

# UPORABA SINHROTRONSKE SVETLOBE PRI ŠTUDIJU STRUKTURE PROTEINOV

Saša Jenko, Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana

## Synchrotron Radiation in Macromolecular Crystallography

### ABSTRACT

Synchrotron radiation has become a major structural research tool across the world in numerous scientific areas. It is a critical component for many of these developments, and it is essential for high-throughput crystallography. The source characteristics of modern synchrotrons are ideally matched to a number of difficult problems in macromolecular crystallography. Recent studies on viruses, membrane proteins and ribosomes give clear examples of the power of modern macromolecular crystallography using synchrotron radiation. The detailed structural information obtained enables the relationships between structure and function to be addressed with confidence.

### POVZETEK

Sinhrotronsko sevanje se zadnjih dvajset let uporablja za raziskave v številnih tehniških in naravoslovnih vedah, kot so fizika, kemija, fizikalna metalurgija, biokemija, farmacija, medicina in druge. Sinhrotronsko sevanje je postalo eno izmed glavnih orodij v biokemiji za strukturne študije proteinov; je nujno potrebno za razvoj »high-throughput« kristalografije, ki bo omogočila avtomatizirano reševanje novih struktur množice proteinov, ki so rezultat hitrega razvoja področja genomike (določevanja zaporedja genov dednega zapisa) in proteomike (določevanja struktur proteinov, ki jih ti geni zapisujejo). Poleg tega moderni sinhrotroni omogočajo reševanje težjih problemov v makromolekulski kristalografiji, kot so strukture virusov, membranskih proteinov idr. Podatki, pridobljeni z uporabo sinhrotronskega sevanja, omogočajo natančnejšo določitev strukture proteinov in s tem posredno njihove funkcije.

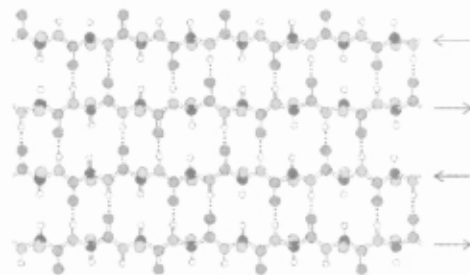
## 1 Proteini

Proteini so kompleksne makromolekule, ki igrajo pomembno vlogo v vseh bioloških procesih: kot encimi sodelujejo pri katalizi kemijskih reakcij v bioloških sistemih, prenašajo manjše molekule in ione, utrjujejo strukturo celice, sodelujejo pri imunskem odgovoru organizma, pri prenašanju živčnih impulzov ter kontrolirajo izražanje genske informacije, ki je nujna za rast in diferenciacijo celic. Sestavljeni so iz 20 različnih aminokislin, med seboj povezanih s peptidnimi vezmi /1/. Aminokislina se lahko na različne načine povezujejo v polipeptidne verige in s tem omogočijo izredno raznolikost strukture in funkcije proteinov (primer: bak-

terija E. coli vsebuje več kot 1000 različnih proteinov, ki skrbijo za normalni potek življenjskih funkcij organizma).

Strukturo proteina delimo na: primarno, sekundarno, terciarno in kvartarno. Najenostavnejša je primarna struktura, ki nam pove, kakšno je zaporedje aminokislinskih v polipeptidni verigi proteina.

S sekundarno strukturo (npr: vijačnica  $\alpha$ , nagubana struktura  $\beta$ ) opišemo ponavljajoče se strukturne elemente v proteinu in se nanaša na prostorsko orientacijo aminokislinskih, ki so si blizu skupaj glede na aminokislinsko zaporedje.



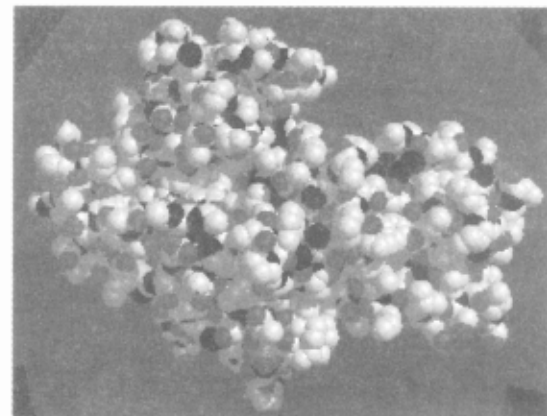
Slika 2: Sekundarna struktura proteina: vijačnica  $\alpha$  in nagubana struktura  $\beta$

```

5      10      15      20      25      30
1  A A S X D X S L V E V H X X V F I V F P X I L Q A V V S I A
31 T T R X D D X D S A A A S I P M V P G W V L K Q V X G S Q A
61 G S F L A I V M G G G D L E V I L I X L A G Y Q E S S I X A
91 S R S L A A S M X T T A I P S D L W G N X A X S N A A F S S
121 X E P S S X A G S V P L G F T F X E A G A K E X V I K G Q I
151 T X O A X A F S L A X L X K L I S A M X N A X F P A G D X X
181 X X V A D I X D S H G I L X X V N Y T D A X I K M G I I F G
211 S G V N A A Y W C D S T X I A D A A D A G X X G G A G X M X
241 V C C X Q D S F R K A F P S L P Q I X Y X X T L N X X S P X
271 A X K T F E K N S X A K N X G Q S L R D V L M X Y K X X G Q
301 X H X X X A X D F X A A N V E N S S Y P A K I Q K L P H P D
331 L R X X X D L F X G D Q G I A X K T X M K X V V R R X L F L
361 I A A Y A P R L V V C X I X A I C Q K K G Y S S G H I A A X
391 G S X R D Y S G F S X N S A T X N X N I Y G W P Q S A X X S
421 K P I X I T P A I D G E G A A X X V I X S I A S S Q X X X A
451 X X S A X X A

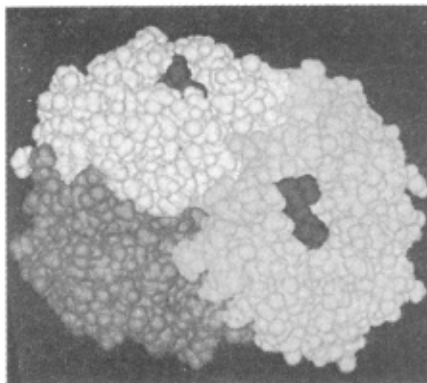
```

Slika 1: Primarna struktura encima heksokinaze



Slika 3: Terciarna struktura encima heksokinaze

Terciarna struktura je tridimezionalna struktura polipeptidne verige. Kvar tar no strukturo pa imajo le proteini, ki so sestavljeni iz več polipeptidnih verig, opisuje pa prostorsko orientacijo in organizacijo vseh polipeptidnih verig /2/.



Slika 4: Kvar tar na struktura hemoglobina

## 2 Določanje strukture proteinov

Lastnosti proteina in njegova fiziološka vloga v celici so odvisne od njegove tridimenzionalne strukture. To strukturo proteinov lahko določamo na več načinov: z NMR (jedrsko magnetno resonanco), z elektronsko mikroskopijo ter z difrakcijo rentgenskih žarkov ali nevtronov na kristalih. Prva tridimenzionalna struktura biološke makromolekule je bila DNA-vijačnica, določena z difrakcijo rentgenskih žarkov leta 1953, za katero sta leta 1962 Watson in Crick prejela Nobelovo nagrado. Prva tridimenzionalna struktura proteina, ki je prav tako prinesla Nobelovo nagrado, je bila struktura miooglobina, ki sta jo določila Perutz in Kendrew leta 1962.

Z metodo difrakcije rentgenske svetlobe na proteinskem kristalu lahko določimo položaje vseh atomov v molekuli in s tem strukturo molekule, saj je valovna dolžina vpadne rentgenske svetlobe približno enaka dolžini kovalentnih vezi v molekuli (0,15 nm).

Pri rentgenski difrakciji analiziramo uklonske kote rentgenske svetlobe na monokristalu. (Monokristal je periodično urejena tridimenzionalna struktura molekul, med seboj povezanih z nekovalentnimi interakcijami.) Kristal vpne mo na goniometriško glavo med vir rentgenske svetlobe in detektor. Vpadna svetloba se na navideznih ravninah kristala uklanja, in to tem močnejše, čim gostejše so ravnine zasedene z atomi. Uklonjeno svetlobo, ki jo zazna detektorski sistem, nato računalniško obdelamo.

Določanje strukture proteina z metodo rentgenske difrakcije poteka v več stopnjah:

1. priprava čistega proteina
2. kristalizacija proteina ter rast visokokvalitetnih monokristalov
3. merjenje difrakcijskega vzorca proteina
4. določitev prostorske grupe kristala in vrednotenje merjenih podatkov
5. usklajevanje modela z merjenimi rezultati

## 2.1 Kristalizacija

Določanje tridimenzionalne strukture proteinov z metodo rentgenske difrakcije se začne s pripravo monokristalov. Glavne razlike med anorganskimi kristali in kristali proteinov so, da slednji vsebujejo velik delež vode (20-80%, podobno kot živa celica) ter da so molekule med seboj povezane s šibkimi nespecifičnimi vezmi: (van der Waalove sile, elektrostatske interakcije, vodikove vezi). Proteinske molekule se lahko posledično urejajo na več različnih načinov v kristalno strukturo, zato lahko en protein kristalizira v več različnih prostorskih grupah.

Proteinski kristali so optično aktivne molekule, sestavljene iz L-optičnih enantiomerov aminokislin, zato ne morejo vsebovati simetrijskih operacij, ki jih opazimo pri anorganskih kristalih in ki zahtevajo enako število D- in L-enantiomerov, kot so: zrcalna ravnina, drsna zrcalna ravnina ali center inverzije. Zaradi teh omejitev proteini kristalizirajo le v 65 prostorskih grupah od skupno 230 /3/.

Proteini kristalizirajo iz prenasičenih raztopin proteinov, v katerih se v določenem trenutku začnejo tvoriti stabilna kristalizacijska jedra, ki rastejo, dokler sistem ne pride v stanje nasičene raztopine, kjer vlada ravnotežje med trdno fazo in molekulami v raztopini /4/.



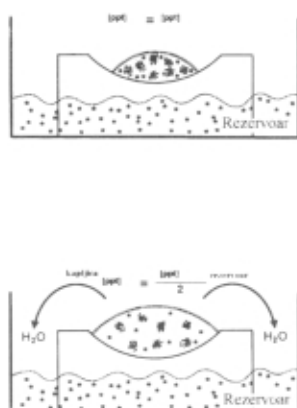
Slika 5: Energijski diagram poteka kristalizacije proteinov /4/

Kristalizacijske pogoje določimo s »screeni«. To je določeno število raztopin z različnimi pH in različnimi koncentracijami aditivov: obarjalnega reagenta in drugih anorganskih in organskih komponent. Raztopinam, v katerih rastejo kristali, še dodatno spreminjamo sestavo, da dobimo monokristal, primeren za strukturno analizo. Pri tem ne smemo pozabiti, da so proteini, ki jih kristaliziramo, vajeni fizioloških pogojev, ki jih imajo v celici /5/.

Za kristalizacijo makromolekul obstaja več metod: dializa, difuzija topila preko plinske faze (angleško: vapour diffusion), difuzija topila med dvema raztopinama (angleško: crystallization by the interface diffusion), metoda vsadka (angleško: batch method).

Najbolj razširjena je metoda izhlapevanja topila z difuzijo preko plinske faze, kjer se stanju prenasičenosti približamo z difuzijo hlapnih molekul topila. Poznamo dve tehniki: z visečo kapljico ter s sedečo kapljico. Kapljica, ki jo sestavljajo protein, pufer in obarjalni reagent, se nahaja v posodici z rezervoarjem, ki vse-

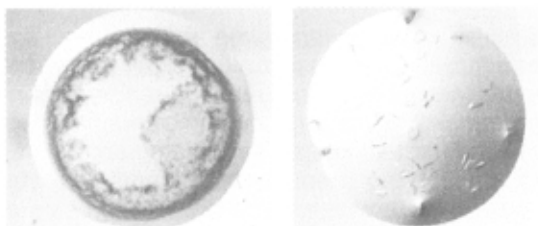
buje višjo koncentracijo obarjalnega reagenta kot kapljica. Hlapne molekule topila (ponavadi vode) difundirajo iz kapljice v rezervoar, dokler se parni tlak topila v kapljici ne izenači s parnim tlakom topila v rezervoarju. Pri tem se v kapljici koncentracija obarjalnega reagenta povečuje in približuje območju prenasajenja raztopine, prične se rast kristala.



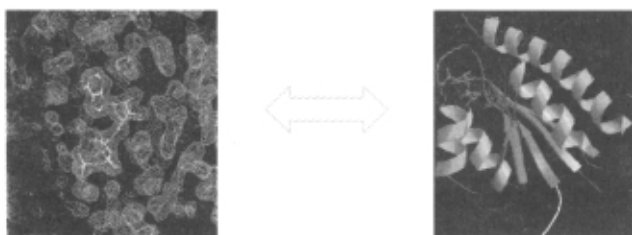
Slika 6: Kristalizacija z metodo izhlapevanja preko plinske faze /4/

Optimalen čas rasti proteinskih kristalov je 14 dni, rastejo pa lahko od nekaj dni do nekaj mesecev.

Pri prehitrem prenasajenju se tvori veliko število majhnih kristalizacijskih jeder, kar ima za posledico nastanek velikega števila majhnih kristalov ali pa celo amorfnе oborine /5/.



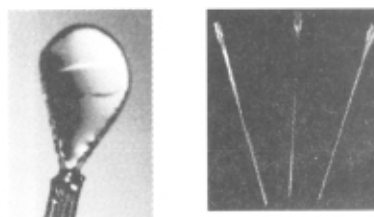
Slika 7: Kapljici z amorfnо oborino in majhnimi kristali



Slika 10: Elektronska gostota in tridimenzionalna struktura proteina (6)

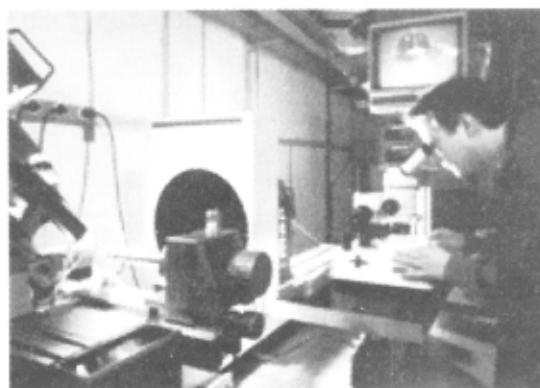
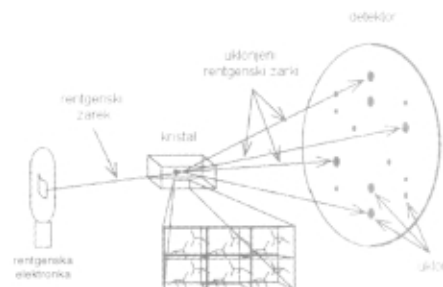
## 2.2 Meritve difrakcije vzorca

Proteinski monokristal pripravimo za meritev v kapilari oziroma ga ujamemo v zanko, potopimo v tekoči dušik, da v hipu zamrzne ter vpnemo na goniometrsko glavo med vir rentgenske svetlobe in detektor.

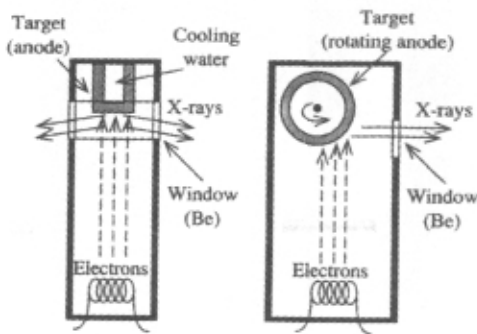


Slika 8: Zanka in kapilara za kristal

Vpadni žarki se na navidezni ravнинah kristala uklanjajo, in to tem močnejše, čim gostejše so ravnine zasedene z atomi. Kristal med snemanjem difrakcijskega vzorca vrtimo, pri čemer se izpolnjuje interferenčni pogoj za različne navidezne ravnine.



Slika 9: Merjenje proteinskih monokristalov z metodo rentgenske difrakcije



Slika 11: Anoda in rotirajoča anoda /8/

Rentgenska svetloba se dejansko uklanja na elektronskih oblakih atomov v molekulah kristala, zato lahko dobimo iz uklonske slike karto elektronske gostote molekule, ki je osnova za izdelavo modela molekule. Kot vir rentgenske svetlobe se uporabljajo: rentgenska elektronka, rentgenska elektronka z rotirajočo anodo ter pospeševalniki delcev, ki proizvajajo sinhrotronsko sevanje v območju rentgenske svetlobe. V rentgenski elektronki elektrone iz vroče katode pospešimo proti kovinski anodi. Ko jo zadanejo, se v snovi ustavijo in pri tem sevajo svetlobo karakteristične valovne dolžine skozi berilijevo okence. V proteinski kristalografiji uporabljamo karakteristično rentgensko svetlobo  $K_{\alpha}$  iz bakrove anode. Gostota toka rentgenske svetlobe je omejena s količino toplote, ki jo prenese anoda. Desetkrat boljši izkoristek dobimo z uporabo rotirajoče anode, pri kateri elektroni zadevajo večjo površino anode, ki se zato počasneje segreva. Najmočnejši vir rentgenske svetlobe pa so pospeševalniki delcev, pri katerih pospešeni elektroni ali pozitroni krožijo v visokem vakuumu s hitrostjo, ki se lahko približa svetlobni hitrosti. Energija je pospeševanim delcem dovedena z radiofrekvenčnimi oddajniki, kroženje pospešenih delcev pa vzdržujemo z močnimi magneti. Pospešeni nabiti delci, kot sta elektron in pozitron, pri kroženju oddajo skoraj celotno energijo v obliki sinhrotronskega sevanja. S sistemom fokusirajočih zrcal in monokromatorjev, ki so nameščeni tangencialno na obroč, lahko izbiramo močne monokromatske rentgenske žarke določenih valovnih dolžin (0,01 - 10 nm) /7/.

Pospeševalniki, namenjeni uporabi v proteinski kristalografiji za določevanje tridimenzionalnih struktur proteinov, so: ELETTRA v Italiji, ESRF v Franciji, DESY v Nemčiji, SRS v Veliki Britaniji, APS, ALS, CHESS, NSLS in SSRL v ZDA in drugi.

Rentgensko svetlobo, ki se uklanja na kristalu, zaznamo z detektorsko ploščo, s CCD-kamero (angleško Charge Coupled Device) ali z večkanalnim proporcionalnim števcem (angl. multiwire proportional chamber). Najbolj uporabljene so detektorske plošče, prekrivane s tanko plastjo anorganske fosforjeve spojine, pri kateri uklonjena rentgenska svetloba vzbudi elektrone. Del elektronov se vrne v izhodno stanje in izseva energijo kot fluorescenčno svetlobo, del elektronov pa ostane ujetih v metastabilnih stanjih. Informacijo o poziciji



Slika 12: Sinhrotron ESRF, Francija

in intenziteti uklonjenih žarkov, shranjeno v detektorski plošči, preberemo z laserjem, ki vzbudi elektrone iz metastabilnih stanj v višja, kratkoživeča stanja. Pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje pride do oddajanja svetlobe, ki jo zaznamo s fotopomnoževalko. Merjena oddana svetloba je sorazmerna s številom fotonov, ki so padli na ploščo oziroma z intenziteto sipanega žarka /8/.

### 2.3 Reševanje tridimenzionalne strukture proteina

Pri uklonu rentgenske svetlobe na realni mreži kristala dobimo difrakcijski vzorec oziroma recipročno mrežo, ki ima enako rotacijsko simetrijo kot realna. Vsak uklon na realni mreži lahko opišemo s Fourierovo vrsto v enačbi strukturnih faktorjev.

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j \cdot e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

- $F_{hkl}$  .....strukturni faktor
- $n$  .....število atomov v osnovni celici
- $h, k, l$  .....koordinate uklona v recipročnem prostoru
- $x_j, y_j, z_j$  .....položaj atoma  $j$  v osnovni celici
- $f_j$  .....uklon žarka na atomu  $j$

Enačba strukturnih faktorjev je torej zveza med recipročno in realno mrežo. Pove, da je posamezna slika uklona na detektorju vsota prispevkov uklonov vsakega posameznega atoma v osnovni celici. Atom predstavlja krogelni delec elektronske gostote in ga zapišemo kot vsoto prispevkov volumskih elementov elektronske gostote v osnovni celici. Gostoto v volumskem elementu zapišemo kot  $\rho(x, y, z)$ .

Fourierova transformacija je reverzibilna operacija, zato lahko z njeno uporabo izrazimo elektronsko gostoto.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \cdot \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Vsako periodično funkcijo opišemo z amplitudo, s frekvenco in fazo. Pri metodi rentgenske difrakcije izmerimo intenziteto (sorazmerna s kvadratom amplitude funkcije) in pozicijo uklona. Faze navadno ne moremo neposredno meriti, lahko pa jo določimo z derivati molekule, ki vsebujejo težke atome (Pb, Pt, Hg itd.), z anomalnim sipanjem nekaterih elementov (Fe, Cu, Zn, Mn, Se) ter z molekulami s podobno strukturo (metoda molekulske zamenjave).

Najpogostejša je metoda molekulske zamenjave, pri kateri dobimo faze iz strukturnih faktorjev znanega proteina. Faze znanega proteina nam rabijo za začetno oceno faz našega modela. Pričakujemo namreč, da ima naš protein podobno zgradbo kot fazirajoči model /7/:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}^{\text{novi}}| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz) - i\alpha_{hkl}^{\text{model}}}$$

V.....volumen osnovne celice

$\alpha_{hkl}$ .....faze fazirajočega modela znanega proteina

Faze, izračunane iz strukturnih faktorjev  $F_{\text{calc}}$ , in amplitude merjene strukture uporabimo za izračun diferencialnih map elektronske gostote  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  in  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ . Mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  pomeni celotno elektronsko gostoto, mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  pa dele elektronske gostote, ki v modelu manjkajo.

Po izračunu faz sledi gradnja modela molekule z interpretacijo elektronske gostote. Prvotne faze so bile zgolj grobi približki, zato iterativno izboljšujemo model, do najboljšega ujemanja izračunanih strukturnih faktorjev z merjenimi podatki. Pri tem minimiziramo energijo z metodo najmanjših kvadratov:

$$E = \Phi + E_G$$

$$\Phi = \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)_{hkl}^2$$

E.....celotna energija molekule

$E_G$ .....energija geometrije molekule (kotov, vezi, konformacij)

$\Phi$ .....vsota kvadratov razlik med merjenimi in izračunanimi amplitudami (kristalografsko minimiziranje)

Z minimizacijo energije želimo doseči konvergenco modela k dejanski strukturi. Merilo za uspešnost je radij konvergence: razdalja do globalnega minimuma. Radij konvergence mora biti na začetku izboljševanja strukture čim večji. To dosežemo z uporabo podatkov nizke resolucije pri računanju funkcije  $\Phi$ . Z manjšanjem radija konvergence povečujemo resolucijo in čedalje manj omejujemo parametre modela, ki postopno konvergira k merjenim podatkom. Konvergenco merjenih podatkov z modelom dosežemo torej z iterativnim izboljševanjem geometrije molekule; izboljšujemo tudi temperaturne faktorje posameznih atomov, ki so mera za oscilacijo atoma okrog položaja v modelu. Ko je ujemanje med merjenimi in izračunanimi intenzitetami veliko, dodamo še molekule topila. Mera za ujemanje

oziroma za konvergenco je rezidualni indeks ali R-faktor /7/:

$$R = \frac{\|F_{\text{obs}}\| - \|F_{\text{calc}}\|}{\|F_{\text{obs}}\|}$$

R.....R-faktor oz. rezidualni indeks

$F_{\text{obs}}$ .....izmerjeni strukturni faktor

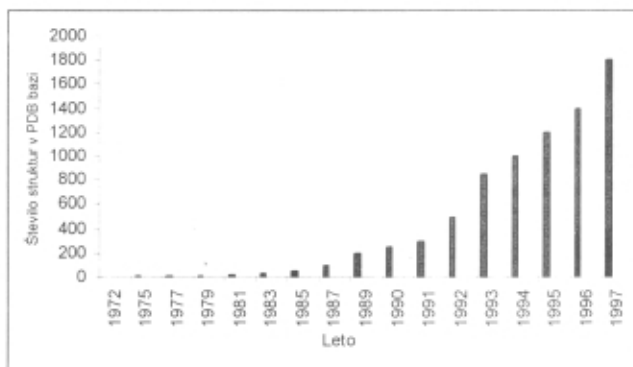
$F_{\text{calc}}$ .....izračunani strukturni faktor

Osnovno merilo za konec iterativnega postopka reševanja strukture proteina je nepretrgana diferencialna mapa elektronske gostote okrog večine atomov in ujemanje le-te z molekulskim modelom. Končni model molekule v kristalu mora biti tudi kemijsko možen, kar pomeni, da nima kiralnega centra inverzije. Dolžine vezi so ustrezne, peptidne vezi so skoraj planarne, neprolinski peptidi so v konformaciji trans, razen če za to ni posebnega vzroka. Konformacijska koža glavne verige  $\Phi$  in  $\Psi$  morata biti v okviru mej, dobljenih z Ramachandrovim diagramom, torzijski koti vezi stranskih skupin pa morajo biti v mejah stabilnih konformacij /7,9/.

## 2.4 PDB-baza tridimenzionalnih struktur proteinov

Rešene tridimenzionalne strukture proteinov so shranjene v PDB-bazi (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>), kjer vsaka dobi svojo kodo. Od vzpostavitve PDB-baze leta 1972 do danes je število rešenih tridimenzionalnih struktur proteinov naraslo iz nekaj struktur na leto na okoli 50 na teden.

Sedaj je v bazi okoli 17.000 tridimenzionalnih struktur proteinov (19. 2. 2002: 17.357 struktur). K hitremu razvoju in aktualnosti področja so prispevale vedno boljše tehnike pridobivanja proteinov in merjenja proteinskih kristalov ter pojav genomike (določevanja zaporedja genov dednega zapisa).



Slika 13: Zgodovinski razvoj PDB-baze /10/

### 3 Sklep

Z razcvetom genomike se je pojavilo tudi vprašanje, v kaj se ti geni prepisujejo. S tem se je odprlo novo področje proteomike oziroma strukturne genomike, ki se je naenkrat srečala z ogromnim številom proteinov, pri katerih bi bilo treba določiti tridimenzionalno strukturo. Zaradi množice vhodnih podatkov se prihodnost reševanja tridimenzionalnih struktur nagiba k avtomatizaciji vseh procesov, od pridobivanja proteina do robotske kristalizacije in avtomatskega merjenja kristalov na sinhrotronih /11/. Ob sinhrotronih že rastejo tovarne proteinov, npr.: Protein Production Factory (SRS, Daresbury, Velika Britanija), Protein Structure Factory (Berlin, Nemčija), ki bodo kos novim zahtevam po avtomatizaciji vseh procesov, ki vodijo do rešene tridimenzionalne strukture proteina. Poleg njih se na sinhrotronih tudi navdušujejo nad možnostjo merjenja proteinskih kristalov in določevanje strukture proteina na daljavo preko interneta (protein poslan po hitri pošti na sinhrotron, avtomatske nastavitve ter spremljanje procesov preko interneta).

Čeprav bo avtomatizacija skrajšala čas in povečala učinkovitost reševanja struktur, bo posledično povzročila »poplavo« podatkov, ki jih bo treba smiselno obdelati, ter vsem proteinom, ki jim bo določena tridimenzionalna struktura, tudi pripisati njihovo funkcijo v bioloških procesih. Z razcvetom genomike in proteomike in uporabo vseh tehnik, ki so se posledično razvile, ter

z uporabo sinhrotronske svetlobe, se je odprlo novo, zelo zanimivo področje, ki bo pripomoglo k razumevanju delovanja celotnega organizma na molekularnem nivoju.

### 4 Literatura

- /1/ Stryer, L., Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York, (1995), 18-72
- /2/ Voet, D., Voet, J. G., Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1996), 141-188
- /3/ Eisenberg, D., X-Ray Crystallography and Enzyme Structure, editor: Boyer P. D., The Enzymes, Academic Press New York, (1970), 1-23
- /4/ Mc Pherson, A., Crystallization of biological macromolecules, Cold Spring harbor Laboratory Press, NY (1970), 159-215
- /5/ Ducruix, A., Giegé, R., Methods of Crystallization. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, Oxford University Press, New York, (1992), 73-91
- /6/ Zarembinski, T., Hung, L. W., Mueller-Dieckmann, J., Kim, K. K., Yokota, H., Kim, R., and Kim, H. S., Proc. Natl. Acad. Sci., 15, (1998), 15189
- /7/ Rhodes, G., Crystallography Made Crystal Clear, Academic Press, San Diego, (1993), 85-99
- /8/ Drenth, J., Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer-Verlag, New York (1994), 34-37.
- /9/ Stern, I., Določanje tridimenzionalne strukture kompleksov katepsinov s sintetičnimi inhibitorji, Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, (2001), 21 - 25
- /10/ Weissig, H., Bourne, P. E., Bioinformatics, 15 (1990), 807-831
- /11/ Lamzin, V. S., Perrakis, A., Nature Structural Biology, (2000), 978-981
- /12/ Orengo, C. A., Curr.Opin.Struct.Biol., 4 (1994), 429-440
- /13/ Holm, L., Sander, C., Nucleic Acids Res., 27 (1999), 244-247

## In memoriam

### DR. AVGUST BELIČ (1928-2002)



Dr. Avgust Belič je izhajal iz skromne železničarske družine na Viču v Ljubljani. Rojen je bil 5. 3. 1928. Po osnovni šoli na Viču se je l. 1939 vpisal na 1. državno moško realno gimnazijo v Ljubljani in jo z odliko končal leta 1947. Jeseni istega leta se je vpisal na Tehniško visoko šolo, Oddelek za elektrotehniko.

Kot mladinec je med vojno sodeloval pri aktivnostih narodnoosvobodilnega boja v domači Rožni dolini. Že zgodaj ga je privlačila tehnika. Med študijem je pričel (1952) kot laborant sodelovati v Inštitutu za šibki tok TVŠ pri prof. Dušanu Lasiču. S tem se je vključil v formiranje nastajajočega Inštituta za elektroniko in vakuumsko tehniko, ki mu je ostal zvest vso svojo delovno dobo. Leta 1956 je z odliko diplomiral, postal samostojni raziskovalec, kmalu potem (1960) vodja Laboratorija za optična merjenja v Oddelku za elektronsko vakuumsko tehniko in štiri leta kasneje vodja Odseka za termične elektrone. Vzporedno z ustvarjanjem družine je povečeval aktivnosti na strokovnem področju in bil postavljen za vodjo Oddelka za kontakte in specialne elektrone (1972). Iz tega obdobja se njegovi sodelavci spominjamo razvoja hermetičnih kontaktnikov, številnih patentov, spoznavanja novih tehnologij, stikov s tujino, aktivnosti za rast inštituta (IEVT) in povečevanja oddelka. Sodeloval je pri vodenju razvojnoraziskovalne dejavnosti celotne hiše in po inž. Kobetu postal direktor (1974); njegovi trije mandati so bili najuspešnejše obdobje Inštituta. Doktoriral je l. 1977 in se istočasno trudil za postavitev

močne vodstvene strukture, ki jo je inštitut z nad 300 zaposlenimi nujno potreboval. Upokojil se je leta 1987.

Dr. Belič, vseskozi napredno tehnično misleč, je okrog sebe z veseljem zbiral mlajše sodelavce, jih vpeljeval v raziskovalno delo in skrbel za njihovo napredovanje. Že iz rane mladosti ga je spremljal izreden socialni čut, kar smo velikokrat opazili, ko je z njemu značilno vztrajnostjo pomagal vsakomur, ne glede na stan ali izobrazbo. V prostem času, kolikor mu ga je ostajalo, je poleg družine vlagal svojo energijo še v Združenje rezervnih vojaških starešin, deloval pri lovskih in strelskih družinah, bil strasten radioamater, kasneje tudi računalničar, ekspert za strelna orožja, za letala in sploh za tehnološko zahtevne tehnične izdelke vseh vrst. Prav v zadnjem obdobju se je z vsem žarom posvetil sistemom GPS. Na tem novem področju je svetoval številnim podjetjem, med drugim tudi Ministrstvu za obrambo in Ministrstvu za notranje zadeve, vodil je tečaje za uporabo GPS sistemov in bil celo somentor pri diplomah študentov, ki so se ukvarjali s tem tehnično dokaj zahtevnim področjem.

Strokovno in znanstveno delo dr. Beliča obsega številne članke v tujih in domačih revijah, referate na simpozijih in konferencah, strokovna poročila, recenzije in patente. Bil je znanstveno-tehnološki svetovalec v več tujih firmah, dobil dve nagradi za izume in tehnične izboljšave, sodeloval pri snovanju in začetnem delovanju Jugoslovanskega centra za vakuumsko tehniko ter bil predsednik Jugoslovanskega komiteja za vakuumsko tehniko. Ves čas je z velikim razumevanjem podpiral delovanje našega društva, ki je nastalo in živelo v isti stavbi kot Inštitut; številne aktivnosti so se v skupnem okolju dopolnjevale. Nanje in na dr. Beliča nas vežejo mnogi lepi spomini.

Andrej Pregelj