

Session IV, Wednesday, June 12

L11

Principle of dominant adhesive mode explains why porous materials improve crystallization of biological macromolecules**PRINCIP DOMINANTNÍHO ADHEZNÍHO MÓDU VYSVĚTLUJE PROČ PÓRÉZNÍ MATERIÁLY ZLEPŠUJÍ KRYSTALIZACI BIOLOGICKÝCH MAKROMOLEKUL**

J. Hašek

*Biotechnologický ústav AV ČR, Průmyslová 595, 252 50 Vestec,
hasekjh@seznam.cz*

Od dob, kdy byla krystalizace proteinů popsána již před 180 lety v knize F. L. Hünefelda [1], bylo publikováno obrovské množství prací z nichž některé zdánlivě připomínají “mysliveckou latinu”. Paralelně s pracemi zdůrazňujícími nutnost vysoké čistoty všech složek krystalizačního roztoku existuje mnoho prací prokazatelně vykazujících pozitivní vliv “nečistot” uvnitř krystalizační kapky. Například pozitivní vliv přítomnosti fousu černého kocoura, žině koně Huculského, kousků vhodných zeolitů [2], kousku nanopórézního skla (bioglass 45S5) na bázi hydroxyapatitu [3], uhlíkových nanotrubiček [4], kousku polymeru do kterého byly provedené otisky tvaru molekul cílového proteinu (molekulárně imprintované polymery) [5], folie s uměle zvrásněným povrchem (zvlnění povrchu vyvolané ostrým zářezem v plasmově modifikovaném elastomeru PDMS) [6], kousku slídy s chemicky modifikovaným povrchem [7], atd.

Je zřejmé, že společným rysem všech hetero-materiálů s pozitivním účinkem na krystalizaci proteinů je jejich povrchová členitost. Problém je, že experimentální pozorování jsou v těchto pracích doprovázena pokaždé jiným teoretickým zdůvodněním (např. vyšší koncentrací molekul proteinu v dutinách [7], vysoký el.potenciál na ostrých výběžcích “fraktálního povrchu” hetero-materiálu [6], atd.), což znemožňuje optimalizaci těchto materiálů. Ani nejnovější studie držící se klasického konceptu krystalizace [8] nedávají jednoznačné vysvětlení proč proteiny krystalují na hetero-materiálech lépe.

Náš princip dominantního adhezního módu respektuje fakt, že velký povrch molekul proteinu nabízí obvykle několik adhezních ploch, které umožňují několik možných způsobů shlukování molekul proteinu do klastrů. To odpovídá často pozorovanému polymorfizmu při krystalizaci proteinů. Pravidelnost (a tedy i stabilita) nově formovaných krystalizačních zárodků proto silně závisí na tom, zdali se nám podaří správným nastavením krystalizačních podmínek zamezit nejednoznačnému skládání molekul proteinu do vznikající pevné fáze.

Pokud jde o pozitivní vliv pórézních heterogenních materiálů na krystalizaci, považujeme za podstatné to, že póry s vhodnými vlastnostmi předem orientují molekuly proteinu tak, aby se molekuly skládaly do vznikajících klastrů jednoznačným způsobem. Klastry proteinů vznikající ve volném roztoku jsou méně pravidelné, méně stabilní, jsou více vystavené okolním turbulencím a mají proto pouze krátkou dobu života. Naopak v chráněném

prostředí hetero-materiálu jsou tyto klustry pravidelnější a vyvíjejí se ve stabilní krystalová jádra. To nám dává možnost přípravy difrakčně kvalitnějších krystalů na povrchu heteromateriálu a možnost volit vhodnou polymorfnní formu správným výběrem hetero-materiálu. Proto je použití pórézních materiálů důležité (kromě zvýšení přesnosti difrakčních metod) též pro identifikaci, které mezimolekulární interakce jsou významné pro biologickou aktivitu a které jsou z biologického hlediska méně důležité.

Naše dynamická teorie krystalizace tedy popisuje proces krystalizace proteinů jako výsledek soutěže mezi možnými adhezními módy mezi všemi molekulami účastnicími se krystalizace. Princip dominantního adhezního módu, říkající že kvalitní krystalickou fází dostaneme pouze pokud se nám podaří zajistit dominanci jediného adhezního módu mezi molekulami proteinu vhodným nastavením krystalizačních podmínek [9,10], nám tedy dává možnost racionálně ovládat krystalizační proces. V článku [11] popisujeme jak lze adhezi mezi molekulami proteinu ovládat složením krystalizačního roztoku. Zde ukážeme, že princip dominantního adhezního módu vysvětluje nekonfliktně (a na jednom společném základu) iniciaci krystalizace proteinů pomocí vhodných heterogenních objektů. Ukážeme, že náš přístup vysvětluje všechna dostupná experimentální pozorování ve všech šesti rozsáhlých a dobře fundovaných studiích uvedených v úvodu.

Doufáme, že znalost funkce porézních materiálů při krystalizaci umožní optimalizaci současných metod krystalizace proteinů založených na metodě zkoušek a chyb systematickým skanováním tisíců krystalizačních podmínek. Cílem je nejen zvýšení účinnosti, spolehlivosti a přesnosti výsledků strukturní analýzy, ale též menší spotřeba cílového proteinu a úspora práce. To by bylo též z ekonomického hlediska přínosem vzhledem k tomu, že cena přípravy cílového proteinu často řádově převyšuje cenu zlata.

1. Hašek, J. (2006). *Zeitschrift fur Kristallogr.* 23, 613-619.
2. Hašek, J. (2011). *J. Synchrotron Radiation*, 18, 50-52.
3. Hašek, J. (2017). *Materials Structure*, 24, 42-43.
4. Hünefeld F.L. (1840). *Chemical Properties in the Animal Organization*, pp. 160-161, Brockhaus, Leipzig.
5. McPherson, A. Shlichta, P. (1988). *Science* 239, 385-387.



6. Chayen N.E., Saridakis E., Sear R.P. (2006). *PNAS*, **103**, 597-601.
 7. Asanithi, P. et al. (2009). *ACS Appl.Mater.Interfaces* **1**, 1203-1210.
 8. Saridakis E., et al. (2011). *PNAS* **108**, 11081-11086.
 9. Ghatak A.S., Rawal G., Ghatak A. (2017). *Crystals* **7** 245-255.
 10. Nanev, C.N. et al. (2017). *Scientific Reports*, **7**, 35821-35828.
 11. Nanev, C.N. (2018). *Crystals*, **8**, 422-438.
- Podporováno projekty BIOCEV (ERDF CZ.1.05/1.1.00/02.0109), CSF 18-10687S, RVO 86652036 a GAČR (18-10687S).*

L12

DIFFERENCES IN CRYSTALLIZATION OF VARIOUS HALOALKANE DEHALOGENASES

I. Kutá Smatanová

University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Science, Branisovska 1760, 370 05 Ceske Budejovice and Academy of Sciences of the Czech Republic, Center for Nanobiology and Structural Biology IMB, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

Knowledge of the structure of proteins is a key in identifying and describing the detailed mechanism of biological processes, the development of therapeutics, the degradation of pollutants from the environment, etc. One of the methods used to determine the structure of proteins on atomic resolution is X-ray crystallography. For many years, our laboratory has been researching structures of different types and mutant variants of haloalkane dehalogenases (HLDs). HLDs are microbial enzymes exhibiting catalytic activity for the hydrolytic conversion of xenobiotics and toxic halogenated aliphatic compounds to the

corresponding alcohols. To date, several tertiary structures of these enzymes have been solving by X-ray diffraction analysis. Although we have several types of newly cloned enzymes and their mutants, crystallize and structurally characterize these enzymes is not trivial. In the lecture will be discussed the complications in the preparation of crystals, the enzyme structures will be described and the reaction mechanism of the dehalogenation reaction will be outlined.

This research is supporting by the GAČR (17-24321S).

L13

DIRECTIONALITY OF DIPOLES OF COFACTORS IN CONTEXT OF CRYSTAL STRUCTURE

J. Brynda, J. Myšková and J. Lazar

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo náměstí 542/2, 166 10 Praha 6, Česká Republika
brynda@uochb.cas.cz*

The popularity of fluorescent proteins comes from their endogenous cofactor [1], which is formed spontaneously when the backbone of three amino acid residues (Ser-Tyr-Gly in the green fluorescent protein) cyclizes and dehydrates [2, 3]. The following oxidation step extends the aromatic system of the nascent chromophore, which, upon illumination, exhibits intense fluorescence. The chromophore interacts strongly with neighboring residues within the 11-stranded β -barrel. Perturbation of the immediate environment through mutagenesis of key residues results in protein variants with altered spectroscopic and chemical properties [4]. Crystals of fluorescent proteins provide a suitable system for determining directional optical proper-

ties of the corresponding fluorophores. However, knowledge of the orientation of fluorescent protein molecules within the crystal is a crucial prerequisite.

1. Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., and Ward, W. W. (1993) *Biochemistry* **32**, 1212-1218.
2. Reid, B. G., and Flynn, G. C. (1997) *Biochemistry* **36**, 6786-6791.
3. Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bodi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I., and Sakakibara, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13549-13554.
4. Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544.

L14

SOFTWARE DEVELOPMENT FOR MACROMOLECULAR CRYSTALLOGRAPHY**P. Kolenko^{1,2}, M. Malý^{1,2}, J. Stránský², J. Dohnálek²**¹ FNSPE, Czech Technical University in Prague, Břehová 7, Prague 2, CR² Institute of Biotechnology CAS, v.v.i., Průmyslová 595, Vestec near Prague, CR
petr.kolenko@jffi.cvut.cz

Improvement of computational procedures depends on the quality of documentation of the software already used and on many other software functionalities such as availability of the output files. Furthermore, the new software should be created in a form that enables easy implementation and automation in other software packages, such as CCP4 [1] or PHENIX [2].

A new script baSHELiXir was developed to enable easy automation of experimental phasing [3]. The script utilizes SHELXC/D/E calculations in a fully automated procedure to analyze phasing information of a diffraction data. The script provides testing of various space groups and of optimal solvent content. The script is designed to have minimal software dependencies – the SHELX pack-

age, GNUplot and bash. baSHELiXir is mainly useful for on-site data analysis during synchrotron data collection.

1. M. D. Winn *et al.*, *Acta Cryst. D*, **67**, (2011), 235-242.
2. P. D. Adams *et al.*, *Acta Cryst. D*, **66**, (2010), 213-221.
3. available online:
<http://kmlinux.fjfi.cvut.cz/~kolenpe1/baSHELiXir/>
4. I. Uson & G. M. Sheldrick, *Acta Cryst. D*, **74**, 106-116.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Technical University in Prague, grant No. SGS19/189/OHK4/3T/14, by the MEYS CR (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16-019/0000778) and by the project CIISB4HEALTH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001776), BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the ERDF.

L15

SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING OF BIOLOGICAL SAMPLES WITH LABORATORY EQUIPMENT IN BIOCEV**J. Stránský, J. Dohnálek***Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Průmyslová 595, Vestec*
jan.stransky@ibt.cas.cz

Small angle X-ray scattering (SAXS) serves as one of the complementary methods of structural biology. SAXS allows both characterization and low resolution structural studies of macromolecules, with advantage of liquid samples. Low scattering power of the biological molecules makes experiments using laboratory equipment very time consuming, therefore, many users opt for using dedicated SAXS beamlines at synchrotrons. However, advent of high flux X-ray sources as MetalJet (Excillum) and hybrid photon counting detectors as Eiger (Dectris) made rapid analysis more accessible in laboratory.

Centre of Molecular Structure is equipped with SAXSPoint 2.0 (Anton Paar) instrument with MetalJet C2+ X-ray source and Eiger 2M detector. Samples can be

loaded to variety of the capillaries using an autosampler. The set of temperature controlled sample stages include low noise cell and capillary capable of on-line UV/Vis absorption spectrometry. The instrument can be routinely used for sample characterization, measurement of particle shape, oligomerization state, crystal structure validation and more.

The Centre of Molecular Structure is supported by: MEYS CR (LM2015043 CIISB); project Czech Infrastructure for Integrative Structural Biology for Human Health (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001776) from the ERDF; project Structural dynamics of biomolecular systems (CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000447) from the ERDF.



CL3

RHEOLOGY AND SAXS IN ONE GO WITH A LABORATORY SAXS SYSTEM - METHOD AND APPLICATIONS

P. M. Worsch, Franz Pirolt, Heiner Santner and H.M.A. Ehmman

Anton Paar GmbH, Anton-Paar-Straße 20, 8054 Graz, Austria
 peter.worsch@anton-paar.com

Material research in all its complexity continuously calls for new analysis solutions to solve sophisticated issues in one go. It often requires the visualization of structural information in the nano scale to complement simultaneous investigations of the rheological behavior. The RheoSAXS system from Anton Paar is the first commercially available instrument that allows using both methods simultaneously in one setup in the lab. RheoSAXS resolves the combined information of your sample within minutes.

In this contribution we present a novel experimental set-up for performing combined Rheo-SAXS studies with the SAXSpoint 2.0 laboratory SAXS system. The integrated Rheo-SAXS sample stage enables temperature-controlled rheological experiments with *in-situ* determination of shear-induced structural changes of nanostructured materials on a nanoscopic length scale (from approx. 1 nm to 200 nm) by small-angle X-ray scattering.

The Rheo-SAXS unit includes a rheological sample compartment which is integrated in the evacuated SAXS measurement chamber. The rheometer measuring head comprises a high-precision air-bearing motor which holds and controls the rheological scattering measuring system in the SAXS instrument chamber.

We present different combined rheology-SAXS studies of colloidal systems for investigating shear-induced struc-

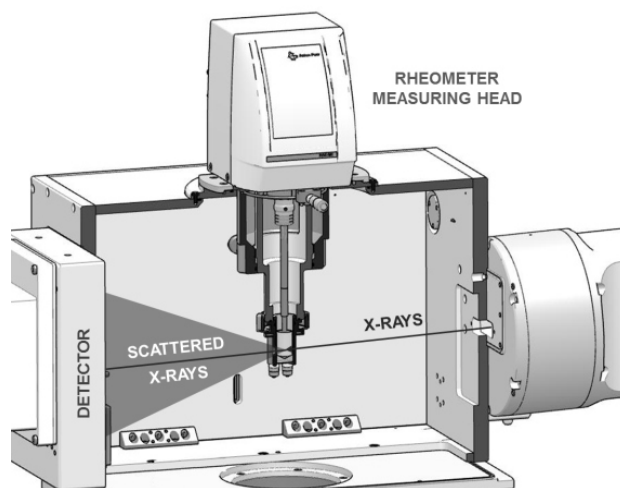


Figure 1. Rheo-SAXS set-up

tural changes at the nanometer level which were performed with this novel and optimized Rheo-SAXS laboratory set-up.

