

1. Ing. Jan Kopečný, CSc., Ú.fyziol.hosp.zvířat, Uhlíněves
2. RNDr. Zuzana Wroblowska, Biocel, Paskov
3. Doc. RNDr. Marie Tichá, CSc., PFF UK, Praha

ODBORNÉ PŘÍSPĚVKY

Knihovny struktur?

- Knihovny struktur!

Ing. Michal Lebl, CSc,

Selectide Co., Tucson, Arizona, U.S.A.

Termín knihovna struktur je odvozen od staršího, nicméně velmi recentního termínu knihoven peptidů, který byl již vědeckou komunitou přijat. Jedná se o multiplicitu struktur (peptidů) vytvořenou cíleným syntetickým procesem. Velmi vzdáleně je možno knihovnou nazvat i sbírku struktur vzniklou přípravou jednotlivých sloučenin a jejich smísením. Filozofickým základem použití knihoven struktur pro vyhledávání látek tvořících výchozí bod pro návrh nových léčiv je fakt (podložený desítkami let prací stovek laboratoří na izolaci a stanovení struktur biologicky aktivních látek z přírodních materiálů), že biologická aktivita je detegovatelná i v případech, kdy aktivní komponenta tvoří jen hmotově zanedbatelnou část zkoumaného materiálu. Možnost současného výskytu ekvipotentního agonisty a inhibitoru nelze sice vyloučit, nicméně pravděpodobnost takovéto situace je velice nízká.

Prvním a zcela zřejmým cílem pro přípravu randomizovaných knihoven byly nukleové kyseliny. Randomizace pouze čtyř stavebních kamenů vede k přípravě astronomických množství strukturálních variant. Interakce nukleových kyselin s receptory, protilátkami či enzymy však má pouze omezené použití a fragmenty nukleových kyselin majících vazbu k příslušné makromolekule jsou obvykle příliš velké, aby mohly sloužit jako výchozí struktura pro vývoj léčiva. Na druhé straně nespornou výhodou nukleových kyselin je možnost jejich amplifikace a stanovení struktury i byt jen několika molekul. Těto vlastnosti využívají tzv. evoluční metody, ve kterých směs oligonukleotidů je podrobena interakci s

příslušným makromolekulárním cílem, vzniklý agregát je izolován, zachycená směs oligonukleotidů je multiplikována a celý proces je opakován znovu, nyní však již se značně omezenou multiplicitou struktur, za mnohem náročnějších podmínek, při kterých dojde k výběru pouze ligandů s nejvyšší afinitou. Nejvýznamnějším výsledkem v této oblasti je nález inhibitoru thrombinu s afinitou 10 nmol/l.

Randomizovaný oligonukleotid může být vpraven do genetického materiálu fága a to tak, aby strukturální informace byla přepsána do molekuly proteinu objevujícího se na povrchu fága. Vzhledem k tomu, že ze směsi oligonukleotidů je pro konstrukci fága použita jen jedna molekula, obsahuje tento fág na svém povrchu unikátní strukturu proteinu. Aplikací technologie "biopanningu" (bioryžování) je pak možno identifikovat kolonie fágů vykazujících vazbu k studovanému makromolekulárnímu cíli a stanovit sekvenci nukleové kyseliny odpovědné za syntézu povrchového proteinu fága a tudíž i sekvenci tohoto proteinu. Tato technologie, velmi atraktivní jednoduchostí provedení je velmi široce využívána, má řadu omezení a nevýhod. Není možno s její pomocí identifikovat jiné struktury, než struktury peptidů obsahujících přirozené aminokyseliny a navíc jen ty struktury, které fág na svém povrchu může tolerovat.

Metody nemající omezení "biologických knihoven" jsou založeny na syntéze peptidů na pevných nosičích a lze je rozdělit do tří kategorií:

- 1) Metody připravující definované struktury v množství dostatečném pro stanovení biologické aktivity (vazby), ne však vždy dostatečném pro stanovení struktury, na prostorově přesně definovaném místě.

- 2) Metody připravující definované směsi struktur nevyžadující žádné následné strukturální analýzy.

- 3) Metody připravující unikátní struktury, které je nutno po jejich identifikaci v "knihovně" určit.

První metoda je v podstatě pouze miniaturní mnohonásobná syntéza peptidů. Představitelem tohoto přístupu je například Ronald Frank, jehož metoda tzv. bodové syntézy peptidů byla uvedena na trh ve formě kitu firmou CRB. Jednotlivé peptidy jsou syntetizovány na papírové podložce ve formě malých bodů. Reagenty jsou nanášeny mikropipetou a společně kroky syntézy (odštěpování chránících skupin, promývání) jsou prováděny společně pro všechny peptidy. Tímto způsobem bylo syntetizováno paralelně několik set peptidů. Biologický test spočívá

v inkubaci celého listu s příslušným makromolekulárním cílem a identifikaci interakce pomocí ELISA testu. Mnohonásobná syntéza používající principu individuálního provedení kondenzační reakce a společného provedení ostatních kroků syntézy byla zavedena Richardem Houghtenem při tzv. syntéze v čajových pytlících. Další metodou velmi rychle mnohonásobné syntézy je syntéza na modifikovaných polyethylenových tyčinkách vypracovaná Mario Geysenem, nyní komerčně dostupná od firmy Chiron Mimotopes. Výše uvedené metody poskytují maximálně stovky peptidů pro biologické vyhodnocení v jednom experimentu. Postup využívající fotolitografických principů byl navržen a realizován Stephenem P.A. Fodorem. Stal se natolik atraktivním pro americké investory, že firma založená pro jeho využití (Affymax) je v současnosti hodnocena na 400 miliónů dolarů. Fotolitografie umožňuje syntézu až 64 000 peptidů na prostoru zhruba 6 cm². Nicméně metoda je díky nedokonalosti chemických procedur omezena na přípravu relativně krátkých peptidů. Biologický test spočívá v inkubaci skleněné destičky, na které byla připravena mozaika syntetických peptidů. Koordináty čtverečku, který interaguje s fluorescenčně označeným makromolekulárním cílem, jsou identifikovány ve fluorescenčním mikroskopu a z těchto koordinát je dedukována struktura interagujícího peptidu. Aby nedocházelo k omylům, jsou peptidy syntetizovány v několika kopiích na různých místech destičky (většinou v 8 kopiích) a tudíž pouze zhruba 8000 peptidů je vyhodnoceno v jednom experimentu. Laciná verze této technologie, použitelná i pro přípravu "pravých" knihoven, byla navržena Pavlíkem a Vobůrkou. Jedná se o syntézu na bavlněné niti na kterou jsou jednotlivé aminokyseliny připojovány v závislosti na vzdálenosti od počátku, přičemž společné kroky syntézy jsou prováděny s celou "špulkou". Technické řešení této ideje nebylo ještě dotaženo do reality.

Knihovny druhého typu jsou vlastně nerozdělitelné směsi peptidů, které jsou testovány pro libovolnou biologickou aktivitu od vazebných testů až po testy na laboratorních zvířatech *in vivo*. Obvyklým postupem je příprava směsi peptidů randomizovaných na několika pozicích peptidového řetězce a majících jednu nebo dvě pozice řetězce přesně definovány. Syntéza je prováděna metodou v pevné fázi. V pozicích majících randomizovanou strukturu je buď kondenzována směs aminokyselin v molárním zastoupení

odrážející reaktivitu jednotlivých chráněných derivátů, nebo je prováděno dělení pevného nosiče a jeho směšování po kondenzaci, tak jako v případě dále popsané technologie Selectide. Nosič s peptidovým řetězcem z randomizovaných aminokyselin je pak rozdělen na (například) 20 stejných dílů a na každý díl je připojena jedna aminokyselina. Každá z dvaceti vzniklých částí je znovu rozdělena na dvacet dílů a opět definovaná aminokyselina je připojena. Tímto způsobem vznikne 400 směsí peptidů majících v pozicích 1 a 2 všechny možné kombinace přirozených aminokyselin. Vzniklé směsi jsou biologicky vyhodnoceny a neaktivnější směs je použita jako základ pro syntézu dalších definovaných směsí. Tedy například z testů 400 směsí hexapeptidů se ukázala jako nejslibnější ta, která v poloze 1 a 2 obsahovala Asp a Gly (směs značená DGXXXX - D a G jsou jednopísmenkové symboly aminokyselin a X je symbol pro směs dvaceti aminokyselin). Tato směs obsahovala 160 000 peptidů. V dalším kroku bylo připraveno dvacet směsí DGOXXX (O je symbol pro definovanou aminokyselinu) o 8000 peptidech. Jejich vyhodnocením byla zjištěna jako nejvýhodnější aminokyselina v pozici 3 kyselina glutamová (E). Je tedy připraveno dalších dvacet směsí o 400 peptidech majících strukturu DGE0XX. Následující dva kroky vedou k určení struktury aktivního peptidu DGERTC. Jak je vidět z tohoto příkladu, bylo třeba syntézy 460 směsí a 20 peptidů a biologického vyhodnocení 480 vzorků k určení struktury aktivního peptidu. Popsaná technologie byla publikována v časopise Nature Richardem Houghtenem a spol. v roce 1991 a byla základem firmy Houghten Pharmaceuticals, která ji používá k návrhu struktur nových léčiv. Prvním, kdo popsal možnost použití definovaných směsí k vyhledání aktivního peptidu byl Mario Geysen, který již v roce 1986 publikoval výše popsanou metodu pro syntézu a testování směsí které jsou připraveny a testovány na modifikovaných polyethylenových tyčinkách. Vzhledem k tomu, že metoda neposkytla významné výsledky, M. Geysen si zaměřil na zdokonalování mnohonásobné syntézy technikou peptidových knihoven dále nevyvíjel. Přiznává, že ve své době (v roce 1986) nebyla doba zralá pro myšlenku použití knihoven a publikace zasláná do časopisu Science byla zamítnuta s argumentací, že práce používá velmi chabě definovanou směs látek pro biologické vyhodnocení.

Knihovny třetího typu jsou vlastně "pravými" knihovnami. Tak, jako v knihovně knih, člověk (makromolekulární akceptor) vyhledá z milionů svazků tu knihu, ke které má v daný okamžik největší afinitu (chce si ji přečíst) a přečte si její obsah, tak receptor interaguje s jednou partikulí z knihovny peptidů, na které je vázán syntetický peptid. Interakce je využita k označení dané částice. Částice je oddělena ze směsi (vynesena z knihovny) a sekvence peptidu je stanovena chemickými metodami (knihy je přečtena). Příprava knihovny tohoto druhu tedy poskytuje "směs čistých peptidů" neznámého složení, jejichž struktura je stanovována teprve tehdy, jestliže interakce peptidu s makromolekulárním akceptorem byla detegována. Syntéza "směsi čistých peptidů" je založena na velmi jednoduchém triku, který pro přípravu ekvimolární směsi peptidů navrhl Arpád Furka již v roce 1988 na Biochemickém kongresu v Praze. Technika přípravy spočívá v tom, že kondenzace a partikule pevné fáze (obvykle kuličky o průměru zhruba 100 μm) jsou po ukončení kondenzace smíchány a přerozděleny pro další krok syntézy. Tímto způsobem každá jednotlivá partikule přichází do styku v kondenzačním stupni pouze s jednou aktivovanou aminokyselinou a tudíž pouze jediný peptid je syntetizován na jedné částici pevného nosiče. Furka při návrhu způsobu syntézy směsi peptidů přehlédl prostý fakt, že každá částice nosiče obsahuje unikátní peptidovou sekvenci. Kit Lam spojil možnost syntézy čistého peptidu na polymerní částici s možností detekce vazby na pevném povrchu pomocí ELISA testu a možností stanovení struktury z jediné kuličky v takzvané Selectide technologii, která se stala základem stejnojmenné firmy (ve které mimořádně v současnosti pracuje 10 českých a slovenských peptidových chemiků).

Nosiče polystyrenového typu poskytují zhruba 30-200 pmolů peptidu, což je množství dostatečné pro stanovení struktury buď pomocí Edmanova odbourávání nebo po odštěpení z nosiče pomocí hmotové spektroskopie. Jeden gram nosiče obsahuje zhruba 1 milion částic a tudíž kompletní knihovna penta-peptidů (3.6 milionů peptidů) by mohla být připravena na méně než 4 g nosiče. Vzhledem k tomu, že však rozdělování pevného nosiče v každém stupni syntézy je statistickým procesem, jistotu, že získáme všechny možné struktury, můžeme získat až při použití patnáctinásobku tohoto množství. Na druhé straně ale není třeba se obávat ztráty informace při použití

neúplně knihovny pro biologický test. Podstatná je informace o důležitosti jednotlivých aminokyselin v peptidu pro vazbu na daný akceptor. Pokud všech pět pozic penta-peptidu je kritických pro vazbu na daný receptor, pak máme v případě použití 4 g knihovny penta-peptidů zhruba 70%ní pravděpodobnost nalezení této unikátní sekvence. Pokud však pouze tři pozice penta-peptidu jsou kritické pro vazbu na akceptor, pak bychom měli nalézt 400 rozličných částic obsahujících strukturální konsensus pro tři polohy řetězce. Lze odvodit následující vzorec:

$$n_{\text{krit}} = \frac{\log(\text{vzorek})}{\log(\text{amk})} - \frac{\log(\text{hitů})}{\log(\text{amk})}$$

kde n_{krit} je počet "kritických" zbytků v peptidu, vzorek je počet částic vzatých do experimentu, hitů je počet nalezených pozitivních částic a amk je počet randomizovaných aminokyselin v každé pozici peptidu. Jak je vidět, je možno testovat knihovnu libovolně dlouhých peptidů, neboť závislost počtu hitů na počtu "kritických" zbytků není ovlivněna délkou peptidu. Příprava kompletní knihovny deka-peptidů by vyžadovala použití 10 000 kg polymerního nosiče, přesto však testování pouze 1 g knihovny, t.j. 1 000 000 struktur může přinést 100 pozitivních částic v případě, že deka-peptid obsahuje tři "kritické" zbytky.

KONKURZ

ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT,
160 00 Praha 6, Technická 3

vypisuje konkurs na obsazení míst odborných asistentů v oboru biochemie a mikrobiologie, počítá se i s vypsáním konkursu na místo odborného asistenta v oboru biologie.

Zájemci o práci na vysoké škole v uvedených oborech (i výhledově) informujte se u vedoucího ústavu prof. Ing. Dr. Z. Vodrážky, DrSc.

(tel. 311 73 41) nebo prof. Ing. J. Káše, DrSc. (tel. 332 3018) nebo faxem 311 3726.

ústav též přijme kvalitní sekretářku.