SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tin Takač

Krio-elektronska mikroskopija i rendgenska difrakcijska analiza u dizajnu lijekova

Kemijski seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Zagreb, 2022.

SADRŽAJ

1. Uvod 3
2. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD) 6
3. Krio-elektronska mikroskopija (krio-EM) 11
   3.1. Krio-EM u dizajnu lijekova 12
4. Usporedba tehnika krio-EM i XRD - prednosti, nedostaci i izazovi u dizajnu lijekova 14
5. Predviđena tehnološka poboljšanja za širu primjenu krio-EM u dizajnu lijekova 16
6. Zaključak 17
7. Literaturni izvori 18
8. Prilog 20

1. Uvod

Otkriće i razvoj novih lijekova skup je i dugotrajan proces uglavnom zbog troškova sinteze i fizičkog ispitivanja spojeva kojih velika većina nije održiva kao farmaceutski proizvod za svrhu koja se istražuje, pa se ogromna sredstva troše na istraživanja u razvoju lijeka i testiranje spojeva koji su u konačnici neuspješni kao lijekovi. Dizajn lijekova na temelju strukture (*Structure-Based Drug Design*, SBDD) je brzo rastuće područje u kojem su u zadnjim godinama postignuti brojni uspjesi zahvaljujući naglom razvoju genomike, proteomike, i strukturnih informacija koje su omogućile identifikaciju stotine novh meta i tako pružile mogućnosti za otkriće novih vodećih spojeva.[1]

Proces SBDD prolazi kroz višestruke cikluse prije nego što optimirani vodeći spoj uđe u fazu kliničkih pokusa. Prvi ciklus uključuje kloniranje, pročišćavanje i određivanje strukture proteinske mete ili nukleinske kiseline jednom od glavnih metoda strukturne analize.[2] Primarne metode za određivanje strukture koje se koriste u metodi SBDD su: rendgenska kristalografija (*X-Ray Crystalography*), nuklearna magnetna rezonancija (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), te modeliranje homologijom.[3]

Točno poznavanje strukture molekula preduvjet je za dizajniranje lijekova na racionalnoj osnovi. Difrakcija rendgenskih zraka ima iznimnu važnost u pružanju potrebnih strukturnih informacija: strukturno određivanje rendgenskom difrakcijom novih kandidata za lijekove i međuprodukata može pružiti vrijedne informacije o novim sintezama i parametrima za kvantitativne odnose strukture i aktivnosti. Makromolekularna rendgenska kristalografija važna je i moćna tehnika koja se koristi u otkrivanju novih lijekova. Detaljna analiza kristalnih struktura kompleksa proteina i liganda omogućuje proučavanje specifičnih interakcija određenog lijeka s njegovim proteinskim ciljem na atomskoj razini. Većina farmaceutskih proizvoda na tržištu sastoji se od molekularnih kristala. Raspored molekula u kristalu određuje njegova fizička svojstva i uvelike utječe na obradu i formulaciju krutih lijekova, kao i na ključna svojstva lijeka kao što su brzina otapanja i stabilnost. Difrakcija rendgenskih zraka glavni je alat za karakterizaciju lijekova u krutim oblicima.[4]

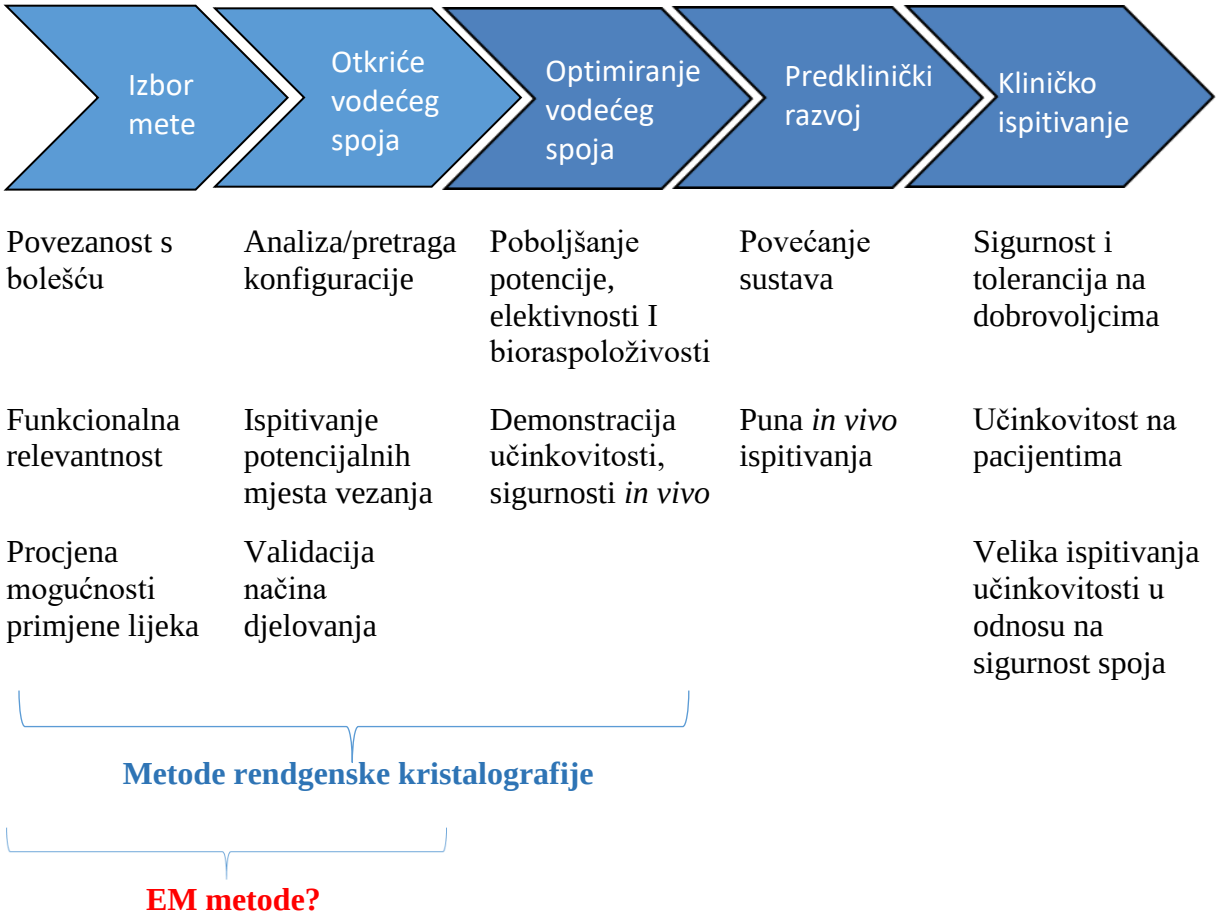
Razvijene su razne tehnike NMR za otkrivanje lijekova na temelju strukture (SBDD). Spektroskopija NMR pruža mnoge prednosti u odnosu na druge metode, kao što je mogućnost izravnog promatranja kemijskih spojeva i ciljanih biomolekula, te se koristi za pristupe temeljene na ligandu i proteinu, a može pružiti i važne informacije o interakcijama u kompleksu protein-ligand, kao što su struktura, dinamika i afinitet.[5]

Modeliranje homologijom ili usporedno modeliranje proteina, odnosi se na konstruiranje modela "ciljnog" proteina uz razlučivanje na razini atoma iz njegovog slijeda aminokiselina i eksperimentalne trodimenzijske strukture srodnog homolognog proteina, odnosno predloška.[6]

Uz stalna poboljšanja računalnih programa uključenih u krio-elektronsku mikroskopiju (*Cryogenic - Electron Microscopy,* krio-EM) tijekom posljednjih desetak godina, krio-EM se sve više koristi za dobivanje strukturnih informacija ključnih u SBDD. Stoga je krio-elektronska mikroskopija (krio-EM) uz rendgensku difrakcijsku analizu postala neizostavna tehnika u procesu otkrića novih lijekova.[7] Utjecaj strukturne biologije na otkriće lijekova dobro je dokumentiran, a strukturna karakterizacija proteina se danas rutinski koristi u svim dijelovima procesa otkrića lijeka, od početnog odabira proteina koji će biti meta budućem lijeku, identifikacije i optimizacije kemijske udarne tvari, tj. vodećeg spoja (*lead compound*) i procesa kojim se završna svojstva spoja razvijaju do konačnog kliničkog kandidata (slika 1.).

U posljednjih 30-ak godina tehnika rada u SBDD strukturnim analizama bila je rendgenska kristalografija, a s pojavom nekoliko tehnoloških poboljšanja, uključujući izravne detektore elektrona, automatizaciju, bolje mikroskopske vakuume i leće, fazne ploče i poboljšanja računalne snage koja omogućuju grafičku jedinicu za obradu, moguće je snimati i analizirati slike proteinskih struktura koje sadrže informacije visoke razlučivosti. Vizualizacija male molekule vezane na protein tradicionalno se postizala kristalografskim ispitivanjem razlika u mapi elektronske gustoće, a s pojavom karata elektronske mikroskopije (EM) visokog razlučivanja, mali spojevi mogu se izravno vizualizirati. Način vezivanja se zatim analizira računalno podržanim dizajnom lijekova (*Computer Aided Drug Design,* CADD) za daljnju obradu spoja u cilju poboljšanja afiniteta i selektivnosti.[7]

FAZE OTKRIĆA LIJEKA



Slika 1. Paradigma otkrića lijekova. Konceptualni put tijekom procesa otkrića lijeka. Metode rendgenske kristalografije se koriste u fazama izbora mete, otkrića vodećeg spoja i njegove optimizacije, a krio-EM ima sve veću dodatnu ulogu u fazama izbora mete i otkrića vodećeg spoja osobito za tvari koje teško kristaliziraju. (Prilagođeno prema lit. [7])

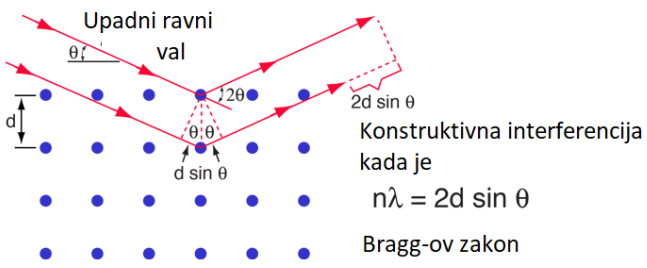
2. Rendgenska difrakcija (XRD)

Rendgenska difrakcija (XRD) je tehnika koja se koristi za određivanje kristalne strukture tvari. To je moguće jer je valna duljina rendgenskog zračenja mala, reda veličine 1Å, što odgovara udaljenosti između dva vezana atoma u kristalu. Tehnika XRD može dati i informacije o faznom sastavu, odnosno pomoću nje moguće je identificirati i kvantificirati pojedine kristalne faze u uzorku. Za određivanje kristalne strukture neke tvari potrebno je snimiti uzorke njegova monokristala dovoljne veličine. Ako se oni ne mogu dobiti, mogu se primijeniti razne druge metode rendgenskog snimanja koje pružaju manje detaljne informacije od kojih je najkorištenija ona difrakcije na prahu.[2]

Tehnika se zasniva na ozračivanju uzorka rendgenskim zrakama (X-zrake) koje nastaju u rendgenskoj cijevi, a zatim se mjeri intenzitet i kutovi raspršenja difraktiranih X-zraka s kristala koji se pri tom ne mijenja. Do difrakcije zračenja dolazi zbog međudjelovanja rendgenskih zraka i elektronskog omotača atoma u uzorku. Rendgenska zraka predaje svoju energiju elektronskom omotaču, a atom zatim zrači rendgensko zračenje iste valne duljine (koherentno zračenje) u svim smjerovima. Intenzitet raspršenog rendgenskog zračenja opada s kutom otklona od primarnog snopa, a amplituda mu je proporcionalna broju elektrona u elektronskom omotaču, tj. atomskom broju. Intenzitet raspršenih rendgenskih zraka prikazuje se kao funkcija kuta raspršenja, a struktura materijala određuje se analizom položaja, kuta i intenziteta raspršenih vrhova. Odnos između položaja difrakcijskih vrhova i kristalne strukture shematski je dan Bragg-ovim zakonom (jednadžba 1, slika 2.)

$$n\lambda = 2d \sin \theta \qquad (1),$$

gdje je λ valna duljina upotrijebljenog X-zračenja, d je razmak između kristalnih ploha, θ je kut incidencije na kojem je mjeren difrakcijski pik, dok je n cijeli broj koji predstavlja 'harmonijski red' difrakcije.



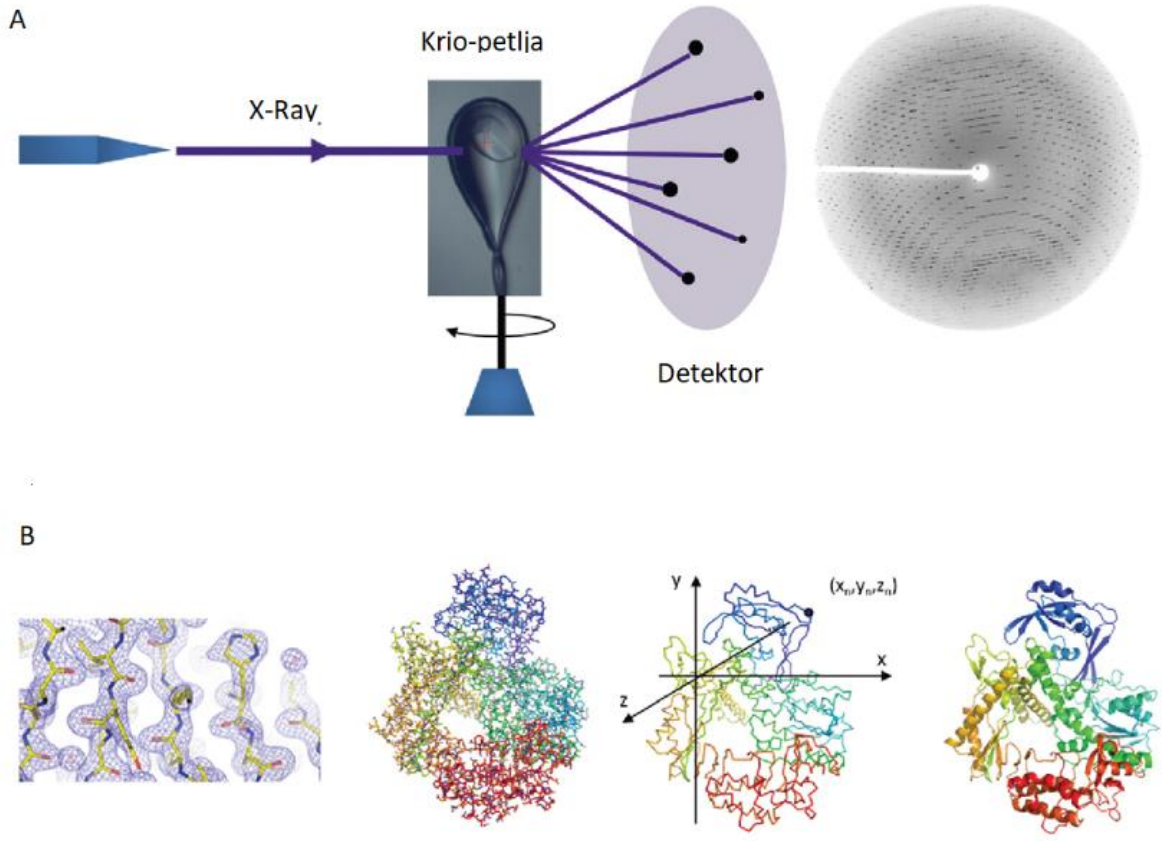
Slika 2. Shematski prikaz Braggovog zakona (prilagođeno prema http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/bragg.html, pristupljeno 3.05.22)

Difrakcija rendgenskih zraka, bilo na kristalnom uzorku ili na amorfnom prahu, još uvijek se rutinski koristi u farmaceutskoj industriji za karakterizaciju lijekova, polimorfizam i pseudopolimorfizam lijekova. Primjenom strukturne biologije u procesu dizajna lijekova, medicinski kemičari dobili su priliku koristiti detaljne strukturne informacije kako bi napredovali u probiru kandidata za lijekove. Poznavanje trodimenzijske strukture bioloških makromolekula, poput proteina i DNK, ključno je za razumijevanje funkcioniranja života. Stoga se biološka kristalografija kao glavna metoda strukturne biologije koja proučava strukturu i prostornu organizaciju u biološkim makromolekulama, temelji na proučavanju difrakcije rendgenskih zraka na kristalima makromolekula. U samo 50 godina rendgenska kristalografija je postala tehnika izbora za određivanje strukture bioloških makromolekula na atomskoj skali, koristeći prednosti velikog napretka u znanstvenim područjima kao što su molekularna biologija, biokemija, računalne znanosti, fizika i u novije vrijeme robotika. Danas je kristalografijom moguće učinkovito odrediti složene trodimenzijske struktura makromolekula,[2] koje se zatim pohranjuje u Banku podataka o proteinima (engl. *Protein Data Bank,* PDB).[8, 9]

Rendgenska kristalografija pokazala se neprocjenjivim alatom budući da može pružiti sveobuhvatne strukturne informacije o interakciji liganda s farmakološkom metom. Ideja da bi poznavanje strukture proteina moglo pomoći u dizajnu specifičnih liganada, što je danas općeprihvaćeno, pojavila se 1976., nekoliko godina nakon pokretanja 1971. Ovaj koncept bio je ključan za razvoj "ciklusa dizajna lijeka na racionalnoj osnovi " prema kojem se lijek može racionalno dizajnirati i optimirati korištenjem znanja dobivenog određivanjem strukture njegovog kompleksa s biološkom metom.[10] Prva difrakcija rendgenskih zraka na proteinskim kristalima zabilježena je početkom tridesetih godina prošlog stoljeća, ali je prošlo gotovo 30 godina prije nego što je objavljena atomska kristalografska struktura mioglobina.[11] U 1953. James Watson i Francis Crick otkrili su dvostruku uzvojnicu DNK koristeći rezultate Rosalyn Franklin dobivene raspršenjem X-zraka na prirodnim filamentima nastalim od molekule DNK.[12] Potencijal rendgenske kristalografije već je prije dokazan određivanjm strukture β-laktamskog antibiotika penicilina.[13]

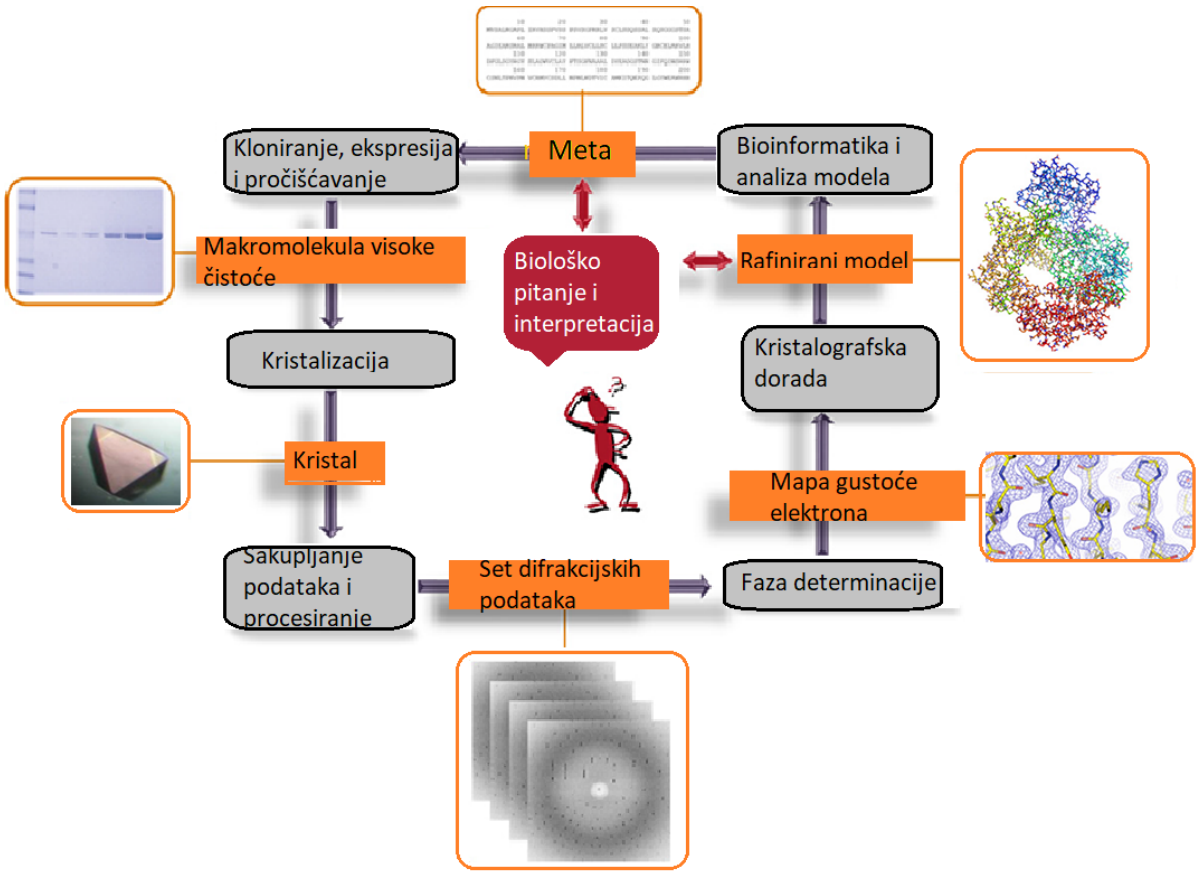
Princip kristalografije temelji se na rendgenskoj difrakciji svih elektrona u svim atomima makromolekula sadržanih u kristalu. Monokromatska rendgenska zraka ozračuje kristal zamrznut u krio-petlji koja se rotira oko osi, a difrakcijske mrlje koje se opažaju su rezultat vala koji dospijeva na detektor zbog difrakcije na elektronima (slika 3A). Analiza ovih

difrakcijskih podataka omogućuje kristalografu izračunavanje elektronske gustoće, što je distribucija elektronskog oblaka makromolekule u kristalu. Elektronska gustoća, pod uvjetom da je dovoljno precizna, što ovisi o razlučivanju difrakcijskih podataka, omogućuje lokalizaciju svakog atoma molekule, a time i određivanje njegovih koordinata u trodimenzijskom prostoru. Na slici 3B prikazana je karta elektronske gustoće fragmenta makromolekule, te je njena trodimenzijska struktura (u ovom slučaju proteina) predstavljena na tri načina: prikaz svih atoma, okosnica i crtani prikaz.[2] Da bi se dobila trodimenzijska struktura, potrebno je nekoliko koraka. To su proizvodnja i pročišćavanje makromolekule, njezina kristalizacija te prikupljanje i obrada difrakcijskih podataka. Sljedeći korak je određivanje faza mjerenog signala što je ključno za izračunavanje gustoće elektrona. Posljednji korak je usavršavanje izgrađene strukture, nazvane modelom, koja se potom tumači u kontekstu njezine biološke funkcije. Analiza modela postavlja nova pitanja koja vode do razlučivanja drugih kristalnih struktura, kao što je struktura kompleksa između proučavanog proteina i njegovih partnera (slika 4).



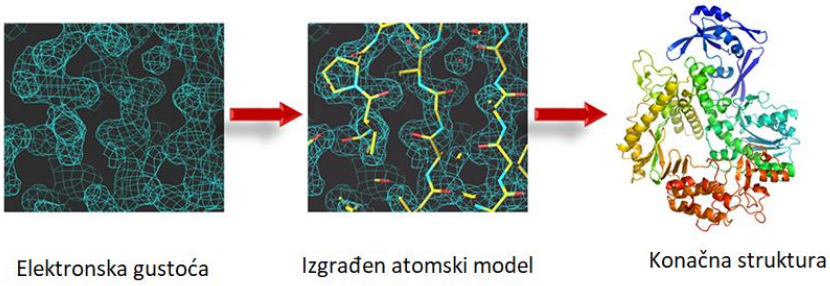
Slika 3. Princip rendgenske kristalografije makromolekula. (A) Monokromatska rendgenska zraka ozračuje kristal zamrznut u krio-petlji koja se rotira oko osi, a difrakcijske mrlje koje se opažaju su rezultat vala koji dospijeva na detektor zbog difrakcije na elektronima u kristalu. (B) Prikazana je karta

elektronske gustoće fragmenta makromolekule (lijevo). Trodimenzionalna struktura makromolekule (u ovom slučaju proteina) predstavljena je na tri načina: prikaz svih atoma, okosnica i crtani prikaz. (prilagođeno prema lit.[2])



Slika 4. Glavni koraci u trodimenzijskom određivanju bioloških makromolekula kristalografijom. (prilagođeno prema lit.[2])

Nakon što se procijeni prvi skup faza, izračunava se prva karta gustoće elektrona. Ako se dobivena karta može interpretirati slijedi izgradnja modela strukture makromolekule korak po korak (slika 5.). Kombinacija automatiziranog algoritma i ručne metode dostupne putem interaktivnosti za koju se koriste grafički računalni programi, dovodi do konačnog modela sastavljenog od trodimenzijskih koordinata svakog atoma u uzorku sastavljenom od jedne ili više makromolekula. Iz tog prvog izgrađenog modela, intenziteti difrakcije izračunavaju se Fourierovom transformacijom i usporede se s eksperimentalno izmjerenim intenzitetima. Ova usporedba omogućuje postupno poboljšanje modela, a taj se ciklički proces naziva kristalografsko pročišćavanje, tj. naizmjenično traženje globalnog minimuma energetskih funkcija i ručna rekonstrukcija modela.



Slika 5. Karta elektronske gustoće (lijevo) omogućuje postupnu izgradnju atomskog modela (sredina) i vodi do trodimenzijskog modela strukture (desno). (prilagođeno prema lit.[2])

Iako vrlo moćna, ova tehnika ima i svoja ograničenja. Do sada koncept rendgenske difrakcije makromolekula nailazi na dvije prepreke. Prva je što je prenizak signal pojedinačne makromolekule, a druga se prepreka odnosi na djelove uređaja (poput leća) koje generiraju izravnu sliku makromolekula, a ne postoje za X-zrake. Korištenje kristala koji sadrži oko 10^{15} identičnih makromolekula raspoređenih u tri smjera u prostoru, savladava ove prepreke. Ipak s pojavom automatiziranih sustava za kristalizaciju, intenzivnijih izvora sinkrotronskih X-zraka, bržih detektora, automatiziranog rješenja strukture i pristupa za pročišćavanje, nije neuobičajeno da se makromolekularne strukture mogu odrediti unutar nekoliko dana, a u slučaju određivanja struktura kompleksa protein-ligand, propusnost od nekoliko struktura dnevno je dostižna. Kako se povećavala propusnost, primjena rendgenske kristalografije napredovala je od određivanja ciljne strukture proteina, moguće u prisutnosti nekog unaprijed identificiranog liganda, do određivanja odnosa strukture i aktivnosti, gdje se određuje nekoliko struktura kompleksa u cilju optimizacija liganda. Točno poznavanje makromolekularnih struktura preduvjet je za racionalno dizajniranje lijekova i funkcionalnih studija na temelju strukture. Stoga kristalografska istraživanja igraju važnu ulogu u dizajnu lijekova. Rezultati ovih istraživanja daju nedvosmislene, točne i pouzdane 3-dimenzijske strukturne parametre ponekad čak i prije nego što je dostupna potpuna kemijska karakterizacija. Ujedno, kristalografija je jedina metoda za određivanje "apsolutne" konfiguracije molekule koja je kritično svojstvo u biološkim sustavima zbog toga što promjene u konfiguraciji mogu promijeniti biološki odgovor. Rezultati kristalografskih istraživanja omogućuju i izračunavanje farmakofornih parametara iz 3-dimenzijskih koordinata koji se zatim mogu koristiti zajedno s podacima o biološkoj aktivnosti za usmjeravanje budućeg razvoja. Korištenje 3-dimenzijskih podataka omogućuje i usporedbu relativnog položaja skupina (farmakofora) za koje se smatra da utječu na vezanje na biološku metu čak i u strukturno različitim spojevima.[14]

3. Krio-elektronska mikroskopija (Krio-EM)

Krioelektronska mikroskopija (krio-EM) je tehnika strukturne molekularne i stanične biologije koja je doživjela veliki napredak posljednjih godina. Tome u prilog ide i Nobelova nagrada za kemiju 2017. dodijeljena Jacquesu Dubochetu, Joachimu Franku i Richardu Hendersonu (slika 6.) "za razvoj krio-EM za određivanje strukture visokog razlučivanja biomolekula u otopini", a *Nature Methods* je 2016. proglasio krio-EM "Metodom godine".

Slika 6. Dobitnici Nobelove nagrade za kemiju u 2017. su Jacques Dubochet, Joachim Frank i Richard Henderson "za razvoj krio-EM za određivanje strukture visokog razlučivanja biomolekula u otopini"

Od ranih 2010-ih, krio-EM evoluirala je do jedne od glavnih metoda strukturne biologije, a zahvaljujući značajnom napretku u tehnologiji detektora, mikroskopa i obradi podataka farmaceutske tvrtke također su počele koristiti krio-EM u otkriću lijekova o čemu svjedoči sve veći broj objavljenih radova koji dolaze iz farmaceutsko-industrijskog okruženja. Sama priroda krio-EM trenutno zahtijeva instrumente i opremu za čiju su nabavu i održavanje potrebna značajna ulaganja što predstavlja prepreku za evaluaciju krio-EM u industriji. Do sada je krio-EM bila ograničena u razlučivosti, propusnosti i dostižnoj molekulskoj masi. Međutim ova tehnika je brzo prevladala svoja glavna ograničenja za širu upotrebu kroz novi val tehnološkog napretka koji se odnosi na snimanje slika kao i softvera za njihovu obradu što omogućuje dobivanje trodimenzijskih rekonstrukcija makromolekularnih kompleksa na gotovo atomskoj razini razlučivanja koji su se prije dobivali samo rendgenskom kristalografijom.[15] Razlučivanje struktura određenih pomoću krio-EM, povijesno su bile niže

od struktura generiranih rendgenskom kristalografijom. Ovaj nedostatak značajno je poboljšan razvojem novih elektronskih detektora.[16] Uz stalna poboljšanja hardvera i elektronskih mikroskopa i povezanog softvera u posljednjih nekoliko godina, krio-EM je omogućila dobivanje strukturnih informacija potrebnih za dizajn lijekova na osnovu strukture (SBDD).

Proces suvremene krio-EM koji obuhvaća metodu za pripremu i analizu uzoraka sastoji se od nanošenja pročišćenog monodisperznog proteinskog uzorka na rešetku elektronskog mikroskopa, koja služi kao potpora uzorku.[17] Rešetke (bakar, nikal ili ugljik obložen potpornim slojem često ugljikom ili zlatom) su proizvedene tako da imaju tanak polimerni sloj s ravnomjerno raspoređenim rupama u koje se suspendiraju proteinske molekule. Ravnomjerno raspoređene rupe omogućuju automatsko prikupljanje podataka, te su molekule proteina idealno izolirane od susjednih molekula i u nasumičnoj orijentaciji. Rešetka s uzorkom se brzo zamrzne u tekućem dušiku, čime se spriječava isušivanje uzorka i nastanak kristala leda, tako da protein ostaje zarobljen u staklastom ledu. Rešetka se zatim stavlja u mikroskop, održava na niskoj temperaturi, osvjetljava snopom elektrona i projekcije prikupljaju na detektoru. Prikupljaju se brojne slike kako bi se omogućile projekcije čestica u svim smjerovima, a kako elektroni imaju potencijal izazvati oštećenje u biološkim uzorcima, primijenjena doza elektrona mora biti svedena na minimum, što rezultira niskim signalom prema šumu. Prvi koraci obrade podataka su identificiranje čestica na svakoj slici (određivanje čestica) i njihovo grupiranje prema sličnosti (poravnanje čestica) kako bi se omogućile prosječne projekcije s poboljšanim signalom i šumom. Analiza jedne čestice pomoću pogodnog programa izdvaja samo pojedinačne molekule iz slika, centrira svaku česticu i uprosječuje molekule, prvo u dvije dimenzije, a zatim u tri dimenzije da bi na kraju dala 3D mapu gustoće u kojoj atomski model može biti izgrađen. Stvarni proces je nešto kompliciraniji nego što je opisano u ovom kratkom sažetku.

3.1. Krio-EM u dizajnu lijekova

Utjecaj krio-EM na otkriće lijekova dosada je već poznat, a najmodernija tehnologija spremna je za daljnju revoluciju u primjeni na proteine koji su se prethodno teško mogli strukturno odrediti, kao i na nove slučajeve upotrebe.[18] Na temelju današnje tehnologije može se pretpostaviti da će krio-EM imati najveći utjecaj na dvije faze u razvoja lijeka (slika 1), na fazu identifikacije mete i fazu identifikacije vodećeg spoja. Budući da je propusnost trenutnih krio-EM metoda niska, vjerojatno je da će vezanje spojeva u početnoj fazi projekta imati najveći utjecaj na projekt novog kemijskog entiteta (NCE, *New Chemical Entity*) i Fab/antigen

kompleksa za razumijevanje načina djelovanja (MOA, *Mode of Action*) za projekt novog biološkog entiteta (NBE, *New Biological Entity*), ali bi daljnja tehnološka unapređenja mogla pomaknuti primjenu u ciklus optimizacije potencijalnih vodećih spojeva kao što je sadašnja praksa pomoću rendgenske kristalografije.[19] Još uvijek nema objavljenih primjera otkrića lijekova pomoću krio-EM, ali postoje mnoge strukture s malim vezanim molekulama gdje se pokazuje potencijal krio-EM u istraživanjima malih bioaktivnih molekula. Struktura β-galaktozidaze u kompleksu s inhibitorom riješena uz razlučivanje od 2,2 Å 2015.[20] bila je jedna od prvih struktura nakon najave 'Revolucionarnog razlučivanja' koja je odnedavno prošireno na 1,9 Å uslijed poboljšanja u obradi podataka. Struktura ribosoma *Leishmania donovani* u kompleksu s antibiotikom paromomicinom[21] određena je s ukupnim razlučivanjem od 2,5 Å (proširuje se na 2,2 Å u jezgri gdje su primarna mjesta vezanja). Paromomicin cilja citozolni ribosom parazita *Leishmania*, a način vezanja odobrenog lijeka u skladu je s generiranim podacima o mutaciji što daje pretpostavku za razvoj novih spojeva koji mogu biti selektivniji. Kvaliteta mape također je omogućila identifikaciju liganada na sekundarnim veznim mjestima, koji se nalaze periferno od jezgre molekule. Sažetak proteinskih struktura o kojima se raspravlja u ovom pregledu prikazan je u Tablici 1 u prilogu.

Kako poboljšanja u elektronskim mikroskopima dopuštaju da uzorci mogu ostati u njima danima umjesto satima, to omogućuje prikupljanje više podataka iz svakog uzorka. Nedavno primjenjena računala s grafičkim procesorom za obradu slike (GPU - *Graphical Processing Unit*) u mnogo kraćim vremenima čine ciklus od uzorka do strukture prikladnijim za rješavanje pitanja u dizajnu lijekova. Daljnje poboljšanje u pripremi uzoraka zajedno s brzom identifikacijom prikladnih uzoraka vrlo vjerojatno će omogućiti često korištenje krio-EM u početnim fazama otkrića lijekova, kao dopuna vene rendgenskoj kristalografiji i metodama NMR (slika 1).[7]

Razumijevanje molekularnog načina djelovanja lijeka važan je dio suvremenog programa otkrića lijekova, posebno ako novi kemijski entiteti imaju neobične načine djelovanja s nedefiniranim molekularnim ciljem. Mnogi uspješni i sigurni lijekovi u suvremenoj farmakoterapiji ciljaju proteine relevantne za bolest posebnim mehanizmom. Usmjeravanje istraživanja na protein-protein interakcije (engl. *Protein-Protein Interaction*, PPI) pomoću malih molekula često se smatra vrlo izazovnim jer su proteinski kompleksi dinamični i njihova farmakološka modulacija se može postići ne samo inhibicijom PPI, već i stabilizacijom kompleksa. Dva nedavna primjera stabilizacije neaktivnih i aktivnih proteinskih kompleksa p97 (ATP-aza povezana s brojnim staničnim aktivnostima)[22] i eIF2B (eukariotski proteinski kompleks, faktor izmjene gvaninskih nukleotida za eukariotski inicijacijski faktor 2)[23],

ilustriraju sve veću moć krio-EM u otkrivanju novih mogućnosti za interakciju lijekova s velikim multiproteinskim kompleksima. Prevalencija onkogenih mutacija u p97, enzimu ključnom za homeostazu proteina, čini ga privlačnom metom za terapije protiv raka. Integrirani odgovor na stres (engl. *Integrated Stress Response*, ISR) je konzervirani translacijski i transkripcijski mehanizam koji štiti stanice od napada virusa, UV zračenja i sl., te utječe na metabolizam, pamćenje i imunitet. Regulacija ISR konvergira s fosforilacijom faktora inicijacije translacije eIF2α, koji se pretvara iz supstrata u kompetitivni inhibitor namjenskog faktora izmjene gvanin nukleotida, eIF2B, čime je inhibirana translacija. U neurološkim stanjima poput traume mozga, ISR može postati nereguliran te inhibirati stanice u sintezi proteina nužnih za popravak i povratak u normalnu funkciju. Pomoću krio-EM nedavno je otkrivena strukturna osnova djelovanja ovog spoja, a korak koji određuje brzinu u sastavljanju potpuno aktivnog i dekamernog eIF2B uključuje formiranje dimera tetramernih αβγδ podkompleksa. Ovaj korak je poboljšan inhibitorom B integriranog odgovora na stress (engl. *Integrated Stress Response Inhibitor B,* ISRIB), koji se veže na sučelju između β i δ regulatornih podjedinica, time premošćava simetrični dimer i djeluje poput molekularnog ljepila koje drži kompleks eIF2B zajedno, čime je povećana njegova aktivnost i spriječena fosforilacija eIF2α.[7]

S trenutnom krio-EM tehnologijom može se pretpostaviti da će naveći utjecaj imati na faze identifikaciju mete i identifikacije vodećeg spoja (slika 1.). Međutim daljnja poboljšanja mogla bi potaknuti njenu primjenu i u ciklusu optimizacije vodećeg spoja.

4. Usporedba tehnika krio-EM i XRD - prednosti, nedostaci i izazovi u dizajnu lijekova

Prilikom određivanja strukture makromolekule (pojedinačne ili u kompleksu) bilo da se radi s rendgenskom kristalografijom ili krio-EM, potrebno je izolirati pročišćenu biomolekulu proteina. U slučaju krio-EM moguće je odrediti strukturu pomoću samo nekoliko mikrolitara relativno heterogenog uzorka. Bilo koja heterogenost se (u teoriji) može odvojiti u stadiju krio-EM obrade podataka i može dovesti do strukture višestrukih konformacija proteina, reprezentativnijeg za protein u otopini; dok konformacijsko okruženje dostupno u kristalnoj rešetki je u najboljem slučaju često jako smanjeno i u najgorem slučaju, nije reprezentativno za konformaciju proteina u otopini.

Očigledan nedostatak određivanja strukture proteina pomoću XRD je apsolutni zahtjev za prikladnim kristalom. Kada se radi s novim proteinom, nije moguće unaprijed odrediti koji su uvjeti uspješne kristalizacije.

Međutim, napretci u robotici i minijaturizaciji kristalizacije proteina, poluautomatiziranom postavljanju kristala, poravnavanju i upotrebi zbirke podataka omogućuju pregledavanje tisuća uvjeta i desetaka kristala u samo nekoliko sati pomoću jednog uzorka proteina. Ako se uvjeti ne mogu pronaći, protein se može konstruirati tako da se potiče kristalizacijua, na primjer brisanjem mobilnih područja. To nije potrebno za određivanje krio-EM strukture ako konformacijska heterogenost ne spriječava prikupljanje podataka o biomolekuli. U tom slučaju će na rezultirajućoj karti biti smanjeno razlučivanje u tim mobilnim regijama. Krio-EM ima prednost i što, u teoriji, omogućuje određivanje struktura pri različitim uvjetima, npr. pri pH vrijednostima na kojima se kristali ne mogu formirati niti se vezanje liganda tolerira. Prva krio-EM mreža napravljena s uzorkom može otkriti i da se biomolekula agregirala ili se raspala, prije ili tijekom procesa nanošenja na rešetku i zamrzavanja, da je nedovoljna ili prevelika količina makromolekule nanesena na mrežu, ili da je staklasti led pretanak ili predebeo da bi omogućio prikupljanje visokokvalitetnih slika. U ovim slučajevima sustavne varijacije uvjeta i pretraživanje rezultirajućih mreža ostaju i radno intenzivni process.[7]

Prednosti krio-EM u odnosu na XRD su u tome što ne zahtjeva pripremu monokristala, manji su zahtjevi za čistoćom uzorka, a brzom obradom uzorka zamrzavanjem njegovo stanje održava se bliže prirodnom. Također je potrebna mala količina uzorka (oko 0,1 mg), u malom volumenu uzorka, obično dva ili tri mikrolitra. Krio-EM također omogućuje *in silico* pročišćavanje različitih sastavnih i/ili konformacijskih stanja uzorka.

Nedostaci i ograničenja krio-EM se odnose na slabo razlučivanje i osrednju propusnost, dugotrajanost procesa dobivanja slike dobre kvalitete, te na skupoću procesa. Glavni nedostatak ove tehnike je da se čestice detektiraju u nepoznatim orijentacijama. Također su problem visoke razine šuma, zbog upotrebe ograničenih doza elektrona u cilju minimizacije oštećenja zračenja, osobito pri visokom razlučenju, jer imaju tendenciju kompliciranja određivanja orijentacija, što je posebno zabrinjavajuće za manje čestice. Stoga je tijekom posljednjih nekoliko godina određivanje strukture bioloških makromolekula pomoću Cryo-EM bilo ograničeno na velike komplekse ili modele niske rezolucije.

Potrebno je prevladati brojne prepreke kako bi ova tehnika bila redovito primjenjivana u dizajnu lijekova, a jedan od izazova je u pripremi uzoraka koji uključuju osiguravanje proteinske molekule raspoređene u staklastom ledu, a ne agregirane na rubu rupa ili na granici zrak-voda. Pronalaženje eksperimentalnih uvjeta za postizanje ovog cilja među

ostalim uključuje sustavnu varijaciju uvjeta, uključujući pH, aditive te površinu mreže. Rješavanje strukture krio-EM oslanja se na usrednjavanje tisuća (ili čak milijuna) slika identičnih makromolekularnih čestica. Postojanje više stanja stoga je mač s dvije oštrice, budući da može ograničiti razlučivanje. Opsežna optimizacija pripreme proteina i zamrzavanje uzoraka i dalje su ključni za uspjeh. [7]

5. Predviđena tehnološka poboljšanja za uspostavu važnijeg statusa krio-EM u otkriću lijekova

Kako bi krio-EM postala tehnologija koju bi industrija lakše prihvatila, tri ključna područja moraju biti riješena:
(a) jednostavnost izrade uzoraka i praćenje uzoraka,
(b) vrijeme potrebno za prikupljanje i obradu skupa podataka i
(c) trošak.

Neki ključni aspekti krio-EM metodologije i poboljšanja instrumentacije aktivna su područja istraživanja kako bi se omogućila njezina buduća primjena u razvoju lijekova. To uključuje bolje nosače uzoraka i poboljšane alternativne metode za izradu mreža. Bolji direktni detektori elektrona, brojanje elektrona za poboljšanje detektorske kvantne učinkovitosti i veća brzina čitanja mogu povećati propusnost i smanjiti vrijeme prikupljanja podataka. Rutinska primjena i korištenje fazne ploče povećava kontrast za biomolekule mase do <80 kDa, a mnogi skupovi podataka koji su prikupljeni već su koristili faznu ploču. Sa softverskog gledišta, obrada slika/filmova u hodu kako su snimljeni omogućit će procjenu u stvarnom vremenu i kvalitetu podataka, kako bi bili sigurni da su prikupljeni samo najbolji podaci. Ovaj razvoj događaja će u konačnici poboljšati strukturno razlučivanje krio-EM, raspon uzoraka koji se mogu strukturno karakterizirati, a time i primjenjivost krio-EM u procesu razvoja lijekova.[7]

6. Zaključak

Dvije glavne metode za dobivanje trodimenzijskih struktura makromolekula potrebnih za razumijevanje bioloških procesa i razvoj novih lijekova su rendgenska difrakcija (XRD) i krio-elektronska mikroskopija (krio-EM).

Rendgenska difrakcija se temelji na interakciji X-zraka s elektronskim oblakom atoma u kristalu, a krio-EM se oslanja na interakciju elektrona s elektrostatskim poljem atoma u uzorku.

XRD metoda je glavna metoda strukturne analize uzoraka kristala i to najčešće u obliku praha, dok je krio-EM metoda određivanja strukture biomolekula i njihovih kompleksa u smrznutoj otopini. Glavne prednosti metode rendgenske difrakcije su: brzina identifikacije, minimalna količina uzorka, jednostavnost tumačenja dobivenih podataka te široka dostupnost XRD mjernih instrumenata.

Ova tehnika ima određena ograničenja koja se odnose na pripremu uzorka u kristalnom obliku biomolekula koje teško kristaliziraju, homogenost praškastih uzoraka, te analizu koja obično zahtijeva pristup standardnim referentnim podacima.

Značajnim napretkom u tehnologiji detektora, mikroskopima i obradi podataka omogućena je primjena i krio-EM u dizajnu lijekova. Poboljšanja u mikroskopima znači da uzorci mogu ostati u mikroskopu danima umjesto satima, što dopušta više podataka koje treba prikupiti iz svakog uzorka. Ključne prednosti krio-EM u odnosu na XRD odnose se na: niže zahtjeve za uzorkom, priprava kristala nije preduvjet za analizu, dostatnost nekoliko mikrolitara uzorka te mogućnost pročišćavanje *in silico* različitih sastavnih i/ili konformacijskih stanja uzorka.

Glavni nedostaci krio-EM su nisko razlučivanje, oštećenja uzorka koja mogu prouzrokovati elektroni, te skupoća instrumentacije.

Za očekivati je da će daljnja poboljšanja u pripremi uzorka zajedno s brzom identifikacijom promaknuti krio-EM u često korišteni alat u početnim fazama otkrića lijeka, I biti dopuna rendgenskoj kristalografiji i metodama NMR.

7. Literaturni izvori

1. Rodríguez, I.; Gautam, R.; Tinoco, A.D. Using X-ray diffraction techniques for biomimetic drug development, formulation, and polymorphic characterization *Biomimetics* **2021** *6*: 1–23, https://doi.org/10.3390/biomimetics6010001.

2. Mayer, C. X-Ray Diffraction in Biology: How Can we see DNA and proteins in three dimensions? Ch. 9, u X-ray Scattering, Ares A. E. (Ed.). London: IntechOpen; 2017, str. 207–218, Dostupno https://www.intechopen.com/books/5371, https://doi.org/10.5772/62609.

3. Anderson, C.A. The process of structure-based drug design, *Chem. Biol.* **2003**, *10*: 787–797, https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.09.002.

4. Bacchi, A. X-ray diffraction as a tool in the path from the design of an active pharmaceutical ingredient to the tablet on the shelf. *Rend. Fis. Acc. Lincei*. **2013**, 24: 109–114, https://doi.org/10.1007/s12210-012-0199-8

5. Sugiki, T.; Furuita, K; Fujiwara,T.; Kojima, C.; Current NMR techniques for structure-based drug discovery. *Molecules* **2018**, *23*: 148, https://doi.org/10.3390/molecules23010148.

6. Meier, A.; Söding, J. Automatic prediction of protein 3D structures by probabilistic multi-template homology modeling. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*: e1004343, https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004343.

7. Ceska, T.; Chun-Wa, C.; Cooke, R.; Phillips, C.; Williams, P.A. Cryo-EM in drug discovery. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*: 487–493, https://doi.org/10.1042/BST-2018-0267.

8. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., The Protein Data Bank. *Nucl. Acids. Res.* **2000**, *28*: 235–242, https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235.

9. http://www.rcsb.org

10. Maveyraud, L.; Mourey, L., Protein X-ray crystallography and drug discovery, *Molecules* **2020**, *25*: 1030–1048, https://doi.org/10.3390/molecules25051030.

11. Kendrew, J.C.; Dickerson, R.E.; Strandberg, B.E.; Hart, R.G.; Davies, D.R.; Phillips, D.C.; Shore, V.C. Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å. Resolution, *Nature* **1960**, *185*: 422–427, https://doi.org/10.1038/185422a0.

12. Watson, J.D.; Crick, F.H.C., Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **1953**, 171: 737–738.

13. Hodgkin, D.C., The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Adv. Sci.* **1949**, *6*: 85–89.

14. Deschamps, J.R. The role of crystallography in drug design, *AAPS J.* **2005**. *7*: Article 78.

15. Carroni, M.; Saibil, H.R. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods* **2016**, *95*: 78–85, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.023.

16. Jednačak, T.; Mikulandra, I.; Novak, P. Advanced Methods for Studying Structure and Interactions of Macrolide Antibiotics. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*: 7799, https://doi.org/10.3390/ijms21207799.

17. Renaud, J.-P.; Chari, A.; Ciferri, C.; Liu, W.-t., Rémigy, H.W.; Stark, H.; Wiesmann, C.. Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects. *Nat. Rev. Drug. Discov*. **2018**, *17*: 471–492, https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77.

18. Wigge, C.; Stefanovic, A.; Radjainia, M. The rapidly evolving role of cryo-EM in drug design, *Drug Discov. Today Technol.* **2020**, *3*8: 91–102, https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.12.003.

19. García-Nafría, J.; Tate, C.G. Cryo-electron microscopy: Moving beyond X-ray crystal structures for drug receptors and drug development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *60*: 51–71, https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023545.

20. Bartesaghi, A.; Aguerrebere, C.; Falconieri, V.; Banerjee, S.; Earl, L.A.; Zhu, X.; Grigorieff, N.; Milne, L.S.J.; Sapiro, G.; Wu, X.; Subramanian, S. Atomic resolution cryo-EM structure of β-galactosidase. *Structure* **2018**, *26*: 848–856.e3, https://doi.org/10.1016/j.str.2018.04.004.

21. Shalev-Benami, M.; Zhang, Y.; Rozenberg, H.; Nobe, Y.; Taoka, M.; Matzov, D.; Zimmerman, E.; Bashan, A.; Isobe, T.; Jffe, L.C.; Yonath, A.; Skiniotis, G. Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. *Nat. Commun.* **2017**, *8*: 1589, https://doi.org/10.1038/s41467-017-01664-4.

22. Banerjee, S.; Bartesaghi, A.; Merk, A.; Rao, P.; Bulfer, S.L.; Yan, Y.; Green, N.; Mroczkowski, B.; Neitz R.J.; Wipf, P.; Falconieri, V.; Deshaies, J.R.; Milne, L.S.J,; Huryn, D.; Arkin, M.; Subramaniam, S. 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* **2016**, *351*: 871–875, https://doi.org/10.1126/science.aad7974.

23. Tsai, J.C.; Miller-Vedam, L.E.; Anand, A.A.; Jaishankar, P.; Nguyen, H.C.; Renslo, A.R.; Frost, A.; Walter, P. Structure of the nucleotide exchange factor eIF2B reveals mechanism of memory-enhancing molecule. *Science* **2018**, *359*: eaaq0939, https://doi.org/10.1126/science.aaq0939.

8. Prilog 1

Tablica 1. Makromolekule i ligandi određeni uporabom krio-EM. Proteinska meta, molekulska masa, primjer molekulske mase male molekule liganda, indikacija bolesti (prilagođeno prema lit.[7])

Protein	Molekulska masa	Mala molekula	Bolest	Literaturni izvor
Leishmania ribosom	1.6 MDa	616	Parazit/infekcija	Shalev-Benami, M.; Zhang, Y.; Rozenberg, H.; Nobe, Y.; Taoka, M.; Matzov, D.; Zimmerman, E.; Bashan, A.; Isobe, T.; Jffe, L.C.; Yonath, A.; Skiniotis, G. Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. *Nat. Commun.* **2017**, *8*: 1589.
Glp1R kompleks	161 kDa	GLP1; 3.3 K	Tip 2 dijabetes, debljina	Zhang, Y.; Sun, B.; Feng, D.; Hu, H.; Chu, M.; Qu, Q.; Tarrasch, J.T., Li S, Kobilka, T.S.; Kobilka, B.K.; Skiniotis, G. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature* **2017**, *546*: 248–253.
Adenozin 2A receptor	144 kDa	Karboksamido adenozin; 308	Kardio i immune bolesti	García-Nafría, J.; Tate, C.G. *Cryo*-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *60*: 51–71.
Adenozine 1 receptor	130 kDa	Adenozin; 267	Ishemija–reperfuzija ozljeda, Neuropatska bol	Draper-Joyce, C.J.; Khoshouei, M..; Thal, D.M..; Liang, Y.-L.; Nguyen, A.T.N.; Furness, S.G.B. et al. Structure of the adenosine-bund human adenosine A1 receptor-Gi complex. *Nature* **2018**, *558*: 559–563.
5HT1B	112 kDa	Donitriptan; 404	Ponašanje, migrena	García-Nafría, J.; Tate, C.G. Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal structures for drug receptors and drug development. *Annu.Rev. Pharmacol.Toxicol.* **2019**, *60*: 51–71
Mu-opiodni receptor	154 kDa	DAMGO; 514	Analgezija	Koehl, A.; Hu, H.; Maeda, S.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Paggi, J.M.; Lettoraca, R.N.; Hilger, D.; Dawson, R.; Matile, H.; Schertler, F.X.G.; Grainer, S.; Weis, I.W.; Dror, O.R.; Manglik, A.; Skiniotis, G.;, Kobilka, B. Structure of the m-opioid receptor–Gi protein complex. *Nature* **201**8, *55*8: 547–552.
TRPV1 kanal	318 kDa	Resiniferatoksin; 628 Kapsazepin; 377	Analgezija	Gao, Y.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* **2016**, *53*4: 347–351.
TRPC6 kanal	293 kDa	Inhibitor BTDM; 340	Bubrežna bolest, regulacija Ca	Tang, Q.; Guo, W.; Zheng, L.; Wu, J.-X., Liu, M.; Zhou, X.; Zhang, X.; Chen, L. Structure of the receptor-activated human TRPC6 ion channels. *Cell. Res.* **2018**, *28*: 746–755.
DNA-PK	610 kDa	–	Onkologija	Sharif, H., Li, Y., Dong, Y., Dong, L., Wang, L. W., Mao, Y.; Wu, H. Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*: 7367–7372.
p97	650 kDa]	UPCD30245; 464	Onkologija	Banerjee, S.; Bartesaghi, A.; Merk, A.; Rao, P.; Bulfer, S.L.; Yan, Y.; Green, N.; Mroczkowski, B.; Neitzzz, R.J.; Wipf, P.; Falconieri, V.; Deshaies, J. R.; Milne, L.S.J.; Huryn, D. 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* **2016**, *351*: 871–875.
EIF2B transkripcijski faktor	545 kDa	Inhibitor; 451	Spoznaja	Zyryanova, A.F.; Weis, F.; Faille, A.; Alard, A.A.; Crespillo-Casado, A.; Sekine, Y.; Sekine, Y.; Harding, H.P.; Allen, F.; Parts, L.; Fromont, C.; Fischer, P.M.; Warren, A.J.; Ron, D. Binding of ISRIB reveals a regulatory site in the nucleotide exchange factor eIF2B. *Science* **2018**, *359*: 1533–1536.
Inzulinski receptor	221 kDa	–	Dijabetes	Ward, C.W.; Menting, J.G.; Lawrence, M.C. The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: sharpening the picture of insulin receptor activation. *BioEssays* **2013**, *35*: 945–954.
Tau	79 kDa (monomer)	–	Neurodegenerativna bolest	Fitzpatrick, A.W.P.; Falcon, B.; He, S.; Murzin, A.G.; Murshudov, G.; Garringer, H.J.;. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* **2017,** *547*: 185–190.