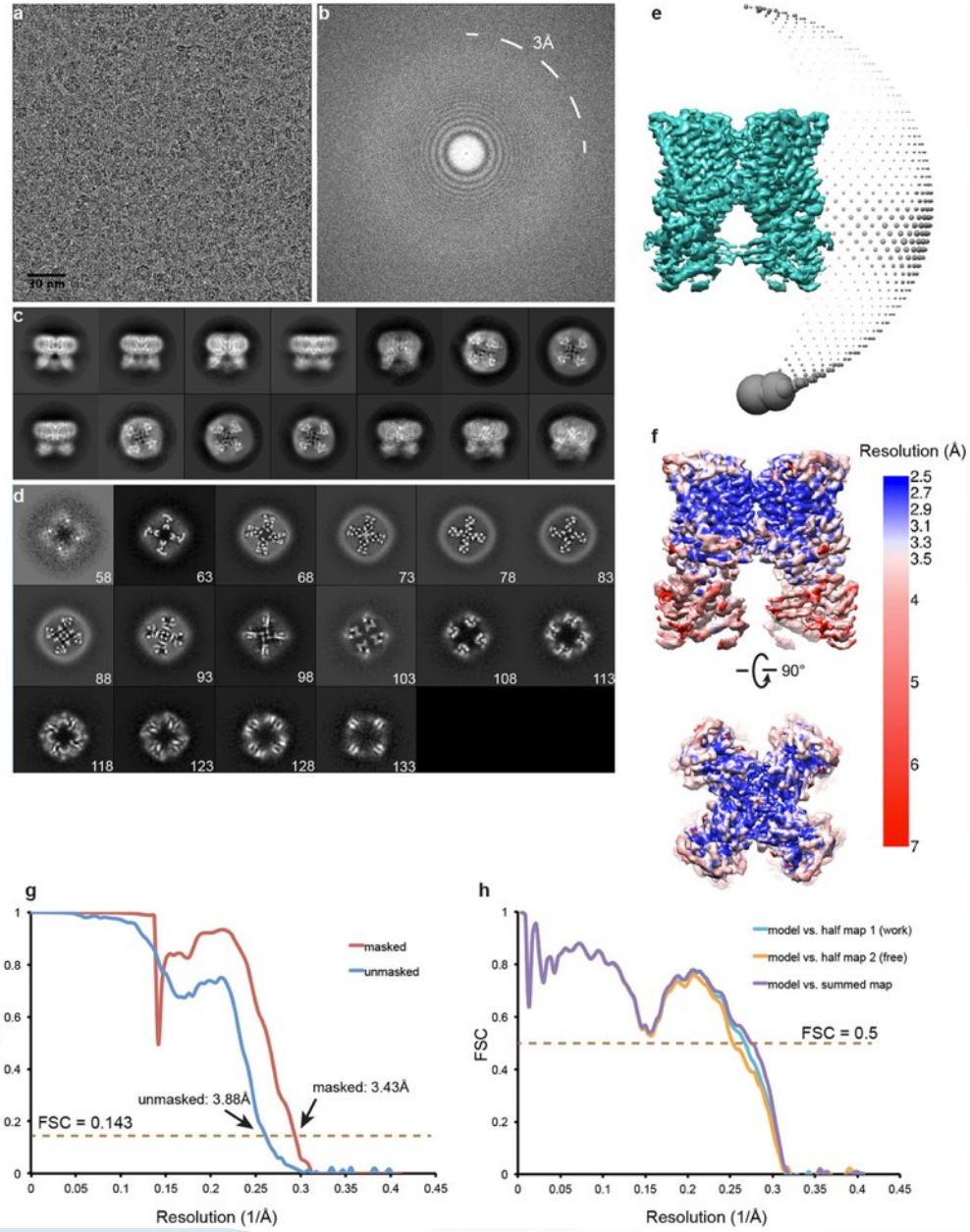




Single Particle Reconstruction –

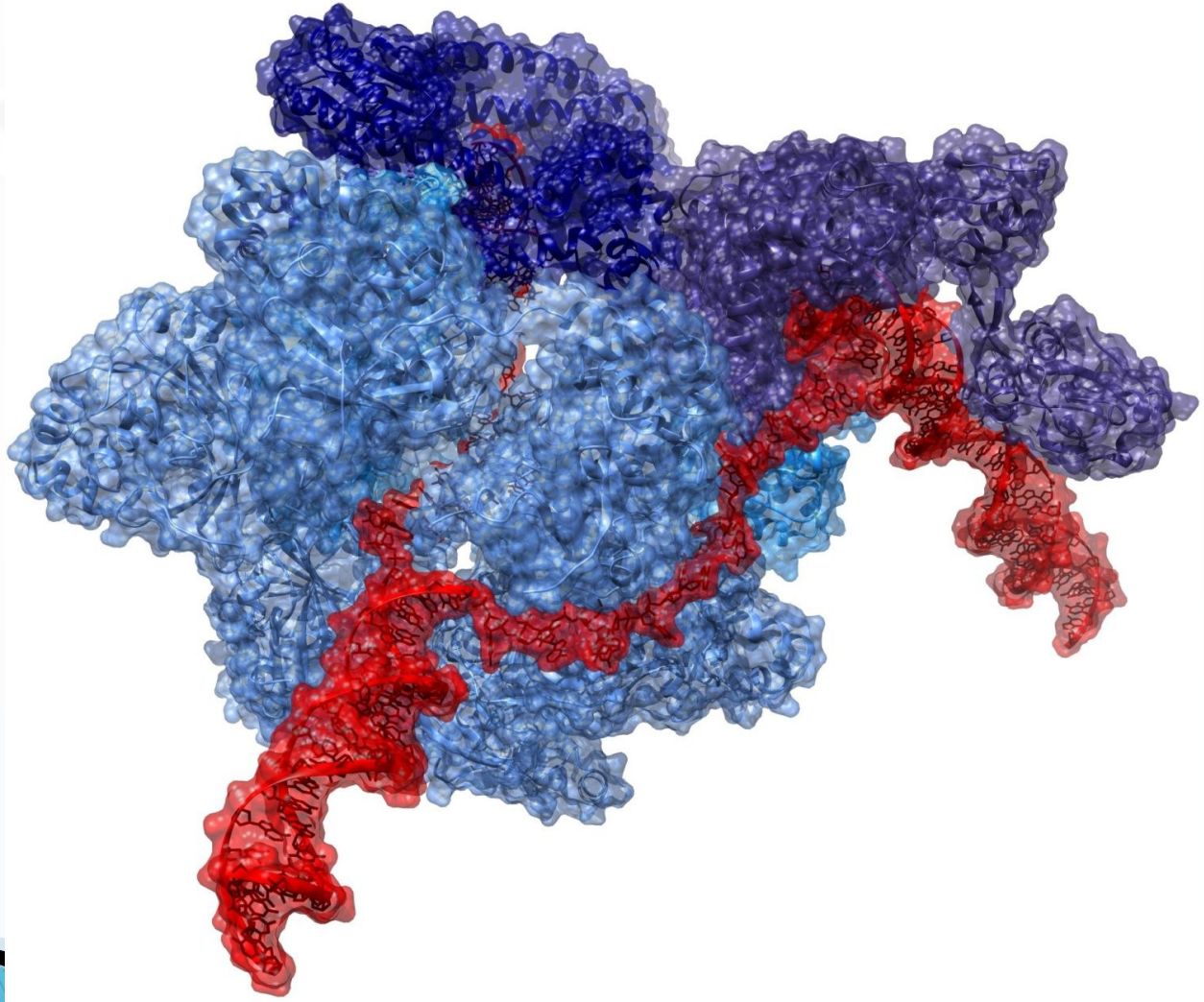
Cryo-EM: SPR

- Le immagini vengono analizzate per **derivare l'orientazione delle particelle** in esame
  - **COLLO DI BOTTIGLIA DELLA TECNICA**
- Le particelle (10^5 – 10^6) vengono **suddivise in sottoinsiemi di orientazioni**
- Viene fatta la **media in ogni sottoinsieme**
- L'immagine 3D viene ricostruita iterativamente mediante trasformata di Fourier dei sottoinsiemi delle immagini 2D



Single Particle Reconstruction –

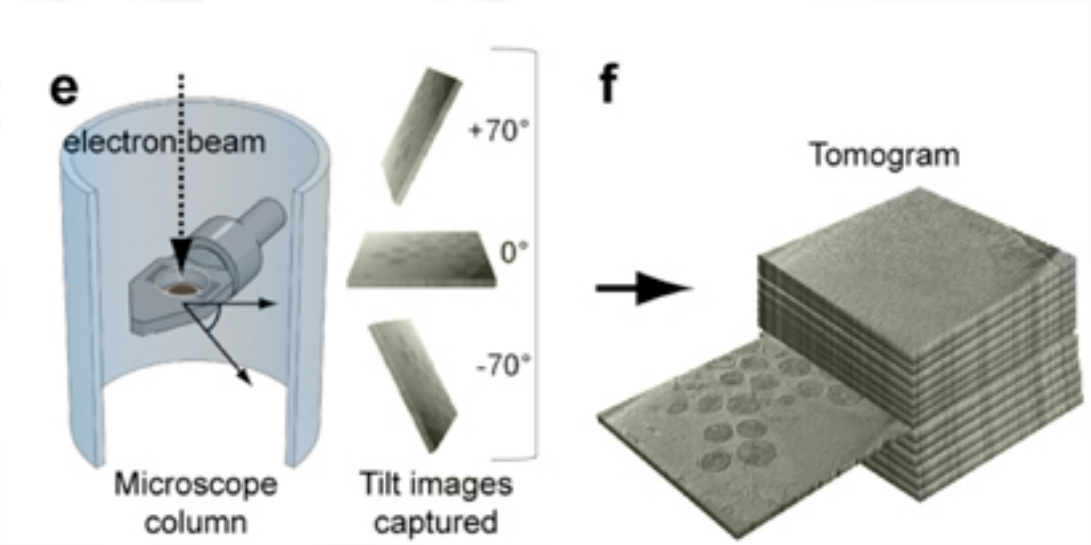
Cryo-EM: structtura del replisoma (replicazione del DNA)



Tomografia elettronica – cryo-ET

Tomografia Elettronica Criogenica: Cryo-ET

- Il goniometro con **il campione viene fatto ruotare**
- Si raccoglie un'immagine per ogni angolo di rotazione
- **La griglia ruota da -70° a +70°**

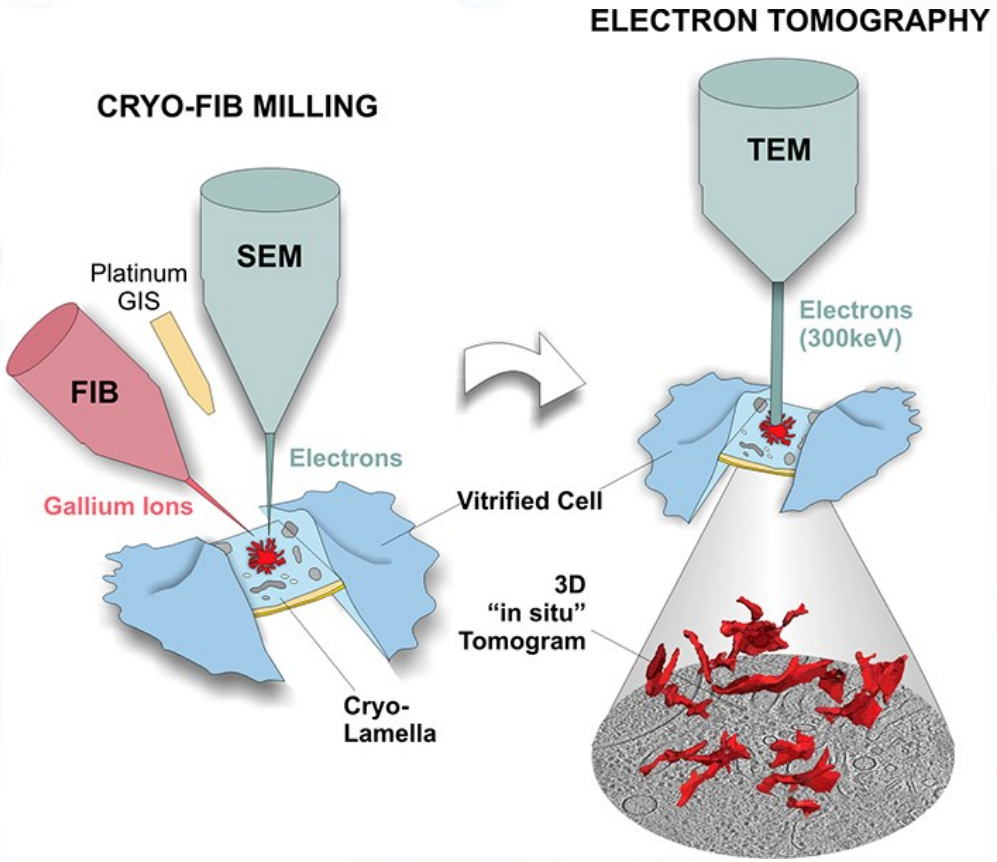


Tomografia elettronica - cryo-ET

Tomografia Elettronica Criogenica: Cryo-ET

- Il goniometro con **il campione viene fatto ruotare**
- Si raccoglie un'immagine per ogni angolo di rotazione
- **La griglia ruota da -70° a +70°**

Questa tecnica viene usata anche per analizzare **fettine di cellula dette LAMELLE** che hanno uno spessore di 100 -200 nm

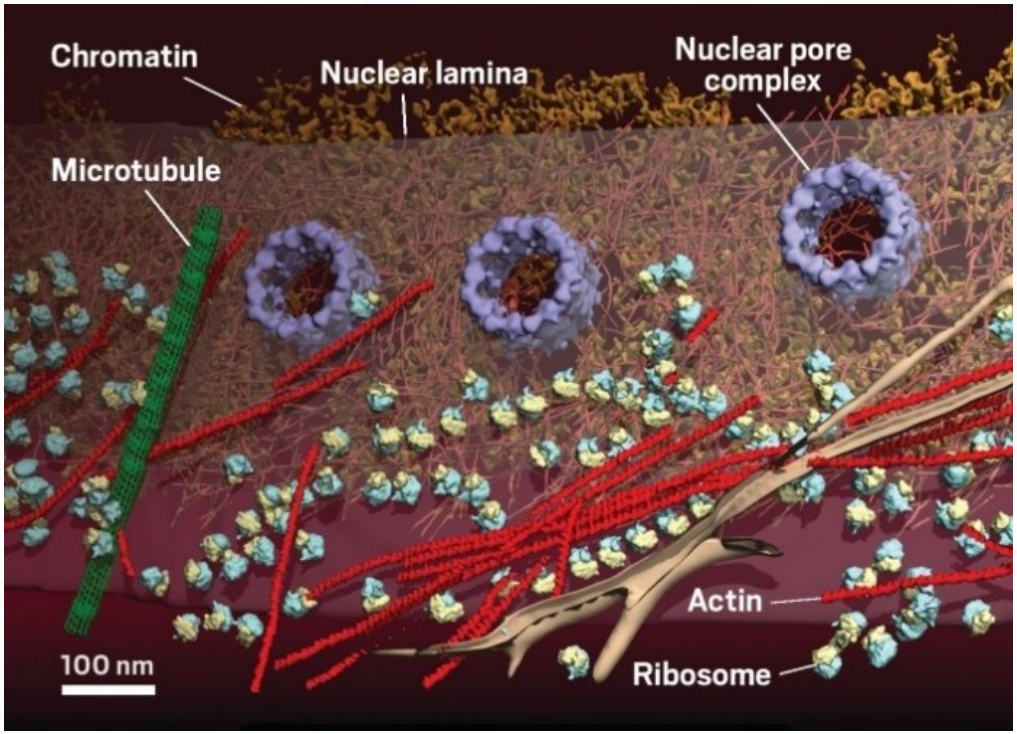


Tomografia elettronica –

Tomografia Elettronica Criogenica: Cryo-ET

- Il goniometro con **il campione viene fatto ruotare**
- Si raccoglie un'immagine per ogni angolo di rotazione
- **La griglia ruota da -70° a +70°**

Questa tecnica viene usata per analizzare **fettine di cellula dette LAMELLE** che hanno uno spessore di 100-200nm



Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery
Science 26 Feb 2016: Vol. 351, Issue 6276, pp. 969-972
DOI: 10.1126/science.aad8857

Tomografia elettronica – cryo-ET

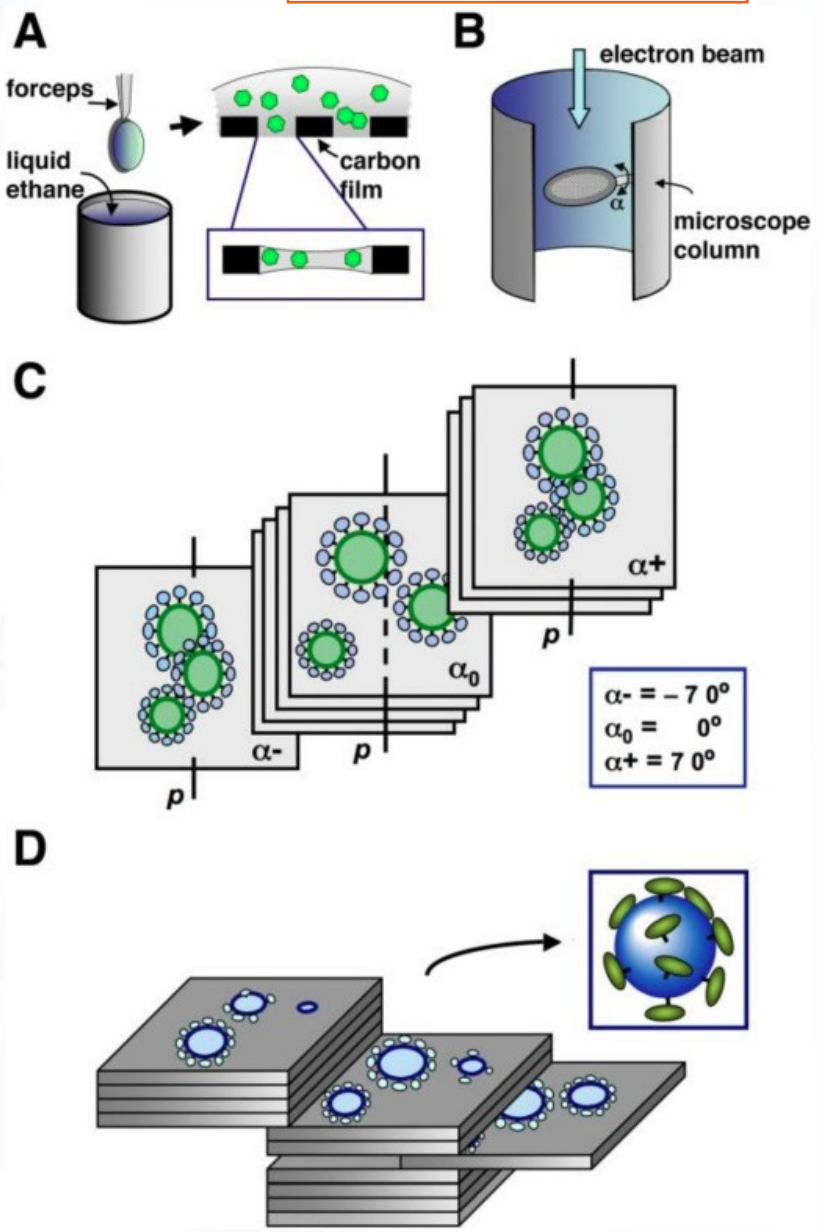
Tomografia Elettronica Criogenica: Cryo-ET

VANTAGGI Cryo-ET

- **Analisi dati semplificata**: si ottengono le diverse orientazioni delle molecole già nelle immagini 2D

SVANTAGGI Cryo-ET

- **Congelamento complesso**: Il campione non deve avere uno spessore troppo elevato (max 200 nm) perché gli e^- non lo attraverserebbero.
- L'angolo effettivo è $< 180°$: quindi **mancano dei dati alla ricostruzione completa**



VANTAGGI



- Analisi del campione in **condizioni fisiologiche**
- Consente di ottenere informazioni su diverse conformazioni → **dinamica strutturale**
- È la tecnica elettiva per **proteine di membrana e complessi supramolecolari** non adatti per analisi NMR o raggiX (>100KDa)
- Con nuovi detector di elettroni e tecniche criogeniche si è arrivati alla **Alta Risoluzione**

SVANTAGGI



- **Basso rapporto segnale/rumore** per non danneggiare il campione → difficoltà nell'analisi delle orientazioni
  - Se aumento il numero di e^- incidenti per aumentare il rapporto, aumento anche il danno da radiazione
- Per **ora bassa automazione**

https://instruct-eric.eu/

instruct Integrating Biology

Search

Home | Access | Training | Information | Network | Register | Login | Dashboard | Submit Proposal



Instruct-ULTRA
Biennial Meeting
Access Call

Instruct-ULTRA Kicks-Off Jan 1st

Instruct-ULTRA is a project to accelerate and expand Instruct to new members, both in Europe and worldwide

Starting Points: Service/Technology Catalogue | Training & Events | Jobs | Instruct Centres | Contact Us

The decision of the UK to leave the European Union will not affect Instruct operations - we will continue as normal

Latest News

INFRAFRONTIER open call

INFRAFRONTIER open call Disease model development and systemic phenotypingINFRAFRONTIER, the European Research Infrastructure for phenotyping and arch...

The Instruct Hub wishes you all the best for 2017

2016 was an eventful year for Instruct and 2017 will bring important developments starting the 22nd of February in Brussels with the launch of Instruc...

Kick off meeting of the Czech Infrastructure for Integrative Structural Biology (CIISB)

The Czech Infrastructure for Integrative Structural Biology (CIISB) kick off meeting took place last week. CIISB) is a distributed infrastructure of t...

Upcoming Events

23-01-2017
Conference
CCP4/SPring-8 Crystallography School
Hyogo Prefecture

30-01-2017
Meeting
Training Course: Data Visualisation for Biology
Cambridge

03-02-2017
Training
Instruct-ARIA training for iNEXT and CORBEL facility managers
1066 CX Armsterdam

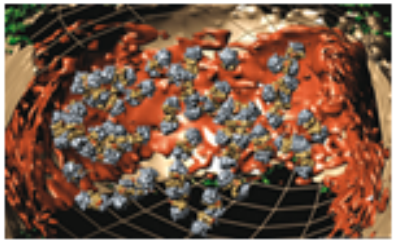
Submit a Proposal

Contact Us

Book Instrument

Instruct Publications

Become a member of the Instruct Hub today and gain access to resources and start collaborating.



Structural Analysis

- Correlative Light and Electron Microscopy
- Electron microscopy
- Electron Paramagnetic Resonance
- Fast field cycling relaxometry
- In-house X-ray source
- Ion Mobility Mass Spectrometry
- Light microscopy
- Native Mass Spectrometry
- Small angle scattering
- Solid State NMR
- Solution NMR
- X-ray crystallography beamline

Platform Catalogue | Instru

Giorgio

https://www.structuralbiology.eu/update/platform-catalogue

Apps | Google | Save to Mendeley | SERV e DB | SOCIALZ | Uniroma | RICERCA | DEPOSITIONS | Sincrotroni | WIKI | HyGraph-12 | 3D-2D

instruct Integrating Biology

Search

Home | Access | Training | Information | Network | Register | Login | Dashboard | Submit Proposal

Service/Technology Catalogue



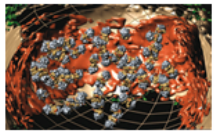
Sample Preparation

- Bacterial expression
- Baculovirus expression
- Biobank sample
- Cell-free Expression
- Crystallisation
- Library Methods
- Mammalian expression
- Membrane Protein Production & Crystallisation
- Nanobody Production
- Purification: chromatographic system
- Purification: Lysis system
- Virus purification
- Yeast expression



Biophysical Characterisation

- Analytical Ultracentrifugation (AUC)
- Calorimetry
- Circular dichroism (CD)
- Microscale Thermophoresis (MST)
- Multi Angle / Dynamic Light Scattering (MALS)
- Proteomic Mass Spectrometry
- Surface Plasmon Resonance (SPR)
- Thermal shift assay



Structural Analysis

- Correlative Light and Electron Microscopy
- Electron microscopy
- Electron Paramagnetic Resonance
- Fast field cycling relaxometry
- In-house X-ray source
- Ion Mobility Mass Spectrometry
- Light microscopy
- Native Mass Spectrometry
- Small angle scattering
- Solid State NMR
- Solution NMR
- X-ray crystallography beamline



Data Analysis

- Bioinformatics
- Computational software
- Image Processing

Filter Catalogue

Select Centre

- STRUBI
- Instruct Centre - France 1
- ISPC (WIS) Israel
- Instruct Centre - Germany 1
- Bijvoet Center - UU
- Centre for Computational Biology
- Centre for Virus Production
- Centre for Protein Production
- Centre for Bioinformatics
- Centre for Image Processing
- Instruct Centre Frankfurt - CCMP
- Instruct Centre - CERM/CIRMMP Italy
- Instruct Centre - France 2
- Centre for Solid State NMR
- Goethe University - Frankfurt
- Oxford Mass Spectrometry Centre
- OPPF-UK
- OPIC
- Diamond Light Source
- Instruct-NL
- Protein facility - NKI
- Nanobodies4Instruct
- Molecular Biophysics Suite
- Structural Genomics Consortium

Centres | Instruct

Giorgio

https://www.structuralbiology.eu/update/centres

Apps | Google | Save to Mendeley | SERV e DB | SOCIALZ | Uniroma | RICERCA | DEPOSITIONS | Sincrotroni | WIKI | HyGraph-12 | 3D-2D

instruct Integrating Biology

Search

Home | Access | Training | Information | Network | Register | Login | Dashboard | Submit Proposal

Instruct Centres

Through our Instruct Centres, we provide access to cutting-edge technology and scientific expertise. We offer all the core technologies needed to further structural biology research. Each of the Centres has contributed a range of instruments to the catalogue of services/technologies offered through the Instruct Hub.

Centre for Protein Production



Instruct-CZ



Instruct-NL



Centre for Mass Spectrometry



Centre for Bioinformatics



Centre for Image Processing



Centre for Virus Production



Instruct Centre - CERM/CIRMMP Italy



Centre for Solid State NMR



Instruct Centre - United Kingdom



ISPC (WIS) Israel



Nanobodies4Instruct



Instruct Centre - Germany 2



Instruct Centre - Germany 1



Instruct Centre - France 2

