

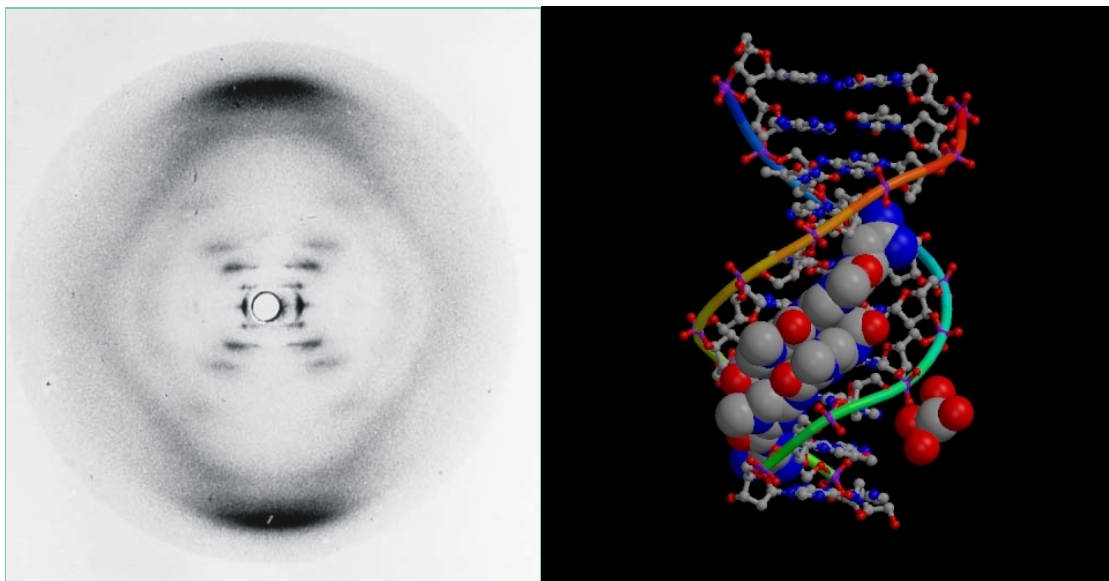


Razotkrivanje tajni (za život važnih) molekula

Sanja Tomić

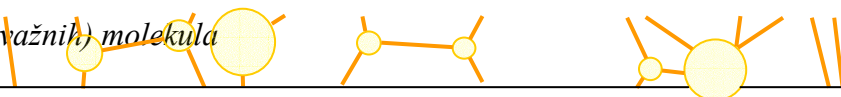
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Riječ fizika obično nas podsjeća na atom, atomsku jezgru i elektron, na nuklearne reakcije, neutrino ili pak na Svemir i njegovo širenje. No fizika i fizičari uvelike su pridonijeli i razumjevanju tajni života. Među dobitnicima Nobelovih nagrada za medicinu, biologiju i kemiju značajan je udio fizičara. U ovom tisućljeću to su fizičar Alan Heeger, dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 2000. godine (nagrada je dodijeljena za otkriće i razvoj vodljivih polimera), biofizičar Roderick MacKinnon dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 2003. (za otkrića vezana za kanale u membrani stanice), te Sir Peter Mansfield koji je Nobelovu nagradu za medicinu 2003. (za primjenu metoda magnetske rezonancije u medicini) podijelio s Paul Lauterburom, fizikalnim kemičarem.



Slika 5-1: Lijevo je prikazana difrakcijska slika DNA koju je sredinom prošlog stoljeća odredila Rosalind Franklin. Desno je struktura DNA s malom molekulom vezanom u njezinu udubinu, određena pomoću difrakcije X-zraka 2002 godine (<http://rutgers.rcsb.org/pdb/>).

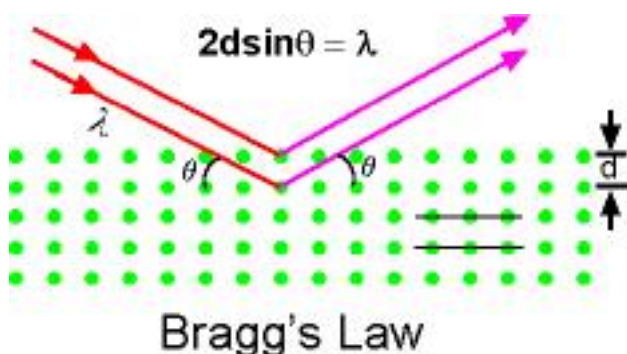
Vratimo se malo dalje u prošlost, sredinom prošlog stoljeća razotkrivena je tajna molekule kojom se informacije o životu prenose s pokoljenja na pokoljenje. Strukturu «spirale života», tj deoksiribonukleinske kiseline (DNA) točno su predvidjeli biolog James Watson i fizičar Francis Crick. Rad su objavili u časopisu Nature 1953. godine. Watson i Crick vjerovali su da je molekula DNA spiralna, a Crick je dokazao da bi rendgenska slika takve molekule pokazivala oblik križa. Prve rendgenske slike DNA napravila je Rosalind Franklin i one su odgovarale Crickovim pretpostavkama. Kemijska analiza pokazala je da je DNA dugi lanac šećera i fosfata na koji su



pričvršćene baze adenin (A), guanin (G), timin (T) i citozin (C) (plosnate prstenaste molekule koje sadrže ugljik, dušik i vodik), te da količina adenina u molekuli DNA odgovara količini timina, a količina guanina količini citozina. Na temelju prikupljenih informacija Watson i Crick sagradili su trodimenzionalni model DNA. Pravilno su pretpostavili da su A i T, te G i C u molekuli povezani tzv. vodikovim mostovima, slabim vezama u kojima se atom vodika nalazi između dva negativno nabijena atoma, dok vanjsku ovojnicu molekule čine šećer i fosfati.

DNA sadrži informaciju o građi proteina, molekula koje s pravom nose naziv 'građevni blokovi' života. Proteini čine 12-18% težine odraslog čovjeka, grade mišiće i čine strukturni okvir za druga tkiva (npr. vezivna). Pored građivne njihova uloga u funkcioniranju života, na svim nivoima složenosti, je višestruka: miofibrili i aktin omogućuju stezanje i rastezanje mišića, hemoglobin, albumin i niz drugih proteina prenosi tvari kroz tijelo, proteini djeluju kao enzimi (u tijelu čovjeka postoji oko 1000 proteinskih enzima), reguliraju fiziološke procese i rast, sastavni su dio imunog sistema [1].

Svi prirodni proteini građeni su od 20 različitih aminokiselina i to njihovih 8 izomera. Ovisno o veličini proteini se sastoje od nekoliko desetaka do nekoliko stotina tisuća aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Redosljed aminokiselina u nizu definira oblik i funkciju proteina, a kodiran je unutra DNA, tako da skupina od tri baze, 'kodon', predstavlja jednu aminokiselinu. Četiri različite baze koje se javljaju u DNA mogu se na 64 načina složiti u 'trojke', koje kodiraju 20 različitih aminokiselina (pojedine aminokiseline kodira više trojki baza, no ovisno o kojoj je trojki riječ aminokiselina će imati različite susjede). Niz tripleta baza koji definira pojedini protein naziva se gen. Genetski kod dešifriran je 1996, a slijedilo je sekvencioniranje kromosoma niza organizama. Sekvencioniranje ljudskog genoma završeno je 2001. godine [2]. Utvrđeno je da sadrži nekoliko desetaka tisuća gena, znatno manje nego se u početku pretpostavljalo. U posljednje vrijeme sve se više pažnje posvećuje istraživanju nekodirajućeg dijela kromosoma, budući postoji sve više indicija da, suprotno prijašnjim pretpostavkama i on nosi određene informacije.



Slika 5-2: Difrakcija elektromagnetskog zračenja na čvorovima rešetke.

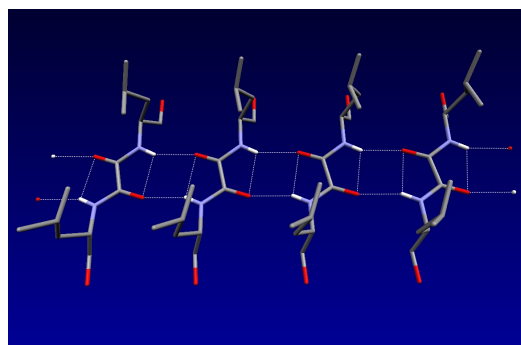
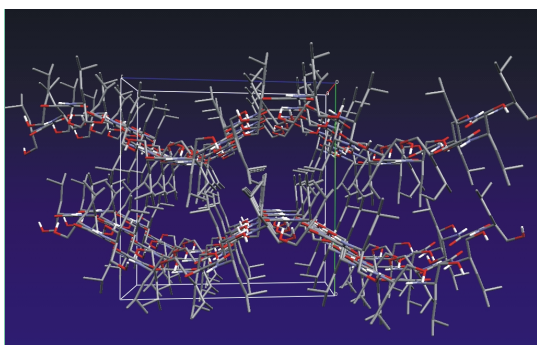
<http://www.mrl.ucsb.edu/mrl/centralfacilities/xray/xray-basics/>

Razotkrivanje tajni života i rješavanje kompleksnih problema vezanih uz biološke sisteme moguće je samo interdisciplinarnim pristupom, te se biofizika, bioinformatika i biokemija sve više isprepleću. Od eksperimentalnih metoda najbolji uvid u oblik molekule, trodimenzionalnu strukturu, pružaju difrakcija X-zraka,



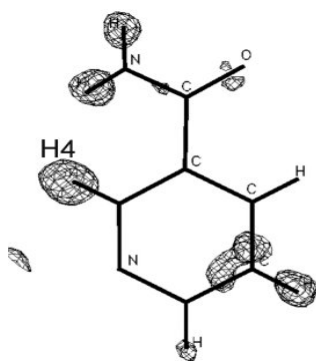
difrakcija neutrona, nuklearna magnetska rezonancija te u novije vrijeme elektronska mikroskopija.

Difrakcijske metode mogu se primjeniti praktički na sve molekule, velike i male. Jedini preduvjet je dobiti monokristal, što je ponekad, pogotovo kod membranskih proteina ravno magiji. Valna duljina X-zraka približno odgovara udaljenosti atoma u molekuli, pa njihovim raspršenjem na monokristalima, tzv. molekulskim rešetkama, u kojima su istovrsne molekule pravilno, periodički poredane, omogućuje određivanje trodimenzionalne strukture molekule.



Slika 5-3: Razmještaj molekula u kristalu. Na slici lijevo istaknuta je jedinična ćelija kristalne rešetke [3].

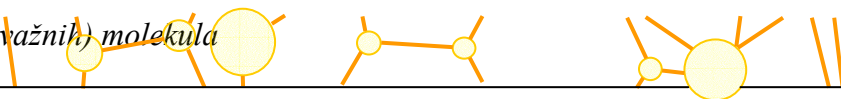
X-zrake raspršuju se na elektronima u molekuli i intenzitet raspršenog zračenja (kvadrat valne funkcije) proporcionalan je gustoći elektrona. Problem u rješavanju strukture predstavlja određivanje faza valne funkcije budući se one ne mogu mjeriti. Kako bi se problem faza riješio postoji nekoliko pristupa, no u osnovi svakoga je da se pretpostavi oblik molekule i na temelju utvrđene kristalne simetrije odredi raspodjela intenziteta koja se zatim uspoređuje s eksperimentalnim vrijednostima.



Slika 5-4: Mapa elektronske gustoće nakon oduzimanja izračunatih od izmjerenih F vrijednosti ($F_{obs} - F_{calc}$). Konture su rađene na 2σ određene elektronske gustoće [4].

Ovisno o razlici navedenih vrijednosti model se modificira sve dok se ne postigne najbolje moguće slaganje izračunatih i izmjerenih vrijednosti intenziteta.

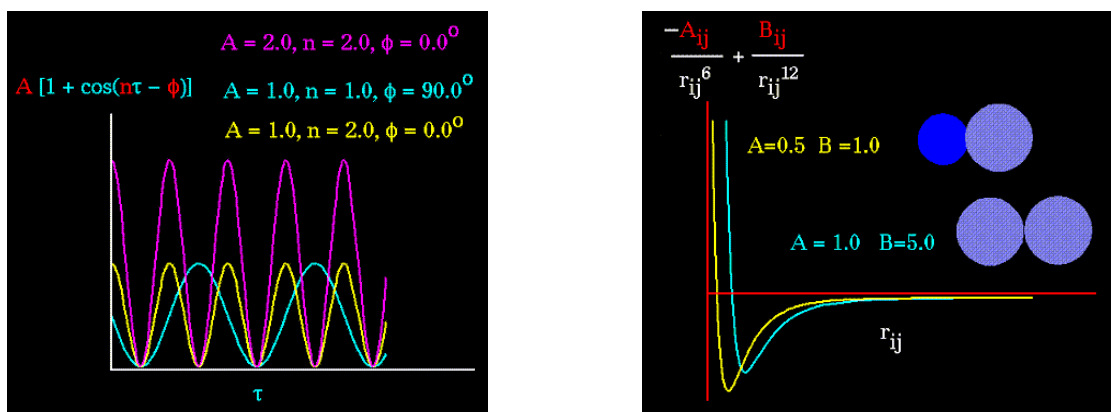
Kako bi što točnije odredili ponašanje i funkciju neke molekule nastojimo o njoj što više saznati. U današnje vrijeme najveći napor u bio-znanostima ulažu se na utvrđivanje funkcije pojedinih proteina, te njegove povezanosti s ostalim proteinima u stanici. Tako se razvio niz teorijskih metoda koje nam omogućuju proučavanje oblika i



dinamike, te elektronskih svojstava molekule, a time i njezine reaktivnosti. Ukoliko nas prvenstveno zanima oblik molekule, njezino ponašanje u otopini i sposobnost stvaranja nekovalentnih kompleksa s drugim molekulama, promatrati ćemo je kao klasični objekt, dakle kao tvorevinu koja se sastoji od kuglica različitih veličina, masa i naboja među kojima djeluju sile analogne onima koje nalazimo na makroskopskoj skali. Potencijalna energija molekule u tom je pristupu najčešće prikazana kao suma harmoničkih i periodičnih članova te elektrostatske i van der Waalsove energije interakcije:

$$U = \frac{1}{2} \sum_v k_v (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_k k_k (a - a_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_t k_t [1 + \cos(n\tau - \phi)] + \sum_{ij} [q_i q_j / R_{ij} + (A_{ij} / R_{ij}^{12} - B_{ij} / R_{ij}^6)]$$

Prve tri sume u navedenom izrazu za potencijalnu energiju molekule nazivaju se vezni, a posljednje dvije, nevezni članovi. Harmonički članovi vode računa da veze i valentni kutevi između kovalentno povezanih atoma u molekuli budu u ravnotežnom stanju, dok periodični član određuje moguće položaje četiri uzastopno povezana atoma. Konstante sile (k) i ravnotežne vrijednosti veza (b_0) i kuteva (a_0) određuju se eksperimentalno, spektroskopskim, difrakcijskim i kalorimetrijskim mjerenjima, ali i kvantnomehaničkim računima. Kod velikih molekula, kao što su proteini i nukleinske kiseline, DNA i RNA, broj neveznih interakcija znatno je veći od veznih, pa je potrebno vrlo pažljivo odrediti parametre u izrazu za van der Waalsov i elektrostatsku potencijalnu energiju.



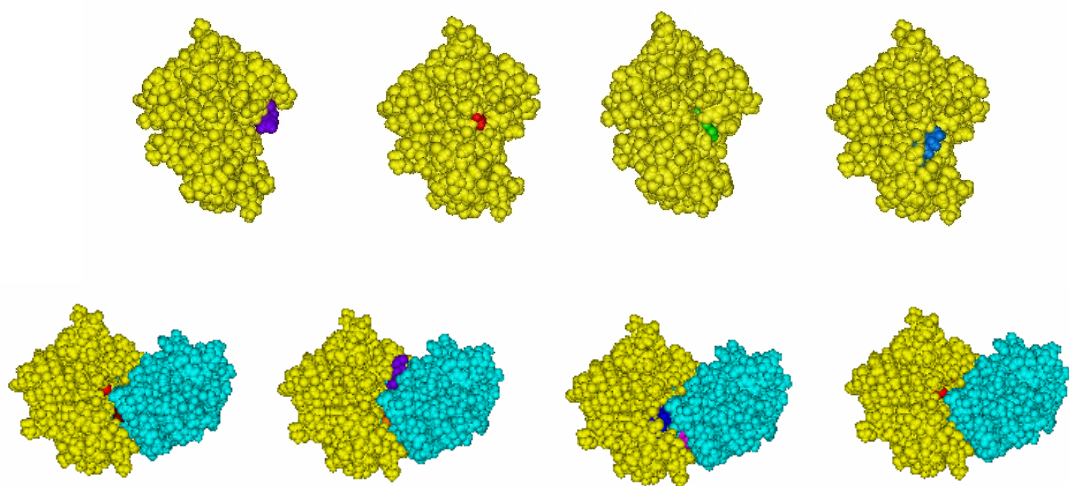
Slika 5-5: Izgled funkcija kojim se opisuje potencijalna energija molekule. Periodični potencijal torzijskih kuteva u molekuli (lijevo), van der Waalsov potencijal (desno)[5].

Ukoliko promatramo sustav molekula, npr. molekulu proteina otopljen u vodi ili pak vodenoj otopini natrijevog klorida, što približno odgovara mediju u kome se proteini nalaze u živim organizmima, pored unutarnje potencijalne energije, molekule imaju i potencijalnu energiju koju određuju raspored i naboj okolnih molekula. Nadalje, kako bi što vjernije simulirali fiziološke uvjete, sustavu molekula pridružujemo i određenu temperaturu, T , dakle kinetičku energiju. Na temperaturi T , sustavu od N , relativno slobodnih, atoma pridružena je kinetička energija u iznosu $(3N-6) k_B T / 2$, pri čemu je k_B Boltzmanova konstanta, a $(3N-6)$ broj stupnjeva slobode u sustavu (energija sustava ne ovisi o translaciji i rotaciji njegovog centra mase). Gibanje svake pojedine čestice, i , u takvom se sustavu prikazuje Newtonovom jednadžbom



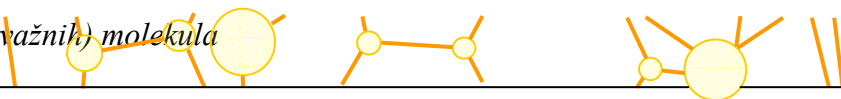
gibanja, $-\frac{dU_i}{dt} = m_i \frac{d^2 r}{dt^2}$, (i predstavlja atom ili čitavu molekulu), a praćenje promjena molekule (sustava) naziva se molekularna (ili molekulska :) dinamika (MD). Pored navedene, o temperaturi ovisne kinetičke energije, molekule u sustavu dio kinetičke energije dobivaju, ili gube, promjenom potencijalne energije, što dovodi do zagrijavanja, odnosno do hlađenja sistema. Kako bi se navedene promjene izbjegle koriste se različiti regulatori topline sistema. Ukoliko se kao regulator temperature sistema uvodi trenje, jednačba gibanja je oblika $-\frac{dU_i}{dt} - \gamma_i m_i = m_i \frac{d^2 r}{dt^2}$. Vremenski korak tijekom simulacije određen je najbržim gibanjem unutar molekule i obično je reda veličine fs, 10^{-15} s (frekvencije atoma vodika vezanih za atom ugljika su reda veličine 10^{-14} s).

Eksplcitno simuliranje molekula otapala vrlo je skupo, pa se njegov utjecaj na elektrostatski potencijal molekule aproksimira dielektričnom konstantom ili reakcijskim potencijalom, a sudari otapala s promatranom molekulom opisuju se slučajnom silom R . Pored, neusmjerenog, Brownovog gibanja, molekule se gibaju u smjeru smanjenja elektrostatskog potencijala što dovodi do nastajanja njihovih nakupina i kompleksa. Mutacije aminokiselina u proteinima utječu na brzinu nastajanja kompleksa, na njihovu stabilnost i specifičnost. Navedene efekte možemo proučavati eksperimentalno, korištenjem NMR tehnika ili teorijski, modeliranjem mutanata proteina i njihovih kompleksa i računanjem brzina asocijacije, odnosno razlika njihovih «slobodnih energija vezanja» ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).



Slika 5-6: Na «površini» proteina, ribonukleaze, Barnase (gore) označene su točkaste mutacije koje najviše utječu na stabilnost njegovog kompleksa s proteinom Barstar (dolje). 'Površina proteina' definirana je van der Waalsovima radiusima atoma.

Pri modeliranju kompleksa proteina i nukleinskih kiselina znanstvenici se ponajprije koriste eksperimentalno riješenim strukturama koje su pohranjene u bazi PDB. Trenutačno (svibanj 2005. godine) se u bazi nalazi oko 31000 riješenih struktura (no veliki broj tih struktura odnosi se na mutante i komplekse proteina i nukleinskih



kiselina, te se broj bitno različitih struktura svodi na tristotinjak), od toga oko 27000 je riješeno difrakcijom X-zraka. Eksperimentalno određivanje strukture proteina skupo je i dugotrajno, pa znanstvenici sve više koriste teorijske pristupe kako bi odredili strukturu proteina. Tako se razvila nova disciplina bioinformatika, koja koristi sličnosti proteina kako bi odredila nepoznate strukture. Korištenjem MD simulacija moguće je pratiti savijanje proteina *ab ovo*, tj. od potpuno istegnutog niza aminokiselina. No takve simulacije su izrazito duge i zahtjevne. Naime, prosječno vrijeme smatanja proteina iznosi oko *ms* do *s*, a samo mali broj njih smota se već nakon nekoliko desetaka μs . Primjer jednog takvog projekta je simuliranje savijanja proteina Vilinska perjanica (36 amino kiselina). Savijanje se simulira na 150000 PC širom svijeta: <http://folding.stanford.edu/science.html>.

Ukoliko nas zanima raspodjela elektrona unutar molekule, njezina reaktivnost i katalitička svojstva, molekulu moramo promatrati kao kvantno-mehanički objekt. Proučavanje kemijskih reakcija moguće je samo kvantnomehaničkim metodama. U tom slučaju polazimo od Schrödingerove jednadžbe, $H\Psi=E\Psi$. No egzatno rješenje te jednadžbe moguće je isključivo na vrlo malim sustavima kao što je npr. atom vodika. Schrödingerovu jednadžbu za molekule možemo riješiti samo aproksimativno, uvođenjem niza pretpostavki, pa se pri opisu i ne suviše velikih molekula nailazi na niz problema. No, usavršavanjem računala i razvojem različitih iterativnih pristupa, kao i razvojem samog formalizma kvantnomehaničkog računa, on se danas uvelike koristi i nadopunjuje klasični opis molekula. Uglavnom se koriste dvije metode: Hatree Fockova metoda molekulskih orbitala te metoda koja se bazira na funkciji gustoće elektronskog oblaka, DFT (density functional theory).

Literatura

- [1] Peter Karlson, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb (1982).
- [2] Venter *et al.*, Science 291.
- [3] Z. Štefanić, Doktorska disertacija 2004.
- [4] Podjarny *et al.*, Europhysics News Vol. 33, No. 4 (2002).
- [5] NIH, *Uvod u molekulsku mehaniku*.