

Session X, Thursday, June 21

L26

Protein structure solution with program ARCHIMBOLDO**ŘEŠENÍ PROTEINOVÝCH STRUKTUR PROGRAMEM ARCIBOLDO****J. Brynda^{1,2}, L. Urbániková³**¹Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo náměstí 542/2, 166 10, Praha 6²Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20, Praha 4³Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava 4, Slovenská republika
brynda@img.cas.cz

Molekulární nahrazení je jednou z obecných metod řešení fázového problému v makromolekulární krystalografii, je však kriticky závislé na dostupnosti modelu strukturně podobného proteinu, pro který následně hledáme správné natočení a umístění v elementární buňce, tak abychom našli iniciální set fází pro naši krystalovou strukturu. Program byl původně koncipován jako *ab initio* fázování využívající vysoce strukturně identické fragmenty jako jsou polyalaninové alfa helixy. Od září 2009, kdy byl oficiálně uvolněn pro proteinově-krystalografickou komunitu, je jeho základem kombinace přesného umístění strukturně homologických fragmentů pomocí programu PHASER [1] (polyalaninové alfa helixy a případně další strukturně identické molekuly) a programu SHELXE [2], který zlepšuje fáze pomocí algoritmů pro úpravu elektronových hustot a následným trasováním a postupným budováním krystalové struktury. V současnosti program ARCIBOLDO³ (<http://chango.ibmb.csic.es/>) je provozován v několika obměnách, zaprvé jeho paralelizovaná plná verze pro počítačový cluster, ale i zjednodušená verze

pro vícejádrové počítače ARCIBOLDO-Lite, která je součástí souboru programů CCP4 i s GUI v CCP4i.

Použití programu ARCIBOLDO-Lite je demonstrováno na řešení struktury C-koncové části **Endolysinu** *Corynebacterium phage* BFK20. Krystaly poskytly dobrá difrakční data, pokusy o fázování metodami SAD a MIRAD pro krystaly dotované těžkými ionty a komplexními molekulami s těžkými atomy však selhaly.

1. Phaser crystallographic software. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007) *J Appl Cryst.* 40, 658-674.
2. Extending molecular-replacement solutions with SHELXE. Thorn, A. & Sheldrick, G. M. (2013) *Acta Cryst.* D69, 2251-2256.
3. Exploiting tertiary structure through local folds for *ab initio* phasing. Sammito, M., Millán, C., Rodríguez, D. D., M. de Ilarduya, I., Meindl, K., De Marino, I., Petrillo, G., Buey, R. M., de Pereda, J. M., Zeth, K., Sheldrick, G. M. & Usón, I. (2013) *Nat Methods.* 10, 1099-1101.

L27

Porous catalysts of protein crystallization**PORÉZNÍ INICIÁTORY PROTEINOVÉ KRYSTALIZACE****J. Hašek, T. Skálová, T. Koval, P. Kolenko, J. Stránský, J. Dušková, J. Dohnálek***Biotechnologický ústav AV ČR, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, hasekjh@seznam.cz*

Krystalizace proteinů byla popsána již před 180 lety v knize F. L. Hünfelda "Chemical properties of animal organization" [1]. Rychlý rozvoj krystalizačních technik proteinů začal v 80-tých letech minulého století, kdy začalo být rtg. strukturní analýza se stává optimální metodou pro stanovení struktury a funkce biologických makromolekul (viz např. [2]). Od té doby bylo na toto téma publikováno tisíce článků. Obrovské investice do rozvoje krystalizačních technik zejména ze strany farmaceutických společností vedly k jejich masovému rozvoji a automatizaci, která umožňuje testování tisíců krystalizačních podmínek s poměrně malými nároky na pracovní sílu. Přesto krystalizace proteinů zůstává i nadále hlavním

limitujícím faktorem spolehlivého a přesného stanovení struktury molekulárních systémů, které bio-molekuly v organizmech vytvářejí. Stále převládá nedůvěra, že existuje spolehlivá cesta k racionální přípravě dobře difraktujících krystalů. Důvodem je velké množství používaných empirických postupů, které mají často protichůdná odůvodnění. Teoretické práce se zabývají podrobně procesem vysrážení makromolekuly z roztoku, ale obvykle pomíjí řešení hlavního problému – to, proč ve většině případů vzniká nekrytalická sraženina místo pravidelně uspořádaného krystalu.

Naše **dynamická teorie krystalizace proteinů** je postavena na **principu dominantního adhezního módu**,



který je podmínkou vzniku pravidelné krystalické fáze. Nové pojmy **adhezní mód, protein-povrchově aktivní látky (protein surface active agents)** umožňují jednotné a logické zdůvodnění všech dosud používaných postupů krystalizace [3,4,5]. Tento jednotný pohled na krystalizaci proteinů ukazuje limity použitelnosti současných metod a dává naději na přípravu kvalitnějších krystalů s lepší difrakcí a snížení časové a finanční náročnosti výzkumu.

V tomto příspěvku ukážeme využití dynamické teorie pro **mikro-pórézní materiály, které jsou schopné řízené iniciace krystalizace biologických makromolekul**. Dřívější teorie vysvětlovaly iniciaci krystalizace v omezeném prostoru zvýšenou koncentrací proteinu v dutinách mikropórézního materiálu a vedly ke kontroverzním závěrům ohledně heterogenního materiálu a k diametrálně odlišným odhadům optimální velikosti dutin podle různých autorů [6].

Naše teorie vysvětluje iniciaci krystalizace orientačním efektem při vazbě molekul proteinu na konkávní povrch dutiny. Jednotná vazba na povrchu substrátu vede k unifikaci zbývajících protein-protein adhezních módů mezi makromolekulami v dutině. Proteinové klastry vznikající z předběžně orientovaných molekul proteinu v dutinách jsou proto mnohem pravidelnější a stálější než ty vznikající ve volném roztoku a vedou tedy ke vzniku stabilních krystalizačních zárodků.

L28

CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES OF HDAC8-INHIBITOR COMPLEXES

Martin Marek¹, Christophe Romier²

¹*Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology & RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5/A13, 625 00 Brno, Czech Republic*

²*Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France*

Currently approved epigenetic drugs target mainly metal-dependent histone deacetylases (HDACs), which are key epigenetic regulators. Yet, cross-reactivity of these drugs for the structurally similar but functionally different HDAC isozymes hampers their broad usage in clinical settings. Selective inhibitors targeting single HDAC isozymes are being developed, but our precise understanding in molecular terms of their selectivity remains sparse. PCI-34051 and NCC-149 were among the first inhibitors displaying isozyme-specificity for their target, HDAC8. In this report, we show numerous structures of HDAC8-inhibitor complexes solved by X-ray crystallography. These structures

K cílené přípravě mikropórézního materiálu s dobře definovaným tvarem a velikostí pórů je možné použít například speciální polymery s molekulárním otiskem (**molecularly imprinted polymers**) [7]. Předpokládáme, že cílený návrh a příprava mikropórézního iniciátoru krystalizace umožní řízenou přípravu velkého množství mikrokrystallků potřebných pro **sériovou proteinovou krystalografii na femtosekundových zdrojích rtg záření (femtosecond X-ray laser facilities)**.

1. Hünefeld, F.L. *Chemical Properties in the Animal Organization*, pp. 160-161, Brockhaus, Leipzig (1840).
2. Giege, R. *FEBS Journal*, 6456-6497 (2013).
3. Hašek, J. J. *Synchrotron Radiation* 18, 50-52 (2011).
4. Skálová, T. et al, *J. Appl. Crystallogr.* 43, 737-742 (2011).
5. Hašek, J. et al, (to be published 2018).
6. Nanev, C.N., Satridakis, E., Chayen, N.E. *Scientific Reports*, 7, 35821-35828 (2017).
7. Saridakis, E., Chayen, N.E. *Trends Biotechnol.* 31, 515-520 (2013).

Supported by Czech Science Foundation 18-10687S, RVO 86652036.

reveal how HDAC8-selective inhibitors build their selectivity on specific interactions, notably with the HDAC8 active site catalytic tyrosine, but also through contacts with the HDAC8 L6 loop that forms, together with the L1 loop, a HDAC8-specific pocket. These interactions are enabled by the specific size and conformation of the HDAC8 L1 and L6 loops, which leave the catalytic tyrosine uncovered, and by the constrained L-shape of HDAC8-selective inhibitors. Collectively, our results highlight the importance of HDAC active site loops and architecture, and pave the way for the design of next-generation selective HDAC inhibitors.

L29

STRUCTURAL STUDIES OF NOVEL HALOALKANE DEHALOGENASE DgaA FROM GLACIECOLA AGARYLITICA NO2**Ivana Berkova¹, Tatyana Prudnikova^{1,2}, Michal Kutý^{1,2}, Radka Chaloupkova³, Jiri Damborsky³, Ivana Kuta Smatanova^{1,2}**¹*University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Science, Branisovska 1760, 370 05 Ceske Budejovice*²*Academy of Science of the Czech Republic, Center for Nanobiology and Structural Biology IMB, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky*³*Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and Research Centre for Toxic Compounds in the Environment RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5/A13, 625 00 Brno, Czech Republic*

Haloalkane dehalogenases (HLDs) are microbial enzymes that have attracted significant interest because of their ability to catalyze the irreversible hydrolysis of a wide range of halogenated compounds. These enzymes can be used as potential applicants in industrial catalysis, in the bioremediation and the biosensing of environmental pollutants. Novel haloalkane dehalogenase DgaA (EC 3.8.1.5, HLDs) belonging to the superfamily of hydrolases, was isolated from a psychrophilic and moderately halophilic organism, *Glaciecola agarilytica* NO2, that was found in marine sediment collected from the East Sea, Korea. The purified protein dialyzed against 50mM Tris HCl

buffer (pH 7.5) overnight and stored at 193 K was used for crystallization experiments in the concentration of 13.6 mg ml⁻¹. Screening for crystallization conditions has been performed by Oryx crystallization robot (Douglas Instruments, Ltd., UK) using sitting drop vapour diffusion method. Commercial crystallization screen Index HR2-144 (Hampton Research, USA) was used for screening of DgaA crystallization conditions. Further optimization to find successful crystallization conditions will be starting point for further research focused on structure determination and description of protein function.

The work was supported from GACR 17-24321S.

L30

CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES OF A NEWLY PREPARED HISTIDINOL-PHOSPHATE PHOSPHATASE Tt82 FROM THERMOCOCCUS ONNURINEUS**Petra Havlickova¹, Tatyana Prudnikova^{1,3}, Jeroen R. Mesters², Michal Kutý^{1,3}, Marc L. Pusey⁴ and Ivana Kuta Smatanova^{1,3}**¹*University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Science, Branisovska 1760, 370 05 Ceske Budejovice*²*Institute of Biochemistry, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany*³*Academy of Sciences of the Czech Republic, Center for Nanobiology and Structural Biology IMB, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky*⁴*iXpressGenes Inc., 601 Genome Way, Huntsville, AL 35810, USA*

Histidinol-phosphate phosphatase (HolPase, EC 3.1.3.15) catalyzes the dephosphorylation of histidinol-phosphate to histidinol, which is the eighth step in the histidine biosynthesis pathway [1]. Histidinol-phosphate phosphatases belong to the HAD superfamily, crystal structures from the HAD superfamily share a conserved -domain classified as a hydrolase fold and usually contain an insertion subdomain [2]. Protein Tt82 from *Thermococcus onnurineus* is a 241-residues protein and according to the analysis of its primary structure it is considered to be a histidinol-phosphate phosphatase. Crystal screening was performed with screening kit Index-HR-144 (Hampton Research, USA) using the sitting drop vapor diffusion method at 295 K, applying an Oryx-6 crystallization robot (Douglas Instru-

ments Hungerford, England). Optimization of preliminary crystallization conditions yielding crystals was performed manually with the sitting drop vapor diffusion method, varying the drop ratio and protein concentration. The 3D crystals suitable for X-ray diffraction measurement were grown in approximately 3 weeks from the precipitant composed of 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 25% w/v Polyethylene glycol 3350, 0.1 M Tris pH 8.5. Native data set was collected to the resolution of 1.6 Å at the BESSY-II synchrotron operated by Joint Berlin MX-Laboratory (Berlin-Adleshof, Germany). Tt82 crystals belonged to space group P2₁2₁2₁, with unit cell parameters a = 66.59, b = 117.47, c = 33.97 Å. Although attempting to solve the crystal structure using molecular replacement method with



homologues (PDB codes 1qyi, 3pib, 3kbb, 2hdo, 3r3h, 2vvl, 3iru) as search models, all trials using MOLREP [3] and Phaser [4] resulted in failure. Therefore, heavy atom derivative crystals were grown by co-crystallization procedure with the final concentration in drop of 1 mM Manganese (II) chloride (the X-ray absorption edge is 6.5390 keV) in order to solve the crystal structure using the multiple wavelength anomalous diffraction method.

1. Brill, M. & Fani, R. (2004). *J. Mol. Evol.* 58, 225-237.
2. Kim, Y., Yakunin, A. F., Kuznetsova, E., Xu, X., Pennycooke, M., Gu, J., Cheung, F., Proudfoot, M., Arrousmith, C.

H., Joachimiak, A., Edwards, A. M., Christendat, D. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 517-526.

3. Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* 30(6): 1022-1025.
4. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* 40(4): 658-674.

The work was supported by GACR 17-24321S, GAJU 04-149/2016/P and ERDF No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000441.

L30

STRUCTURAL STUDIES OF HALOACID DEHALOGENASE Tt81 FROM *THERMOCOCCUS THIOREDUCENS*

Kristyna Rejzkova¹, Tatyana Prudnikova^{1,2}, Michal Kutý^{1,2}, Radka Chaloupkova³, Jiri Damborsky³, Ivana Kuta Smatanova^{1,2}

¹University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Science, Branisovska 1760, 370 05 Ceske Budejovice

²Academy of Science of the Czech Republic, Center for Nanobiology and Structural Biology IMB, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

³Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and Research Centre for Toxic Compounds in the Environment RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5/A13, 625 00 Brno, Czech Republic

Industrial production and the chemical industry are responsible for the growing number of foreign substances (xenobiotics) in the biosphere. Although the metabolic versatility of microbial communities is enormous, it is not always that xenobiotics degrade. Substitution of halogens can lead to an increase in the toxicity of halogenated organic compounds, which represent a significant proportion of industrially used solvents, herbicides and pesticides. These substances have become the target of a number of bioremediation research projects aimed at removing xenobiotics from infested areas, for example by the action of living organisms. Dehalogenases, microbial enzymes capable of cleaving a carbon-halogen bond, have been

shown to be useful. Dehalogenases include several groups of enzymes such as haloacid dehalogenases. Haloacid dehalogenase Tt81 was isolated from an extremely thermophilic and anaerobic bacteria *Thermococcus thio-reducens*, that lives in hydrothermal springs, areas deep underground and oil wells. The purified protein Tt81 was used for crystallization experiments. Sitting drop vapour diffusion and microbatch under oil were used as crystallization methods. The obtained crystals were subjected to X-ray diffraction and diffraction data will be used for further research focused on structure determination.

The work was supported from GACR 17-24321S.