

Synchrotronem k léčivům: modeluj si sám

Soňa Burešová, Gymnázium Jaroslava Heyrovského, Praha,
sonka.buresova@gmail.com

Kristína Szabová, Gymnázium, Varšavská cesta 1, Žilina,
k.szabova98@gmail.com

Vladimír Lukačko, Gymnázium, Varšavská cesta 1, Žilina,
v.lukacko1@gmail.com

Abstrakt:

Enzymy jsou jedny z nejdůležitějších látek v lidském těle. Jestliže se nám podaří zjistit jejich strukturu, můžeme lépe pochopit jejich vlastnosti a způsob, kterým interagují s ostatními molekulami. My jsme zvolili metodu monokrystalické difrakce na urychlovači synchrotronu. Na základě difrakčních dat jsme určili strukturu enzymu i léčiva navázaného do aktivního centra enzymu.

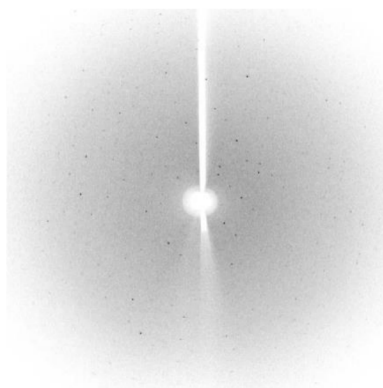
1 Úvod

Cílem našeho miniprojektu bylo zjistit strukturu enzymu nukleasy z difrakčních dat monokrystalu. Tato data byla naměřena na synchrotronu Bessy II v Berlíně. Synchrotron je kruhový urychlovač částic, převážně elektronů nebo pozitronů. Tyto částice se urychlí na rychlost blízkou rychlosti světla a získají velkou energii. Zakřivením trajektorie urychlovaných částic lze tuto energii využívat ke strukturnímu studiu.

2 Výsledky

Synchrotron se skládá ze tří částí: lineárního urychlovače, boosteru a kruhového prstence. Po obvodu celého synchrotronu se nachází speciální měřicí stanoviště vybavená různými detektory. Zkrystalizovaný enzym zde byl ozářen elektromagnetickým zářením. Krystaly se používají kvůli své opakující se struktuře. Na jednotlivých atomech dochází k rozptylu svazku. Dopadem svazku na krystal se vytvoří difrakční obrazec, který je zaznamenán na pozičně citlivém detektoru. S krystalem otáčíme, abychom získali informace o vnitřní struktuře v podobě difrakčních dat ze všech úhlů.

Pomocí programu iMOSFLM¹ jsme získaná data zpracovali a identifikovali dvoučetnou symetrii. Aby byly výsledky průkaznější, museli jsme změnit rozlišení na 1,8 Å. Výsledky ze zpracování dat jsou uvedeny v tabulce 1. Reprezentativní difrakční snímek je uveden v obrázku 1.

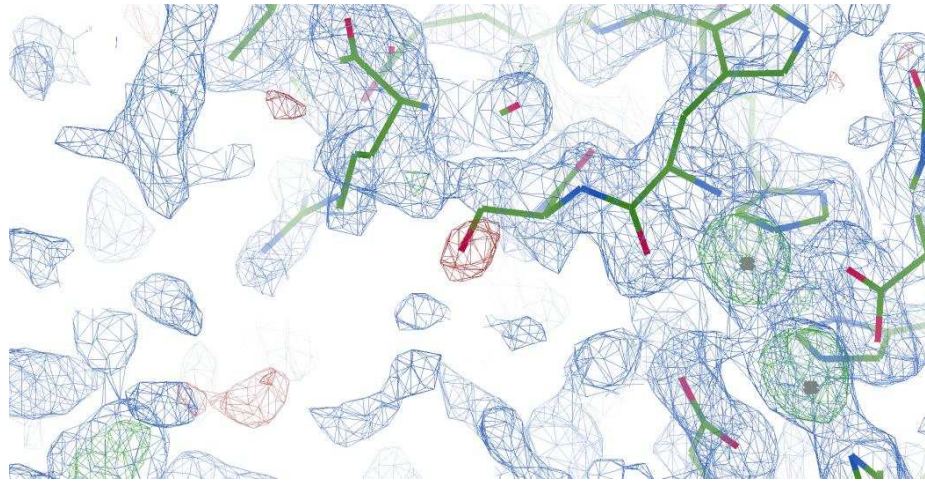


Obrázek 1: Vzorek difrakčních dat

Result			
Summary data for Project: New Crystal: New Dataset: New			
	Overall	InnerShell	OuterShell
Low resolution limit	45.93	45.93	1.84
High resolution limit	1.80	9.00	1.80
Rmerge (within I+/I-)	0.106	0.028	0.642
Rmerge (all I+ and I-)	0.121	0.037	0.702
Rmeas (within I+/I-)	0.144	0.039	0.861
Rmeas (all I+ & I-)	0.142	0.044	0.820
Rpim (within I+/I-)	0.096	0.027	0.569
Rpim (all I+ & I-)	0.073	0.024	0.420
Rmerge in top intensity bin	0.041	-	-
Total number of observations	79931	650	4606
Total number unique	21872	192	1269
Mean(I)/sd(I)	9.1	23.9	2.1
Mn(I) half-set correlation CC(1/2)	0.994	0.997	0.645
Completeness	100.0	99.7	100.0
Multiplicity	3.7	3.4	3.6

Tabulka 1: Výsledky zpracování dat

Struktura byla vyřešena metodou molekulárního nahrazení pomocí struktury podobného enzymu multifunkční nukleasy TBN1 z rajčete². Celý následný proces řešení struktury byl monitorován na hodnotách takzvaného R faktoru. Startovací hodnoty R/R free byly 0,51/0,51. V mapě elektronové hustoty byly nalezeny nesrovnalosti modelu s experimentem, proto byl využit program ARP/wARP³ k automatickému vylepšení modelu s cílem zvýšit shodu modelu s experimentem. Po tomto kroku hodnoty R/R free klesly na 0,24/0,27. Dále jsme museli programem vylepšený model manuálně upravit, například změnit polohu atomů, které nesouhlasily s mapou elektronové hustoty, nebo nahradit chybně určenou aminokyselinu správnou. Rovněž byly lokalizovány tři ionty zinku, které se podílí na tvorbě aktivního místa (R/R free – 0,21/0,23).



Obrázek 2: Nesrovnalosti modelu s experimentem

Závěrem byl lokalizován ligand (potenciální léčivo) ve zbývající mapě elektronové hustoty, byly namodelovány zbývající molekuly vody. Výsledný R/R free nám vyšel 0,16/0,20. Tyto hodnoty nejsou absolutními, závisí na konkrétní struktuře, ale obecným cílem signalizujícím správnost modelu je hodnota nižší než 0,20.



Obrázek 3: Výsledná struktura enzymu

3 Shrnutí

Monokrystalová strukturní analýza je velmi důležitý způsob zjišťování struktury bílkovin. Využívá se při vývoji nových materiálů, nanotechnologií, ale také nových léčiv. Téměř každé léčivo produkované farmaceutickými firmami bylo vyvinuto na základě této analytické metody. Na tuto aplikaci jsme se zaměřili a našli jsme léčivo deaktivující enzym nukleázu.

Poděkování

Rádi bychom tímto poděkovali Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D z Katedry inženýrství pevných látek Fakulty jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT za odborný dohled a pomoc při experimentu.

Reference

- [1] M. D. Winn et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta. Cryst.* D67, 235-242 (2011).

- [2] Koval', T., Lipovova, P., Podzimek, T., Matousek, J., Duskova, J., Skalova, T., Stepankova, A., Hasek, J., Dohnalek, J. Plant multifunctional nuclease TBN1 with unexpected phospholipase activity: structural study and reaction-mechanism analysis. *Acta. Cryst.* D69, 213-226 (2013).

- [3] Langer GG, Hazledine S, Wiegels T, Carolan C, Lamzin VS. Visual automated macromolecular model building. *Acta. Cryst.* D69, 635-641 (2013).