

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**  
**Název katedry**

**Charles University in Prague, Faculty of Science**  
**Name of department**

Doktorský studijní program:  
Ph.D. study program:

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



**Jiří Zahradník, M.Sc.**

Cílené modifikace interakcí mezi proteiny: Ternární komplex interferonu- $\gamma$  jako model

Targeted modifications of the protein-protein interactions: Ternary complex of interferon- $\gamma$  as a model system

Supervisor: doc. Ing. Bohdan Schneider, CSc.  
Institute of Biotechnology CAS, v.v.i.

Prague, 2018

## Abstrakt (In Czech)

Klíčovým požadavkem pro detailní porozumění biologických procesů, až na molekulární úroveň, je znalost struktury interagujících molekul a jejich komplexů. Jako modelový systém, pro naši studii, jsme si zvolili IFN- $\gamma$ . Ačkoliv je tato molekula jedním ze zásadních modulátorů imunitní odpovědi, a je studována již více než 60 let, tak struktura přídatného receptoru (IFN- $\gamma$ R2) a porozumění celému komplexu je nedostačující. V této práci jsme se nejprve zabývali binárním systémem IFN- $\gamma$  s jeho receptorem, který vykazuje vysokou afinitu k IFN- $\gamma$  a prostorová struktura obou dvou molekul je známa. Zaměřili jsme se tedy na modulaci afinity mezi IFN- $\gamma$  a tímto receptorem. Náš přístup spočíval v inovativní metodě založené na modulaci stability protein-proteinových interakcí pomocí mutagenizace aminokyselinových zbytků umístěných uvnitř struktury proteinu. Podařilo se nám zvýšit afinitu testované interakce sedmkrát. Druhá část projektu byla zaměřena na krystalizaci, vyřešení a popis struktury druhého – přídatného receptoru pro IFN- $\gamma$ . Naše analýza variabilních aminokyselinových zbytků na povrchu tohoto proteinu a strukturně příbuzných receptorů z rodiny typu II odhalila možné vazebné místo pro IFN- $\gamma$ . Ve třetí části naší práce jsme se zaměřili na krystalizaci IFN- $\gamma$  z platýze druhu *Paralichthys olivaceus* a tuto strukturu jsme vyřešili s rozlišením 2.3 Å (identifikační číslo proteinové databáze PDB: 6f1e). Získaná struktura se liší od ostatních známých struktur IFN- $\gamma$  a indikuje divergenci rybích proteinů, i když celkové uspořádání a topologie molekuly (z angl.: fold) jsou stejné. Biofyzikální a bioinformatické pokusy navržené na základě této struktury nám umožnili vyřešit aspekty koevoluce mezi IFN- $\gamma$  a jeho receptorem 1. Všechny získané poznatky, doplněné o data z mutagenizačních experimentů, SAXS techniky a analýz krystalových struktur, nám na závěr práce umožnili postulovat topologii ternárního komplexu IFN- $\gamma$ .

## Abstract

A key prerequisite for a deeper understanding of biological processes at molecular level is a detailed description of the three-dimensional structure of interaction partners and their complexes. We adopted the IFN- $\gamma$  complex as our model system. Even though IFN- $\gamma$  is one of the key modulators of the immunity response, which has been studied intensively for more than 60 years, the structure of the accessory receptor chain and the understanding of the IFN- $\gamma$  complex is still lacking. In this work we firstly discussed the binary system between IFN- $\gamma$  and its high affinity receptor R1 which is structurally known. Using a new innovative methodology we focused on the modulation of the affinity between IFN- $\gamma$  and its receptor R1. Our approach was based on the modulation of protein – protein stability by mutating cavities in the proteins' structure and increasing the affinity about seven-fold. Secondly, we crystallized and solved the structure of the IFN- $\gamma$  receptor 2, the accessory receptor molecule. Our analysis of variable residues on the surface of the structures of type II family receptors, to which receptor 2 belongs, revealed the putative binding site for IFN- $\gamma$ . In the third part of our work, we crystallized IFN- $\gamma$  from olive flounder *Paralichthys olivaceus* and solved its structure at 2.3 Å resolution (PDB code 6f1e). This structure differs from the other IFN- $\gamma$  structures and indicates how the fish IFN- $\gamma$  diverged while preserving the overall fold. We resolved a co-evolutionary aspect between IFN- $\gamma$  and its high affinity receptor by using bioinformatics and biophysical experiments. Finally, we integrated our results obtained by different techniques and postulated the topology of the IFN- $\gamma$  ternary complex based on our structure of IFN- $\gamma$ R2, SAXS data, and mutational scanning.

## Obsah (In Czech, bold) / List of Contents

1. Introduction .....	1
1.1. Cytokines .....	1
1.2. Interferons .....	1
1.3. Cytokine receptors .....	4
2. Aims of the study.....	5
3. Methods.....	6
4. Results and discussion.....	6
4.1. IFN- $\gamma$ R1 cavities.....	6
4.2. Structural biology analysis of IFN- $\gamma$ R2.....	7
4.3. Interferons type II and their receptors in fish species.....	7
4.4. The topology of the ternary complex.....	8
5. Conclusions.....	9
<b>A. Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>A.1. Cytokiny.....</b>	<b>10</b>
<b>A.2. Interferony.....</b>	<b>10</b>
<b>A.3. Cytokinové receptory.....</b>	<b>13</b>
<b>B. Cíle práce.....</b>	<b>14</b>
<b>C. Metody.....</b>	<b>15</b>
<b>D. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>15</b>
<b>D.1. IFN-<math>\gamma</math>R1 „kavity“ .....</b>	<b>15</b>
<b>D.2. Analýza struktury IFN-<math>\gamma</math>R2.....</b>	<b>16</b>
<b>D.3. Interferony typu II a jejich receptory v rybách.....</b>	<b>16</b>
<b>D.4. Topologie ternárního komplexu.....</b>	<b>17</b>
<b>E. Závěry.....</b>	<b>18</b>
<b>Použitá literatura / References.....</b>	<b>19</b>
<i>Curriculum vitae.....</i>	<i>21</i>
<b>Seznam publikací / Selected publications .....</b>	<b>22</b>

# 1. Introduction

Structural biology is an exciting interdisciplinary field of life sciences branching molecular biology, biochemistry, biophysics and bioinformatics. It focuses on detailed description of three-dimensional structures of biological macromolecules – a key component of all known live forms. Proteins and their interactions are dominant carriers of functions in the living cell. The cell is an open system which needs information input from the environment to take necessary actions. The processing of information input is mediated by receptor proteins and subsequent signalization cascades.

The present study focuses on the structural aspects of one of these communication cascades involved in the human immune system – the interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) system. Although more than four thousand scientific papers are published every year with the key word “interferon gamma”, the structural aspects of its signaling ternary complex were not completely resolved. The complexity, novelty and potential applications motivated us to analyze this difficult target.

This summary of the Ph.D. Thesis will introduce the reader to the background of the IFN- $\gamma$  signaling, then states the aims of the study and briefly presents the results of my work on this project. These results have been published in three reviewed publications and are discussed in my dissertation thesis.

## 1.1 Cytokines

The word cytokine comes from Greek words - cyto and kytos which mean cell and movement, respectively. Therefore, cytokines represent a category of small secreted proteins that mediates signaling and immunomodulatory effects between cells. Cytokines regulate a broad spectrum of cell processes. Indispensable components of the cytokine signaling are the cognate receptors on the cell surface [1].

## 1.2. Interferons

Interferons are small secreted proteins that were described more than 60 years ago by two phenomenal British researchers Alick Isaacs and Jean Lindenmann [2]. They described interferon molecule by its ability to interfere with the viral infection. Currently, three independent groups of interferons are known. The type I, II and III of interferons differ by their sequences, cognate receptors, genome localization and cellular traits.

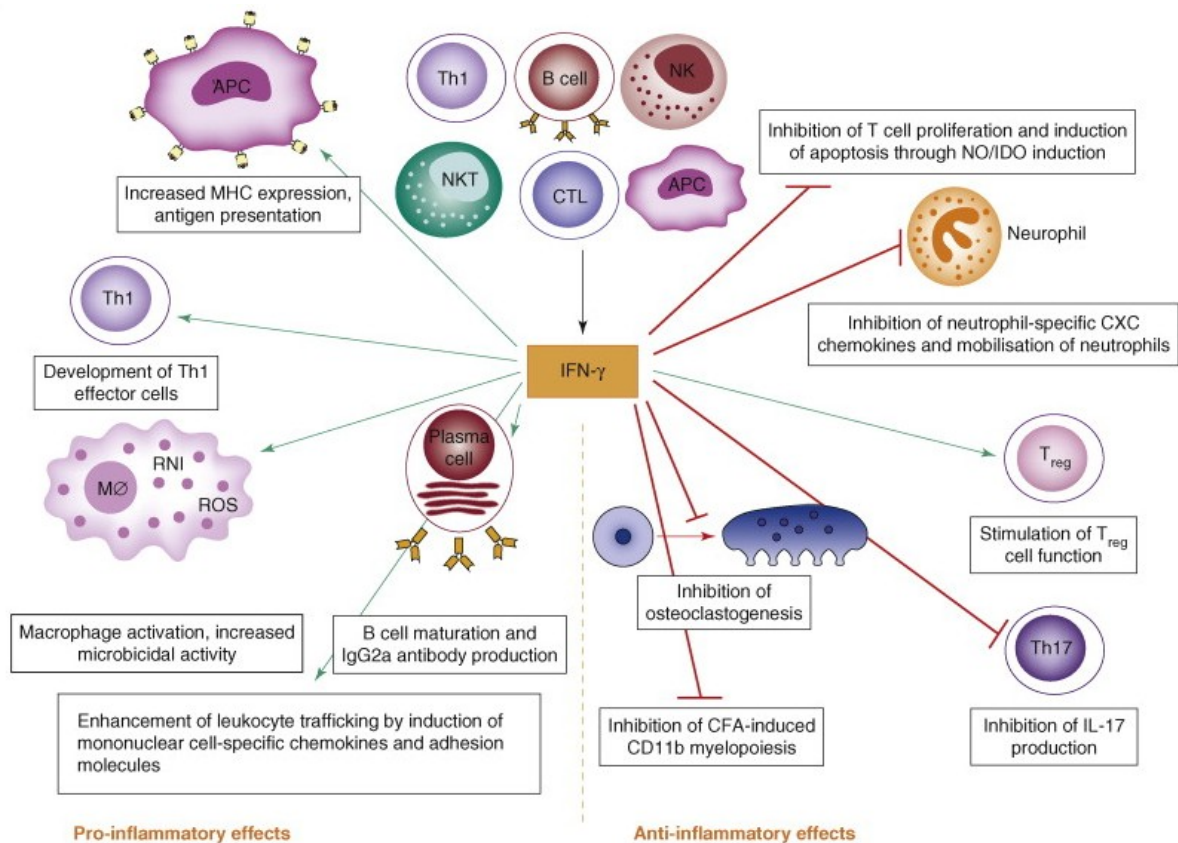
The role of interferons in organisms is very broad with functionality in anti-viral, anti-bacterial, anti-tumor responses and modulating the immune system [3,4,5]. The interferon signaling is mediated by two cell surface receptors that subsequently switch intracellular signaling cascades. The receptor pairs are composed of high affinity receptors and the accessory factors. The high affinity receptors mediate the interferon capture and the second receptors with usually lower affinity are required for signaling and therefore are known as accessory factors. Following the ternary complex formation, the signal is transmitted into the cell cytoplasm and a signaling cascade via the Janus Kinase (JAK) and Signal Transducer and

Activator of Transcription (STAT) pathway occurs. A combination of different JAKs and STATs results in the regulation of transcription of various interferon-regulated genes [6].

The **type I interferon family** is the biggest one in humans with five structurally dissimilar members and 17 proteins overall. Members of this family signal through only one ternary receptor complex composed of IFN $\alpha$  receptor 1 (IFN- $\alpha$ R1) and receptor 2 (IFN- $\alpha$ R2) subunits. Interestingly, their responses showed large differences and subsequent JAK/STAT pathways differ significantly [7]. These differences are probably caused by differential expression, binding affinities [8], and JAK/STAT involved [9,10].

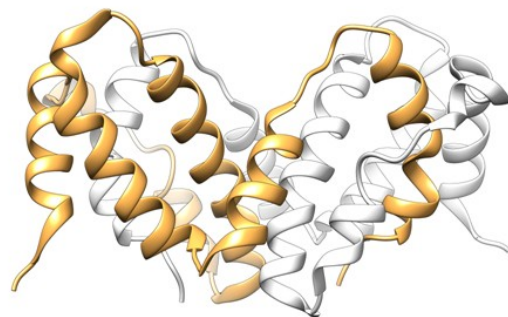
The **interferon type II family** is the subject of this work and is unique in its biological and structural aspects. In the first place, the canonical members of the family are dimers in contrast to monomers in type I and type III families. Single, exclusive representative of the family in all tetrapods is IFN- $\gamma$ . This interferon is accompanied by so called interferon gamma related protein (IFN- $\gamma$ rel) in fish species. The type II interferons signal through the receptor complex composed of IFN- $\gamma$  receptors 1 (IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ R1-like) and IFN- $\gamma$  receptor 2 (IFN- $\gamma$ R2). The precise composition of the receptor complex for IFN- $\gamma$ rel is under investigation. Interestingly, the dimeric behavior of IFN- $\gamma$  implies more complex stoichiometries for the formation of a ternary complex (IFN- $\gamma$ / IFN- $\gamma$ R1/ IFN- $\gamma$ R2) than for the other interferons. It is expected that the IFN- $\gamma$  binds to two IFN- $\gamma$ R1 and two IFN- $\gamma$ R2 molecules [11], but other possibilities are not excluded. The binding of IFN- $\gamma$  and the formation of the signaling complex results in reorientation of the receptor intracellular domains and initiates thereby the JAK/STAT pathway resulting in STAT1 specific phosphorylation and dimerization. The STAT1 dimers act as transcription factor and directly induce changes in the expression of hundreds of primary regulated genes by the interaction with the so-called GAS site (gamma activator sequence) [12]. This pathway is known as the canonical or classical IFN- $\gamma$  signaling pathway. Another, so called non-canonical IFN- $\gamma$  signaling pathway is known and involves endocytosis mediated by nuclear localization signal (NLS) and polycationic C-terminus present in the IFN- $\gamma$  molecule [13].

The IFN- $\gamma$  protein is produced by immune system cells [14,15] and almost all cell types can respond when exposed to it [16]. The functions of IFN- $\gamma$  are pleiotropic in modulating the innate and adaptive immune response (**Figure 1**). The tightly balanced signaling of IFN- $\gamma$  is very sensitive to any changes. Therefore, it is not surprising that altered IFN- $\gamma$  expression is associated with auto-inflammatory or autoimmune diseases [17].



**Figure 1** – The overview of the most general functions of interferon gamma. The left part of the picture highlights the pro-inflammatory functions and the right shows the anti-inflammatory effects. Green arrow lines correspond to stimulatory effects whereas the red lines depict inhibitory effects. (Original picture was published by Kelchterman et al. [19]).

Three-dimensional structures of the IFN- $\gamma$  protein have been solved by X-ray diffraction. There are several IFN- $\gamma$  structures solved from four different organisms: human, rabbit, bovine, and fish *Paralichthys olivaceus* 6f1e [18]. The structures show unique interferon gamma fold, which is composed of two identical subunits, each with 6 alpha helices (A – F) approximately parallel to the dimer twofold axis (**Figure 2**).



**Figure 2** – Three-dimensional structure of interferon gamma (pdb: 1fg9).

**Interferon type III family** is the interferon family discovered quite recently [20], has four members, and belongs to the family of cytokines related to interleukin 10 (IL10) by their genome organization, sequence and structure. Their antiviral properties rank them into the interferon group [21]. The signaling complex is formed by IFN- $\lambda$  receptor 1 (IFN- $\lambda$ R1, IL-28R1 alternatively) and interleukin 10 receptor 2 (IL-10R2). Interestingly, the IL-10R2 is

shared also with the other members of the FIL10 family like IL-10, IL-22 and IL-26. The subsequent signalization cascade utilizes JAK/STAT pathway [22]. The major role of type III interferons seems to be in airway epithelial cells after the infection of respiratory viruses. The receptor expression is restricted to the barrier tissues and small subset of immune cells which gives IFN- $\lambda$  therapeutic potential [23].

### 1.3. Cytokine receptors

Cytokine receptors are cell surface proteins which are able to transmit the incoming signal provided by cytokine through the cell membrane. They are classified into six families according to their three-dimensional structures. The IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ R2 receptors belong to the type II cytokine receptor family. Receptors from this family are usually composed of two fibronectin type III domains. The type II cytokine receptor family is characteristic by sequentially discontinuous motif (X)WRWR(X), where X is K, R or H which forms extensive structurally ordered cation- $\pi$  motif. Receptors of this family create heterodimeric signaling ternary complexes.

The human **interferon gamma receptor 1** (IFN- $\gamma$ R1) is a transmembrane glycoprotein with a single transmembrane  $\alpha$ -helix. The nascent polypeptide undergoes endoplasmic reticulum secretory pathway together with S-S bond formation, glycosylation and cleavage of signal peptide (AA 1-17) [24]. The mature receptor has 472 amino acids with predicted mass of 52.5 kDa. The extracellular, transmembrane and intracellular parts correspond to the amino acids 18 – 245, 246 – 266 and 267 – 489 respectively (numbering of the human IFN- $\gamma$ R1).

The structure of the extracellular part of human and chicken IFN- $\gamma$ R1 has been solved by crystallography [25,26] and it is composed of two fibronectin type III domains connected by a short linker with six residues. The D1 domain is composed of residues 14–102 and forms a  $\beta$ -sandwich with three  $\beta$ -strands stacked on a layer of four  $\beta$ -strands. The D2 domain is composed by amino acid residues 114–221 and forms similar  $\beta$ -sandwich with four strands stacked on four  $\beta$ -strands. The linker between both domains is present in all members of the type II receptor family and variations of its sequence allow modifications the mutual orientation of the two domains.

The IFN- $\gamma$ R1 extracellular part is responsible for mediating highly specific [27] and high-affinity binding of IFN- $\gamma$  with Kd approximately 30 nM [28]. The intracellular domain structure is unknown but mutation studies demonstrate the presence of important regions participating in the activation of Jak1 [29].

The **interferon gamma receptor 2** (IFN- $\gamma$ R2) comprises of 310 amino acids with a predicted molecular mass of 35 kDa. In contrary to IFN- $\gamma$ R1, the intracellular part is very short (residues 269 – 337). The transmembrane part (residues 248 – 268) and the extracellular parts (residues 28 – 247) are similar to the IFN- $\gamma$ R1. Before our study, the structure of IFN- $\gamma$ R2 had not been known.

The structure of the **IFN- $\gamma$  ternary complex** is unknown. The homodimeric nature of IFN- $\gamma$  increases the complexity of the ternary complex composition and structure, the feature that can be possibly used to tune the cytokine receptor signaling [30]. A more detailed knowledge



of the ternary complex is needed to fully understand the IFN- $\gamma$  signaling especially in respect to illnesses and susceptibilities associated with mutations of the IFN- $\gamma$  ternary complex components.

## **2. Aims**

The general goal of this study is a development of novel approaches in the field of modulation of protein – protein interactions and application of these approaches to description of the composition and structure of the IFN- $\gamma$  ternary complex. We concentrated mainly on insufficiently studied IFN- $\gamma$ R2 and mechanisms of formation of the ternary complex IFN- $\gamma$ /R1/R2. The parallel way how we study the conditions prevailing in the complex was to study the complex evolution in vertebrates. The general goal of the thesis is partitioned into four independent aims:

- I. Modulation of protein – protein interactions by modulation of the stability of protein – protein complexes. The process is focused on development of novel technique changing amino-acid residues in the receptor cavities. This novel approach might complement the current methodological portfolio mainly targeted on the interface residues and enables to preserve the interaction interface intact.
- II. Characterization of IFN- $\gamma$ R2. Production, biophysical and structural characterization of the receptor and its specific features. Comparison with other members of type II family.
- III. Analysis of evolution of interferons type II in fish species, their phylogeny and analysis of their co-evolution with receptors. Production, biophysical and structural characterization of some fish IFN- $\gamma$  signaling molecules. Analysis of possible interaction pairs by biophysics and bioinformatics approaches.
- IV. IFN- $\gamma$  ternary complex structure analysis. The study of topology and low-resolution structure of complexes between IFN- $\gamma$  and extracellular portions of its two receptors IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ R2.

### 3 Methods

- Cloning, site-directed mutagenesis and other DNA manipulations
- Heterologous protein expression in *Escherichia coli* and *Drosophila* Schneider S2 cells
- Protein purification
- Protein crystallization and structure analysis
- Biophysical techniques – CD and SPR, ITC, MST, SAXS

### 4 Results and discussion

We applied different strategies to modulate the affinity of the extracellular part of human IFN- $\gamma$ R1 to IFN- $\gamma$ . The first set of mutations was on the interface between both partners [28] and discussion of this topic is not included in this thesis. The study was followed by a study of "cavity" mutants (chapter 3.1). In the second paper described in the thesis, we focused on the unknown structure of IFN- $\gamma$ R2 and solved it. This enabled us to characterize the structure in detail and propose some features important for the IFN- $\gamma$  ternary complex (chapter 3.2). The acquired knowledge has allowed us to study the evolutionary aspects of IFN- $\gamma$  ternary complex and to describe putative changes which shaped the interfaces between receptors. The evolutionary aspect of all parts of ternary complex are analyzed in the third publication which describes evolutionary aspect together with structure of IFN- $\gamma$  from the Japanese halibut *Paralichthys olivaceus* (chapter 3.3). Finally, we focused on the ternary complex topology and composition (chapter 3.4).

#### 4.1 IFN- $\gamma$ R1 cavities

Černý, J., Biedermannová, L., Mikulecký, P., **Zahradník, J.**, Charnavets, T., Šebo, P., Schneider, B. (2015): Redesigning Protein Cavities as a Strategy for Increasing Affinity in Protein-Protein Interaction: Interferon- $\gamma$  Receptor 1 as a Model. *Biomed Res Int* 2015: 716945.

A new strategy to influence the affinity between IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$  was developed based on the premise that significant contribution to the binding affinity is given by conformational dynamics and thus by entropic forces. The entropic penalty of binding can be reduced by lowering complex flexibility. We analyzed in detail the three-dimensional data available for binary complexes in pdb: 1fyh [31] and 1fg9 [26], suggested the beneficial mutants in the IFN- $\gamma$ R1 protein cavity and experimentally tested the change in the complex affinity by SPR.

We searched for mutants that would increase the stability of IFN- $\gamma$ R1 and/or the affinity to IFN- $\gamma$  and focused on 12 promising positions. Possible mutations in these positions were analyzed by comparing the changes of free energies ( $\Delta\Delta G$ ) calculated using the program FoldX; the calculations were supported by averaging 500 snapshots of 10 ns molecular dynamics relaxations. Three different changes of free energy were calculated –  $\Delta\Delta G$  of folding of IFN- $\gamma$ R1 in the complex,  $\Delta\Delta G$  of folding of free IFN- $\gamma$ R1, and  $\Delta\Delta G$  of binding.

Individual cavity mutants yielded slight increase in the affinity compared to wild type. Combination of cavity mutants with the previously shown mutants on the complex interface led to significant increase. Our results thus support the hypothesis and changing the stability of the protein complex is a viable methodology to modulate protein-protein interactions.

## 4.2 Structural biology analysis of IFN- $\gamma$ R2

Mikulecký, P., **Zahradník, J.**, Kolenko, P., Černý, J., Charnavets, T., Kolářová, L., Nečasová, I., Pham, P.N., Schneider, B. (2016): Crystal structure of human interferon- $\gamma$  receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72(9):1017-25.

Our study of IFN- $\gamma$  ternary complex was restricted by the missing structure of the accessory chain. Therefore, we focused on expression, purification and crystallization of the protein and investigate the molecular structure of the extracellular portion of human IFN- $\gamma$ R2. We obtained successful production of high quality protein from insect cell expression system. For the growth of diffraction quality crystals, the deglycosylation by Endo H was needed. Our study determined the structure of the last missing type II receptor among human receptors. It has been solved by phasing technique of molecular replacement at the 1.8 Å crystallographic resolution and was deposited in Protein Data Bank under the code 5eh1.

The bioinformatics analysis based on our structure and comparison with the other members of class II family receptors revealed independent structural and evolutionary aspects of IFN- $\gamma$ R2. Analysis of evolutionary variable residues shed light on the putative binding site for interferon gamma and suggested the independent evolution of two fibronectin type III domains in the receptor. Interestingly, our analysis of structure revealed a distinct structural motif of six stacked residues interacting by  $\pi$ -cation interaction: Lys68, Trp74, Arg114, Trp126, Arg116 and His123 analogous stacking motif is known from the type I receptor family as the motif with the consensus sequence WSXWS [32].

## 4.3 Interferons type II and their receptors in fish species

**Zahradník, J.**, Kolářová, L., Pařízková, H., Kolenko, P., Schneider, B. (2018) Interferons type II and their receptors R1 and R2 in fish species: Structure, function & evolution. *Fish and shellfish immunology, Fish Shellfish Immunol* 79, 140-152

IFN- $\gamma$  evolved early in the evolution of chordates and is therefore present in extant cartilaginous fish, bony fish, as well as in tetrapods [33]. Fish and tetrapods split about 225 - 333 million years ago and then they undergo specific evolutionary adaptations [34]. Water environment is more prone for transmitting infectious agents such a bacteria and viruses and therefore the immune system evolution is under higher pressure than in terrestrial organisms. All these conditions contribute to the teleost fish attractiveness for evolutionary study of immune related proteins.

In contrast to mammalian type II family, the fish type II family is richer in the majority of species, consisting of two independent members, IFN- $\gamma$  and fish-specific IFN- $\gamma$  related (IFN- $\gamma$ rel) proteins. Moreover, in some fish species the interferon genes are additionally duplicated resulting in more copies. This large variability of type II interferons in fish species motivated us to perform a deeper analysis.

We did thorough phylogeny study of IFN- $\gamma$  and its receptors in fish species, and analyzed their co-evolution. Quite significantly, we supported our computations experimentally by biophysical interaction measurements of to this purpose expressed IFN- $\gamma$ /receptor pairs. This approach led us to recognition of two previously unknown cognate pairs: IFN- $\gamma$ /IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ rel/ IFN- $\gamma$ R1-like. Our analysis was recorded, reflected in ZFIN (Zebrafish Information Network; [zfin.org](http://zfin.org)) nomenclature, and finally annotated according to our suggestions in the NCBI database.

To shed a light on the differences between IFN- $\gamma$  from fish and mammal species, we determined the crystal structure of IFN- $\gamma$  from olive flounder *Paralichthys olivaceus* (PDB code 6f1e) and the low-resolution topologies of four other fish interferons by Small Angle X-ray diffraction (SAXS). Homology modeling compared with multiple-sequence alignments showed high variability at the binding interfaces and supported our previously published data.

#### 4.4 The topology of the ternary complex

Manuscript in preparation: **Zahradník, J.**, Mikulecký, P., Biedermannová, L., Černý, J., Klumpler, T., Kolářová, L., Kukačka, Z., Pham, P.N., Schneider, B.: Topology of complexes between interferon-gamma and extracellular portions of its two receptors R1 and R2.

All the knowledge gained during the study of IFN- $\gamma$  enabled us to investigate the topology of the ternary complex which is currently unknown. Most of the current models of the ternary complex suggest that it comprises two R1 receptor chains [11] and two R2 chains [35] forming thus a symmetrical complex. However, various experimental data including ours suggest that the situation is more complex. The crystal structure of IFN- $\gamma$  in complex with R1 shows an unexpected stoichiometry of 1:3 (one IFN- $\gamma$  dimer interacting with three IFN- $\gamma$ R1 chains) [26]. Moreover, signaling activity was observed in a modified IFN- $\gamma$  with only one binding site for IFN- $\gamma$ R1 but two for IFN- $\gamma$ R2 [31]. The formation of the assumed symmetrical complex is therefore not a necessary prerequisite for signaling.

We used previously determined structure of IFN- $\gamma$ R2 and confirmed the localization of the binding interface by adopting the cell based competitive assay. The position of the R2 chains were proposed by bioinformatics and confronted with SAXS. Interestingly, our preliminary data suggest the presence of only one R2 chain in the complex. We hypothesize that the variability in topology of the ternary complex is biologically relevant and impacting the signaling. Our investigation is still ongoing and the manuscript is being prepared.

## 5. Conclusions

- I. A novel methodology which can be used for modulation of protein-protein interactions was successfully described. A lower flexibility of the protein-protein complex decreases the entropic penalty which acts against binding.
- II. The human IFN- $\gamma$ R2 was crystallized and the structure was solved at 1.8 Å (PDB 5eh1). The structure was described in detail and compared with the other class II cytokine receptor family members.
- III. IFN- $\gamma$  structure from fish olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) was solved at 2.3 Å (PDB code 6f1e). The structure enabled us to describe molecular co-evolution between IFN- $\gamma$  and its high affinity receptor and the interaction affinities of three pairs of IFN- $\gamma$ / IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ / IFN- $\gamma$ R1-like were biophysically determined
- IV. The SAXS technique and mutations scanning was successfully used to analyze the IFN- $\gamma$  ternary complex topology. By combining bioinformatics, biophysical, and biochemical methods, we characterized the putative binding interface between IFN- $\gamma$  and IFN- $\gamma$ R2.

## A. Úvod (Czech part of Summary of the Ph.D. Thesis)

Strukturní biologie je vzrušující disciplína patřící do věd o živé přírodě. Tento obor využívá poznatky z molekulární biologie, biochemie, biofyziky a bioinformatiky a využívá je k detailnímu popisu trojrozměrné struktury biologických makromolekul – klíčových komponent všech živých organismů, které známe.

Na buňku můžeme pohlížet jako na otevřený systém, který potřebuje získávat informační vstupy z okolního prostředí k zajištění adekvátní reakce. Proteiny a jejich vzájemné interakce jsou dominantními nositeli buněčných funkcí. Informace z okolního prostředí jsou přijímány za pomoci receptorových proteinů a na ně navázaných signalizačních kaskád.

Předkládaná studie se zaměřuje na objasnění strukturních aspektů jedné z takových komunikačních kaskád imunitního systému člověka – systém interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ). Ačkoliv je tento systém podkladem pro více než čtyři tisíce vědeckých publikací každý rok, tak strukturní aspekty zůstávají dosud neobjasněny. Tento nelehký cíl nás zaujal a podnítil k hlubšímu studiu pro svoji komplexitu, množství nových poznatků a potenciál pro budoucí aplikace.

Cílem tohoto autoreferátu dizertační práce je uvést čtenáře do základů o signalizaci IFN- $\gamma$ , předložit vytyčené cíle a krátce diskutovat získané výsledky. Popisované výsledky se staly předmětem tří publikovaných vědeckých článků a jeden článek je v přípravné fázi.

### A.1 Cytokiny

Označení cytokin pochází z řečtiny a jedná se o složené slovo skládající se z části cyto znamenající buňku a kytos, která označuje pohyb. Cytokiny představují kategorii malých sekretovaných proteinů, které slouží jako signalizační a imunomodulační efekторы mezi buňkami a jsou schopné regulovat širokou škálu buněčných procesů. Nepostradatelnou funkční složkou cytokinové signalizace jsou jejich rozpoznávací receptory umístěné na buněčném povrchu [1].

### A.2 Interferony

Interferony patří mezi cytokiny. Jsou to malé sekretované proteiny, které objevili před více než 60 lety dva fenomenální Britští výzkumníci – Alick Isaacs a Jean Lindenmann [2]. Jejich název byl odvozen od schopnosti potlačovat virovou infekci. V současné době známe tři nezávislé skupiny interferonů označované jako typy I, II a III. Tyto typy se mezi sebou liší svojí aminokyselinovou sekvencí, receptory, umístěním genů v genomu a také dalšími vlastnostmi.

Role interferonů v organismu jsou velmi variabilní a zahrnují antivirové, antibakteriální, protirakovinné a modulační účinky [3,4,5]. Interferonový signál je zachycen a přenášen dvěma receptory na povrchu buněk, které po své aktivaci spouštějí vnitrobuněčné signalizační kaskády. Receptorový pár se vždy skládá z receptoru s vysokou afinitou k cílové molekule a takzvaného přídatného faktoru. Funkce receptoru s vysokou afinitou je zprostředkovat vycytávání interferonu ze séra zatímco druhý receptor slouží jako modulátor signalizace. Po vzniku ternárního komplexu, kde jsou přítomny všechny tři molekuly – oba receptory a interferon, je získaný signál přenášen přes membránu do buněčné cytoplazmy a je spuštěna

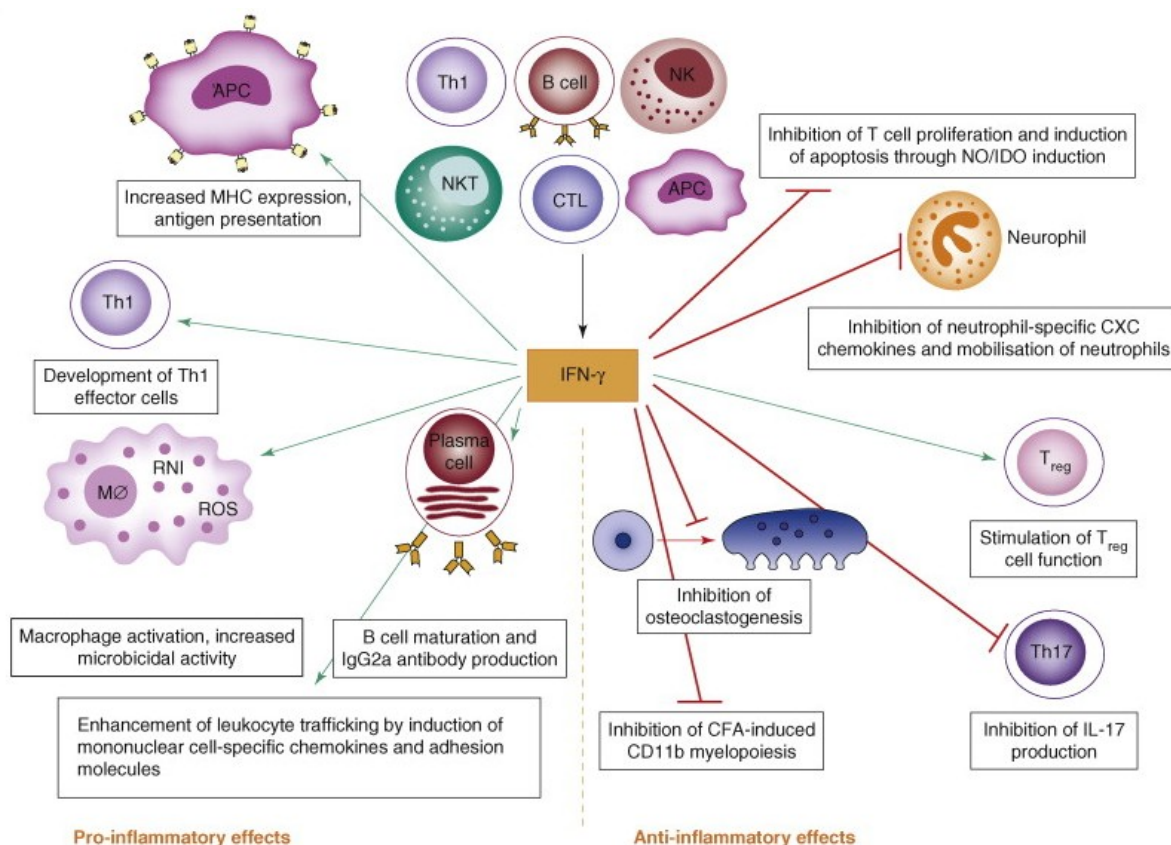
signalizační kaskáda pomocí Janusových kináz (JAK) a transkripčních faktorů STAT. Různé kombinace kináz a transkripčních faktorů vedou k odlišné regulaci interferonem ovlivněných genů [6].

**Interferony typu I** jsou největší skupinou skládající se z pěti strukturně odlišných členů a celkem 17 různých proteinů. Všechny proteiny této skupiny signalizují za vzniku jednoho typu ternárního komplexu. Receptory IFN $\alpha$  receptor 1 (IFN- $\alpha$ R1) a receptor 2 (IFN- $\alpha$ R2) jsou sdíleny všemi členy. Je velmi zajímavé, že různé členové rodiny vykazují velké rozdíly ve své signalizaci a ve schopnosti aktivovat následné JAK/STAT signalizační kaskády [7]. Usuzuje se, že tyto rozdíly jsou způsobeny diferenciací expresí, rozdíly ve vazebných afinitách [8] a rozdíly v JAK/STAT signalizačních kaskádách u daného typu buněk [9,10].

**Interferony typu II** jsou předmětem zde popsaného výzkumu. Jejich struktura a biologická aktivita je unikátní. Všichni řádní členové typu II jsou dimerní na rozdíl od ostatních interferonů, které jsou pouze monomerní. Jediný zástupce nacházející se ve všech žijících druzích skupiny čtvernožců je IFN- $\gamma$ . Oproti tomu je v rybích druzích přítomný ještě interferon gamma podobný protein (z angl.: interferon gamma related protein [IFN- $\gamma$ rel]). Interferony druhého typu signalizují pomocí receptorového komplexu skládajícího se z receptorů 1 pro IFN- $\gamma$  a IFN- $\gamma$ rel (IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ R1-like) a z druhého přídatného receptoru 2 (IFN- $\gamma$ R2). Přesné složení signalizačního komplexu je stále předmětem výzkumu. Očekává se, že se na IFN- $\gamma$  váží dva receptory 1 a také dvě molekuly receptoru 2 [11]. Další možnosti však nejsou vyloučeny.

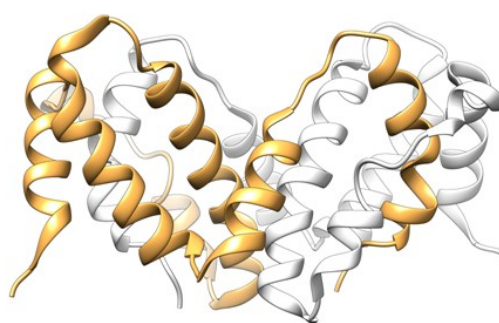
Vazba IFN- $\gamma$  iniciuje vznik ternárního komplexu, po kterém následuje změna prostorového uspořádání vnitrobuněčných domén receptorů. Tento proces inicializuje JAK/STAT signalizační kaskádu, jejíž výsledkem je fosforylace specifických residuí na proteinu STAT1. Fosforylovaný STAT1 protein vytváří homodimer a vniká do buněčného jádra, kde funguje jako transkripční faktor. STAT1 se váže na specifickou sekvenci DNA známou jako GAS (z angl.: gamma activator sequence) [12]. Vazba indukuje změnu exprese stovek, takzvaných, primárních genů. Celá výše popsaná dráha představuje kanonický průběh signalizace. Existuje i odlišný způsob, který má za následek aktivaci jiných genů. Tato dráha je známa jako nekanonická a zahrnuje endocytózu zprostředkovanou jaderným lokalizačním signálem přítomným na C konci molekuly IFN- $\gamma$  [13].

Interferon gamma je produkován buňkami imunitního systému [14,15] a téměř každý další buněčný typ nese receptory a může na IFN- $\gamma$  reagovat [16]. Funkce IFN- $\gamma$  jsou pleiotropní zahrnující modulaci vrozené i adaptivní imunity (Obrázek č. 1). Signalizace této molekuly je proto velmi citlivá na veškeré změny. Z tohoto důvodu není překvapivé, že pozměněná exprese je spojena s velkým množstvím zánětlivých a autoimunitních chorob [17].



**Figure 2** – Přehled hlavních funkcí interferonu gamma. Levá strana obrázku ukazuje prozánětlivé funkce. Pravá strana se zaměřuje na protizánětlivé funkce. Zelené šipky odpovídají stimulaci a červené inhibici. (Obrázek byl převzat z publikace Kelchtermana a kol. [19], popis byl ponechán v originálním znění).

Struktura IFN- $\gamma$  byla vyřešena za použití rentgenové krystalografie. V současné době je známo několik různých struktur pocházejících z různých organismů: člověk, králík, tur domácí a díky naší práci také rybí, japonského platýze druhu *Paralichthys olivaceus* [18]. Samotné uspořádání peptidového řetězce je unikátní a nenachází ve stejné podobě v žádném jiném proteinu. Skládá se ze dvou identických řetězců vytvářejících 6  $\alpha$  helixů (A-F). Oba dva řetězce jsou přibližně paralelní k dvojčetné ose dimeru (Obrázek č. 2).



**Obrázek č. 2** – 3D struktura interferonu gamma (pdb: 1fg9). Jednotlivé proteinové řetězce jsou obarveny žlutě a bíle.

**Interferony typu III** byly objeveny teprve nedávno [20] a jsou také označovány jako interferony lambda (IFN- $\lambda$ ). Celá rodina má pouze čtyři členy, kteří jsou také zařazeni do rodiny interleukinu-10 (IL-10) podle jejich sekvenční podobnosti. Jejich protivirové účinky je neoddiskutovatelně řadí mezi interferony [21]. Signalizace je zprostředkována receptorem 1



pro IFN- $\lambda$  a receptorem 2 pro interleukin 10 (IL-10R2), který je sdílen s dalšími zástupci rodiny, jako jsou IL-10, IL-22 a IL-26. Následná signalizační kaskáda je zprostředkována opět JAK/STAT dráhou [22]. Hlavní rolí interferonů třetího typu je zabránění virových infekcí na epitelech dýchacích cest. Exprese receptorů je omezena právě na tuto a další bariérové tkáně. Pouze velmi malá část imunitních buněk je citlivá na interferony lambda. Nedochozí k vyvolání systematické zánětlivé odpovědi, což dává zástupcům IFN- $\lambda$  značný terapeutický potenciál [23].

### A.3. Cytokinové receptory

Cytokinové receptory jsou proteiny vystavené na povrchu buněk, které jsou schopné předat signál zprostředkovaný vazbou cytokinu přes buněčnou membránu. Rozdělují se na šest rodin podle jejich 3D struktury. Receptory 1 a 2 pro IFN- $\gamma$  patří do rodiny cytokinových receptorů typu II. Charakteristickým rysem rodiny typu II je jejich kompozice ze dvou domén fibronectinového typu III. Členové receptorové rodiny mohou být identifikováni na základě sekvenčně diskontinuálního konzervovaného motivu (X)WRWR(X), kde X odpovídá lysinu, argininu nebo histidinu. Aminokyselinové zbytky tohoto motivu vytváří zajímavé uskupení na povrchu proteinu, které interaguje rozsáhlým systémem kation- $\pi$  interakcí.

**Receptor 1 pro lidský interferon gamma (IFN- $\gamma$ R1)** je transmembránový glykoprotein. Tento protein prochází při své syntéze endoplasmatickým retikulem a sekreční drahou. Během tohoto procesu dochází k formování disulfidových vazeb, glykosylaci a odstranění sekrečního signálu signální proteázou [24]. Plně procesovaný receptor 1 má 472 aminokyselin s predikovanou hmotností 52.5 kDa. Extracelulární část odpovídá aminokyselinám 18 – 245, membránová část zahrnuje aminokyseliny 246 – 266 a cytoplasmatická aminokyseliny 267 – 489.

Struktura extracelulární části byla vyřešena pro lidský a slepičí protein pomocí rentgenové krystalografie [25,26]. Oba známé proteiny jsou složeny ze dvou domén fibronectinového typu III spojenými krátkým řetězcem 6 aminokyselin. První doména je označována jako D1 (aminokyseliny 14 – 102) a vytváří sendvičovou strukturu, kdy jedna vrstva tří  $\beta$ -skládaných listů interaguje s obdobnou vrstvou čtyř  $\beta$  listů. Druhá doména má analogickou strukturu složenou z dvojice čtyř  $\beta$ -skládaných listů. Spojení obou domén se v podobné podobě vyskytuje u všech receptorů typu II a jeho variace umožňují různé orientace obou dvou domén vůči sobě. Tato orientace je velmi důležitá pro vlastní vazbu.

Extracelulární část molekuly IFN- $\gamma$ R1 je odpovědná za vysoce specifickou vazbu IFN- $\gamma$  [27] s afinitou přibližně 30 nM [28]. Struktura vnitrobuněčné části není známá, ale pomocí mutagenizačních přístupů byly identifikovány důležité regiony zásadní pro vazbu Jak1 [29].

**Receptor 2 pro interferon gamma (IFN- $\gamma$ R2)** je protein skládající se z 310 aminokyselin a s molekulovou hmotností 35 kDa. Oproti receptoru 1 je jeho vnitrobuněčná část velmi krátká (269 – 337). Membránová část odpovídá aminokyselinám 248 – 268 a extracelulární aminokyselinám (28 – 247). Strukturu tohoto receptoru se nám podařilo vyřešit a je předmětem jedné z publikovaných prací.

Celková struktura ternárního komplexu IFN- $\gamma$  je neznámá. Dimerní podstata IFN- $\gamma$  zvyšuje komplexitu celého multiproteinového uspořádání a vytváří možnosti po využití odlišných uspořádání k rozdílné signalizaci [30]. Pro úplné pochopení tohoto komplexu je nutné získání

dalších znalostí. Ty se mohou stát cenným nástrojem pro odhalení a léčbu nemocí způsobených změnou některého z členů komplexu.

## **B. Cíle**

Hlavním cílem této studie je vývoj nových přístupů ke studiu protein – proteinových interakcí a aplikace těchto postupů ke studiu složení a struktury ternárního komplexu interferonu gamma. V naší práci jsme se zaměřili převážně na studium dosud nedostatečně prozkoumaného receptoru IFN- $\gamma$ R2 a následně mechanismu kterým se tento receptor podílí na formování ternárního komplexu. Paralelní přístup ke studiu ternárního komplexu, který jsme také zvolili je analýza evoluce jednotlivých komponent komplexu. Celkový cíl této práce lze rozdělit na čtyři nezávislé dílčí úkoly:

- I. Modulace protein – proteinových interakcí pomocí ovlivnění stability protein – proteinových komplexů. Vývoj nové metody založené na pozměnění aminokyselinových zbytků umístěných uvnitř struktury proteinu. Tento nový přístup by měl doplnit současné metody založené na cíleném pozměnění aminokyselinových zbytků podílejících se na vazebném rozhraní a měl by umožnit ponechání těchto zbytků bez změn.
- II. Charakterizace druhého receptoru pro IFN- $\gamma$ . Jeho produkce, biofyzikální a strukturní charakterizace. Analýza struktury receptoru, jeho unikátních znaků, a porovnání s ostatními receptory typu II.
- III. Analýza evoluce interferonů druhého typu v rybách a jejich fylogeneze společně s analýzou odpovídajících receptorů a popis jejich vzájemné koevoluce. Produkce, biofyzikální a strukturní charakterizace vybraného zástupce rybích IFN- $\gamma$ . Studium možných interakčních párů pomocí biofyzikálních a bioinformatických přístupů.
- IV. Strukturní analýza kompozice ternárního komplexu IFN- $\gamma$ . Studium topologie komplexů mezi IFN- $\gamma$  a extracelulárních částí jeho receptorů pomocí metod s nízkým rozlišením.

## C. Metody

- Klonování, místně cílená mutagenese a další DNA manipulace
- Heterologní exprese proteinů v systémech *Escherichia coli* a *Drosophila Schneider* S2
- Purifikace proteinů
- Proteinová krystalizace a strukturní analýza
- Biofyzikální techniky – CD, SPR, ITC, MST a SAXS

## D. Výsledky a diskuze

Aplikovali jsme různé přístupy k modulaci afinity mezi extracelulární částí lidského IFN- $\gamma$ R1 a jeho ligandu IFN- $\gamma$ . Náš prvotní přístup se zaměřil na modulaci aminokyselinových zbytků na rozhraní mezi oběma partnery [28]. Diskuse zmíněného přístupu není obsažena v dizertační práci. V následné studii jsme se zaměřili na tzv „kavity“ mutanty. Tedy na mutantní verze proteinu s modifikacemi uvnitř proteinové struktury (kapitola 3.1). V další studii, popsané v této práci, jsme se zaměřili na neznámou strukturu IFN- $\gamma$ R2 a vyřešili ji. Detailní analýza struktury nám umožnila rozpoznat znaky podílející se na tvorbě ternárního komplexu IFN- $\gamma$  (kapitola 3.2). Získané znalosti nám dovolili kompletní studium evolučních aspektů všech komponent ternárního komplexu. V naší studii jsme se zaměřili hlavně na odhalení evolučních změn, které ovlivňují podobu rozhraní mezi IFN- $\gamma$  a jeho receptory. Analýza evolučních aspektů společně s vyřešením struktury IFN- $\gamma$  z japonského platýze druhu *Paralichthys olivaceus* se stala základem pro třetí publikaci (kapitola 3.3). Na závěr jsme se zaměřili na studium topologie a složení ternárního komplexu (kapitola 3.4).

### D.1 IFN- $\gamma$ R1 „kavity“

Černý, J., Biedermannová, L., Mikulecký, P., Zahradník, J., Charnavets, T., Šebo, P., Schneider, B. (2015): Redesigning Protein Cavities as a Strategy for Increasing Affinity in Protein-Protein Interaction: Interferon- $\gamma$  Receptor 1 as a Model. *Biomed Res Int* 2015: 716945.

Nová strategie na modulaci protein – proteinových interakcí byla vyvinuta na základě premisy, že vazebná afinita je signifikantně ovlivňována konformační dynamikou a tedy i entropickými silami s tím souvisejícími. Redukcí flexibility komplexu je možné snížit entropický příspěvek k vazbě a tím ovlivnit afinitu. Jako testovací model byl zvolen systém IFN- $\gamma$  a jeho receptoru 1, pro který je dostupné dostatečné množství dat v podobě dvou struktur obsažených v databázi pdb: 1fyh [31] and 1fg9 [26]. Na základě bioinformatických výpočtů bylo navrženo několik mutantních proteinů, které byly následně exprimovány. Afinita výsledné binární interakce byla studována pomocí SPR s purifikovanými proteiny.

V naší práci jsme se zaměřili na mutanty, které zvýší výslednou afinitu mezi IFN- $\gamma$ R1 a IFN- $\gamma$ . Vybráno bylo celkem 12 slibných pozic umístěných uvnitř molekuly proteinu. Mutace byly vybírány na základě porovnání změn Gibsovy volné energie ( $\Delta\Delta G$ ) vypočtené pomocí program FoldEX. Pro podpoření našich výpočtů jsme zvážili i data získaná z molekulové

dynamiky. Výsledné hodnoty  $\Delta\Delta G$  pro IFN- $\gamma$ R1 v komplexu a volného byly porovnávány s celkovým  $\Delta\Delta G$  vazby.

Jednotlivé mutanty vykazovaly pouze drobné zvýšení vazebné afinity oproti divokému typu proteinu. Jejich kombinace s dříve navrženými záměnami na vazebném rozhraní vedla k podstatnému zvýšení afinity. Naše výsledky tak potvrzují hypotézu, že změna stability proteinového komplexu ovlivňuje vazebnou afinitu a je tedy možné tento přístup postulovat jako funkční metodický přístup.

## D.2 Analýza struktury IFN- $\gamma$ R2

Mikulecký, P., Zahradník, J., Kolenko, P., Černý, J., Charnavets, T., Kolářová, L., Nečasová, I., Pham, P.N., Schneider, B. (2016): Crystal structure of human interferon- $\gamma$  receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72(9):1017-25.

Zásadní prerekvizitou pro studium ternárního komplexu IFN- $\gamma$  je znalost struktury všech komponent komplexu nebo komplexu samotného. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na expresi, purifikace a vyřešení dosud neznámé struktury receptoru 2. Úspěšná produkce v dostatečné kvalitě a množství byla získána z eukaryotického expresního systému za použití hmyzích buněk. Pro zvýšení kvality krystalů bylo nutné protein deglykosylovat pomocí enzymu Endo H. Vyřešením krystalové struktury pomocí fázovací techniky molekulárním nahrazením byl doplněn poslední receptor s chybějící strukturou v rodině typu II. Bylo získáno rozlišení 1.8 Å a data byla deponována do proteinové databáze PDB pod kódem 5eh1.

Bioinformatická analýza získané struktury a ostatních zástupců rodiny typu II ukázala nezávislé strukturní a evoluční aspekty IFN- $\gamma$ R2. Pomocí hledání evolučně variabilních proteinových zbytků ve struktuře se nám podařilo navrhnout pozici vazebného místa s IFN- $\gamma$ . Odhalili jsme také značné rozdíly v doménách D1 a D2. Je zřejmé, že obě fibronectinové domény tvořící receptor podléhají jiné evoluční selekci. Zajímavým odhalením je identifikace rozsáhlého strukturního motivu, který se skládá z šesti interagujících aminokyselinových zbytků. Jedná se o Lys68, Trp74, Arg114, Trp126, Arg116 a His123, které spolu interagují  $\pi$  – kation interakcí. Tento motiv byl dosud znám jen u receptorů typu I, kde tvoří kontinuální sekvenční motiv WSXWS [32].

## D.3 Interferony typu II a jejich receptory v rybách

Zahradník, J., Kolářová, L., Pařízková, H., Kolenko, P., Schneider, B. (2018) Interferons type II and their receptors R1 and R2 in fish species: Structure, function & evolution. *Fish and shellfish immunology, Fish Shellfish Immunol* 79, 140-152

Interferon gamma vznikl v evoluci se vznikem strunatců a je díky tomu přítomen ve všech současných rybách i čtvernožcích [33]. K rozdělení evolučních linií ryb a čtyřnožců došlo před přibližně 225 až 333 miliony let. Po této události došlo k nezávislé evoluční adaptaci ryb na jejich specifické prostředí [34]. Vodní prostředí je vhodnější pro přenos infekčních agens, jako jsou bakterie a viry. Imunitní systém vodních organismů je tedy pod větším selekčním

tlakem, než je tomu u suchozemských organismů. Všechny tyto odlišnosti ryb z nich činí atraktivní cíl pro studium imunitních proteinů.

Na rozdíl od savčí rodiny interferonů typu II s pouze jedním zástupce mají ryby tuto rodinu bohatší. Vyskytují se u nich dva zástupci: IFN- $\gamma$  a pro ryby charakteristický IFN- $\gamma$ rel protein. V některých druzích ryb jsou tyto geny ještě navíc duplikovány a vyskytují se tedy ve více kopiích. Tato dosud neprostudovaná variabilita nás motivovala k podrobnější studii.

Udělalí jsme důkladnou fylogenetickou a koevoluční studii rybích IFN- $\gamma$  a jejich receptorů. Naše výpočetní výsledky jsme dále podpořili použitím biofyzikálních měření. V souladu obou přístupů jsme navrhly binární interakční páry mezi IFN- $\gamma$ / IFN- $\gamma$ rel a jejich receptory. Tyto interakční páry nebyly dosud popsány a kvalitně ověřeny. Výsledky naší studie byly reflektovány v databázi ZFIN (Zebrafish Information Network; [zfin.org](http://zfin.org)) a také v databázi NCBI GenBank.

Abychom získali detailní znalosti o rozdílech v IFN- $\gamma$  mezi savci a rybími druhy, tak jsme vyřešili krystalovou strukturu IFN- $\gamma$  z japonského platýze druhu *Paralichthys olivaceus* (PDB code 6fle). Pomocí maloúhlového rozptylu rentgenových paprsků (SAXS) jsme analyzovali další čtyři zástupce rybích IFN- $\gamma$ . Homologní modelování společně se sekvenčními porovnáními ukázalo dramatickou variabilitu vazebných rozhraní, zvláště u receptorů, čímž jsme podpořili naše předchozí výsledky.

#### D.4 Topologie ternárního komplexu

Manuscript in preparation: **Zahradník, J.**, Mikulecký, P., Biedermannová, L., Černý, J., Klumpler, T., Kolářová, L., Kukačka, Z., Pham, P.N., Schneider, B.: Topology of complexes between interferon-gamma and extracellular portions of its two receptors R1 and R2.

Všechny poznatky získané během předchozích experimentů s IFN- $\gamma$  nám umožnily detailně zkoumat dosud neznámou topologii ternárního komplexu. Většina předpokládaných modelů je založena na představě vazby dvou receptorů 1 [11] a dvou receptorů 2 [35] za vzniku symetrického komplexu. Nicméně, rozličná experimentální data ukazují, že situace může být složitější. Krystalová struktura IFN- $\gamma$  s IFN- $\gamma$ R1 vykazuje neočekávanou třetí molekulu R1 a stechiometrii 1:3 (jeden IFN- $\gamma$  dimer a tři IFN- $\gamma$ R1) [26]. Kromě toho byla publikována studie s mutantní formou IFN- $\gamma$ , kde je pouze jedno vazebné místo IFN- $\gamma$ R1, ale dvě místa pro IFN- $\gamma$ R2. Tato varianta proteinu je aktivní a je tedy možné předpokládat, že vznik symetrického komplexu není pro signalizaci nutný.

Pomocí dříve získané struktury IFN- $\gamma$ R2 a nalezení vazebného rozhraní s IFN- $\gamma$  pomocí biochemické kompetičního testu jsme mohli postulovat pozici IFN- $\gamma$ R2 v ternárním komplexu. Navržená pozice byla porovnána z daty získanými pomocí SAXS. Překvapivým výsledkem je, že změřená data prokazují přítomnost pouze jedné molekuly R2 v komplexu. Můžeme tedy hypotetizovat, že variabilní složení v topologii ternárního komplexu je biologicky relevantní jev, který má dosud neznámý dopad na signalizaci. Naše snaha porozumět tomuto komplexnímu systému stále probíhá a článek zabývající se touto problematikou je v přípravě.

## E. Závěry

- I. Úspěšně jsme popsali nový metodický přístup jak modulovat protein – proteinové interakce. Snížením flexibility protein – proteinového komplexu se sníží entropický příspěvek, který působí proti vazbě.
- II. Lidský receptor 2 pro interferon gamma byl krystalizován a jeho struktura byla vyřešena s rozlišením 1,8 Å (PDB 5eh1). Získaná struktura byla detailně analyzována, popsána a porovnána s dalšími zástupci cytokinových receptorů typu II.
- III. Struktura rybího interferonu gamma z japonského platýze druhu *Paralichthys olivaceus* byla vyřešena s rozlišením 2,3 Å (PDB code 6fle). Molekulární aspekty koevoluce mezi interferonem gamma a jeho receptorem 1 byly postulovány společně s jejich ověřením biofyzikálními experimenty.
- IV. Mutační studie v kombinaci s malouhlovým rozptylem rentgenových paprsků (SAXS) byla úspěšně použita pro nalezení pozice vazebného místa receptoru 2. Kombinací bioinformatických, biofyzikálních a biochemických přístupů jsme charakterizovali ternární komplex interferonu gamma.

## Použitá literatura / References

- [1] Lackie, J., O'Callaghan, C.A. *A Dictionary of Biomedicine*, OUP Oxford 2010.
- [2] Isaacs, A., Lindenmann, J. Virus interference. I. (1957) The interferon, *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 147(927) 258-67.
- [3] Karupiah, G.; Xie, Q. W.; Buller, R. M.; Nathan, C.; Duarte, C.; MacMicking, J. D. (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261 (5127), 1445-1448.
- [4] McNab, F.; Mayer-Barber, K.; Sher, A.; Wack, A.; O'Garra, A. (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15 (2), 87-103.
- [5] Corrales, L.; Gajewski, T. F. (2015) Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res* 21 (21), 4774-9.
- [6] George R.S.; Darnell, James E. (2012) The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* 36 (4), 503-514.
- [7] Sadler, A. J.; Williams, B. R. (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8 (7), 559-68.
- [8] Pestka, S. (2007) The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282 (28), 20047-51.
- [9] Jaitin, D. A.; Roisman, L. C.; Jaks, E.; Gavutis, M.; Piehler, J.; Van der Heyden, J.; Uze, G.; Schreiber, G. (2006) Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol Cell Biol* 26 (5), 1888-97.
- [10] Moraga, I.; Harari, D.; Schreiber, G.; Uze, G.; Pellegrini, S. (2009) Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. *Mol Cell Biol* 29 (17), 4778-87.
- [11] Walter, M. R.; Windsor, W. T.; Nagabhushan, T. L.; Lundell, D. J.; Lunn, C. A.; Zauodny, P. J.; Narula, S. K. (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 376 (6537), 230-5.
- [12] Hertzog, P.; Forster, S.; Samarajiwa, S. (2011) Systems biology of interferon responses. *J Interferon Cytokine Res* 31 (1), 5-11.
- [13] Blouin, C. M.; Lamaze, C. (2013) Interferon Gamma Receptor: The Beginning of the Journey. *Front Immunol* 4, 267.
- [14] Bach, E. A.; Aguet, M.; Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-91.
- [15] Young, H. A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16 (8), 563-8.
- [16] Valente, G.; Ozmen, L.; Novelli, F.; Geuna, M.; Palestro, G.; Forni, G.; Garotta, G. (1992) Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol* 22 (9), 2403-12.
- [17] Reinhardt, R. L.; Liang, H.-E.; Bao, K.; Price, A. E.; Mohrs, M.; Kelly, B. L.; Locksley, R. M. (2015) A Novel Model for IFN- $\gamma$ -Mediated Autoinflammatory Syndromes. *J Immunol* 194 (5), 2358-2368.
- [18] Zahradník, J.; Kolářová, L.; Pařízková, H.; Kolenko, P.; Schneider, B. (2018) Interferons type II and their receptors R1 and R2 in fish species: Evolution, structure, and function. *Fish Shellfish Immunol* 79, 140-152.
- [19] Kelchtermans, H.; Billiau, A.; Matthys, P. (2008) How interferon- $\gamma$  keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 29 (10), 479-486.
- [20] Pestka, S.; Krause, C. D.; Walter, M. R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.
- [21] Kotenko, S. V.; Gallagher, G.; Baurin, V. V.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, N. K.; Langer, J. A.; Sheikh, F.; Dickensheets, H.; Donnelly, R. P. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4 (1), 69-77.
- [22] Bolen, C. R.; Ding, S.; Robek, M. D.; Kleinstein, S. H. (2014) Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* 59 (4), 1262-72.

- [23] Lasfar, A.; Gogas, H.; Zloza, A.; Kaufman, H. L.; Kirkwood, J. M. (2016) IFN- $\lambda$  cancer immunotherapy: new kid on the block. *Immunotherapy* 8 (8), 877-888.
- [24] Hershey, G. K.; Schreiber, R. D. (1989) Biosynthetic analysis of the human interferon-gamma receptor. Identification of N-linked glycosylation intermediates. *J Biol Chem* 264 (20), 11981-8.
- [25] Ping, Z.; Qi, J.; Sun, Y.; Lu, G.; Shi, Y.; Wang, X.; Gao, G. F.; Wang, M. (2014) Crystal structure of the interferon gamma receptor alpha chain from chicken reveals an undetected extra helix compared with the human counterparts. *J Interferon Cytokine Res* 34 (1), 41-51.
- [26] Thiel, D. J.; le Du, M. H.; Walter, R. L.; D'Arcy, A.; Chène, C.; Fountoulakis, M.; Garotta, G.; Winkler, F. K.; Ealick, S. E. (2000) Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure* 8 (9), 927-936.
- [27] Farrar, M. A.; Schreiber, R. D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611.
- [28] Mikulecký, P.; Černý, J.; Biedermannová, L.; Petroková, H.; Kuchař, M.; Vondrášek, J.; Malý, P.; Šebo, P.; Schneider, B. (2013) Increasing Affinity of Interferon- $\gamma$  Receptor 1 to Interferon- $\gamma$  by Computer-Aided Design. *Biomed Res Int* 2013, 752514.
- [29] Usacheva, A.; Sandoval, R.; Domanski, P.; Kotenko, S. V.; Nelms, K.; Goldsmith, M. A.; Colamonici, O. R. (2002) Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *J Biol Chem* 277 (50), 48220-6.
- [30] Moraga, I.; Wernig, G.; Wilmes, S.; Gryshkova, V.; Richter, C. P.; Hong, W.-J.; Sinha, R.; Guo, F.; Fabionar, H.; Wehrman, T. S.; Krutzik, P.; Demharter, S.; Plo, I.; Weissman, I. L.; Minary, P.; Majeti, R.; Constantinescu, S. N.; Piehler, J.; Garcia, K. C. (2015) Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands. *Cell* 160 (6), 1196-1208.
- [31] Randal, M.; Kossiakoff, A. A. (2000) The 2.0 Å structure of bovine interferon-gamma; assessment of the structural differences between species. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (1), 14-24.
- [32] Bazar, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (18), 6934-6938.
- [33] Venkatesh, B.; Lee, A. P.; Ravi, V.; Maurya, A. K.; Lian, M. M.; Swann, J. B.; Ohta, Y.; Flajnik, M. F.; Sutoh, Y.; Kasahara, M.; Hoon, S.; Gangu, V.; Roy, S. W.; Irimia, M.; Korzh, V.; Kondrychyn, I.; Lim, Z. W.; Tay, B. H.; Tohari, S.; Kong, K. W.; Ho, S.; Lorente-Galdos, B.; Quilez, J.; Marques-Bonet, T.; Raney, B. J.; Ingham, P. W.; Tay, A.; Hillier, L. W.; Minx, P.; Boehm, T.; Wilson, R. K.; Brenner, S.; Warren, W. C. (2014) Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* 505 (7482), 174-9.
- [34] Savan, R.; Ravichandran, S.; Collins, J. R.; Sakai, M.; Young, H. A. (2009) Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2), 115-24.
- [35] Kotenko, S. V.; Izotova, L. S.; Pollack, B. P.; Mariano, T. M.; Donnelly, R. J.; Muthukumar, G.; Cook, J. R.; Garotta, G.; Silvennoinen, O.; Ihle, J. N. (1995) Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem* 270 (36), 20915-21.



# Curriculum vitae

JIŘÍ ZAHRADNÍK

zahradj@ibt.cas.cz / Jiri.Zahradnik@weizmann.ac.il

Home address:

Vančurova 5, Plzeň – Bílá Hora, Vančurova 5, 301 00 Plzeň, Czech Republic

IBT address:

BIOCEV, Průmyslová 5, 252 42 Vestec, Czech Republic, <http://www.biocev.eu/en/>

Current address:

Weizmann Institute of Science, Rehovot Israel 7610001

## CURRENT POSITION

**Weizmann Institute of Science**  
**Laboratory Protein-protein Interactions**  
pre-Postdock

## EDUCATION

- 2014 – present**      **PhD. Degree in Biochemistry; Charles University, Prague**
- 2013 – 2016      Mgr. Degree (equivalent to MSc.) in Molecular Biology; Faculty of Science, Department of Biology, Charles University Prague  
Specialization: Molecular biology and genetics of Prokaryotes
- 2012 – 2014      Mgr. Degree in Biochemistry; Faculty of Science, Department of Chemistry, Charles University Prague  
Specialization: Protein biology, Enzymology, Organic chemistry
- 2009 – 2013      BSc. in Molecular Biology; Faculty of Science, Department of Biology, Charles University Prague
- 2008 – 2012      BSc. in Biochemistry; Faculty of Science, Department of Chemistry, Charles University Prague

## GRANTS AND AWARDS

- 2014 – 2017**      **Microbial metabolisms of the morphine alkaloids**  
Grant Agency of Charles University
- 2017**              **1<sup>st</sup> Price in Biocev Science photo**

### Participation in research teams

- 2015 – 2018**      **Interleukins of the IL-10 family: specificity and targeted modulation of interactions with receptors, Applicant: Bohdan Schneider**  
Czech Science Foundation (16-20507S)

## RESEARCH EXPERIENCE

### Institute of Biotechnology AS CR, v.v.i.

- 2014 – 2018**      Graduate Research Assistant; Supervisor: B. Schneider  
Interferon gamma and Interleukins of the IL-10 family: specificity and targeted modulation of interaction with receptors; Evolution of IFN $\gamma$  and IL-10 family interleukins; Structure-function studies on RAYT tyrosine transposases and REP sequences;

### Institute of Microbiology AS CR, v.v.i.

- 2014 – 2017      Graduate Research Assistant; Supervisor: P. Kyslík  
Morphine alkaloid induced changes and toxicity in bacterial cells study; Old Yellow Enzyme family structure-function studies;
- 2009 – 2014      Undergraduate Research Assistant; Supervisor: M. Šulc, Advisor: P. Kyslík  
Characterization of biotransformation potential of *Agrobacterium bohemicum* using HPLC (HPLC\*MS) and FPLC instruments;

## Seznam publikací / Selected publications

Publikace zahrnuté v dizertační práci jsou vyznačeny tučně.

Publications related to the Dissertation thesis are in bold.

1. Kyslíková, E., Babiak, P., Štěpánek, V., **Zahradník, J.**, Palyzová, A., Marešová, H., Valešová, R., Hájíček, J. Kyslík, P. (2013): Biotransformation of codeine to 14-OH-codeine derivatives by *Rhizobium radiobacter* R89-1. *J Mol Catal B: Enzymatic* 87: 1-5
2. **Černý, J., Biedermannová, L., Mikulecký, P., Zahradník, J., Charnavets, T., Šebo, P., Schneider, B. (2015): Redesigning Protein Cavities as a Strategy for Increasing Affinity in Protein-Protein Interaction: Interferon- $\gamma$  Receptor 1 as a Model. *Biomed Res Int.* 2015: 716945.**
3. **Mikulecký, P., Zahradník, J., Kolenko, P., Černý, J., Charnavets, T., Kolářová, L., Nečasová, I., Pham, P.N., Schneider, B. (2016): Crystal structure of human interferon- $\gamma$  receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72(9):1017-25.**
4. Grulich, M., Brezovský, M., Štěpánek, V., Palyzová, A., Marešová, H., **Zahradník, J.**, Kyslíková, E., Kyslík, P. (2017) In-silico driven engineering of enantioselectivity of a penicillin G acylase towards active pharmaceutical ingredients. *J Mol Catal B: Enzymatic* 133 (1):S53-S59
5. Palyzova, A., **Zahradník, J.**, Marešová, H., Sokolovská, L., Kyslíková, E., Grulich, M., Štěpánek, V., Řezanka, T., Kyslík, P. (2017) Potential of the strain *Raoultella* sp. KDF8 for removal of analgesics. *Folia Microbiol* 63(3), 273-282
6. **Zahradník, J.**, Nunvar, J., Pařízková, H., Kolářová, L., Palyzová, A., Marešová, H., Grulich, M., Kyslík, P. (2018) *Agrobacterium bohemicum* sp.nov. isolated from poppy seed wastes in central Bohemia. *Syst Appl Microbiol* 41(3), 184-190
7. **Zahradník, J.**, Kolenko, P., Palyzová, A., Černý, J., Kolářová, L., Kyslíková, E., Marešová, H., Grulich, M., Nunvář, J., Šulc, M., Kyslík, P., Schneider, B. (2018) Bacterial Old Yellow Enzymes exhibit autogenic blocking of FMN binding site as reveals a crystal structure of XdpB one member. *PLoS ONE* 13(4): e0195299.
8. **Zahradník, J., Kolářová, L., Pařízková, H., Kolenko, P., Schneider, B. (2018) Interferons type II and their receptors R1 and R2 in fish species: Structure, function & evolution. *Fish Shellfish Immunol* 79, 140-152**

### Genomické reporty / Reports

1. **Zahradník, J.**, Kyslíková, E. Kyslík, P. (2016): Draft Genome Sequence of *Agrobacterium* sp. Strain R89-1, a Morphine Alkaloid-Biotransforming Bacterium. *Genome Announc* 4(2): e00196-16
2. **Zahradník, J.**, Plačková, M., Palyzová, A., Marešová, H., Kyslíková, E., Kyslík, P. (2017) Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* JM1, strain exhibiting valacyclovir-like hydrolase activity isolated from a soil polluted by industrial production of beta-lactam antibiotics. *Genome Announc* 5(38): e00921-17