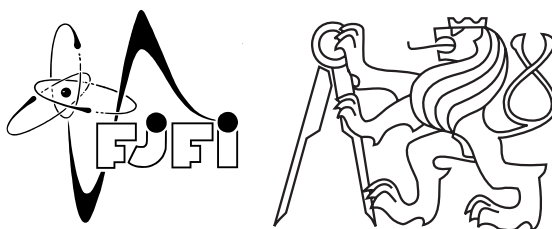


ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

Katedra inženýrství pevných látek

Obor: Inženýrství pevných látek



**Nízkomolekulární ligandy a inhibice S1-P1
nukleasy - krystalografická studie**

**Molecular fragments and inhibition of
S1-P1 nuclease - crystallographic study**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala: Bc. Karolína Špeldová

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Kovaľ, Ph.D.

Rok: 2024



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ
Katedra inženýrství pevných látek

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Karolína Špeldová**

Studijní program: **Inženýrství pevných látek**

Akademický rok: **2022/2023**

Název práce: **Nízkomolekulární ligandy a inhibice S1-P1 nukleasy -
krystalografická studie.**
(česky)

Název práce: **Molecular fragments and inhibition of S1-P1 nuclease -
crystallographic study.**
(anglicky)

Jazyk práce: **čeština**

Pokyny pro vypracování:

Diplomová práce je zaměřena na studium interakcí ligandů s aktivním místem S1-P1 nukleasy a s jeho okolím. Pomocí metod monokrystalové rentgenové difrakce budou detailně studovány způsoby vazby vybraných nízkomolekulárních ligandů a S1-P1 nukleasy se zaměřením na jejich potenciální inhibiční vlastnosti. Práce bude realizována v Laboratoři struktury a funkce biomolekul, BTÚ AV ČR, v.v.i. s využitím difraktometru Bruker D8 Venture v Centru molekulární struktury, BTÚ AV ČR, v.v.i. a na zdrojích synchrotronového záření – např. BessyII (Helmholtz-Zentrum Berlin).

Při řešení postupujte podle následujících bodů.

I. Rešeršní/teoretická část

- 1) S1-P1 nukleasy a vazba ligandů.
- 2) Rentgenová difrakce na monokrystalech.
- 3) Upřesňování modelu proteinu a jeho validace.
- 4) Principy vazby ligandů v proteinech.

II. Experimentální část

- 1) Příprava krystalů komplexů nukleasy s vybranými ligandy.
- 2) Difrakční experimenty, vyhodnocení dat.
- 3) Identifikace a analýza vazby ligandů.
- 4) Návrh možného inhibitoru S1-P1 nukleasy.

Doporučená literatura:

- [1] Rupp, B.: Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, Garland Science, New York 2010.
- [2] Liu, Q., Hendrickson, W.A: Methods in Molecular Biology 1607 (2017), 377-399.
- [3] Kovař, T., Dohnálek, J.: Biotechnology Advances 36 (2018), 603-612.
- [4] Kirsch, P., et al.: Phil. Molecules 24 (2019) 4309.

Jméno a pracoviště vedoucího práce:

Mgr. Tomáš Kovař, PhD., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

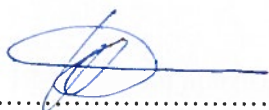
Jméno a pracoviště konzultanta:

doc. Ing. Petr Kolenko, PhD., Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT v Praze.

Datum zadání diplomové práce: 20. 10. 2022

Termín odevzdání diplomové práce: 3. 5. 2023

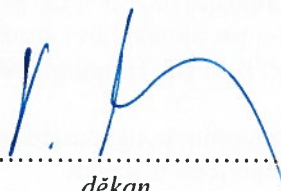
Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.



garant



vedoucí katedry



děkan

V Praze dne 20. 10. 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, software atd.) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne 07. 05. 2024

.....*Špeldová*.....
Bc. Karolína Špeldová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala skvělému Mgr. Tomášovi Kovařovi, Ph.D. za jeho trpělivost, vstřícnost, velmi cenné odborné rady a humornou náladu, kterou neztratil při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. a Ing. Janu Dohnálkovi, Ph.D. za jejich odborné rady a konzultace mé diplomové práce. Děkuji také Centru molekulární struktury za služby v laboratořích. Nakonec bych chtěla poděkovat i všem ostatním kolegům z Laboratoře Struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR za skvělý přístup a užitečné rady. Tato práce byla podpořena grantem Studentské grantové soutěže ČVUT č. SGS22/183/OHK4/3T/14.

Bc. Karolína Špeldová

Název práce:

Nízkomolekulární ligandy a inhibice S1-P1 nukleasy - krystalografická studie

Autor: Bc. Karolína Špeldová

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Inženýrství pevných látek

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Kovař, Ph.D.

Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec

Konzultant: doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.

Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT v Praze

Abstrakt: Studium vazby komplexů protein-ligand je dnes hojně využíváno například při objevování nových inhibitorů enzymů, a tedy i nových léčiv. V této studii jsem se zaměřila na nukleasu S1-P1 (*SmNuc1*) z oportunního lidského patogenu *Stenotrophomonas maltophilia* a použila metodu testování vazeb pomocí fragmentů ke zkoumání vazby malých organických ligandů do jejího aktivního místa. Krystaly *SmNuc1* byly namočeny do roztoků ligandů, vitrifikovány a podrobeny rentgenovému difrakčnímu experimentu na synchrotronu. Po zpracování difrakčních dat a vyřešení fázového problému molekulárním nahrazením byly struktury upřesněny a byly analyzovány vazby ligandů. Pět ze 49 testovaných ligandů bylo možné identifikovat jako ligandy vázající se do aktivního místa nukleasy *SmNuc1*. Na základě těchto výsledků byly navrženy čtyři různé organické molekuly, které by mohly být vhodnými inhibitory této nukleázy.

Klíčová slova: makromolekulární krystalografie, nukleasa, testování vazeb ligandu, rentgenová strukturní analýza, molekulární nahrazení

Title:

Molecular fragments and inhibition of S1-P1 nuclease - crystallographic study

Author: Bc. Karolína Špeldová

Abstract: The study of the protein-ligand complexes is nowadays widely used, for example, in the discovery of new inhibitors of enzymes and so possibly new drugs. In this study, I focused on the S1-P1 nuclease (*SmNuc1*) from the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* and used a fragment screening method to investigate the binding of small organic ligands into its active site. Crystals of *SmNuc1* have been soaked in ligand solutions, vitrified, and subjected to an X-ray diffraction data measurement at the synchrotron. After processing diffraction data and solving the phase problem by molecular replacement, the structures were refined, and the ligand bindings were analyzed. Five out of 49 tested ligands could be identified as binding into the active site of the *SmNuc1* nuclease. Based on these results, four different organic molecules have been designed that could be suitable inhibitors of this nuclease.

Key words: macromolecular crystallography, nuclease, fragment screening, X-ray structural analysis, molecular replacement

Obsah

Úvod	10
1 Teoretická část	11
1.1 Makromolekulární krystalografie	11
1.2 Difrakce záření	12
1.3 Fázový problém	12
1.3.1 Pattersonova funkce	13
1.4 Molekulární nahrazení	14
1.4.1 Rotační funkce	14
1.4.2 Translační funkce	15
1.4.3 Úspěšnost vyřešení fázového problému	16
1.5 Upřesňování strukturního modelu proteinu	16
1.6 Kontrola kvality strukturního modelu	18
1.6.1 Validace přítomnosti a pozice ligandu	19
1.7 Rodina nukleas S1-P1	20
1.8 Hledání inhibitoru nukleasy z rodiny S1-P1	23
2 Materiály a metody	24
2.1 Příprava proteinového vzorku	24
2.2 Krystalizace vzorku	24
2.3 Příprava komplexů protein-ligand	25
2.4 Provedení difrakčního experimentu	25
2.5 Zpracování difrakčních dat	26
2.6 Vyřešení fázového problému	27

2.7	Upřesňování strukturních modelů	27
2.8	Kontrola kvality strukturních modelů	29
2.9	Návrh inhibitoru	30
3	Výsledky a diskuze	31
3.1	Struktura nukleasy <i>SmNuc1</i> s navázanými fragmenty	31
3.2	Analýza způsobu vazby fragmentů	32
3.2.1	<i>SmNuc1_{C3}</i>	33
3.2.2	<i>SmNuc1_{D10}</i>	35
3.2.3	<i>SmNuc1_{F31}</i>	37
3.2.4	<i>SmNuc1_{B8}</i>	39
3.2.5	<i>SmNuc1_{F9}</i>	43
3.3	Návrh inhibitoru	45
	Závěr	49
	Seznam použitých zdrojů	50
	Přílohy	55

Úvod

Proteiny, velmi významná skupina biologických makromolekul, v živých organismech plní mnoho funkcí (jsou katalyzátory biochemických reakcí, enzymy, hormony, a tak podobně). Funkci proteinu může definovat i její vazba, a to buď vazba mezi dvěma proteiny, nebo navázání neproteinové molekuly na protein. Studium vazeb mezi proteiny a jinými molekulami (ligandy) je možné provádět několika způsoby. Například v roztocích lze analyzovat možné vytvoření vazby pozorováním změny aktivity proteinu. Přítomnost navázaného ligandu lze studovat i pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR), nejvíce vhodnou metodou pro analýzu atomárních detailů vazeb mezi ligandy a proteiny je však rentgenová krystalografická studie [1].

Výhoda rentgenové strukturní analýzy spočívá ve schopnosti odhalit trojrozměrné uspořádání atomů i vazeb mezi proteiny a dalšími navázanými molekulami s přesností až na atomární úrovni. Rentgenová krystalografická studie zahrnuje i přípravu vzorku, který je zkrystalizován a následně podroben sběru dat při difrakčním experimentu. Správná interpretace naměřených dat z rentgenové difrakce je klíčová k vytvoření strukturního modelu proteinu. Upřesňováním strukturních modelů vůči naměřeným difrakčním datům dosáhneme spolehlivých struktur, které můžeme použít k popisu samotných proteinů i k popisu vazeb mezi proteinem a navázanou molekulou (ligandem).

Použitím rozsáhlé knihovny ligandů je možné určit typy ligandů, které se mohou navázat do aktivního místa námi zkoumaného proteinu. Výhodou testování vazeb pomocí fragmentů je možnost využití velkého množství molekul za poměrně krátký čas. Tyto molekuly nám při úspěšném navázání do aktivního místa dovolují lépe pochopit a popsat vazbu mezi ligandem a proteinem. Pomocí výsledků z takové krystalografické studie lze následně určit potenciální inhibiční vlastnosti vybrané skupiny ligandů a případně navrhnout nový selektivní a účinnější inhibitor zkoumaného proteinu.

Tato práce se zabývá krystalizací nukleasy z gram-negativní bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* (*SmNuc1*) [2] v komplexu s několika různými ligandy a návrhem nového inhibitoru této nukleasy.

Kapitola 1

Teoretická část

1.1 Makromolekulární krystalografie

Buňky živých organismů obsahují biologické makromolekuly, tedy sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Jednou z metod pro stanovení struktur biologických makromolekul je rentgenová strukturní analýza. V této metodě je zahrnuta difrakce rentgenového záření na krystalech zkoumaných biologických molekul, které je potřeba připravit ve vhodné velikosti a kvalitě. Makromolekulární krystalografie je klíčovým nástrojem strukturní biologie, který pomáhá pochopit funkce molekul a díky kterému je možné navrhnout například jejich inhibitory a následně vhodná léčiva.

Krystalizace některých biologických molekul je souhrnný proces vyžadující optimalizaci podmínek pro vznik a růst monokrystalů vhodných k rentgenové difrakční analýze. Samotný proces krystalizace probíhá ve dvou hlavních krocích nukleace a růst.

V prvním kroku, tzv. nukleační fázi, přejdou molekuly ze zcela neuspořádaného stavu do stavu uspořádaného. V nasyceném roztoku se začnou postupně shlukovat a tvořit krystalizační zárodky. Krystalizační zárodky musí dosáhnout určité velikosti pro jejich stabilizaci. V druhém kroku, růstové fázi, se jednotlivé molekuly v zárodku vzájemně orientují a uspořádávají na povrchu krystalu, čímž postupně roste krystal až do finální velikosti. Při dosažení rovnovážného stavu mezi volnými molekulami v roztoku a nově vzniklými krystaly končí růstová fáze.

Příprava vzorku pro krystalizaci, tedy ověření čistoty, koncentrace a monodisperzity vzorku, je podrobněji popsána v Bakalářské práci [3], stejně jako metody krystalizace vzorku a jeho následná vitrifikace.

1.2 Difrakce záření

Jak již bylo zmíněno, jednou ze základních metod makromolekulární krystalografie je rentgenová strukturní analýza. Podstatou rentgenové strukturní analýzy je difrakce neboli interference elektromagnetického záření po jeho interakci s hmotou. Difrakce může nastat při použití různých typů záření (elektronové, neutronové a rentgenové).

Nechť na pravidelně uspořádanou mřížku krystalu dopadá rovinná monochromatická elektromagnetická vlna o vlnové délce λ a vlnovém vektoru \mathbf{k}_0 . Předpokládejme, že vlna bude pružně rozptýlena (nastane tzv. *Thomsonův rozptyl* [4]). Vlnová délka rozptýlené a dopadající vlny se bude lišit směrem, přičemž bude platit $|\mathbf{k}_0| = |\mathbf{k}|$.

Nechť dále \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} jsou vektory dané krystalové mřížky. Ke konstruktivní interferenci rozptýlených vln dojde v případě, že platí *Laueho difrakční podmínky* (vlevo)

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi h & \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} &= h, \\ \mathbf{b} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi k & \xrightarrow{\mathbf{S} = \frac{\mathbf{k} - \mathbf{k}_0}{2\pi}} \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} &= k, \\ \mathbf{c} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi l & \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} &= l, \end{aligned} \quad (1.1)$$

kde celá čísla h, k, l charakterizují řád reflexe a nazývají se *Laueho indexy*. Laueho rovnice byly dále zjednodušeny dosazením rozptylového vektoru $\mathbf{S} = \frac{\mathbf{k} - \mathbf{k}_0}{2\pi}$ (vpravo).

Dále uvažujme \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* , \mathbf{c}^* za vektory reciprokého prostoru. Pro vektory reciprokého prostoru a mřížkové vektory platí cyklicky záměnné rovnosti $\mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* = 1$, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}^* = 0$, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{c}^* = 0$. Vektor reciproké mřížky je definován jako $\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$. Laueho difrakční podmínky jsou splněny, pokud je rozptylový vektor \mathbf{S} shodný s vektorem reciproké mřížky \mathbf{H}_{hkl} .

Z výše uvedených tvrzení pak lze jednoduše odvodit i *Braggův zákon*

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta, \quad (1.2)$$

přičemž uvažujeme, že platí vztah $|\mathbf{H}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}}$ [4, 5].

1.3 Fázový problém

Schopnost struktury rozptylovat záření popisuje veličina strukturní faktor $\mathbf{F}(\mathbf{S})$, který je definován vztahem

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i(\mathbf{r} \cdot \mathbf{S})} dV, \quad (1.3)$$

kde $\mathbf{S} = \frac{\mathbf{k} - \mathbf{k}_0}{2\pi}$ je spojitě proměnný rozptylový vektor v reciprokém prostoru, V je objem základní buňky a $\rho(\mathbf{r})$ elektronová hustota v daném místě krystalu $\mathbf{r} = (ax, by, cz)$ [6]. Vektory \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} jsou mřížkové vektory a (x, y, z) jsou relativní souřadnice v základní buňce.

Roznásobením skalárního součinu uvnitř exponenciály v (1.3) při současném splnění *Laueho difrakční podmínky* (1.1) pro zvolenou rovinu (hkl) dostaneme tvar součinu

$$\mathbf{r} \cdot \mathbf{S} = (\mathbf{a}x + \mathbf{b}y + \mathbf{c}z) \cdot \mathbf{S} = \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}x + \mathbf{b} \cdot \mathbf{S}y + \mathbf{c} \cdot \mathbf{S}z = hx + ky + lz. \quad (1.4)$$

Strukturní faktor lze tedy s použitím indexů roviny (hkl) zapsat místo $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ následovně

$$\mathbf{F}_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV. \quad (1.5)$$

Při standardní monokrystalové difrakci uvažujeme vznik signálu pouze v diskrétních směrech, a proto můžeme strukturní faktor zapsat taktéž ve tvaru

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{hkl} \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)}. \quad (1.6)$$

Cílem krystalografie je vyřešení struktury, kterou definuje funkce elektronové hustoty $\rho(x, y, z)$. Použitím inverzní Fourierovy transformace strukturního faktoru \mathbf{F}_{hkl} lze spočítat funkci elektronové hustoty

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\mathbf{F}_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz) + i\alpha_{hkl}}, \quad (1.7)$$

kde (x, y, z) jsou relativní souřadnice v základní buňce o objemu V , (h, k, l) označují indexy reflexí a α_{hkl} jsou fáze strukturního faktoru reflexe s Millerovými indexy (hkl) [6].

Komplikace nastává při samotném difrakčním experimentu, při kterém lze naměřit pouze intenzitu difraktovaného záření, pro niž platí vztah $I_{hkl} = |\mathbf{F}_{hkl}|^2$. Intenzita difraktovaného záření nenesou žádnou informaci o fázích jednotlivých reflexí α_{hkl} a my z ní můžeme určit pouze hodnotu $|\mathbf{F}_{hkl}|$. Tato komplikace při určování struktury se nazývá *fázový problém* a lze ji vyřešit několika nepřímými metodami (například metoda molekulárního nahrazení, metoda isomorfního nahrazení či metoda anomálního rozptylu) nebo přímými metodami (například *ab initio* metoda *Shake-and-bake*) [5, 6].

1.3.1 Pattersonova funkce

Při řešení fázového problému lze použít tzv. *Pattersonova funkce*, která je definována následujícím vztahem

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\mathbf{F}_{hkl}|^2 \cos [2\pi(hu + kv + lw)] \quad (1.8)$$

pro relativní souřadnice $\mathbf{u} = (u, v, w)$ v *Pattersonově mapě* [5, 6]. Již z definice vyplývá možnost výpočtu Pattersonovy funkce pouze pomocí naměřených intenzit $I_{hkl} \sim |\mathbf{F}_{hkl}|^2$ i bez znalosti fází jednotlivých reflexí α_{hkl} .

Pattersonovu funkci je možné vyjádřit také jako konvoluci funkce elektronové hustoty a její vlastní inverze

$$P(\mathbf{u}) = \int_V \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}-\mathbf{u})d\mathbf{r}, \quad (1.9)$$

přičemž integrace probíhá přes objem základní buňky V . Výstupem Pattersonovy funkce je Pattersonova mapa zobrazující pravděpodobnostní rozložení meziatomových vektorů v krystalu. Ze vztahů (1.8) a (1.9) vyplývají některé užitečné vlastnosti Pattersonovy funkce. Pattersonova funkce má stejnou periodicitu jako funkce elektronové hustoty. Maxima funkce $P(\mathbf{u})$, tedy i největší píky v Pattersonově mapě, nastávají pro taková \mathbf{u} , která odpovídají typickým meziatomovým vzdálenostem ve struktuře. Pattersonova mapa je vždy centrosymetrická, a proto se dá vztah pro Pattersonovu funkci (1.8) zapsat také v exponenciálním tvaru

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\mathbf{F}_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}. \quad (1.10)$$

1.4 Molekulární nahrazení

Metoda molekulárního nahrazení (*molecular replacement*) je metodou využívanou k řešení fázového problému. Pro tuto metodu je nezbytná znalost modelové struktury, kterou může být například homologní proteinová struktura, nebo již vyřešená struktura stejného proteinu například v jiné prostorové grupě [6]. Vyšší procento podobnosti modelové struktury obvykle zaručuje vyšší pravděpodobnost vyřešení fázového problému. Modelová struktura by měla mít minimálně 30% shodu v sekvenci aminokyselin. Použití metody molekulárního nahrazení k řešení fázového problému je možné například v programech MolRep [7] či Phaser [8].

Principem molekulárního nahrazení je porovnání Pattersonových funkcí modelové a řešené struktury. Po umístění modelové struktury do základní buňky řešené struktury lze porovnáním získat odhady fází jednotlivých reflexí.

Pattersonova funkce modelové struktury bude pro dostatečnou shodu obsahovat rysy Pattersonovy funkce řešené struktury vypočtené z naměřených dat. Určení pozice modelové struktury v základní buňce řešené struktury je dáno nejprve rotací a následnou translací modelové struktury. Tento proces lze vyjádřit vztahem

$$\mathbf{X}' = \mathbb{R}\mathbf{X} + \mathbf{t}, \quad (1.11)$$

ve kterém \mathbb{R} je rotační matice, která otáčí strukturou ze souřadnic \mathbf{X} . Translační vektor \mathbf{t} pak tyto souřadnice posune do nových souřadnic \mathbf{X}' .

1.4.1 Rotační funkce

V prvním kroku molekulárního nahrazení je hledána vzájemná orientace Pattersonových funkcí modelu a řešené struktury. Každou dvojici atomů ve stejné molekule

definují v Pattersonově mapě krátké vektory, tzv. *self-Pattersonovy vektory*. V případě velmi podobné modelové a řešené struktury budou jejich Pattersonovy mapy v okolí počátku téměř identické. Lišit se budou pouze orientací. Vzájemný překryv pak určuje *rotační funkce*. Ta je definována jako konvoluce Pattersonových funkcí řešené a modelové struktury pro různé vzájemné rotace

$$R(\mathbb{R}) = \int_U P_O(\mathbf{u})P_M(\mathbb{R}\mathbf{u})d\mathbf{u}, \quad (1.12)$$

kde $P_O(\mathbf{u})$ je Pattersonova funkce řešené struktury vypočítaná ze získaných intenzit, $P_M(\mathbb{R}\mathbf{u})$ je Pattersonova funkce modelu po rotaci kolem os procházejících počátkem souřadnic. U je oblast Pattersonovy mapy kolem počátku. Správná orientace modelové struktury v řešené struktuře je dána při největším překryvu Pattersonových funkcí, kdy rotační funkce $R(\mathbb{R})$ dosahuje nejvyšších hodnot [6].

1.4.2 Translační funkce

V druhém kroku molekulárního nahrazení je hledána výsledná pozice modelové molekuly v základní buňce řešené molekuly. Každá dvojice atomů z různých molekul je v tomto případě definována tzv. *cross-Pattersonovými vektory*. Tyto vektory jsou na rozdíl od self-Pattersonových vektorů delší a mění se při změně polohy molekuly. Translace Pattersonovy funkce modelové struktury tedy způsobí změnu cross-Pattersonových vektorů. Podobně jako v případě hledání správné orientace (viz. kapitola 1.4.1) je vzájemný překryv Pattersonových funkcí v závislosti na vzájemném posunutí dán *translační funkcí*, která je definována jako konvoluce Pattersonových funkcí řešené a modelové struktury

$$T(\mathbf{t}) = \int_V P_O(\mathbf{u})P_{M1,2}(\mathbf{u}, \mathbf{t})d\mathbf{u}, \quad (1.13)$$

kde V je objem základní buňky řešené struktury a $P_{M1,2}(\mathbf{u}, \mathbf{t})$ je *cross-Pattersonova funkce* dvou molekul modelové struktury, které jsou spojeny krystalovou symetrií a vzájemně posunuty podle translačního vektoru \mathbf{t} [6].

Cross-Pattersonova funkce dvou molekul modelové struktury vychází ze základního vztahu (1.9) pro Pattersonovu funkci

$$P_{Mi,j}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) = \int_V \rho_i(\mathbf{r})\rho_j(\mathbf{u} - \mathbf{r})d\mathbf{r} = \sum_{\mathbf{h}} F_M(\mathbf{h})F_M^*(\mathbf{h}\mathbb{R}')e^{-2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{t}}e^{2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{u}}, \quad (1.14)$$

kde F_M je strukturní faktor modelové molekuly, \mathbb{R}' je orientační matice popisující vzájemnou orientaci dvou molekul a $\mathbf{h} = (h, k, l)$. Jestliže zohledníme počet molekul v základní buňce daný prostorovou grupou a vyloučíme self-Pattersonovy vektory, získáme vztah pro translační funkci závislý na strukturních faktorech a naměřených intenzitách

$$T(\mathbf{t}) = \sum_{\mathbf{h}} \left(|F_O(\mathbf{h})|^2 - \sum_{n=1}^N |F_{M,n}(\mathbf{h})|^2 \right) F_M(\mathbf{h})F_M^*(\mathbf{h}\mathbb{R}')e^{-2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{t}}, \quad (1.15)$$

kde $|F_O|^2$ je intenzita naměřená při experimentu, $|F_{M,n}|^2$ intenzita n -té molekuly modelové struktury a N je počet molekul v základní buňce modelu. Vztahy (1.14) a (1.15) jsou blíže rozvedené v [6].

1.4.3 Úspěšnost vyřešení fázového problému

Po úspěšném umístění modelové molekuly do řešené struktury lze odhadnout fáze reflexí, tedy i strukturních faktorů. Z nich jsme schopni dopočítat mapu elektronové hustoty, která udává první model řešené struktury. Úspěšnost vyřešení fázového problému lze kvantifikovat několika statistickými veličinami, které ověřují shodu získaného modelu s experimentálními daty.

Tuto shodu ověřujeme pomocí residuálu mezi F_O a F_C , tedy R -faktoru

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} ||F_O(\mathbf{h})| - k|F_C(\mathbf{h})||}{\sum_{\mathbf{h}} |F_O(\mathbf{h})|}, \quad (1.16)$$

kde F_O je strukturní faktor získaný z experimentu, F_C strukturní faktor vypočítaný ze získaného modelu a k je škálovací faktor [9].

Dalším indikátorem shody modelu s daty je Pearsonův korelační koeficient mezi strukturními faktory F_O a F_C

$$CC(F_O, F_C) = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \left(|F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right) \left(|F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)}{\sqrt{\sum_{\mathbf{h}} \left(|F_O(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_O(\mathbf{h})|^2} \right)^2 \left(|F_C(\mathbf{h})|^2 - \overline{|F_C(\mathbf{h})|^2} \right)^2}}. \quad (1.17)$$

R -faktor může nabývat hodnot od 0 do 1, přičemž hodnoty pod 0,2 naznačují vysokou kvalitu strukturního modelu. Hodnoty $CC(F_O, F_C)$ spadají také do intervalu od 0 do 1, s rostoucí hodnotou kvalita strukturního modelu roste. Rozhodujícími faktory, které ovlivňují úspěšnost molekulárního nahrazení, jsou především kvalita difrakčních dat a shoda modelu s řešenou strukturou. Úspěšnost je dále ovlivněna i velikostí použitého modelu (s velikostí modelu roste počet maxim v $P(\mathbf{u})$, resp. informací), přítomnost α -šroubovic (opakování hmoty v jednom směru a podobná struktura šroubovic) a pohyblivost jednotlivých podjednotek (různé možnosti vzájemného pootočení podjednotek, často vyřešené pomocí programu Phaser [8]).

Hlavním ukazatelem úspěšného vyřešení fázového problému je výsledná podoba elektronové hustoty, a především možnost dalšího modelování a upřesňování struktury.

1.5 Upřesňování strukturního modelu proteinu

Po vyřešení fázového problému, například metodou molekulárního nahrazení uvedenou v kapitole (1.4), lze pomocí vypočítané elektronové hustoty sestavit alespoň

část modelu řešené struktury. Fáze v takovém modelu jsou často určeny nepřesně, proto je nutné strukturní model upřesnit. Kvalita upřesňování modelu závisí na rozlišení nasbíraných dat a úspěšnosti vyřešení fázového problému.

Parametry modelu, které jsou upřesňovány, jsou souřadnice jednotlivých atomů v základní buňce $\mathbf{r}_i = (x_i, y_i, z_i)$ a jejich B-faktory (respektive Debyeův-Wallerův faktor [4]). B-faktor je ukazatelem relativního vibračního pohybu různých částí struktury, přičemž se snižujícím se B-faktorem se zvyšuje kvalita uspořádanosti struktury. Vysoké B-faktory atomů značí výrazné teplotní kmity atomů. B-faktor jednotlivých atomů je definován vztahem

$$B = \frac{8}{3}\pi^2\langle u^2 \rangle, \quad (1.18)$$

kde $\langle u^2 \rangle$ je střední kvadratická výchylka daného atomu [10]. B-faktor je udáván v jednotkách Å^2 . Parametry upřesňování jsou buď čtyři (tři pro souřadnice a jeden izotropní B-faktor), nebo jich je devět (tři pro souřadnice a šest pro anizotropní B-faktor, který je popsán symetrickým tenzorem druhého řádu).

Strukturní model je možné upřesňovat v přímém prostoru vůči funkci elektronové hustoty $\rho(x, y, z)$. V přímém prostoru jsou prováděny pouze nutné manuální změny modelu, jakými mohou být například různé rotamery residuí. Tyto úpravy jsou nejčastěji prováděny pomocí programu Coot [11] a jejich správnost musí být následně ověřena. Většina upřesňovacích procesů však probíhá v recipročním prostoru vůči pozorovaným hodnotám strukturních faktorů $|F_O(\mathbf{h})|$. Upřesňovaným parametrům v tomto případě odpovídají vypočítané strukturní faktory $|F_C(\mathbf{h})|$ a fáze $\alpha_C(\mathbf{h})$ jednotlivých reflexí.

Metoda nejmenších vážených čtverců

Metoda nejmenších vážených čtverců je jednou z metod využívaných k upřesňování v recipročním prostoru. Jejím principem je minimalizace výrazu

$$Q = \sum_{\mathbf{h}} w_{\mathbf{h}} (|F_O(\mathbf{h})| - |F_C(\mathbf{h})|)^2, \quad (1.19)$$

kde $w_{\mathbf{h}}$ je váhový faktor [6]. Metoda nejmenších vážených čtverců je používána pouze pokud jsou experimentální data naměřena ve velmi vysokém rozlišení, jinak metoda nekonverguje. Tuto metodu pro upřesňování využívá například program SHELXL [12] obsažen v programovém balíku SHELX [13].

V případě využití metody nejmenších čtverců je minimalizován výraz (1.19) zahrnující i stereochemický člen

$$Q = w_{exp} \sum_{\mathbf{h}} w_{\mathbf{h}} (|F_O(\mathbf{h})| - |F_C(\mathbf{h})|)^2 + \sum_{\mathbf{h}} (|G_O(\mathbf{h})| - |G_I(\mathbf{h})|)^2, \quad (1.20)$$

kde G_O , G_I jsou pozorované a ideální geometrické členy a w_{exp} je váhový koeficient naměřených dat.

Metoda největší pravděpodobnosti

Metoda největší pravděpodobnosti je zobecněním metody nejmenších čtverců, rychleji však konverguje do globálního minima z většího poloměru konvergence. Tato metoda je řešením pro upřesňování struktur, jejichž data nemají tak vysoké rozlišení. Metodu největší pravděpodobnosti využívá například program Phenix.refine [14] zahrnutý v programovém balíku Phenix [15], nebo Refmac5 [16] z programového balíku CCP4 [17].

Snahou při upřesňování strukturního modelu je upřesnění co nejvíce parametrů zároveň. U biologických makromolekul je však počet upřesňovaných parametrů velmi vysoký kvůli počtu atomů v molekule. K upřesňování se proto jako další zdroj dat využívá i ideální geometrie aminokyselin či ligandů, které jsou obsaženy v molekule a jejichž typické parametry jsou určeny velmi přesně ze struktur malých molekul. Tyto informace jsou využity při upřesnění délek vazeb a vazebných úhlů, které při upřesňování struktury figurují jako dodatečné parametry.

Při upřesňování je vybrán náhodný soubor reflexí, takzvaný *testovací soubor* tvořený 5-10 % pozorovaných reflexí. Tento soubor slouží jako kontrolní soubor, který pomáhá analyzovat, jestli úloha konverguje ke globálnímu minimu. Samotné upřesňování probíhá pouze na nezávislém *pracovním souboru*, který je tvořen zbytkem pozorovaných reflexí. Podobně jako při řešení fázového problému je kvalita upřesňování kontrolována pomocí R -faktoru a Pearsonova korelačního koeficientu $CC(F_O, F_C)$. Pro testovací i pracovní soubor reflexí se počítá R -faktor zvlášť. R_{work} odpovídá pracovnímu souboru reflexí, R_{free} pak testovacímu souboru reflexí. Konvergenci pouze k lokálnímu minimu značí pokles R_{work} a současný růst R_{free} . Úspěšnou konvergenci ke globálnímu minimu, a tedy úspěšné upřesňování, naznačuje současný pokles R_{free} a R_{work} . V posledním kroku je nutné upřesnit model na celém souboru reflexí, tedy zahrnout do upřesňování i testovací soubor a ověřit konvergenci. Finální hodnota R -faktoru upřesněného strukturního modelu by se měla pohybovat mezi 10 až 20 % [18].

1.6 Kontrola kvality strukturního modelu

Při procesu upřesňování strukturního modelu je nutné zkontrolovat jeho kvalitu. Kontrolováním kvality i v průběhu upřesňování nalézáme místa v modelu, jejichž oprava je pro správnou interpretaci struktury nezbytná.

Při posuzování kvality strukturního modelu je věnována pozornost především těmto faktorům:

- stereochemie - porovnávání odchylek od ideálních délek vazeb, vazebných úhlů, dihedrálních úhlů či chiralit,

- kontrola odchylek od ideálních torzních úhlů v Ramachandrově grafu¹,
- průměrné hodnoty B -faktorů proteinu, ligandů či vod, analýza jejich průběhů a extrémních hodnot,
- odchylky od rotamerů - výběr ideální konformace postranních řetězců aminokyselinových residuí,
- blízké kontakty - jsou detekovány příliš krátké vzdálenosti mezi atomy, které nejsou spojené vazbou v jedné asymetrické jednotce i mezi atomy v různých asymetrických jednotkách (*symmetry-related clashes*).

Kvalitu strukturního modelu můžeme kontrolovat pomocí několika nástrojů, například v programu Coot [11], MolProbity [19], PRO-CHECK [20] nebo OneDep [21]. Výstup z některého výše uvedeného nástroje slouží jako návod pro úpravu míst ve struktuře, která nesplňují požadovaná kritéria (například špatné rotamery či kolize residuí) a jejichž oprava je nezbytná. Po jakýchkoliv úpravách musí být strukturní model znovu upřesněn a zopakován celý kontrolní proces [22].

1.6.1 Validace přítomnosti a pozice ligandu

V případě, že mapa elektronové hustoty vykazuje přítomnost navázaného ligandu, je třeba ligand do strukturního modelu doplnit. Doplnění ligandu probíhá v přímém prostoru například v programu Coot [11]. Následně je nezbytné strukturní model upřesnit s doplněným ligandem a provést znovu kontrolu kvality strukturního modelu.

Identifikace navázaného ligandu v makromolekulární struktuře často není snadná. Přítomnost ligandu je naznačena mapou elektronové hustoty v daném místě. Úspěšnost přesného určení přítomnosti a pozice ligandu se významně snižuje s klesajícím rozlišením. Interakci mezi ligandem a proteinem často zprostředkovávají molekuly vody, které však při nižším rozlišení (kolem 3 Å) často nedokážeme pozorovat. Pokud se ligandy naváží jen do některých molekul proteinu krystalu (mají tedy pouze částečnou okupanci), nebo pokud jsou příliš malé, jejich identifikace je náročná i ve vyšším rozlišení [23].

Při doplnění ligandu do míst strukturního modelu, která naznačuje mapa elektronové hustoty, je kladen důraz především na stereochemii ligandu. Proto je před použitím ligandu důležité vybrat správnou knihovnu ligandů a ověřit stavbu molekuly ligandu a jeho stereochemii. Ke stavbě ligandu do strukturního modelu je možné využít program Coot [11, 24].

Validační program wwPDB [25] využívá pro kontrolu stereochemie program Mogul [26] od *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC), který kontroluje pře-

¹Ramachandrov graf je graf s osami Φ , Ψ sloužící k porovnání torzních úhlů residuí v aminokyselinovém řetězci. Torzní úhly určují vazebné napojení residua na řetězec. Graf rozděluje jednotlivá residua do několika oblastí - preferovaná, povolená a zakázaná oblast, ve které by se neměla nacházet žádná residua. Ramachandrov graf byl sestrojen G. N. Ramachandranem v roce 1963.

devším délkou vazeb a úhlů v ligandu. K tomuto je využita knihovna *Cambridge Structure Database* (CSD [27]), která definuje ideální stereochemii v molekulách ligandů získaných z krystalových struktur malých molekul [23]. Do kontroly kvality ligandů zahrnuje validační program také ukazatele dobré shody lokální elektronové hustoty a *R*-faktorů v přímém prostoru (RSR). Meziatomární blízké kontakty jsou porovnávány pomocí MolProbity [19].

K ověření pozice ligandu je využíváno tzv. *polder mapy*, která je využívána jako nástroj pro nalezení ligandů. Polder mapa je OMIT mapa², která vylučuje difrakční vliv rozpouštědla na daném místě. Polder mapa je vytvářena typicky kolem několika residuů nebo ligandu, nikoliv okolo jednotlivých atomů nebo naopak kolem celé molekuly. Nicméně určení ideálního poloměru pro vytvoření polder mapy je složité. Polder mapu generuje například program Phenix.polder [15, 30].

Další možnou kontrolou přítomnosti ligandu a jeho pozice je vytvoření kompozitní slepé mapy (*composite omit map*). Kompozitní slepá mapa je vytvořena spojením několika map, z nichž každá byla vytvořena zvlášť a u každé byla vynechána jiná část struktury. Tento postup umožňuje vypočítat mapu pro strukturní model s výrazně menším zkreslením od vypočítaných fází. Nevýhodou této mapy je její časová a výpočetní náročnost. Kompozitní slepou mapu počítá například program Phenix [15].

1.7 Rodina nukleas S1-P1

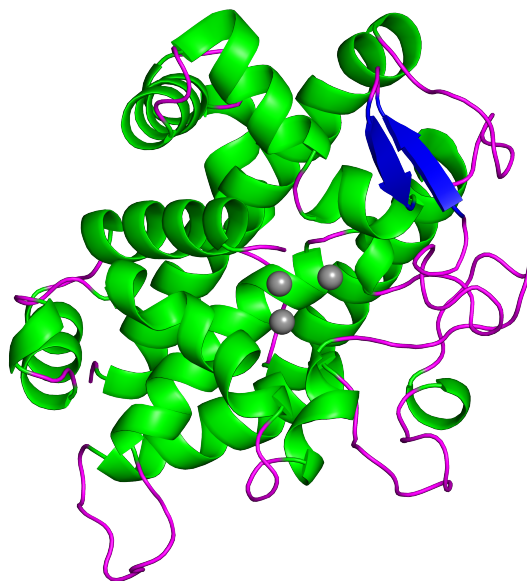
Nukleasy, tedy hydrolasy schopné štěpení fosfodiesterových vazeb nukleových kyselin, se v organismech mohou podílet na replikaci, rekombinaci anebo opravě poškozené DNA. Podle typu nukleové kyseliny, jejíž vazby štěpí, je možné nukleasy rozdělit na RNasy či DNasy. Nukleasy je možno rozdělit i podle počtu a typu kovových iontů, které formují aktivní místo a které jsou ve většině případů nezbytnou součástí katalytických reakcí.

Nukleasy, které jsou nespecifické vzhledem k cukrům obsaženým v nukleových kyselinách, jsou schopny štěpit jak RNA, tak i DNA. Takové nukleasy jsou například ty z rodiny S1-P1. Vyskytují se v houbách, rostlinách i některých prvocích a bakteriích. Nukleasy z rodiny S1-P1 zastávají různé funkce, u hub mají například významnou funkci při zisku nukleosidů nebo nukleotidů z prostředí. Nukleasy z rodiny S1-P1 vyskytující se v leishmaniích jsou předmětem výzkumu kvůli jejich možnému využití při hledání nových léčiv proti onemocnění leishmanióze, jehož některé formy mohou být smrtelné [31].

Primární struktura nukleas z rodiny S1-P1 se vyznačuje přítomností tryptofanu na N-konci. Postranní řetězec tohoto residua je součástí hydrofobního jádra proteinu, hlavní řetězec tvoří část aktivního místa. Sekundární struktura nukleas z rodiny S1-

²OMIT mapa je taková mapa elektronové hustoty, do jejíhož výpočtu nejsou zahrnuty atomy z určité oblasti. Fáze z této oblasti tedy nezkrusují výpočet fází ani následné upřesňování distribuce elektronů [28, 29].

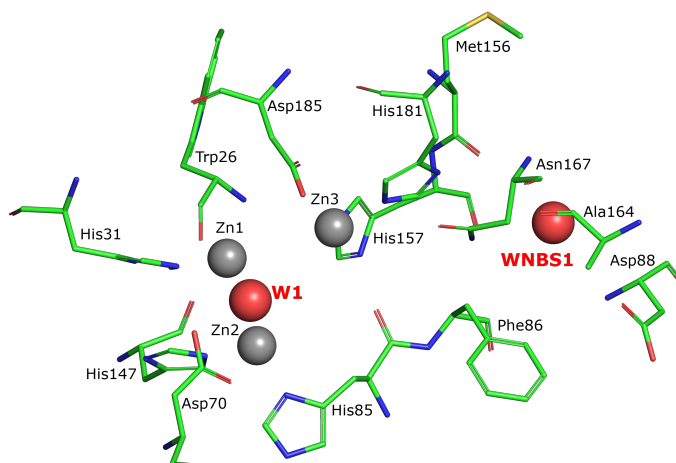
P1 se skládá z několika málo β -skládaných listů, avšak převažujícím strukturním motivem jsou α -šroubovice. Příkladem nukleasy z rodiny S1-P1 je nukleasa TBN1 pocházející ze *Solanum lycopersicum* (rajče) publikovaná v PDB [32] pod kódem 3SNG [33]. Její struktura je zobrazena na obrázku 1.1.



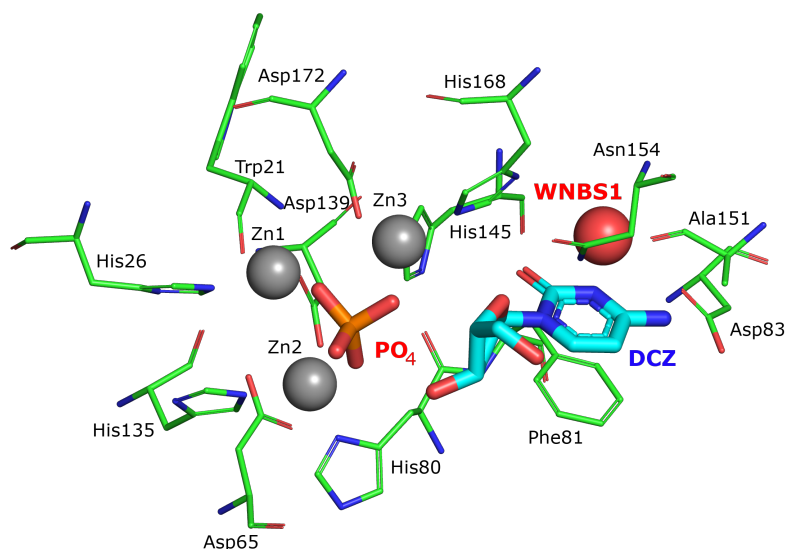
Obrázek 1.1: Struktura nukleasy *TBN1* z rajčete (*Solanum lycopersicum*), která je v PDB databázi pod kódem 3SNG [33]. Struktura je zobrazena v reprezentaci sekundární struktury. Zeleně jsou zbarveny α -šroubovice, modře β -skládaný list, smyčky jsou v barvě magenta a šedě je zbarven zinkový klastr. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

S1-P1 nukleasy jsou závislé na dvojmocných kovech. Trojice dvojmocných kovů formuje kovový klastr, který je jednou z částí aktivního místa nukleasy. Dvojmocným kovem je většinou zinek, klastr může být tvořen i hořčíkem, manganem nebo vápníkem [36, 37]. Hlavní funkcí aktivního místa je štěpení fosfodiesterových vazeb nukleových kyselin. Kovový klastr společně s disulfidovými můstky stabilizuje sbalení proteinu.

Další část aktivního místa je formována aminokyselinovými zbytky tak, že připomíná „kapsu“. Tato část je označována jako NBS1 (*Nucleoside binding site 1*). Do NBS1 se zpravidla navazují báze a cukerné skupiny substrátu. Mezi zinkový klastr jsou navázány čtyři molekuly vody v případě, že se do aktivního místa NBS1 ne naváže žádný ligand. Molekula vody označovaná jako W1 slouží k nukleofilnímu štěpení. Tato molekula se nachází mezi zinečnými ionty Zn1 a Zn2 a poskytuje elektron jiným molekulám za účelem vytvoření elektronového páru [33]. Na obrázku 1.2 je znázorněno aktivní místo nukleasy *TBN1* bez navázaných ligandů pouze s vodami W1 a WNBS1, které se účastní vazby nukleových kyselin a nukleofilního štěpení.



Obrázek 1.2: Aktivní místo nukleasy *TBN1* z rajčete (*Solanum lycopersicum*), která je v PDB databázi pod kódem 3SNG [33]. Šedě je znázorněn zinkový klastr, červeně molekula vody *W1* zodpovědná za nukleofilní štěpení a molekula vody *WNBS1*, která se účastní vazby nukleových kyselin. Aminokyseliny formující aktivní místo jsou znázorněny tyčinkovým modelem, kde uhlíky jsou zbarveny zeleně. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].



Obrázek 1.3: Aktivní místo nukleasy *S1* z *Aspergillus oryzae* v komplexu s navázaným fosfátem a 2'-deoxycytidinem (DCZ), která je v PDB databázi pod kódem 5FBD [35]. Šedě je znázorněn zinkový klastr, červeně molekula vody *WNBS1*, která se účastní vazby ligandu 2'-deoxycytidinu, který je znázorněn tyčinkovým modelem se světle modrými uhlíky. Tyčinkovým modelem v červeno-oranžové barvě je znázorněn navázaný fosfát. Aminokyseliny formující aktivní místo jsou znázorněny tyčinkovým modelem, kde uhlíky jsou zbarveny zeleně. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

Příklad přirozené vazby nukleosidu a fosfátu v aktivním místě je na obrázku 1.3, kde je zobrazena část struktury nukleasy S1 z plísně *Aspergillus oryzae*, která je v PDB databázi pod kódem 5FBD [35]. Tato nukleasa má v aktivním místě v části zinkového klastru navázán fosfát a v části NBS1 navázán nukleosid 2'-deoxycytidin, který je produktem štěpení 3'-nukleotidu. Vazby se účastní i vazebná voda WNBS1, jejíž molekula je na obrázku znázorněna červeně.

1.8 Hledání inhibitoru nukleasy z rodiny S1-P1

Objevování léčiv na základě fragmentů (angl. Fragment-Based Drug Discovery, FBDD) je novým přístupem v poznávání proteinů (i konkrétně naší zkoumané nukleasy z rodiny S1-P1). Tato metoda získává stále větší pozornost díky své účinnosti a efektivnímu identifikování nových inhibitorů, což je výchozím bodem pro následný návrh a vývoj léčiv.

Metoda FBDD zahrnuje screening velkého množství malých, většinou strukturně jednoduchých, organických molekul - fragmentů. Tyto fragmenty mají typicky nízkou molekulovou hmotnost v porovnání se zkoumaným proteinem (molekulová hmotnost je nejčastěji pod 300 Da), nicméně pozdější výzkumy ukazují, že pro určité typy fragment screeningů lze využít i rozmanitější molekuly s vyšší molekulovou hmotností. Takové fragmenty často nejsou součástí komerčních knihoven [38]. Hlavním principem metody FBDD je vysoká pravděpodobnost navázání malých fragmentů do různých oblastí aktivního místa zkoumaného proteinu.

Rentgenová difrakční analýza jako jedna z metod při FBDD poskytuje detailní vizualizaci 3D struktury zkoumaného proteinu a jeho aktivního místa na atomovém rozlišení. Kokrytalizací (kdy protein a použitý fragment krystalizují společně v jedné kapce), či namáčením (kdy krystal proteinu namáčíme v roztoku fragmentu, přičemž se fragment naváže na protein) lze získat vhodné krystaly pro následný difrakční experiment. Strukturální data získaná rentgenovou difrakcí jsou pro pochopení interakcí mezi proteinem a navázaným fragmentem zásadní.

Výhodou FBDD je vysoká účinnost, která je způsobena využitím velkého množství fragmentů o malé velikosti, které lze vytvořit z jednoduchých chemických sloučenin. Informace získané z interakcí fragmentů s proteiny pomáhají při optimalizaci těchto fragmentů na účinnější a selektivnější kandidáty na léčiva. Metodou FBDD lze objevovat a navrhnout nejen kompletně nová léčiva a inhibitory, ale i vyvíjet a zlepšovat léčiva a inhibitory, které již existují.

Kapitola 2

Materiály a metody

2.1 Příprava proteinového vzorku

Nukleasa ze *Stenotrophomonas maltophilia* (*SmNuc1*) byla produkována rekombinantní expresí z bakterie *Escherichia coli* v Laboratoři struktury a funkce biomolekul v Biotechnologickém ústavu AV ČR ve Vestci [2, 39]. U vzorku *SmNuc1* byla metodou SDS-PAGE ověřena čistota a zjištěna přibližná hmotnost 28 kDa. Po zkoncentrování vzorku byla následně ověřena jeho monodisperzita metodou SDS a byla určena koncentrace vzorku pro následnou krystalizaci 13,1 mg.ml⁻¹ v pufru z 50 mM Tris, pH 7,0 a 150 mM NaCl. Tyto kroky byly podrobně popsány v článku od autorů Husťáková, *et al.*, 2023 [2] a v Bakalářské práci [3].

2.2 Krystalizace vzorku

Krystalizace proteinového vzorku *SmNuc1* probíhala metodou difuze par vždy v uspořádání sedící kapky. Byly použity 96 jamkové desky Geiner CrystalQuick. Objem roztoku precipitantu (dále nazývaný krystalizační podmínka) byl 50 μ l. Teplota při krystalizaci byla udržována na 18 °C. První krystaly byly pozorovány po třech dnech, růst pokračoval až tři týdny. Krystaly rostly v několika krystalizačních podmínkách detailněji popsáných v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: Krystalizační podmínky použité ke krystalizaci vzorku *SmNuc1*. Míra koncentrace roztoku polymeru v celkovém objemu roztoku krystalizační podmínky je značena w/v (*weight/volume*). Sloupec *Objem* v tabulce udává objem proteinu a krystalizační podmínky v kapce a je dán v jednotkách μl .

Číslo podmínky	Sůl	Pufr	Polymer	Objem
I	0,2 M Li_2SO_4	0,1 M BIS-TRIS (5,5 pH)	25 % (w/v) PEG 3350	0,5+0,5
II	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M BIS-TRIS (5,5 pH)	25 % (w/v) PEG 3350	0,5+0,5
III	0,2 M Li_2SO_4	0,1 M MES (6,5 pH)	30 % (w/v) PEG 8000	0,5+0,5
IV	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M MES (6,5 pH)	30 % (w/v) PEG 8000	0,5+0,5
V	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 M MES (6,5 pH)	30 % (w/v) PEG 5000	0,5+0,5

2.3 Příprava komplexů protein-ligand

Ze všech vzrostlých krystalů byly vybrány krystaly bez viditelných vnějších defektů a bez viditelných srůstů. Komplexy byly vytvořeny namáčením krystalů v roztocích ligandů, které byly vybrány z desky Xtal Frag Screen (Jena Bioscience). Tato obsahovala 96 jamek se suchými fragmenty. Taktéž tato deska obsahovala jamky pro rezervoár, které byly použity při tvorbě roztoků těchto ligandů. Roztoky ligandů byly připraveny v krystalizačních deskách, do jejichž rezervoárů bylo naneseno 30 μl krystalizační podmínky, ve které rostl krystal vybraný k namáčení do příslušného roztoku ligandu. Roztok ligandu byl vytvořen nanesením 0,5 μl krystalizační podmínky na suchý fragment. Celkem bylo otestováno 49 z 96 dostupných ligandů, jejichž seznam je uveden v Příloze A v tabulce 3 spolu s popisem krystalů, které úspěšně prošly procesem namáčení bez viditelné deformace nebo zničení krystalu. Takto připravené krystaly byly po namáčení vybrány z roztoků ligandů smyčkami Dual Thickness MicroLoops LD (MiTeGen). Následně byly na 10 sekund namočený v roztoku krystalizační podmínky a 25% (w/v) glycerolu a vitrifikovány v tekutém dusíku.

2.4 Provedení difrakčního experimentu

Připravené krystaly byly podrobeny difrakčnímu experimentu na zdroji synchrotronového záření BESSY II, BL 14.2 (Helmholtz-Zentrum, Berlín, Německo) [40]. Experiment probíhal rotační metodou za stálého chlazení krystalu při teplotě 100 K. U každého krystalu byly nejprve nasbírány dva testovací snímky při 0° a $90^\circ \phi$, ty byly oindexovány a na jejich základě byla navržena strategie měření programem iMOSFLM [41]. Difrakční obrazec byl snímán CMOS detektorem PILATUS 6M. Čas expozice byl u všech měřených krystalů 0,1 sekund na snímek. Oscilační úhel byl $0,1^\circ$. Difrakce na všech krystalech byla měřena při vlnové délce záření 0,9184 Å. Při difrakčním experimentu bylo zjištěno, že na některých krystalech rentgenové záření nedifraktuje (viz Příloha A, tabulka 3). Celkově bylo difrakčnímu experimentu

úspěšně podrobena 40 krystalů. Charakteristické parametry difrakčních dat všech úspěšně naměřených krystalů jsou uvedeny v Příloze B v tabulce 4.

2.5 Zpracování difrakčních dat

Soubory všech úspěšně naměřených difrakčních dat byly zpracovány v programu XDS [42]. U některých krystalů pravděpodobně došlo k lehké degradaci způsobené rentgenovým zářením při měření, proto byla část snímků vyřazena při následném zpracování dat v programu Aimless [43] z programového balíku CCP4 [17]. Informace o počtu použitých snímků spolu s dalšími charakteristickými parametry zpracování difrakčních dat jsou uvedeny v Příloze B v tabulce 4. Pro pět struktur, které jsou později detailněji popsány, jsou tyto charakteristiky i v tabulce 2.2.

Tabulka 2.2: Charakteristické parametry dat z difrakčního experimentu a jejich následného zpracování pro struktury $SmNuc1_{C3}$, $SmNuc1_{D10}$, $SmNuc1_{B8}$, $SmNuc1_{F3_1}$ a $SmNuc1_{F9}$. Hodnoty v závorkách odpovídají slupce s nejvyšším rozlišením.

Název měřeného krystalu	$SmNuc1_{C3}$	$SmNuc1_{D10}$	$SmNuc1_{F3_1}$
Vzdálenost detektoru [mm]	295	295	345
Počet použitých snímků	3598	3098	1799
Difrakční limit [Å]	42,62-1,70 (1,73-1,70)	42,64-1,74 (1,78-1,74)	42,64-1,75 (1,78-1,75)
Parametry el. buňky: $a b c$ [Å] $\alpha \beta \gamma$ [°]	44,31 72,43 81,40 90,00 105,79 90,00	44,25 72,68 81,52 90,00 105,52 90,00	44,28 72,71 81,40 90,00 105,64 90,00
Prostorová grupa	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Počet reflexí	260327 (16064)	295856 (16542)	169961 (9508)
Počet nezávislých reflexí	38184 (2417)	50172 (2715)	49654 (2731)
Kompletnost dat [%]	97,9 (95,8)	98,7 (96,8)	98,9 (98,9)
R_{meas}	0,094 (0,625)	0,166 (1,182)	0,111 (0,981)
R_{merge}	0,086 (0,576)	0,151 (1,081)	0,094 (0,829)
R_{pim}	0,035 (0,239)	0,068 (0,471)	0,059 (0,518)
$CC_{1/2}$	0,999 (0,912)	0,994 (0,717)	0,997 (0,737)
I/σ [I]	16,8 (3,7)	9,1 (1,8)	8,7 (1,6)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1B8</i>	<i>SmNuc1F9</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	150	239
Počet použitých snímků	3598	3350
Difrakční limit [Å]	42,83-1,73 (1,76-1,73)	43,37-1,74 (1,78-1,74)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,42 72,71 81,55 90,00 105,24 90,00	44,47 72,71 82,54 90,00 102,82 90,00
Prostorová grupa	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Počet reflexí	659436 (29979)	330323 (18633)
Počet nezávislých reflexí	97893 (4625)	52083 (2852)
Kompletnost dat [%]	98,3 (94,4)	99,4 (98,5)
<i>R</i> _{meas}	0,077 (1,007)	0,107 (0,768)
<i>R</i> _{merge}	0,071 (0,928)	0,098 (0,707)
<i>R</i> _{pim}	0,029 (0,386)	0,042 (0,296)
CC _{1/2}	0,999 (0,817)	0,997 (0,856)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	15,5 (2,2)	14,6 (2,8)

2.6 Vyřešení fázového problému

Vyřešení fázového problému bylo u všech struktur možné díky znalosti dosud nepublikované vyřešené struktury *SmNuc1* bez navázaných ligandů. Tato struktura je již v databázi PDB [32] pod kódem *8QJL* (Adámková K. *et al.*, zatím nepublikováno). Struktura byla použita jako model při molekulárním nahrazení, které bylo provedeno v programu MOLREP [7]. Úspěšnost vyřešení fázového problému byla zkontrolována v programu Coot [11], ve kterém byl kladen důraz především na korespondenci mapy elektronové hustoty a aminokyselinových residuí modelu.

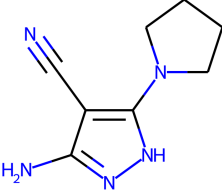
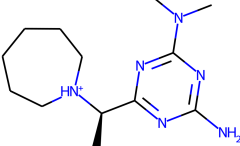
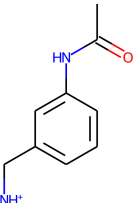
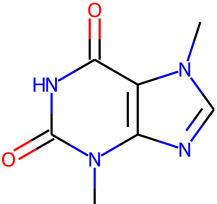
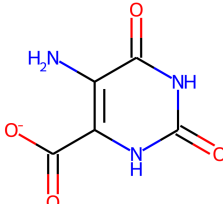
2.7 Upřesňování strukturních modelů

Při upřesňování strukturních modelů byly v přímém prostoru upřesňovány pozice postranních řetězců jednotlivých aminokyselinových residuí. Některá residua byla pro nedostatečnou shodu upřesňovaného modelu a mapy elektronové hustoty nahrazena za alanin, čímž byl výrazně snížen vliv původního modelu v daném místě. Všechny tyto úpravy byly provedeny v programu Coot [11]. Po tomto kroku byly strukturní modely upřesněny v programu Refmac5 [16]. Uměle upravená residua byla z alaninu namodelována zpět tak, aby odpovídala pozorované mapě elektronové hustoty a původní sekvenci proteinu. Následně bylo znovu provedeno upřesnění. Ně-

kterým flexibilním residuím byla navíc přidána alternativní konformace a byla změněna okupance obou alternativních pozic na hodnotu 0,5. Ve všech strukturách byly automaticky přidány vody programem Coot [11], jejich pozice byly následně zkontrolovány a manuálně upraveny. I po tomto kroku bylo provedeno upřesnění modelů. Při upřesňování byly použity automaticky vygenerované vodíky. Testovací soubor použitý pro výpočet R_{free} tvořilo 5 % náhodně vybraných reflexí.

Strukturní modely, které jednoznačně nevykazovaly přítomnost ligandu v aktivním místě, dále nebyly upřesňovány. Charakteristické parametry posledního upřesňování těchto struktur jsou uvedeny v Příloze C v tabulce 5. Ligandy, které byly namodelovány do strukturních modelů, u nichž mapa elektronové hustoty vykazovala jejich přítomnost, jsou uvedeny v tabulce 2.3.

Tabulka 2.3: Ligandy, které byly po upřesnění namodelovány do strukturních modelů. Obrázky ligandů byly vytvořeny pomocí Grade2 [44].

Struktura ligandu			
Název ligandu	1H-Pyrazole-4-carbonitrile,5-amino-3-(1-pyrrolidinyl)	1,3,5-Triazine-2,4-diamine,6-[1-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)ethyl]-N2,N2-dimethyl	Acetamide,N-[3-(aminomethyl)phenyl]
Kód ligandu	46X	FXT-C3	463
Název krystalu	SmNuc1 _{B8}	SmNuc1 _{C3}	SmNuc1 _{D10}
Struktura ligandu			
Název ligandu	1H-Purine-2,6-dione,3,7-dihydro-3,7-dimethyl (theobromin)	4-Pyrimidinecarboxylic acid,5-amino-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-dioxo	
Kód ligandu	37T	IJZ	
Název krystalu	SmNuc1 _{F31}	SmNuc1 _{F9}	

Ustrukturních modelů $SmNuc1_{C3}$, $SmNuc1_{D10}$ a $SmNuc1_{F31}$ byl do aktivního místa doplněn ligand pouze v jedné ze dvou molekul v asymetrické jednotce. U strukturních modelů $SmNuc1_{B8}$ a $SmNuc1_{F9}$ byly namodelovány ligandy do aktivních míst obou molekul v asymetrické jednotce. Následovalo finální upřesnění v programu Refmac5 [16].

2.8 Kontrola kvality strukturních modelů

Po finálním upřesnění byla zkontrolována geometrie a rotamery residuí, residua ze zakázané oblasti Ramachandrova grafu i výrazná maxima v diferenční mapě. Strukturní modely byly následně zkontrolovány i pomocí wwPDB [25]. Charakteristiky strukturních modelů před a po dokončeném upřesňování jsou uvedeny v tabulce 2.4. Pro těchto pět strukturních modelů byly v programu Phenix [15] vytvořeny kompozitní slepé mapy. Program byl spuštěn v režimu simulovaného žíhání a současného upřesňování.

Tabulka 2.4: Statistiky upřesňování strukturních modelů komplexů $SmNuc1_{C3}$, $SmNuc1_{D10}$, $SmNuc1_{B8}$, $SmNuc1_{F31}$ a $SmNuc1_{F9}$.

Statistika upřesňování	$SmNuc1_{C3}$	$SmNuc1_{D10}$	$SmNuc1_{F31}$
R_{work}	0,162	0,242	0,188
R_{free}	0,206	0,287	0,228
$R.m.s.d.$ vazeb od ideálních hodnot [Å]	0,008	0,009	0,007
$R.m.s.d.$ úhlů od ideálních hodnot [°]	1,523	1,647	1,423
Ramachandran povolené [%]	100	100	100
Průměrný B-faktor [Å ²]	24,0	25,0	25,9
Počet upřesněných atomů bez vodíků	4338	4038	4340
Počet molekul vody	427	206	359
Ligandy a jiné molekuly v asymetrické jednotce	1x FXT-C3, 6x Zn ²⁺ , 1x SO ₄ ²⁻	1x 463, 6x Zn ²⁺	1x 37T, 6x Zn ²⁺ , 6x SO ₄ ²⁻

Statistika upřesňování	<i>SmNuc1B8</i>	<i>SmNuc1F9</i>
R_{work}	0,154	0,194
R_{free}	0,187	0,246
<i>R.m.s.d.</i> vazeb od ideálních hodnot [Å]	0,012	0,007
<i>R.m.s.d.</i> úhlů od ideálních hodnot [°]	1,733	1,369
Ramachandran povolené [%]	100	100
Průměrný B-faktor [Å ²]	17,4	26,0
Počet upřesněných atomů bez vodíků	4658	4374
Počet molekul vody	573	507
Ligandy a jiné molekuly v asymetrické jednotce	2x 46X, 6x Zn ²⁺ , 5x glycerol, 1x MES, 2x PEG, 2x SO ₄ ²⁻	2x IJZ, 6x Zn ²⁺ , 1x SO ₄ ²⁻

2.9 Návrh inhibitoru

Způsob vazby jednotlivých fragmentů do aktivního místa byl analyzován a na základě těchto analýz byly navrženy čtyři nové molekuly inhibitoru. Molekuly byly navrženy po částech a následně byly vyhledány již existující molekuly jim podobné v databázi PubChem [46], ChemSpider [47] či ZINC [48].

Kapitola 3

Výsledky a diskuze

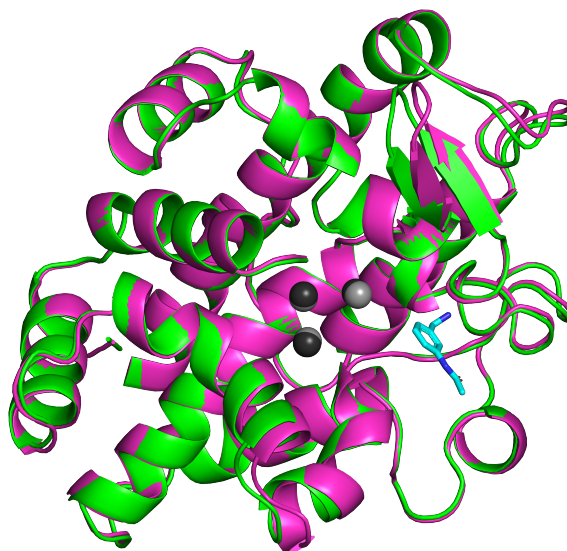
3.1 Struktura nukleasy *SmNuc1* s navázanými fragmenty

Byla otestována schopnost navázání 49 různých ligandů do aktivního místa nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia*. Ze všech 49 testovaných ligandů se při vytváření komplexů protein-ligand celkem 8 krystalů proteinu rozpustilo při namáčení v roztoku příslušného ligandu. Ligandy rozpouštějící krystal nukleasy jsou uvedeny v Příloze A v tabulce 3 se stavem krystalu „krystal rozpuštěn“. Celkem 8 krystalů, které byly podrobeny namáčení do roztoku ligandů, nedifraktovalo, přestože jejich makroskopická struktura nebyla na pohled experimentem namáčení ovlivněna. Ligandy, které byly použity a krystal s nimi nedifraktoval, jsou uvedeny v Příloze A v tabulce 3 se stavem „bez difrakce“.

Celkem bylo zpracováno 40 difrakčních datasetů s difrakčními limity 1,27-2,38 Å. Pro některé ligandy byly naměřeny datasety ze dvou krystalů. Celkem 28 ze 49 použitých ligandů nebylo nalezeno v aktivním místě upřesněných struktur nukleasy. Tyto ligandy jsou uvedeny v Příloze A v tabulce 3 se stavem „ligand nenalezen“. Bylo získáno pět nových struktur komplexů ligandů a nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia*. Ve všech pěti strukturách bylo po vyřešení fázového problému pozorováno navázání ligandu do části aktivního místa označované jako NBS1 (v kapse).

Přeložením struktury nukleasy 8QJL, která byla použita jako model při molekulárním nahrazení, a nově vyřešených struktur, do kterých se navázal ligand, bylo ověřeno, že sbalení struktury nukleasy se nijak nezměnilo navázáním ligandu do jejího aktivního místa. Všechny nové struktury mají klasický fold S1-P1 nukleasy. Pohled na přeložení použité modelové struktury a nově vyřešené struktury *SmNuc1*_{D10} je na obrázku 3.1. Všechny nově určené struktury jsou v globálním měřítku stejné jako příklad na obrázku 3.1, a to včetně pozic všech residuí tvořících aktivní místo. Po detailním pohledu do aktivního místa, který je na obrázku 3.2, bylo ověřeno, že navázání ligandu nijak zásadně nezměnilo ani aktivní místo. Hodnoty odchylky pozic C α atomů řešených struktur vůči modelové struktuře jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Některá residua přizpůsobila konformace svých postranních řetězců vazbě ligandu. Způsob vazby jednotlivých ligandů je diskutován níže.



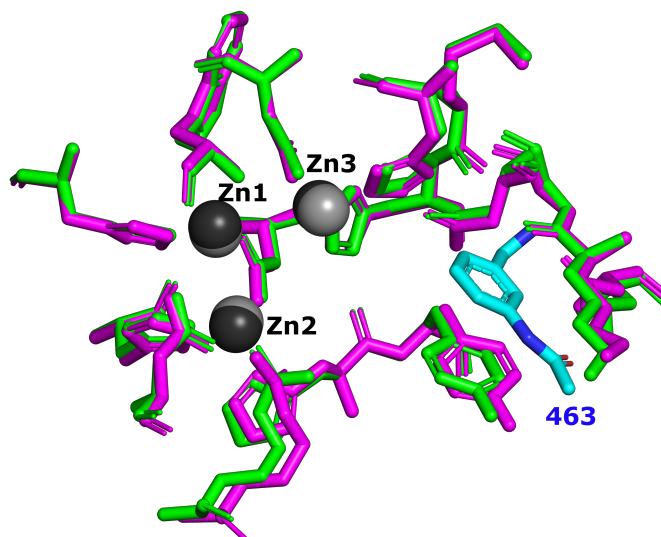
Obrázek 3.1: Přeložení modelové struktury s PDB kódem 8QJL a již vyřešené struktury *SmNuc1_{D10}* v reprezentaci sekundární struktury. Barvou magenta je znázorněna struktura použitá jako model v molekulárním nahrazení, zeleně je zobrazena struktura *SmNuc1_{D10}* s navázaným ligandem, který je v tyčinkové reprezentaci s tyrkysovými uhlíky. Zinky jsou zobrazeny černými (model) a šedými koulemi (*SmNuc1_{D10}*). Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

Tabulka 3.1: Odchylka pozic C_{α} atomů řešených struktur od modelové struktury použité při molekulárním nahrazení.

Porovnávaná struktura	<i>R.m.s.d.</i> pozic C_{α} atomů [Å]
<i>SmNuc1_{B8}</i>	0,645
<i>SmNuc1_{C3}</i>	0,605
<i>SmNuc1_{D10}</i>	0,550
<i>SmNuc1_{F31}</i>	0,646
<i>SmNuc1_{F9}</i>	0,614

3.2 Analýza způsobu vazby fragmentů

Všechny vyřešené struktury nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia* obsahují dvě molekuly (označené jako řetězec A a B) v asymetrické jednotce. Každá molekula nukleasy obsahuje otevřenou kapsu v aktivním místě, kam se ve všech pěti případech navázal ligand (dvakrát do obou molekul v asymetrické jednotce). Tuto část aktivního místa tvoří aminokyselinová residua His151, His175, Met150, Asn161,

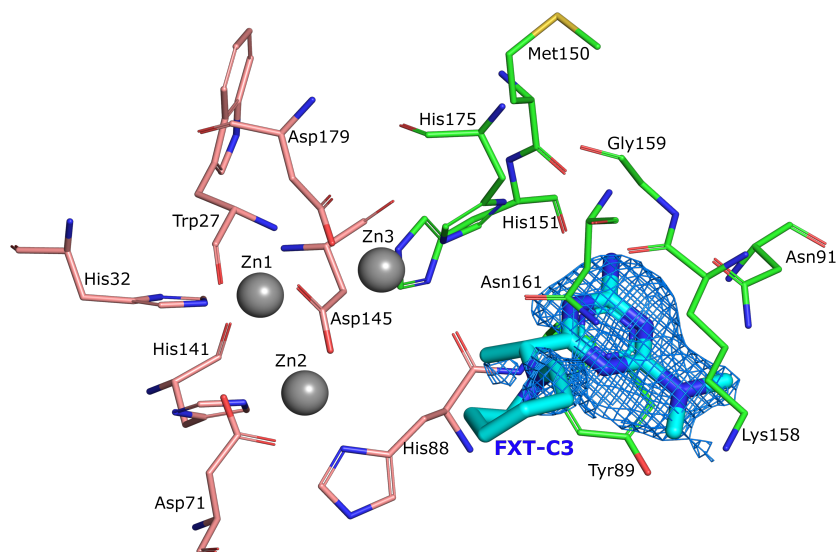


Obrázek 3.2: Přeložení aktivních míst modelové struktury s PDB kódem 8QJL a již vyřešené struktury *SmNuc1_{D10}* v tyčinkové reprezentaci. Barvou magenta je znázorněna struktura použitá jako model v molekulárním nahrazení, zeleně je zobrazena struktura *SmNuc1_{D10}* s navázaným ligandem, který je v tyčinkové reprezentaci s tyrkysovými uhlíky. Zinky jsou zobrazeny černými (model) a šedými koulemi (*SmNuc1_{D10}*). Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

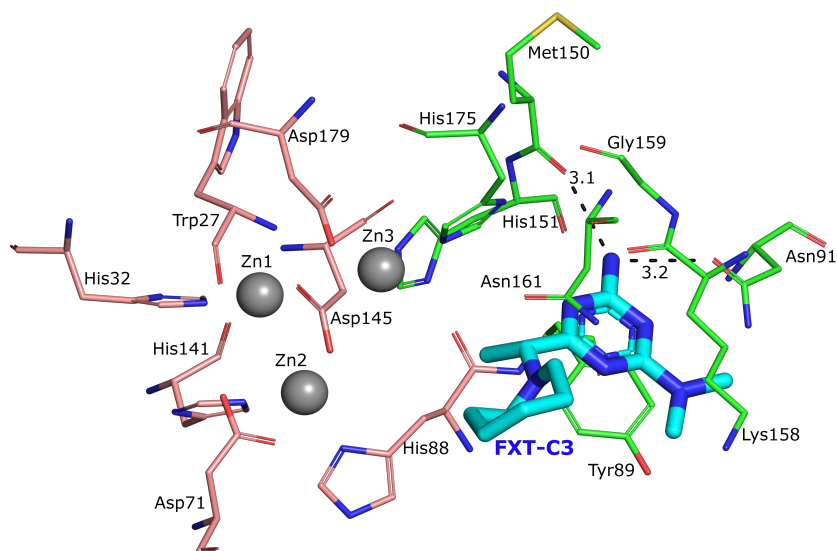
Gly159, Asn91, Lys158 a Tyr89. Ve všech případech aromatická skupina navázaného ligandu tvoří paralelní stacking s Tyr89. Do aktivního místa (kapsy) se v některých případech navázala i voda označovaná jako WNBS1, která zprostředkovává vazbu mezi ligandem a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo. Druhá část aktivního místa tvořena zinkovým klastrem se v žádném ze strukturních modelů nijak nezměnila. Vazby se účastní pouze ve dvou případech zprostředkovane přes interakci s vodou a zinkem Zn3.

3.2.1 *SmNuc1_{C3}*

Do struktury označené *SmNuc1_{C3}* bylo namodelováno 427 molekul vody, jedna molekula síry a ligand 1,3,5-Triazine-2,4-diamine,6-[1-(hexahydro-1H-azepin-1-yl) ethyl]-N2,N2-dimethyl, který je na obrázcích níže značen jako FXT-C3. Přítomnost ligandu byla ověřena výpočtem $2mF_o - DF_c$ kompozitní slepé mapy, která je kolem ligandu vykreslena na hladině 1σ , viz obrázek 3.3a. Navázaný ligand tvoří paralelní stacking s Tyr89. V aktivním místě této struktury není přítomna voda WNBS1 poskytující vazbu ligandu. Tento ligand tvoří vodíkové vazby s aminokyselinovými residui Met150 a Asn91, tyto vazby jsou vyznačeny černě na obrázku 3.3b v 3D reprezentaci struktury. Na 2D schématu 3.4 jsou černě vykresleny vodíkové vazby a zelenými zuby jsou vyznačeny hydrofobní interakce mezi ligandem a aminokyselinovými residui Asn161, Lys158, Tyr89, Gly159 a His175.

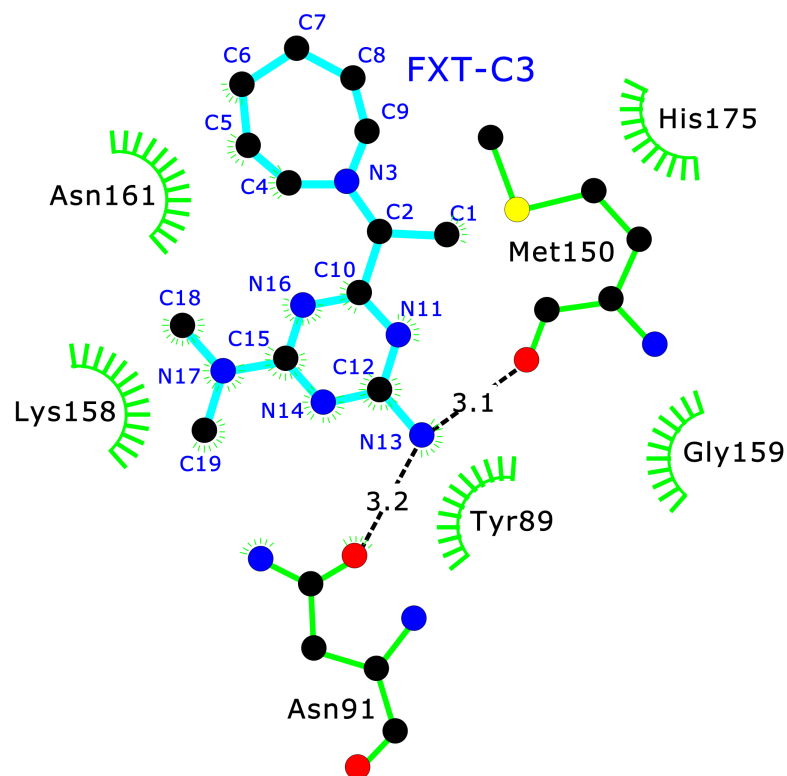


(a) Kompozitní slepá mapa ($2mF_o-DF_c$) znázorněná modrou sítí kolem ligandu na hladině 1σ .



(b) Černě znázorněné vazby mezi ligandem a okolními residui.

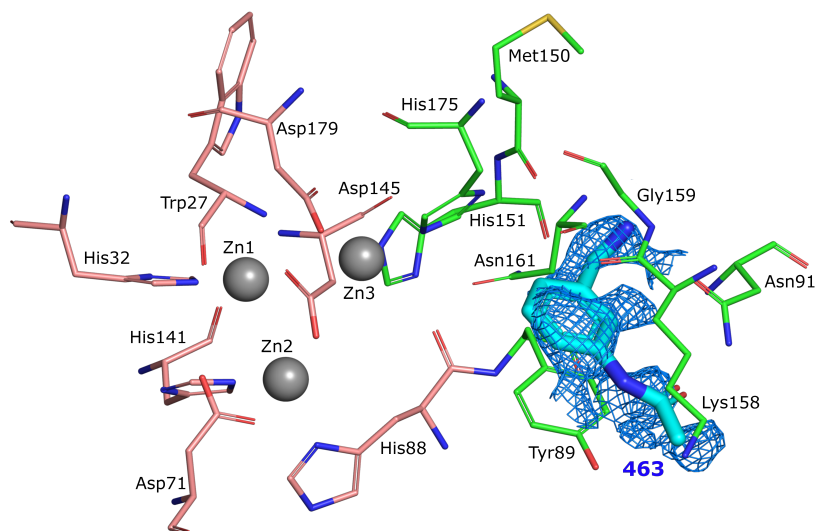
Obrázek 3.3: Aktivní místo struktury *SmNuc1C3* s navázaným ligandem 1,3,5-Triazine-2,4-diamine,6-[1-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)ethyl]-N2,N2-dimethylem (FXT-C3). Ligand je reprezentován tyčinkovým modelem s tyrkysově zbarvenými uhlíky, residua tvořící kapsu NBS1 se zeleně zbarvenými uhlíky. Šedými koulemi je reprezentován zinkový klastr s okolními residui, jejichž uhlíky jsou zbarveny lososově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].



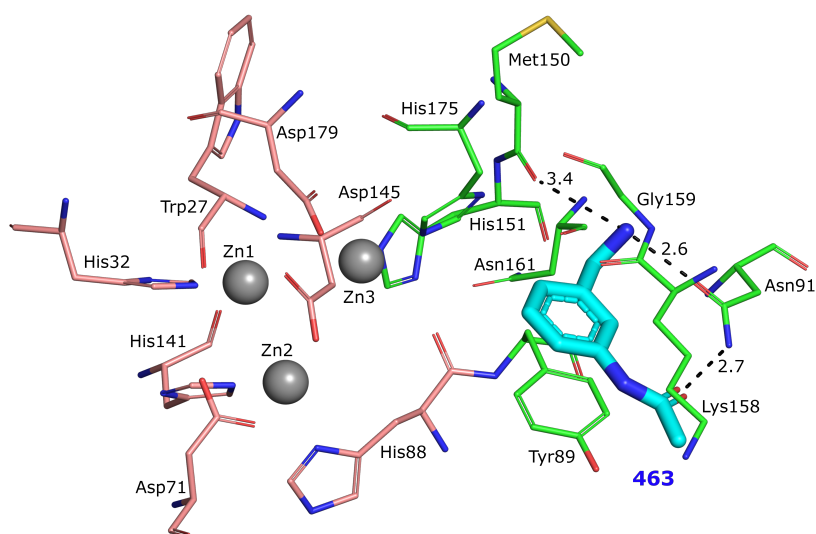
Obrázek 3.4: Vazby mezi ligandem 1,3,5-Triazine-2,4-diamine,6-[1-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)ethyl]-N2,N2-dimethylem (FXT-C3) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo nukleasy. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

3.2.2 *SmNuc1*_{D10}

Do struktury označené *SmNuc1*_{D10} bylo namodelováno 206 molekul vody a ligand Acetamide N-[3-(aminomethyl)phenyl], který je na obrázcích níže značen podle PDB kódového označení 463. Přítomnost ligandu byla ověřena výpočtem $2mF_o - DF_c$ kompozitní slepé mapy, která je kolem ligandu vykreslena na hladině 1σ , viz obrázek 3.5a. Navázaný ligand tvoří paralelní stacking s Tyr89. Ani v tomto aktivním místě není přítomna voda WNBS1 poskytující vazbu ligandu. Ligand 463 tvoří vodíkovou vazbu s aminokyselinovým residuem Met150 a dvě vazby s residuem Asn91, tyto vazby jsou vyznačeny černě na obrázku 3.5b v 3D reprezentaci struktury. Na 2D schématu 3.6 jsou černě vykresleny vodíkové vazby a zelenými zuby jsou vyznačeny hydrofobní vazby mezi atomy ligandu a aminokyselinovými residui Asn161, Lys158, Tyr89, Gly153, His151, Gly159 a His175.

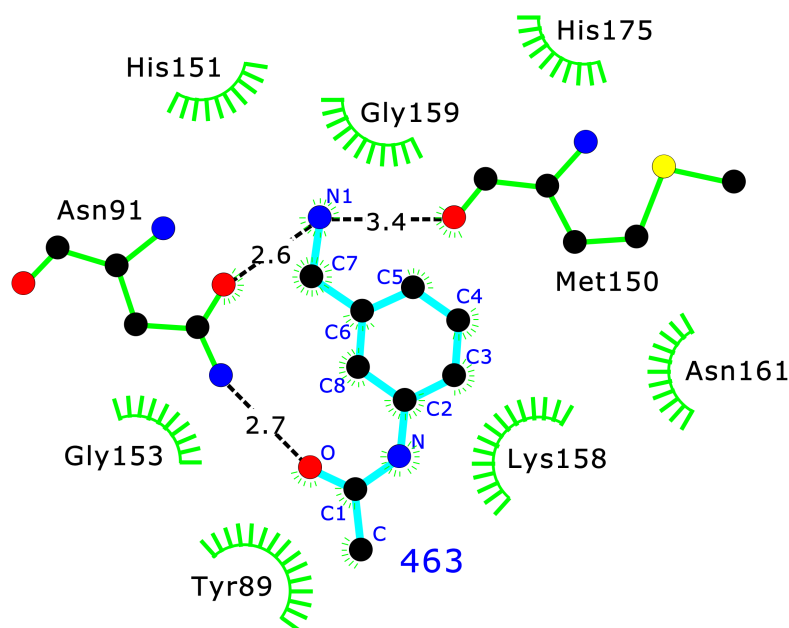


(a) Kompozitní slepá mapa ($2mF_o-DF_c$) znázorněná modrou sítí kolem ligandu na hladině 1σ .



(b) Černě znázorněné vazby mezi ligandem a okolními residui.

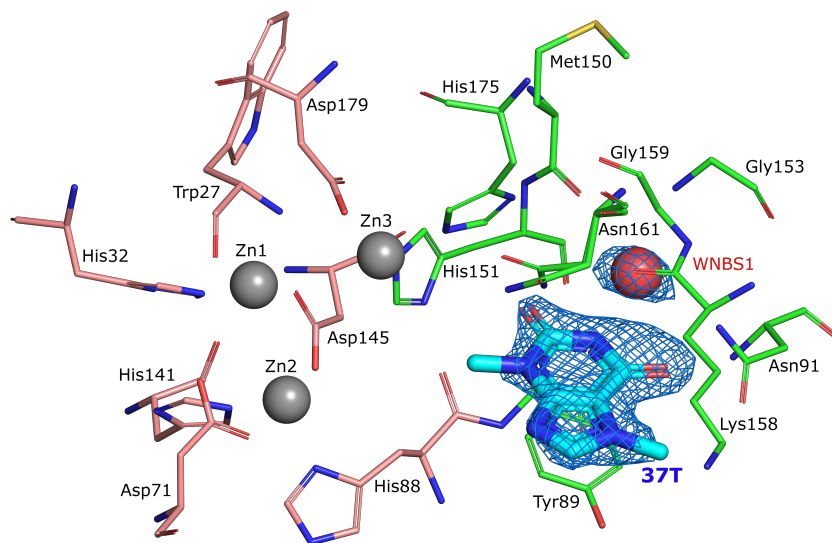
Obrázek 3.5: Aktivní místo struktury *SmNuc1_{D10}* s navázaným ligandem Acetamide N-[3-(aminomethyl)phenyl] (463). Ligand je reprezentován tyčinkovým modelem s tyrkysově zbarvenými uhlíky, residua tvořící kapsu NBS1 se zeleně zbarvenými uhlíky. Šedými koulemi je reprezentován zinkový klastr s okolními residui, jejichž uhlíky jsou zbarveny lososově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].



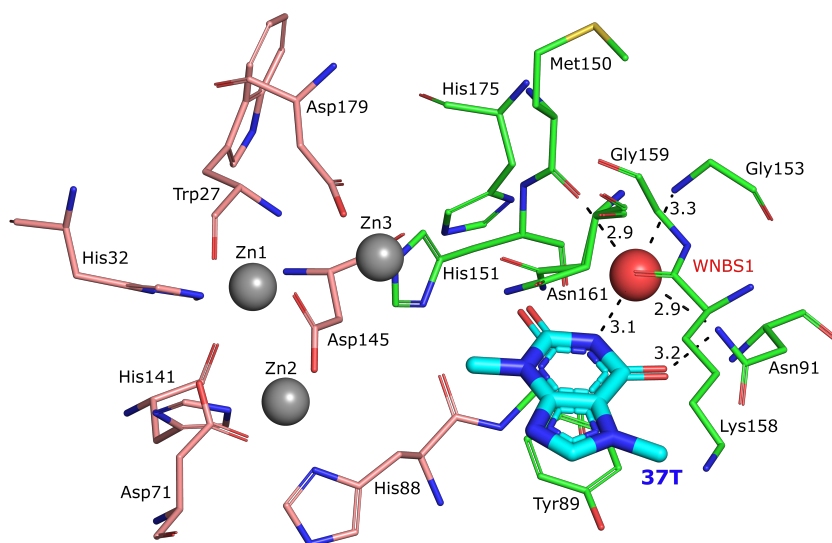
Obrázek 3.6: Vazby mezi ligandem Acetamide N-[3-(aminomethyl)phenyl] (463) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo nukleasy. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

3.2.3 *SmNuc1*_{F3₁}

Do struktury označené *SmNuc1*_{F3₁} bylo namodelováno 359 molekul vody, jeden síran a ligand theobromin (1H-Purine-2,6-dione3,7-dihydro-3,7-dimethyl), který je na obrázcích níže značen podle PDB kódového označení 37T. Přítomnost ligandu byla ověřena výpočtem $2mF_o - DF_c$ kompozitní slepé mapy, která je kolem ligandu vykreslena na hladině 1σ , viz obrázek 3.7a. Navázaný ligand tvoří paralelní stacking s Tyr89, nicméně v tomto aktivním místě je navázána i voda WNBS1 poskytující vazbu mezi ligandem a Gly153, Asn91 a Met150. Ligand theobromin dále tvoří vodíkovou vazbu s residuem Asn91. Tyto vazby jsou vyznačeny černě na obrázku 3.7b v 3D reprezentaci struktury. Na 2D schématu 3.8 jsou černě vykresleny vodíkové vazby a zelenými zuby jsou vyznačeny hydrofobní vazby mezi atomy ligandu a aminokyselinovými residui Asn161, Lys158, Tyr89, His151 a His175.

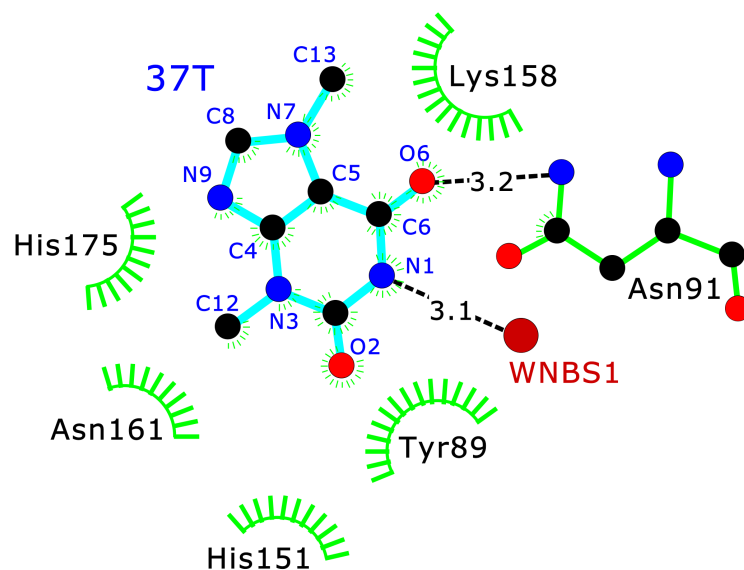


(a) Kompozitní slepá mapa ($2mF_o-DF_c$) znázorněná modrou sítí kolem ligandu na hladině 1σ .



(b) Černě znázorněné vazby mezi ligandem a okolními residui.

Obrázek 3.7: Aktivní místo struktury *SmNuc1F₃₁* s navázaným ligandem theobrominem (37T). Ligand je reprezentován tyčinkovým modelem s tyrkysově zbarvenými uhlíky, residua tvořící kapsu NBS1 se zeleně zbarvenými uhlíky. Šedými koulemi je reprezentován zinkový klastr s okolními residui, jejichž uhlíky jsou zbarveny lososově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

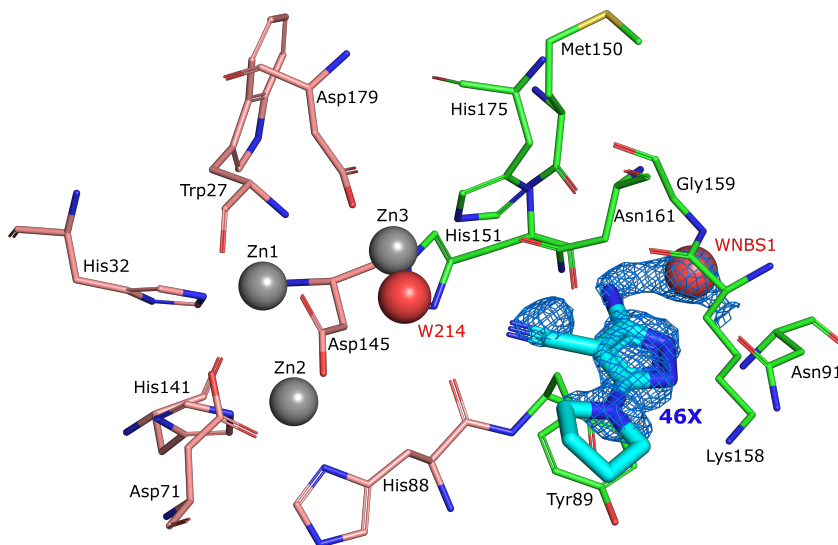


Obrázek 3.8: Vazby mezi ligandem theobrominem (37T) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo nukleasy. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

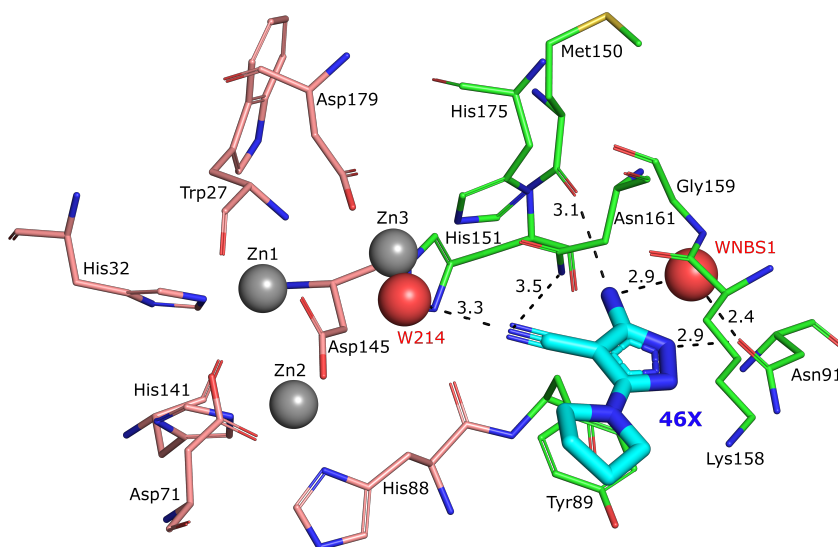
3.2.4 *SmNuc1_{B8}*

Do struktury označené *SmNuc1_{B8}* bylo namodelováno 573 molekul vody, jedenkrát MES (kyselina 2-morfolin-4-ylethansulfonová), dvakrát polyethylenglykol a pět glycerolů, které sloužily jako ochrana krystalů při vitrifikaci. V každém řetězci (A i B) byl do aktivního místa namodelován ligand 1H-Pyrazole-4-carbonitrile 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl), který je na obrázcích níže značen podle PDB kódového označení 46X. Přítomnosti ligandů byly ověřeny výpočtem $2mF_o-DF_c$ kompozitních slepých map, které jsou kolem ligandů vykresleny na hladině 1σ , viz obrázek 3.9a pro řetězec A a obrázek 3.11a pro řetězec B.

V řetězci A aromatická část navázaného ligandu znovu tvoří paralelní stacking s Tyr89 stejným způsobem, jako ve strukturách *SmNuc1_{C3}*, *SmNuc1_{D10}* a *SmNuc1_{F31}*. Ligandu poskytuje jednu z vazeb i voda WNBS1, která tvoří vazbu s residuem Asn91. Dusík N3, který je popsán i na 2D schématickém obrázku 3.10, je z azidoskupiny, má tedy záporný náboj a tvoří vodíkovou vazbu s dusíkem residua Asn161 a zároveň s vodou W214. Tato voda se váže na zinek Zn3, který je součástí zinkového klastru. Dále tvoří vazbu s residui Met150 a Asn91. Všechny tyto vazby jsou popsány na obrázku 3.9b.

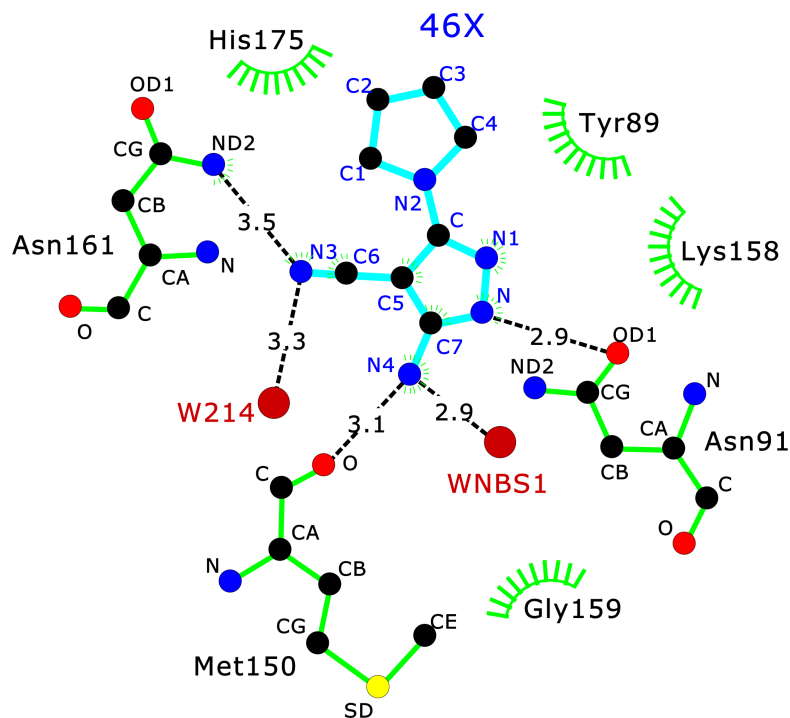


(a) Kompozitní slepá mapa ($2mF_o-DF_c$) znázorněná modrou sítí kolem ligandu v řetězci A na hladině 1σ .



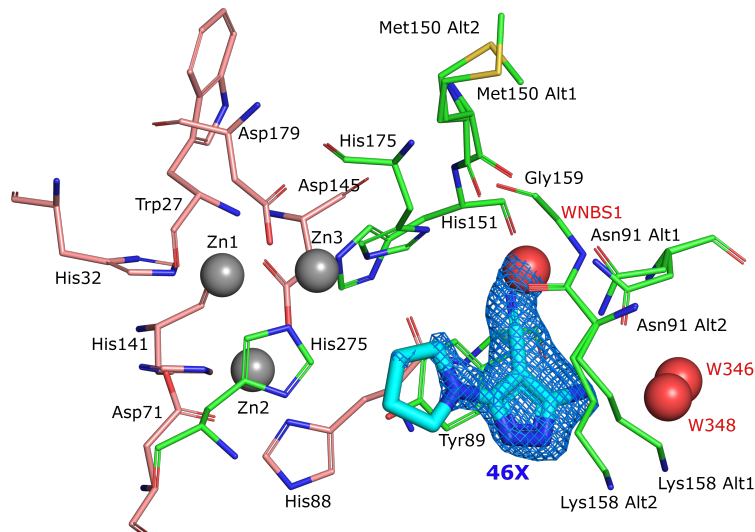
(b) Černě znázorněné vazby mezi ligandem a okolními residui v řetězci A.

Obrázek 3.9: Aktivní místo struktury *SmNuc1B8* řetězce A s navázaným ligandem 1H-Pyrazole-4-carbonitrile 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl) (PDB kódové označení 46X). Ligand je reprezentován tyčinkovým modelem s tyrkysově zbarvenými uhlíky, residua tvořící kapsu NBS1 se zeleně zbarvenými uhlíky. Šedými koulemi je reprezentován zinkový klastr s okolními residui, jejichž uhlíky jsou zbarveny lososově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

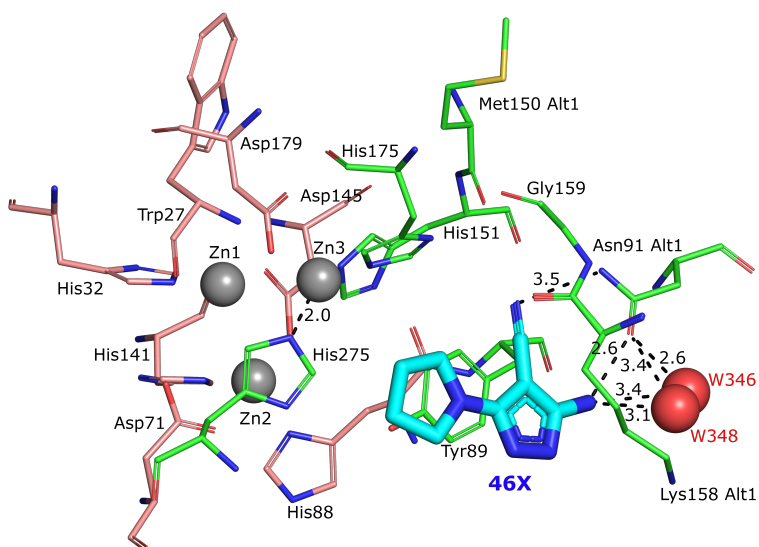


Obrázek 3.10: Vazby mezi ligandem 1H-Pyrazole-4-carbonitrile 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl) (PDB kódové označení 46X) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo v řetězci A. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

Do řetězce B byl namodelován ligand pouze s poloviční okupací, do aktivního místa byla s poloviční okupací namodelována i voda WNBS1 (viz obrázek 3.11a, kde pro lepší přehlednost bylo na obrázcích vynecháno residuum Asn161). Aminokyselinová residua Met150, Asn91 a Lys158 tvořící aktivní místo mají dvě alternativní pozice, které jsou na obrázku označeny jako Alt1 a Alt2. Alternativní pozice 2 mají tato residua v případě, že je do aktivního místa navázána pouze voda WNBS1. Vazba této vody se vylučuje s vazbou fragmentu 46X v orientaci, kterou v řetězci B pozorujeme. Tato orientace se od vazby v řetězci A liší, viz obrázky k porovnání 3.9 a 3.11. Lze pozorovat, že i v tomto případě aromatická část ligandu tvoří paralelní stacking s Tyr89, který se velice významně vychýlil od jeho běžné pozice, kterou bylo možné pozorovat ve strukturách s ostatními ligandy. Tento disorder by bylo teoreticky možné použít jako zprostředkovatele vazby inhibitoru. Zinek Zn3 je navíc spojen vodíkovou vazbou s histidinovým tagem, respektive His275 ze symetrického řetězce. Navázaný ligand tvoří vazby s aminokyselinovým residuem Asn91 a dvěma vodami W346 a W348. Všechny tyto vazby jsou znázorněny na obrázku 3.11b a na 2D schématu 3.12.

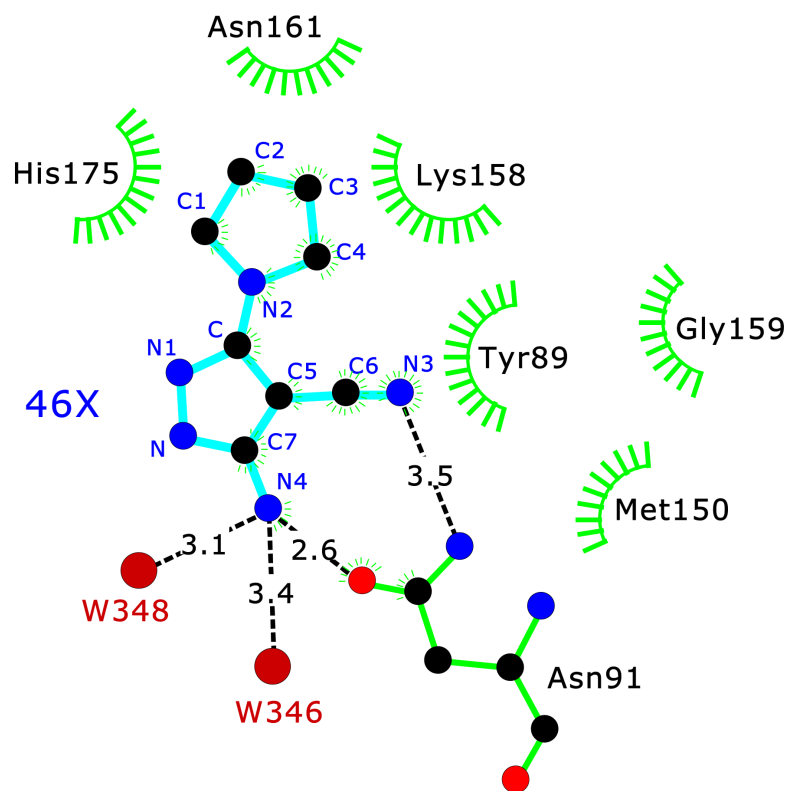


(a) Kompozitní slepá mapa ($2mF_o-DF_c$) znázorněná modrou sítí kolem ligandu v řetězci B na hladině 1σ .



(b) Černě znázorněné vazby mezi ligandem a okolními residui v řetězci B.

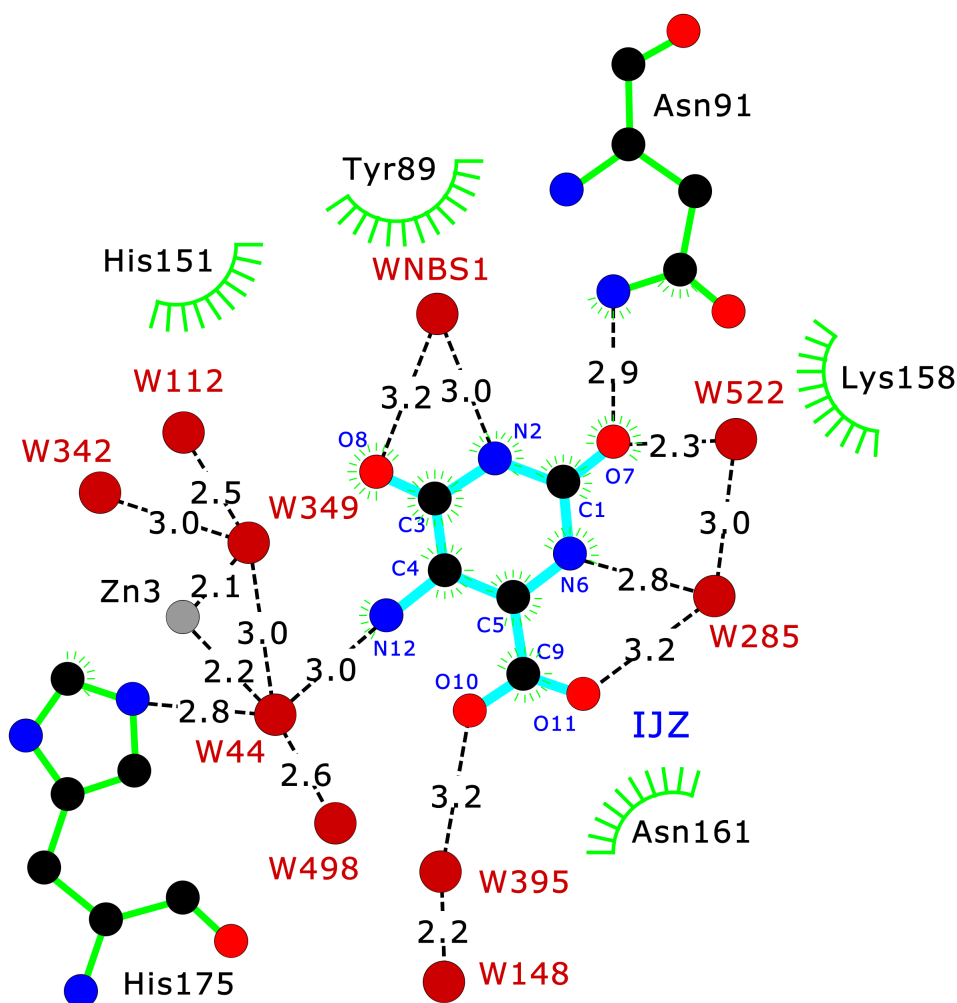
Obrázek 3.11: Aktivní místo struktury *SmNuc1B8* řetězce B s navázaným ligandem 1H-Pyrazole-4-carbonitrile 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl) (PDB kódové označení 46X). Ligand je reprezentován tyčinkovým modelem s tyrkysově zbarvenými uhlíky, residua tvořící kapsu NBS1 a His275 se zeleně zbarvenými uhlíky. Šedými koulemi je reprezentován zinkový klastr s okolními residui, jejichž uhlíky jsou zbarveny lososově. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].



Obrázek 3.12: Vazby mezi ligandem 1H-Pyrazole-4-carbonitrile 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl) (PDB kódové označení 46X) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo v řetězci B. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

3.2.5 *SmNuc1_{F9}*

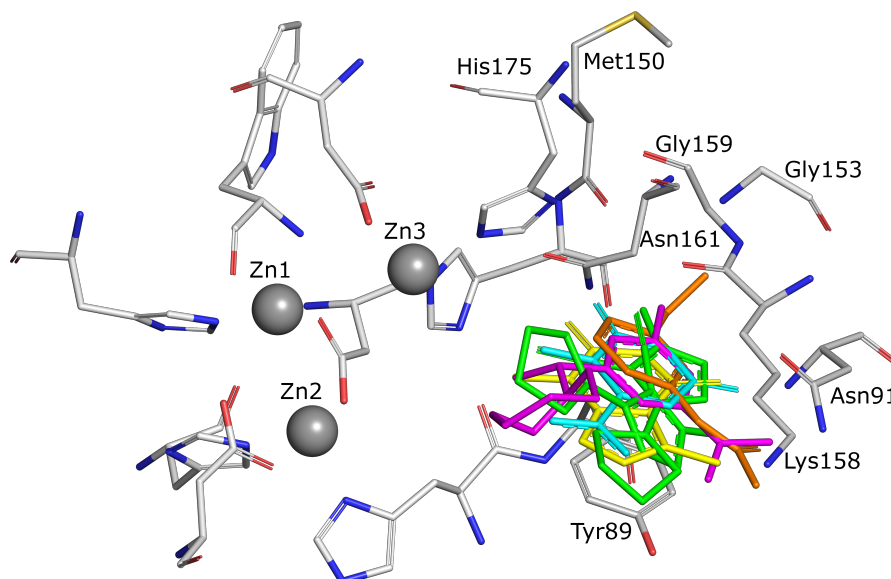
Do struktury označené *SmNuc1_{F9}* bylo namodelováno 507 molekul vody, jedna molekula síranu a v každém řetězci byl do aktivního místa namodelován ligand L-Histidine,1-methyl, který je na obrázcích níže značen podle PDB kódového označení IJZ. Interakce v řetězci A i B jsou pro tento ligand velice podobné, nicméně kvůli poměrně výraznému disorderu nebude interakce v řetězci B popsána. Přítomnost ligandu v řetězci A byla ověřena výpočtem $2mF_o - DF_c$ kompozitní slepé mapy, která je kolem ligandu vykreslena na hladině 1σ , viz obrázek 3.13a. Ligand v aktivním místě znovu tvoří paralelní stacking s Tyr89, dále je spojen vodíkovou vazbou na vodu W44, která je navázána na zinek Zn3 ze zinkového klastru. Do aktivního místa se též navázala i voda WNBS1, přes kterou jsou poskytnuty vazby na residua Asn91, Met150 a Gly153. Dále je ligand spojen přímou vazbou s residuem Asn91 a s vodami W522 a W285. Obě tyto vody jsou navázány i na residua tvořící kapsu NBS1 tvořící aktivní místo.



Obrázek 3.14: Vazby mezi ligandem L-Histidine,1-methyl (PDB kódové označení IJZ) a aminokyselinovými residui tvořícími aktivní místo v řetězci A. Obrázek byl vytvořen v programu LigPlot⁺ [45].

3.3 Návrh inhibitoru

Jak již bylo zmíněno, všechny ligandy se navázaly do části aktivního místa NBS1 (viz obrázek 3.15). Na základě těchto navázaných ligandů a jejich vazeb s okolními residui tvořícími aktivní místo byly navrženy čtyři nové molekuly možného inhibitoru. Tři nové molekuly jsou ve velikosti fragmentů, protože se všechny fragmenty navázaly pouze do části aktivního místa NBS1, které je prostorově omezeno. Čtvrtá molekula je větší s pokusem propojit vazbu mezi místem NBS1 a zinkovým klastrem. Tyto molekuly jsou uvedeny na obrázcích v tabulce 3.2.



Obrázek 3.15: Zobrazení všech navázaných ligandů v aktivním místě nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia*. Zinkový klastr v reprezentaci šedých koulí, residua tvořící aktivní místo reprezentovány tyčinkovým modelem se šedými uhlíky. Navázané ligandy v tyčinkové reprezentaci pro přehlednost zbarvené podle struktur, ve kterých byly objeveny: *SmNuc1_{B8}* zelená, *SmNuc1_{C3}* magenta, *SmNuc1_{D10}* oranžová, *SmNuc1_{F31}* žlutá, *SmNuc1_{F9}* tyrkysová. Residua, s nimiž fragmenty interagují, jsou označena svým názvem. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL [34].

První z molekul v tabulce 3.2 obsahuje podobně jako ligand 37T i IJZ 2 keto skupiny, přes něž by se mohla navázat do aktivního místa. Vazbu by tomuto ligandu mohla zprostředkovat i voda WNBS1 přes sekundární aminoskupinu, podobně jako je tomu u struktur *SmNuc1_{F31}* na obrázku 3.7b nebo *SmNuc1_{F9}* na obrázku 3.13b. Navržený ligand již v databázi PubChem [46] existuje pod názvem 4,6-dioxo-1H-1,3,5-triazine-2-carbaldehyd. Podobné molekuly s více než 90% shodou jsou 6-oxo-1H-1,3,5-triazine-2,4-dicarbaldehyde a 5-iodo-4,6-dioxo-1H-1,3,5-triazine-2-carbaldehyd.

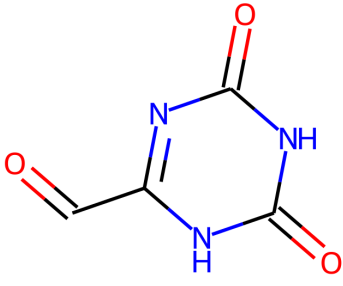
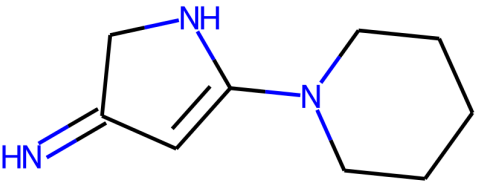
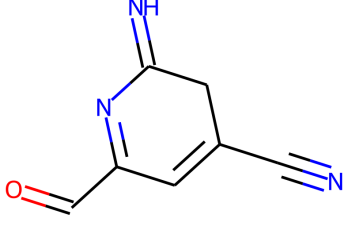
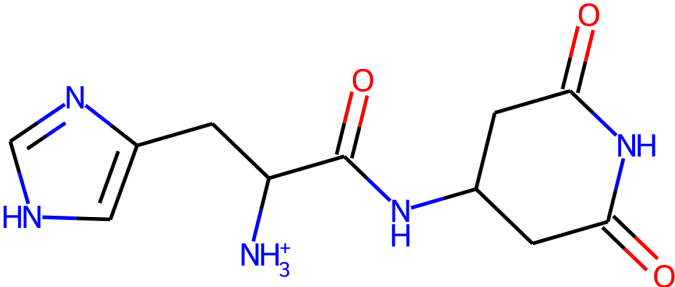
Druhá molekula z této tabulky má v databázích pouze jednu molekulu s více než 90% podobností, a to molekulu 2-(3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1H-isoquinolin-2-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carbonitril. V aktivním místě by mohla vytvořit vazbu přes NH skupinu, podobně jako ligand 46X, 463 nebo FXT-C3 ve strukturách *SmNuc1_{B8}* (na obrázku 3.9b), *SmNuc1_{D10}* (na obrázku 3.5b) nebo *SmNuc1_{C3}* (na obrázku 3.3b). Této vazby by se pravděpodobně nemusela účastnit voda WNBS1, neboť by místo ní byla vazba mezi dusíkem a kyslíkem jedné z okolních aminokyselinových residuí.

Třetí molekula byla v databázích nalezena pouze jako substruktura molekuly 5-bromo-4-cyano-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-6-carboxyové kyseliny nebo ethyl8-amino-7-cyano-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridine-5-carboxylátu. Tato molekula by teoreticky mohla vytvořit vazbu pomocí záporně nabitě azidoskupiny a zároveň pomocí NH skupiny, podobně jako ligand 46X ve struktuře *SmNuc1_{B8}* na obrázku 3.11b. Vazbu by mohl

zprostředkovat i histidinový tag nukleasy, který by teoreticky mohl tvořit vazbu s aldehydovou skupinou.

Poslední návrh molekuly je jedna větší molekula, u které byl jako základ použit histidin navázaný do zinkového klastru ze symetricky sdružené molekuly. Tato molekula by měla propojit zároveň inhibici kapsy NBS1 a inhibici zinkového klastru. Histidinová část této molekuly by se mohla navázat do zinkového klastru podobně jako His275 ve struktuře *SmNuc1_{B8}* na obrázku 3.11b. Voda v místě NBS1 by se této vazby pravděpodobně neúčastnila.

Tabulka 3.2: Nově navržené molekuly, které by mohly být novým selektivním inhibítorem nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia*. Obrázky nových molekul byly vytvořeny pomocí Grade2 [44].

Struktura nového ligandu	
SMILES molekuly	<chem>C(=O)C1=NC(=O)NC(=O)N1</chem>
Struktura nového ligandu	
SMILES molekuly	<chem>N=C2C=C(N1CCCCC1)NC2</chem>
Struktura nového ligandu	
SMILES molekuly	<chem>N#CC1=CC(C=O)=NC(=N)C1</chem>
Struktura nového ligandu	
SMILES molekuly	<chem>NC(Cc1c[nH]cn1)C(=O)NC2CC(=O)NC(=O)C2</chem>

Závěr

V této krystalografické studii vazby nízkomolekulárních ligandů do aktivního místa S1-P1 nukleasy ze *Stenotrophomonas maltophilia* bylo zjištěno, že některé fragmenty z desky Xtal Frag Screen (Jena Bioscience) se mohou navázat do aktivního místa nukleasy. Pouze přibližně 10 % testovaných fragmentů se navázalo do aktivního místa nukleasy tak, aby byly vazby dostatečně a strukturně popsitelné.

Ukázalo se, že část použitých fragmentů má destruktivní účinky na krystaly zkoumané nukleasy, které byly po namočení do roztoků fragmentů makroskopicky zničeny, či zcela rozpuštěny. Některé fragmenty zničily uspořádanost krystalů tak, že nešlo pozorovat difrakci.

Všechny fragmenty, které jsme pozorovali, se navázaly pouze do kapsy NBS1 a se zinkovým klastrem interagovaly pouze zprostředkovaně přes vodu navázanou na zinkový klastr. Na žádné jiné místo nukleasy se testované fragmenty nenavázaly.

Na základě těchto vazeb byly navrženy tři nové molekuly potenciálního inhibitoru, jejichž velikost a tvar jsou podobné úspěšně se vázajícím fragmentům. Kromě toho byla navržena ještě jedna větší molekula možného inhibitoru, která by spojovala část aktivního místa NBS1 se zinkovým klastrem. Tyto návrhy představují potenciální kandidáty pro vývoj nových látek, které by mohly efektivně inhibovat nukleasu.

Seznam použitých zdrojů

- [1] WEISS Manfred S. *et al.* *Of problems and opportunities—How to treat and how to not treat crystallographic fragment screening data.* Protein Science. 2022, 31/9. ISSN 0961-8368. DOI: 10.1002/pro.4391.
- [2] HUSTÁKOVÁ Blanka, TRUNDOVÁ Mária, ADÁMKOVÁ Kristýna, KOVAĽ Tomáš, DUŠKOVÁ Jarmila *et al.* *A highly active S1-P1 nuclease from the opportunistic pathogen Stenotrophomonas maltophilia cleaves c-di-GMP.* FEBS Letters. 2023, 597/16, s. 2103-2118. ISSN 0014-5793. DOI: 10.1002/1873-3468.14683.
- [3] ŠPELDOVÁ, Karolína. *Krystalografické testování vazby ligandů S1-P1 nukleasy.* Praha, 2021. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská. Vedoucí práce Tomáš Kovaľ.
- [4] KRAUS, Ivo. *Úvod do strukturní rentgenografie.* CZ: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [5] VALVODA, Václav, POLCAROVÁ Milena a LUKÁČ Pavel. *Základy strukturní analýzy.* Praha: Univerzita Karlova, 1992. ISBN 807066648X.
- [6] DRENTH, Jan. *Principles of protein x-ray crystallography.* 3. vyd. New York: Springer, c2007. ISBN 03-873-3334-7.
- [7] VAGIN, Alexei a Alexei TEPLYAKOV. *Molecular replacement with MOLREP.* Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2010, 66(1), 22-25. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444909042589.
- [8] MCCOY, Airlie J. *et al.* *Phaser crystallographic software.* Journal of Applied Crystallography. 2007, 40(4), 658-674. ISSN 0021-8898. DOI: 10.1107/S0021889807021206.
- [9] MCPHERSON, Alexander a Jose A. GAVIRA. *Introduction to protein crystallization.* Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications. 2014, 70(1), 2-20. ISSN 2053-230X. DOI: 10.1107/S2053230X13033141.
- [10] BAHAR, Ivet, ATILGAN, Ali Rana, ERMAN, Burak. *Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential.* Folding and Design. 1997 2(3), 173–181. DOI: 10.1016/s1359-0278(97)00024-2

- [11] EMSLEY, Paul a Kevin COWTAN. *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2004, 60(12), 2126-2132. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444904019158
- [12] SHELDRICK, George M. *Crystal structure refinement with SHELXL*. Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry. 2015, 71(1), 3-8. ISSN 2053-2296. DOI: 10.1107/S2053229614024218
- [13] SHELDRICK, George M. *A short history of SHELX*. Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography. 2008, 64(1), 112-122. ISSN 0108-7673. DOI: 10.1107/S0108767307043930
- [14] AFONINE, Pavel V., Ralf W. GROSSE-KUNSTLEVE, Nathaniel ECHOLS *et al.* *Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2012, 68(4), 352-367. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444912001308
- [15] ADAMS, Paul D., Pavel V. AFONINE, Gábor BUNKÓCZI *et al.* *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2010, 66(2). ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444909052925
- [16] MURSHUDOV, Garib N., Pavol SKUBÁK, Andrey A. LEBEDEV *et al.* *REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2011, 67(4), 355-367. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444911001314
- [17] WINN, Martyn D., Charles C. BALLARD *et al.* *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2011, 67(4), 235-242. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444910045749
- [18] BRÜNGER, Axel T. *Free R value: Cross-validation in crystallography*. Macromolecular Crystallography Part B. Elsevier. 1997, 366-396. ISBN 9780121821784. DOI: 10.1016/S0076-6879(97)77021-
- [19] WILLIAMS, Christopher J., Jeffrey J. HEADD, Nigel W. MORIARTY *et al.* *MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation*. Protein Science. 2018, 27(1), 293-315. ISSN 09618368. DOI: 10.1002/pro.3330
- [20] LASKOWSKI, R. A., M. W. MACARTHUR, D. S. MOSS a J. M. THORNTON. *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography. 26(2), 283-291. ISSN 00218898. DOI: 10.1107/S0021889892009944
- [21] YOUNG, Jasmine Y., John D. WESTBROOK, Zukang FENG *et al.* *OneDep: Unified wwPDB System for Deposition, Biocuration, and Validation of Macromolecular Structures in the PDB Archive*. Structure. 2017, 25(3), 536-545. ISSN 09692126. DOI: 10.1016/j.str.2017.01.004

- [22] KLEYWEGT, Gerard J. a T. ALWYN JONES. *Model building and refinement practice*. Macromolecular Crystallography Part B. Elsevier, 1997, 1997, 208-230. Methods in Enzymology. ISBN 9780121821784. DOI: 10.1016/S0076-6879(97)77013-7
- [23] SMART, Oliver S. a Vladimír HORSKÝ *et al.* *Validation of ligands in macromolecular structures determined by X-ray crystallography*. Acta Crystallographica Section D Structural Biology. 2018, 74(3), 228-236. ISSN 2059-7983. DOI: 10.1107/S2059798318002541
- [24] EMSLEY, Paul. *Tools for ligand validation in Coot*. Acta Crystallographica Section D Structural Biology. 2017, 73(3), 203-210. ISSN 2059-7983. DOI: 10.1107/S2059798317003382
- [25] BERMAN, Helen, Kim HENRICK a Haruki NAKAMURA. *Announcing the worldwide Protein Data Bank*. 2003, 10(12), 980-980. ISSN 1545-9993. <http://www wwpdb.org/> DOI: 10.1038/nsb1203-980
- [26] BRUNO, Ian J., Jason C. COLE, Magnus KESSLER *et al.* *Retrieval of Crystallographically-Derived Molecular Geometry Information*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences. 2004, 44(6), 2133-2144. ISSN 0095-2338. DOI: 10.1021/ci049780b
- [27] GROOM, Colin R., Ian J. BRUNO, Matthew P. LIGHTFOOT a Suzanna C. WARD. *The Cambridge Structural Database*. Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials. 2016, 72(2), 171-179. ISSN 2052-5206. DOI: 10.1107/S2052520616003954
- [28] TERWILLIGER, Thomas C. *et al.* *Iterative-build OMIT maps: map improvement by iterative model building and refinement without model bias*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2008, 64(5), 515-524. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444908004319
- [29] BHAT, T. N. *Calculation of an OMIT map*. Journal of Applied Crystallography. 21(3), 279-281. ISSN 00218898. DOI: 10.1107/S0021889887012755
- [30] LIEBSCHNER, Dorothee, Pavel V. AFONINE *et al.* *Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent*. Acta Crystallographica Section D Structural Biology. 2017, 73(2), 148-157. ISSN 2059-7983. DOI: 10.1107/S2059798316018210
- [31] KOVAL, Tomáš a Jan DOHNÁLEK. *Characteristics and application of S1-P1 nucleases in biotechnology and medicine*. Biotechnology Advances. 2018, 36(3), 603-612. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.007
- [32] BERMAN, H. M. *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research. 28(1), 235-242. ISSN 13624962. <http://www.rcsb.org/> DOI: 10.1093/nar/28.1.235

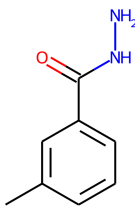
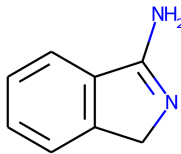
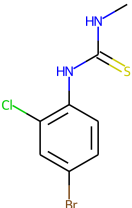
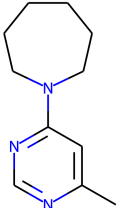
- [33] KOVAL, Tomáš *et al.* *Structural and Catalytic Properties of S1 Nuclease from Aspergillus oryzae Responsible for Substrate Recognition, Cleavage, Non-Specificity, and Inhibition.* PLOS ONE. 2016, 11(12). ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0168832
- [34] Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.* 2020
- [35] KOVAL, Tomáš *et al.* *Structural and Catalytic Properties of S1 Nuclease from Aspergillus oryzae Responsible for Substrate Recognition, Cleavage, Non-Specificity, and Inhibition.* Online. PLOS ONE. 2016. ISSN 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0168832
- [36] LESNIEWICZ K. *et al.* *The Plant S1-Like Nuclease Family Has Evolved a Highly Diverse Range of Catalytic Capabilities.* Plant and Cell Physiology. 2013, 54/7, 1064-1078. ISSN 1471-9053. DOI: 10.1093/pcp/pct061.
- [37] YANG B *et al.* *Purification, Cloning, and Characterization of the CEL I Nuclease.* Biochemistry. 2000, 39/13, 3533-3541. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi992376z.
- [38] HEIDRICH, Johannes *et al.* *Embracing the Diversity of Halogen Bonding Motifs in Fragment-Based Drug Discovery —Construction of a Diversity-Optimized Halogen-Enriched Fragment Library.* Frontiers in Chemistry. 2019, roč. 7. ISSN 2296-2646. DOI: 10.3389/fchem.2019.00009.
- [39] HUSTÁKOVÁ, Blanka. *Struktura a funkce S1-P1 nukleas z oportunních patogenů.* Praha, 2019. Bakalářská práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Vedoucí práce Petra Lipovová.
- [40] GERLACH, M., MUELLER, U., WEISS, M. S. *The MX Beamlines BL14.1-3 at BESSY II.* Journal of large-scale research facilities JLSRF. 2016, 2. ISSN 2364-091X. DOI: 10.17815/jlsrf-2-64
- [41] BATTYE, T. Geoff G., Luke KONTOGIANNIS, Owen JOHNSON, Harold R. POWELL a Andrew G. W. LESLIE. *IMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM.* Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2011, 67(4), 271-281. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444910048675
- [42] KABSCH, W. *XDS.* Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2010, 66(2), 125-132. ISSN 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444909047337
- [43] EVANS, Philip R. a Garib N. MURSHUDOV. *How good are my data and what is the resolution?* Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 2013, 69(7), 1204-1214. ISSN 0907-4449. DOI:
- [44] SMART, O.S., Sharff A., Holstein, J., Womack, T.O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Vornrhein, C. and Bricogne G. *Grade2 version 1.5.0.* Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd. 2021.

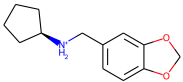
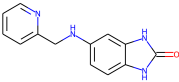
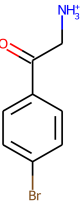
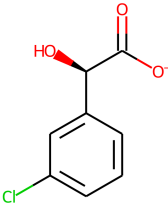
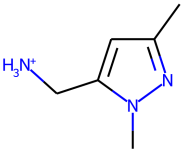
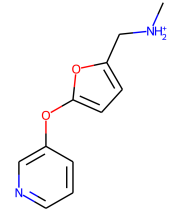
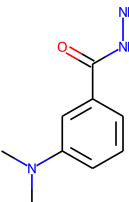
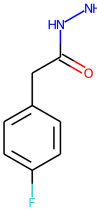
- [45] LASKOWSKI R., SWINDELLS M., *LigPlot: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery*. Journal of Chemical Information and Modeling. 2011, 51(10), 2778-2786. ISSN 1549-9596. DOI:10.1021/ci200227u
- [46] KIM S. *et al.* *PubChem 2023 update*. Nucleic Acids Research. 2023, 51/D1, D1373-D1380. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkac956.
- [47] PENCE H. a WILLIAMS A. *ChemSpider: An Online Chemical Information Resource*. Journal of Chemical Education. 2010, 87/11, 1123-1124. ISSN 0021-9584. DOI: 10.1021/ed100697w.
- [48] STERLING T. a IRWIN J. J. *ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone*. Journal of Chemical Information and Modeling. 2015, 55/11, 2324-2337. ISSN 1549-9596. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00559.

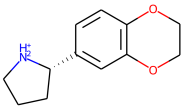
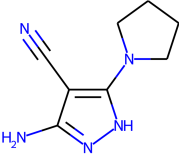

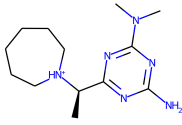
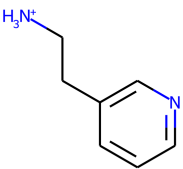
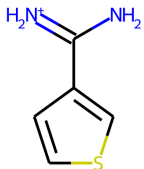
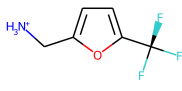
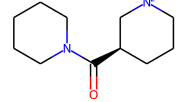
Přílohy

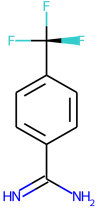
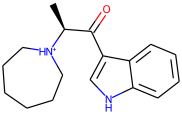
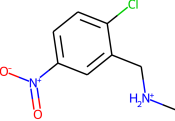
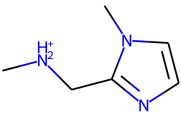
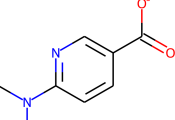
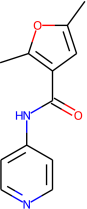
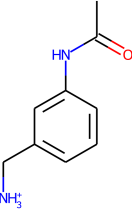
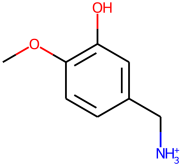
Příloha A

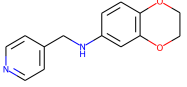
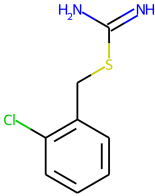
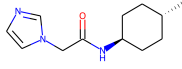
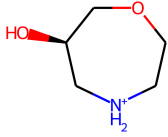
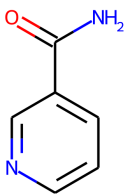
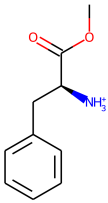
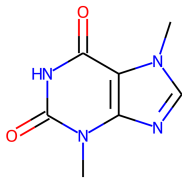
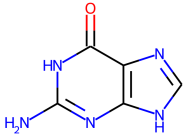
Tabulka 3: Tabulka všech ligandů použitých k fragment screeningu. Obrázky ligandů byly vytvořeny pomocí Grade2 [44].


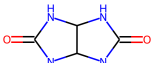
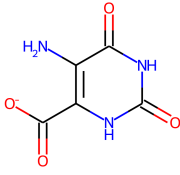
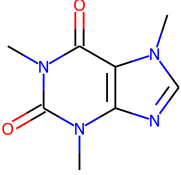
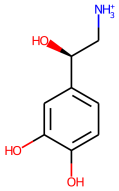
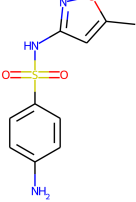
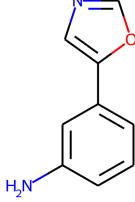
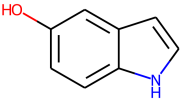
Jamka	A1	A2	A3	A4
Strukturní vzorec ligandu				
Název ligandu	Benzoic acid, 3-methyl-, hydrazide	1H-Isoindol-3-amine	Thiourea, N-(4-bromo-2-chlorophenyl)-N'-methyl	1H-Azepine, hexahydro-1-(6-methyl-4-pyrimidinyl)
PDB kód ligandu	45L	F05	46V	46S
Název krystalu	SmNuc1 _{A1}	SmNuc1 _{A2}	SmNuc1 _{A31,2}	SmNuc1 _{A4}
Doba namáčení	2 h	3,5 h	4 h	3,5 h
Stav	krystal rozpuštěn	ligand nenalezen	bez difrakce	bez difrakce

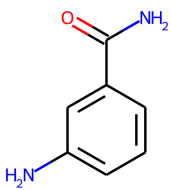
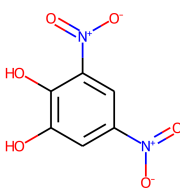
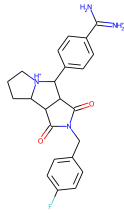
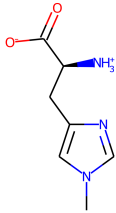
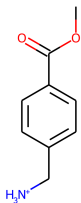
Jamka	A6	A9	A10	A12
Struktura ligandu				
Název ligandu	1,3-Benzodioxole-5-methanamine, N-cyclopentyl	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-[(2-pyridinyl methyl) amino]	Ethanone, 2-amino-1-(4-bromophenyl)-hydrochloride (1:1)	Benzeneacetic acid, 3-chloro- α -hydroxyl
PDB kód ligandu	45N	47Q	47A	47E
Název krystalu	SmNuc1 _{A6}	SmNuc1 _{A9}	SmNuc1 _{A10}	SmNuc1 _{A12}
Doba namáčení	2 h	5 h	3 h	2 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen	bez difrakce
Jamka	B1	B2	B5	B6
Struktura ligandu				
Název ligandu	1H-Pyrazole-5-methanamine, 1,3-dimethyl	2-Furan methanamine, N-methyl-5-(3-pyridinyloxy)	Benzoic acid, 3-(dimethyl amino) hydrazide	Benzeneacetic acid, 4-fluoro-hydrazide
PDB kód ligandu	47J	F63	47S	45Y
Název krystalu	SmNuc1 _{B1}	SmNuc1 _{B2}	SmNuc1 _{B5}	SmNuc1 _{B6}
Doba namáčení	3,5 h	3 h	3 h	5 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen

Jamka	B7	B8	C2	C3
Struktura ligandu				
Název ligandu	Pyrrolidine, 2-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)	1H - Pyrazole-4-carbonitrile, 5-amino-3-(1-pyrrolidinyl)	2-Thiazolamine, 4-methyl-5-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)	1,3,5-Triazine-2,4-diamine, 6-[1-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)ethyl]-N2,N2-dimethyl
PDB kód ligandu	8LZ	46X	46P	-
Název krystalu	SmNuc1 _{B7}	SmNuc1 _{B8}	SmNuc1 _{C2}	SmNuc1 _{C3}
Doba namáčení	3 h	5 h	3 h	2 h
Stav	bez difrakce	lig. navázán	ligand nenalezen	lig. navázán
Jamka	C4	C5	C6	C7
Struktura ligandu				
Název ligandu	3-Pyridine-ethanamine	3-Thiophene-carboximidamide, hydrochloride (1:1)	2-Furan methanamine, 5-(trifluoromethyl)	Methanone, 1-piperidinyl-3-piperidinyl
PDB kód ligandu	45X	8M2	47M	-
Název krystalu	SmNuc1 _{C4}	SmNuc1 _{C5}	SmNuc1 _{C6}	SmNuc1 _{C7_{1,2}}
Doba namáčení	3 h	2,5 h	5 h	2,5 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen

Jamka	C9	C10	C12	D1
Struktura ligandu				
Název ligandu	Benzene-carboximidamide, 4-(trifluoromethyl)	Guanidine, N-(4-ethoxy-8-methyl-2-quinazoliny)	Benzene-methanamine, 2-chloro-N-methyl-5-nitro	1H - Imidazole-2-methanamine, N,1-dimethyl
PDB kód ligandu	FBF	-	-	-
Název krystalu	SmNuc1 _{C9}	SmNuc1 _{C10,1,2}	SmNuc1 _{C12}	SmNuc1 _{D1}
Doba namáčení	3,5 h	2,5 h	2,5 h	2 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	krystal rozpuštěn	krystal rozpuštěn
Jamka	D5	D6	D10	D11
Struktura ligandu				
Název ligandu	3-Pyridine-carboxylic acid, 6-(dimethylamino)	3-Furancarboxamide, 2,5-dimethyl-N-4-pyridinyl	Acetamide, N-[3-(aminomethyl)phenyl]-	Phenol, 5-(aminomethyl) 2-methoxy-, hydrochloride (1:1)
PDB kód ligandu	46L	47V	463	47G
Název krystalu	SmNuc1 _{D5}	SmNuc1 _{D6}	SmNuc1 _{D10}	SmNuc1 _{D11}
Doba namáčení	2 h	2 h	5 h	5 h
Stav	krystal rozpuštěn	ligand nenalezen	lig. navázán	krystal rozpuštěn

Jamka	D12	E1	E4	E8
Struktura ligandu				
Název ligandu	4-Pyridine-methanamine, N-(2,3-dihydro-1,4benzodioxin-6-yl)	Carbamimidothioic acid, (2-chlorophenyl)-methyl ester	1H-Imidazole-1-acetamide, N-(4-methylcyclohexyl)	1,4-Oxazepin-6-ol, hexahydro-(6R)
PDB kód ligandu	F91	F06	483	8KB
Název krystalu	SmNuc1 _{D12,2}	SmNuc1 _{E1,2}	SmNuc1 _{E4,2}	SmNuc1 _{E8}
Doba namáčení	2,5 h	3 h	3 h	2 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen	ligand nenalezen
Jamka	F1	F2	F3	F4
Struktura ligandu				
Název ligandu	3-Pyridine-carboxamide	L-Phenylalanine, methylester, hydrochloride (1:1)	1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-3,7-dimethyl	6H-Purin-6-one,2-amino-1,9-dihydro
PDB kód ligandu	NCA	0A9	37T	GUN
Název krystalu	SmNuc1 _{F1}	SmNuc1 _{F2}	SmNuc1 _{F3,2}	SmNuc1 _{F4}
Doba namáčení	5 h	3,5 h	3,5 h	3,5 h
Stav	ligand nenalezen	ligand nenalezen	lig. navázán	ligand nenalezen

Jamka	F6	F8	F9	F11
Struktura ligandu				
Název ligandu	2(3H)-Benzoxazolone 5-chloro-	Imidazo[4,5-d]imidazole-2,5(1H,3H)-dione, tetrahydro	4-Pyrimidine carboxylic acid, 5-amino-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-dioxo	1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl
PDB kód ligandu	CLW	GLW	IJZ	CFF
Název krystalu	SmNuc1 _{F61,2}	SmNuc1 _{F8}	SmNuc1 _{F9}	SmNuc1 _{F11}
Doba namáčení	2 h	2 h	5 h	4 h
Stav	bez difrakce	krystal rozpuštěn	lig. navázán	bez difrakce
Jamka	G2	G8	G11	G12
Struktura ligandu				
Název ligandu	1,2-Benzenediol, 4-[(1R)-2-amino-1-hydroxyethyl]	Benzene sulfonamide, 4-amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)	Benzenamine, 3-(5-oxazolyl)	1H-Indol-5-ol
PDB kód ligandu	LNR	08D	5AO	5H1
Název krystalu	SmNuc1 _{G2}	SmNuc1 _{G8}	SmNuc1 _{G11,2}	SmNuc1 _{G12}
Doba namáčení	3 h	3 h	3 h	2,5 h
Stav	krystal rozpuštěn	ligand nenalezen	ligand nenalezen	bez difrakce

Jamka	H1	H8	D2	F10
Struktura ligandu				
Název ligandu	Benzamide, 3-amino-	1,2-Benzenediol, 3,5-dinitro	Imidazo[1,2-a]pyridine-2-acetamide, N-phenyl	L-Histidine, 1-methyl
PDB kód ligandu	3AB	DNC	FSN	HIC
Název krystalu	SmNuc1 _{H1,2}	SmNuc1 _{H8}	SmNuc1 _{D2}	SmNuc1 _{F10}
Doba namáčení	3 h	3 h	3 h	3 h
Stav	ligand nenalezen	bez difrakce	krystal rozpuštěn	ligand nenalezen
Jamka	C8			
Struktura ligandu				
Název ligandu	Benzoic acid, 4-(aminomethyl) methylester, hydrochloride (1:1)			
PDB kód ligandu	8G2			
Název krystalu	SmNuc1 _{C8}			
Doba namáčení	3 h			
Stav	ligand nenalezen			

Příloha B

Tabulka 4: Charakteristické parametry dat z difrakčního experimentu a jejich následného zpracování. Hodnoty v závorkách odpovídají slupce s nejvyšším rozlišením.

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1A2</i>	<i>SmNuc1A6</i>	<i>SmNuc1A9</i>	<i>SmNuc1A10₁</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	268	150	150	150
Počet použitých snímků	3599	3100	3598	3600
Difrakční limit [Å]	43,18 -1,85 (1,89-1,85)	43,14-1,49 (1,52-1,49)	43,38- 1,39 (1,42- 1,39)	43,46-1,45 (1,47-1,45)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,30 72,71 82,73 90,00 102,89 90,00	44,19 72,72 82,60 90,00 102,48 90,00	44,39 73,03 83,07 90,00 102,20 90,00	44,51 72,65 82,95 90,00 102,47 90,0
Prostorová grupa	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Počet reflexí	292351 (16260)	479662 (24044)	661833 (30831)	617150 (26579)
Počet nezávislých reflexí	43425 (2602)	81785 (4037)	101705 (4880)	90480 (4409)
Kompletnost dat [%]	99,1 (97,4)	99,0 (98,4)	98,6 (95,5)	99,1 (97,7)
<i>R</i> _{meas}	0,233 (1,032)	0,067 (0,527)	0,093 (0,651)	0,05 (0,35)
<i>R</i> _{merge}	0,214 (0,946)	0,061 (0,480)	0,086 (0,598)	0,046 (0,318)
<i>R</i> _{pim}	0,090 (0,406)	0,027 (0,212)	0,036 (0,254)	0,019 (0,14)
<i>CC</i> _{1/2}	0,991 (0,732)	0,999 (0,938)	0,997 (0,866)	0,99 (0,97)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	9,7 (2,3)	17,5 (3,8)	12,7 (3,0)	23,9 (5,3)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1A10₂</i>	<i>SmNuc1B1</i>	<i>SmNuc1B2</i>	<i>SmNuc1B5</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	321	268	322	322
Počet použitých snímků	3148	2797	2599	3147
Difrakční limit [Å]	37,29-1,65 (1,68-1,65)	43,18-1,60 (1,63-1,60)	43,41- 1,60 (1,62- 1,60)	40,54-1,75 (1,78-1,75)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,51 72,65 82,94 90,0 102,51 90,0	44,29 72,73 82,73 90,00 102,89 90,00	44,51 72,71 82,97 90,00 102,78 90,00	44,26 72,70 83,02 90,00 102,43 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁
Počet reflexí	349849 (17028)	347060 (17315)	331347 (14476)	300603 (15422)
Počet nezávislých reflexí	60962 (2862)	66912 (3256)	67453 (2967)	51511 (2714)
Kompletnost dat [%]	97,9 (95,0)	98,9 (98,0)	98,7 (88,8)	99,3 (95,4)
<i>R</i> _{meas}	0,13 (0,88)	0,237 (2,232)	0,135 (1,598)	0,117 (0,873)
<i>R</i> _{merge}	0,118 (0,801)	0,213 (2,011)	0,121 (1,423)	0,106 (0,793)
<i>R</i> _{pim}	0,054 (0,352)	0,103 (0,956)	0,060 (0,716)	0,048 (0,358)
<i>CC</i> _{1/2}	0,99 (0,84)	0,992 (0,409)	0,997 (0,567)	0,997 (0,769)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	13,0 (2,5)	5,9 (0,8)	8,8 (1,1)	11,8 (2,1)
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1B6</i>	<i>SmNuc1B8</i>	<i>SmNuc1C2</i>	<i>SmNuc1C3</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	211	150	240	295
Počet použitých snímků	2850	3598	3593	3598
Difrakční limit [Å]	40,54-1,75 (1,78-1,75)	42,83-1,73 (1,76-1,73)	42,86-1,39 (1,42-1,39)	42,62-1,70 (1,73-1,70)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,40 72,78 81,54 90,00 105,26 90,00	44,42 72,71 81,55 90,00 105,24 90,00	44,24 72,76 81,57 90,00 105,57 90,00	44,31 72,43 81,40 90,00 105,79 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁
Počet reflexí	276647(13197)	659436 (29979)	351891 (15565)	260327 (16064)
Počet nezávislých reflexí	51314 (2465)	97893 (4625)	54408 (2715)	38184 (2417)
Kompletnost dat [%]	97,9 (85,9)	98,3 (94,4)	99,1 (94,9)	97,9 (95,8)
<i>R</i> _{meas}	0,081 (0,464)	0,077 (1,007)	0,106 (0,783)	0,094 (0,625)
<i>R</i> _{merge}	0,073 (0,418)	0,071 (0,928)	0,098 (0,711)	0,086 (0,576)
<i>R</i> _{pim}	0,034 (0,198)	0,029 (0,386)	0,041 (0,321)	0,035 (0,239)
<i>CC</i> _{1/2}	0,998 (0,927)	0,999 (0,817)	0,998 (0,760)	0,999 (0,912)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	15,9 (4,1)	15,5 (2,2)	13,6 (2,7)	16,8 (3,7)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1C4</i>	<i>SmNuc1C5</i>	<i>SmNuc1C6</i>	<i>SmNuc1C7₁</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	321	374	212	295
Počet použitých snímků	3588	3398	3599	3597
Difrakční limit [Å]	39,85-2,29 (2,37-2,29)	43,22-2,30 (2,38-2,30)	36,74-1,24 (1,27-1,24)	42,79-1,75 (1,78-1,75)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,33 72,51 82,25 90,00 104,34 90,00	44,30 72,63 82,87 90,00 102,66 90,00	44,19 72,79 81,17 90,00 105,62 90,00	44,38 72,75 81,56 90,00 105,37 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁
Počet reflexí	134542 (10660)	146420 (14101)	811670 (30626)	336589 (18368)
Počet nezávislých reflexí	22423 (2103)	22720 (2210)	133451 (5999)	50008 (2696)
Kompletnost dat [%]	98,0 (94,3)	99,0 (98,7)	96,4 (87,5)	99,2 (96,3)
<i>R</i> _{meas}	0,202 (0,560)	0,172 (0,584)	0,092 (1,714)	0,084 (0,507)
<i>R</i> _{merge}	0,183 (0,505)	0,158 (0,536)	0,085 (1,546)	0,078 (0,468)
<i>R</i> _{pim}	0,084 (0,237)	0,067 (0,228)	0,036 (0,717)	0,032 (0,192)
<i>CC</i> _{1/2}	0,961 (0,939)	0,995 (0,927)	0,999 (0,497)	0,999 (0,945)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	7,7 (2,9)	12,4 (4,4)	11,8 (1,2)	17,0 (4,5)
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1C7₂</i>	<i>SmNuc1C8₁</i>	<i>SmNuc1C8₂</i>	<i>SmNuc1C9</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	295	322	212	268
Počet použitých snímků	3600	2998	2998	3593
Difrakční limit [Å]	43,12-2,00 (2,05-2,00)	41,13-1,5 (1,53-1,5)	41,11-1,45 (1,47-1,45)	43,13-2,19 (2,26-2,19)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,40 72,63 82,15 90,00 103,78 90,00	84,61 72,79 88,55 90,00 107,59 90,00	49,83 72,38 72,87 90,0 90,0 90,0	49,81 72,47 72,82 90,0 90,0 90,0
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁
Počet reflexí	235472 (15785)	449356(13945)	617259(29237)	342449 (26915)
Počet nezávislých reflexí	33232 (2301)	42547 (1845)	46876 (2210)	51801 (4124)
Kompletnost dat [%]	96,7 (90,9)	99,0 (89,1)	98,9 (96,3)	98,2 (90,8)
<i>R</i> _{meas}	0,137 (0,745)	99,0 (89,1)	98,9 (96,3)	0,186 (0,515)
<i>R</i> _{merge}	0,127 (0,689)	0,054 (0,423)	0,069 (0,564)	0,170 (0,473)
<i>R</i> _{pim}	0,051 (0,280)	0,017 (0,161)	0,021 (0,174)	0,072 (0,201)
<i>CC</i> _{1/2}	0,997 (0,906)	1,0 (0,848)	1,0 (0,956)	0,991 (0,952)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	10,9 (2,5)	30,3 (4,7)	26,4 (5,3)	6,4 (3,8)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1C10₁</i>	<i>SmNuc1C10₂</i>	<i>SmNuc1D6</i>	<i>SmNuc1D10</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	243	243	348	295
Počet použitých snímků	3597	2891	3599	3098
Difrakční limit [Å]	42,95-1,80 (1,84-1,80)	43,1-1,91 (1,96-1,91)	36,93-2,15 (2,21-2,15)	42,64-1,74 (1,78-1,74)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,32 72,69 82,12 90,00 104,24 90,00	44,67 73,35 82,57 90,00 105,25 90,00	44,00 72,87 82,49 90,00 103,23 90,00	44,25 72,68 81,52 90,00 105,52 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁
Počet reflexí	315701 (18258)	212028 (12628)	181462 (15715)	295856 (16542)
Počet nezávislých reflexí	46356 (2625)	39157 (2432)	27503 (2355)	50172 (2715)
Kompletnost dat [%]	99,0 (94,3)	98,7 (91,6)	99,1 (97,8)	98,7 (96,8)
<i>R</i> _{meas}	0,090 (0,606)	0,168 (1,345)	0,146 (0,519)	0,166 (1,182)
<i>R</i> _{merge}	0,083 (0,561)	0,151 (1,204)	0,134 (0,478)	0,151 (1,081)
<i>R</i> _{pim}	0,034 (0,227)	0,071 (0,587)	0,057 (0,199)	0,068 (0,471)
<i>CC</i> _{1/2}	0,999 (0,935)	0,995 (0,625)	0,994 (0,944)	0,994 (0,717)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	15,3 (3,7)	8,5 (1,7)	10,7 (4,0)	9,1 (1,8)
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1D12₁</i>	<i>SmNuc1D12₂</i>	<i>SmNuc1E1</i>	<i>SmNuc1E4₁</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	260	240	423	260
Počet použitých snímků	3597	3596	3597	3597
Difrakční limit [Å]	42,90-1,80 (1,84-1,80)	43,02-1,90 (1,94-1,90)	42,33-2,00 (2,05-2,00)	36,34-1,59 (1,61-1,59)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,28 72,40 81,88 90,00 104,35 90,00	44,31 72,67 82,19 90,00 103,84 90,00	43,92 72,87 81,41 90,00 105,50 90,00	44,40 72,68 81,83 90,00 104,53 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁	<i>P</i> ₂₁
Počet reflexí	296699 (13014)	236123 (12920)	212825 (16164)	440577 (15630)
Počet nezávislých reflexí	44597 (1938)	37652 (2236)	33104 (2393)	66375 (2325)
Kompletnost dat [%]	96,3 (70,8)	94,1 (86,7)	98,2 (97,3)	97,5 (96,5)
<i>R</i> _{meas}	0,105 (0,878)	0,062 (0,376)	0,351 (2,341)	0,095 (0,753)
<i>R</i> _{merge}	0,097 (0,811)	0,057 (0,343)	0,318 (2,162)	0,087 (0,695)
<i>R</i> _{pim}	0,040 (0,333)	0,024 (0,151)	0,144 (0,888)	0,036 (0,287)
<i>CC</i> _{1/2}	0,998 (0,895)	0,999 (0,956)	0,967 (0,640)	0,998 (0,923)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	11,7 (2,0)	21,5 (5,0)	5,5 (1,1)	10,7 (2,1)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1E42</i>	<i>SmNuc1E8</i>	<i>SmNuc1F1</i>	<i>SmNuc1F2</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	241	295	212	268
Počet použitých snímků	3598	3596	3595	3598
Difrakční limit [Å]	42,66-1,70 (1,73-1,70)	40,66-1,60 (1,63-1,60)	43,24-1,85 (1,88-1,85)	43,6- 1,50 (1,52- 1,50)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,28 72,82 81,51 90,00 105,55 90,00	41,93 72,79 79,18 90,00 104,16 90,00	44,65 72,88 82,15 90,00 103,61 90,00	44,47 72,89 83,51 90,00 101,40 90,00
Prostorová grupa	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Počet reflexí	360568 (12994)	273185 (9729)	553277 (21860)	561894 (26695)
Počet nezávislých reflexí	54171 (2280)	56190 (2561)	45771 (2387)	83070 (4059)
Kompletnost dat [%]	98,9 (98,0)	98,3 (92,5)	98,8 (84,9)	99,2 (98,2)
<i>R</i> _{meas}	0,111 (0,592)	0,281 (1,472)	0,347 (0,760)	0,077 (0,713)
<i>R</i> _{merge}	0,102 (0,539)	0,250 (1,271)	0,333 (0,719)	0,071 (0,657)
<i>R</i> _{pim}	0,043 (0,239)	0,125 (0,714)	0,097 (0,241)	0,029 (0,274)
<i>CC</i> _{1/2}	0,997 (0,922)	0,970 (0,284)	0,987 (0,914)	0,999 (0,871)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	10,9 (2,3)	5,6 (1,1)	4,0 (1,8)	18,1 (2,8)
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1F31</i>	<i>SmNuc1F32</i>	<i>SmNuc1F4</i>	<i>SmNuc1F9</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	345	347	322	239
Počet použitých snímků	1799	3598	2898	3350
Difrakční limit [Å]	42,64-1,75 (1,78-1,75)	36,8-1,94 (1,99-1,94)	43,08-2,10 (2,16-2,10)	43,37-1,74 (1,78-1,74)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,28 72,71 81,40 90,00 105,64 90,00	44,29 72,74 81,45 90,00 105,56 90,00	85,11 72,76 88,18 90,00 108,10 90,00	44,47 72,71 82,54 90,00 102,82 90,00
Prostorová grupa	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Počet reflexí	169961 (9508)	237674 (15744)	326164 (23102)	330323 (18633)
Počet nezávislých reflexí	49654 (2731)	36433 (2522)	59424 (4517)	52083 (2852)
Kompletnost dat [%]	98,9 (98,9)	99,3 (98,5)	98,9 (97,0)	99,4 (98,5)
<i>R</i> _{meas}	0,111 (0,981)	0,222 (0,964)	0,189 (0,733)	0,107 (0,768)
<i>R</i> _{merge}	0,094 (0,829)	0,204 (0,883)	0,171 (0,658)	0,098 (0,707)
<i>R</i> _{pim}	0,059 (0,518)	0,086 (0,379)	0,078 (0,314)	0,042 (0,296)
<i>CC</i> _{1/2}	0,997 (0,737)	0,994 (0,816)	0,996 (0,863)	0,997 (0,856)
<i>I</i> / <i>σ</i> [I]	8,7 (1,6)	8,1 (2,3)	7,6 (2,4)	14,6 (2,8)

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1F10</i>	<i>SmNuc1G8</i>	<i>SmNuc1G11</i>	<i>SmNuc1H1</i>
Vzdálenost detektoru [mm]	321	348	212	260
Počet použitých snímků	3150	3050	3600	3598
Difrakční limit [Å]	42,67-2,0 (2,05-2,00)	43,7-1,99 (2,04-1,99)	43,29-1,40 (1,42-1,40)	42,97-1,60 (1,63-1,60)
Parametry el. buňky: <i>a</i> <i>b</i> <i>c</i> [Å] <i>α</i> <i>β</i> <i>γ</i> [°]	44,12 72,71 81,67 90,0 104,75 90,0	85,22 73,02 89,60 90,00 108,09 90,00	44,42 72,71 82,64 90,00 102,99 90,00	44,48 72,77 81,81 90,00 104,99 90,00
Prostorová grupa	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁
Počet reflexí	185357 (14034)	368924 (18284)	676060 (32936)	439787 (20767)
Počet nezávislých reflexí	33248 (2397)	66684 (3333)	99801 (4845)	65708 (3132)
Kompletnost dat [%]	97,9 (96,5)	98,6 (93,6)	99,2 (98,0)	98,9 (96,2)
<i>R</i> _{meas}	0,187 (0,810)	0,284 (0,865)	0,052 (0,653)	0,094 (0,805)
<i>R</i> _{merge}	0,168 (0,737)	0,257 (0,784)	0,048 (0,603)	0,087 (0,743)
<i>R</i> _{pim}	0,080 (0,330)	0,120 (0,361)	0,020 (0,248)	0,036 (0,307)
<i>CC</i> _{1/2}	0,979 (0,873)	0,984 (0,808)	1,000 (0,916)	0,999 (0,905)
<i>I</i> /σ [I]	8,6 (2,3)	3,4 (1,4)	21,3 (3,3)	13,1 (2,8)

Příloha C

Tabulka 5: Charakteristické parametry upřesňování strukturních modelů.

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1A2</i>	<i>SmNuc1A6</i>	<i>SmNuc1A9</i>	<i>SmNuc1A10₁</i>
R_{work}	0,280	0,185	0,188	0,160
R_{free}	0,319	0,204	0,220	0,185
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,008	0,010	0,011	0,011
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,569	1,716	1,807	1,777
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1A10₂</i>	<i>SmNuc1B1</i>	<i>SmNuc1B2</i>	<i>SmNuc1B5</i>
R_{work}	0,215	0,504	0,273	0,179
R_{free}	0,240	0,509	0,294	0,224
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,007	0,003	0,007	0,007
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,457	0,947	1,471	1,429
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1B6</i>	<i>SmNuc1B8</i>	<i>SmNuc1C2</i>	<i>SmNuc1C3</i>
R_{work}	0,251	0,154	0,269	0,162
R_{free}	0,282	0,186	0,290	0,206
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,008	0,010	0,008	0,008
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,587	1,661	1,557	1,523
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1C4</i>	<i>SmNuc1C5</i>	<i>SmNuc1C6</i>	<i>SmNuc1C7₁</i>
R_{work}	0,325	0,225	0,255	0,257
R_{free}	0,396	0,261	0,272	0,293
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,007	0,008	0,009	0,008
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,530	1,579	1,712	1,563
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1C7₂</i>	<i>SmNuc1C8₁</i>	<i>SmNuc1C8₂</i>	<i>SmNuc1C9</i>
R_{work}	0,244	0,141	0,157	0,346
R_{free}	0,281	0,145	0,169	0,414
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,007	0,013	0,011	0,007
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,497	1,953	1,870	1,552

Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1_{C10₁}</i>	<i>SmNuc1_{C10₂}</i>	<i>SmNuc1_{D6}</i>	<i>SmNuc1_{D10}</i>
R_{work}	0,255	0,282	0,266	0,242
R_{free}	0,287	0,323	0,306	0,287
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,008	0,007	0,008	0,009
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,567	1,508	1,560	1,647
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1_{D12₁}</i>	<i>SmNuc1_{D12₂}</i>	<i>SmNuc1_{E1}</i>	<i>SmNuc1_{E4₁}</i>
R_{work}	0,293	0,250	0,367	0,286
R_{free}	0,334	0,294	0,404	0,316
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,009	0,007	0,007	0,008
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,585	1,493	1,445	1,5006
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1_{E4₂}</i>	<i>SmNuc1_{E8}</i>	<i>SmNuc1_{F1}</i>	<i>SmNuc1_{F2}</i>
R_{work}	0,275	0,441	0,456	0,256
R_{free}	0,305	0,428	0,477	0,277
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,007	0,003	0,008	0,011
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,490	1,178	1,706	1,771
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1_{F3₁}</i>	<i>SmNuc1_{F3₂}</i>	<i>SmNuc1_{F4}</i>	<i>SmNuc1_{F9}</i>
R_{work}	0,363	0,219	0,349	0,194
R_{free}	0,367	0,261	0,386	0,246
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,012	0,006	0,008	0,007
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,723	1,357	1,644	1,369
Název měřeného krystalu	<i>SmNuc1_{F10}</i>	<i>SmNuc1_{G8}</i>	<i>SmNuc1_{G11}</i>	<i>SmNuc1_{H1}</i>
R_{work}	0,301	0,408	0,178	0,220
R_{free}	0,344	0,446	0,206	0,268
$R.m.s.d$ vazeb [Å]	0,007	0,006	0,011	0,007
$R.m.s.d$ úhlů [°]	1,427	1,415	1,759	1,445