



## Session X, Thursday, June 22

L28

### Dynamic Theory of Protein Crystallization

## DYNAMICKÁ TEORIE PROTEINOVÉ KRYSTALIZACE

J. Hašek

*Biotechnologický ústav České akademie věd, Biocev, 25250 Vestec  
hasekj@seznam.cz*

**Abstract:** The lecture summarizes the basic principles of new dynamic theory of protein crystallization providing a rational approach for a growth of protein crystals of better diffraction quality. The principle of a single dominating adhesion mode should have been respected in any method of protein crystallization. The impact of the principle and the use of the so called protein surface active molecules (PSAM) are discussed too.

Krystalizace proteinů je po téměř sto let empirických zkušeností již poměrně dobře zvládnutý proces. V současné době spoléhá proteinová krystalizace na testování mnoha tisíců krystalizačních podmínek, které v minulosti daly pro některé proteiny dobré výsledky. Pokud není krystalizace úspěšná, zkouší se jiné krystalizační screeny v naději, že některý jiný bude třeba fungovat. Poněkud frustrujícím faktem je, že ani v případě úspěšné krystalizace nikdo neví, jestli by některá jiná krystalizační podmínka neposkytla kvalitnější krystal.

Difrakční kvalita proteinových krystalů je stále principiální problém proteinové krystalografie. Difrakční metody jsou samy o sobě schopné měřit spolehlivě meziatomové vzdálenosti s přesností na setiny Angstromu [1]. Průměrná kvalita měřená pojmem "resolution" je ale u proteinových struktur deponovaných v PDB je pouze 2 Angstromy. Z racionálního hlediska je tedy krystalizace proteinů v poměrně neúspěšné situaci poskytující kvůli nekvalitním vzorkům nepříliš dobré výsledky a vyřešení struktury stojí stále značné úsilí, vyžaduje pevné nervy a vyšší spotřebu obvykle velice drahocenného proteinu.

**Proč je situace u proteinů jiná než u organických krystalů?** Dlouholetá praxe s krystalizací proteinů ukazuje, že proteinový krystal vždy obsahuje velké množství nekystalografické (tekuté) vody. Proteinový skeleton může existovat pouze v termodynamické rovnováze s **27 až 85 %** dynamicky neuspořádaného roztoku uzavřeného uvnitř krystalu. Když si uvědomíme, že krystalický proteinový skeleton zachovává svoji pevnost i v pětinasobném množství vody, je zřejmé, že **architektura proteinového skeletonu krystalu hraje mimořádně důležitou roli.**

Při krystalizaci organických nebo anorganických materiálů dochází k účinné separaci krystalujícího materiálu z rozpouštědla a molekuly v krystalu vytváří obvykle souvislý pravidelný kompaktní blok s nepatrnými zbytky rozpouštědla. U proteinových krystalů je situace velice odlišná. Proteinové molekuly zachovávají velkou část svojí hydratační slupky a drží v krystalu vodu až do pěti-

násobku svoji hmotnosti. Architektura proteinových krystalů připomíná konstrukci moderních budov, u kterých je stabilita zajištěna tenkým nosným železobetonovým skeletem a kde sádkartonové přepážky uvnitř budovy nemají z hlediska stability velkou roli. Obdobně, stabilita proteinového krystalu závisí na pevnosti a uspořádání mezimolekulárních interakcí protein-protein. Porozumění mezimolekulární adheze (mezi molekulami proteinů a také mezi molekulami proteinů a aditiv záměrně přidávaných do krystalizačního roztoku) hraje proto klíčovou roli při řízení krystalizace proteinů.

**Nová dynamická teorie krystalizace proteinů se snaží vysvětlit adhezní jevy řídící proces krystalizace** a umožnit tak racionální řešení této časově a nervově obvykle nejnáročnější části řešení molekulární struktury biologických makromolekul [2]. Základem dynamické teorie krystalizace proteinů je **teorie adhezních módů** vycházející z analýzy adhezních módů pozorovaných v krystalových strukturách deponovaných v PDB, dále z analýzy mnohem přesněji [1] pozorovaných interakcí v CSD, a také z analýzy interakcí popisovaných jinými analytickými metodami, které dovedou poskytnout také jisté informace o existenci mezimolekulárních klusterů v koncentrovaných roztocích. **Pojem adhezní mód** je názorný, ale jak uvidíme, vzhledem k jeho univerzalitě ho není snadné přesně definovat. Jak ale ukážeme na příkladech, je to v mnoha případech užitečný a často srozumitelný pojem.

Obrovská plocha povrchu proteinu vždy nabízí větší počet adhezních ploch s různou afinitou. Pokud se v rostoucím "krystalu" uplatní různé adhezní módy, molekuly budou různě orientované. Dostaneme možná pravidelný rigidní útvar, ale difrakční efekt bude minimální nebo nulový. Pro úspěšnou krystalizaci proteinů je proto mimořádně důležitý **princip jediného dominantního adhezního módu (PSDAM – Principle of a Single Dominating Adhesion Mode)**, který musí řídit celý krystalizační proces bez ohledu na to jakým mechanismem růst probíhá. Zárukou úspěšné krystalizace je tedy cílené řízení pravděpodobnosti realizace vybraných krystalově kompatibilních adhezních módů.

Dalším klíčovým nezbytným pojmem jsou **molekuly aktivní na povrchu molekul proteinů** - modifikující vlastnosti povrchu proteinů [3]. Označujeme je zkratkou **PSAM – "Protein Surface Active Molecules"**. Tyto molekuly jsou záměrně přidávány do krystalizačního roztoku, a adherují (s nízkou afinitou !!) na dobře definované adhezní plochy na proteinových molekulách. PSAM takto dočasně mění adhezní vlastnosti proteinových molekul -

buď aktivují a nebo pasivují vybrané adhezní módy mezi proteinovými molekulami vytvářející krystalový skeleton.

Máme tedy k dispozici velice efektivní a snadnou metodu ovládnání afinity mezi proteinovými molekulami a tedy máme **racionální cestu jak zajistit dominantní roli zvoleného adhezního módu zaručující dobrou periodicitu a difrakční schopnost rostoucího krystalu**. Možnost racionálně volit architekturu proteinových krystalů a možnost optimalizovat difrakční schopnost proteinových krystalů nabízí možnost zlepšit efektivitu metod stanovení struktury biologických materiálů v atomárním rozlišení.

- **Znalost protein-protein adhezních módů** využíváme ke stavbě proteinového skeletonu rostoucího krystalu. Je obtížné předvídat tyto adhezní módy pomocí molekulárního modelování, protože jejich stabilita je vždy zásadně ovlivněna dynamickou vrstvou většího množství molekul vody, iontů atd. Z praktického hlediska je proto logické vycházet zejména z experimentálně pozorovaných adhezních módů.
- **Znalost protein-PSAM adhezních módů** využíváme k pasivaci a nebo aktivaci protein-protein vybraných adhezních módů, abychom zaručili dominanci řídicího adhezního módu [3]. Funkci PSAM má řada iontů (solí), molekul, oligomerů a polymerů. Významnou roli zde hraje PEG poly(ethylene glycol) jehož role byla již dobře popsána [4, 5].

Pokud chceme racionalizovat krystalizační proces, je třeba princip dominantního adhezního módu akceptovat vždy bez ohledu na to, jakou metodu krystalizace chceme použít. Současné metody proteinové krystalizace jsou v zásadě empirické a výše uvedenými principy se příliš neřídí. Zde se zmíníme o důsledcích vyplývajících z dynamické teorie krystalizace, z principu jediného dominu-

jícího adhezního módu a ze znalosti vlivu PSAM na adhezní vlastnosti povrchu proteinu, pro stávající metody proteinové krystalizace:

- **výběr optimálních homologů** proteinu pro krystalizační screening
- výběr mutačních míst pro krystalizaci založenou na **mutacích cílového proteinu**, tj. chemické a biochemické mutace, metylace lysinů, redukce povrchové entropie, atd.
- **výběr PSAM pro krystalizaci** řízenou chemickým složením krystalizačního roztoku,
- dopad na **další empirické krystalizační metody**, tj. elektrické, magnetické pole, proud, vibrace, gravitace, atd.

Přestože jsou nově definované přístupy a pojmy názorné a přirozené, většina stávajících metod krystalizace proteinů je stále založena na masivním testování “nekonečného” množství racionálních i iracionálních experimentů bez dostatečného vysvětlení pozorovaných efektů. Předpokládáme, že respektování důsledků vyplývajících z dynamické teorie, z principu dominujícího adhezního módu, a znalost funkce PSAM pomohou zefektivnit postupy používané při krystalizaci proteinů a zlepšit tak přesnost a spolehlivost stanovení struktury biomolekulárních systémů.

1. Hašek, J., *Chemické listy*, **105**, (2011), 467-475.
2. Hašek, J., *Materials Structure*, **23**, (2016), 341.
3. Hašek, J. et al, *J. Synchr. Radiation*, **18**, (2011), 50-52.
4. Hašek, J., *Z. Kristallogr.*, **28**, (2011), 475-480.
5. Hašek, J. et al, *Z. Kristallogr.*, **23**, (2006), 613-618.

*Podporováno projekty BIOCEV (ERDF CZ.1.05/1.1.00/02.0109) a GAČR (15-15181S).*

L29

## DEVELOPMENT OF PROTEIN DIFFRACTION TECHNOLOGIES

J. Dohnálek

*Institute of Biotechnology CAS, v. v. i., Biocev, Průmyslová 595, 25250 Vestec  
dohnalek@ibt.cas.cz*

Single crystal X-ray diffraction techniques applied on biological molecules have specific requirements. The significantly larger unit cell of bio-molecular crystal results in much weaker diffraction intensities compared to small molecules and high sensitivity to radiation damage, which limits total exposure per data set. Therefore, the development of X-ray diffraction technologies was marked by important advances in the areas of X-ray sources, detectors, goniometers, automation, *in situ* approaches, and software.

Advances in each area broadened the possibilities of the field and pushed the limits of single crystal protein structure analysis. X-ray free electron lasers enable crystal analysis with use of submicron crystals outrunning the radiation damage events. Photon counting detectors provide one of the most efficient ways of detecting diffraction intensities. While high-precision four-circle goniometers

find use in in house analysis of very small crystals, the ever growing intensity of the synchrotron beams available for macromolecular crystallography led to development of ultra-fast single-axis goniometers enabling thus several-second-data-set acquisition. Automation of crystallization and crystal manipulation simplified screening of large numbers of conditions as well as single crystals. Automated techniques of *in situ* (or in tray) measurements opened up screening for ligand binding (or derivatives) in solvated conditions without the need for crystal vitrification. Devices controlling crystal humidity enable optimization of macromolecular single crystals as for their packing and quality of diffraction pattern. Recent software development enabled automated or semi-automated parallelized diffraction data processing providing quick answers in the



case of utilization of relatively costly beam times at synchrotron beam lines.

Each of the main technological areas will be briefly discussed in the light of the current limits of use in macromolecular crystallography.

Despite the enormous technological improvements the basic understanding of diffraction experiment, its parameters, and background in single crystal analysis requires relatively good understanding of the field. Excellent technology can be used incorrectly or non-efficiently if the basic principles are ignored or the modern technologies are

not properly understood. While some important parameters of macromolecular crystallography can be improved or their negative effects minimized with the use of modern equipment or procedures, other critical parameters cannot be ignored. The distinction between these two types of characteristics/parameters will be discussed to support better application of macromolecular crystallography.

*Support by MEYS CR (LM2015043, CIISB) and by the ERDF fund (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001776) is acknowledged.*

L29

## NK Cells, Their Receptors and Interaction

### NK BUŇKY, JEJICH RECEPTORY A INTERAKCE

T. Skálová<sup>1</sup>, J. Bláha<sup>2</sup>, J. Stránský<sup>1</sup>, T. Koval<sup>1</sup>, J. Dušková<sup>1</sup>, J. Hašek<sup>1</sup>, Y. Zhao<sup>3</sup>, K. Harlos<sup>3</sup>, J. Dohnálek<sup>1</sup>, O. Vaněk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Biocev, Průmyslová 595, 252 50 Vestec,*

<sup>2</sup>*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Hlavova 8, 128 40 Praha,*

<sup>3</sup>*Division of Structural Biology, The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, OXFORD OX3 7BN, United Kingdom  
t.skalova@gmail.com*

NK buňky (z anglického natural killer cells, přirození zabíječi) jsou jedním typem bílých krvinek. Jsou co do počtu třetí subpopulací lymfocytů, vedle T-lymfocytů a B-lymfocytů. Na rozdíl od T a B lymfocytů je funkce NK buněk převážně vrozená (zapsaná v DNA, nevyvíjí se během života, zato je velmi rychlá).

Hlavní funkcí NK buněk je obrana proti virovým infekcím a nádorovým buňkám. NK buňky exprimují na svém povrchu receptory mnoha druhů. Ty komunikují s buňkou, kterou NK buňka potká. Na základě celkové bilance odpovědí získaných z aktivačních a inhibičních receptorů NK buňka rozhodne, zda zkoumaná buňka je poškozená nebo zdravá, a vydá nebo nevydá pokyn k její likvidaci.

V naší skupině se již řadu let zabýváme výzkumem struktury a funkce receptorů NK buněk, a to těch, jejichž poslední doména, která interaguje s partnerskou buňkou, strukturně patří do kategorie proteinů s tzv. C-type lectin-like (CTL) skladem. Lektiny jsou proteiny, které se

v imunitním systému vyskytují velmi často. CTL proteiny jsou proteiny strukturně podobné lektinům C-typu, které však ve své vazebné doméně neobsahují vápník, který je pro C-lektiny typický. Lektiny váží cukry, zatímco u této skupiny CTL proteinů bez vápníku se vazba cukrů nepředpokládá.

Nedávno jsme vyřešili strukturu lidského receptoru NKR-P1. V roce 2015 nám vyšla publikace o LLT1, což je jeho vazebný partner – ligand, který má též CTL sklad. Přednáška představí strukturu obou těchto proteinů, jejich oligomerizaci a glykosylaci.

T. Skálová, J. Bláha, K. Harlos, J. Dušková, T. Koval<sup>1</sup>, J. Stránský, J. Hašek, O. Vaněk, J. Dohnálek, Four crystal structures of human LLT1, a ligand of human NKR-P1, in varied glycosylation and oligomerization states, *Acta Cryst. D71*, (2015) 578-591 (open access)

*Tento výzkum byl finančně podpořen z projektů BIOCEV (ERDF CZ.1.05/1.1.00/02.0109) a Grantovou agenturou ČR (15-15181S).*

## The Second Generation of Carbon Anhydrases Inhibitors on the Base of Carboranes

## DRUHÁ GENERACE INHIBITORŮ UHLIČITÝCH ANHYDRÁZ NA BÁZI KARBORANŮ

Jiří Brynda,<sup>1</sup> Klára Pospíšilová,<sup>3</sup> Pavlína Řezáčová,<sup>1,3</sup> Milan Fábry,<sup>1</sup> Vlastimil Král,<sup>1</sup>  
Jana Štěpánková,<sup>2</sup> Marián Hajdúch,<sup>2</sup> Josef Holub,<sup>4</sup> Václav Šícha,<sup>4</sup> Jan Nekvinda,<sup>4</sup>  
and Bohumír Grüner<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Genetics, AS ČR, Prague 4, Czech Republic,*

<sup>2</sup>*Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic,*

<sup>3</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS ČR, Prague 6,*

<sup>4</sup>*Institute of Inorganic Chemistry, AS ČR, 250 68 Řež, Czech Republic*

Lidské karbonátlyázy jsou metaloenzymy, které se účastní mnoha fyziologických pochodů v organismu, ale hrají také roli v patogenezi řady chorob. Karbonátlyáza IX (CAIX) se, na rozdíl od ostatních 15 izoenzymů lidských karbonátlyáz, za normálních podmínek vyskytuje v organismu jen v omezené míře, avšak v hypoxických nádorech je vysoce exprimovaným znakem na povrchu buněk. Z tohoto důvodu je tento enzym dobrým cílem pro terapii a diagnostiku nádorů, a proto jsou proti CAIX vyvíjeny různé specifické inhibitory.

V rámci naší laboratoře je testována řada inhibitorů, mezi něž patří i karboranové inhibitory, tvořené objemnou klecí z atomů bóru, uhlíku a vodíku.

Pro potřebné experimenty jsme heterologní expresí získali dostatečné množství čistého proteinu CAIX, dále CAII enzymu, který slouží jako „off-target“ izoforma, a také hybridní enzym CA29, který tvoří aktivní místo z CAIX izoenzymu obklopené aminokyselinovými zbytky z CAII izoenzymu a umožňuje tak jednodušší krystalizaci. U každého testovaného inhibitoru byla nejprve zjištěna inhibiční konstanta, a to pro obě izoformy CAII i CAIX. Poté byl testován způsob vazby vybraných inhibitorů.

V prezentaci uvádíme poslední pokroky v molekulárním návrhu inhibitorů karboranů a metalakarboranů zaměřených na izoenzym CAIX. Tento enzym, který je spojen s pevnými hypoxickými nádory, patří do nově identifikovaných cílů pro léčbu rakoviny a diagnostiku.

Rozsah aktuálně dostupných modifikací na různých bórových klastrech je shrnut s důrazem kladeným na

pokrok v syntéze karboranů a metalakarboranů substituovaných sulfamidem, sulfonamidem a dalšími podobnými skupinami, tj. funkcemi, o kterých je známo, že se pevně váží k atomu zinku v aktivním místě CAIX. Nové generace polyhedrálních inhibitorů CAIX založené na pečlivém výběru borových klecí a optimalizovaných substitucí vykazují významně zvýšené aktivity *in vitro* s odpovídajícími hodnotami  $K_i$  v rozmezí nM až desítek pM. Vztah mezi strukturou a aktivitou (SAR) byl pozorován v malé knihovně cca. 60 diskutovaných karboranů a metalakarboranů.

Tyto výsledky jsou doplněny synchrotronovými strukturami komplexů enzym-inhibitorů a krátkým přehledem farmakologicky významných faktorů jako je vazba plazmatických bílkovin, penetrace buněčné membrány a základní výsledky z toxikologických a farmakokinetických studií (myší model) prováděných na panelu vybraných inhibitorů enzymů CAIX. Kvůli slibným inhibičním vlastnostem jsou tyto sloučeniny primárně považovány za kandidáty na léky použitelné při léčbě rakoviny.

*Projekt byl podpořen GAČR, projekt č. 15-05677S a částečně Technologickou agenturou České republiky, projekt č. TE01020028 (farmakologie a testování in vivo). Při práci byla též využita podpora institucionálních výzkumných projektů RVO 68378050, 61388963 a 61388980 Akademie věd České republiky.*



L31

**LIGAND VALIDATION IN MACROMOLECULAR STRUCTURES****P. Kolenko<sup>1,2</sup>, M. Malý<sup>2</sup>, T. Skálová<sup>1</sup>, T. Kovař<sup>1</sup>, J. Dušková<sup>1</sup>, J. Stránský<sup>1,2</sup>,  
L. Švecová<sup>1,2</sup>, K. Fejfarová<sup>1</sup>, J. Hašek<sup>1</sup>, J. Dohnálek<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology CAS, v.v.i., BIOCEV, Průmyslová 585, Vestec*<sup>2</sup>*Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering CTU, Břehová 7, Prague  
petr.kolenko@jffi.cvut.cz*

Numerous projects of macromolecular structure-function studies involve soaking and/or co-crystallization of ligands. Their presence is afterwards expected to be observed in 2mFo-DFc electron density map and mainly in mFo-DFc (omit) map. However, computation of the electron density map may be distorted by additional factors. In less clear cases (*e.g.* lower occupancy of the ligand), the initial observed electron density may not contain information on localization of the ligand and further validation procedures are necessary: composite omit map, feature-enhanced map, polder map [1], *etc.* Current methods are briefly reviewed

and their application is shown on a single case of an enzyme:substrate complex.

1. D. Liebschner, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, B. K. Poon, O. V. Sobolev, T. C. Terwilliger, P.D. Adams. *Acta Crystallogr. D73*, (2017) 147-157.

*This publication was supported by project BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and CIISB4HEALTH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001776) from the ERDF fund and by the Grant Agency of the Czech Technical University in Prague, grant No. SGS16/246/OHK4/3T/14.*