

# Krystalografický screening fragmentů: Lokalizace vazebných míst a predikce substrátové specifity proteinu neznámé funkce

Leona Švecová<sup>1,2</sup>, Lars Henrik Oestergaard<sup>3</sup>, Tereza Skálová<sup>2</sup>, Petr Kolenko<sup>1,2</sup>, Martin Malý<sup>1,2</sup>, Jan Dohnálek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze, Břehová 7, 115 19, Praha 1

<sup>2</sup>Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i., Průmyslová 595, 252 50 Vestec

<sup>3</sup>Novozymes A/S, Biologiens Vej 2, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark  
leona.svecova@fjfi.cvut.cz

## Abstrakt

Krystalografický screening vazby fragmentů k cílové biologické makromolekule je účinná metoda především k identifikaci strukturních prvků využitelných pro design nových léčiv. Tato metoda byla aplikována ke zmapování míst pro vazbu fragmentů a k nastínění chemické stavby potenciálního substrátu proteinu s neznámou katalytickou funkcí. Analýza získaných komplexů odhalila několik vazebných míst vzájemných preferenčně aromatických strukturních motivů. Rozmístění a četnost aromatických kruhů poukazuje na polyaromatický charakter potenciálního substrátu.

**Klíčová slova:** Krystalografický screening fragmentů; makromolekulární krystalografie.

## Úvod

Existuje několik přístupů, jak identifikovat látky vážící se ke studované cílové makromolekule. Jsou to například výpočetně náročné *in silico* metody (virtuální screening), *in vitro* testování biologické aktivity zvoleného cíle vůči velkému množství chemických látek (high-throughput activity screening, HTS) nebo krystalografický screening fragmentů (Crystallographic fragment screening, CFS). V běžné praxi se tyto metody často kombinují.

CFS je efektivní metoda založená na screeningu knihoven fragmentů, následné identifikaci chemických skupin interagujících s cílovou molekulou a jejich kombinací do předložené struktury pro nový inhibitor (léčivo). Jako fragmenty jsou označovány nízkomolekulární organické látky splňující „pravidlo tří“: molekulární hmotnost < 300 Da, rozdělovací koeficient  $\text{clogP} \leq 3$ , počet donorů vodíkových vazeb  $\leq 3$  a počet akceptorů vodíkových vazeb  $\leq 3$  [1].

Krystalová struktura komplexu proteinu s navázaným fragmentem umožňuje trojrozměrný pohled na způsob vazby fragmentu, přímou lokalizaci vazebných míst biologického cíle a odhalení jeho možné dynamiky, kterou nelze snadno získat jinými experimentálními přístupy. Kromě vývoje nových inhibitorů má metoda potenciál také při charakterizaci substrátu proteinu s neznámou katalytickou funkcí a odhalení principu jeho enzymatické reakce [2].

Metodika CFS byla testována na modelovém proteinu neznámé funkce (CtFDO) z rodiny glukóza-methanol-cholin oxidoreduktáz, u kterého HTS screening vůči více než 1000 různým látkám o hmotnosti 100-1500 Da vyloučil všechny testované látky včetně substrátů typických pro známé příbuzné enzymy.

## Experiment

Krystaly CtFDO pro CFS byly připraveny podle protokolu uvedeného v [3]. Pro přípravu komplexů bylo použito celkem 42 fragmentů (Tab. 1) z Frag Xtal Screen (Jena Bioscience GmbH,

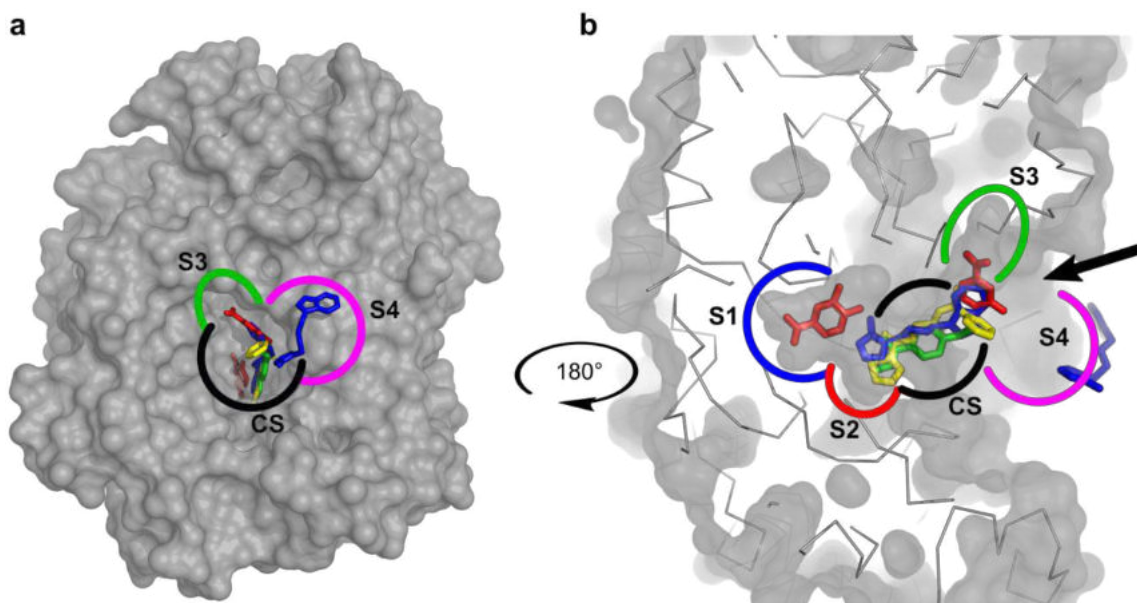
www.jenabioscience.com). Krystaly byly máčeny v roztocích s vybranými fragmenty (50 nmol fragmentu v 0.5  $\mu$ l srážecího roztoku) po dobu 2,5 h až 70 h při teplotě 20 °C.

Krystaly komplexů byly kryoprotekovány pomocí perfluoropolyetherového oleje (Hampton Research) a zmrazeny a uchovány v tekutém dusíku. Difrakční data byla sbírána buď na svazku záření P13 synchrotronového zdroje Petra III (DESY, Hamburk, Německo) s detektorem Pilatus 2M, nebo na svazcích BL 14.1 a BL 14.2 zdroje Bessy II (Helmholz Zentrum, Berlín, Německo) s detektorem Pilatus 6M. Data byla zaznamenána při teplotě krystalu 100 K. Naměřená data byla zpracována programem XDSgui [4]. Řešení, upřesňování a analýza struktur byla provedena pomocí nástrojů programového balíčku CCP4 [5] a Phenix [6].

## Výsledky a diskuze

Celkem bylo pro difrakční experiment připraveno 132 vzorků krystalů máčených ve srážecím roztoku s jedním ze 42 fragmentů (Tab. 1). Na 70 vzorcích byla nasbírána difrakční data s rozlišením mezi 1.26 Å a 3.5 Å. Ztráta difrakce u zbylých 63 vzorků naznačuje pravděpodobně mechanické poškození krystalu v důsledku nevhodné manipulace s krystalem při kryoprotekování a vitrifikaci a vlivem osmotického tlaku při máčení v roztocích s fragmenty.

Struktury vyřešené na základě naměřených difrakčních dat byly dále analyzovány. Mapy elektronové hustoty ( $mF_o-DF_c$ ) potvrdily vazbu fragmentu pouze ve 12 strukturách. Výsledkem jsou čtyři unikátní struktury komplexů s navázanými fragmenty 24, 32, 35 a 82 (Tab. 1). Strukturální analýza komplexů odhalila čtyři vazebná místa uvnitř rozsáhlé kapsy proteinu a jedno místo na vstupu do kapsy (Obr. 1). Přestože mezi testovanými fragmenty byly zastoupeny jak aromatické tak alifatické látky, vazba byla pozorována pouze pro látky aromatické. Rozložení aromatických strukturálních motivů naznačuje, že hledaným substrátem bude pravděpodobně polyaromatická sloučenina o vyšší molekulové hmotnosti než 290 Da (přibližná molekulová hmotnost pro největší navázaný fragment).



Obrázek 1: Přeložení struktur komplexů *CtFDO* s fragmenty 24 (žlutě), 32 (zeleně), 35 (modře) a 82 (červeně). *CtFDO* je zobrazený v povrchové reprezentaci a fragmenty v tyčinkové reprezentaci. Vazebná místa jsou barevně označena a popsána jako CS a S1-S4. (a) Pohled shora dovnitř kapsy v *CtFDO* s navázanými fragmenty. (b) Průřez *CtFDO* s bočním pohledem na vnitřní kapsu. Šipka naznačuje vstup do kapsy. Obrázky byly vytvořeny pomocí softwaru PyMOL (Schrödinger, LLC).

Tabulka 1: Seznam fragmentů použitých pro přípravu komplexů uvedený s pořadím fragmentu ve Frag Xtal Screen (Jena Bioscience), chemickým vzorcem, dobou máčení krystalu v roztoku s daným fragmentem a zda se fragment vázal (A) či nevázal (N) ve struktuře C1FDO. Pomlčka značí mechanické poškození krystalu.

Pořadí fragmentu	Chemický vzorec fragmentu	Doba máčení [h]	Fragment detekován A/N	Pořadí fragmentu	Chemický vzorec fragmentu	Doba máčení [h]	Fragment detekován A/N
3		70	N	49		21	N
6		3,5–24	N	52		21	N
7		3	N	57		21	N
9		20	N	59		21	–
10		17	N	62		21	N
12		4–70	–	65		4–24	N
16		2,5–70	N	67		4–24	N
18		70	N	69		21	N
24		3–17	A	70		4–24	N
28		3–21	N	72		4–24	N
29		70	N	74		17	N
32		2,5–22	A	77		4–24	N
35		70	A	78		20	N
36		3–22	–	80		17	N
38		2,5–24	–	81		21	–
39		21	N	82		17–20	A
41		2,5–24	–	88		21	–
42		3–21	N	90		17	N
43		2,5–24	–	91		3,5–24	N
47		21	–	92		17	N
48		17	N	94		20	N

## Závěr

CtFDO z rodiny glukóza-methanol-cholin oxidoreduktáz je protein, u kterého doposud nebyla definována substrátová specifita, a proto byl vhodným kandidátem pro ilustraci metodiky krystalografického screeningu fragmentů. Celkem bylo otestováno 42 fragmentů aromatického i alifatického typu obsahujících různé chemické skupiny. 17 % ze 70 struktur vyřešených na základě nasbíraných difrakčních dat jsou komplexy CtFDO vážící jeden ze čtyř fragmentů: 24, 32, 35 a 82. Přítomnost ostatních testovaných fragmentů nebyla prokázána. Každý ze čtyř navázaných fragmentů obsahuje aromatický strukturní prvek, což poukazuje na aromatický charakter potenciálního substrátu. Strukturní analýza komplexů odhalila pět vazebných míst ve vnitřní kapse proteinu a na jejím ústí.

## Reference

- [1] Z. Chilingaryan, Z. Yin, A. J. Oakley. Fragment-Based Screening by Protein Crystallography: Successes and Pitfalls. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 12857–12879, 2012.
- [2] D. Patel, J. D. Bauman, E. Arnold. Advantages of Crystallographic Fragment Screening: Functional and Mechanistic Insights from a Powerful Platform for Efficient Drug Discovery. *Prog Biophys Mol Biol.* **116**(0):92–100, 2014.
- [3] L. Švecová, *et al.* So, what does the enzyme do? Structural data-based identification of substrate specificity [přednáška]. Quedlinburg, Německo: Konference 21<sup>st</sup> Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting. 20. 9. 2018.
- [4] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**: 125–132, 2010.
- [5] Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**:760–763, 1994.
- [6] D. Liebschner, P. V. Afonine, *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons, and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **75**: 861–877, 2019.

### Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Studentské grantové soutěže ČVUT č. SGS13/219/OHK4/3T/14 a SGS19/189/OHK4/3T/14, grantem Grantové agentury České republiky (č. 14-36566G), Institucionální podporou Biotechnologického ústavu Akademie věd České republiky (RVO: 86652036), Evropským fondem pro regionální rozvoj (CZ.1.05/1.1.00/02.0109 a CZ.02/1.01/0.0/0.0/15\_003/0000447) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (LM2015043 a LM2018127).