

mgr Wojciech Witek¹,
mgr Wiktoria Ragin¹,
mgr Ha Linh Tran¹,
mgr Ewa Połomska²,
mgr Mikołaj Podlewski²,
mgr Aleksandra Pawłowicz²,
mgr Aleksandra Cioch-Biniaś²,
mgr Amadeusz Woś²,
dr Witold Andrałojć²,
prof. dr hab. inż. Marta
Szachniuk³,
dr hab. prof. ICHB PAN
Miłosz Ruskowski^{1✉}

¹Zakład Biologii Strukturalnej Eukariontów, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Zakład Biomolekularnego NMR, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

³Zakład Bioinformatyki Strukturalnej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_533

✉autor korespondujący: mruskowski@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: biologia strukturalna, krytalografia, kriomikroskopia elektronowa, jądrowy rezonans magnetyczny, biologia obliczeniowa

ABSTRAKT

B iologia strukturalna zajmuje się poznawaniem budowy biocząsteczek, takich jak białka i kwasy nukleinowe. Rozszyfrowanie struktury pozwala na zrozumienie ich funkcjonowania w komórce na bardzo dokładnym, molekularnym poziomie. Dzięki temu możliwe jest nie tylko określenie podłoża chorób, lecz również zaproponowanie strategii i narzędzi terapeutycznych. Tak silna motywacja do rozwoju biologii strukturalnej doprowadziła do stworzenia szeregu metod pozwalających określać budowę cząsteczek życia. Ciągły postęp umożliwia integracja biologii, chemii, fizyki i informatyki, powodując, że biologia strukturalna jest niezwykle interdyscyplinarna.

W swojej 35-letniej historii, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu stał się jednym z kluczowych polskich ośrodków prowadzących badania w obszarze biologii strukturalnej. Z jednej strony prowadzone badania przyniosły rozpoznanie na arenie międzynarodowej, a z drugiej wymusiły wdrażanie i rozwój nowoczesnych metod. Niniejsza praca przeglądowa zawiera omówienie metod biologii strukturalnej wykorzystywanych w Instytucie.

WPROWADZENIE

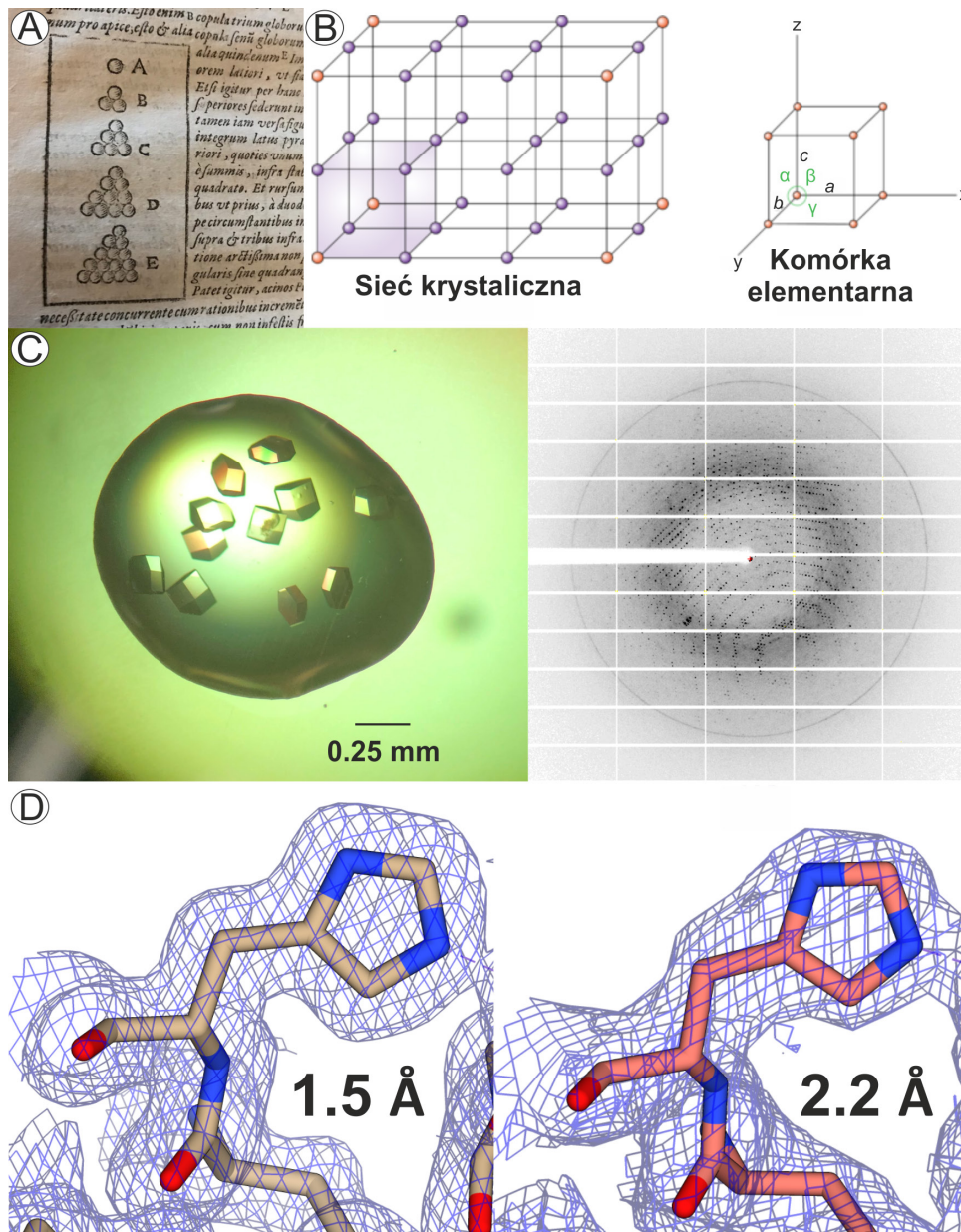
Białka, DNA i RNA dyktują niemalże wszystkie procesy zachodzące w komórce, zasługując na miano cząsteczek życia lub biocząsteczek. Ich prawidłowe funkcjonowanie i odpowiednia regulacja są kluczowe dla każdego organizmu, a zaburzenia skutkujące obniżeniem lub podwyższeniem aktywności albo poziomu danej biocząsteczki często są podstawą schorzeń. Wiemy również, że funkcja cząsteczek życia jest ściśle związana z ich strukturą. Jednak poznawanie budowy biocząsteczek jest utrudnione przez ich rozmiary, wynoszące zazwyczaj od kilku do kilkudziesięciu nanometrów (nm). Z uwagi na ograniczenia wynikające z długości fali światła widzialnego, rozmiar ten uniemożliwia obserwacje z zastosowaniem klasycznego mikroskopu optycznego. Jak więc poznawać strukturę biocząsteczek biorąc pod uwagę, że samych białek, tylko u człowieka, jest około 25000?

Dedykowanych narzędzi dostarcza biologia strukturalna, która zajmuje się poznawaniem budowy białek, kwasów nukleinowych i innych cząsteczek biologicznych, a także ich oddziaływań ze sobą. Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICHB PAN) w Poznaniu od swojego powstania był jednym z wiodących ośrodków w kraju w obszarze biologii strukturalnej. Artykuł ten stanowi podsumowanie metodologii, które są dostępne, wykorzystywane lub tworzone w Instytucie, świadcząc o podtrzymywaniu tej zaszczytnej, ale i odpowiedzialnej roli.

KRYSTALOGRAFIA

Dekadę temu, w 2014 roku, obchodzony był Międzynarodowy Rok Krytalografii. Była to setna rocznica upamiętniająca przyznanie Nagrody Nobla Maxowi von Laue, fizykowi, który odkrył dyfrakcję promieni rentgenowskich na kryształach siarczynu (VI) miedzi (II). Rok 1914 uznaje się za początek nowoczesnej krytalografii rentgenowskiej, jednak jej podwaliny były kształtowane już od XVII wieku. W roku 1611 ukazało się dzieło Johanneses Keplera pt. „*Strena seu de Nive Sexangula*” (ang. *On the Snowflake, or the Six-Angled Crystal*) [1], w którym sformułował hipotezę dotyczącą sześciokątnej symetrii płatków śniegu, wynikającej z regularnego upakowania cząsteczek wody (Ryc. 1A).

Początki biokrytalografii, która skupia się na badaniach makromolekuł tj. białek i kwasów nukleinowych, datuje się na rok 1840, kiedy to Friedrich Hübnfeld otrzymał krystały hemoglobiny z dżdżownicy, świni oraz człowieka [2].



Rycina 1. (A) Diagram J. Keplera ilustrujący najbardziej wydajne sposoby upakowania cząsteczek w strukturze trójwymiarowej. Źródło: www.seh.ox.ac.uk/blog/johannes-kepler-on-snowflakes (B) Relacja pomiędzy siecią krystaliczną a komórką elementarną. Źródło (mod.): collegesidekick.com/study-guides/cheminter/unit-cells/ (C) Kryształy roślinnego enzymu ze szlaku biosyntezy histydyny, dehydratazy fosforanu imidazoliglicerolu (IGPD/HISN5), oraz dyfraktogram jednego z nich. Zwróć uwagę na koncentryczny wzór tworzony z refleksów. (D) Porównanie mapy gęstości elektronowej, w różnych rozdzielczościach, wokół reszty histydyny enzymu IGPD.

W 1958 roku, John Kendrew opublikował pierwszą krystalograficzną strukturę trójwymiarową mioglobiny wyizolowanej z kaszalota [3]. Za te trwające ponad 20 lat badania, J. Kendrew wraz ze swoim współpracownikiem Maxem Perutzem, otrzymali w 1962 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. W tym samym roku Nagrodę Nobla otrzymali również James Watson, Francis Crick i Maurice Wilkins za wyznaczenie helikalnej struktury A-DNA, również w oparciu o krystalografię [4]. O sile biologii strukturalnej, której fundamentem jest krystalografia, stanowi fakt, że około trzydziestu Nagród Nobla zostało przyznanych za osiągnięcia w tym obszarze [5].

Celem biokrystalografii jest określenie trójwymiarowej struktury makrocząsteczki, tj. pozycji jej atomów w kryształce (Ryc. 1B). Badać w ten sposób można białka rozpuszczone

czalne, błonowe oraz kwasy nukleinowe. Kryształ jest to materiał składający się z wysoce uorganizowanych, powtarzających się we wszystkich kierunkach atomów, jonów lub cząsteczek, tworzących sieci krystaliczne. Najmniejszymi powtarzalnymi częściami kryształu są komórki elementarne, które tworzą siedem rodzajów układów krystalograficznych, jednak najłatwiej wyobrazić je sobie jako bryły, takie jak np. sześciany lub prostopadłościany (Ryc. 1B). Wysoki stopień organizacji atomów w kryształce umożliwia stosowanie operacji symetrii (np. rotacje i translacje) do uproszczenia opisu ułożenia atomów w kryształce. Innymi słowami, jeśli elementy struktury poddamy właściwym dla danego kryształu operacjom symetrii, to otrzymamy niezmienny układ elementów, który jest identyczny ze stanem początkowym. Połączenia układów krystalograficznych i operacji symetrii składają się na tzw. grupy przestrzenne [6].

Naświetlanie kryształu wiązką promieni rentgenowskich prowadzi do ich dyfrakcji na warstwach atomów kryształu, konkretnie na elektronach. Odbite promienie rejestrowane są na detektorze w postaci refleksów, czego wynikiem jest obraz dyfrakcyjny (Ryc. 1C). Na podstawie ułożenia i intensywności refleksów można obliczyć parametry wielkości komórki elementarnej oraz grupę przestrzenną. Następnie stosując zaawansowane narzędzia matematyczne, m. in. odwrotną transformatę Fouriera, otrzymuje się mapę gęstości elektronowej, do której można dopasować model białka lub kwasu nukleinowego na podstawie ich sekwencji. Wszystkie niezbędne obliczenia wykonuje się za pomocą dostępnych programów, wyspecjalizowanych w każdym etapie procesowania danych. Jakość tych danych jest wprost proporcjonalna do jakości otrzymanych kryształów, dlatego pomiar dyfrakcyjny traktuje się jako ostatni etap eksperymentalny w drodze do rozwiązania struktury [7].

Parametrem mającym duże znaczenie dla jakości struktury krystalograficznej, szczególnie mapy gęstości elektronowej, jest rozdzielczość. W skrócie, rozdzielczość definiuje się jako najmniejszą odległość z jaką można odróżnić od siebie dwa punkty. Fale rentgenowskie są falą elektromagnetyczną o długości ok. 0,5 Å–2,5 Å (Å, Angstrom; 1 Å = 0,1 nm), co pozwala rozróżniać atomy. Dla porównania, fala światła widzialnego, wykorzystywana w mikroskopach optycznych, ma długość 400–700 nm (4000–7000 Å), co nie pozwalała na obserwację pojedynczych cząsteczek, z uwagi na maksymalną rozdzielczość około 200 nm, czyli połowę długości fali. Im wyższa rozdzielczość (tzn. mniejsza jej wartość liczbowo) tym więcej informacji na temat danego obiektu możemy uzyskać. Przy rozdzielczości 4–6 Å (wyżej opisana pierwsza struktura mioglobiny) możemy zaobserwować co najwyżej przebieg elementów struktury drugorzędowej białek, np. α -helis, natomiast przy rozdzielczości 1,5 Å uwidoczni się ułożenie łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych lub położenie ligandów w makrocząsteczce (Ryc. 1D). Znajomość pozycji atomów i ich wzajemnych oddziaływań umożliwia zrozumienie molekularnej funkcji białek (receptorów, enzymów, czynników transkrypcyjnych, kompleksów białkowych itd.) oraz kwasów nukleinowych.

Krystalografia posiada również pewną słabość. Odnalezienie warunków w których wykrystalizuje np. białko nie jest łatwym zadaniem. Dostępne są komercyjne zestawy odczynników, zawierające roztwory o zróżnicowanym składzie chemicznym, które mają promować krystalizację białka. Na krystalizację wpływ ma wiele czynników fizykochemicznych, takich jak temperatura otoczenia, skład buforów, sekwencja i rozpuszczalność białka, stężenie białka czy stężenie soli i innych związków towarzyszących. Czasami odnalezienie właściwych warunków może trwać latami, ale otrzymanie kryształów i rozwiązanie struktury rekompensuje ten wysiłek. Otrzymane w ten sposób kryształy zazwyczaj nie przekraczają 0,5 mm długości. Aby przygotować je do eksperymentu dyfrakcyjnego należy je wyłowić, pracując pod mikroskopem stereoskopowym. Ponieważ eksperyment dyfrakcyjny prowadzi się zazwyczaj w warunkach kriogenicznych, do kryształu należy zastosować krioprotektant i zamrozić go w ciekłym azocie. Krioprotekcja zapobiega powstawaniu lodu krystalicznego,

który może niszczyć strukturę kryształu i zaburzać pomiar dyfrakcyjny. Jest to kluczowe dla zachowania właściwości bardzo wrażliwych kryształów biocząsteczek, które szybko ulegają zniszczeniom radiacyjnym w wyniku stosowania wysokoenergetycznych wiązek promieni rentgenowskich. Z drugiej jednak strony, powstanie bardzo intensywnych źródeł promieniowania rentgenowskiego (synchrotronów) pod koniec XX wieku, znacznie ułatwiło badania krystalograficzne.

KRIOGENICZNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

Kriomikroskopia elektronowa (ang. *cryogenic electron microscopy*, cryoEM) to metoda obrazowania opierająca się o rozpraszanie wiązki elektronów przez atomy makrocząsteczek, zamrożonych, a konkretnie zwitryfikowanych, w lodzie amorficznym, tzn. pozbawionym struktury krystalicznej. Witryfikacja to proces bardzo szybkiego chłodzenia cieczy w niskich temperaturach. Ciałem amorficznym znanym z życia codziennego jest, np. szkło. Próbkę białka (lub kompleksów białek z kwasami nukleinowymi) umieszcza się na mikrośiataczkach (ang. *grid*). Roztwór osadza się w oczkach siateczek dzięki napięciu powierzchniowemu, tworząc warstwę o grubości maksymalnie kilkunastu nm [8]. Tak cienka warstwa łatwiej ulega witryfikacji. Z uwagi na mały kontrast cząsteczek biologicznych, cryoEM zazwyczaj jest skuteczne w badaniu dużych białek lub kompleksów.

W przypadku mikroskopu optycznego wykorzystującego światło widzialne, granica rozdzielczości wynosi około 200 nm. Chociaż jest to wystarczające do obrazowania komórek, jest niewystarczające dla biocząsteczek. Dlatego też konieczne jest wykorzystanie innego rodzaju wiązki. Fizyka uczy nas, że elektron ma podwójne właściwości cząstki i fali. W mikroskopie elektronowym (ang. *electron microscope*, EM), długość fali (np. 2 pm) regulowana jest poprzez zmianę energii. Podobnie jak mikroskop optyczny, EM również wykorzystuje system soczewek do ogniskowania i kierowania wiązki elektronów. Szczególną cechą tych soczewek jest jednak to, że są one elektromagnesami, ponieważ tor ruchu naładowanych elektronów można zmieniać w polu magnetycznym.

Mikroskop elektronowy pozwala rejestrować na detektorze elektrony przechodzące przez próbkę. Podobnie jak w przypadku konwencjonalnego mikroskopu, wynikiem jest dwuwymiarowa projekcja. Ponieważ pojedyncza projekcja zawiera bardzo mało informacji na temat struktury białka, opracowano metodę zwaną analizą pojedynczych cząstek (ang. *single-particle analysis*, SPA). Przy założeniu, że wszystkie cząsteczki białka są strukturalnie identyczne, różnica w kształcie projekcji różnych cząsteczek wynika z ich orientacji w lodzie. W trakcie procesowania danych, specjalistyczne algorytmy pozwalają klasyfikować podobne projekcje oraz odtworzyć z nich trójwymiarową mapę, by ostatecznie rozwiązać strukturę biocząsteczki. Warto podkreślić, że cryoEM nie tylko otwiera szansę na badanie statycznej struktury, ale pozwala także odtworzyć dynamikę cząsteczki.

Ostatnio zaobserwowano bardzo szybki rozwój cryoEM w trzech aspektach: rozwoju detektorów, algorytmów obli-

zeniowych, a także zastosowania sztucznej inteligencji w przetwarzaniu danych. Doprowadziło to do zwiększenia liczby struktur w bazie *Protein Data Bank* (PDB) rozwiązanymi techniką cryoEM, która przeżywa obecnie etap rozwoju podobny do tego, na jakim krystalografia była w latach 1995–2010. Przykładowo, w roku 2010 w bazie PDB zdeponowano 57 struktur otrzymanych metodą cryoEM, a w 2023 r. było to prawie 4600 struktur [9].

Dzisiaj cryoEM jest metodą komplementarną do krystalografii, która ma od dawna ugruntowaną w nauce pozycję. Obecny rekord rozdzielczości wynosi 1,22 Å dla mysiej apoferrytyny, o masie całego 24-meru równej 480 kDa [10]. CryoEM okazuje się doskonale do badania dużych kompleksów białkowych (>1 MDa), zarówno błonowych, jak i cytoplazmatycznych, których krystalizacja jest często niemożliwa. Za rozwój cryoEM Jacques Dubochet, Joachim Frank i Richard Henderson zostali uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 2017 roku.

BADANIE STRUKTURY BIAŁEK BŁONOWYCH

Białka błonowe obejmują wszystkie białka osadzone w dwuwarstwie lipidowej komórki (w tym w błonach organelli) lub z nią związane [11]. Nie jest przesadą stwierdzenie, że białka błonowe są strażnikami komórek. Odgrywają one kluczową rolę w sygnalizacji np. receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptor*, GPCR), adhezji komórek (kadheryny), rozpoznawaniu (białka kompleksu zgodności tkankowej), transporcie (kanały jonowe, pompy jonowe, transportery hormonów, itp.), często posiadając również aktywność enzymatyczną. Warto zauważyć, że białka błonowe stanowią cel molekularny wielu zatwierdzonych terapii. Na przykład, zmiany w strukturze receptora endoteliny typu A (ETAR) stoją za wysokim ciśnieniem krwi. Rozumiejąc strukturę i funkcję ETAR, zaprojektowano i zsyntetyzowano bosentan, który jest antagonistą tego receptora, zatwierdzonym jako lek.

Charakterystyczna struktura białek błonowych pozwala im oddziaływać z hydrofobowym wnętrzem błony. Ze względu na hydrofobową stronę zewnętrzną, struktura białka błonowego może zostać łatwo zakłócona po „wyjęciu” go z natywnej błony. Dlatego też poznanie struktur białek błonowych jest trudniejsze. Duży rozmiar (powyżej 100 kDa) oraz elastyczność znacznie zmniejszają szansę na krystalizację. Konieczność naśladowania środowiska lipidowego, niezbędna do utrzymania prawidłowej struktury jest również sporym wyzwaniem. Duży postęp w zrozumieniu białek błonowych umożliwiło cryoEM. Rozwój technologii dedykowanej białkom błonowym szczególnie związany jest imitacją środowiska naśladowającego naturalne lipidy, tj. wprowadzaniem detergentów [12], nanodysków [13], liposomów, itp. Wszystko to prowadzi do wykładniczego rozwoju liczby struktur białek błonowych. W szczególności postęp w cryoEM uitorował drogę do zrozumienia GPCR [14], otwierając możliwości projektowania nowych agonistów GPCR [15].

Wciąż jednak struktura bardzo wielu kluczowych białek błonowych i kompleksów wielobiałkowych nie została poznana. Do poznawania architektury największych kom-

pleksów, pomocna okazuje się tak zwana kriotomografia elektronowa (cryoET). Technika ta daje szansę przyjrzenia się komórce, mogąc dostarczyć informacji o interakcjach biocząsteczek w jej wnętrzu. Ponieważ rozdzielczość cryoET jest obecnie ograniczona, aby zbadać oddziaływania białek błonowych stosuje się szereg innych technik, takich jak transfer energii rezonansu Forstera [16] czy spektroskopię sił atomowych [17].

SPEKTROSKOPIA NMR

Spektroskopia NMR, obok omawianej wcześniej krystalografii rentgenowskiej, stanowi jedną z najważniejszych metod, pozwalających na wyznaczenie struktur trójwymiarowych makrobiomolekuł. Zgodnie z bazą danych PDB, znanych jest obecnie 216 tysięcy struktur białek oraz kwasów nukleinowych wyznaczonych przy użyciu jednej z trzech metod: krystalografii rentgenowskiej (84,5%), cryoEM (8,8%) oraz spektroskopii NMR (6,6%) (<https://www.rcsb.org/stats/summary>). Większość struktur białkowych została rozwiązana metodą krystalograficzną, co wynika z charakteru badanych struktur, które są przeważnie dużymi układami biomolekularnymi o dobrze zdefiniowanej strukturze. Jednakże część biopolimerów, w których występują dynamiczne zmiany konformacyjne i są problematyczne w krystalizacji, może być analizowana wyłącznie metodami bazującymi na pomiarach w roztworze. Spośród ww. metod, klasyczną metodą opisującą zachowanie biomolekuł w roztworze jest spektroskopia NMR, umożliwiając precyzyjne powiązanie fizjologiczne pomiędzy strukturą trójwymiarową badanej biocząsteczki, a pełnioną przez nią funkcją. Zgodnie ze statystyką bazy PDB, metoda spektroskopii NMR umożliwiła rozwiązanie 1479 struktur wolnych kwasów nukleinowych (nieskompleksowanych z białkami), podczas gdy metodami krystalografii rentgenowskiej rozwiązano 2760 takich struktur. W przypadku niekanonicznych struktur biomolekuł, takich jak G-kwadrupeksy, na 529 rozwiązanych struktur, aż 285 z nich zostało opisane techniką NMR w roztworze.

Spektroskopia NMR stanowi skuteczną metodę wyznaczenia struktury biomolekuł z rozdzielczością atomową, co w tym przypadku rozumiemy jako możliwość selektywnej obserwacji lokalnego otoczenia poszczególnych atomów. Co więcej, przedstawione wyżej statystyki nie odzwierciedlają całego wkładu spektroskopii NMR w biologię strukturalną, gdyż wiele badań NMR nie kończy się zdeponowaniem struktury wysokorozdzielczej w PDB. Wykonywanie badań w roztworze zapewnia niezaburzoną dynamikę molekularną oraz swobodne oddziaływania międzycząsteczkowe, co sprawia, że spektroskopia NMR jest niezastąpioną metodą badania tych zjawisk. Różnorodność technik pomiarowych NMR nie tylko zapewnia szerokie spektrum informacji na temat dynamiki konformacyjnej, ale także pozwala na rejestrację interakcji zachodzących w badanym układzie, w przedziale czasowym od pikosekund do nawet dni.

Spektroskopia NMR oparta jest na podstawowych właściwościach mechaniki kwantowej spinów jądrowych. Wykorzystuje ona naturalne właściwości magnetyczne jąder atomowych ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , w celu uzyskania informacji o otoczeniu chemicznym danego atomu. Niestety, najbardziej

lających ocenić jednorodność strukturalną badanej próbki, poprzez wyznaczenie struktury drugorzędowej po wstępnej analizie widm, aż po rozwiązanie struktury wysokorozdzielczej po całkowitym przypisaniu sygnałów w widmie. W wielu wypadkach już niskorozdzielcze informacje uzyskane po wstępnej analizie widm wystarczają do udzielenia odpowiedzi na postawione pytania badawcze.

Już po wykonaniu pierwszego widma NMR, często od razu można wysnuć przypuszczenia odnośnie struktury drugorzędowej, nie skupiając się na całości widma, lecz bazując na przesunięciach chemicznych odpowiednich grup atomów. Dla przykładu, w widmie ^1H NMR zarejestrowanym dla kwasów nukleinowych, sygnały iminowe występujące przy 10–15 ppm pozwalają na oszacowanie ilości par zasad w cząsteczce (każda para AT, UT, GC ma jeden proton iminowy), przy czym pary Watsona-Cricka pojawiają się w regionie 12–15 ppm, natomiast pary niekanoniczne przy 10–12 ppm (Ryc. 2). Ten zakres przesunięć jest charakterystyczny także dla tworzenia się G-kwadrupleksów. Patrząc na fragment widma ^1H NMR w regionie iminowym, często możemy także stwierdzić liczbę form strukturalnych, bazując na liczności sygnałów, to znaczy czy w roztworze znajduje się jeden konkretny konformer, czy więcej [22,23]. Niestety nie zawsze jest to możliwe, wynika to z kinetyki tworzenia związków (przy szybkiej kinetyce otrzymamy sygnały formy uśrednionej) lub ze zjawiska nakładania się sygnałów.

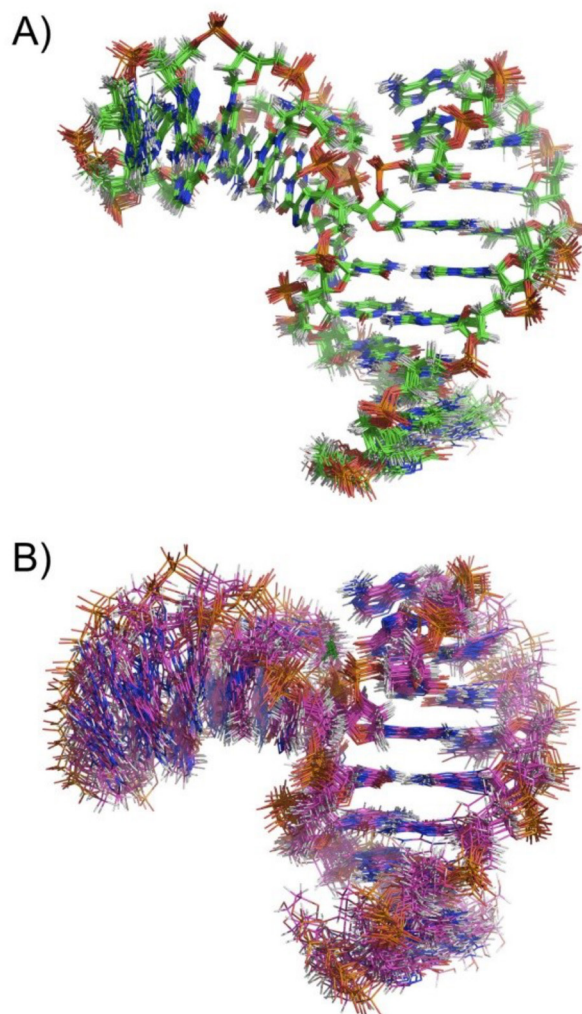
Ustalenie struktury trzeciorzędowej wymaga przede wszystkim przypisania jak największej liczby sygnałów w widmie dwuwymiarowym NOE badanej cząsteczki. W następnym etapie otrzymujemy dane strukturalne w formie więzów konformacyjnych [24]. Następnie na podstawie przypisanych sygnałów w widmie NOESY konkretnym atomom w cząsteczce, porównuje się ich intensywności i w ten sposób przewiduje odległości pomiędzy atomami w strukturze.

Aby przejść od rozwiązanego widma do ustalenia struktury trzeciorzędowej, wykorzystywane są różne algorytmy, które próbują dopasować niezdefiniowaną konformacyjnie cząsteczkę do danych NOE. Dzieje się to przez przeszukanie przestrzeni konformacyjnej, czyli przetestowanie wszystkich możliwych konformacji, by powstający model jak najbardziej spełniał dane eksperymentalne, czyli odległości międzyatomowe. W tym celu wykonuje się wiele powtórzeń tej samej symulacji przy użyciu tych samych danych wejściowych, ale różnych, losowo wybranych warunków początkowych i porównuje się otrzymaną grupę konformerów, by mieć pewność, że zawsze otrzymujemy tę samą strukturę [25,26].

Najczęściej stosowanymi metodami badań strukturalnych biomolekuł są algorytmy restryktywnej dynamiki molekularnej (ang. *restrained Molecular Dynamics*, rMD), metoda symulowanego wyżarzania (ang. *simulated annealing*, SA) oraz geometrii odległościowej (ang. *distance geometry*, DG) [27]. Po zakończeniu modelowania molekularnego otrzymujemy dziesiątki struktur, które różnią się od siebie. Po ich nałożeniu i otrzymaniu, tzw. rodziny struktur, jesteśmy w stanie określić zdefiniowanie konformacyjne wyzna-

zonej struktury (Ryc. 3), którą następnie możemy złożyć do bazy PDB, deponując rodzinę ok. 10–20 struktur najlepiej spełniających dane NOE.

Zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe (DNA, RNA) nie są sztywnymi strukturami. Okazuje się, że można zaobserwować całą gamę procesów dynamicznych, które mogą być istotne dla funkcji biologicznych danej biomolekuły [28]. Dynamika molekularna w tego typu układach jest obecna na wszystkich poziomach architektury cząsteczki – od ruchów „lokalnych”, ograniczonych do pojedynczych reszt, poprzez dynamikę w obrębie poszczególnych elementów struktury drugorzędowej (na przykład przejściowe „otwierania” par zasad w dupleksach DNA/RNA), aż po zmiany przekształcające całą strukturę trzeciorzędową, jak dynamika pomiędzy poszczególnymi helisami tworzącymi skomplikowane struktury RNA [24]. Jednocześnie ruchy te zachodzą w bardzo szerokim przedziale czasowym, od pikosekund (wibracje, zmiany kątów dwuściennych w cząsteczkach cukrów), aż po godziny czy dni (przejścia strukturalne pomiędzy różnymi strukturami trzeciorzędowymi). Mimo tak wielkiej różnorodności skal czasowych ruchów



Rycina 3. Przedstawienie rodzin struktur otrzymanych za pomocą NMR. **Panel A** prezentuje bardzo dobrze zdefiniowaną rodzinę struktur. **Panel B** przedstawia rodzinę struktur wyznaczaną za pomocą mniejszej liczby więzów strukturalnych, co przekłada się na gorsze zdefiniowanie wzajemnej orientacji elementów helikalnych [57].

biomolekuł, spektroskopia NMR dostarcza nam szerokiego wachlarza narzędzi, które razem pozwalają na badanie całego zakresu tych procesów dynamicznych [24,28]. Także, na przykład w celu zbadania zakresu ruchów pomiędzy dwiema helisami tworzącymi element RNA TAR z wirusa HIV-1, zastosowano resztkowe sprzężenia dipolowe (ang. *residual dipolar couplings*, RDC), które są wrażliwe na orientację wiązań między atomami w układzie odniesienia całej cząsteczki [29]. Innymi ważnymi narzędziami badania dynamiki są pomiary czasu relaksacji R1ρ oraz metoda CEST (ang. *chemical exchange saturation transfer*), pozwalające na obserwację krótko żyjących alternatywnych struktur badanej biomolekuły o wyższych energiach (ang. *excited states*, ES) [30].

Zaprezentowane przykłady pokazują jak szerokiego spektrum informacji dostarcza spektroskopia NMR o strukturze, oddziaływaniach, dynamice oraz funkcji biomolekuł. Jednak złożoność układów biomolekularnych sprawia, że do ich właściwego opisu potrzeba często więcej danych niż może dostarczyć jakakolwiek pojedyncza technika badawcza. Spektroskopia NMR jest narzędziem silnie komplementarnym do krystalografii rentgenowskiej i wspólne wykorzystanie obu metod pozwala na uzyskanie szerszego spektrum informacji na temat analizowanych białek. Na przykład porównanie struktury przestrzennej biomolekuły w cieple stałym (w kryształach), z nawet podstawowymi parametrami NMR zmierzonymi w roztworze, pozwala na szybką ocenę czy obecne są różnice strukturalne pomiędzy tymi warunkami. W przypadku labilnych kompleksów białek z kwasami nukleinowymi, krystalografia rentgenowska pozwala zapewnić szczegółowy, statyczny obraz struktury molekularnej poszczególnych komponentów, podczas gdy badania NMR są szczególnie przydatne do zrozumienia często dynamicznych oddziaływań pomiędzy nimi [31].

METODY OBLICZENIOWE I BIOINFORMATYKA W BIOLOGII STRUKTURALNEJ

Metody obliczeniowe bioinformatyki są nieodłącznym narzędziem badań biologii strukturalnej. Pozwalają one gromadzić, systematyzować i przetwarzać wiedzę o strukturach molekularnych, a także tworzyć modele cząsteczek i procesów będących ich udziałem, co umożliwia symulowanie *in silico* wielu eksperymentów laboratoryjnych. Warunkiem początkowym badań podstawowych w biologii strukturalnej jest dostęp do danych o budowie cząsteczek. Te gromadzone są w bazach pierwotnych (dane eksperymentalne) i wtórnych (dane adnotowane, wzbogacone o dodatkowe parametry, wizualizacje, statystyki, itd.). Bazy wtórne powstają jako produkt analizy danych pierwotnych, która często opiera się na specjalizowanych narzędziach obliczeniowych. Wśród tych ostatnich wymienić można, np. programy stworzone w IChB PAN – *RNApdbee* (do analizy struktury przestrzennej, oznaczania struktury drugorzędowej, klasyfikacji pseudowęzłów) [32], *WebTetrado* (do wykrywania kwadrupleksów i wyznaczania ich parametrów strukturalnych) [33] czy *DrawTetrado* (do wizualizacji kwadrupleksów) [34]. Przyczyniły się one do opracowania m. in. RNA FRABASE [35] – bazy eksperymentalnych struktur RNA, wraz z zaawansowaną wyszukiwarką motywów, ONQUADRO – bazy struktur tetrad i kwadrupleksów [36]

oraz RNAsolo – bazy oczyszczonych struktur 3D RNA pogrupowanych według podobieństwa [37]. Ostatnią z nich zaprojektowano, m.in. do analizy komparatywnej algorytmów przewidujących strukturę drugo- i trzeciorzędową RNA oraz trenowania metod predykcyjnych, bazujących na uczeniu maszynowym. Komputerowe przewidywanie struktury 2D i 3D, do jakiej zwiążają się cząsteczki o określonej sekwencji jest coraz powszechniej stosowanym podejściem uzyskiwania ogólnej wiedzy o budowie kwasów nukleinowych i białek, a także wstępnym etapem projektowania cząsteczek o określonej funkcjonalności. Stosuje się w nim najczęściej algorytmy symulujące proces zwiążania (modelowanie *de novo*), metody bazujące na modyfikacji struktur homologicznych (modelowanie komparatywne), składanie z fragmentów oraz – ostatnio – modele uczenia maszynowego. Jednym z najpopularniejszych predyktorów struktury 3D RNA jest system *RNAComposer*, autorstwa bioinformatyków z IChB PAN, który składa modele z fragmentów wyciętych ze struktur eksperymentalnych. Dokładność i jakość przewidywania ocenia się korzystając z miar odległości (np. RMSD, MCQ, GDT-TS), podobieństwa (np. INF, TM-score, LCS) i jakości (ang. *clash score*). Na części z nich bazują również metody służące do wyszukiwania wspólnych podstruktur czy klastrowania cząsteczek w zbiorze. Do najnowszych wyzwań bioinformatyki strukturalnej należy analiza topologii komputerowych modeli 3D RNA. Algorytmy predykcyjne, zwłaszcza te oparte o uczenie maszynowe, generują bowiem struktury zawierające splecione motywy (wykrywa je program *RNAspider*) [38] lub węzły topologiczne, niespotykane dotychczas w naturalnych cząsteczkach RNA. Przyszłość pokaże czy są to halucynacje czy predykcje, które potwierdzą się w nadchodzących latach.

Ogólnodostępna baza PDB, która gromadzi struktury białek i kwasów nukleinowych, przeżywa szybki wzrost liczby deponowanych struktur. Dla przedstawienia skali rozwoju, w roku 1995 cała baza PDB liczyła 3812 struktur, a w samym tylko 2023 r. zdeponowano 14480 struktur, podczas gdy całe PDB zawiera ich już ponad 216 tysięcy [9]. Oprócz struktur otrzymanych eksperymentalnie, PDB pozwala również na dostęp do prawie miliona modeli wygenerowanych metodami obliczeniowymi. Algorytmy sztucznej inteligencji, np. *AlphaFold*, *ESMFold* czy *RoseTTAFold*, potrafią przewidywać struktury 3D makrocząsteczek. Należy jednak pamiętać, że algorytmy te stosują duże uproszczenia, a struktury otrzymane eksperymentalnie zawsze będą bliższe prawdzie.

ZASTOSOWANIE BIOLOGII STRUKTURALNEJ W PROJEKTOWANIU LEKÓW

Biologia strukturalna stanowi potężne narzędzie wykorzystywane w procesie projektowania leków, a tym samym znacząco wpływa na rozwój medycyny i farmakologii. Struktury krystalograficzne stanowią pewnego rodzaju mapę dla naukowców, bowiem poprzez ich analizę naukowcy uzyskują wgląd w molekularne podstawy chorób, co umożliwia precyzyjne zidentyfikowanie celów terapeutycznych. Wspomnianym celem terapeutycznym mogą być kwasy nukleinowe: DNA lub RNA, a także białka. W przypadku krystalografii białek, szczególnie istotnym aspektem jest poznanie miejsca aktywnego enzymu i domeny funkcjonalnej docelowego białka. Szczegół-

lowa wiedza na temat wspomnianych elementów struktury pozwala na zastosowanie metody projektowania leków w oparciu o strukturę (ang. *structure-based drug discovery*, SBDD). W rezultacie zaprojektowane leki są dobrze dopasowane do celu terapeutycznego (wysoce specyficzne), co przyczynia się do zwiększenia ich skuteczności i ograniczenia skutków ubocznych [39].

Przykładem leku, który został opracowany w oparciu o SBDD jest Imatinib – preparat stosowany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myelogenous leukemia*, CML) oraz ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *acute lymphocytic leukemia*, ALL). Za jedną z molekularnych podstaw wyżej wymienionych typów nowotworów, uznaje się nieprawidłowe działanie kinazy tyrozynowej. Imatinib w sposób wysoce specyficzny wiąże się receptorami kinazy tyrozynowej, co prowadzi do zahamowania aktywności enzymu, a w konsekwencji zahamowania wzrostu komórek nowotworowych (prolifracji) i ich apoptozy (programowanej śmierci komórki). Wykorzystanie biologii strukturalnej przyczyniło się do zwiększenia specyficzności leku oraz zminimalizowania ryzyka wystąpienia efektów niepożądanych. Wskazuje na to zahamowanie aktywności enzymu, bez zakłócenia innych procesów komórkowych [40,41].

Metodą, która zyskuje na popularności, potwierdzając swoją skuteczność, jest tzw. krystalograficzne przesiewanie fragmentów (ang. *crystallographic fragment screening*) [42]. Znajduje ono zastosowanie, gdy możliwa jest krystalizacja celu molekularnego (np. białka lub RNA). Otrzymane kryształy nasąca się wówczas małowcząsteczkowymi związkami (fragmentami). Następnie analiza otrzymanych map gęstości elektronowych pozwala zidentyfikować te związki, które wiążą się z celem. Jednocześnie otrzymywane są informacje o miejscu i sposobie wiązania, co z kolei pozwala na wskazanie miejsc modyfikacji cząsteczki w celu zwiększenia energii oddziaływania.

Metody oparte na biologii strukturalnej znalazły zastosowanie, m.in. w rozwoju innych terapii przeciwnowotworowych. Szczególnie obiecującą strategią w walce z chorobami nowotworowymi jest terapia celowana. Personalizowane strategie terapeutyczne określane są mianem „szytych na miarę”, opierają się bowiem na indywidualnych predyspozycjach pacjenta [43]. Zastosowanie biologii strukturalnej w terapiach celowanych w głównej mierze opiera się na analizie strukturalnej kwasów nukleinowych, np. analizie zmian w ramionach chromosomów [44].

Istotnym obszarem zastosowań biologii strukturalnej jest także badanie mechanizmów lekooporności - zjawiska powszechnie obserwowanego w chorobach o podłożu bakteryjnym [45]. Przykładowo, analizując rybosomy różnych gatunków bakterii naukowcy odkryli, że bakterie modyfikują swój rybosom poprzez metylację miejsca wiązania antybiotyku, uniemożliwiając tym samym wiązanie leku. Powyższe dane stały się inspiracją do opracowania antybiotyku o nazwie Cresomycin, który jest zoptymalizowany pod kątem wiązania z rybosomem [46].

Naturalnie występujące kwasy nukleinowe DNA i RNA zaangażowane w procesy chorobotwórcze, stały się waż-

nym celem przy projektowaniu i opracowywaniu leków [47]. W szczególności techniki spektroskopii NMR pozwalają na efektywne monitorowanie interakcji biomolekuł z ligandami w roztworze. Podobnie jak w przypadku badań struktury biomolekuł, spektroskopia NMR pozwala na śledzenie różnych aspektów oddziaływań międzycząsteczkowych, w zależności od postawionych celów badawczych: od samego potwierdzenia występowania oddziaływań kwas nukleinowy – ligand, poprzez ocenę ich specyficzności, aż po wyznaczenie struktur przestrzennych kompleksów. Do pierwszej kategorii należą eksperymenty przesiewowe (ang. *screening*), pozwalające na identyfikację nowych ligandów oddziałujących z badaną biomolekułą, na podstawie zmian w sygnałach rezonansowych NMR, np. poszerzenia, przesunięcia [47]. Obserwacja tych zmian pozwala wyodrębnić z dużych bibliotek związków chemicznych te, które wchodzi w interakcje z biomolekułą. Dodatkowym atutem staje się możliwość wyznaczenia stałych wiązania nowo odkrytych ligandów. Spektroskopowe przesiewanie ligandów zyskuje znaczącą przewagę nad innymi metodami, ponieważ nie wymaga chemicznej modyfikacji biocząsteczki, ani cząsteczki reporterowej [48]. Dla już zidentyfikowanych ligandów możliwa jest również wstępna, niskorozdzielcza identyfikacja miejsca wiązania, na podstawie eksperymentów śledzących zmiany przesunięć chemicznych w obrębie makromolekuły, wywołane obecnością liganda [49]. Wreszcie, w przypadku tworzenia specyficznego wiązania między ligandem, a biomolekułą, możliwy jest pomiar odległości między atomami tworzącymi kompleks poprzez efekt NOE, a w konsekwencji wyznaczenie struktury trójwymiarowej kompleksu.

Obecnie techniki biologii strukturalnej coraz częściej wspomagane są metodami obliczeniowymi, co istotnie przyspiesza proces opracowania nowych leków. Algorytmy uczenia maszynowego wykorzystują dane strukturalne do przewidywania interakcji lek – cel, a także lek – komórka, umożliwiając, np. szacowanie właściwości związków przed wprowadzeniem do modeli zwierzęcych [50]. Należy również podkreślić, że narzędzia dostarczane przez biologię strukturalną znajdują zastosowanie również przy projektowaniu innych cząsteczek aktywnych biologicznie, takich jak na przykład herbicydy [51-56].

Istnieje szerokie spektrum zastosowań strategii opartych na biologii strukturalnej w projektowaniu leków i innych związków aktywnych biologicznie. Dotyczy to zarówno zrozumienia mechanizmów chorób, projektowania leków o zwiększonej skuteczności i zmniejszonych efektach ubocznych, a także rozwoju terapii celowanych.

PODSUMOWANIE

Biologia strukturalna to nauka niezwykle interdyscyplinarna. Jej rozkwit umożliwiony został przez postępy w biologii molekularnej, chemii, fizyce i informatyce. Dzięki temu możliwe było opracowanie szeregu metod eksperymentalnych, bazujących na różnych fizycznych fenomenach. Przedstawione metody są w stosunku do siebie komplementarne, umożliwiając badania wszystkich rodzajów biocząsteczek. To właśnie komplementarność krystalografii, cryoEM, spektroskopii NMR i metod obliczeniowych poka-

zuje, że o prawdziwej mocy badań strukturalnych stanowi wdrażanie metodologii skombinowanych. Co więcej, badania strukturalne cząsteczek biologicznych z jednej strony posilują się odkryciami dokonanymi w innych obszarach, a z drugiej inspirują kolejne.

Zaprezentowane przykłady metod stosowanych w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk pokazują dobitnie, że biologia strukturalna była, jest i będzie jednym z jego naukowych filarów. Poznawanie struktur biocząsteczek napędzają ekscytacja i naukowa satysfakcja, każdorazowo towarzyszące rozwiązaniu struktury. Dotychczasowe odkrycia motywują do kolejnych, otwierając nowe perspektywy, jednocześnie przesuując ograniczenia metod. W efekcie możliwe jest otrzymanie coraz pełniejszego obrazu funkcjonowania zarówno zdrowych, jak i chorych komórek na poziomie molekularnym. Wiele terapii zostało opracowanych dzięki wdrożeniu biologii strukturalnej, a ciągły rozwój pozwala z nadzieją patrzeć w przyszłość.

PIŚMIENNICTWO

- Kepler J (1611) *Strena seu de Nive Sexangula*, Frankfurt
- Hunefeld FL (1840) *Der Chemismus in der thierischen Organisation*, Leipzig
- Kendrew JC, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958) A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* 181(4610): 662-666
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356): 737-738
- IUCR. <https://www.iucr.org/people/nobel-prize>
- Atkins PW (2002) *Podstawy Chemii Fizycznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M (2008) Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 275(1): 1-21
- Saibil HR (2022) Cryo-EM in molecular and cellular biology. *Mol Cell* 82(2): 274-284
- PDB. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>
- Nakane T, Kotecha A, Sente A, McMullan G, Masiulis S, Brown P, Grigoras IT, Malinauskaite L, Malinauskas T, Miehling J, Uchanski T, Yu LB, Karia D, Pechnikova EV, de Jong E, Keizer J, Bischoff M, McCormack J, Tiemeijer P, Hardwick SW, Chirgadzhe DY, Murshudov G, Aricescu AR, Scheres SHW (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature* 587(7832): 152-156
- Pogozheva ID, Mosberg HI, Lomize AL (2014) Life at the border: adaptation of proteins to anisotropic membrane environment. *Protein Sci* 23(9): 1165-1196
- Lee HJ, Lee HS, Youn T, Byrne B, Chae PS (2022) Impact of novel detergents on membrane protein studies. *Chem* 8(4): 980-1013
- Rouck JE, Krapf JE, Roy J, Huff HC, Das A (2017) Recent advances in nanodisc technology for membrane protein studies (2012-2017). *FEBS Lett* 591(14): 2057-2088
- Gusach A, Garcia-Nafria J, Tate CG (2023) New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures. *Curr Opin Struct Biol* 80: 102574
- Zhang Z, Johnson RM, Drulyte I, Yu L, Kotecha A, Danev R, Wootten D, Sexton PM, Belousoff MJ (2021) Evolving cryo-EM structural approaches for GPCR drug discovery. *Structure* 29(9): 963-974
- Lerner E, Barth A, Hendrix J, Ambrose B, Birkedal V, Blanchard SC, Borner R, Sung Chung H, Cordes T, Craggs TD, Deniz AA, Diao J, Fei J, Gonzalez RL, Gopich IV, Ha T, Hanke CA, Haran G, Hatzakis NS, Hohng S, Hong SC, Hugel T, Ingargiola A, Joo C, Kapanidis AN, Kim HD, Laurence T, Lee NK, Lee TH, Lemke EA, Margat E, Michaelis J, Michalet X, Myong S, Nettels D, Peulen T, Ploetz E, Razvag Y, Robb NC, Schuler B, Soleimaninejad H, Tang C, Vafabakhsh R, Lamb DC, Seidel CA, Weiss S (2021) FRET-based dynamic structural biology: Challenges, perspectives and an appeal for open-science practices. *eLife* 10: e60416
- Perrino AP, Miyagi A, Scheuring S (2021) Single molecule kinetics of bacteriorhodopsin by HS-AFM. *Nat Commun* 12(1): 7225
- Duss O, Lukavsky PJ, Allain FH (2012) Isotope labeling and segmental labeling of larger RNAs for NMR structural studies. *Adv Exp Med Biol* 992: 121-144
- Lapinaite A, Simon B, Skjaerven L, Rakwalska-Bange M, Gabel F, Carlomagno T (2013) The structure of the box C/D enzyme reveals regulation of RNA methylation. *Nature* 502(7472): 519-523
- Keane SC, Heng X, Lu K, Kharytonchyk S, Ramakrishnan V, Carter G, Barton S, Hoscic A, Florwick A, Santos J, Bolden NC, McCowin S, Case DA, Johnson BA, Salemi M, Telesnitsky A, Summers MF (2015) Structure of the HIV-1 RNA packaging signal. *Science* 348(6237): 917-921
- Ruschak AM, Kay LE (2012) Proteasome allostery as a population shift between interchanging conformers. *Proc Natl Acad Sci* 109(50): E3454-E3462
- Phan AT, Modi YS, Patel DJ (2004) Two-repeat telomeric d(TGGGGT-TGGGGT) sequence interconverts between asymmetric dimeric G-quadruplexes in solution. *J Mol Biol* 338(1): 93-102
- Adrian M, Heddi B, Phan AT (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods* 57(1): 11-24
- Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, Schwalbe H (2003) NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem* 4(10): 936-962
- Wuthrich K (1990) Protein-Structure Determination in Solution by NMR-Spectroscopy. *J Biol Chem* 265(36): 22059-22062
- Sugiki T, Kobayashi N, Fujiwara T (2017) Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Comp Struct Biotechnol J* 15: 328-339
- Güntert P (1998) Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys* 31(2): 145-237
- Marusic M, Schlagnitweit J, Petzold K (2019) RNA Dynamics by NMR Spectroscopy. *ChemBioChem* 20(21): 2685-2710
- Zhang Q, Stelzer AC, Fisher CK, Al-Hashimi HM (2007) Visualizing spatially correlated dynamics that directs RNA conformational transitions. *Nature* 450(7173): 1263-1267
- Geng A, Ganser L, Roy R, Shi HL, Pratihar S, Case DA, Al-Hashimi HM (2023) An RNA excited conformational state at atomic resolution. *Nat Commun* 14(1): 8432
- Backe PH, Messias AC, Ravelli RBC, Sattler M, Cusack S (2005) X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure* 13(7): 1055-1067
- Zok T, Antczak M, Zurkowski M, Popenda M, Blazewicz J, Adamiak RW, Szachniuk M (2018) RNApdbee 2.0: multifunctional tool for RNA structure annotation. *Nucl Acids Res* 46(W1): W30-W35
- Adamczyk B, Zurkowski M, Szachniuk M, Zok T (2023) WebTetrado: a webserver to explore quadruplexes in nucleic acid 3D structures. *Nucl Acids Res* 51(W1): W607-W612
- Zurkowski M, Zok T, Szachniuk M (2022) DrawTetrado to create layer diagrams of G4 structures. *Bioinformatics* 38(15): 3835-3836
- Popenda M, Szachniuk M, Blazewicz M, Wasik S, Burke EK, Blazewicz J, Adamiak RW (2010) RNA FRABASE 2.0: an advanced web-accessible database with the capacity to search the three-dimensional fragments within RNA structures. *BMC Bioinformatics* 11: 231
- Zok T, Kraszewska N, Miskiewicz J, Pielacinska P, Zurkowski M, Szachniuk M (2022) ONQUADRO: a database of experimentally determined quadruplex structures. *Nucl Acids Res* 50(D1): D253-D258
- Adamczyk B, Antczak M, Szachniuk M (2022) RNAsolo: a repository of cleaned PDB-derived RNA 3D structures. *Bioinformatics* 38(14): 3668-3670
- Luwanski K, Hlushchenko V, Popenda M, Zok T, Sarzynska J, Martisch D, Szachniuk M, Antczak M (2022) RNAspider: a webserver to

- analyze entanglements in RNA 3D structures. *Nucl Acids Res* 50(W1): W663-W669
39. Renaud JP (2020) *Structural Biology in Drug Discovery Methods, Techniques, and Practices* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
 40. Vologzhanina AV, Ushakov IE, Korlyukov AA (2020) Intermolecular Interactions in Crystal Structures of Imatinib-Containing Compounds. *Int J Mol Sci* 21(23): 8970
 41. Sacha T (2014) Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 6(1): e2014007
 42. Patel D, Bauman JD, Arnold E (2014) Advantages of crystallographic fragment screening: Functional and mechanistic insights from a powerful platform for efficient drug discovery. *Prog Biophys Mol Bio* 116(2-3): 92-100
 43. Humbert O, Davis L, Maizels N (2012) Targeted gene therapies: tools, applications, optimization. *Crit Rev Biochem Mol* 47(3): 264-281
 44. Kou F, Wu L, Ren XB, Yang LL (2020) Chromosome Abnormalities: New Insights into Their Clinical Significance in Cancer. *Mol Ther Oncolytics* 17: 562-570
 45. Pandurangan AP, Ascher DB, Thomas SE, Blundell TL (2017) Genomes, structural biology and drug discovery: combating the impacts of mutations in genetic disease and antibiotic resistance. *Biochem Soc Trans* 45(2): 303-311
 46. Wu KJY, Tresco BIC, Ramkissoon A, Aleksandrova AV, Syroegin EA, See DNY, Liow P, Dittmore GA, Yu M, Testolin G, Mitcheltree MJ, Liu RY, Svetlov MS, Polikanov YS, Myers AS (2024) An antibiotic pre-organized for ribosomal binding overcomes antimicrobial resistance. *Science* 383(6684): 721-726
 47. Gossert AD, Jahnke W (2016) NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules. *Prog Nucl Mag Res Sp* 97: 82-125
 48. Dalvit C, Gmur I, Rössler P, Gossert AD (2023) Affinity measurement of strong ligands with NMR spectroscopy: Limitations and ways to overcome them. *Prog Nucl Mag Res Sp* 138-139: 52-69
 49. Shortridge MD, Varani G (2021) Efficient NMR Screening Approach to Discover Small Molecule Fragments Binding Structured RNA. *ACS Med Chem Lett* 12(8): 1253-1260
 50. Waman VP, Sen N, Varadi M, Daina A, Wodak SJ, Zoete V, Velankar A, Orengo C (2021) The impact of structural bioinformatics tools and resources on SARS-CoV-2 research and therapeutic strategies. *Brief Bioinform* 22(2): 742-768
 51. Ruzzkowski M (2018) Guarding the gateway to histidine biosynthesis in plants: *Medicago truncatula* ATP-phosphoribosyltransferase in relaxed and tense states. *Biochem J* 475(16): 2681-2697
 52. Ruzzkowski M, Dauter Z (2016) Structural Studies of *Medicago truncatula* Histidinol Phosphate Phosphatase from Inositol Monophosphatase Superfamily Reveal Details of Penultimate Step of Histidine Biosynthesis in Plants. *J Biol Chem* 291(19): 9960-9973
 53. Ruzzkowski M, Dauter Z (2017) Structures of *Medicago truncatula* L-Histidinol Dehydrogenase Show Rearrangements Required for NAD(+) Binding and the Cofactor Positioned to Accept a Hydride. *Sci Rep* 7(1): 10476
 54. Ruzzkowski M, Forlani G (2022) Deciphering the structure of *Arabidopsis thaliana* 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase: An essential step toward the discovery of novel inhibitors to supersede glyphosate. *Comput Struct Biotechnol J* 20: 1494-1505
 55. Rutkiewicz M, Nogues I, Witek W, Angelaccio A, Contestabile R, Ruzzkowski M (2023) Insights into the substrate specificity, structure, and dynamics of plant histidinol-phosphate aminotransferase (HISN6). *Plant Physiol Biochem* 196: 759-773
 56. Witek W, Sliwiak J, Ruzzkowski M (2021) Structural and mechanistic insights into the bifunctional HISN2 enzyme catalyzing the second and third steps of histidine biosynthesis in plants. *Sci Rep* 11(1): 9647
 57. Andralojc W, Wieruszewska J, Pasternak K, Gdaniec Z (2022) Solution Structure of a Lanthanide-binding DNA Aptamer Determined Using High Quality pseudocontact shift restraints. *Chem Eur J* 28(66): e2022021

Advancements in Structural Biology – How to See Molecules of Life?

Wojciech Witek¹, Wiktoria Ragin¹, Ha Linh Tran¹, Ewa Połomska², Mikołaj Podlewski², Aleksandra Pawłowicz², Aleksandra Cioch-Biniaś², Amadeusz Woś², Witold Andrałojć², Marta Szachniuk³, Miłosz Ruskowski¹✉

¹Department of Structural Biology of Eukaryotes, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

²Department of Biomolecular NMR, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

³Department of Structural Bioinformatics, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding author: mruszkowski@ibch.poznan.pl

Keywords: structural biology, crystallography, cryogenic electron microscopy, nuclear magnetic resonance, computational biology

ABSTRACT

Structural biology is focused on understanding the architecture of biomolecules, such as proteins and nucleic acids. Deciphering the structure helps to understand their function in the cell at a very precise – molecular level. This makes it possible to not only determine the basis of diseases but also to propose therapeutic strategies and tools. Such a strong motivation for the development of structural biology has led to the development of a number of methods, which enable determination of the structures of the molecules of life. The continuous progress has been enabled by the integration of biology, chemistry, physics, and computer science, making structural biology extremely interdisciplinary. In its 35-year history, the Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences in Poznan has become one of the key Polish institutions conducting research in the field of structural biology. On one hand, the research has brought international recognition, and on the other hand, it has forced the implementation and development of cutting-edge methods. This review discusses the methods used in structural biology at the Institute.

