

# PROGRAMA Y CRONOGRAMA

## Criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X en la frontera de la biología estructural

Centro de Microscopías Avanzadas CMA (FCEN-UBA)  
26 de agosto al 6 de septiembre de 2018  
Buenos Aires

### Modalidad

Teórico-Problemas: 60 hs  
Laboratorio: 20 hs  
Horario: Lu - Vi 9 a 18 hs

### Aprobación

Examen teórico al final del curso.

### Unidad 1. Estructura y Función de Biomoléculas

Biología Estructural y Biotecnología. Técnicas y resultados de la Biología Estructural. Niveles de organización estructural de las biomoléculas. Importancia biológica del agua. Interacciones no covalentes en medio acuoso. Ionización del agua, equilibrio iónico y sistemas reguladores. Estructura y propiedades de los aminoácidos. Estereoisomería y comportamiento ácido-base. Péptidos y enlace peptídico. Análisis de la composición de aminoácidos y de la secuencia de las proteínas. Introducción a las técnicas de purificación y caracterización de proteínas. Uso de las secuencias de proteínas para el análisis de relaciones evolutivas. Caracterización estructural de macromoléculas. Métodos espectroscópicos y sus aplicaciones: espectroscopía de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular, infrarrojo, espectrometría de masas. Determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas mediante resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X.

### Unidad 2. Cristalografía

#### Redes y Celdas Elementales

Redes, vectores translación, redes centradas, parámetros de red, celdas elementales, celda reducida (Niggli), simetría de redes, coordenadas atómica, ejemplos de estructuras simples: cobre, hierro, magnesio.

#### Direcciones y Planos cristalográficos.

Idea intuitiva a partir de la forma externa cristalina, planos cristalinos, ley de los índices racionales, índices de Miller, direcciones, ejes de zona, familias de planos y el espaciado interplanar: índices de Bragg, la red recíproca y algunas de sus propiedades.

#### Elementos y Operaciones de simetría puntuales

Elementos de simetría puntual: centro de inversión, plano especular, ejes de rotación, ejes de inversión, notación, combinación de elementos, los grupos puntuales, aplicaciones a los poliedros de coordinación (tetraedro, octaedro y cubo) y moléculas simples (benceno y metano).

#### Elementos y Operaciones de simetría cristalinos

Elementos de simetría con traslación, restricciones, planos con deslizamiento, ejes roto-translacionales, el plano con deslizamiento "d", redes de Bravais, sistemas cristalinos, grupos espaciales, representación, símbolos y notación, lectura de tablas e interpretación, la unidad asimétrica, relación entre V, Z y  $\rho$ , derivación de las coordenadas atómicas, las posiciones especiales, ejemplos y aplicaciones.

### Unidad 3. Difracción

Fuentes de radiación

Generación de rayos X, espectro discreto y continuo, fenómeno de absorción y filtros, generadores de tubo sellado y ánodo rotatorio, sincrotrón. Otras fuentes: electrones y neutrones.

Dispersión (*Scattering*) de ondas

Interferencia entre ondas (dispersión coherente e incoherente), redes de difracción, difracción por un cristal, enfoque de Bragg y Laue-Ewald, factor de forma atómico, factor de estructura, dispersión anómala, la re-aparición de la red recíproca, simetrías en la distribución de intensidades: grupos de Laue.

La experiencia de difracción por material cristalino

Difracción por muestras mono y poli-cristalinas, técnicas experimentales e instrumentos usuales, ventajas comparativas de cada método, factor de Lorentz-polarización, el problema de las fases: relación entre factor de estructura e intensidad, relación entre fases y coordenadas atómicas, cálculo de densidad electrónica.

Cristales reales

Efectos térmicos: factor de Debye-Waller, fenómeno de extinción primaria y secundaria, simetrías en la distribución de intensidades: regla de Friedel, pares de Bijvoet, aplicaciones en la determinación de la estructura absoluta.

#### Unidad 4. Obtención de cristales

Nucleación primaria y secundaria. Efectos de las impurezas presentes. Crecimiento de cristales.

#### Unidad 5: Resolución y refinamiento de estructuras cristalinas

Métodos directos: multi-solución y adición simbólica.

Métodos de Fourier: Cálculo de la densidad electrónica, síntesis de Fourier, síntesis de Fourier diferencias. Diferencia en la determinación de las posiciones de los átomos pesados. Las diferencias cruzadas de Fourier. La dispersión anómala y su uso en la solución del problema de la fase. Método de la sustitución isomorfa múltiple

Métodos en el espacio recíproco: métodos de átomo pesado, función de Patterson. Significado físico. Ejemplos de cálculo La síntesis de la diferencia de Patterson. Determinación de la posición de los átomos pesados en la celda unidad mediante el uso de la diferencia de Patterson. Resolución del problema de la fase por remplazo molecular. Función de rotación y de traslación. Simetría no-cristalográfica. Interpretación de los mapas de densidad electrónica.

Refinamiento de la estructura. El refinamiento de las fases. El método MAD. Cuerpo rígido. *Constrained y restrained*. Uso de términos geométricos y energéticos en el refinamiento. Teoría de Cuadrados Mínimos, Aplicación a monocristales. Clase Práctica. Procesamiento de Datos, construcción del modelo y refinado.

#### Unidad 6. Análisis de Resultados

Resultados directos y derivados. Evaluación de la calidad de los datos reportados.

#### Unidad 7. Microscopía electrónica tridimensional

Introducción al concepto de partícula única. Métodos de microscopía electrónica con tinción negativa y en condiciones criogénicas (CryoEM). Plataformas para experimentos de CryoEM. Equipamiento necesario. Automatizaciones.

#### Unidad 8. El microscopio de transmisión electrónica.

Generadores de electrones, lentes, columnas, cámaras de muestras, filtros de energía, detectores, sistemas de vacío.

### Unidad 9. Preparación de las muestras y colecta de datos.

Tipos de grillas y soportes. Preparación de las grillas a temperatura ambiente y en condiciones criogénicas. Montado de las muestras en microscopio. Alineamiento. Configuración de parámetros. Limitaciones de dosis. Heterogeneidad.

### Unidad 10. Formación de la imagen

Transformada de Fourier y espacio recíproco. Contraste de amplitudes y fases. Función de transferencia de contraste (CTF). Desenfoque y su efecto. Filtros.

### Unidad 11. Procesamiento y análisis de datos

Pretratamiento de las micrografías. Alineamiento de las películas. Corrección de la cámara y anisotropía. Corrección del CTF. Selección de partículas. Centrado. Alineamiento. Clasificación 2D. Máscaras. Reconstrucción angular y proyecciones. Clasificación 3D. Heterogeneidad. Desorden estructural. Refinamiento. Construcción del modelo. Validación. Interpretación del modelo atómico. Depósito en bancos de datos (EM y PDB).

### **Bibliografía**

- o Liljas, A, Liljas, L., Piskur, J., Lindblom, G., Nissen, P & Kjeldgaard, M. (2009) Textbook of Structural Biology. World Scientific Publishing Singapore.
- o Branden, C. & Tooze, J. (1999) Introduction to Protein Structure. Second Edition. Garland Publishing, Inc., New York.
- o Rupp, B. (2010) Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology. Garland Science New York.
- o Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) Biophysical Chemistry Volume 2. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- o Giacovazzo, C. (Editor) (1992) Fundamentals of Crystallography. Oxford University Press, Oxford.
- o McPherson, A. (1999) Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- o Rafael Fernandez-Leiro & Sjors H. W. Scheres (2016) Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. Nature volume 537, pages 339–346.
- o Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., & Walz, T. (2015). A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy. Cell, 161(3), 438–449.
- o Frank, J. (2018). New Opportunities Created by Single-Particle Cryo-EM: The Mapping of Conformational Space. Biochemistry, 57(6), 888–888.
- o Des Georges, A., Clarke, O. B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K. J., Grassucci, R. A., Wayne A. Hendrickson, Andrew R. Marks and Frank, J. (2016). Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. Cell, 167(1), 145–157.
- o Pablo Conesa Mingo, Jose Gutierrez, Adrián Quintana, José Miguel de la Rosa Trevín, Airen Zaldívar-Peraza, Jesus Cuenca Alba, Mohsen Kazemi, Javier Vargas, Laura del Cano, Joan Segura, Carlos Oscar S. Sorzano, and Jose María Carazo (2018) Scipion web tools: Easy to use cryo-EM image processing over the web. Protein Science, 27(1), 269-275.
- o J Gómez-Blanco, José Miguel de la Rosa-Trevín, R Marabini, L Del Cano, A Jiménez, M Martínez, R Melero, T Majtner, D Maluenda, J Mota, Y Rancel, E Ramírez-Aportela, JL Vilas, Marta Carroni, Stefan Fleischmann, Erik Lindahl, AW Ashton, M Basham, DK Clare, K Savage, CA Siebert, GG Sharov, COS Sorzano, P Conesa, JM Carazo (2018) Using Scipion for stream image processing at Cryo-EM facilities. Journal of structural biology 204 (3), 457-463.

## CRONOGRAMA

Criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X en la frontera de la biología estructural  
 Centro de Microscopías Avanzadas CMA (FCEN-UBA)  
 26/08 al 6/09 de 2018

SEMANA 1	Lunes 26/08	Martes 27/08	Miércoles 28/08	Jueves 29/08	Viernes 30/08
<b>Mañana (9 – 13)</b>	* Presentación del curso (Teórica 0)  * Introducción Histórica Cristalografía y Cryo EM (Teórica 1) <b>JM CARAZO GARCÍA</b>	*Estructura y Función de proteínas (Teórica 2)  *Expresión de proteínas (Teórica 3)	* El microscopio electrónico * Preparación de las muestras (Cryo-EM, Negative staining) * Colecta de datos (Teórica 5) <b>JM CARAZO GARCÍA</b>	* Procesado de datos CryoEM (Teórica 6) <b>JM CARAZO GARCÍA</b>	TP2 – Procesado de imágenes en SCIPION hasta obtención de mapa (computadoras) <b>JM CARAZO GARCÍA</b>
<b>Tarde (14 – 18)</b>	Presentación poster de las tareas de investigación de los participantes	* Introducción a TEM (Negative staining, Cryo-EM) * Instalaciones europeas * Programas de financiación (i-NEXT, INSTRUCT, etc) * Ejemplos de estructuras (Teórica 4) <b>A PODJARNY</b>	TP1 - Preparación de muestra tinción negativa y colección de datos (CMA-FCEN) <b>M BORGNA</b> Preparación de muestra Cryo-EM y colección de datos (virtual-ESPAÑA)	* Procesado de datos CryoEM (Teórica 7) <b>JM CARAZO GARCÍA</b>	RMN (Teórica 8)  Bioinformática (Teórica 9)  Nanobodies (Teórica 10)

## CRONOGRAMA

Criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X en la frontera de la biología estructural  
 Centro de Microscopías Avanzadas CMA (FCEN-UBA)  
 26/08 al 6/09 de 2018

SEMANA 2	Lunes 2/09	Martes 3/09	Miércoles 4/09	Jueves 5/09	Viernes 6/09
<b>Mañana (9 – 13)</b>	* Introducción a la Cristalografía * Simetría * Red directa y reciproca (Teórica 11)	* Introducción a la Determinación Estructural de Proteínas * Mapas de densidad electrónica (Teórica 13)	TP3 – Cristalización de Lisozima	* Modelado y refinamiento RX (Teórica 15)  Tutorial T TERWILLIGER	Validación (Teórica 17) T TERWILLIGER * Deposito de las estructuras en bases de datos (PDB, EMDatabank) (Teórica 17) (A PODJARNY / T TERWILLIGER / M BORGNA)
<b>Tarde (14 – 18)</b>	* Rayos X y difracción * Dispersión Anómala * Función de Patterson * Métodos de resolución (Teórica 12)	* Cristalización de proteínas * Estrategias de medición * Difractómetro/ Sincrotrón (Teórica 14)	TP4 - Selección y Medición de Cristales  TP5- Resolución estructural- procesado de datos de difracción (Demostrativa)	* Modelado y refinamiento CryoEM (Teórica 16)  Tutorial T TERWILLIGER	Mesa redonda CryoEM y cristalografía de RX en América Latina: en la frontera de la biología estructural Repaso General (1 hs)  Examen Final (16 – 18 hs)