

# Synchrotronem k léčivům: modeluj si sám

Emma Bielokostolská, Tereza Hladíková  
Bilingválne gymnázium Milana Hodžu, Sučany, SK  
První soukromé jazykové gymnázium, Hradec Králové, CZ  
e.bielokostolska@gmail.com  
hladikova.tereza@psjg-hk.cz

## Abstrakt:

Monokrystalová strukturní analýza představuje nejdůležitější metodu určování 3D struktur biologicky aktivních makromolekul. Výsledky těchto analýz nacházejí uplatnění v širokém rozsahu oborů od lékařství, farmacie, potravinářství po nanobiotechnologie. Naše práce se zabývá modelováním makromolekul na základě difrakčních dat, získaných ze synchrotronu. Výsledky předložené práce poskytují náhled na mechanismus vazby ligandu do aktivního místa enzymu a pomáhají lépe pochopit způsob aktivity enzymu. Na základě těchto výsledků lze navrhnout efektivnější variantu ligandu. Tento strukturně orientovaný přístup se převážně používá při návrhu a testování léčiv.

## 1 Úvod

Synchrotron je typ kruhového urychlovače částic (převážně elektronů, pozitronů), který byl vyvinut v padesátých letech dvacátého století Luisem Walterem Alvarezem pro široké spektrum fyzikálních analytických technik. Urychlované elektrony necháváme vyzářit v širokém vlnovém spektru pomocí ohybu trajektorie magnetickým polem. Zkoumání struktur synchrotronem je velmi přesné.

Strukturní biologie využívá synchrotronu a jeho parametrů pro zkoumání atomární 3D struktury biologicky aktivních molekul, které jsou před experimentem uvedeny do krystalického stavu. Záření je rozptylováno krystalovou mříží a vytváří obrazce v podobě soustavy teček na detektoru. Soustavu naměřených snímků nazýváme *difrakční data*. Intenzita jednotlivých teček a jejich poloha je obrazem vnitřní (elektronové) struktury zkoumané bílkoviny. Difrakční data jsou prve zintegrována (odečet intenzit na detektoru), dále seškalována (srovnání a zprůměrování jednotlivých reflexí) a převedena na strukturní faktory.

K rekonstrukci rozložení elektronů v prostoru (tzv. fázový problém) se v případě znalosti podobné molekuly využívá její strukturní znalost pro první nepřesný odhad rekonstrukce elektronové hustoty.

Takto získaná strukturní data jsou nezastupitelná při analýze funkcí zkoumaných proteinů. V současné době například pomáhají při vývoji léčiv a pochopení nitrobuněčných procesů.

## 2 Metody

Měřeným objektem je zkrystalizovaný enzym z parazitického organismu, který je aktivní na nukleových kyselinách. Difrakční data, která byla naměřena na synchrotronu Bessy II. v Německu na měřicím stanovišti 14.2 v roce 2015. Data byla zpracována pomocí programu iMOSFLM a seškálována programem AIMLESS. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení programem Phaser. Model byl dále přebudován programem ARP/wARP a dále upřesňován programem REFMAC5 a manuálně upravován v COOT. Všechny uvedené software patří do balíku CCP4[1].

## 3 Výsledky

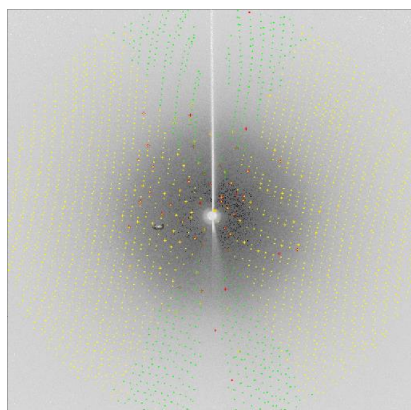
Difrakční data byla zpracována nejprve s plným rozlišením, které nám umožňovalo experiment (1,6 Å). Z analýzy statických údajů bylo zjištěno, že ve vysokém rozlišení byl pozorován nedostatečný signál. Abychom do souboru konečných měření nezanášely nepřesné výsledky, bylo rozlišení třeba omezit na hodnotu 1,8 Å. Parametry krystalu a zpracování dat jsou uvedeny v tabulce č. 1. Reprezentativní difrakční snímek je uveden na obrázku č. 1.

Tabulka 1: Parametry krystalu a experimentu

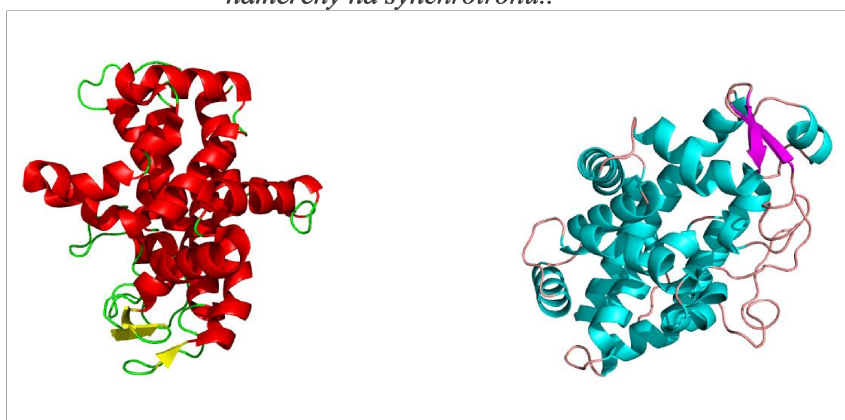
Prostorová grupa	P2 <sub>1</sub>
a, b, c [Å]	41,65; 62,31; 47,98
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	90°, 106,79°, 90°
Signál(I)/šum( $\sigma$ )	9,0
Korelační koeficient	0,994
R faktor	0,101

Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení pomocí struktury z PDB databáze [2] s PDB kódem 3SNG. Model molekuly byl následně přebudován podle zadané aminokyselinové sekvence programem ARP/wARP. Tímto krokem se podařilo vylepšit shodu modelu s experimentem z počáteční hodnoty R faktoru 0,51 na hodnotu 0,20. Výchozí a konečná struktura jsou uvedeny na obrázku č. 2.

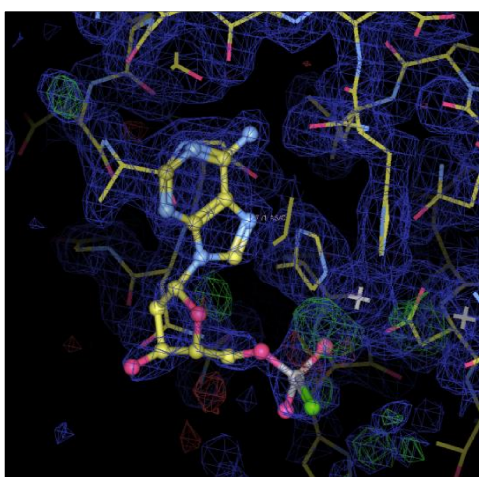
Kromě enzymů byla pozorována tři maxima elektronové hustoty, jenž náležela iontům zinku, které se podílí na aktivitě enzymu. V mapách elektronové hustoty však byla patrná oblast, která nenáležela enzymu, ale další nízkomolekulární sloučenině, která je navázána v aktivním místě. Tato oblast byla modelována jako ligand 2-deoxy-adenosin-5'-thiomonofosfát. Celková struktura enzymu v komplexu s ligandem a detail vazby ligandu s pozorovanou elektronovou hustotou je uvedena na obrázku č. 3. Celková sekundární struktura enzymu s ligandem je uvedena na obrázku č. 4.



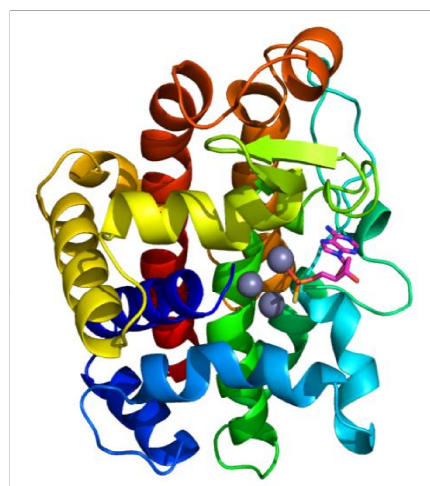
*Obrázek 1: Difrakční snímek krystalu zkoumaného enzymu naměřený na synchrotronu..*



*Obrázek 2: Počáteční a výsledná struktura enzymu v reprezentaci sekundárních struktur.*



*Obrázek 3: Pozorovaná elektronová hustota nízkomolekulárního ligandu v aktivním místě enzymu.*



*Obrázek 4: Celková struktura enzymu v reprezentaci sekundární struktury s ligandem (tyčinkový model).*