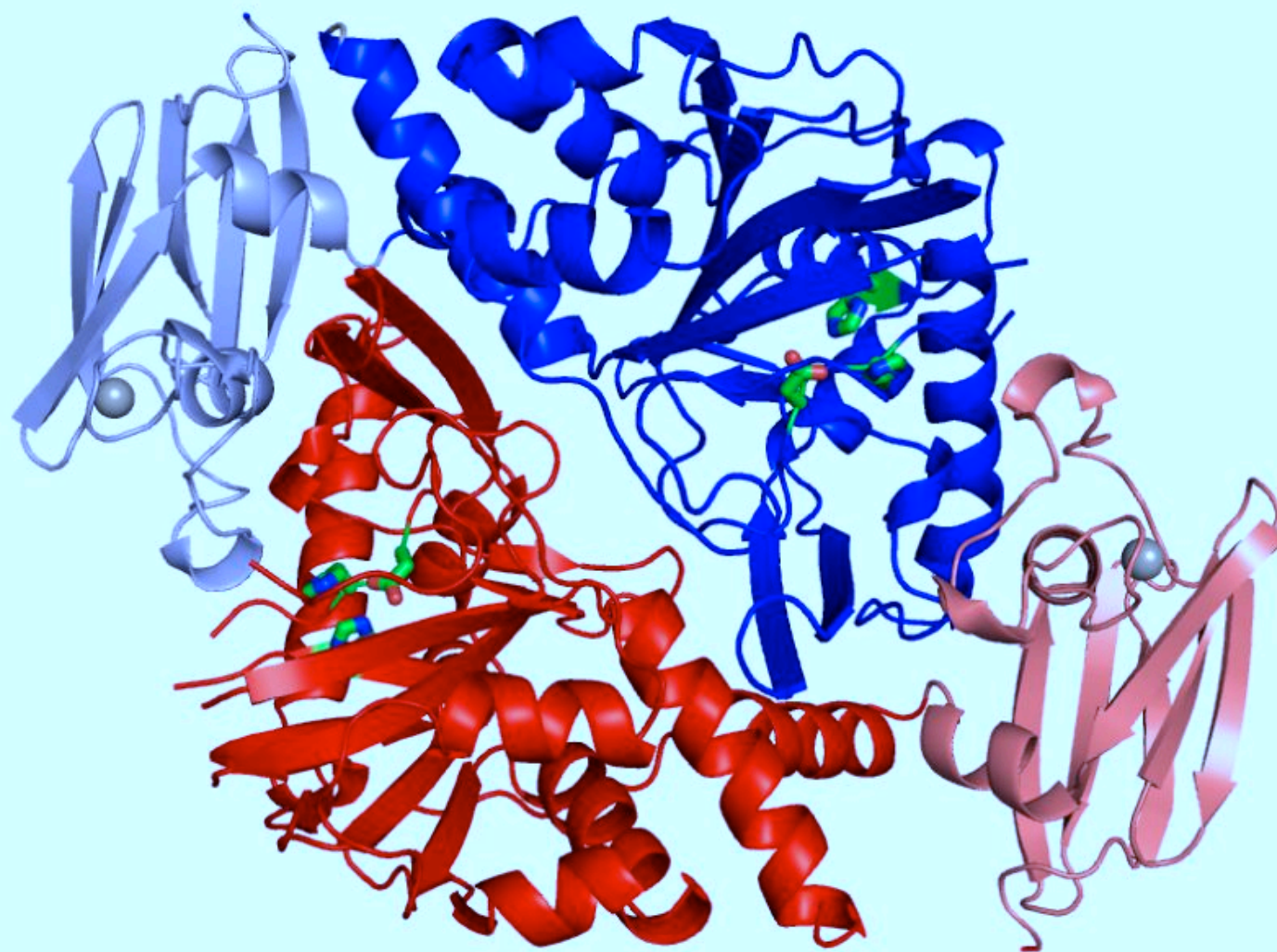
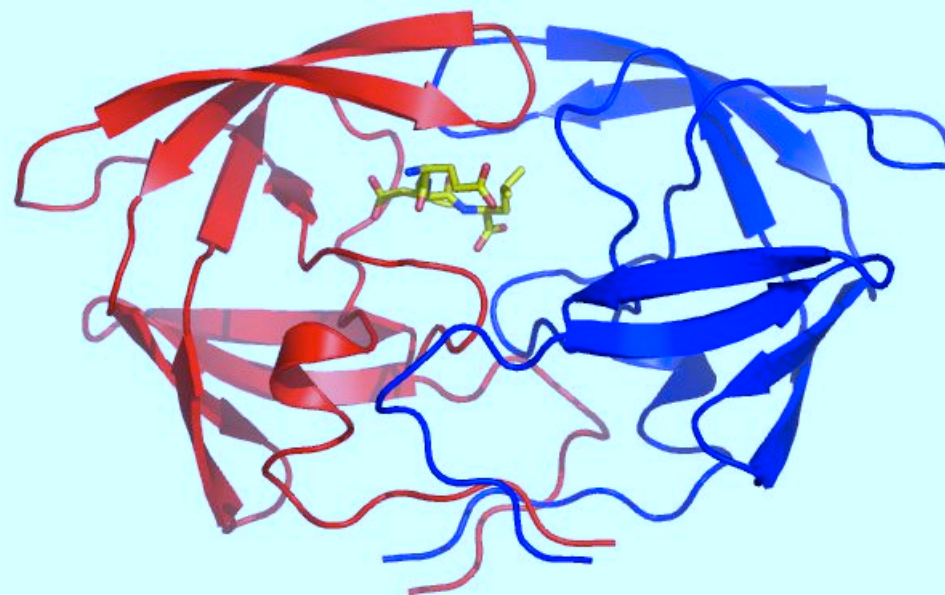


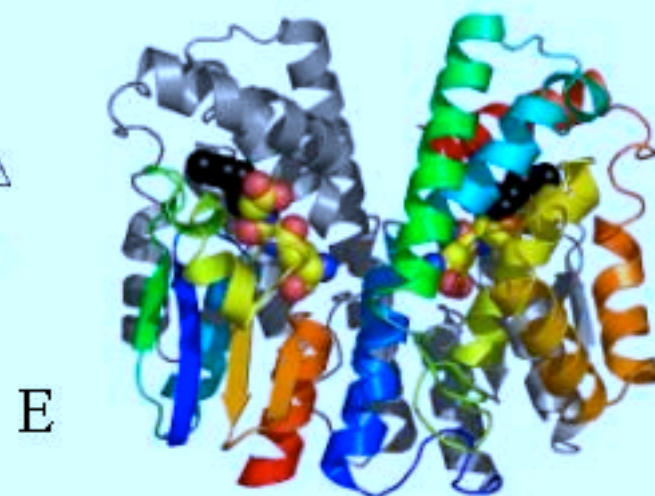
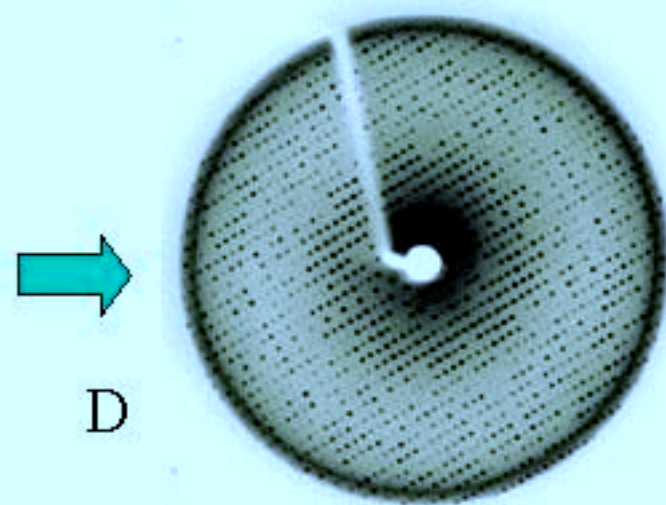
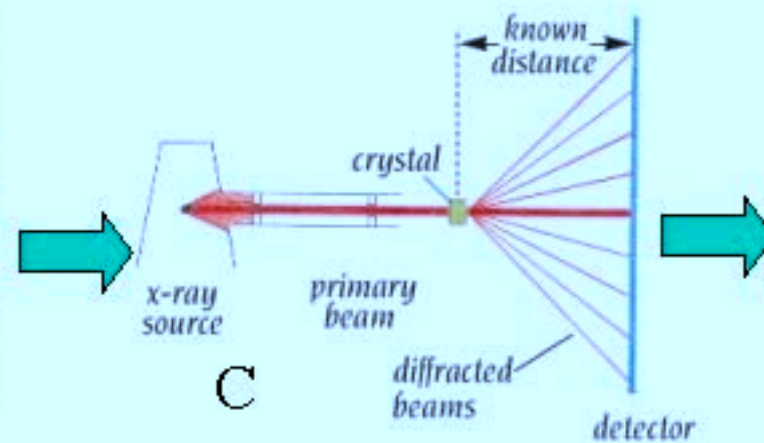
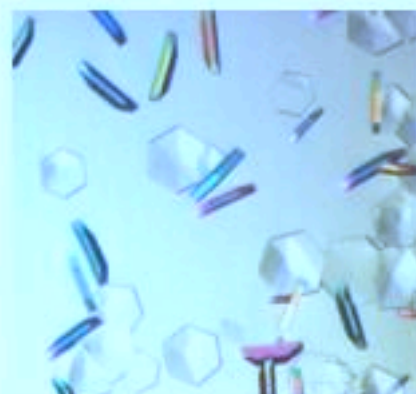
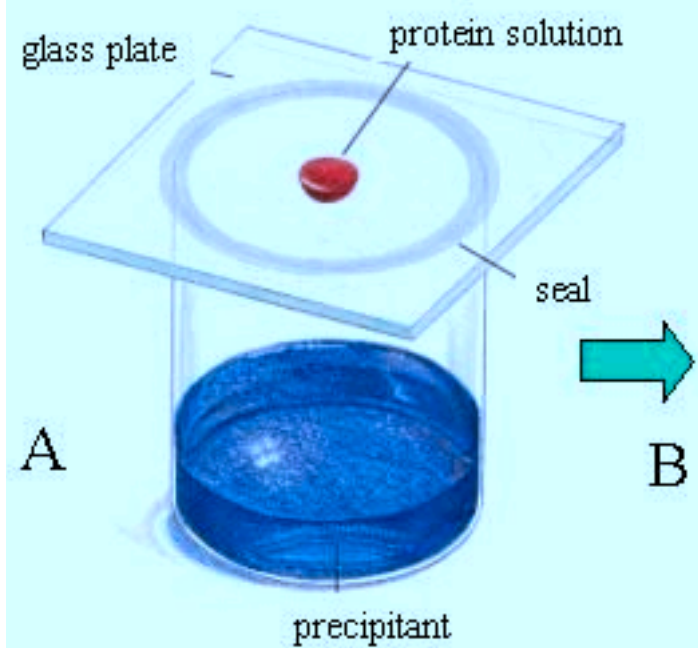
Gamma butirobetaīna hidroksilāzes struktūra



Kāpēc nepieciešams noteikt proteīnu struktūras?

- Vizuāls attēls – kā proteīns izskatās
- Priekšstats par to, kā proteīns veic savas funkcijas
- Iespēja proteīnu racionāli pārveidot
- Iespēja racionāli dizainēt ligandus (piem. zāles)

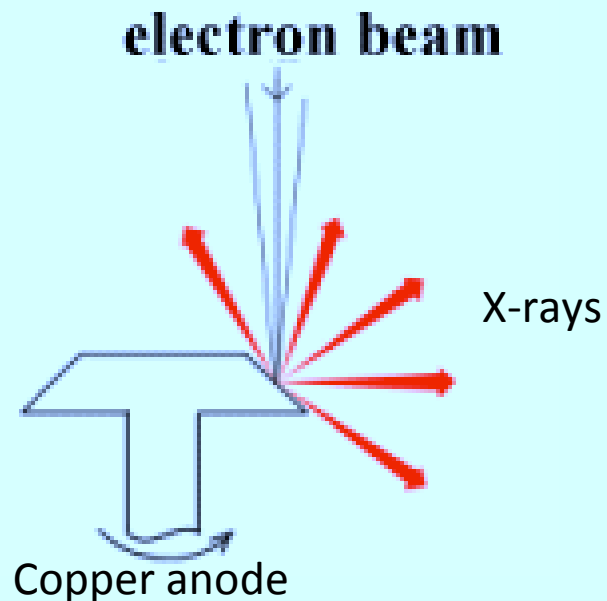




Rentgenstaru iegūšana

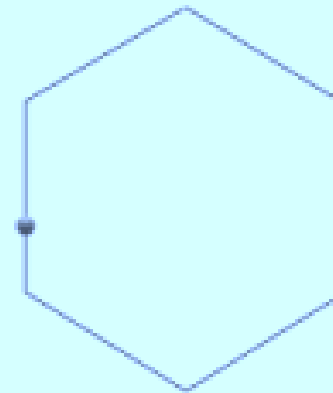
Rentgenstaru lampa

Elektronu kūlis no katoda
atsitas pret metāla
(parasti Cu) anodu un
producē rentgenstarus



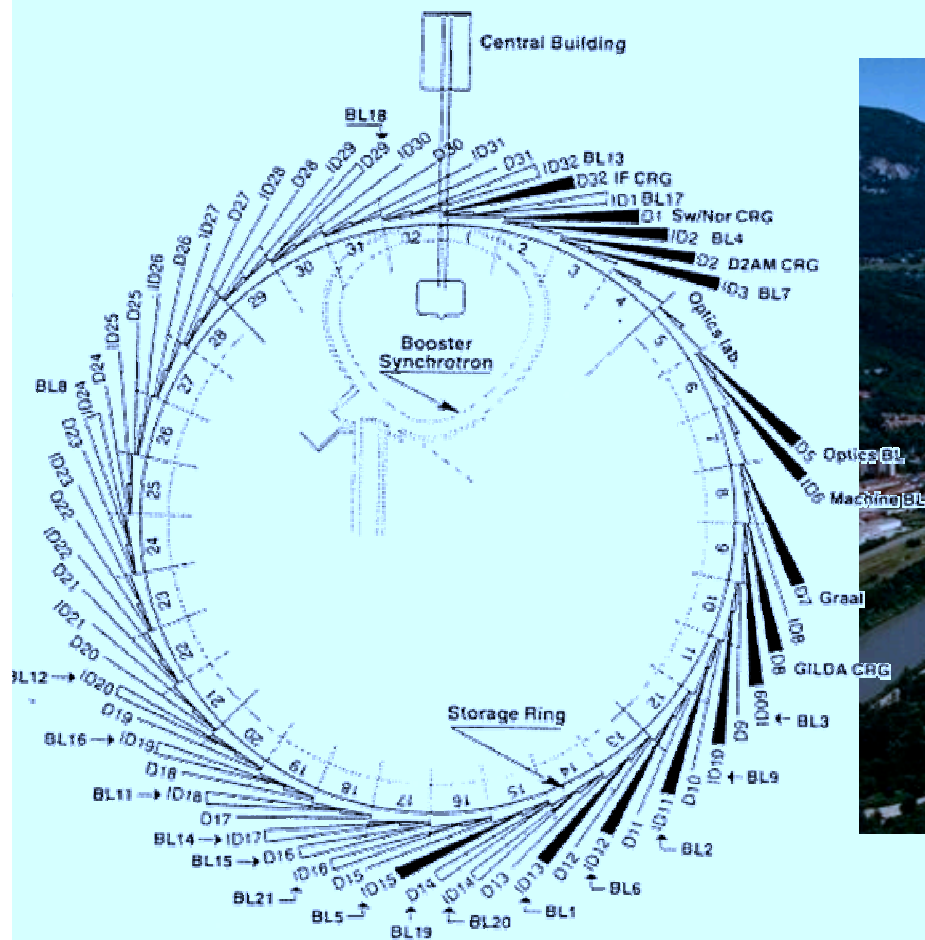
Daļiņu paātrinātājs

Lielā ātrumā mainot
kustības virzienu,
elementārdaļiņas
(elektroni vai pozitroni)
emitē rentgenstarus



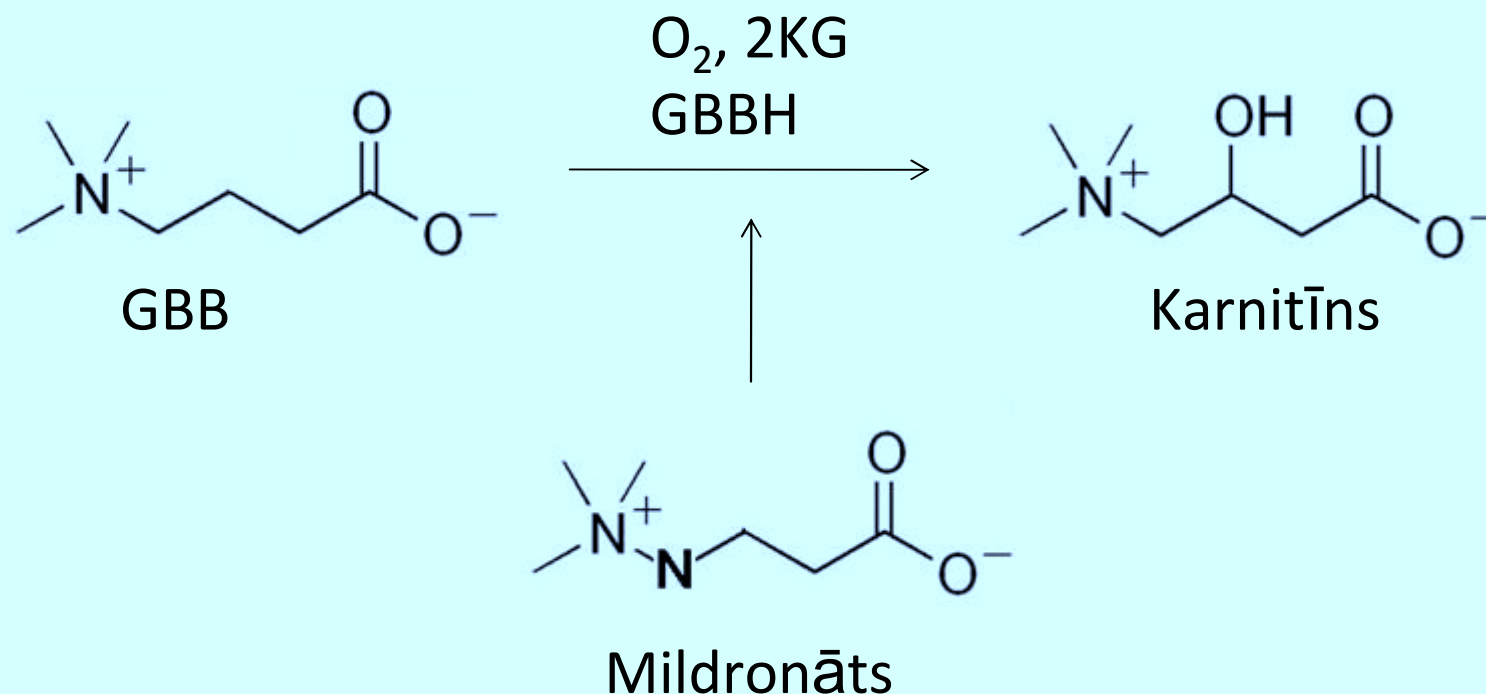
ESRF sinhrotrons Grenoblē, Francijā

- Visspēcīgākais rentgenstaru avots Eiropā
- Akadēmiskiem pētījumiem bezmaksas



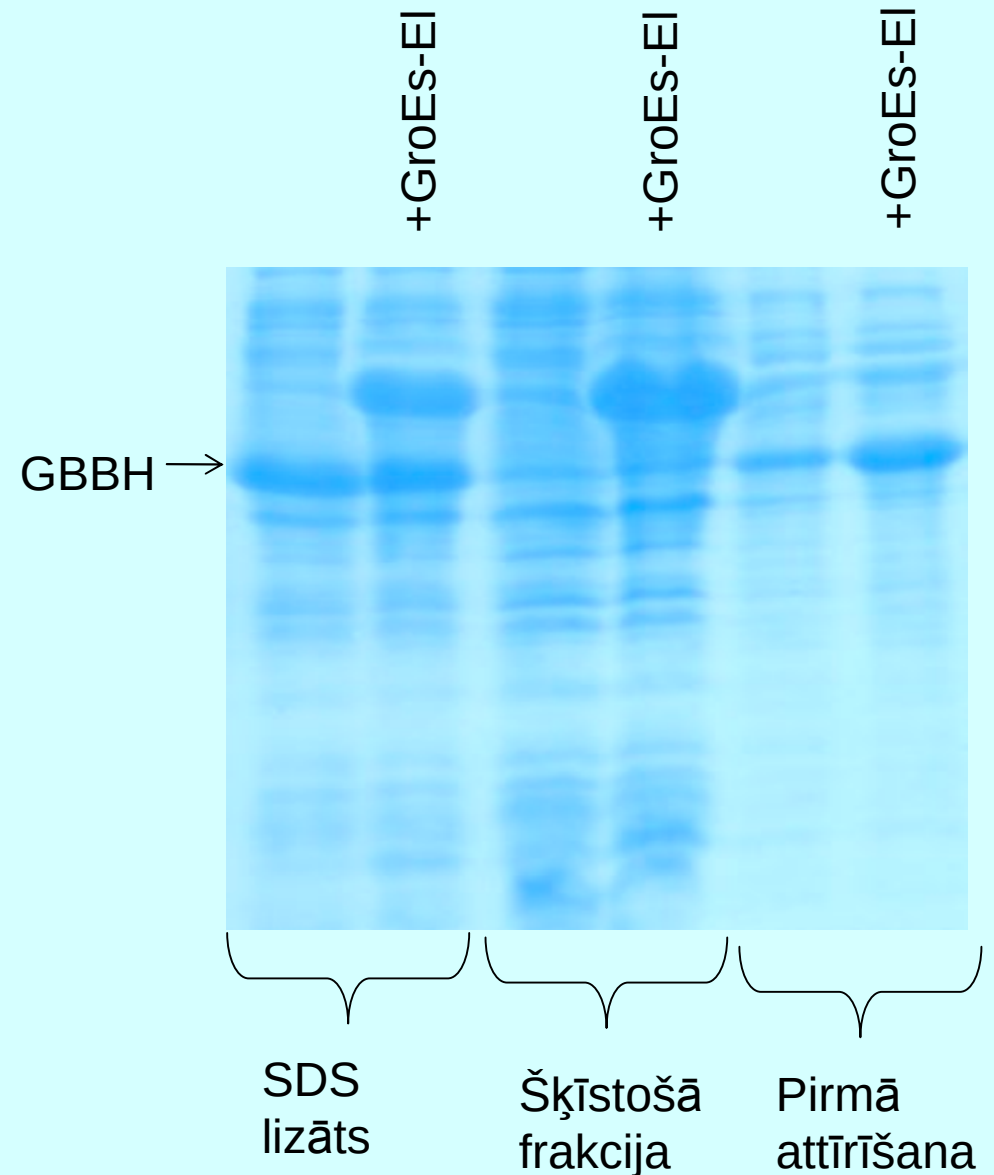
GBBH- gamma butirobetaīna hidroksilāze

- GBBH pieder pie 2KG atkarīgajām oksigenāzēm
- Katalizē karnitīna biosintēzi no GBB
- Reakciju inhibē mildronāts



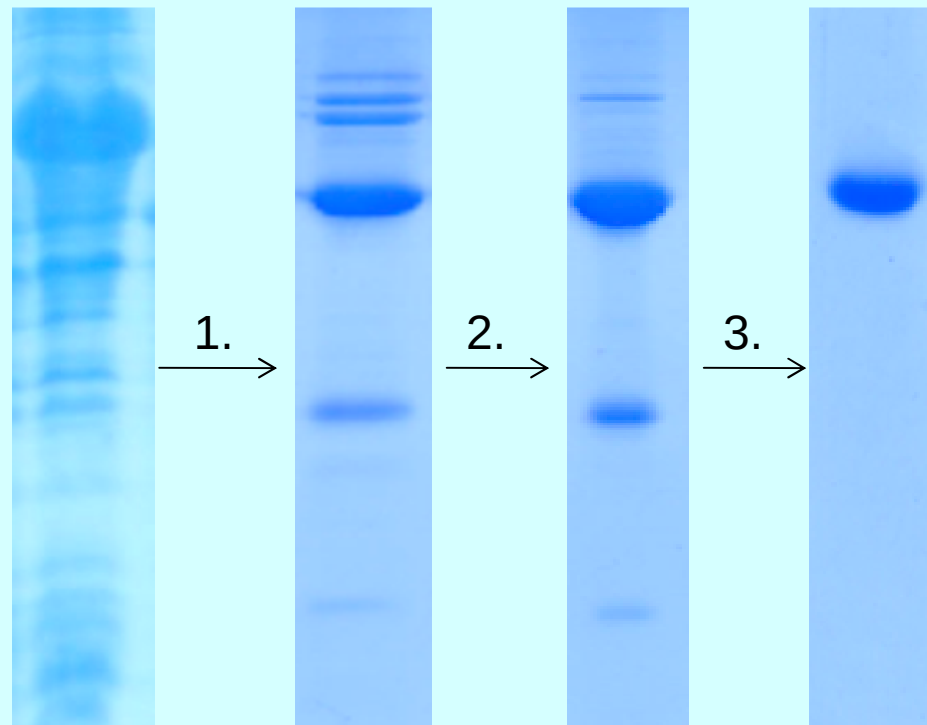
GBBH producēšana

- Gēns no komerciāli pieejamas cDNA plasmīdas ieklonēts pET *E.coli* ekspresijas vektorā
- >95% producētā proteīna nešķīstošajā frakcijā
- Ko-ekspresējot ar GroEs-EI šaperonīniem, izdevās uzlabot proteīna šķīdību



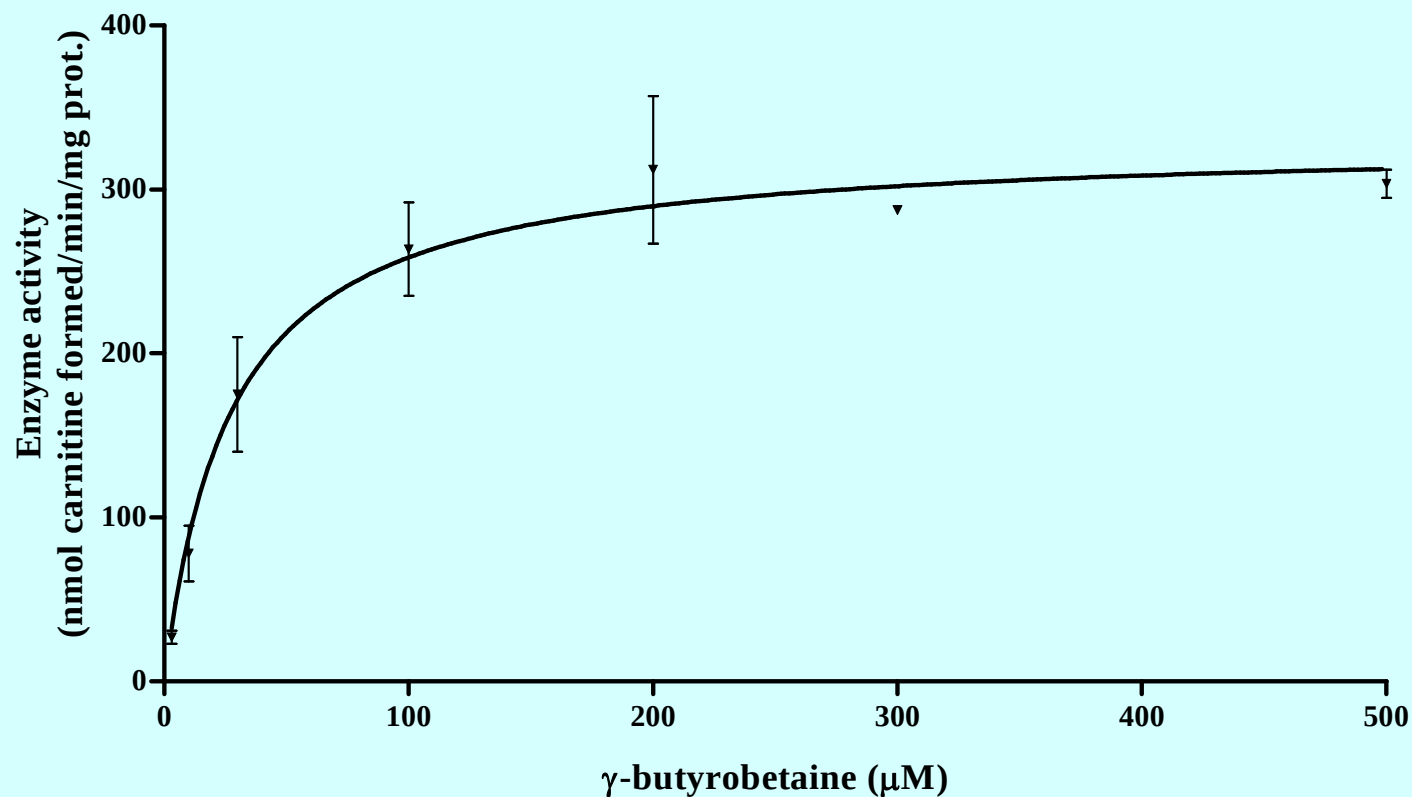
GBBH attīrīšana

- 1. Izmantojot introducēto 6xHis sekvenci ar metālhromatogrāfijas palīdzību (ar Ni-Nta sefarozi)
- 2. Ar gēlfiltrāciju uz Superdex200 koloonas
- 3. Ar jonapmaiņu uz MonoQ kolonnas



GBBH aktivitātes pārbaude

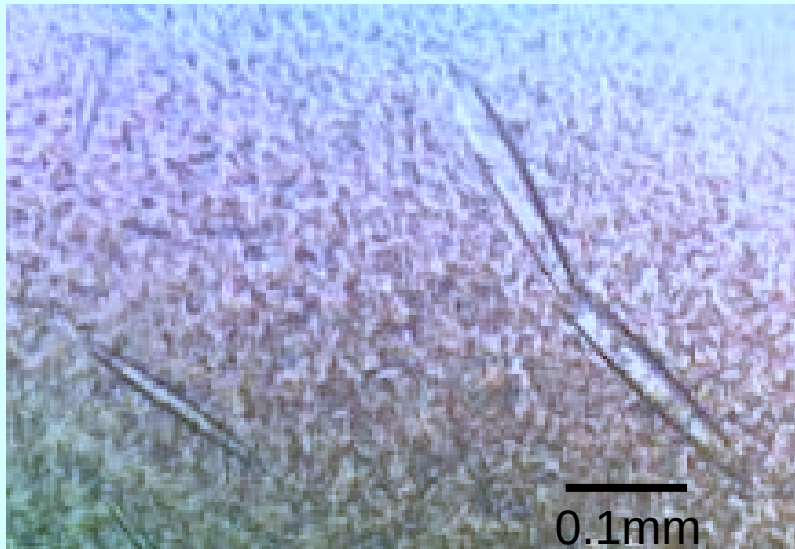
- Tika noteikta GBBH spēja producēt karnitīnu no gamma-butirobetāina



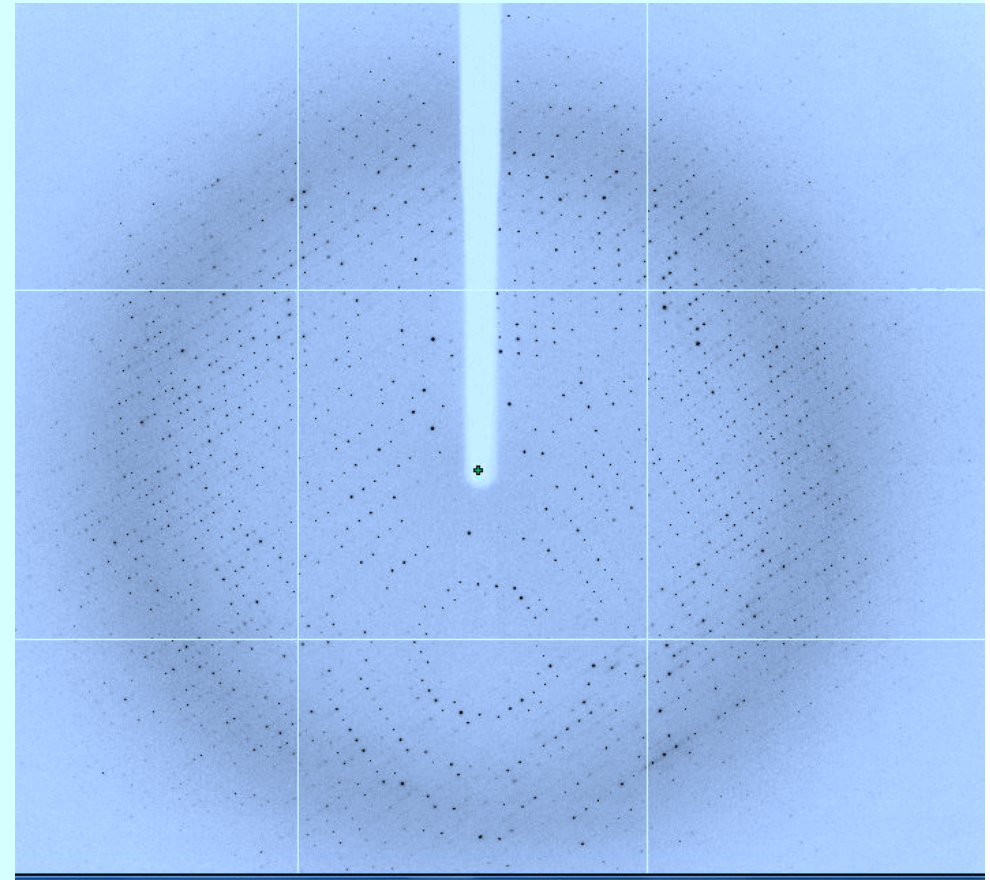
Producētās GBBH salīdzinājums ar literatūras datiem

- Enzīms ir nedaudz aktīvāks, salīdzinot ar publicētajiem cilvēku un žurku enzīmu datiem

BBH kristāli



1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
100 mM NaAc pH 4.5

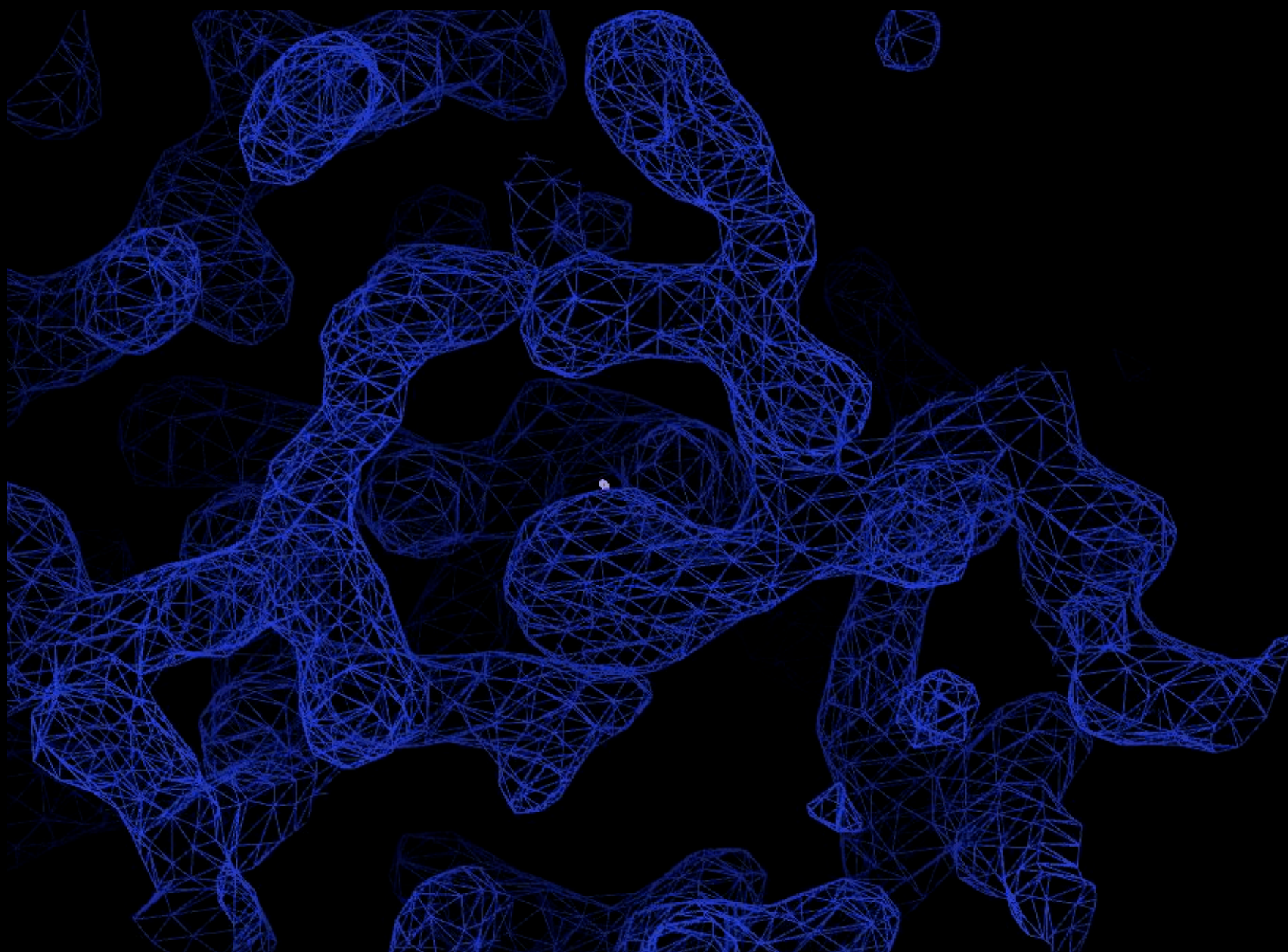


BBH kristāla difrakcija, 2.0Å izšķirtspēja

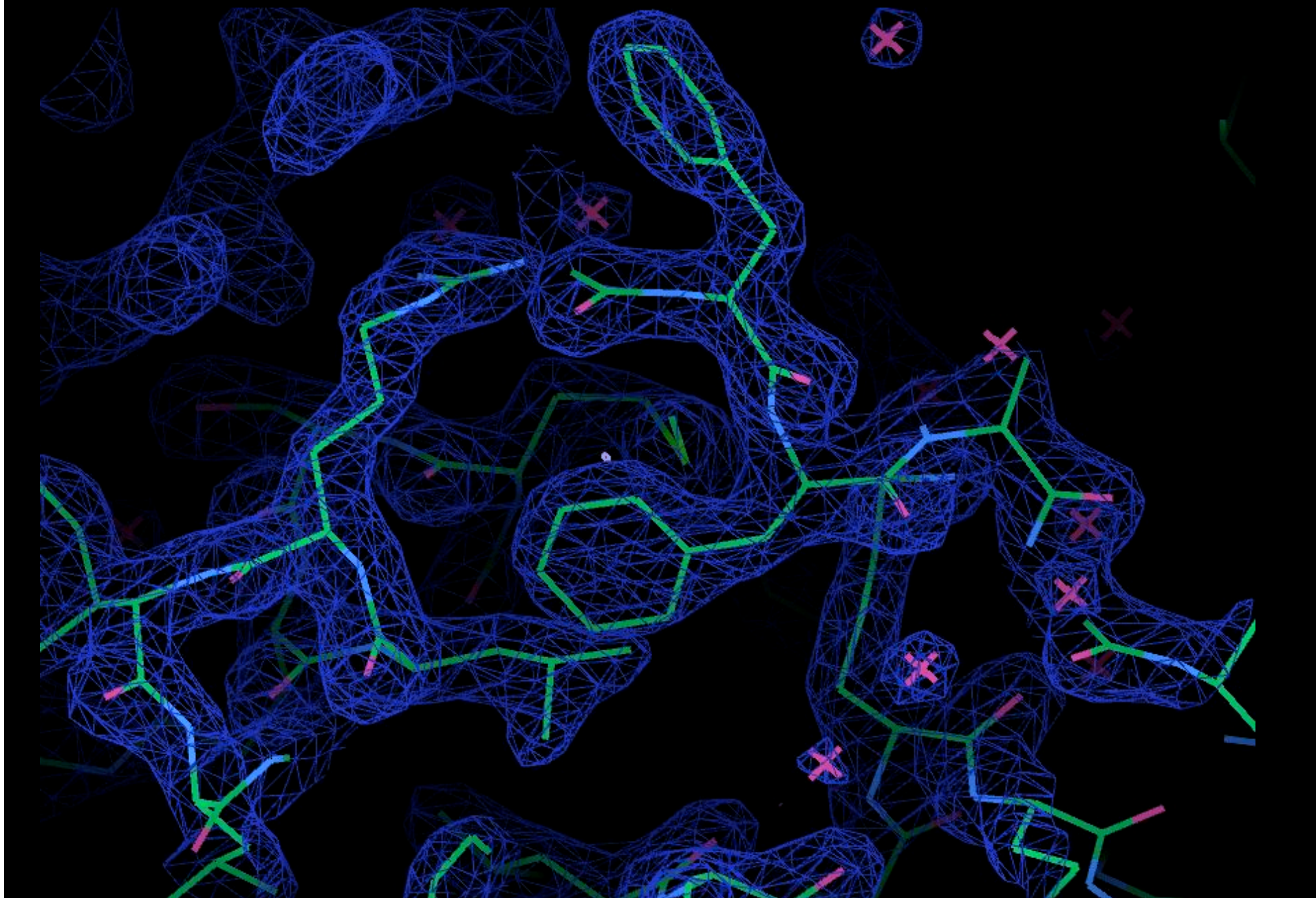
Struktūras aprēķins

- PDB datu bankā uz doto brīdi nebija nevienas pietiekoši līdzīgas struktūras
- Struktūras aprēķinam nepietiek tikai ar natīvajiem kristāliem
- Tika uzproducēts un sakristalizēts GBBH ar selenometionīnu
- Struktūra tika aprēķināta ar anomālās dispersijas metodi

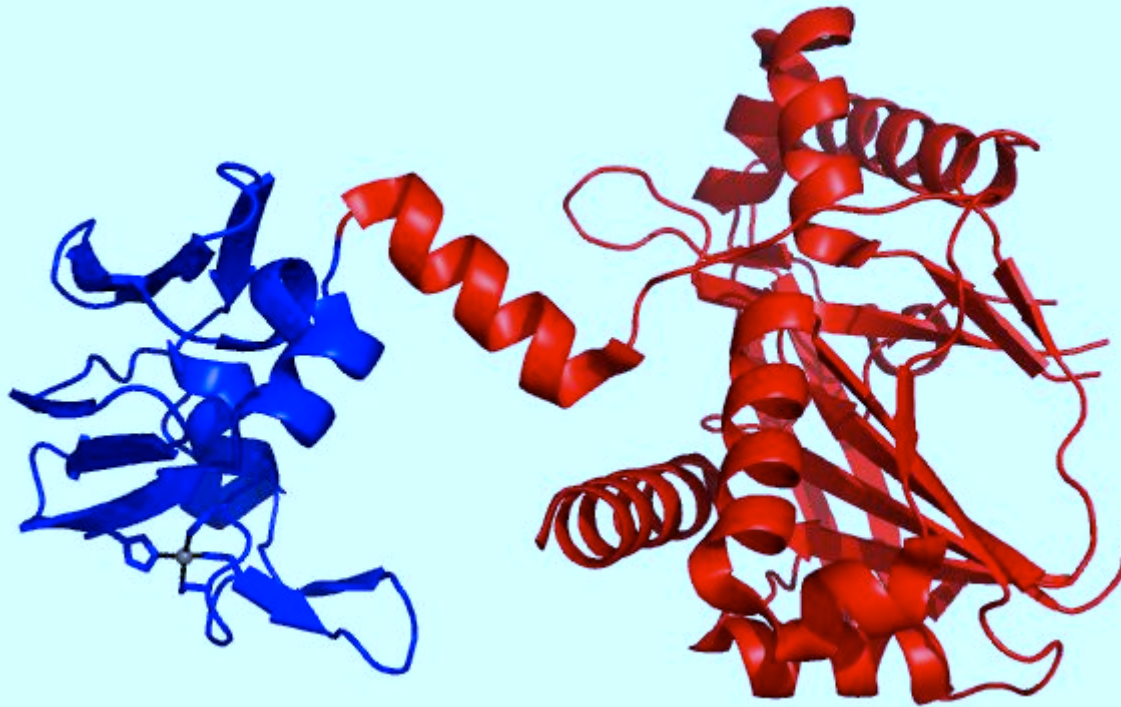
Elektronu blīvuma karte



Elektronu blīvuma karte

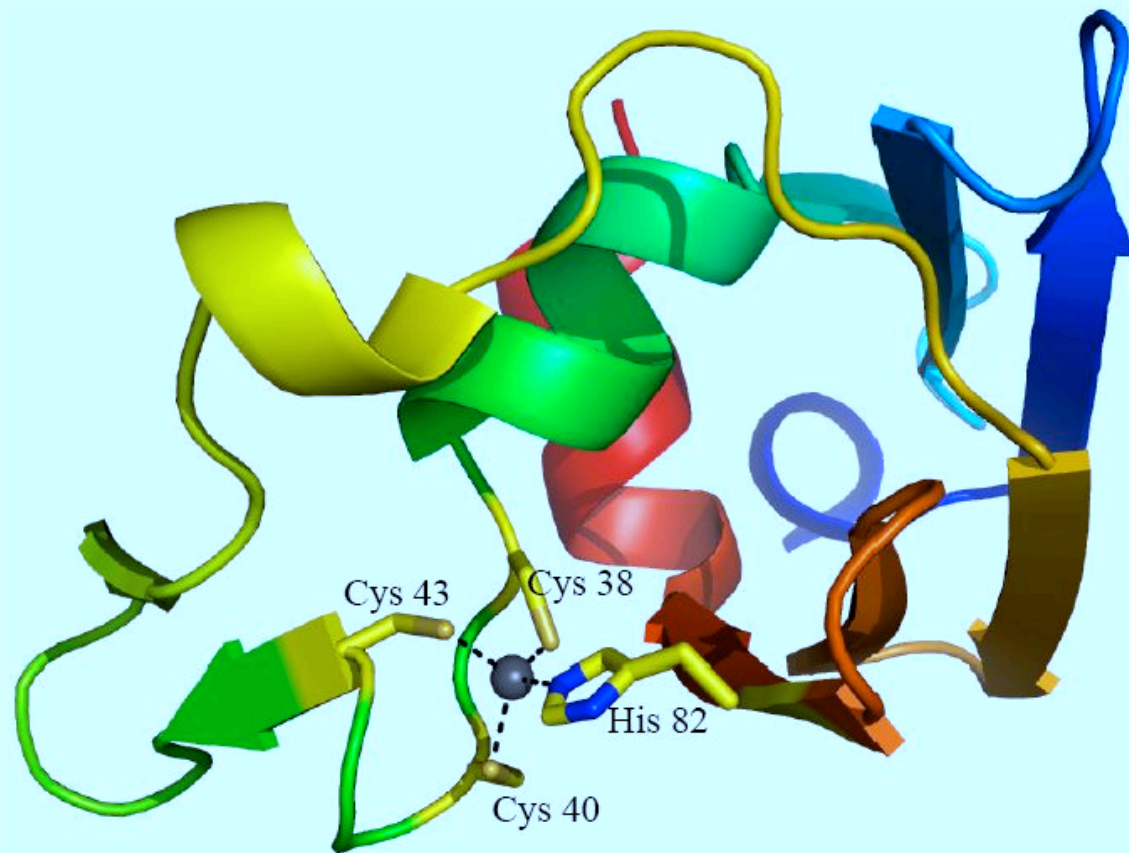


GBBH struktūra



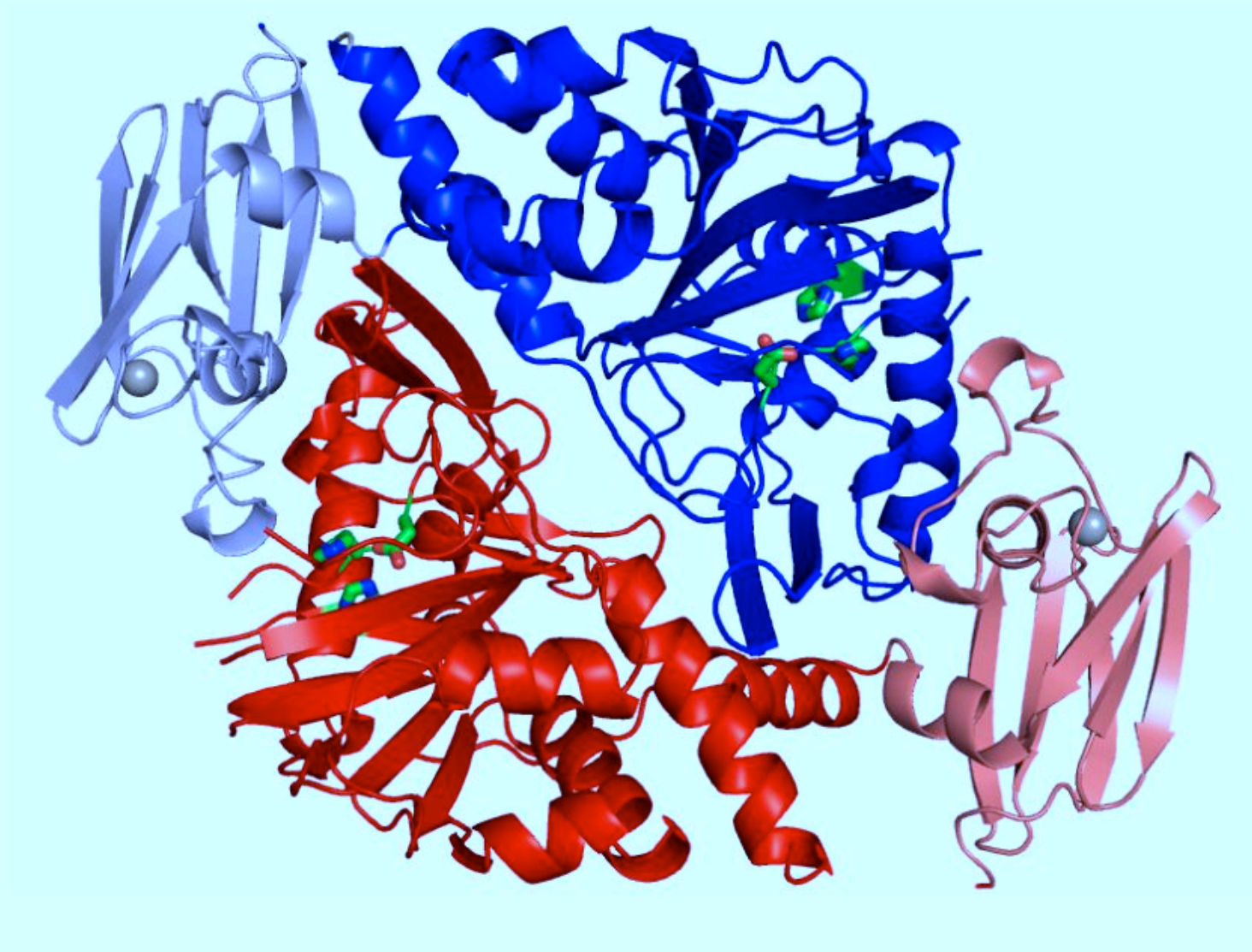
- 2 domēni – katalītiskais un N-terminālais

N-terminālā domēna struktūra

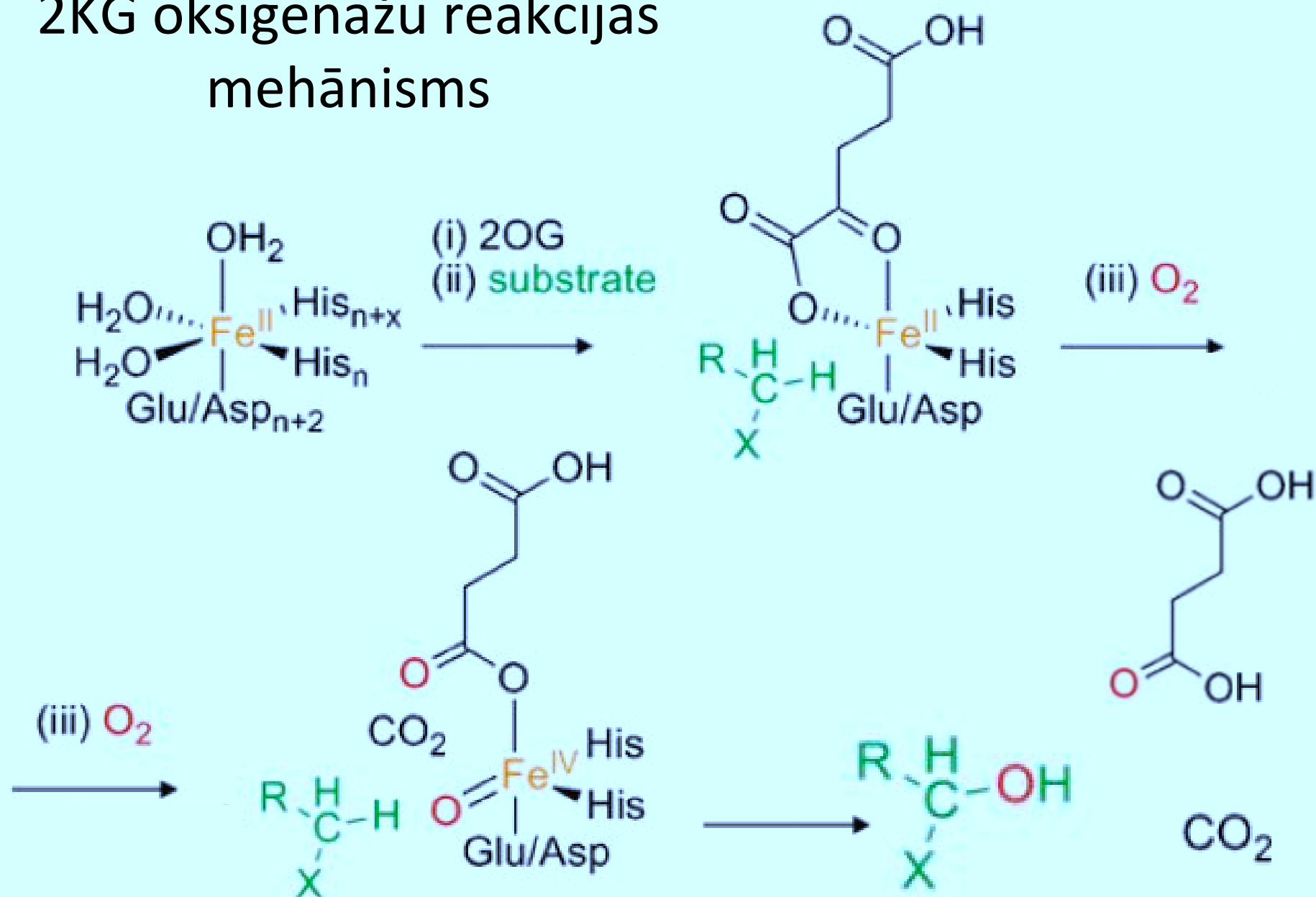


- Domēns satur cinka koordinācijas saitu
- Domēna funkcija nezināma, iespējams vajadzīgs dimerizācijai

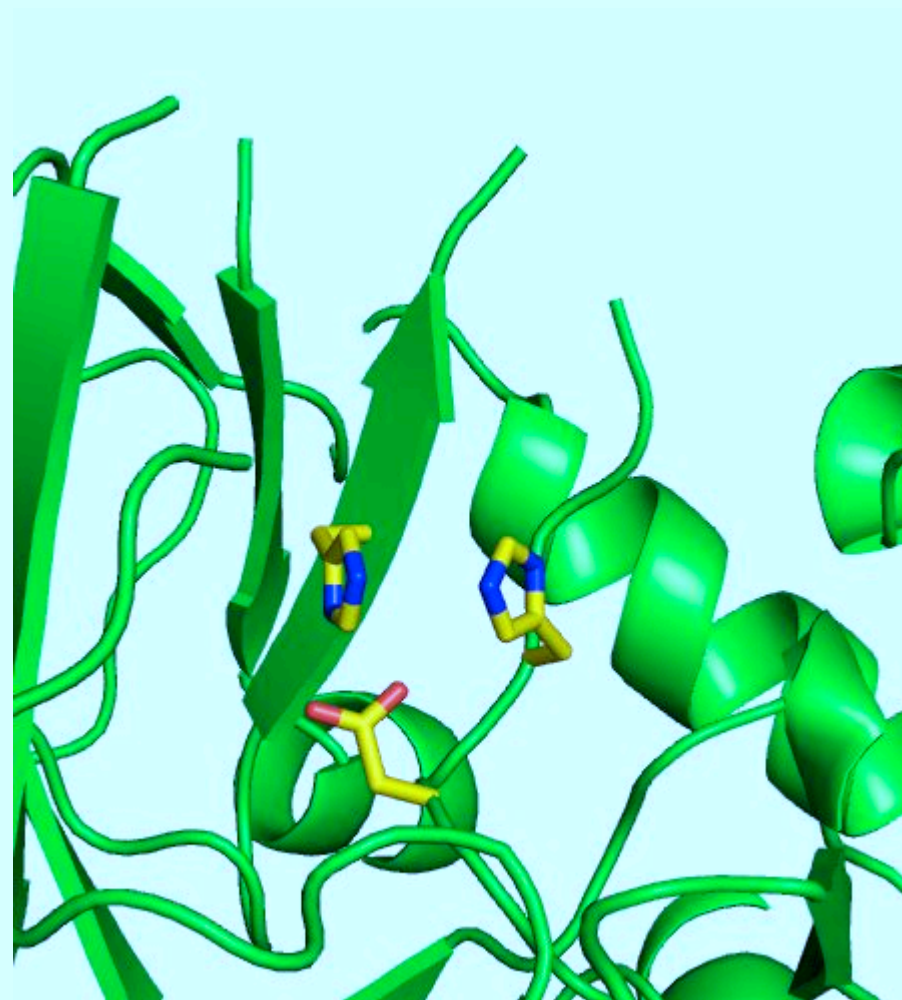
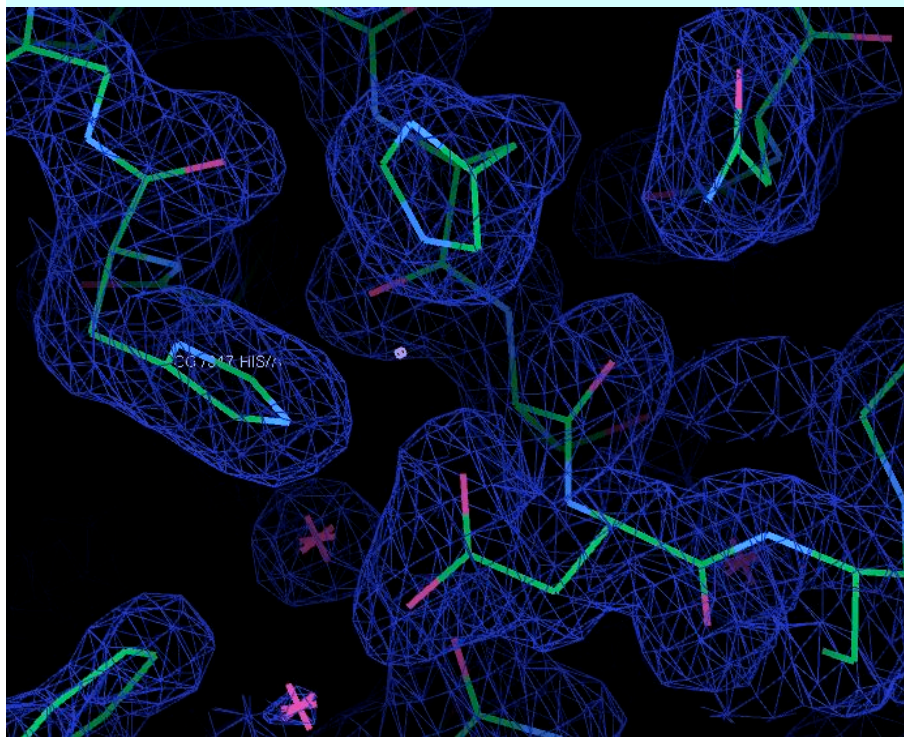
GBBH dimērs

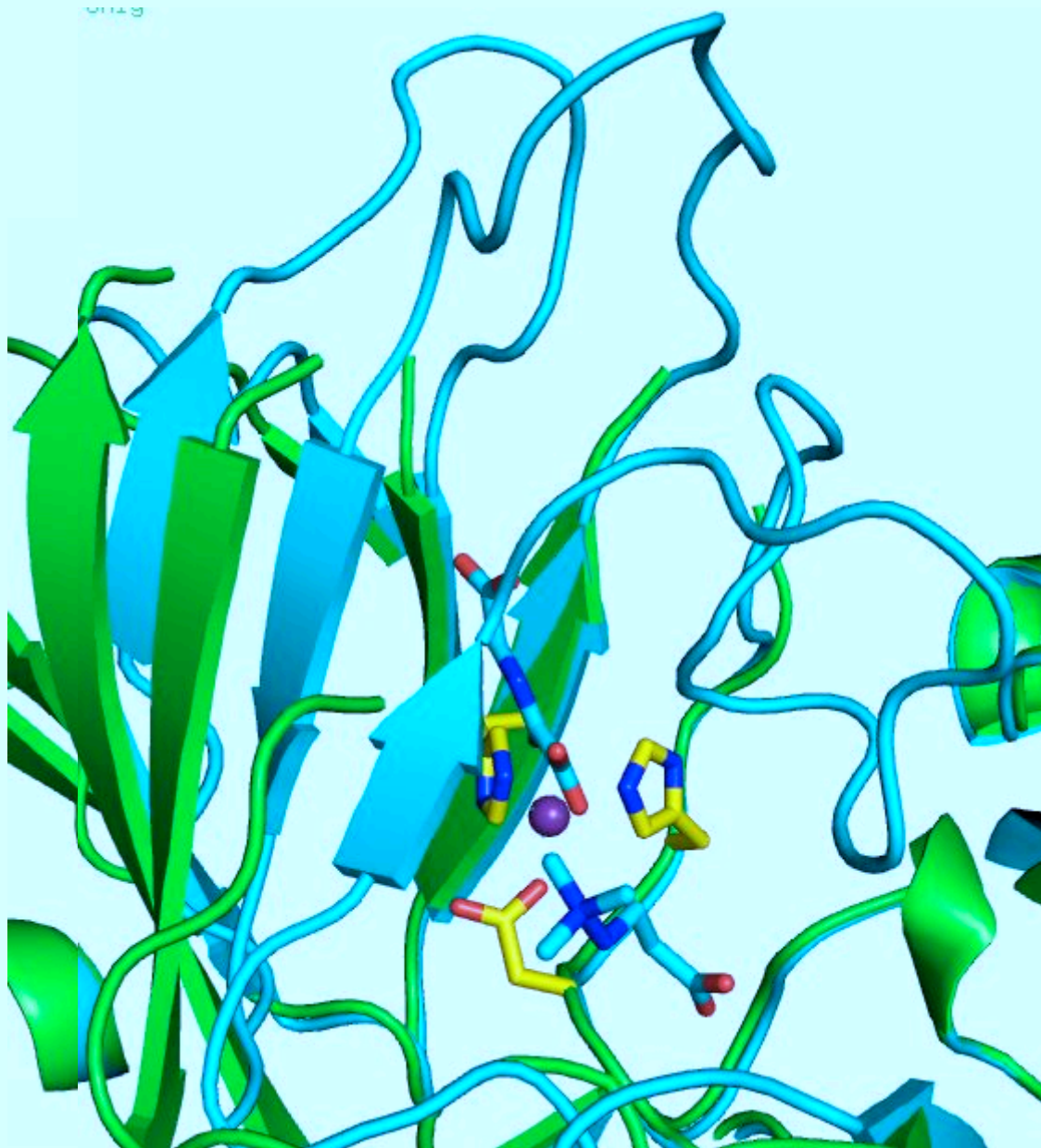


2KG oksigenāžu reakcijas mehānisms



GBBH aktīvais saits





Konkurenti
no
Oksfordas!

Ātrā publikācija...



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase

Kaspars Tars^{a,*}, Janis Rumnieks^a, Andris Zeltins^a, Andris Kazaks^a, Svetlana Kotelovica^a,
Ainars Leonciks^a, Jelena Sharipo^a, Arturs Viksna^b, Janis Kuka^c, Edgars Liepinsh^c, Maija Dambrova^c

^aBiomedical Research and Study Centre, Ratsupites 1, LV1067, Riga, Latvia

^bFaculty of Chemistry, University of Latvia, Kr. Valdemara 48, LV1013, Riga, Latvia

^cLatvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV1006, Riga, Latvia

Secinājumi no GBBH struktūrām

- 1. GBBH satur N-terminālu domēnu ar pagaidām nezināmu funkciju
- 2. GBBH aktīvais saits pirms substrāta piesaistīšanās ir atvērts
- 3. Pēc substrātu piesaistīšanās aktīvais saits ir gandrīz pilnībā noslēgts
- 4. Jaunu inhibitoru modelēšana ir apgrūtināta aktīvā saita fleksibilitātes dēļ
- 5. Viens no risinājumiem – noteikt GBBH struktūru kopā ar dažādiem inhibitoriem

Nākotnes plāni

- Iegūt GBBH struktūras kompleksā ar OSI sintezētajiem inhibitoriem
- Uzsākt citu farmakoloģiski nozīmīgu proteīnu izpēti