

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Strukturní studie serpinu IRS-1 z *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Rudolf Binder

Školitel: Tatyana Prudnikova, MSc. Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.

České Budějovice 2021

Binder, R., 2021: Strukturní studie serpinu IRS-1 z *Ixodes ricinus*. [Structural study of serpin IRS-1 from *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] – 62 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis deals with the crystallization and the structure studies of serpin IRS-1 from *Ixodes ricinus*. The work aims on mastering the basic crystallization techniques, which are then used to obtain crystals of IRS-1. Furthermore, the structure of the serpin is analyzed and discussed there.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

.....

Místo a datum

.....

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Tatyane Prudnikové, MSc. Ph.D. za vedení bakalářské práce a za cenné připomínky. Také bych chtěl poděkovat konzultantovi Mgr. Michalovi Kutému, PhD. za přátelský přístup a rady.

Největší dík patří mé rodině a přátelům za jejich podporu a pochopení při psaní celé bakalářské práce.

Obsah

3. Úvod	1
4. Cíle práce	2
5. Přehled literatury	3
5.1. Ixodes ricinus	3
5.1.1. Výskyt	3
5.2. Proteázy.....	4
5.2.1. Vliv na rozvoj rakoviny.....	4
5.3. Proteázové inhibitory (PI)	5
5.3.1. α 2-macroglobuliny	6
5.3.2. Inhibitory typu Kunitz.....	6
5.3.3. Inhibitory typu Kazal	6
5.3.4. Využití inhibitorů	7
5.4. Serpiny	7
5.4.1. Nativní a latentní konformace	8
5.4.2. Mechanismus inhibice.....	11
5.4.3. Chybné skládání	14
5.4.4. Zástupci serpinů a jejich funkce.....	16
5.5. Serpiny v spojitosti s klíšťaty.....	17
5.5.1. Serinové PI s biologickou rolí.....	18
5.5.2. Serinové PI v modulování hostitelské odpovědi obratlovců.....	19
5.5.3. Serinové PI zapojené do rozvoje patogenů a jejich přenos	20
5.6. Krystalizace.....	20
5.6.1. Krystalizace metodou difúze par.....	22
5.6.2. Krystalizace metodou dávkování	23
5.7. Phyre2	23
5.8. Chimera.....	24
6. Materiál a metody	27
6.1. Krystalizace Lysozymu	27
6.2. Krystalizace IRS-1	29
6.3. Odhad struktury.....	30
7. Výsledky	33
7.1. Krystalizace.....	33
7.2. Odhad struktury.....	38
7.2.1. Normální mód	38
7.2.2. Výsledky normálního módu	44

7.2.3.	Intenzivní mód.....	47
7.2.4.	Porovnání výsledků normálního a intenzivního módu.....	48
8.	Diskuse.....	51
9.	Závěr.....	54
10.	Seznam použité literatury.....	56
10.1.	Seznam internetových zdrojů.....	59
10.2.	Seznam použitých komerčních kitů a dalších pomůcek.....	60
11.	Seznam použitých zkratk.....	61
11.1.	Seznam zkratk aminokyselin.....	61
12.	Seznam příloh.....	62

3. Úvod

Velmi rozšířeným zástupcem čeledi klišťatovitých v Evropě je *Ixodes ricinus*. Tento druh přenáší velké množství patogenů spojené s lidskými nemocemi, především *Borrelia burgdorferi s.l.*, který způsobuje lymfskou boreliózu. Díky rozšíření klišťate především v České republice je třeba se zabývat látkami, které klišťe využívá při svém životním cyklu.

Takovými látkami jsou i serpiny. Tyto proteázové inhibitory využívá *Ixodes ricinus* pro biologické účely jako je trávení, imunita a vývoj vajíček. Ve vztahu k hostiteli je podstatné využívání serpinů k rozvoji patogenů a k ovlivňování odpovědi imunitního systému hostitele. Mnoho serpinů však ještě není prozkoumáno a nejsou přesně známy ani jejich role. Čím větší bude naše pochopení funkcí látek *Ixodes ricinus*, tím rychlejší a snazší bude možný vývoj léčiv proti nemocem, které způsobují přenášené patogeny.

Pro zkoumání proteinů (v této práci konkrétně serpinů) je využíváno metody rentgenové difrakce. Díky ozáření krystalu proteinu rentgenovými paprsky je možné zjistit jeho sekundární strukturu, z čehož je následně možné vyvodit funkčnost proteinu a jeho různé role. Tato metoda je nejspolehlivější, je k ní však zapotřebí vypěstovat krystal proteinu. Tento proces je pro každý protein specifický a je závislý na mnoha faktorech, konkrétně např. na činidle a jeho koncentraci, pH, teplotě a na samotné délce doby krystalizace. Pro potřeby krystalizace byly za řadu let vyvinuty různé techniky, nejpoužívanější na principu difúze par – sedící kapka („sitting drop“) a visící kapka („hanging drop“).

V současné době je i možné sekundární strukturu proteinu odhadnout. Předpokladem pro odhad struktury je, že v evoluci jsou struktury proteinů uloženy více než jejich sekvence. Dále je to také fakt, že v přírodě existuje malý počet unikátních foldů a tento počet je především konečný. Těchto faktů využívají nejrůznější nástroje výpočetní techniky, které na základě sekvence a jejího porovnání s knihovnami již známých proteinových struktur odhadují strukturu ještě neznámého proteinu.

Nejprve byly v práci vyzkoušeny a osvojeny základní metody krystalizace na modelovém proteinu Lysozymu. Dále je zkoumán serpin IRS-1 z *Ixodes ricinus*. Pomocí krystalizace byly připraveny krystaly, které následně podstoupily rentgenovou difrakci. Pomocí internetového nástroje Phyre2 byla odhadnuta a analyzována struktura tohoto serpinu. Struktury IRS-1 byly zobrazeny pomocí programu na zobrazování a vizualizaci struktur proteinů UCSF Chimera.

4. Cíle práce

1. Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu.
2. Charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů.
3. Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly proteinu IRS-1 v difrakční kvalitě.
4. Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data.
5. Zvládnout základní techniky dockingu a molekulové dynamiky.

5. Přehled literatury

5.1. *Ixodes ricinus*

Ixodes Ricinus (česky klíště obecné) je řazeno do čeledi klíšťatovitých (*Ixodidae*). Samečci mají hnědou barvu a dosahují délky 2,5 mm a šířky 1,5 mm. Oproti tomu samičky jsou zbarveny do žluta a jejich rozměr délky a šířky je 4 mm a 3 mm (po nasátí však mohou být dlouhé až 11 mm, 7 mm široké a mění barvu na olověnou) (Kavina 1940).

Po odpadnutí od hostitele samička klade 500–1000 vajíček do vlhké země. Za 3–5 dní vylézají z vajíček šestinohé larvy. Ty se přichytávají na savce a sají jeho krev. Po několika týdnech se mění larvy na osminohé nymfy, které opět sají krev, ale na jiném hostiteli. Dospělá klíšťata se z nich stávají po osmi týdnech (Kavina 1940).

Ve všech životních stádiích klíštěte je využívána technika „přepadení“, kdy se klíště na hostitele dostane z vegetace. Živí se na teplokrevných i studenkrevných obratlovcích (hlodavci, ještěrky) a na větších savcích (ježci, zajáci, veverky, hospodářská zvířata) (Medlock et al. 2013).

Klíšťata přenášejí celou řadu patogenů, např. (v závorkách jsou uvedené způsobované nemoci) *Borrelia Burgdorferi s.l.* (lymská borelióza), *Anaplasma phagocytophilum* (lidská granulocytární anaplazmóza), *Francisella tularensis* (tulamérie) a *Rickettsia monacensis* (skvrnitá horečka rickettsiíza). V letech 2000–2010 se v alespoň devíti státech Evropy zvýšil výskyt lymské boreliózy. Důvodem může být změna geografické distribuce klíštěte, anebo změna lidské aktivity, která vede k častějšímu kontaktu s klíšťaty (Medlock et al. 2013).

5.1.1. Výskyt

Na hřbetu mají klíšťata buňky citlivé na světlo a také disponují senzorickými orgány. Proto mohou detekovat úroveň světla, teplotu, vlhkost nebo vibrace (k rozpoznání přítomnosti hostitele). K přežití potřebují v období bez hostitele alespoň 80% vlhkost. Typické oblasti výskytu klíštěte jsou opadavé i jehličnaté lesy, vřesoviště, rašeliniště, pastviny a parky. V severních oblastech Země klíšťata přežijí i teploty pod 0°C. Vyskytují se v celé Evropě – od Irska po Ural a od Švédska po sever Afriky. Jeho přizítí i výskyt je ovlivňován globálním oteplováním (Medlock et al. 2013).

5.2. Proteázy

Jedná se o enzymy, které se uplatňují při metabolismu proteinů v živých organismech. Jejich role spočívá v hydrolýze peptidových vazeb polypeptidů a proteinů (Agbowuro et al. 2018). Tímto štěpením mohou proteázy získat, ale i ztratit funkci v závislosti na povaze substrátu (Zani & Moreau 2010). Krom proteolýzy také zastávají roli v buňkách, kde regulují exprese genů, dělení buněk a jejich smrt (Eatemade et al. 2017). V lidském genomu jsou zastoupeny skoro ze 6 % (u bakterií a virů se jedná o 1–5 %) (Agbowuro et al. 2018). K roku 2017 bylo známo 990 proteázových genů a 1605 genů proteázových inhibitorů (Eatemade et al. 2017).

Proteázy se dělí podle aminokyseliny, která se nachází v jejich aktivním místě na cysteinové, threoninové, serinové, aspartátové, proteázy glutamové kyseliny a matricové metaloproteázy (Agbowuro et al. 2018). Dále je možno je dělit podle mechanismu štěpení vazby (Eatemade et al. 2017). Cysteinové, threoninové a serinové proteázy fungují na principu tvorby acyl-enzym komplexu, přičemž následně dochází ke štěpení proteinu a uvolnění dvou produktů (karboxylátu a aminu). Proteázy aspartátové, proteázy glutamové kyseliny a metaloproteázy hydrolyzují peptidovou vazbu za použití molekul vody, které vazbu nukleofilně napadají (Agbowuro et al. 2018).

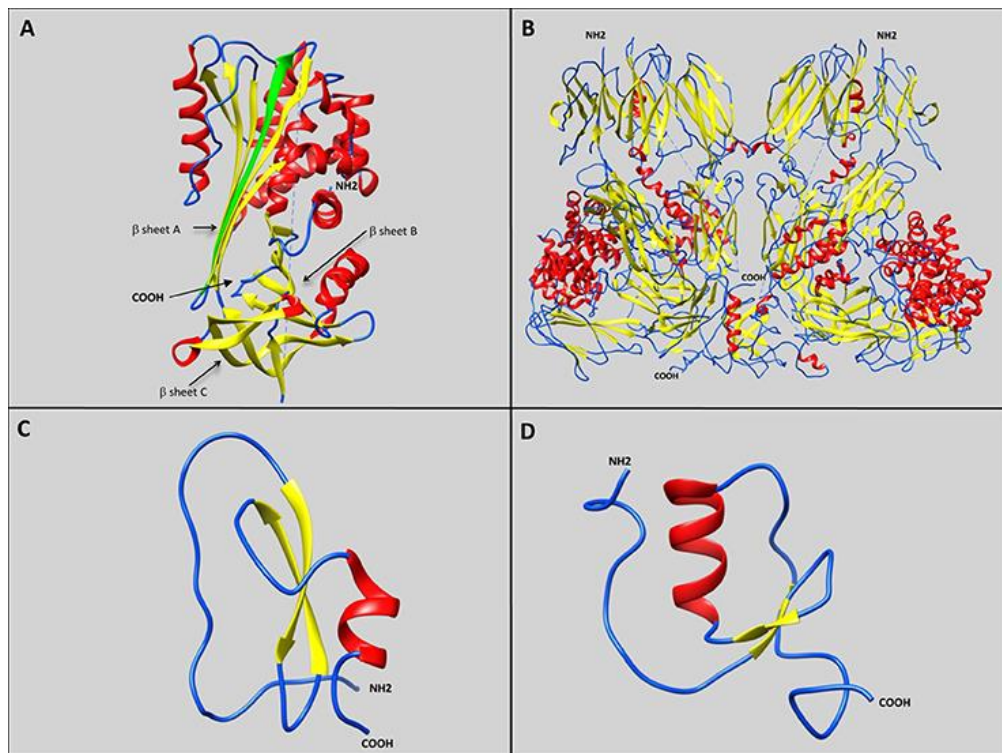
Celá řada proteáz je spojena s nemocemi a poruchami. Jde např. o rakovinu, různé záněty, osteoporózu, neurodegenerativní poruchy a parazitická, bakteriální a virová onemocnění. Právě proto jsou vyvíjeny léky, které inhibují proteázy reverzibilně i nereverzibilně (Zani & Moreau 2010). Takové inhibitory proteáz mohou rozvinout imunitu, opravit tkáň, léčit záněty a degradovat některé alergeny (alergeny jsou často cysteinové a serinové proteázy) (Smith & Harper 2006).

5.2.1. Vliv na rozvoj rakoviny

Proteázy mají vliv na růst a progresi rakoviny jak v primární fázi, tak i v metastázi. Nádorové buňky stimulují exprese proteáz v okolí zdravých buněk, aby zneužívaly jejich aktivitu k rozvoji rakoviny. Již v brzkých fázích rakoviny byly zjištěny zvýšené hladiny proteáz, které, jak se později ukázalo, jsou zapojeny v mnoha aspektech rakoviny, např. v imunitní odpovědi, apoptóze, proliferaci a náboru zánětlivých buněk (Eatemade et al. 2017).

5.3. Proteázové inhibitory (PI)

Proteázové inhibitory jsou děleny podle dvou kritérií. Podle jejich specifity na serinové a cysteinové PI a podle struktury pak na serpiny, inhibitory typu Kunitz, inhibitory typu Kazal a inhibitory s doménami bohatými na cystein podobné trypsinovým inhibitorům (α 2-macroglobuliny) (Prudnikova 2020). Serpinům bude v práci věnováno více prostoru v samostatné kapitole, proto zde budou popsány ostatní druhy PI.



Obrázek 1: Reprezentativní schématické diagramy čtyř sekundárních struktur serinových PI: (A) serpiny, (B) α 2-macroglobuliny, (C) PI typu Kunitz, (D) PI typu Kazal (Blisnick et al. 2017;

kvůli kvalitě staženo z <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00199/full>, dne 24. 2. 2021).

Na Obr. 1 jsou ohyby označeny modře, β -sheety žlutě a α -helixy červeně. Na obrázku A je zeleně označen β -strand, který vznikl proteolýzou.

5.3.1. α 2-macroglobuliny

Většinou se jedná o tetramery (existují i monomery a dimery) složené z párových podjednotek spojené disulfidickými můstky (Obr. 1 B). Jsou součástí včasné imunitní odpovědi, avšak jejich role při útoku patogenů (proteáz) není objasněná. Způsob inhibice spočívá v navázání enzymu thiol-esterovou vazbou, kterou je možno přerušit malými aminy (např. methylamin). Jejich další role může být transport hormonů a samotnou inhibicí mohou chránit aktivní místa proteáz před molekulami s velkou molekulovou hmotností (Prudnikova 2020).

5.3.2. Inhibitory typu Kunitz

Tyto PI inhibují proteázy serinového typu a mohou obsahovat až několik Kunitz domén. Kunitz doména se skládá ze dvou β -sheetů a jednoho α -helixu, který je stabilizován třemi disulfidickými můstky vzniklými mezi šesti cysteiny (Obr. 1 C). Tyto inhibitory se vyskytují ve velkém množství ve slinách a slinných žlázách klíšťat. Jedná se o malé proteiny s molekulovou hmotností 20 kDa a méně (samotná Kunitz doména váží kolem 7 kDa) (Prudnikova 2020).

Mechanismus inhibice spočívá ve vytvoření těsné nekovalentní vazby (podobně jako Michaelisův komplex enzym-substrát) s aktivním místem serinové proteázy bez konformační změny. Vytváří se tak β -sheet mezi enzymem a inhibitorem – částečně stabilní substrát-inhibitor komplex. Díky odkrytému RCL mají možnost inhibovat velký počet různých proteáz. Jejich další funkcí je např. blokáce iontových kanálů a fungují jako hadí toxiny (Blisnick et al. 2017).

5.3.3. Inhibitory typu Kazal

Kazalové inhibitory mohou obsahovat dvě až patnáct Kazalových domén. Každá taková doména obsahuje 40 až 60 aminokyselin o různých sekvencích a šest zakonzervovaných cysteinových reziduí, která mohou vytvořit tři podoblasti spojené disulfidickými můstky. V doméně se vyskytuje jeden α -helix, 3 β -sheety a neuspořádaná struktura (Obr. 1 D). Tak je vytvořen prostor, kam se může přesně vejít aktivní místo dané proteázy, která je následně stechiometricky zablokována ve vzniklém poměrně stabilním komplexu proteáza-inhibitor (Prudnikova 2020). I když se jedná o nekovalentní vazbu, spojení

komplexu je pevné a inhibice velmi silná (Blisnick et al. 2017). Díky tomu mohou PI tohoto typu inhibovat několik cílů, např. trypsin, plasmin, chymotrypsin a trombin (Prudnikova 2020).

5.3.4. Využití inhibitorů

PI mohou být používány k léčbě některých nemocí, např. k léčbě plicní embolie a k prevenci mrtvice u pacientů s fibrilací síní (dabigatran). Také se mohou používat klinicky pro řízení infekčních nemocí, jako je třeba HIV/AIDS nebo infekce hepatitidou C (Agbowuro et al. 2018). Některé mohou být použity při léčbě rakoviny. Toto využití je však složité, jelikož ve všech fázích rozvoje rakoviny je zapojeno mnoho proteáz a jedním inhibitorem je nelze všechny pokrýt (Eatemade et al. 2017).

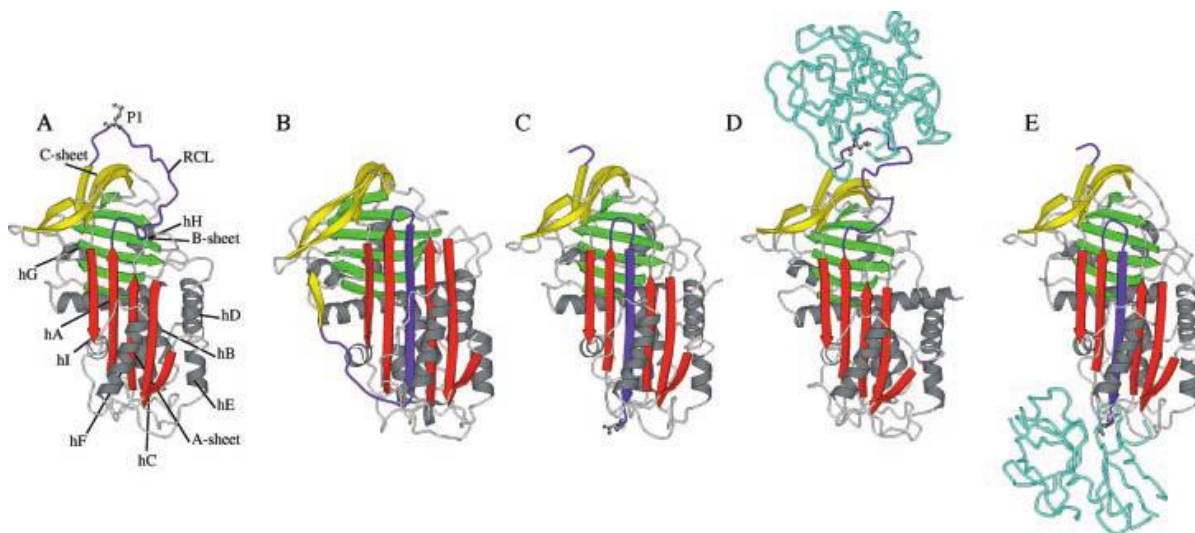
5.4. Serpiny

Serpiny („serine protease inhibitors“) jsou skupina PI, objevená v roce 1994 (Silverman et al. 2001). S více než 1500 zástupci se jedná o nejvíce studovanou skupinu PI (Chmelař et al. 2017). Serpiny jsou jediné inhibitory, které jsou přítomné ve všech třech životních říších: eukaryota, bakterie a archea (a také některé viry) (Fulton et al. 2005). Jedna molekula obsahuje 350–500 aminokyselin (Silverman et al. 2001). Hmotnost takové molekuly se pak pohybuje od 35 k 45 kDa (Whisstock & Bottomley 2006). Nové studie postupně odkrývají princip navázání proteáz, i nové biochemické a biologické funkce. Většina serpinů inhibuje proteázy ze skupiny chymotrypsinů (Silverman et al. 2001). Jejich mechanismus inhibice se může zdát zbytečně komplikovaný, ale právě z něj vyplývají evoluční výhody – díky konformační změně se serpiny chovají jako molekulární senzory proteolýzy, které mohou signalizovat přítomnost proteáz okolním molekulám (Whisstock & Bottomley 2006).

Serpiny zastávají i další role, jako např. transport hormonů (SERPINA6 – globulin, který váže hormony štítné žlázy; SERPINA7 – globulin, který váže kortikosteroidy) a regulace krevního tlaku (SERPINA8 – angiotenzin). Vzhledem k nelineárnímu vztahu mezi počtem genů serpinů a celkovým počtem genů lze očekávat, že si část serpinů osvojila různé a odlišné funkce (Silverman et al. 2001). Dysfunkce serpinů způsobují alespoň zčásti různé nemoci – emfyzém, cirhózu, angioedém, hypertenzi nebo dokonce familiární demenci (Chmelař et al. 2017).

5.4.1. Nativní a latentní konformace

Sekundární struktura serpinů se skládá ze tří β -sheetů pojmenovaných A, B a C a z alespoň 7 α -helixů (typicky však z 9), které jsou také pojmenovávány dle abecedy (Obr. 2 A) (Silverman et al. 2001). Mezi β -sheety A a C se nachází flexibilní neuspořádaná struktura sestávající z 20 až 25 aminokyselin, která se nazývá RCL („reactive centre loop“). RCL slouží jako návnada pro proteázu a její rozpoznání (inhibitorová specifita). Tato tzv. nativní struktura serpinů existuje v dynamické rovnováze buď s Michaelisovým komplexem (s neaktivní navázanou proteázou) nebo v konformacích, kde je RCL buď částečně vsunuto do β -sheetu A (Obr. 3 A) nebo je plně vyloučeno v podobě ohybu (Obr. 3 B) (Whisstock & Bottomley 2006). Právě změnou konformace RCL, β -sheetu A a vlákna β -sheetu C (s1C) mění serpiny zásadně svou strukturu (Silverman et al. 2001).



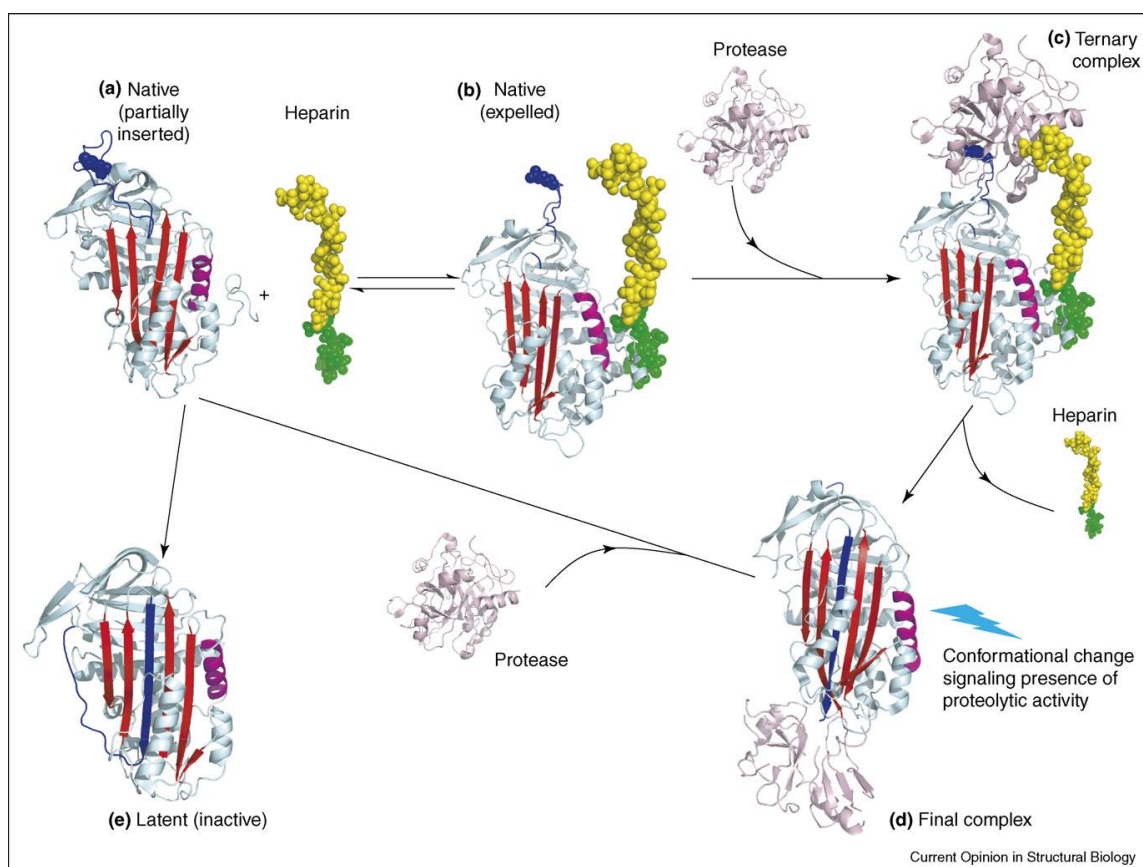
Obrázek 2: Struktury serpinu: (A) nativní konformace, (B) latentní konformace, (C) latentní konformace s odštěpeným RCL, (D) Michaelisův komplex, (E) kovalentní komplex (Silverman et al. 2001; kvůli kvalitě staženo z https://www.researchgate.net/figure/Serpin-structures-From-left-to-right-A-native-1-AT-Protein-Data-Bank-PDB-entry_fig2_232316225?hcb=1, dne 24. 2. 2021, dne 24. 2. 2021).

Na Obr. 2 jsou A-sheety vyznačeny červeně, B-sheety zeleně, C-sheety žlutě, α -helixy jsou šedé a RCL je fialové. Proteáza (zde trypsin) je tyrkysová.

Při změně konformace se RCL zasune doprostřed β -sheetu A a vytvoří tak plně antiparalelní β -sheet (Obr. 2 B). Při svém „putování“ RCL vytrhává s1C z β -sheetu C, které putuje s ním a vzniká tak nechráněný ohyb ze spodní strany serpinu. Taková konformace

serpinu se nazývá latentní. Je více stabilní než nativní, a procesem denaturace a zpětného skládání se může serpin navrátit do původní konformace. Serpin v latentní konformaci již nemůže inhibovat proteázy (Silverman et al. 2001). Těto konformační změně se také říká tranzice od S k R (S – stresovaný, R – relaxovaný) (Fulton et al. 2005).

Nejstabilnější konformace je pro serpiny forma, kdy je RCL plně vloženo mezi β -sheet A jako v latentní konformaci, ale s1C je odštěpeno od RCL (C-sheet tedy zůstane v původním stavu) (Obr. 2 C). Pro rozložení serpinu v této konformaci je odhadována teplota $T_m > 120\text{ }^\circ\text{C}$, kdežto v nativní konformaci se tato teplota T_m pohybuje kolem $60\text{ }^\circ\text{C}$ (Silverman et al. 2001). Na vyšší teploty jsou však serpiny citlivé – vznikají neaktivní polymery. Výjimkou je např. prokaryotický thermophin, který dokáže fungovat i v zahřátém prostředí (Fulton et al. 2005).

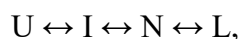


Obrázek 3: Výhody mechanismu serpinů: (A) nativní konformace s částečně vsunutým RCL + kofaktor, (B) nativní konformace s vyloučeným RCL, (C) trojitý komplex serpin-kofaktor-proteáza, (D) kovalentní komplex, (E) latentní konformace (Whisstock & Bottomley 2006).

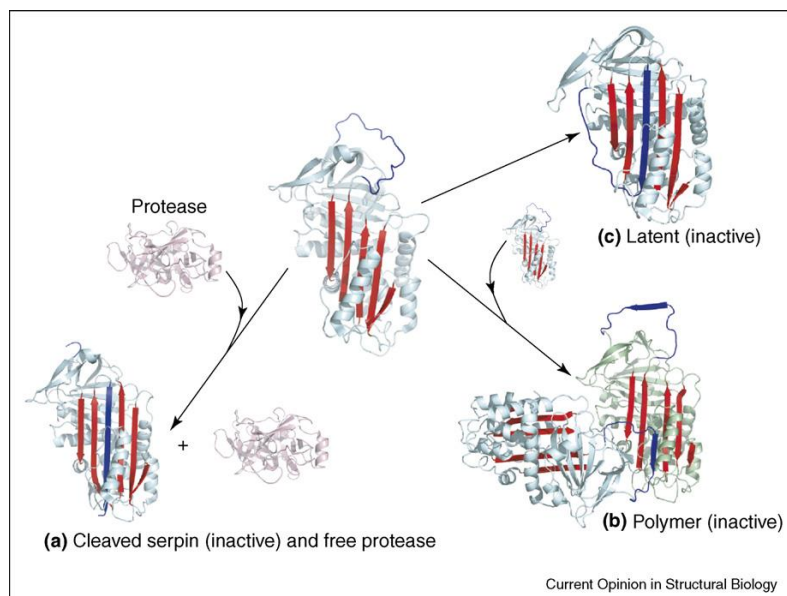
Červeně je na Obr. 3 znázorněn A-sheet, modře RCL a růžově pak jeden α -helix. Zeleně jsou vyznačeny pentasacharidové sekvence a žlutě kofaktor heparin, proteáza poté růžově.

Většina serpinů v nativních konformacích je o dost více flexibilní, než bylo původně předpokládáno. Tím pádem interakce s proteázou s následným odštěpením RCL může fungovat k rychlému posunu v rovnováze směrem k částečně vsunuté konformaci (Obr. 3 A) a následně vyústit k plnému vsunutí RCL (Obr. 3 E). Některé serpiny mají zabudovaný mechanismus, díky kterému samy podstupují změnu do inaktivní monomerické latentní konformace. Tato latentní forma je u mnoha serpinů spojována s onemocněními. Pro některé serpiny však může i latentní konformace představovat správný funkční výsledek (Whisstock & Bottomley 2006).

Touha serpinu po termodynamické stabilitě může vyústit právě ve vznik neaktivních konformací. Přestože je však pro serpiny termodynamicky výhodnější latentní konformace, většina serpinů zůstává překvapivě v nativním stavu a předčasně přerušují přechod na latentní konformaci (Obr. 7). Minimální cesta pro serpinové skládání by mohla být znázorněna jako (Whisstock & Bottomley 2006):



kde U zastupuje nesložený soubor serpinu, I zastupuje přechodný stav – částečně složený soubor serpinu, N zastupuje přirozeně složený serpin a L zastupuje latentní konformaci serpinu. Finální krok $N \rightarrow L$ ve skládání není dostatečně objasněn. Může však být podobný kroku $N \rightarrow I^*$ (kde I^* zastupuje již odštěpený serpin z komplexu serpin-enzym), jelikož v obou konformacích je RCL vloženo do β -sheetu A. Obě konformace L i I^* si jsou podobné jak strukturně, tak i vysokou teplotní stabilitou. Z toho vyplývá, že interakce s proteázou a její následné odštěpení od RCL buď snižuje kinetickou bariéru nebo nabízí alternativní energetickou cestu k více stabilním konformacím (Whisstock & Bottomley 2006).



Obrázek 4: Nevýhody mechanismu serpinů: (A) rozštěpený neaktivní serpin + „uniklá“ proteáza, (B) neaktivní polymer (zde dimer), (C) neaktivní latentní konformace (Whisstock & Bottomley 2006).

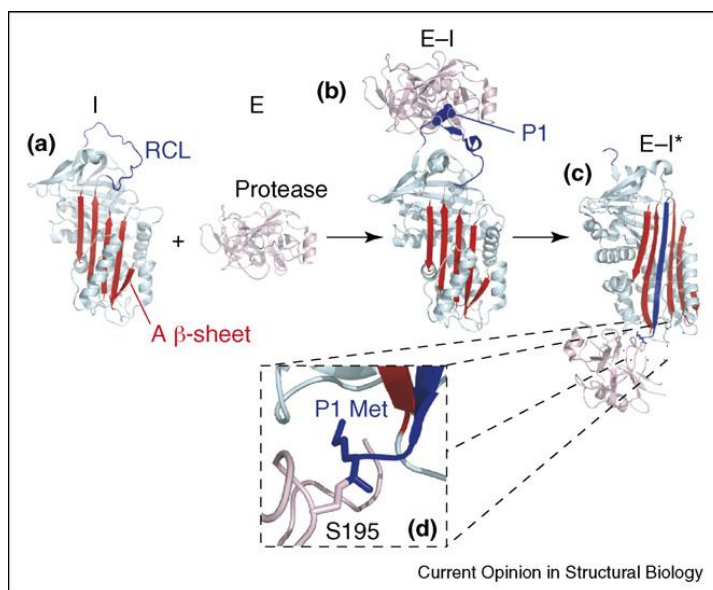
Barevné schéma Obr. 4 je shodné s barevným schématem Obr. 3

Meziprodukty mohou zpomalovat proces skládání serpinu. Pokud se totiž jedná o meziprodukty v nenativním stavu, mohou kineticky bránit serpinu změnit konformaci a ten tak zůstane v konformaci nativní. To může být odpovědí na otázku, proč se serpiny zdržují v nativním stavu, když je pro ně výhodnější latentní konformace. Konkrétní mechanismus by mohl zahrnovat interakci β -sheetu A (serpin v nativním stavu) s rezidui F-helixu (serpin v latentním stavu). Vršek F-helixu se může vsunout mezi β -strandy 3A a 5A a tím zablokovat místo pro vsunutí RCL. Tím pádem je serpin chráněn před přechodem do latentního stavu. Stejně tak je však chráněn před vsunutím RCL jiného serpinu, tudíž je zabráněno i tvorbě polymerů (Obr. 4 B) (Whisstock & Bottomley 2006).

5.4.2. Mechanismus inhibice

Inhibice serinových proteáz probíhá substrátovým mechanismem. Nejdříve serpin vytvoří nekovalentní Michaelisův komplex (Obr. 5 B) pomocí interakcí rezidua proteázy s P1 reziduem serpinu. Následně se díky serinu v aktivním místě vytvoří kovalentní esterová vazba s karbonylem P1 rezidua serpinu (Obr. 5 D) a dochází k rozštěpení peptidové vazby. Nejspíše v této fázi se začne RCL vsouvat do β -sheetu A spolu s kovalentně navázanou proteázou. Jelikož je tento proces již nevratný, je pro serpin „vražedný“ a přezdívá se mu tudíž

sebevražedný mechanismus (Silverman et al. 2001). Díky tomuto mechanismu však serpiny mohou kontrolovat, a hlavně odstraňovat proteázy z biologických systémů (Whisstock & Bottomley 2006).



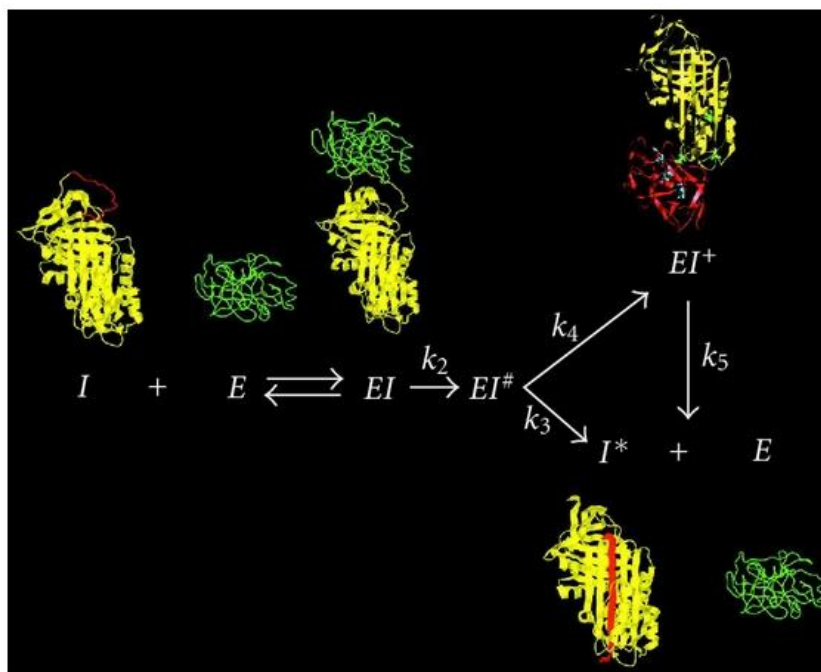
Obrázek 5: Mechanismus inhibice serpinů: (A) latentní konformace, (B) Michaelisův komplex, (C) kovalentní komplex, (D) kovalentní vazba (Whisstock & Bottomley 2006).

Barevné schéma Obr. 5 je shodné s barevným schématem Obr. 3

Pro správnou inhibici potřebuje řada serpinů kofaktory (Obr. 3 A) (Fulton et al. 2005). Ty umožňují serpinům navázat danou proteázu a zrychlit jejich vzájemnou interakci. Kupříkladu antithrombin (Obr. 3 A) má v nativním stavu částečně vsunuté RCL a P1 reziduum vytváří solný můstek s Glu237 umístěným v těle serpinu. Kvůli tomu je P1 částečně uzavřeno a antithrombin je docela špatný inhibitor. Při interakci s kofaktorem (Obr. 3 B) je RCL vytrženo a P1 je otočeno do opačné pozice, čímž je snadněji přístupné pro interakci s proteázou (Whisstock & Bottomley 2006).

Po dokončení změny konformace je proteáza přemístěna o 75 Å a její aktivní místo je zdeformované a neaktivní (Fulton et al. 2005). Po inhibici asi 40 % těla proteázy nevykazuje žádnou elektronovou hustotu. Zkreslení a následná deaktivace proteázy vychází z její komprese vůči serpinu, která nastává díky správné délce RCL. Stabilita vzniklého komplexu serpin-proteáza je mnohem větší než stabilita serpinu v nativním stavu. Díky konformační změně se proteáza ocitne v kinetické pasti, jelikož krok deacylace je oproti normální substrátové reakci zpomalený o 6-8 řádů (k_5 na Obr. 6). Není však znám bod v přesunu, kdy je aktivita enzymu natolik snížena, že se enzym v této pasti ocitne (Silverman et al. 2001).

Deaktivace a zkreslení proteázy se pravděpodobně stane relativně rychle, aby se komplex vyvaroval hydrolyze a uniknutí aktivní proteázy (Whisstock & Bottomley 2006). Rychlosti (Obr. 6) tvorby kovalentního komplexu z Michaelisova komplexu musí být tedy vyšší, než rychlost hydrolyzy a následné deacylace.



Obrázek 6: Osud serpinu a proteázového komplexu: (I) serpin, (E) proteáza, (EI) nekovalentní Michaelisův komplex, ($EI^\#$) acyl-enzymový meziprodukt, (EI^+) kovalentní komplex, (I^*) odštěpený serpin (Silverman et al. 2001; kvůli kvalitě staženo z <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/354365/?hcb=1>, dne 24. 2. 2021).

Na Obr. 6 je žlutě vyznačený serpin, zeleně volná serinová proteáza a červeně je označena kovalentně navázaná proteáza.

Pokud je RCL bráněno v pohybu, proteáza bude mít dostatek času provést deacylaci a uniknout (Obr. 4 A). Touto (neinhibující) cestou vzniká aktivní proteáza a neaktivní serpin. Poměr těchto dvou možných výsledků – komplex serpin-proteáza (Obr. 5 C) a neaktivní serpin + aktivní proteáza (Obr. 4 A) odráží soutěž mezi hodnotou hydrolyzy esteru (k_3 v Obr. 6) a vložení smyčky RCL do β -sheetu (k_4 v Obr. 6). Tento poměr lze také popsat jako počet molů serpinu potřebných k inhibici jednoho molu proteázy v kineticky uvězněném komplexu – $(k_3 + k_4)/k_4$ na Obr. 6 (Silverman et al. 2001).

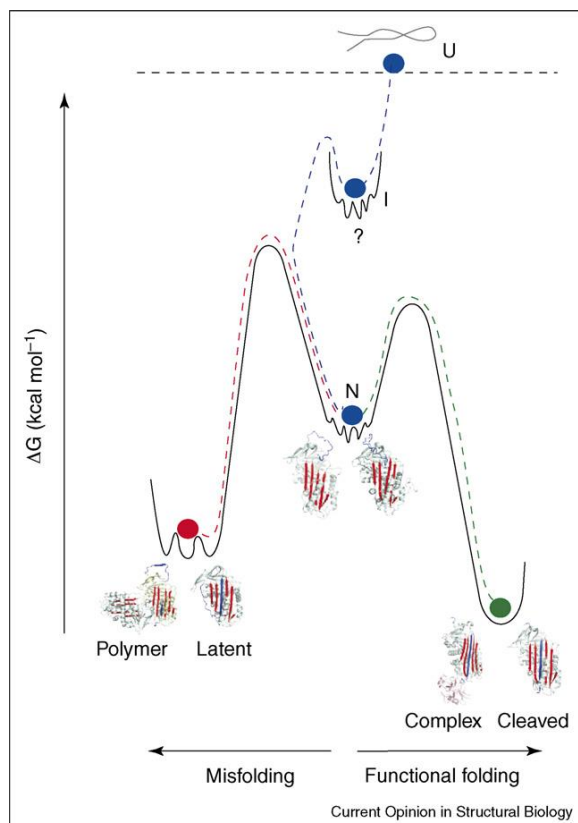
Důležité parametry pro úspěšnou inhibici proteázy serpinem jsou:

- 1) Délka RCL (Silverman et al. 2001).
- 2) Vhodná rezidua v RCL, která souvisí s rychlým a příznivým vsunutím RCL do β -sheetu A (Silverman et al. 2001).
- 3) Přítomnost serinu v aktivní místě proteázy (možná i inhibice cystein proteáz, akorát uvězněný je thiol ester) (Silverman et al. 2001).

5.4.3. Chybné skládání

Nežádoucí vsunutí RCL kvůli potřebě stabilnější konformace serpinu mohou zapříčinit přírodní mutace (Silverman et al. 2001). Tyto mutace způsobují celou řadu nemocí (serpinopatie) právě díky chybnému složení serpinu (Fulton et al. 2005). Pokud se RCL vsune do β -sheetu jiného serpinu, vznikají dimery až oligomery vyšších řádů (Obr. 4 B) (Silverman et al. 2001). Tyto polymery se mohou hromadit v endoplazmatickém retikulu, což může vyústit ve smrt buňky a poškození orgánů. Polymerizace může být vyvolána zahříváním (Fulton et al. 2005).

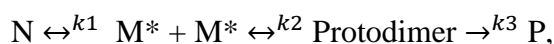
Od roku 1992 bylo identifikováno více než 40 variant pěti lidských serpinů (antitrypsin, antichymotrypsin, antithrombin, C1 inhibitor a neuroserpin), které způsobují výše zmíněné serpinopatie – nemoci způsobené chybným skládáním serpinů. Všechny varianty mají něco společného: schopnost podstoupit spontánní konformační změnu, sníženou teplotní stabilitu a formování polymerů (detekovány *in vivo* i *in vitro*). Předpokládá se, že jelikož jsou serpinové struktury schopné přijmout vlastní RCL, mohou přijímat také RCL dalších molekul. Tím pádem může být změna konformace serpinů považována za „závod“, kde se musí „vlastní“ nebo *cis* vložení RCL stát dostatečně rychle, aby bylo zablokováno „cizí“ nebo *trans* vložení RCL (Whisstock & Bottomley 2006).



Obrázek 7: Schématické energetické znázornění, zobrazující vztahy mezi skládáním a konformacemi (Whisstock & Bottomley 2006).

Na Obr. 7 je modře znázorněna zjednodušená cesta serpinu při skládání do nativní konformace. Následně serpin přechází do stabilnějších konformací: buďto chybným skládáním (červená barva) nebo funkčním skládáním (zelená barva).

Prvním krokem v polymeraci je formování M^* (nenativní konformace), které se vytváří při rychlé fázi nezávislé na koncentraci. M^* je vytvořeno přechodně a je nejspíše strukturně heterogenní. Předpokládá se, že M^* konformace vzniká po formaci nativního stavu (N) a je podobná (ale odlišitelná) od stavu meziprojektu (I) (Obr. 7), kterým musí serpiny projít při skládání do nativního stavu. Po zformování M^* polymerizační procesy vykazují pomalejší kinetické fáze, jejichž rychlosti rostou s rostoucí proteinovou koncentrací (Whisstock & Bottomley 2006).



kde N zastupuje nativní metastabilní monomerní formu serpinu; M^* zastupuje polymerogenní, konformačně změněný monomerní serpin; Protodimer je druh dimeru schopný disociace a P zastupuje polymer (Whisstock & Bottomley 2006).

Narušení vrcholu β -sheetu A částečným vsunutím RCL je důležité pro zahájení polymerizace. Zdá se možné, že pokud jsou serpiny nuceny podstoupit nechtěnou změnu konformace, zápasí spolu latentní konformace a polymerizace. Obě možnosti vyústí ve finální termodynamicky stabilní produkt, i když neaktivní (Whisstock & Bottomley 2006).

5.4.4. Zástupci serpinů a jejich funkce

Ov-serpiny byly vymezeny na základě jejich podobnosti s kuřecím ovalbuminem (ov) v roce 1993. Jejich N a C konce jsou kratší než u klasických serpinů a chybí jim sekreční signální peptid. K roku 2001 bylo známých 13 lidských ov-serpinů – všechny jsou (s výjimkou maspinu) funkcí kompetitivní inhibitory serinových a cysteinových proteáz. Někteří zástupci inhibují více než jednu proteázu, jelikož obsahují duální reakční místa – díky tomu mohou hrát roli při obraně hostitele před mikrobiálními nebo virovými proteázami (Silverman et al. 2001).

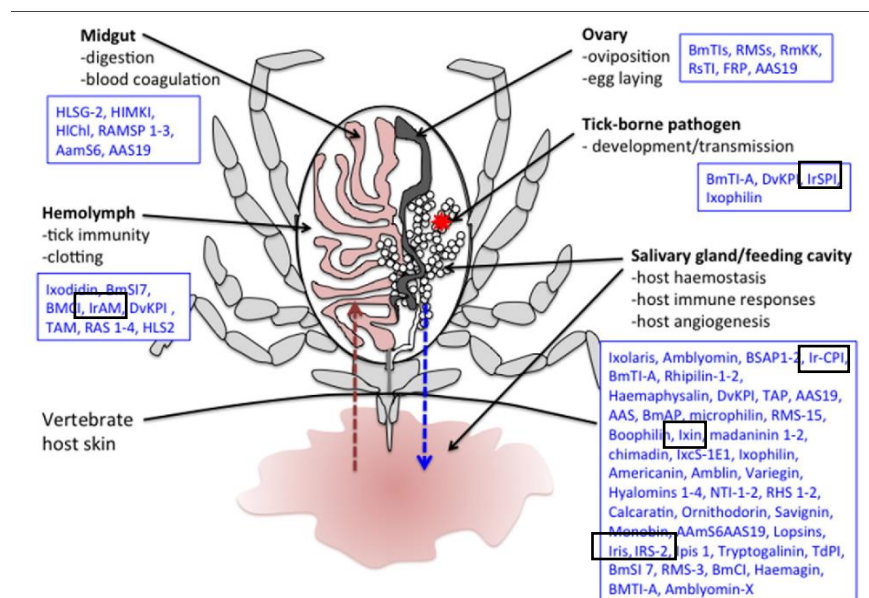
Vysoké hodnoty ov-serpinu PAI2 a nízké hodnoty uPA jsou spojovány s pozitivními nálezy rakoviny prsu (PAI2 inhibicí uPA může regulovat remodelování extracelulární matrix). Dále je možné, že PAI2 má strukturální roli v některých buňkách (keratinocyty). Endogenní nebo exogenní ov-serpiny mohou chránit okolní buňky před proteolytickým poškozením – studie na potkanech ukázaly, že rekombinantní MNEI dodáno do dýchacích cest předchází plicnímu zranění a má potenciál léčby zánětlivých plicních onemocnění (Silverman et al. 2001).

Neuroserpiny jsou vylučovány neurony, gliovými a neuroendokrinními buňkami. Inhibují tPA, uPA, trypsin a faktor nervového růstu γ . Z těchto inhibicí vyplývá, že mohou mít terapeutické využití při obraně mozku před ischemií (Silverman et al. 2001).

Rostlinné serpiny mohou inhibovat cíle serinových proteáz (Silverman et al. 2001). Studie prokázala, že proteáza (mcII-Pa) ze skupiny metakaspas může hrát roli v programované smrti rostlinných buněk. Tento výzkum poukazuje na možnou roli rostlinných serpinů v regulaci aktivity metakaspas (Whisstock & Bottomley 2006). Role rostlinných serpinů je dodnes velmi diskutována a málo prozkoumána.

5.5. Serpiny v spojitosti s klíšťaty

Serinové proteázy se nacházejí v klíštěcích hemocytech a hrají roli v přirozené imunitní obraně klíštěte nebo ve vývoji vajíček. Také jsou zapojeny do trávení krve a extrakci živin z hostitele (Obr. 8). Serinové PI jsou přímo spojené nejen se sekrecí látek při krmení klíšťat, ale také s modulací odpovědi hostitelského organismu – záněty, krevní sraženiny, hojení ran a vazokonstrikce (Obr. 8). Podle jejich rolí se dají klíštěcí serinové PI rozdělit na ty s biologickou rolí a na ty modulující hostitelské odpovědi obratlovců (Blisnick et al. 2017). Pro jeden inhibitor je často pozorován více než jeden efekt. Celý koncept fungování PI je výsledkem dlouhodobé společné evoluce klíštěte s jeho hostitelem (Chmelař et al. 2017).



Obrázek 8: Schématické znázornění klíštěte při krmení (Blisnick et al. 2017; kvůli kvalitě staženo z <https://www.semanticscholar.org/paper/Serine-Protease-Inhibitors-in-Ticks%3A-An-Overview-of-Blisnick-Foulon/aca9412041d4b4e35e44faa7cef23d2d5be1077f#extracted>, dne 10. 3. 2021).

Na Obr. 8 je znázorněno klíště při krmení. Červená hvězdička značí patogen v klíštěti. Červená šipka ukazuje směr absorpce krve, modrá šipka potom vstřikování slin do hostitele. V modrých rámečkách jsou modrým písmem vypsány jednotlivé serinové PI, které se nacházejí v daném orgánu klíštěte. Černými rámečky jsou označeny serinové PI druhu *Ixodes ricinus*.

Nejvíce klíštěcích patogenů je přenášeno na hostitele skrze sliny při sání krve. Látky v těchto slinách napadají obranu hostitele a tím vytváří příhodné prostředí pro přežití a roznos patogenů (Blisnick et al. 2017). Sliny se chovají také jako silné lepidlo, díky kterému se může klíště držet na místě (Kotsyfakis et al. 2015). Nejvíce jsou ve slinách zastoupené tři skupiny PI, které jsou vylučovány do slin: Kunitz inhibitory, serpiny a cystaniny (Chmelař et al. 2017).

Kazal inhibitory se v klíšťatech vyskytují pouze vzácně, přičemž není známá jejich funkce. Inhibitory typu Kunitz inhibují v hostiteli proces shlukování krevních destiček. V jiných organismech jsou inhibitory s jednou Kunitz doménou zapojené do blokad iontových kanálů a mohou mít stejnou roli i u klíšťat. Serpiny a cystaniny se chovají podobně jako Kunitz inhibitory, ale navíc mění hostitelský imunitní systém (Chmelař et al. 2017). Kromě těchto skupin obsahují sliny také lipocaliny a metaloproteázy (Kotsyfakis et al. 2015).

V *Ixodes ricinus* bylo nalezeno alespoň 36 serpinů v několika publikovaných prepisech. K roku 2017 bylo funkčně validováno skoro 20 serpinů z různých druhů klíšťat. Metodami validování byly *in vitro* testy, *in vivo* experimentální modely, očkování a RNA interferenční (RNAi) experimenty (Chmelař et al. 2017). V *Ixodes ricinus* se nacházejí tyto serinové proteázové inhibitory s uvedeným typem a jejich významem v závorkách: IrAM (α 2M; antimikrobiální aktivita), IrCPI (Kunitz; blokáce FXII, FXI a aktivace kallikreinu), IrSPI (Kunitz; modulace rozvoje *Bartonella henselae*), Ixin (typ neznámý; thrombin inhibitor), Iris (Serpín; inhibitor thrombinu a elastázových proteáz), IRS-2 (Serpín; modulace T buněčného dělení, T17 dospívání buňky a inhibitor chymasy a cythepsinu G) (Blisnick et al. 2017).

5.5.1. Serinové PI s biologickou rolí

Díky studiím (většina prováděna na druhu *R. (B.) microplus*) byly především v hemolymfě také objeveny serinové PI, které jsou zodpovědné za imunitní odpověď klíštěte vůči různým mikrobům. Jedná se například o Ixodidin (v hemocytech), který má silnou inhibující aktivitu vůči *Micrococcus luteus* a v menší míře také vůči *Escherichia coli*. Krom toho Ixodidin také inhibuje chymotrypsin a elastázové serinové proteázy. V hemolymfě *Ixodes ricinus* byl identifikován α 2M inhibitor IrAM, sestávající ze dvou kovalentně navázaných podjednotek. IrAM eliminuje bakterii *Chryseobacterium indologenes* a je mu přisuzována role v imunitním systému při fagocytóze bakterií produkujících metaloproteázy (Blisnick et al. 2017).

Zatím je velmi málo známo o proteinech, které se účastní formování sraženin hemolymfy. Díky homologii se známými proteiny je předpokládáno, že se na vzniku sraženin podílejí serinové PI. V *Rhipicephalus appendiculatus* jsou to např. serpin-1, -2, -3, a -4 (RAS-1, -2, -3, a -4) a v *Haemaphysalis longicornis* je to serpin HLS2 (Blisnick et al. 2017).

Klíšťata potřebují pro celkový rozvoj i rozmnožování krev. Vytvářejí na hostiteli krvácivá pole, ze kterých při kousání sají živiny. Vzhledem k tomuto způsobu potravy je možno vyvodit existenci efektivního vstřebávání krve a jejího následného trávení, v čemž hrají roli i serinové PI. Příkladem je serpin HLSG-2, který je hojně produkován ve středním střevě klíšťat a méně také ve slinných žlázách. Právě díky této vypozerované produkci je tento serpin vytvářen jako možné spojení procesů vstřebávání a trávení krve (Blisnick et al. 2017).

5.5.2. Serinové PI v modulování hostitelské odpovědi obratlovců

Při sání krve od hostitele klíšťata kontrolují jeho homeostázu a imunitu tím, že do hostitele vstříknou své sliny a poté z rány po kousnutí absorbují kapaliny. Aby k tomuto mohlo dojít a nedošlo k odmítnutí klíštěte hostitelem, obsahují sliny složky sloužící ke kontrole hostitelské odpovědi (také serinové PI) a k zabránění vzniku sraženin (Blisnick et al. 2017).

Inhibitorem u *Ixodes ricinus*, který inhibuje primárně tvorbu sraženin a výrobu thrombinu je IrCPI (typ Kunitz). Neinhibuje však navázáním katalytického místa jako klasický Kunitz inhibitor, ale raději se naváže na exosit (sekundární vazebné místo), čímž postaví enzymu sterickou překážku, která blokuje jeho aktivitu (Blisnick et al. 2017).

Sliny *Ixodes ricinus* obsahují Iris, jehož název vychází ze slovního spojení „*I. ricinus* immunosuppressor“ (Blisnick et al. 2017). Jedná se o první popsany klíštěcí serpin, který má efekt na hostitelský obranný mechanismus. RCL Irisu obsahuje methionin a cystein, přičemž postrádá signální peptid, což naznačuje jeho možnou intracelulární funkci (Chmelař et al. 2017). Také inhibuje proliferaci T-lymfocytů a slezinných buněk (Blisnick et al. 2017). Dokáže se navázat na monocyty anebo makrofágy a potlačit sekreci TNF (tumor necrosis factor). Tyto aktivity jsou kupodivu nezávislé na proteázové inhibující funkci Irisu (Chmelař et al. 2017).

Krom toho, jak už z názvu vyplývá, je Iris také silná imunosupresivní molekula. Jelikož klíšťata potřebují hodiny až týdny k dokončení svého krmení, vyvinuly si takové mechanismy, aby je hostitelský organismus neodmítl. Iris disponuje rychlou kinetikou, díky čemuž potlačuje a oddaluje zánět hostitelského organismu (Blisnick et al. 2017).

Dalším serpinem z *Ixodes ricinus*, který vykazuje specifickou anti-chymotrypsinovou aktivitu, je IRS-2 (Blisnick et al. 2017). Jedná se o druhý charakterizovaný serpin v tomto druhu klíšťat (Chmelař et al. 2017). Ve slinných žlázách je nejvíce produkován dva až šest dní po přisátí klíštěte, díky čemuž je odhadován jeho vliv na brzké fáze krmení. Inhibuje otékání tkání, migraci neutrofilů do zanícených tkání, a také ovlivňuje dělení T-lymfocytů (Blisnick et al. 2017) inhibicí produkce prozánětlivého cytokinu IL-6 (Chmelař et al. 2017). IRS-2 také ovlivňuje seskupování krevních destiček, které jsou indukované thrombinem (Blisnick et al. 2017).

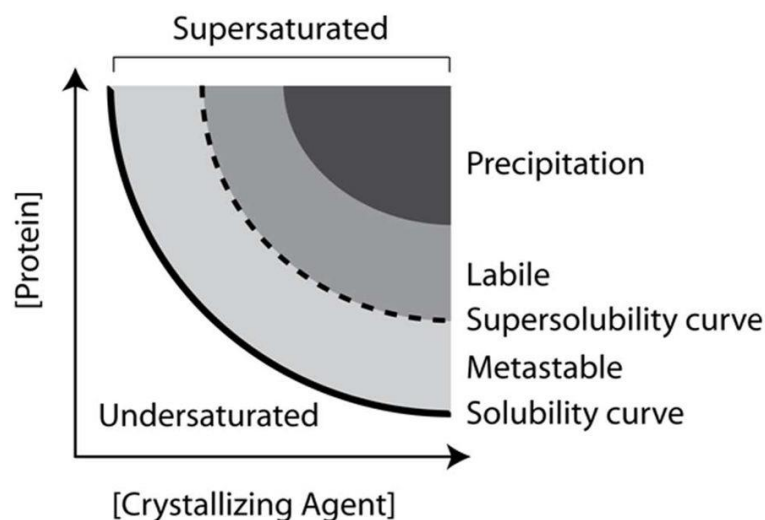
5.5.3. Serinové PI zapojené do rozvoje patogenů a jejich přenos

Díky všem látkám a procesům popsaným výše je vytvořeno ideální prostředí přispívající k přenosu patogenů a infekci hostitele. Buďto molekuly ulehčují vývoj patogenu v přenašeči (klíště) nebo podporují jejich přenos do obratlovců. Mezi těmito molekulami je i několik serinových PI, jejich přesný mechanismus působení však není znám (Blisnick et al. 2017).

IrSPI (vzniklý název ze slovního spojení „*Ixodes ricinus* serine protease inhibitor“) je inhibitor typu Kunitz, který má nejvyšší expresi hned po bakteriální infekci. Když byla v RNAi experimentech exprese IrSPI výrazně snížena, snížila se výrazně také hmotnost plně nakrmeného klíštěte, díky čemuž je mu přisuzována role v krmení se krví (Blisnick et al. 2017).

5.6. Krystalizace

Nejvíce struktur proteinů v Proteinové Data Bance (PDB) bylo určeno pomocí metod rentgenové difrakce. Jelikož však většina proteinů netvoří krystaly v difrakční kvalitě, je nutné jejich pěstování pomocí krystalizace. Krystaly vznikají, pokud molekuly proteinu vypadnou z rozpouštědla v uspořádaném stavu. Aby se tak stalo, je potřeba zajistit mnoho podmínek, např. správné pH a teplotu (Luft et al. 2011).



Obrázek 9: Schématické znázornění krystalizačního fázového diagramu proteinu, v závislosti koncentrace krystalizačního činidla na koncentraci proteinu (Luft et al. 2011).

Nenasycené („Undersaturated“) roztoky zůstanou v jedné kapalně fázi. Nasycení je stav roztoku, kdy krystaly zůstanou v rovnováze s okolním roztokem. Pokud by byl do nenasyceného roztoku umístěn krystal, rozpustil by se, aby bylo dosaženo nasycení. Pokud by však krystaly byly v přesyceném roztoku („Supersaturated“), protein by se přidal ke krystalizaci na povrchu roztoku, aby roztok dosáhl nasycení (Luft et al. 2011).

V ideálním případě parametry rozpouštědla (jako pH, činidlo a teplota) budou protein hnát do labilní zóny (vysoce přesycená), kde začne probíhat spontánní homogenní nukleace (Luft et al. 2011). Homogenní nukleace vzniká z náhodných jevů, kdy se molekuly shlukují dohromady ve stejný čas ve stejném místě, aby vytvořily jádra. Oproti tomu heterogenní nukleace je formování jader na částicích a povrchích (nejčastěji elektrostatickým a hydrofobním přitahováním molekul, ale i jinými interakcemi v metastabilní fázi). Když shluk molekul dosáhne určité velikosti, tak se reorganizuje do pravidelné struktury (Bolanos-Garcia & Chayen 2009). Ve formě jader pak stupeň přesycení může klesnout do metastabilní zóny, kdy se již nebudou tvořit jádra krystalů, ale bude podpořen proces růstu krystalů. Precipitační zóna je příliš přesycená, aby podporovala tvorbu uspořádaných agregátů a vzniká amorfní precipitát. Na Obr. 9 není zobrazena fáze separace tekutina-tekutina. Ta nastává v metastabilní zóně při vysokých koncentracích proteinu (Luft et al. 2011).

Krystaly se tedy tvoří při podmínkách spadajících mezi produkci čistých kapek (silnější interakce protein-činidlo) a precipitátu (silnější interakce protein-protein) (Luft et al. 2011). Všechny metody proteinové krystalizace zahrnují přechod mezi fázemi. Krystalizační

metody lze rozdělit do dvou skupin: nejčastější jsou metody založené na principu difúze par („vapor-difussion“) a „microbatch“ krystalizace. (Bolanos-Garcia & Chayen 2009)

Vznik krystalů soli není vyloučen vznikem krystalů proteinu ve stejné kapce. Je tedy možné, že díky prostředí o širokém rozpětí pH a teplot se v kapce objeví krystaly, které nejsou proteinové. Pokud se objeví stejné krystaly v rezervoáru a při kontrolním experimentu, kde není protein, jedná se jednoznačně o krystaly soli. Dalším ověřením je například test barvivem („dye test“), kdy protein naváže barvivo a krystaly se tak zbarví. Krajní možností je test rozdrcením („crush test“), kdy je možné proteinové krystaly mechanicky rozdrtit, jelikož jsou drženy slabými interakcemi (je však nevyhnutelná ztráta vzorku, což není žádoucí při práci s malým množstvím proteinu). Krystaly proteinu také fluoreskují při 280 nm (UV), kdy však mohou fluoreskovat i anorganické sloučeniny (Luft et al. 2011).

5.6.1. Krystalizace metodou difúze par

Metoda sestává z kapky, kde je smíchán protein a krystalizační činidlo v menším množství, než je třeba pro formování krystalů. Tato kapka se nachází v okolí rezervoáru, který obsahuje vysokou koncentraci daného krystalizačního činidla (Bolanos-Garcia & Chayen 2009). Kapka je v uzavřené soustavě s rezervoárem, přičemž systém spěje k rovnováze. Na základě rozdílnosti osmotických tlaků dochází k difúzi vody z kapky do rezervoáru (Bolanos-Garcia & Chayen 2009). Tímto procesem se kapka zakoncentrovává a dochází k přesycení, čímž mohou vznikat jádra proteinových krystalů.

Jednoduchými technikami jsou sedící kapka („sitting drop“) a visící kapka („hanging drop“). Technika sedící kapky je časově výhodnější, ale krystaly se mohou přichytit k povrchu zařízení. Technika visící kapky poté snižuje šanci přichycení krystalů a zlepšuje tvar a velikost krystalů díky obrácené pozici kapky. Zato je však potřeba silikonová pasta a krycí sklíčko (Bolanos-Garcia & Chayen 2009). Kromě toho je technika visící kapky více flexibilní, jelikož je možné sklíčko s kapkou přenášet nad různé rezervoáry, aniž by byla kapka narušena a tím měnit podmínky krystalizace (Chayen 2005).

Dále je používána technika sendvičové kapky („sandwich drop“), kde je kapka umístěna mezi dvě sklíčka, jedno delší (výše položené) a druhé kratší (níže položené). Sklíčka jsou od sebe dost daleko, aby mezi nimi byla mezera, ale zároveň dost blízko na to, aby uzavřely kapku do „sendviče.“ Výhodou této techniky je optické vyšetřování v mikroskopu, naopak nevýhodou je složitá příprava metody (Hampton Research 2001).

5.6.2. Krystalizace „microbatch“ pod olejem

Použitím techniky „microbatch“ se odstraňují problémy spojené s metodami difúze par, jako např. změny v objemu kapky, změny v pH a drobné změny teplot. V této technice je protein smíchán s krystalizačním činidlem (obojí o konečných koncentracích) na počátku experimentu, čímž jsou zajištěny konstantní podmínky po jeden až tři týdny (Bolanos-Garcia & Chayen 2009).

Při technice „microbatch“ jsou kapky o objemu několik nl umístěny pod parafinový olej (nízká hustota), aby se předešlo vypařování a také kontaminaci a fyzikálnímu šoku (Chayen 1997). Při využití směsi silikonového a parafinového oleje v poměru 1:1 („Al’s Oil“) je odvrácen problém, kdy je stav přesycení docílen mixováním a oproti metodě difúze par je tak méně prozkoumán fázový diagram (D’Arcy et al. 1996). Technika „microbatch“ může být také použita ke krystalizaci membránových proteinů (Chayen 1997).

5.6.1. Krystalizace metodou „counterdiffusion“

Pro tuto metodu krystalizace je používána komora (například kapilára), která je naplněna roztokem proteinu. Poté je přidáno krystalizační činidlo. Jeho molekuly procházejí roztokem proteinu a vyvolávají tvorbu amorfni fáze nebo mikrokystalického precipitátu. Koncentrace proteinu v okolí precipitátu se snižuje a krystalizační činidlo postupuje dál. Při pokračování procesu vzniká gradient přesycení, který umožňuje proteinům tvořit jádra a následně tvořit krystaly (Otálora et al. 2009).

5.7. Phyre2

Phyre2 je sada nástrojů dostupná na internetu, používaná k predikci a analýze proteinové struktury, jejich funkcí a mutací. Pomocí pokročilých metod hledání homologií jsou sestaveny 3D modely, jsou předpovězená místa navázání ligandů a je analyzován efekt různých variací aminokyselin. Typický odhad struktury je vytvořen v časovém rozmezí 30 minut – 2 hodiny. Phyre2 je jedním z nejvíce používaných serverů na predikci struktury proteinu – má přibližně 40.000 uživatelů ročně a zpracovává denně asi 700–1000 zadaných proteinů (Kelley et al. 2015).

Proteinová Data Banka (PDB) obsahuje přes 100 000 3D experimentálně ověřených struktur (Kelley et al. 2015). V průměru 50–70% typický genom může být strukturálně

vymodelovaný pomocí počítačových metod (Mukherjee et al. 2010). Tyto metody pracují na dvou základních principech:

- 1) Proteinová struktura je uložena v evoluci více než sekvence aminokyselin (Koonin et al. 2002).
- 2) Je dokázáno, že v přírodě je konečný a relativně malý (1.000 – 10.000) počet jedinečných foldů (Koonin et al. 2002).

Díky těmto principům je problém predikce struktury proteinu zredukován na problém přiřazení dané sekvence ke známým strukturám. Metody na predikci struktury zahrnují simulaci skládání a konstrukci modelů z malých útržků o známé struktuře. Ty jsou spojovány na základě kompatibility sekvence s experimentálně odvozeným složením proteinu. Toto spojování je určeno na základě podobných energetických funkcí a modelování založeném na šabloně neboli TBM („template-based modeling“) (Kelley et al. 2015).

Nejčastěji jsou metody predikce struktury založené na porovnání chtěné proteinové sekvence s databází sekvencí, přičemž vytvoří její evoluční nebo statistický profil. Následně tento profil porovnávají s databází profilů o známé struktuře. Výsledkem je zarovnání sekvencí o neznámé a známé struktuře. Následně je možné výsledek použít ke konstrukci modelu (Kelley et al. 2015).

Existují však i omezení. První je takové, že pokud nemůže být nalezena homologie mezi uživatelskou sekvencí a sekvencí o známé struktuře, tak modelování je buďto nemožné nebo velice nespolehlivé. Stále totiž neexistují metody, které by dokázaly předpovědět strukturu proteinu pouze podle zadané sekvence bez porovnávání se známými strukturami. Druhé omezení je předpovídání strukturálních efektů, které způsobují bodové mutace. Je možné funkčně předpovědět fenotypový efekt takové mutace, ale je nemožné přesně určit širší strukturní efekt (Kelley et al. 2015).

5.8. Chimera

Předchůdcem Chimery byl program Midas, který byl však pro uživatele příliš složitý. Chimera byla vytvořena s cílem, aby byl program co nejvíce přístupný všem uživatelům na velkém množství zařízení (Pettersen et al. 2004). Jedná se o sadu nástrojů, které studují vztah sekvence a struktury a také jednotlivé struktury porovnávají (Meng et al. 2006).

Chimera používá hlavně programovací jazyk Python a dělí se na jádro (Python a C++) a rozšíření (Python nebo kombinace Python a C/C++). Jádro poskytuje základní funkce a molekulovou grafiku. Všechny další funkční úrovně jsou prováděny rozšířeními, jmenovitě „Multiscale,“ „Multialign Viewer,“ „ViewDock,“ „Movie,“ „Volume Viewer“ a „Collaboratory“ (Pettersen et al. 2004).

Rozšíření „Multiscale“ umožňuje interaktivně zkoumat velké molekulové soustavy (Pettersen et al. 2004). Zobrazuje struktury z PDB (Berman et al. 2000) a generuje jejich formy tak, že pomocí transformačních matic umísťuje podjednotky struktur. „Multiscale“ také umožňuje definovat kvartérní strukturu na biologicky významných úrovních (Pettersen et al. 2004).

„Multialign Viewer“ zobrazuje zarovnání sekvencí spolu s nimi spojenými strukturami. Tato zarovnání umí číst a psát v mnoha formátech. Nejdříve musí být struktury v Chimeře spojeny s odpovídajícími sekvencemi v zarovnání. Když „Multialign Viewer“ otevře zarovnání, prozkoumá struktury, které jsou právě v Chimeře a kontroluje každý řetězec, aby měl vysokou identitu sekvence se zarovnanou sekvencí. Tyto řetězce s vysokou identitou jsou potom přiřazeny k odpovídajícím sekvencím (Pettersen et al. 2004).

Jednou z konkrétních funkcí „Multialign Vieweru“ je „MatchMaker,“ který slouží k překrytí struktur. Sestaví párové překrytí sekvencí a ty použije k překrytí struktur. Je možné porovnávat i vzdáleně příbuzné proteiny, pokud je zadána informace o sekundární struktuře. Funkce „Match → Align“ potom sestavuje odpovídající překrytí sekvencí na základě dvou a více překrytých proteinových struktur. Uživatel může specifikovat mezní vzdálenost a zahrnutí sloupce. Tato funkce určuje, jestli je potřebné zdvojení sekvence a pokud ano, které sekvence by měly být zdvojeny (Meng et al. 2006).

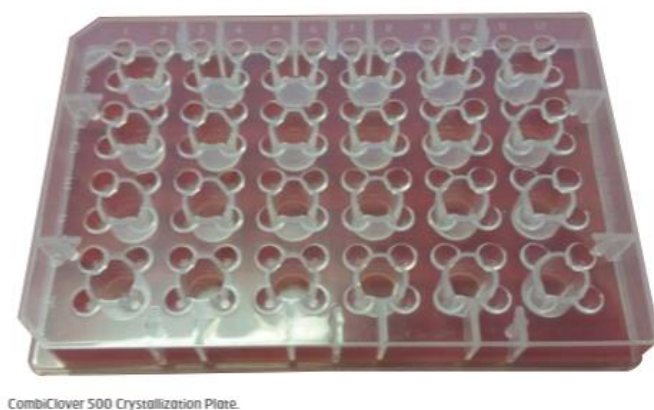
Rozšíření „ViewDock“ poskytuje interaktivní zobrazení orientace ligandů z DOCK (Ewing et al. 2001). DOCK vypočítává možné orientace navázání vzhledem ke struktuře ligandů a receptoru (cílený protein, ke kterému jsou hledány ligandy). Následně jsou vyhodnocena a identifikována nejvíce favorizována vazebná místa dané molekuly proteinu (Pettersen et al. 2004).

Díky rozšíření „Movie“ je Chimera schopná zobrazovat trajektorie molekulové dynamiky. Pro tyto trajektorie jsou používány také schopnosti samotné Chimery jako barvení a detekce vodíkových vazeb. Další rozšíření „Volume Viewer“ zobrazuje 3D data, jako mapy elektronové hustoty, elektrostatický potenciál a obsazenost rozpouštědly. Poslední rozšíření „Collaboratory“ umožňuje výzkumníkům z celého světa sdílet molekulové modelování v reálném čase. Každá změna je okamžitě odeslána, aby ji mohli vidět ostatní účastníci (Pettersen et al. 2004).

6. Materiál a metody

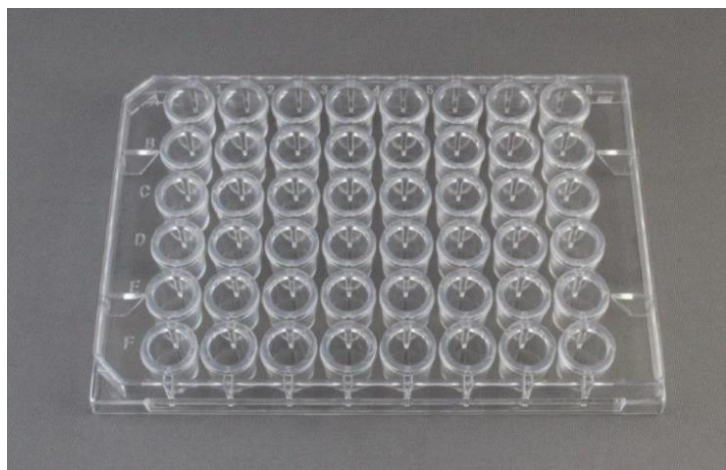
6.1. Krystalizace Lysozymu

Nejprve byly vyzkoušeny základní krystalizační metody. Jako cvičný byl vybrán protein z vaječných bílků Lysozym, díky nenáročnosti krystalizace – není nutná optimalizace. Jako první byla použita technika sedící kapky („sitting drop“). Byla použita krystalizační destička, kde na jeden rezervoár náleží čtyři místa pro umístění kapek (Obr. 10). Do rezervoáru bylo napipetováno vždy 230 μl roztoků NaCl o koncentracích 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % a 14 %. Poté byl vždy do jednoho přiléhajícího důlku napipetován roztok NaCl (o stejné koncentraci jako v rezervoáru) a roztok Lysozymu v poměrech 1:1, 1,5:1 a 2:1. Deska byla zalepena, aby došlo k vytvoření uzavřených soustav. Po vzniku krystalů k nim byl přidán 1 μl barviva „Bright Red“ pro důkaz, že se jedná o krystaly proteinu.



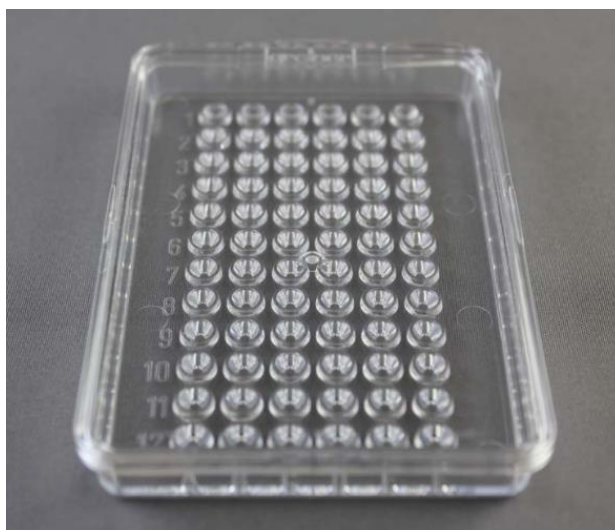
Obrázek 10: Krystalizační destička se čtyřmi jamkami na jeden rezervoár, použitá při technice „sitting drop“ (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom; staženo z <https://docplayer.net/56936098-Molecular-dimensions-more-intelligent-solutions-providing-you-with-the-latest-innovations-in-protein-crystallography.html>, dne 10. 4. 2021).

Druhou technikou byla krystalizace visící kapky („hanging drop“), provedena na krystalizační destičce se 48 rezervoáry se silikonovými kroužky (Obr. 11). Do rezervoárů bylo napipetováno vždy kolem 200 μl roztoku NaCl o koncentracích 6 %, 8 %, 10 %, 12 % a 14 %. Na sklíčko byla následně napipetována kapka – kombinace Lysozymu a roztoku NaCl (o stejné koncentraci jako v rezervoáru) v poměru 1:1. Sklíčko bylo následně položeno nad rezervoár a přitlačeno do silikonového kroužku kolem, aby vznikla uzavřená soustava.



Obrázek 11: Krystalizační destička se 48 rezervoáry se silikonovými kroužky, použita na techniku hanging drop (Hampton Research, Aliso Viejo, USA; staženo z <https://hamptonresearch.com/product-VDX48-Plate-with-sealant-68.html>, dne 10. 4. 2021).

Dále byla provedena „microbatch“ krystalizace. Nejprve byla do destičky se 72 důlky (Obr. 12) nalita směs parafinového a silikonového oleje 1:1 (tzv. „Al’s oil“). Do některých důlků byl napipetován Lysozym a roztok NaCl o koncentracích 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % a 14 % v poměrech 1:1, 1:1,5 a 1:2. Destička byla následně uzavřena víkem. Na krystalech byl proveden crush test, aby bylo dokázáno, že se jedná o krystaly proteinu, nikoliv o krystaly soli.



Obrázek 12: Krystalizační destička se 72 jamkami, použita na techniku "microbatch" (Hampton Research, Aliso Viejo, USA; staženo z <https://hamptonresearch.com/product-VDX48-Plate-with-sealant-68.html>, dne 10. 4. 2021).

Jako poslední byla vyzkoušena technika krystalizace v kapiláře. Kapilára byla zlomena a následně byla umístěna do zkumavky s roztokem Lysozymu. Pomocí kapilární elevace byl roztok nasát do kapiláry, která byla následně zespona utěsněna roztaveným voskem. Poté byl do kapiláry shora napipetován roztok NaCl a kapilára byla zapečetěna voskem i na svém druhém konci. Poté byly kapiláry vloženy do Petriho misky a zajištěny izolepou, aby nedošlo k jejich mechanickému poškození.

6.2. Krystalizace IRS-1

Serpin IRS-1 byl izolován na katedře medicínské biologie dle Kovářové (2010). Kódovací sekvence IRS-1 byla zesílena z cDNA, která byla izolována ze slinných žláz dospělé samičky *Ixodes ricinus* a následně klonována. Pomocí overexprese v *Escherichia coli* při indukci 0,5mM IPTG byl protein IRS-1 nahromaděn ve formě inkluzí, které byly dále separovány. Tato inkluzní tělesa byla rozpuštěna v 6M guanidin hydrochloridu a supernatant byl zředěný na 150násobný objem pufru 20mM TRis-HCl o pH 8, 0,25M L-arginin. Roztok proteinu byl následně zakoncentrován koncentrátorem v míchací komoře (Milipore) a dialyzován proti 20 mM Tris-HCl o pH 8. Koncentrovaný IRS-1 byl dále očištěn na Mono Q koloně s 0-1 M gradientem NaCl do čistoty větší než 99 %. Výsledná koncentrace roztoku IRS-1 byla 1,1 mg/ml.

Nejprve byl proveden pre-krystalizační test (PCT) (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) pomocí techniky sedící kapky. Do rezervoáru bylo napipetováno vždy 100 μ l roztoku (A1 a B1, A2 a B2). Roztoky A1 a B1 zjišťují, zda je roztok proteinu citlivý vůči koncentracím solí a polymerů. Následně byly do rezervoáru upevněny „sitting drop bridges“, do kterých bylo napipetováno vždy 0,5 μ l roztoku ze sady PCT a 0,5 μ l roztoku IRS-1 – tedy v poměru 1:1. Pomocí tohoto testu byla zjištěna vhodnost koncentrace IRS-1 1,1 mg/ml. Roztok tak nebylo potřeba dále ředit či zakoncentrovávat.

Následně byl ručně proveden screening pomocí komerčních krystalizačních kitů PEGRx 1 a 2 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA). Obě sady jsou navrženy k vyhodnocení krystalizačních činidel na bázi polymerů a pH u nízkých (PEGRx 1) a středních (PEGRx 2) iontových sil. Dohromady obě sady čítají 96 činidel. Destičky na techniku „sitting drop“ byly vyčištěny air dusterem (stlačený plyn CLEAN IT). Do rezervoáru bylo napipetováno vždy 200 μ l krystalizačního činidla. Objemy roztoku serpinu a reakčních činidel ze sad PEGRx v kapkách byly všude 1 : 0,3; 1 : 0,5; 0,5 : 0,5; 0,5 : 0,2 [μ l]. Výsledné krystaly ze screeningu byly poslány na difrakci.

Po screeningu byla provedena krystalizace „sitting drop“ (na jeden rezervoár dvě jamky) s komerčním kitem SG1-HT96 (SHotGun Screen) (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom) pomocí robotu OryxNani 4 (Douglas Instruments Hungerford, United Kingdom). Tato sada obsahuje 96 nejvíce úspěšných podmínek pro krystalizaci. Do rezervoáru bylo napipetováno 50 μ l činidla a do přilehlých jamek byl napipetován IRS-1 s daným činidlem v poměrech 1:1 a 1:0,5.

6.3. Odhad struktury

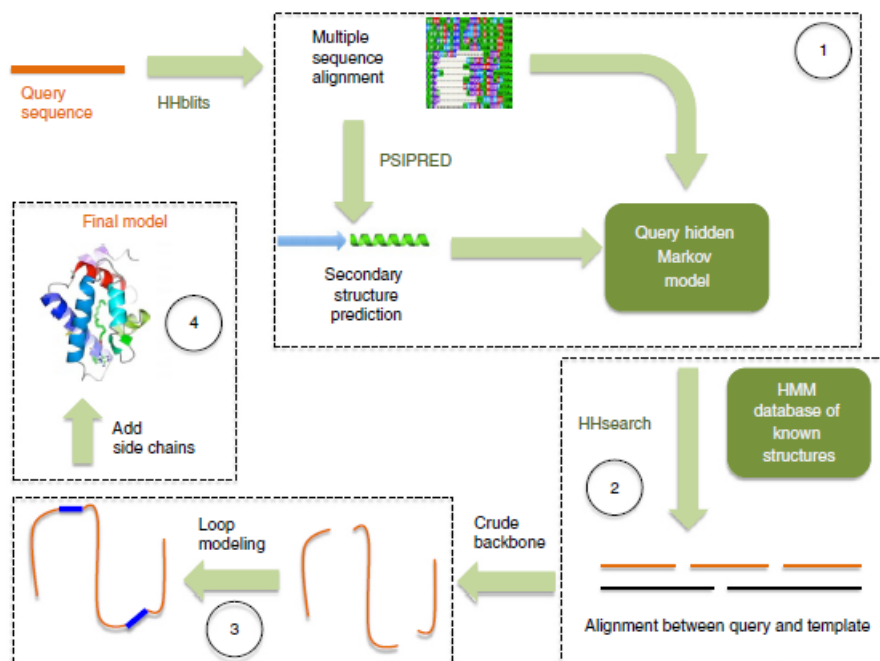
Odhad struktury byl proveden pomocí metody homologního modelování, která byla zprostředkována nástrojem Phyre2. V první fázi (Obr. 14, číslo 1) se shromažďují homologní sekvence. Důležité je shromáždit velké množství různých, avšak skutečných homologů (Kelley et al. 2015). Sekvence IRS-1 (Obr. 13) je skenována proti databázi sekvencí, které jsou metodou HHblits (Remmert et al. 2012) rozdělené na řetězce délky 20 aminokyselin. Ze vzniklého uspořádání sekvencí (profil) je pomocí metody PSIREN (Jones 1999) předpovězena sekundární struktura (α -helixy, β -sheety a neuspořádaná struktura) se 75–80% přesností (Kelley et al. 2015).

```
1 MQGNDKLT FANNQFGLRLLNLTLPSPPEENVFFSPYSVSTALGMAYAGARG
51 DTQEELSEQLGYTAAGLSQDDVFNAYS DHTQWLKASRSNSTLSVANA AVL
101 HDKVGLRYTFQRTIDHAFDADILKVDFVNERKGA VDRIN YWVKDKTNGKI
151 RSLFNKPLESETRLVLLNAIYFKGSWNTRFNKSRTEKSEFLNGGVTPTKV
201 DMMGSMNIGHHFFRDLDKIDVADFPYQGRDYSMTVILPWRNDGVEAIKQN
251 LTLDLFQKL VSELRERRVFLFPKFKIEAEYSLKEPLQNLG I KQIFSGGS
301 DLSGVTNDNDLVVSAVVHKAVLEVNEEGSEAAAVSSVVA VTRIGTQAFEF
351 NVDHPFLFFIRNTVTNDILFAGQVNSL
```

Obrázek 13: Sekvence aminokyselin serpinu IRS-1. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

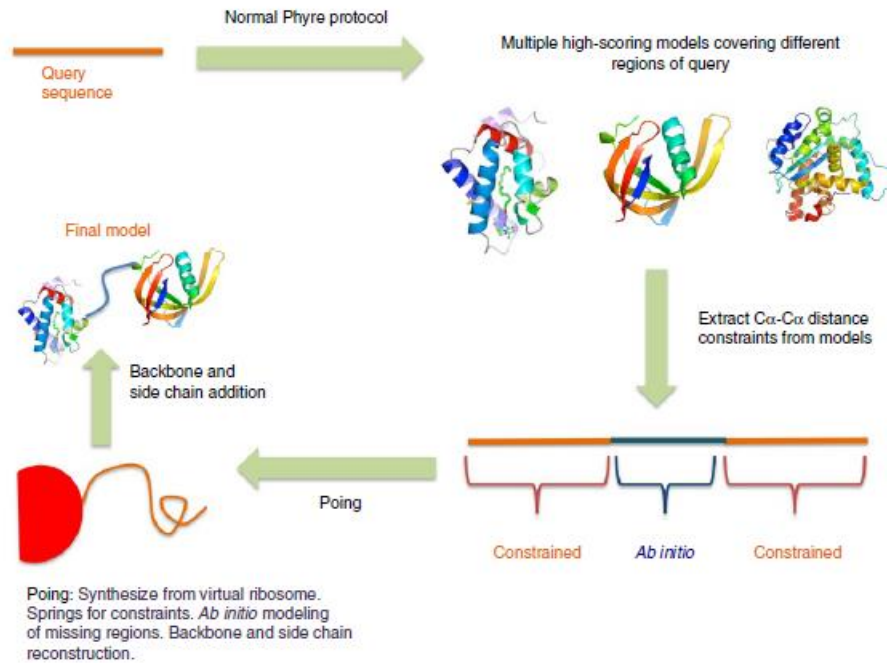
V druhé fázi (Obr. 14, číslo 2) je kombinován vzniklý profil s předpovězenou sekundární strukturou do skrytého Markovova modelu (HMM – „hidden Markov model“). Dále je HMM skenován vůči databázi HMM známých struktur, které vznikly stejným procesem jako v první fázi (Kelley et al. 2015). Pomocí algoritmu HHsearch (Söding 2005) je generován výpis výsledků porovnání, přičemž jsou seřazeny podle pravděpodobností. Tato zarovnání jsou následně použita pro vygenerování kostry, která obsahuje indely (různá vložení a smazání) a neobsahuje postranní řetězce (Kelley et al. 2015).

Ve třetí fázi (Obr. 14, číslo 3) nastává modelování smyček. Indely jsou zpracovány pomocí knihovny fragmentů známých proteinových struktur o délce 2–15 aminokyselin. Pomocí různých charakteristik jako jsou sekvence aminokyselin, geometrie koncových bodů a vzdálenost mezi konci jsou nalezeny vhodné sekvenční fragmenty a indely jsou opraveny (Kelley et al. 2015).



Obrázek 14: Kroky algoritmu při normálním módu odhadu struktury nástroje Phyre2 (Kelley et al. 2015).

Pokud je zvolen intenzivní mód modelování, probíhá ještě mezifáze 3 b (Obr. 15): několikanásobné modelování podle šablony s Poing (Jefferys et al. 2010) (zjednodušený simulátor proteinového skládání). V této fázi je hlavním cílem vytvořit model dotazovaného proteinu, i když jsou různé regiony nebo úseky modelovány různými šablonami (nebo pokud žádné šablony nebyly). Heuristiky nejdříve vyberou podmnožinu modelů z fází 2 a 3, čímž zvýší pokrytí žádaného proteinu při zachování vysoké důvěry z HHsearch. Z těchto modelů jsou následně vyextrahovány shodné spárované úseky, které jsou brány jako lineární nepružná vlákna. Tyto úseky jsou postupně přidávány při simulované syntéze tázaného proteinu z ribosomu. Nepřekryté úseky, jsou modelovány tzv. *ab initio* tak, že jsou bombardovány virtuálními rozpouštědly. Tím jsou zjištěny útvary sekundární struktury a je zabráněno sterickým srážkám. Výsledkem je 5–100 modelů (podle velikosti zadaného proteinu), které jsou následně seskupeny pro vybrání finálního modelu (Kelley et al. 2015).



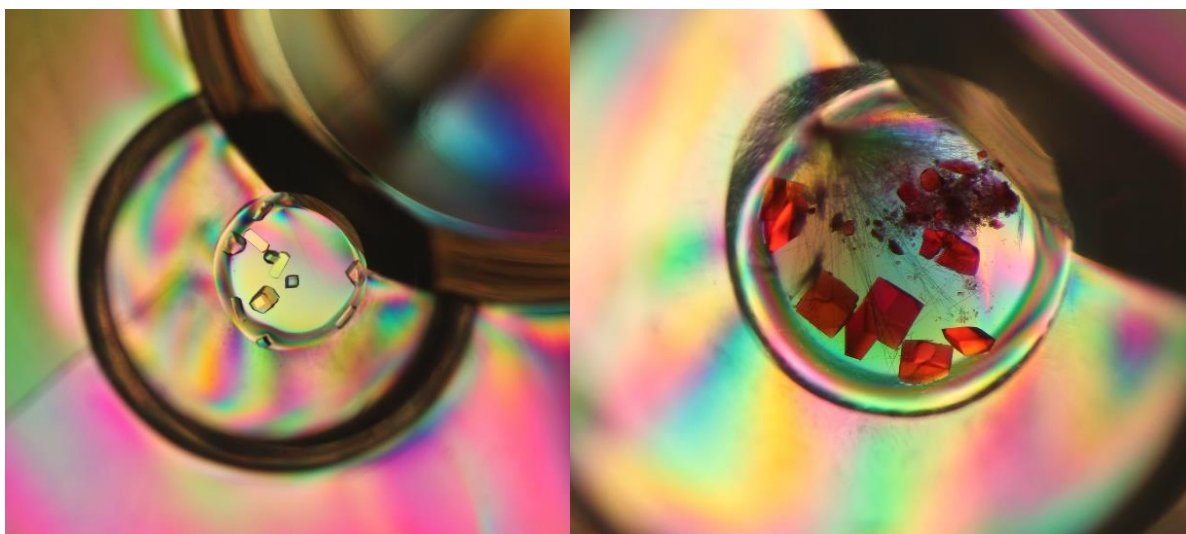
Obrázek 15: Kroky algoritmu při intenzivním módu odhadu struktury nástroje Phyre2 (Kelley et al. 2015).

Ve čtvrté fázi (Obr. 14, číslo 4) jsou vloženy postranní řetězce v nejpravděpodobnějším rotameru do vytvořených koster, aniž by došlo ke sterickým srážkám (Kelley et al. 2015). Rotamer jsou všechny možné kombinace kroucení postranních řetězců. Tato kroucení souvisí s lokálními minimy potenciální energie pro postranní řetězce (Schrauber et al. 1992). Pokud je kostra správná, pak má tato technika přibližně 80% přesnost (Kelley et al. 2015).

7. Výsledky

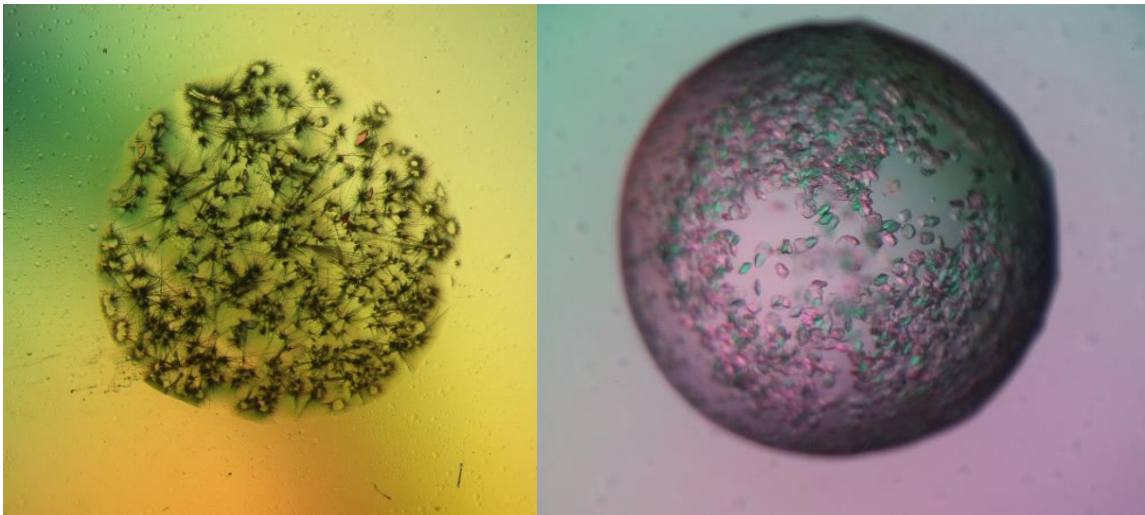
7.1. Krystalizace

Při technice sedící kapky vznikly 3D krystaly Lysozymu při kombinaci proteinu o koncentraci 40 mg/ml a 4% roztoku NaCl v poměru 1:1 (Obr. 16 vlevo). Při stejné technice krystalizace Lysozymu o koncentraci 40 mg/ml s 10% roztokem NaCl v poměru 1:1 vznikly jak 3D krystaly (obarveny barvivem „Bright Red“) (Obr. 16 vpravo), tak amorfni precipitace (černé šmouhy na Obr. 16 vpravo). Obarvením bylo potvrzeno, že se jedná o krystaly proteinu, protože krystaly soli by se nezbarvily.



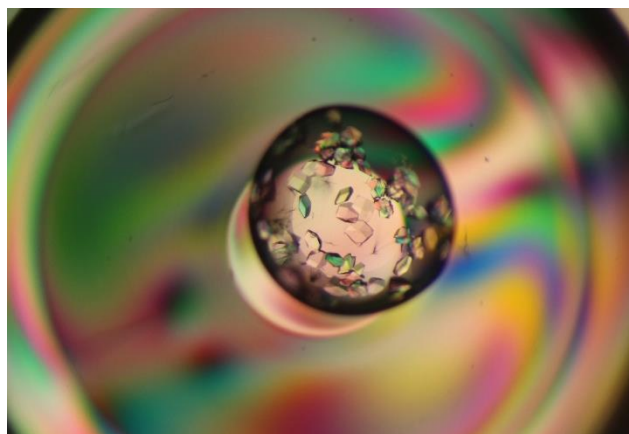
Obrázek 16: Výsledky „sitting drop“ krystalizace Lysozymu – vlevo krystaly a vpravo obarvené krystaly a amorfni precipitace.

Při technice visící kapky vznikly při kombinaci Lysozymu o koncentraci 40 mg/ml a 8% roztoku NaCl v kapce v poměru 1:1 dvojrozměrné „needle clusters“ (Obr. 17 vlevo). Velké množství malých krystalků Lysozymu vzniklo při smíchání proteinu o koncentraci 100 mg/ml s 10% roztokem NaCl v poměru 1:1 (Obr. 17 vpravo).

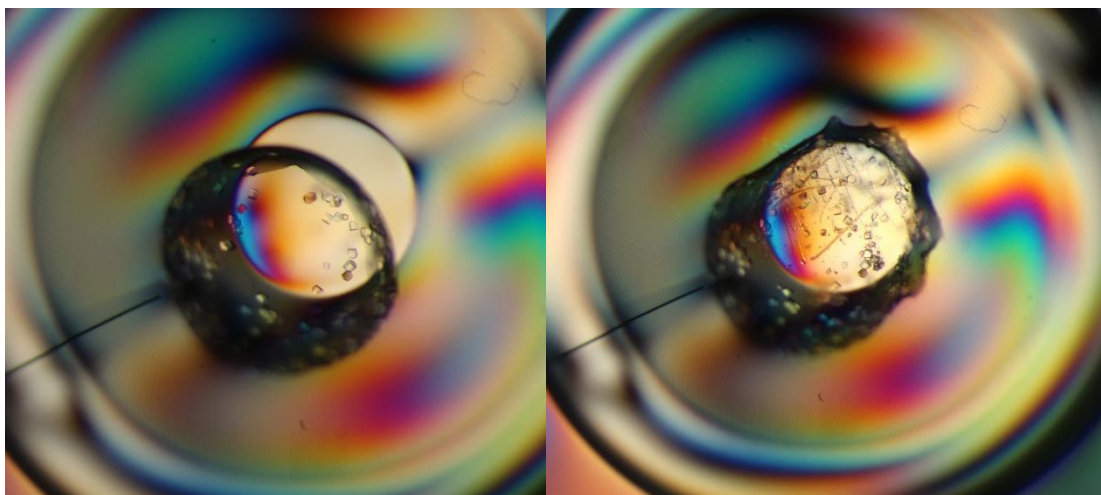


Obrázek 17: Výsledky „hanging drop“ krystalizace Lysozymu – vlevo 2D „needle cluster“ a vpravo 3D krystalky.

Při „microbatch“ krystalizaci vznikly 3D krystaly smícháním Lysozymu o koncentraci 60 mg/ml s 8% roztokem NaCl (Obr. 18). Další krystaly vznikly, když byla použita stejná koncentrace Lysozymu s 12% roztokem NaCl (Obr. 19 vlevo). Na těchto krystalech byl následně proveden crush test. Rozpadnutím krystalů (Obr. 19 vpravo) bylo potvrzeno, že se jedná o proteinové krystaly. Krystaly soli by se nepodařilo snadno rozdrtit, jelikož je drží silnější interakce než krystaly proteinové. Pro tuto techniku krystalizace byl použit „Al’s Oil.“

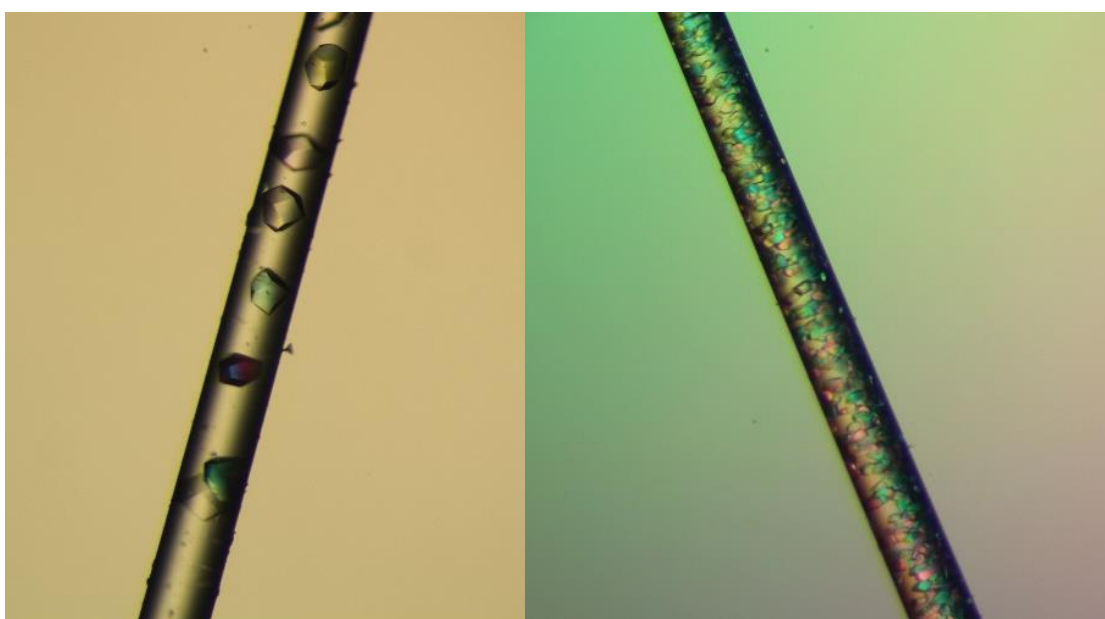


Obrázek 18: Výsledné 3D krystaly Lysozymu vzniklé „microbatch“ krystalizací.



Obrázek 19: Výsledné 3D krystaly Lysozemu vzniklé microbatch krystalizací – vlevo a vpravo následné výsledky crush testu.

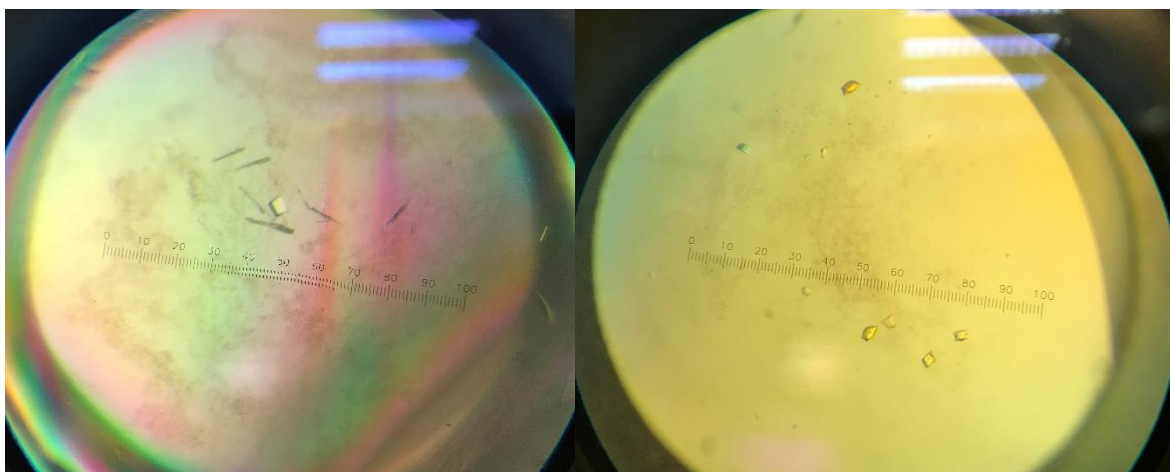
Krystalizací v kapiláře vznikly velké 3D krystaly Lysozemu kombinací proteinu o koncentraci 40 mg/ml s 10% roztokem NaCl (Obr. 20 vlevo). Velké množství malých krystalů poté vzniklo v prostředí, kde byl smíchán Lysozym o koncentraci 100 mg/ml s 12% NaCl (Obr. 20 vpravo).



Obrázek 20: Výsledky krystalizace Lysozemu v kapiláře – vlevo velké 3D krystaly, vpravo velké množství malých 3D krystalů.

Výsledek PCT IRS-1 byl takový, že kapky s roztokem A1 a B1 byly čiré. V kapce s roztokem A2 se však objevila malá zrníčka krystalů – lehký precipitát. Díky tomuto výsledku bylo možné pokračovat screeningem, jelikož bylo ověřeno, že roztok IRS-1 byl připraven v dostatečné koncentraci pro krystalizaci.

Screening neposkytl příliš precipitátů, ani příliš čirých kapek. V takovém případě by bylo potřeba dále upravit koncentraci roztoku IRS-1, anebo stabilizovat vzorek. Při kombinaci IRS-1 o koncentraci 1,1 mg/ml s činidlem PEGRx 1 – 18 (konkrétně 0,1 M HEPES o pH 7,5, 30% w/v polyethylenglykol 1000) v poměru objemů 1:0,3 [μl] vznikly 2D jehličky a jeden 3D krystal (Obr. 21 vlevo). 3D Krystaly také vznikly při použití činidla PEGRx 2 – 11 (konkrétně 1,8 M sulfát amonný, 0,1 M BIS-TRIS o pH 6,5, 2% v/v polyethylenglykol monomethyl ether 550) v poměru 0,5:0,25 [μl] (Obr. 21 vpravo).



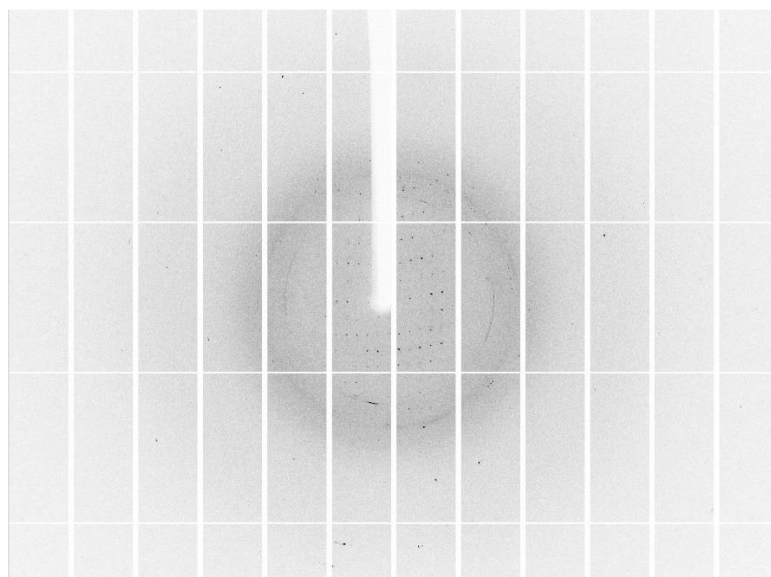
Obrázek 21: Výsledky screeningu se sadami PEGRx 1 a 2 metodou sedící kapky.

Při provedené krystalizaci IRS-1 s kitem SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom) s poměry 1:1 a 1:0,5 vznikly 2D jehličky (Obr. 22 vlevo) a mikrokristaly (Obr. 22 vpravo). Jehličky vznikly při kombinaci roztoku IRS-1 s 0,2 M sulfátem amonným, 0,1 M Bir-Tris o pH 5,5, 25% w/v PEG 3350. Mikrokristaly vznikly smícháním roztoku IRS-1 s 0,2 M sulfátem amonným, 0,1 M HEPES sodný o pH 7,5, 25% w/v PEG 3350.



Obrázek 22: 2D jedličky a mikrokrystaly serpinu IRS-1 vzniklé metodou sedící kapky pomocí kytu SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

Na difrakci byly poslány krystaly IRS-1 vzniklé při screeningu (Obr. 18). Krystaly vzniklé pomocí činidla PEGRx 2 – 11 nedifraktovaly. Krystal vzniklý při kombinaci IRS-1 s činidlem PEGRx 1 – 18 difraktoval na rozlišení 7 Å (Obr. 23). Krystal však nebyl dostatečně kvalitní a je třeba zlepšit jeho kvalitu optimalizací krystalizačních technik.



Obrázek 23: Výsledek rentgenové difrakční analýzy serpinu IRS-1 - difrakční obrazec (rozlišení 7 Å).

7.2. Odhad struktury

7.2.1. Normální mód

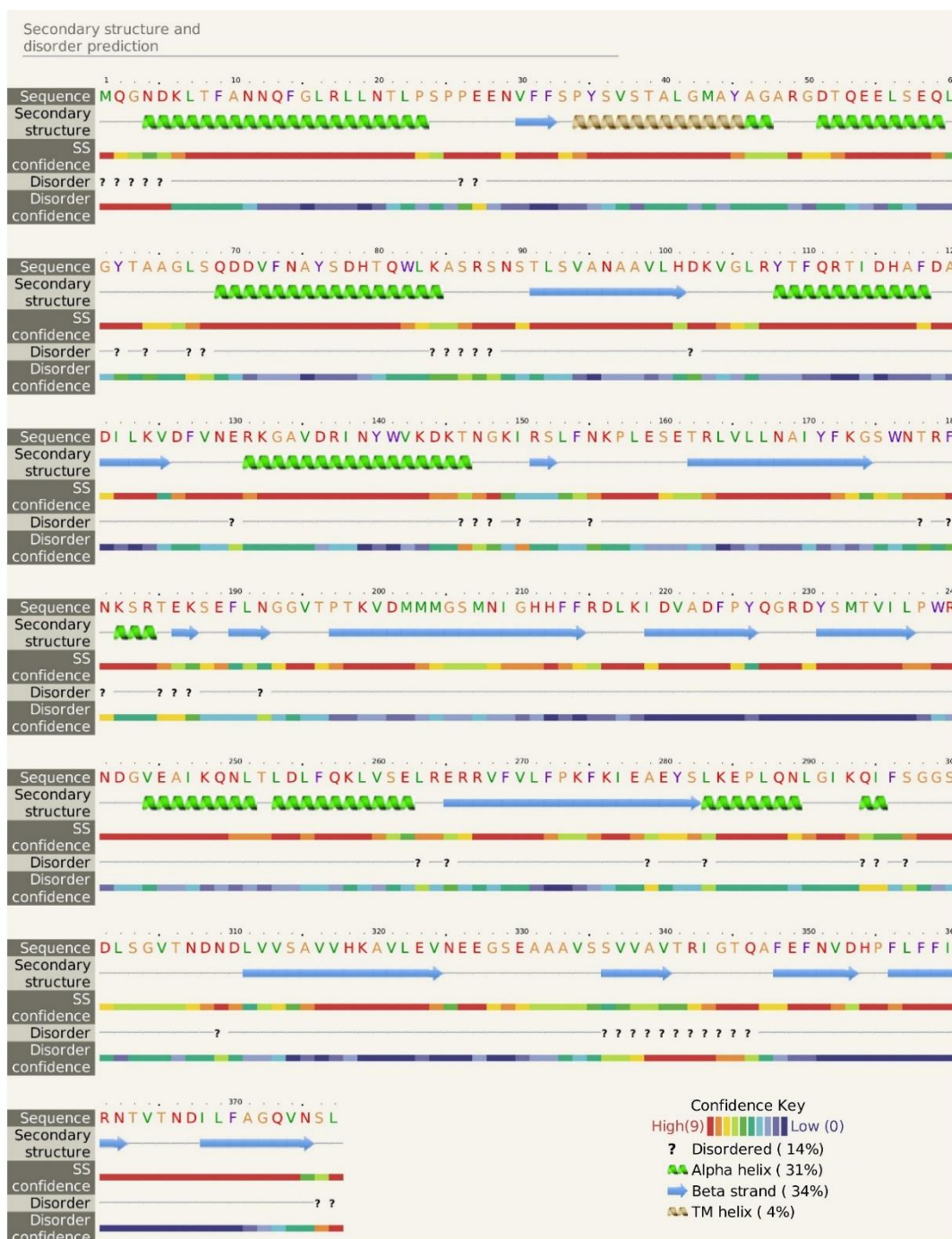
Předlohou pro odhad struktury IRS-1 v normální módu byl serpin IRS-2 (PDB kód 3NDA). Jedná se o serpin, konkrétně hydrolázový inhibitor, který se nachází v *Ixodes ricinus*. Podle tohoto modelového serpinu bylo namodelováno 374 aminokyselin (99 % sekvence IRS-1) se 100% konfidencí. Konfidence je pravděpodobnost, že oba porovnané proteiny jsou homology (Kelley et al. 2015).

Celkem bylo nalezeno 789 potenciálních homologů, které byly následně porovnávány se sekvencí IRS-1 (Obr. 13). Aby byly správně vybrány úseky homologů, které by vygenerovaly přesný odhad sekundární struktury, byly posuzovány pouze homology s nízkou E-hodnotou, tj. < 0.001 . Počet 789 homologů byl tedy po vyškrtnutí těch s vysokou E-hodnotou snížen na 778.

Následný odhad sekundární struktury (Obr. 24) odhaluje, v jakých místech by mohla být struktura nejhůře předpovězena. Podle řádky „SS confidence“ je zřejmé, že opravdu pouze malé úseky mají nízkou konfidenci. Největší problém však znamenají dlouhé úseky sekvence, kde je konfidence nízká, což může signalizovat velké odchylky od reálné sekundární struktury. Takové delší úseky lze najít dva: úsek K (149) – F (155), který má nejnižší konfidenci z celé sekvence IRS-1; a A (331) – T (341), který je nejdelším úsekem s nízkou konfidencí. V obou těchto „problémových“ reziduích zaujímá protein strukturu β -strand. Kvůli nízké konfidenci však nelze s jistotou říct, že se β -strandy budou vyskytovat i v reálné struktuře. Celková sekundární struktura serpinu IRS-1 je pak podle odhadu tvořena z 31 % α -helixy a 34 % β -sheety. Krom toho se ve struktuře objevuje tzv. transmembránový α -helix v úseku P (34) – Y (45).

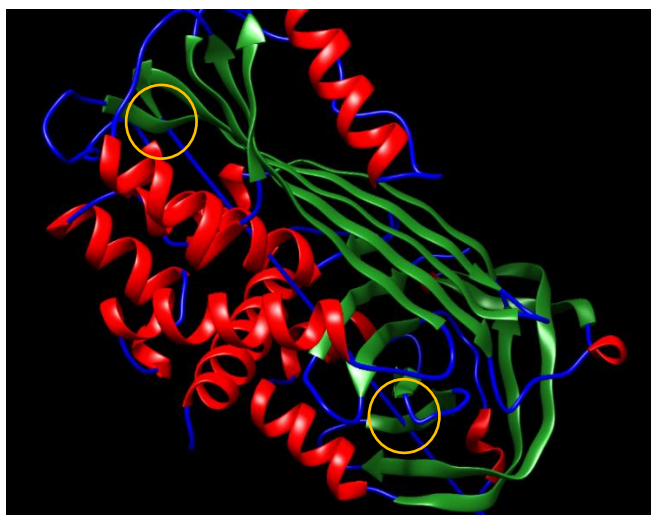
V řádce „Disorder“ (Obr. 24) se nacházejí otazníky tam, kde se nachází neuspořádaná část sekvence (předpovězeno pomocí DisoPred). V IRS-1 je předpovězena 14% neuspořádanost, přičemž je možné si všimnout, že některé poruchy s vysokou konfidencí se nacházejí v úsecích sekvence s nízkou konfidencí struktury – např. počátek nebo úsek V (338) – R (342). Naopak v místech sekvence s vysokou konfidencí struktury se nacházejí poruchy v malé míře a často také s nízkou konfidencí. Z toho vyplývá, že tyto předpovězené neuspořádanosti ve struktuře se mohou nejvíce objevovat v místech sekvence s nízkou konfidencí struktury.

Na Obr. 24 jsou v řádce „Sequence“ vypsány očíslované pozice aminokyselin v sekvenci. Jsou barevně rozlišeny podle charakteru vedlejšího řetězce: žlutá – malé/polární, zelená – hydrofobní, červené – nabitě a fialové – aromatické + cysteinové. V druhé řádce pak zelená šroubovice označuje α -helix, žlutá šroubovice transmembránový helix, modrá šipka β -sheet a čára neuspořádanou část struktury. „SS confidence“ značí konfidenci z PSIREdu, přičemž červené znamená nejvyšší a modrá nejnižší (viz „Confidence key“ vpravo dole na Obr. 24).



Obrázek 24: Odhad sekundární struktury a poruch serpinu IRS-1 (vytvoreno nástrojem Phyre2).

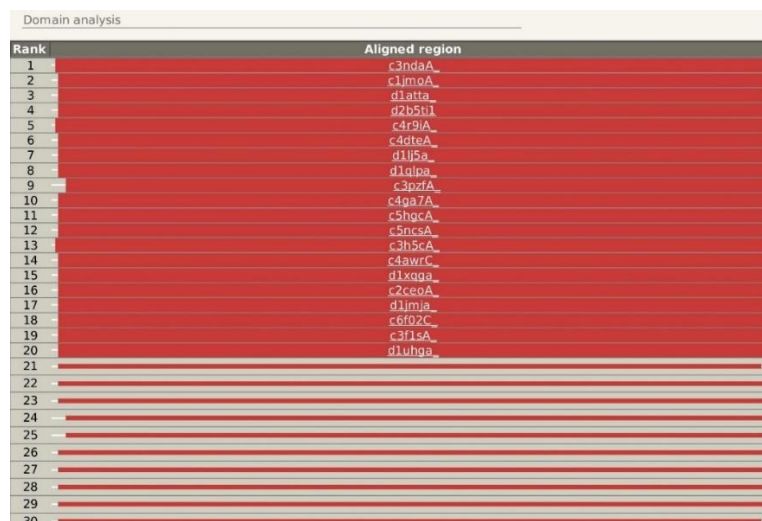
V odhadnuté struktuře nastává na pohled problém. Část struktury, konkrétně T (341) – T (345) prochází skrze β -strandy (oranžově zakroužkováno na Obr. 25). V reálné struktuře se toto stát nemůže, především kvůli nevazebným interakcím. Je možné, že úsek struktury ve skutečnosti není takto lineární právě proto, aby se zabránilo těmto srážkám.



Obrázek 25: Přiblížení na problém v sekundární struktuře IRS-1 odhadnuté normálním módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Na Obr. 25 jsou modře zbarveny neuspořádané části struktury, zeleně jsou obarveny jednotlivé β -strandy a červené jsou α -helixy. Oranžově jsou pak zakroužkovány chyby v předpovězené struktuře IRS-1.

Následuje doménová analýza (Obr. 27). Je vidět, že prvních 20 vzorových homologů má nejvyšší 100% konfidenci a jsou také modelovány (více jich modelováno není, aby nebyla zatížena výpočetní technika). Podle šířky, která udává velikost pokrytí sekvence IRS-1, je na prvním místě protein s PDB kódem 3nda, který pokrývá sekvenci na místech 1–377. Ostatní homology mají pokrytí do aminokyseliny 376, anebo naopak jejich pokrytí začíná od druhé aminokyseliny. Například protein 1jmo na pozici 2, pokrývá sekvenci na oblasti 5–376. Proto je na prvním místě s největším pokrytím právě 3nda, který se také stal hlavním modelem při odhadu sekundární struktury, jelikož se jedná o opravdový homolog.



Obrázek 26: Doménová analýza serpinu IRS-1, výběr homologů 1–30 (vytvořeno nástrojem Phyre2).

Každá čára na Obr. 26 zaujímá takovou délku, jakou délkou pokrývá zadanou sekvenci IRS-1. Červená barva znázorňuje vysokou konfidenci těchto homologů. První písmeno v kódu proteinu „c“ značí, že byla použita celá délka proteinu, „d“ označuje použití pouze jeho části. Následuje číslice a tři písmena, která jsou kódem proteinu v PDB (např. 3nda). Poslední písmeno značí identifikátor řetězce v PDB (např. A), případně identifikátor úseku proteinu v PDB (např. a).

Následně jsou homology seřazeny podle čistého skóre pokrytí (Tab. II). To dává do souvislosti podobnosti sekvencí a sekundárních struktur (jejich počet překrytí a kvalita) a indely. (Kelley et al. 2015) Jsou zde obsaženy informace o proteinech z Obr. 24: 3D model, konfidence, procentuální identita sekvence a další informace. Identita sekvence je pak poměrem reziduí IRS-1 a daných předloh při porovnání (Kelley et al. 2015). Pokud jsou políčka konfidence i identita sekvence červená, jedná se o vysoce konfidentní model blízké homologie. Pokud je pouze konfidence zbarvena červeně, jedná se o vzdálenou homologii, kdy bylo modelování více odlišné než u blízkého homologu.

Dle Obr. 27 lze říct, že předpovězená sekundární struktura IRS-1 kopíruje předpovězenou sekundární strukturu IRS-2. Největší rozdíly jsou pak:

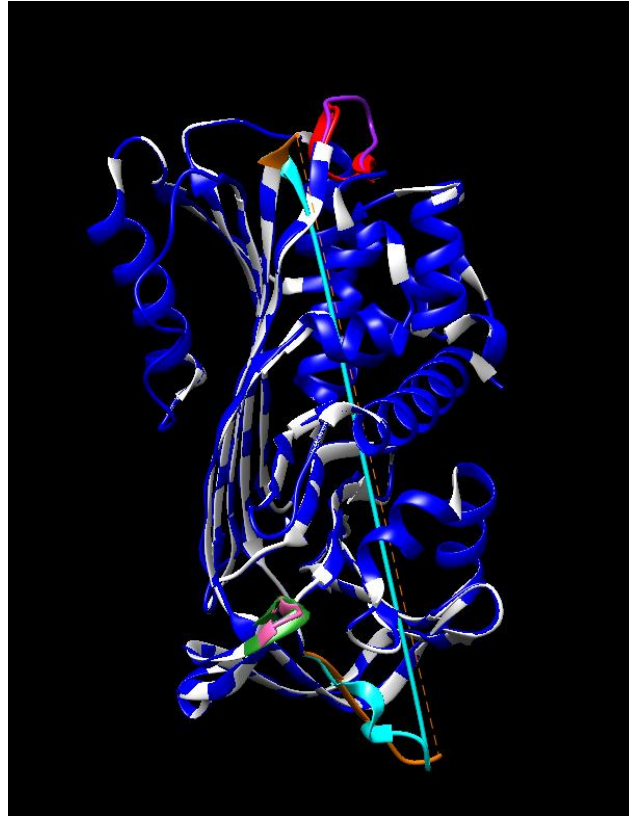
- 1) Na úseku T (91) – H (101), kde se nachází β -strand, ale v odhadnuté struktuře IRS-2 je T (91) – A (97) β -strand, krátký α -helix a neuspořádaná struktura.

- 2) Na úseku sekvence IRS-1 R (163) – G (174) je odhadnuto, že má sekundární struktura podobu β -strandu, ale u odhadu struktury IRS-2 se na reziduu L (163) – W (176) nachází β -strand a α -helix.
- 3) Na reziduu serpínu K (187) – L (191) je odhadováno, že je IRS-1 složeno do β -strandu. Avšak odhadnutá struktura IRS-2 má na reziduu E (186) – F (191) podobu dvou krátkých β -strandů.



Obrázek 27: Porovnání sekvencí a překrytí odhadovaných sekundární struktur IRS-1 a IRS-2 (vytvoreno nástrojem Phyre2).

Šedě jsou na Obr. 27 zbarveny shodné aminokyseliny v obou sekvencích. Ve známé sekundární struktuře vzoru se objevují písmena, která jsou přiřazena programem DSSP. Jedná se o typy sekundární struktury: B je izolovaný β -bridge, G je helix se 3 otočeními (310 helix), I je helix s 5 otočeními (π -helix), S je ohyb a T je otočení spojené vodíkovými vazbami. Vložení do sekvence vzhledem k předloze jsou vyobrazeny jako tečky v červeném obdélníku.



Obrázek 28: Rozdíly mezi oběma sekundárními strukturami IRS-1 (modrá) a IRS-2 (bílá). Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Zeleně je na Obr. 28 obarveno reziduum IRS-2 N (192) – T (196) (zelená), které je porovnáváno s růžovým reziduem IRS-1 N (192) – T (196) (růžová). I když se zde obě sekvence shodují, struktura obou serpinů se zde mírně liší. IRS-2 přechází z β -strandu do α -helixu a zpět do β -strandu (zelená). Kdežto IRS-1 je již na počátku tohoto rezidua složeno do α -helixu, následuje krátký úsek neuspořádané struktury a poté se také skládá do β -strandu (růžová). Rozdíl je tedy takový, že IRS-1 se skládá do α -helixu dříve a následuje po něm neuspořádaná část struktury.

Další rozdíl na Obr. 28 je mezi reziduem IRS-2 L (302) – S (309) (červená) a reziduem IRS-1 L (302) – D (310) (fialová). Struktura IRS-2 je zde tvořena α -helixem (červená), ale struktura IRS-1 je složena pouze jako čistá neuspořádaná struktura (fialová).

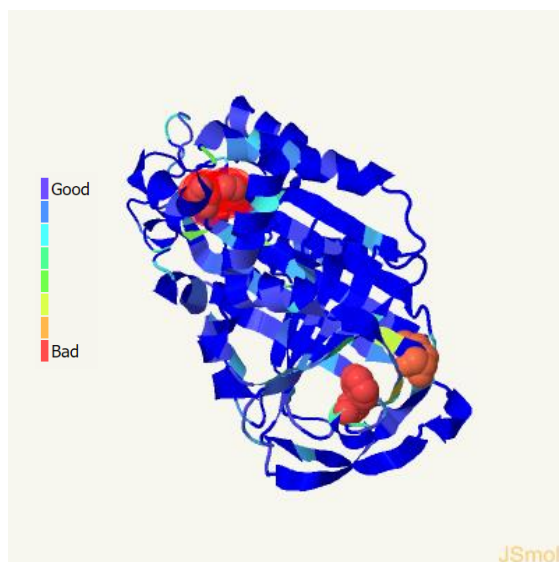
Asi největším rozdílem je mezi IRS-2 reziduem P (340) – V (352) (oranžová) a IRS-1 reziduem T (341) – V (352) (tyrkysová). Jedná se o velký úsek, na kterém se sekvence serpinů vůbec neshodují (Obr. 27). Ihned na počátku je β -strand IRS-2 kratší, než β -strand IRS-1. Na konci je pak IRS-1 složeno do α -helixu (tyrkysová), kdežto IRS-2 má neuspořádanou strukturu. (oranžová).

7.2.2. Výsledky normálního módu

Díky funkci vyšetřovatele („Investigator“) bylo možné ohodnotit kvalitu vymodelované předpovědi sekundární struktury a funkčnost serpínu.

ProQ2 je algoritmus, jehož výsledkem je model, který předpovídá lokální i globální kvalitu daného proteinu (Kelley et al. 2015). Kvalita odhadnutého modelu IRS-1 je na vysoké úrovni. Na většině kostry převládá více než 50% kvalita. Nejspíše díky tomu, že bylo možné odhadnout strukturu pouze pomocí jednoho (homologního) vzoru IRS-2, se nikde ve struktuře nevyskytuje nízká kvalita. Nejméně kvalitní rezidua jsou: počáteční reziduum M (1) – G (3), A (85) – R (87), G (193) – T (196) D (308) a V (340) – E (349). Kvalita výsledné odhadnuté struktury IRS-1 nemá nic společného s konfidencí, se kterou byl vybrán vzorový protein.

Model IRS-1 je vymodelován bez významných srážek reziduí, až na tři výjimky (vyobrazeny červenými kuličkami na Obr. 29). Konkrétně jsou to Y (62), F (350) a o něco méně M (207). Červeně je na Obr. 29 zvýrazněno reziduum Y (62), které vykazuje největší možnost srážky. Je tedy vhodné předpokládat, že v těchto místech je model struktury odhadnutý špatně nebo je postranní řetězec špatně umístěn, jelikož ve skutečné struktuře by k těmto srážkám nedošlo, především kvůli interakcím mezi atomy.



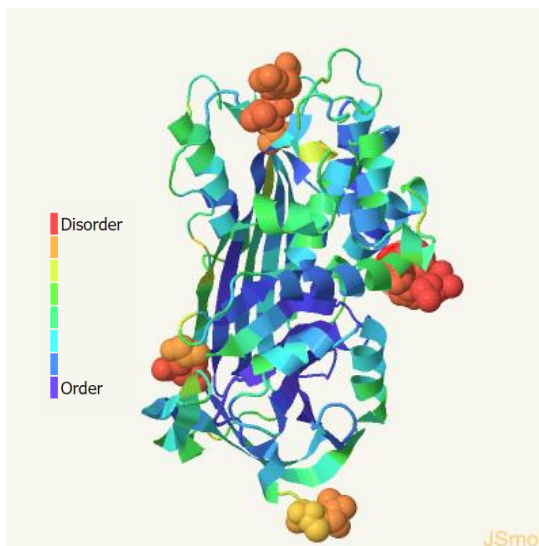
Obrázek 29: Model srážek v odhadnuté struktuře IRS-1 (vytvořeno nástrojem Phyre2).

Barevná škála na Obr. 29 označuje počet pozorovaných srážek od počtu nejméně (modrá) až po nejvíce (červená).

V celé odhadnuté kostře jsou podle analýzy rotamerů všechna rezidua vymodelována v pořádku, až na aminokyselinu L (253). To může v tomto místě znamenat problém v odhadnuté struktuře nebo problém s překrytím se vzorovým proteinem.

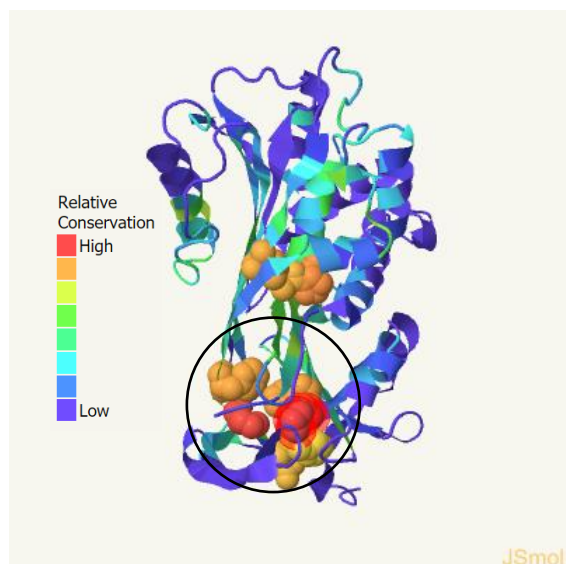
Model Ramachandranovy analýzy odhalil, že v místě aminokyseliny P (25) nastává strukturální problém s Φ/Ψ úhly. Zde se nachází energeticky zakázaná oblast pro dihedrální úhly, tudíž i sekundární struktura je zde špatně předpovězena.

Dále byly předpovězeny poruchy metodou Disopred. Tyto úseky jsou důležité pro funkci proteinů, protože jsou dynamicky flexibilní. Předpovězenými narušenými úseky (zvětšené kuličky na Obr. 26) v serpinu IRS-1 jsou rezidua: počátek M (1) – D (5), A (339) – T (345) a konec S (376) – L (377). Nejvíce narušený je samý počátek serpinu (nejčervenější kuličky na Obr. 30). Tyto regiony jsou pro serpin důležité a je možné, že se budou účastnit důležitých reakcí.



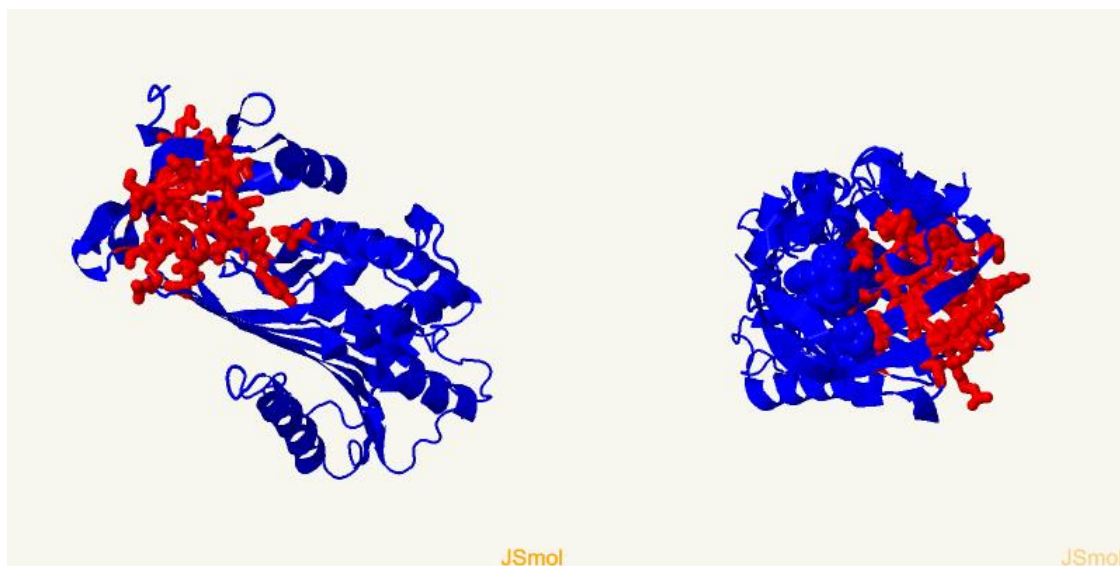
Obrázek 30: Model předpovězených poruch v odhadnuté sekundární struktuře serpinu IRS-1 (vytvoreno nástrojem Phyre2).

Podle konzervační analýzy je velká část struktury IRS-1 velmi málo konzervována (Obr. 31). Znamená to, že je možné daná rezidua nahradit za jiná. Nachází se zde i konzervovaná (S (33) – P (34), F (275), H (318)) a silně konzervovaná (P (273) a D (353) – F (356)) rezidua. Ta jsou naopak pevně zakotvena ve struktuře, jsou pro serpin důležité z hlediska jeho struktury a jeho funkce. Při pohledu na Obr. 31 je možné vyvodit odhad, že se v místě kumulace zakonzervovaných reziduí nachází aktivní místo (černě zakroužkováno na Obr. 31).



Obrázek 31: Model konzervační analýzy odhadnuté sekundární struktury serpinu IRS-1 (vytvořeno nástrojem Phyre2).

Červeně jsou na Obr. 32 znázorněny kapsy v odhadnuté struktuře. Ty mohou předpovídat existenci aktivního místa serpinu. Tuto teorii podporuje i předchozí odhad umístění aktivního místa na základě kumulace zakonzervovaných reziduí. Ta se nacházejí na Obr. 32 vpravo v místě modrých kuliček v blízkosti červených kapes.




Obrázek 32: Model detekce kapes odhadnuté sekundární struktury serpinu IRS-1 z různých úhlů (vytvořeno nástrojem Phyre2).

Analýza senzitivity reziduí ukazuje, na kolik jsou daná rezidua náchylná k mutaci, která by měla za následek změnu funkce nebo fenotypu. U serpinu IRS-1 jsou obecně málo náchylné k mutaci rezidua v α -helixu. Naproti tomu v β -strandech jsou rezidua k mutaci náchylná více. Nejvyšší citlivost se zde nevyskytuje, je však možné nalézt rezidua s relativně vysokou citlivostí, konkrétně T (146), M (233), P (273), V (324), I (360).

Tabulka I: Odhadovaný vliv mutací v reziduu E (349) – N (362) sekvence IRS-1 (vytvoreno nástrojem Phyre2).

		A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
349	E	24	59	10	2	49	76	15	35	16	35	26	20	19	9	20	18	22	25	38	39	E
350	F	68	92	95	93	3	96	89	48	94	42	46	94	83	91	92	92	82	43	80	35	F
351	N	28	39	28	23	39	58	10	33	19	39	27	1	57	27	21	19	15	30	44	24	N
352	V	24	44	91	85	38	91	89	19	89	33	35	90	77	83	88	83	69	7	89	75	V
353	D	73	82	4	31	82	84	60	83	82	78	80	20	58	60	82	48	56	62	83	79	D
354	H	66	78	65	53	50	79	4	78	41	75	67	38	62	20	21	41	65	74	64	50	H
355	P	65	90	82	75	90	89	84	89	85	87	84	86	5	66	86	65	71	88	90	89	P
356	F	58	88	91	87	2	92	70	75	90	73	75	89	86	89	89	64	86	82	72	30	F
357	L	44	57	94	89	32	95	74	14	90	5	15	91	83	85	87	84	61	24	62	57	L
358	F	73	72	95	93	3	95	87	50	94	49	48	94	92	94	94	88	78	57	51	18	F
359	F	45	63	92	88	2	93	78	37	82	25	31	90	88	75	89	66	63	37	45	17	F
360	I	75	86	94	93	81	97	93	5	94	30	42	93	88	94	94	90	81	18	94	88	I
361	R	47	60	88	48	56	77	37	54	18	33	36	61	76	34	5	59	44	58	57	46	R
362	N	54	66	12	18	71	66	7	70	30	66	41	3	43	26	46	23	30	71	74	41	N

0 (Neutral)  100 (Disease-associated)

Tabulka I zobrazuje vybrané aminokyseliny, ve kterých se v největším počtu vyskytovaly mutace, které jsou spojovány s nemocemi (již hodnoty větší než 80). Hodnoty v modrém poli se objevují tam, kde je aminokyselina nahrazena stejnou aminokyselinou, tudíž nedojde k žádnému efektu. Některé mutace (příklad nahrazení A, L a M) v tomto zobrazeném reziduu nemají ve větším počtu žádné vážné efekty. Většina mutací však velmi pravděpodobně může následně způsobit onemocnění, především D, E, G, K, N a R. Zvýrazněná je aminokyselina I (360), která je již podle analýzy senzitivity reziduí velmi citlivá na mutace. Ta tak může být nejvíce problémová, jelikož je velmi pravděpodobné, že k mutaci dojde, přičemž bude velmi pravděpodobně spojena s onemocněním (kromě nahrazení L, M a V).

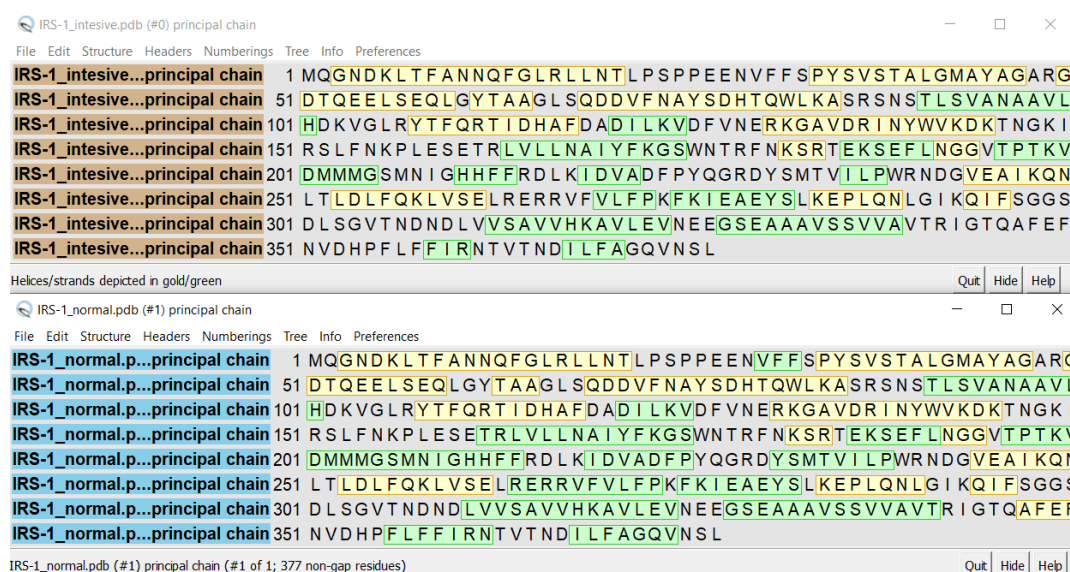
7.2.3. Intenzivní mód

Byl proveden také intenzivní mód odhadu struktury serpinu IRS-1. Tento odhad vymodeloval 99 % reziduí s více než 90% konfidencí. Následně byl vybrán jeden vzor, se kterým byla všechna rezidua porovnána a na jeho základě také namodelována. Tímto vzorem byl protein IRS-2, stejně jako u normálního módu. Zbylé 1 % reziduí (konkrétně pozice 347 a 348) bylo namodelováno tzv. *ab initio*, což je však vysoce nespolehlivá metoda modelování.

Jelikož byl vzorový protein stejný jako u normálního módu, všechny ostatní výsledky (konkrétně předpověď sekundární struktury a poruch, doménová analýza a informace o jednotlivých vzorech) byly shodné.

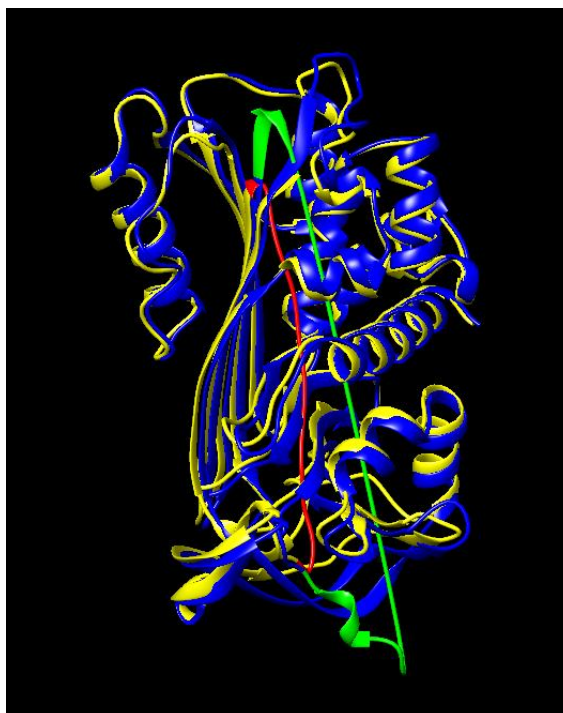
7.2.4. Porovnání výsledků normálního a intenzivního módu

V programu UCSF Chimera byly porovnány sekvence modelů IRS-1 z obou módů (Obr. 33). Zelenou barvou jsou zobrazena místa, kde je protein složen do β -strandu, žlutou jsou znázorněny α -helixy. Všechny rozdíly mezi oběma strukturami jsou podrobně popsány na následujících obrázcích.



Obrázek 33: Porovnání sekvencí výsledků odhadu struktury serpínu IRS-1 normálním (dole) a intenzivním (nahore) módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Nejvíce rozdílů se nachází v reziduu A (339) – N (351) (červená pro intenzivní mód, zelená pro normální mód na Obr. 34). Celé reziduum se zdá být vymodelováno kvalitněji v intenzivním módu, jelikož je kratší a nedochází zde ke srážkám jako na Obr. 25. Na počátku rezidua je β -strand vymodelovaný v intenzivním módu kratší. Následně není reziduum modelované tak lineárně (červená na Obr. 34). Struktura IRS-1 z intenzivního módu poté pokračuje jako neuspořádaná struktura, ale IRS-1 z normálního módu po lineárním úseku přechází do α -helixu (zelená na Obr. 34) na úseku A (347) – F (350).

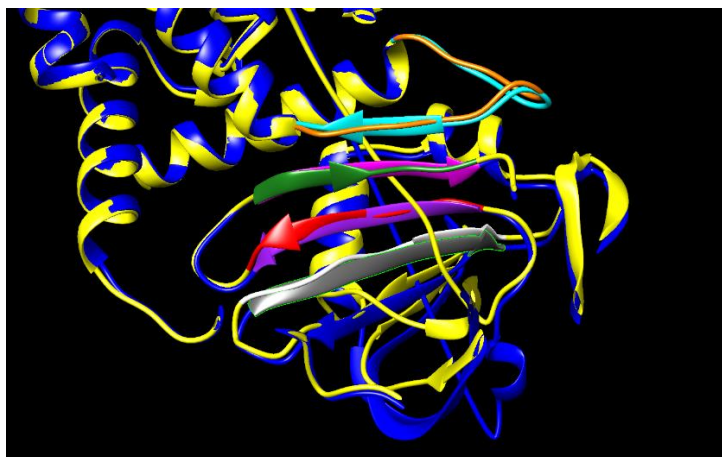


Obrázek 34: Rozdíly mezi oběma sekundárními strukturami serpinu IRS-1 odhadnutými normálním (modrá) a intenzivním (žlutá) módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Na Obr. 35 je ukázán nejčastější rozdíl mezi oběma strukturami IRS-1, kdy byla každá vymodelována jiným módem. Kromě drobných rozdílů, jako jsou třeba trochu jinak namodelované neuspořádané úseky struktury, se nejčastěji liší β -strandy. Na residuu L (22) – S (33) byla intenzivním módem vymodelována pouze neuspořádaná struktura (oranžová na Obr. 35), naopak normální mód zde vymodeloval krátký β -strand (tyrkysová na Obr. 35).

Dále je rozdílné residuum Y (231) – P (238), kde je β -strand z normálního módu (šedá na Obr. 35) opět delší, než β -strand z intenzivního módu (bílá na Obr. 31). Stejná situace nastává na residuu F (356) – N (362). β -strand z normálního módu (fialová na Obr. 35) je zde také delší než ten z intenzivního módu (červená na Obr. 35).

Jev rozdílné délky β -sheetů je možné pozorovat také na residuu I (368) – V (374), kde je β -strand vymodelovaný normální módem (zelená na Obr. 35) kratší než β -strand vymodelovaný intenzivním módem (růžová na Obr. 35).



Obrázek 35: Přiblížení β -strandů obou sekundárních struktur serpinu IRS-1 odhadnutými normálním (modrá) a intenzivním (žlutá) módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Na reziduu G (194) – F (214) se v normální módu nachází dlouhý β -strand (tyrkysová na Obr. 36). Na stejném reziduu byly však intenzivním módem vymodelovány dva β -strandy (oranžová na Obr. 36). Normálním módem byl vymodelován β -strand (fialová na Obr. 36) na reziduu I (219) – P (225), který je delší než β -strand z intenzivního módu (červená na Obr. 36), který pokračuje neuspořádanou strukturou.

Na reziduu R (264) – P (273) opět intenzivní mód vymodeloval kratší β -strand, tentokrát však tato část prochází skrze strukturu serpinu (zelená na Obr. 36) a nekopíruje tak vůbec dráhu dlouhého β -strandu vymodelovaného normálním módem (růžová na Obr. 36), který je vně struktury.



Obrázek 36: Přiblížení na rozdíly obou sekundárních struktur serpinu IRS-1 odhadnutými normálním (modrá) a intenzivním (žlutá) módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

8. Diskuse

Klíšťata si díky svému širokému rozšíření vyvinula větší odolnost, proto je potřeba vylepšovat a objevovat nové možnosti ochrany proti patogenům, které přenáší (Blisnick et al. 2017). Proti rozšiřování klíštěcích patogenů je nutné porozumění celé klíštěcí biologii, samotným patogenům a interakcím klíštěte s hostitelem (Blisnick et al. 2017). Většina z těchto věcí však stále zůstává neznámá. Především jsou to látky, které klíště ve svém životním cyklu využívá – ať už se jedná o látky s biologickou funkcí nebo o ty, které přispívají k roznosu a vývoji patogenů.

Věda však postupuje dopředu velmi rychle. Do PDB přibývají stále nové ověřené struktury proteinů. Tento samotný fakt nahrává také odhadům struktury proteinů, jelikož se zužuje skupina těch neznámých a proteiny s hledanou neznámou strukturou mají více vzorů k porovnávání. Díky rozvoji těch nejmodernějších metod je také možné od počátku století studovat genomy, transkriptomomy a proteomy, což usnadňuje biomolekulární studie (Metzker 2010).

Proteázové inhibitory mají schopnost inhibovat celé skupiny látek. Díky tomu, že cílí na specifické procesy, je možné je využívat při vývoji imunoterapeutických strategií vhodných pro jednotlivé pacienty (Scherer et al. 2010). Již dnes je odhadován jejich přínos při léčbě plicní embolie (Agbowuro et al. 2018) nebo při léčbě rakoviny (Eatemade et al. 2017). Proteázové inhibitory však nemusí sloužit jen jako odpověď na nemoc (léčba). Mohou také fungovat při vývoji vakcín. Dle Cherniacka (2011) jsou z mnoha organismů (i parazitů) izolovány látky, které slouží jako potenciální kandidáti na vývoj nových farmakoaktivních sloučenin.

U klíšťat je nejvhodnější zaměření na zkoumání slinných žláz. Ty totiž hrají hlavní úlohu při ovlivňování hostitelské imunitní odpovědi během saní krve látkami, které do daného organismu vypouštějí. Kromě toho právě ve slinách se přenášejí také dané patogeny. V klíštěcích slinných žlázách je produkováno velké množství serinových proteázových inhibitorů. Právě ty mají potenciál být použity jako nová léčiva proti nemocem spojenými s proteázami (Chmelař et al. 2017). Pro vývoj vakcín by mohly zase sloužit imunogeny, které byly odhaleny pomocí vzoru transkripcie slinných žláz klíštěte (Kotsyfakis et al. 2015). Tyto vakcíny by mohly zajistit brzké odpadnutí klíštěte od hostitele, čímž by se do organismu nestihly přenést patogeny.

Pro vývoj vakcín by měly být využívány antigeny ze slin, se kterými přijde hostitel přímo do styku, jelikož tím může být posílána hostitelova imunitní odpověď (Kotsyfakis et al. 2015). Jedním z kandidátů na vývoj vakcíny je IrSPI (Kotsyfakis et al. 2015). Tento serpin je také produkován ve slinných žlázách a imunitní systém hostitele proti podobným molekulám reaguje (Kotsyfakis et al. 2015). Znalosti všech látek ve slinných žlázách jsou však stále omezené, a tak je třeba stále zkoumat a objevovat. Čím více klíčecích látek a principů bude objasněno, tím větší jsou šance na úspěšné vývoje vakcíny a léků.

Serpin IRS-1 byl poskytnut již jako izolovaný v roztoku o koncentraci 1,1 mg/ml katedrou medicínské biologie. Dodaný objem roztoku byl 909 μ l. Po celou dobu byl uchován v chladničce kvůli co nejdelší životnosti roztoku.

Krystaly, které se podařilo získat screeningem byly poslány na rentgenovou difrakci. Jedna sada krystalů nedifraktovala vůbec, ale jeden krystal z druhé sady difraktoval na rozlišení 7 Å. Tento výsledek není špatný, ale je třeba připravit krystal ve větší kvalitě. Proto je třeba techniky krystalizace IRS-1 optimalizovat a pokusit se získat kvalitnější krystaly. Poté může být i zjištěna reálná struktura IRS-1.

V této bakalářské práci byla struktura pouze odhadnuta pomocí internetového nástroje Phyre2. Jedná se pouze o odhad, který je založen na porovnání sekvence proteinu a databáze proteinů již známých struktur. Pro protein IRS-1 byl jako hlavní vzor vybrán vysoce homologní protein IRS-2, který se také nachází ve slinných žlázách *Ixodes ricinus*.

Výsledná struktura proteinu je namodelována s vysokou konfidencí. Pokud by tato konfidence byla malá na většinové části proteinu, znamenalo by to malou příbuznost s již známými proteiny. Jak vyplývá z principu odhadu struktury, tak by takováto struktura byla s největší pravděpodobností špatně odhadnuta a vymodelována. Pro odhad sekundární struktury platí, že 78-80 % reziduí je vymodelováno ve struktuře správně (Kelley et al. 2015).

Jelikož je odhadnutý model IRS-1 vymodelován se 100% konfidencí, je velká pravděpodobnost, že protein skutečně zaujímá odhadnutý fold a že střed struktury je namodelován velmi přesně. Odlišné oproti skutečné struktuře však stále budou neuspořádané části struktury na povrchu molekuly.

Při určování neuspořádanosti sekundární struktury proteinu je tento odhad vytvořen také se 78-80% přesností. Pokud by však byl model vymodelován pomocí malého množství homologů, tak tato přesnost může spadnout až na 65 % (Kelley et al. 2015). Pokud se tato

neuspořádanost ve struktuře proteinu objevuje z více než 50 %, model proteinu nelze brát za správný. Takto vymodelovaný protein by nedokázal zaujmout globulární strukturu.

Reálná struktura IRS-1 se jistě bude lišit. Místa, ve kterých je velká šance, že reálný model zaujímá jinou strukturu, jsou např. rezidua K (149) – F (155) a A (331) – T (341). Tato rezidua jsou totiž vymodelována s relativně nízkou konfidencí oproti zbytku modelu. V sekvenci následuje reziduum T (341) – T (345), které je v normálním módu vymodelováno tak, že prochází skrze kostru proteinu. Toto reziduum je také vymodelované s velmi malou přesností. Bude se tedy strukturou spíše podobat modelu z intenzivního módu, kdy není reziduum tak lineární a nevznikají ve struktuře žádná překřížení.

Díky výsledkům různých analýz je možné označit další rezidua, která jsou špatně vymodelována. Podle analýzy dochází ke srážkám v okolí aminokyselin Y (62), M (207) a F (350). Podle analýzy rotamerů je špatně vymodelováno místo L (253) a Ramachandranova analýza označila P (25) ve struktuře jako chybné. Ve všech těchto místech je serpin IRS-1 odhadnut špatně a reálná struktura se bude od té představené v bakalářské práci odlišovat.

Díky analýzám nástroje Phyre2 bylo také možné odhadnout hlavní vazebná místa. Silně zakonzervovaná rezidua P (273) a D (253) – F (356) indikovala místa, která mohou být pro protein významná. Při analýze kapes ve struktuře se jich nejvíce nacházelo právě v okolí těchto silně zakonzervovaných reziduí. Je tedy možné, že v těchto místech se nachází aktivní místo serpinu IRS-1.

Při porovnání obou modelů z normálního a intenzivního módu bylo zjištěno, že u obou struktur se nejčastěji liší délka jednotlivých řetězců v β -sheetech. Lze usuzovat, že tento prvek sekundární struktury tedy bude v reálném modelu lehce odlišný. Naopak hlavní α -helixy se shodovaly (až na jeden případ), z čehož lze usuzovat správnost jejich odhadnutého vymodelování.

9. Závěr

Nejprve byly vypěstovány krystaly cvičného proteinu z vaječných bílků – Lysozymu. Byly použity techniky sedící kapky („sitting drop“), visící kapky („hanging drop“), „microbatch“ krystalizace pod olejem a krystalizace v kapiláře. Vzniklé krystaly byly zaznamenány a popsány.

Po osvojení základních krystalizačních technik započala krystalizace serpinu IRS-1 z *Ixodes ricinus*. Serpin byl dodán ve formě roztoku o koncentraci 1,1 mg/ml z katedry medicínské biologie. Poté byl proveden PCT (Hampton Research, Aliso Viejo, USA). Při následném ručním screeningu pomocí kitů PEGRx 1 a 2 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) byly vypěstovány 3D krystaly, které byly poslány na rentgenovou difrakční analýzu. Krystaly vznikly smícháním roztoku IRS-1 o koncentraci 1,1 mg/ml s činidlem 0,1 M HEPES o pH 7,5, 30% w/v polyethylenglykol 1000 v poměru objemů 1:0,3 [μl]. Další krystaly vznikly při kombinaci roztoku IRS-1 o koncentraci 1,1 mg/ml s činidlem 1,8 M sulfát amonný, 0,1 M BIS-TRIS o pH 6,5, 2% v/v polyethylenglykol monomethyl ether 550 v poměru objemů 0,5:0,25 [μl].

Jedna sada krystalů (s činidlem 0,1 M HEPER) difraktovala na rozlišení 7 Å, ale krystaly nebyly dostatečně kvalitní. Druhá sada krystalů (s činidlem 1,8 M sulfát amonný) nedifraktovala vůbec. Ještě byla provedena krystalizace s kitem SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom) pomocí robotu OryxNani 4 (Douglas Instruments Hungerford, United Kingdom). Z této krystalizace byly vypěstovány 2D jehličky a mikrokrystaly.

Následoval odhad struktury pomocí internetového nástroje Phyre2. Byly spuštěny oba módy, jak normální, tak i intenzivní. Díky tomu, že byl nalezen jeden protein, se kterým bylo namodelováno 99 % sekvence IRS-1 se 100% konfidencí, výsledky se v nástroji Phyre2 nelišily a byly rozebírány ty z normálního módu. Onen vzorový protein byl hydrolázový inhibitor IRS-2 z *Ixodes ricinus* (PDB kód: 3NDA). V odhadnuté sekundární struktuře IRS-1 byly popsány možné problémy a nepřesnosti. Pomocí analýzy výsledků nástroje Phyre2 byly definovány chyby, které se v modelu mohly vyskytovat.

Modely serpinů byly vymodelovány a porovnávány v programu na vizualizaci struktur proteinů UCSF Chimera. Struktura IRS-1 odhadnutá normálním módem byla také porovnána s již známou strukturou serpinu IRS-2 a také s odhadnutou strukturou z intenzivního módu. Všechny rozdíly mezi strukturami byly identifikovány a popsány.

10. Seznam použité literatury

AGBOWURO, A. A., HUSTON, W. M., GAMBLE, A. B., TYNDALL, J. D. A. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medical Research Reviews* 38, 1295–1331.

BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N., BOURNE, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 235–242.

BOLANOS-GARCIA, V. M., CHAYEN, N. E. (2009). New directions in conventional methods of protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 101, 3–12.

BLISNICK, A. A., FOULON, T., BONNET, S. I. (2017). Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Thick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 1–24.

D'ARCY, A., ELMORE, C., STIHLE, M., JOHNSTON, J. E. (1996) A novel approach to crystallizing proteins under oil. *Journal of Crystal Growth* 168, 175–180.

EATEMADI, A., AIYELABEGAN, H. T., NEGAHDARI, B., MAZLOMI, M. A., DARAEE, H., DARAEE, N., EATEMADI, R., SADRODDINY, E. (2017). Role of protease and protease inhibitors in cancerpathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86, 221–231.

EWING, T. J. A., MAKINO, S., SKILLMAN, A. G., KUNTZ, I. D. (2001). DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 15, 411–428.

FULTON, K. F., BUCKLE, A. M., CABRITA, L. D., IRVING, J. A., BUTCHER, R. E., SMITH, I., REEVE, S., LESK, A. M., BOTTOMLEY, S. P., ROSSJOHN, J., WHISSTOCK, J. C. (2005) The High Resolution Crystal Structure of a Native Thermostable Serpin Reveals the Complex Mechanism Underpinning the Stressed to Relaxed Transition. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (9), 8435–8442.

HAMPTON RESEARCH (2001). *Crystal Growth Techniques*. Crystal Growth 101.

CHAYEN, N. E. (1997). The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure* 5,

1269–1274.

CHAYEN, N. E. (2005) Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88, 329–337.

CHERNIACK, E. P. (2011). Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Altern. Med. Rev.* 16, 50–58.

CHMELARĚ, J., KOTÁL, J., LANGHANSOVÁ, H., KOTSYFAKIS, M. (2017). Protease Inhibitor in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystanins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 7, 1–16.

JEFFERYS, B. R., KELLEY, L. A., STERNBERG, M. J. (2010). Protein folding requires crowd control in a simulated cell. *J. Mol. Biol.* 397, 1329–1338.

JONES, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195–202.

KAVINA, K. (1940). Naučný slovník přírodních věd pro školu a dům. Slovanské nakladatelství Josef Elstner, Praha.

KELLEY, L. A., MEZULIS, S., YATES, CH. M., WASS M. N., STERNBERG M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845–858.

KOONIN, E. V., WOLF, Y. I., KAREV, G. P. (2002). The structure of protein universe and genome evolution. *Nature* 420, 218–223.

KOTSYFAKIS, M., SCHWARZ, A., ERHART, J., RIBERIO, J. M. C. (2015). Tissue and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports* 9103 (5), 1–10.

KOVÁŘOVÁ, Z., CHMELARĚ, J., ŠANDA, M., BRYNDA, J., MAREŠ, M., ŘEZÁČOVÁ, P. (2010). Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Cryst.* F66, 1453–1457.

LUFT, J. R., WOLFLEY, J. R., SNELL, E. H. (2011). What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments. *Cryst Growth Des.* 11, 651–663.

- MEDLOCK, J. M., HANSFORD, K. M., BOMANE, A. ET AL. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors* 6, 1–11.
- METZKER, M. L. (2010). Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.
- MENG, E. C., PETERSESE, E. F., COUCH, G. S., HUANG, C. C., FERRIN, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics* 7 (339).
- MURKHERJEE, S., SZILAGYI, A., ROY, A., ZHANG, Y. (2010). Genome-wide protein structure prediction. *Multiscale Approaches to Protein Modeling* (ed. Kolinski, A.) 11, 255–279.
- OTÁLORA, F., GAVIRA, J. A., NG, J. D., GARCÍA-RUIZ, J. M. (2009). Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 101, 26–37.
- PETERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C., FERRIN, T. E. (2004). UCSF Chimera—A Visualization System For Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25 (13), 1606–1612.
- PRUDNIKOVA, T. (2020). Structure-functional study of protease inhibitors from ticks as novel pharmaceutical biodrugs. *Czech Science Foundation*.
- REMMERT, M., BIEGERT, A., HAUSER, A., SÖDING, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9, 173–175.
- SCHERER, H. U., DORNER, T., BURMESTER, G. R. (2010). Patient-tailored therapy in rheumatoid arthritis: an editorial review. *Curr. Opin. Rheumatol.* 22, 237–245.
- SCHRAUBER, H., EISENHABER, F., ARGOS, P. (1992). Rotamers: To be or not to be? An Analysis of Amino Acid Side-chain Conformations in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* 230, 592 – 612.
- SILVERMAN, G. A., BIRD, P. I., CARELL, R. W., CHURCH, F. C., COUGHLIN, P. B., GETTINS, P. G. W., IRVING, J. A., LOMAS, D. A., LUKE, C. J., MOYER, R. W., PEMBERTON, P. A., REMOLD-O'DONNELL, E., SALVESEN, G. S., TRAVIS, J., WHISSTOCK, J. C. (2001). The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally

Similar but Functionally Diverse Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36), 33293–33296.

SMITH, P. K., HARPER, J. I. (2006). Serine proteases, their inhibitors and allergy. *Allergy* 61, 1441–1447.

SÖDING, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951–960.

WHISSTOCK, C. J., BOTTOMLEY, S. P. (2006). Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Current Opinion in Structural Biology* 16, 761–768.

ZANI, M-L., MOREAU, T. (2010). Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie* 92, 1689–1704.

10.1. Seznam internetových zdrojů obrázků

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00199/full>, cit. dne 24. 2. 2021.

https://www.researchgate.net/figure/Serpin-structures-From-left-to-right-A-native-1-AT-Protein-Data-Bank-PDB-entry_fig2_232316225?hcb=1, cit. dne 24. 2. 2021.

<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/354365/?hcb=1>, cit. dne 24. 2. 2021

<https://www.semanticscholar.org/paper/Serine-Protease-Inhibitors-in-Ticks%3A-An-Overview-of-Blisnick-Foulon/aca9412041d4b4e35e44faa7cef23d2d5be1077f#extracted>, cit. dne 10. 3. 2021.

<https://docplayer.net/56936098-Molecular-dimensions-more-intelligent-solutions-providing-you-with-the-latest-innovations-in-protein-crystallography.html>, cit. dne 10. 4. 2021.

<https://hamptonresearch.com/product-VDX48-Plate-with-sealant-68.html>, cit. dne 10. 4. 2021.

<https://hamptonresearch.com/product-VDX48-Plate-with-sealant-68.html>, cit. dne 10. 4. 2021.

10.2. Seznam použitých komerčních kitů a dalších pomůcek

Krystalizační destička se čtyřmi jamkami na jeden rezervoár pro metodu „sitting drop“ (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

Krystalizační destička pro metodu „hanging drop“ se 48 rezervoáry se silikonovými kroužky (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

Krystalizační destička pro metodu „microbatch“ se 72 jamkami. (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

Komerční kity PEGRx1 a PEGRx2 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

Komerční kit SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

Robot RysNani 4 (Douglas Instruments Hungerford, United Kingdom).

Air duster CLEAN IT.

Molekulární grafika a analýza provedena s UCSF Chimera, vyvinuto Resource for Fiocomputing, Visualization, and Infromatics at the University od California, San Francisco, s podporou z NIH P41-GM103311.

Internetový nástroj pro odhad struktury proteinu Phyre2

(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

11. Seznam použitých zkratk

3D – trojrozměrný

3NDA – kód IRS-2 v PDB

HMM – „Hidden Markov Model“

PCT – pre-krystalizační test

PDB – Proteinová Data Bank

PI – proteázový inhibitor

RCL – „reactive centre loop“

s1C – β -strand umístěn v β -sheetu C serpínu

TBM – template-based modeling

TNF – „tumor necrosis factor“

11.1. Seznam zkratk aminokyselin

Ala (A) – Alanin

Arg (R) – Arginin

Asn (N) – Asparagin

Asp (D) – Asparagová kyselina

Cys (C) – Cystein

Gln (Q) – Glutamin

Glu (E) – Glutamová kyselina

Gly (G) – Glycin

His (H) – Histidin

Ile (I) – Isoleucin

Leu (L) – Leucin

Lys (K) – Lysin

Met (M) – Methionin

Phe (F) – Fenylalanin

Pro (P) – Prolin

Ser (S) – Serin

Thr (T) – Threonin

Trp (W) – Tryptofan

Tyr (Y) – Tyrosin

Val (V) – Vali

12. Seznam příloh

Obrázek 37: Klíštěcí serpiny (černě) a cystaniny (oranžově) a jejich cíle při přísátí klíštěte (Chmelař et al. 2017).

Obrázek 38: Sekundární struktura serpinu IRS-1 odhadnutá normálním módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Obrázek 39: Povrch odhadnuté sekundární struktury serpinu IRS-1 s hydrofilními (modrá) a hydrofobními (oranžová) místy. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Tabulka II: Detailní informace o předlohách, výběr homologů 1–4 (vytvořeno nástrojem Phyre2).

Obrázek 40: Odhadnutá sekundární struktura serpinu IRS-1 pomocí intenzivního módu. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

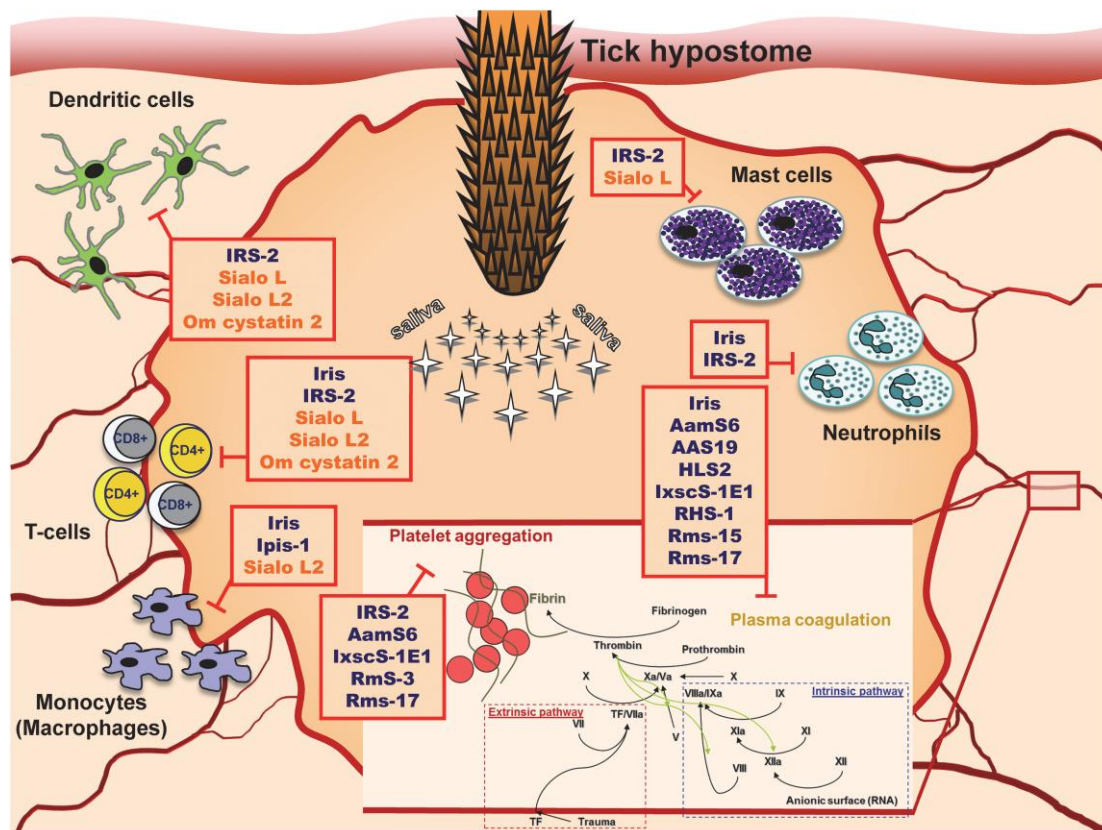
Obrázek 41: Složení komerčního kitu PEGRx 1 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

Obrázek 42: Složení komerčního kitu PEGRx 2 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

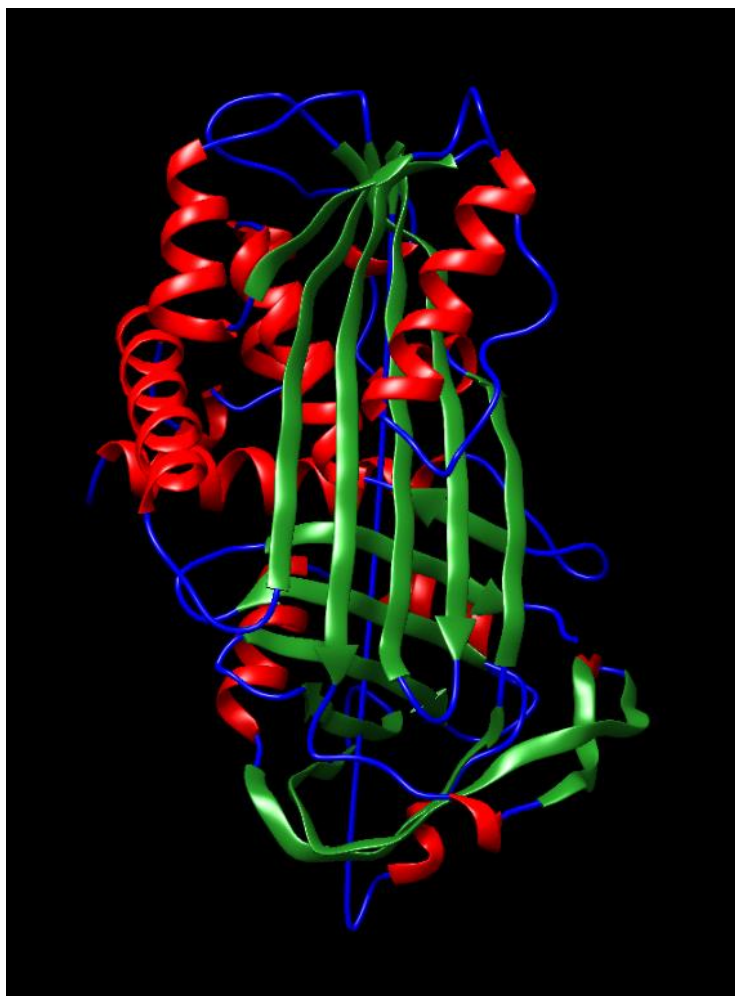
Obrázek 43: Podmínky A1 – D12 obsaženy v komerčním kitu SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

Obrázek 44: Podmínky E1 – H12 obsaženy v komerčním kitu SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

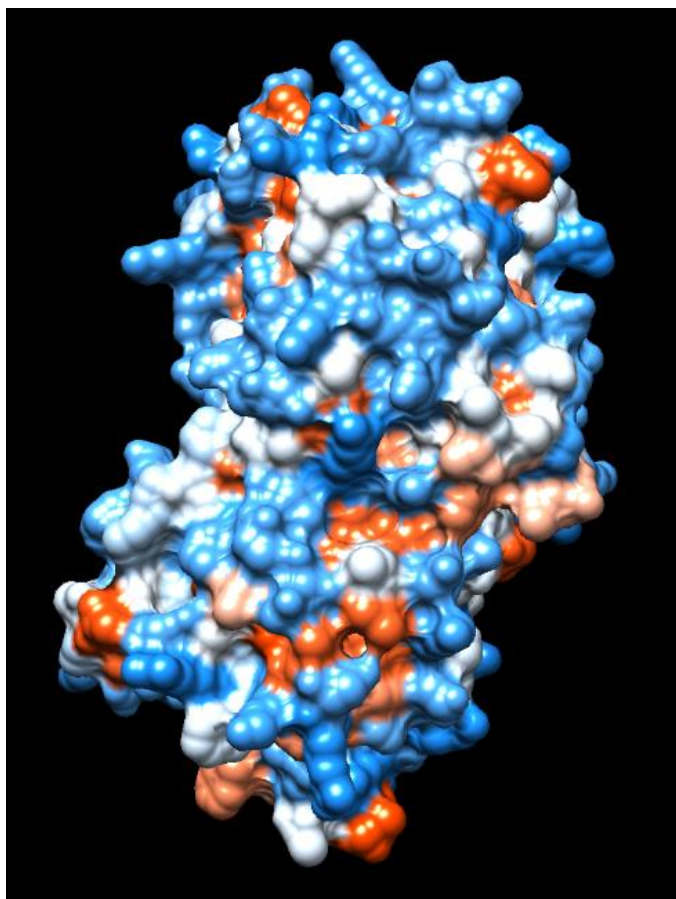
13. Přílohy



Obrázek 37: Klíčtější serpiny (černě) a cystaniny (oranžově) a jejich cíle při přísátí klíšete (Chmelař et al. 2017).



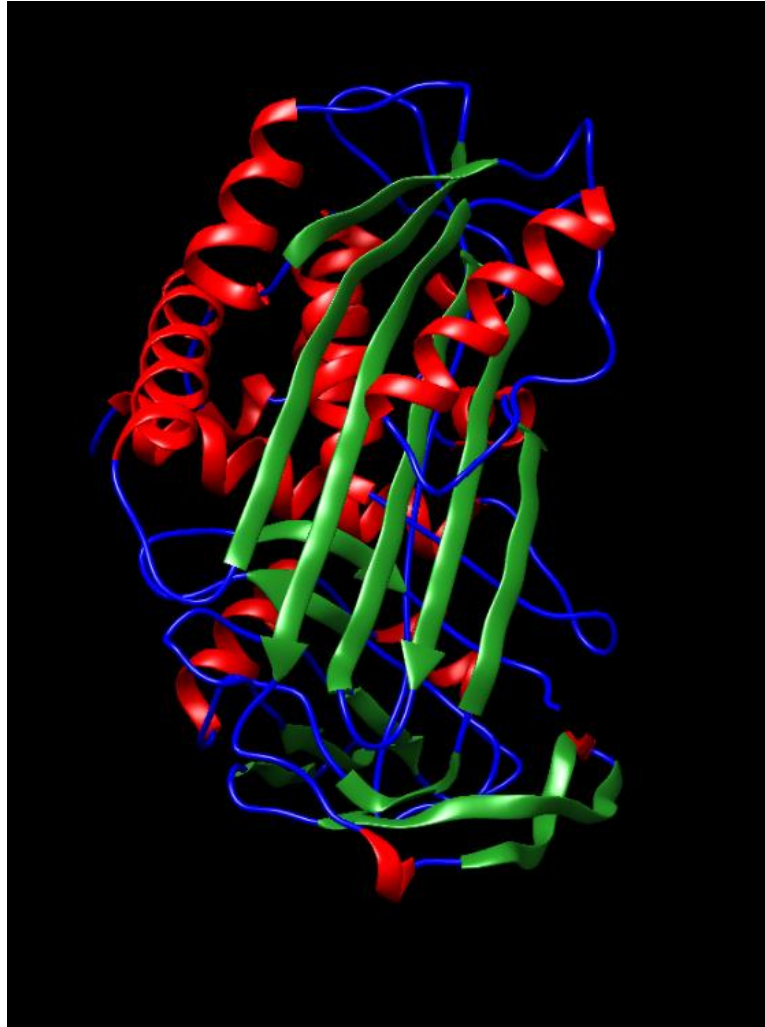
Obrázek 38: Sekundární struktura serpinu IRS-1 odhadnutá normálním módem. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.



Obrázek 39: Povrch odhadnuté sekundární struktury serpinu IRS-1 s hydrofilními (modrá) a hydrofobními (oranžová) místy. Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Tabulka II: Detailní informace o předlohách, výběr homologů 1–4 (vytvořeno nástrojem Phyre2).

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c3ndaA <input type="radio"/>	 Alignment		100.0	59	PDB header: hydrolase inhibitor Chain: A: PDB Molecule: serpin-2; PDBTitle: crystal structure of serpin from tick ixodes ricinus View investigator results
2	c1jmoA <input checked="" type="radio"/>	 Alignment		100.0	27	PDB header: blood clotting Chain: A: PDB Molecule: heparin cofactor ii; PDBTitle: crystal structure of the heparin cofactor ii-s195a thrombin complex
3	d1atta <input checked="" type="radio"/>	 Alignment		100.0	32	Fold: Serpins Superfamily: Serpins Family: Serpins
4	d2b5tj1 <input checked="" type="radio"/>	 Alignment		100.0	33	Fold: Serpins Superfamily: Serpins Family: Serpins



Obrázek 40: Odhadnutá sekundární struktura serpinu IRS-1 pomocí intenzivního módu.
Vytvořeno v programu UCSF Chimera.

Tube #	Buffer [◇]	Tube #	Polymer
1.	0.1 M Citric acid pH 3.5	1.	34% w/v Polyethylene glycol 200
2.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	2.	38% w/v Polyethylene glycol 200
3.	0.1 M HEPES pH 7.5	3.	42% w/v Polyethylene glycol 200
4.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	4.	30% w/v Polyethylene glycol 300
5.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	5.	25% w/v Polyethylene glycol 300
6.	0.1 M BICINE pH 8.5	6.	20% w/v Polyethylene glycol 300
7.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	7.	15% w/v Polyethylene glycol 400
8.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	8.	22% w/v Polyethylene glycol 400
9.	0.1 M Tris pH 8.0	9.	30% w/v Polyethylene glycol 400
10.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	10.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
11.	0.1 M Imidazole pH 7.0	11.	25% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
12.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	12.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
13.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	13.	10% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
14.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	14.	20% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
15.	0.1 M Tris pH 8.0	15.	30% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
16.	0.1 M Citric acid pH 3.5	16.	14% w/v Polyethylene glycol 1,000
17.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	17.	22% w/v Polyethylene glycol 1,000
18.	0.1 M HEPES pH 7.5	18.	30% w/v Polyethylene glycol 1,000
19.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	19.	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
20.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	20.	20% w/v Polyethylene glycol 1,500
21.	0.1 M BICINE pH 8.5	21.	15% w/v Polyethylene glycol 1,500
22.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	22.	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
23.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	23.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
24.	0.1 M Tris pH 8.0	24.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
25.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	25.	30% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
26.	0.1 M Imidazole pH 7.0	26.	20% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
27.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	27.	10% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
28.	0.1 M Citric acid pH 3.5	28.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
29.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	29.	18% w/v Polyethylene glycol 3,350
30.	0.1 M HEPES pH 7.5	30.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
31.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	31.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
32.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	32.	14% w/v Polyethylene glycol 4,000
33.	0.1 M Tris pH 8.0	33.	28% w/v Polyethylene glycol 4,000
34.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	34.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
35.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	35.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
36.	0.1 M BICINE pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
37.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	37.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
38.	0.1 M Imidazole pH 7.0	38.	20% w/v Polyethylene glycol 6,000
39.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	39.	30% w/v Polyethylene glycol 6,000
40.	0.1 M Citric acid pH 3.5	40.	28% w/v Polyethylene glycol 8,000
41.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	41.	16% w/v Polyethylene glycol 8,000
42.	0.1 M HEPES pH 7.5	42.	4% w/v Polyethylene glycol 8,000
43.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	43.	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
44.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	44.	16% w/v Polyethylene glycol 10,000
45.	0.1 M BICINE pH 8.5	45.	20% w/v Polyethylene glycol 10,000
46.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	46.	18% w/v Polyethylene glycol 20,000
47.	0.1 M Imidazole pH 7.0	47.	12% w/v Polyethylene glycol 20,000
48.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	48.	8% w/v Polyethylene glycol 20,000

◇ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Obrázek 41: Složení komerčního kitu PEGRx 1 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

Tube #	Additive / Salt / Volatile Organic / Polyol	Tube #	Buffer [◇]	Tube #	Polymer
1.	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	1.	4% v/v Polyethylene glycol 200
2.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	2.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	2.	26% w/v Polyethylene glycol 200
3.	0.05 M Calcium chloride dihydrate	3.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	3.	45% v/v Polyethylene glycol 200
4.	28% v/v 2-Propanol	4.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	4.	3% v/v Polyethylene glycol 200
5.	20% v/v Tacsimate pH 7.0	5.	0.1 M HEPES pH 7.5	5.	2% v/v Polyethylene glycol 200
6.	10% v/v 2-Propanol	6.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	6.	26% w/v Polyethylene glycol 400
7.	0.2 M Ammonium acetate	7.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	7.	24% v/v Polyethylene glycol 400
8.	0.2 M Ammonium sulfate	8.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	8.	18% v/v Polyethylene glycol 400
9.		9.	0.1 M HEPES pH 7.5	9.	40% v/v Polyethylene glycol 400
10.	6% v/v 2-Propanol	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	10.	26% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
11.	1.8 M Ammonium sulfate	11.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	11.	2% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
12.	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	12.	0.1 M Imidazole pH 7.0	12.	22% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
13.	0.1 M Succinic acid pH 7.0	13.	0.1 M BICINE pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
14.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	14.	20% w/v Polyethylene glycol 1,000
15.	0.1 M Sodium malonate pH 8.0	15.	0.1 M Tris pH 8.0	15.	30% w/v Polyethylene glycol 1,000
16.	4% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	16.	0.1 M Citric acid pH 3.5	16.	20% w/v Polyethylene glycol 1,500
17.	0.2 M L-Proline	17.	0.1 M HEPES pH 7.5	17.	24% w/v Polyethylene glycol 1,500
18.	10% v/v 2-Propanol	18.	0.1 M BICINE pH 8.5	18.	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
19.	0.1 M Sodium chloride	19.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	19.	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
20.	0.02 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate	20.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	20.	24% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
21.	20% v/v 2-Propanol	21.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	21.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
22.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	22.	0.1 M Imidazole pH 7.0	22.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
23.	4.0 M Potassium formate	23.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	23.	2% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
24.	50% v/v Tacsimate pH 4.0	24.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	24.	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
25.	0.10% w/v n-Octyl-β-D-glucoside	25.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	25.	22% w/v Polyethylene glycol 3,350
26.	2% v/v Tacsimate pH 7.0, 5% v/v 2-Propanol	26.	0.1 M Imidazole pH 7.0	26.	8% w/v Polyethylene glycol 3,350
27.	2% v/v 1,4-Dioxane	27.	0.1 M Tris pH 8.0	27.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
28.	18% v/v 2-Propanol	28.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	28.	20% w/v Polyethylene glycol 4,000
29.	6% v/v Tacsimate pH 6.0	29.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	29.	25% w/v Polyethylene glycol 4,000
30.	0.2 M Magnesium formate dihydrate	30.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	30.	18% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
31.	2% v/v Polyethylene glycol 400	31.	0.1 M Imidazole pH 7.0	31.	24% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32.	0.2 M Sodium formate	32.	0.1 M BICINE pH 8.5	32.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
33.	4% v/v 2-Propanol	33.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	33.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
34.	6% v/v Ethylene glycol	34.	0.1 M Citric acid pH 3.5	34.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
35.	0.15 M Lithium sulfate monohydrate	35.	0.1 M Citric acid pH 3.5	35.	18% w/v Polyethylene glycol 6,000
36.	10% v/v 2-Propanol	36.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	36.	22% w/v Polyethylene glycol 6,000
37.	0.2 M Sodium chloride	37.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	37.	22% w/v Polyethylene glycol 8,000
38.	20% v/v 2-Propanol	38.	0.1 M Tris pH 8.0	38.	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
39.	10% v/v Polyethylene glycol 200	39.	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	39.	18% w/v Polyethylene glycol 8,000
40.	15% v/v 2-Propanol	40.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	40.	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
41.	0.4 M Sodium malonate pH 6.0	41.	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	41.	0.5% w/v Polyethylene glycol 10,000
42.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	42.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	42.	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
43.	5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	43.	0.1 M HEPES pH 7.5	43.	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
44.	0.2 M Ammonium acetate	44.	0.1 M Tris pH 8.0	44.	16% w/v Polyethylene glycol 10,000
45.	5% v/v 2-Propanol	45.	0.1 M Citric acid pH 3.5	45.	6% w/v Polyethylene glycol 20,000
46.	1.0 M Sodium malonate pH 5.0	46.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	46.	2% w/v Polyethylene glycol 20,000
47.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	47.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	47.	10% w/v Polyethylene glycol 20,000
48.	3% w/v Dextran sulfate sodium salt	48.	0.1 M BICINE pH 8.5	48.	15% w/v Polyethylene glycol 20,000

◇ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Obrázek 42: Složení komerčního kitu PEGRx 2 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA).

SG1 Screen HT-96

Conditions A1 - D12

MD1-89 / MD1-89-FX

Well #	Conc. Salt1	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant1	Conc. Precipitant2
A1	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A2	2.0 M Ammonium sulfate					
A3	0.2 M Sodium acetate trihydrate				20 % w/v PEG 3350	
A4	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5		
A5	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
A6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 4000	10 % v/v 2-Propanol
A7	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	2 % v/v PEG 400	
A8	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
A9	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A11	4.0 M Sodium formate					
A12	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	20 % w/v PEG 8000	
B1			0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B2			0.1 M MES	6.5	12 % w/v PEG 20000	
B3	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B4	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M MES	6.5	30 % w/v PEG 5000 MME	
B5	0.2 M Calcium chloride dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
B6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 10000	
B7	0.2 M Sodium formate				20 % w/v PEG 3350	
B8	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B9	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate					
B10	0.2 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	28 % v/v PEG 400	
B11	0.2 M Ammonium chloride				20 % w/v PEG 3350	
B12	0.2 M Magnesium formate dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
C1	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	25 % w/v PEG 4000	
C2	1.4 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0					
C3	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
C4	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate				20 % w/v PEG 3350	
C5	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
C6	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6		
C7			0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
C8	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
C9	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	25 % w/v PEG 3350	
C10	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
C11	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
C12	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
D1	1.5 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
D2			0.1 M Sodium citrate	5.5	20 % w/v PEG 3000	
D3					25 % w/v PEG 1500	
D4	0.2 M Potassium thiocyanate				20 % w/v PEG 3350	
D5	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	18 % w/v PEG 8000	
D6	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
D7	0.2 M Ammonium sulfate				30 % w/v PEG 8000	
D8			0.1 M Bis-Tris	6.5	20 % w/v PEG 5000 MME	
D9	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	30 % w/v PEG 2000 MME	
D10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
D11			0.1 M Sodium acetate	4.6	8 % w/v PEG 4000	
D12	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5		

Obrázek 43: Podmínky A1 – D12 obsaženy v komerčním kitu SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).

SG1 Screen HT-96

Conditions E1 - H12

MD1-89 / MD1-89-FX

Well #	Conc.	Salt1	Conc.	Salt2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant1
E1	2.0 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Bis-Tris	5.5		
E2								25 % w/v	PEG 3350
E3	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	PEG 400
E4	2.0 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
E5	3.5 M	Sodium formate							
E6	1.6 M	Magnesium sulfate heptahydrate			0.1 M	MES	6.5		
E7	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate						20 % w/v	PEG 3350
E8	0.2 M	Ammonium sulfate						30 % w/v	PEG 4000
E9	0.1 M	Potassium thiocyanate						30 % w/v	PEG 2000 MME
E10	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate pH7						20 % w/v	PEG 3350
E11	2.0 M	Sodium formate			0.1 M	Sodium acetate	4.6		
E12	0.2 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	25 % w/v	PEG 3350
F1	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
F2	0.2 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	25 % w/v	PEG 3350
F3	0.2 M	Ammonium sulfate						20 % w/v	PEG 3350
F4	1.0 M	Sodium citrate tribasic dihydrate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		
F5	0.2 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
F6	0.2 M	Ammonium nitrate						20 % w/v	PEG 3350
F7	0.2 M	Sodium thiocyanate						20 % w/v	PEG 3350
F8	0.2 M	Potassium nitrate						20 % w/v	PEG 3350
F9					0.1 M	Sodium HEPES	7.5	20 % w/v	PEG 8000
F10	0.2 M	Magnesium acetate tetrahydrate						20 % w/v	PEG 3350
F11					0.1 M	Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
F12	0.02 M	Calcium chloride dihydrate			0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
G1	0.2 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 8000
G2	0.2 M	Sodium sulfate						20 % w/v	PEG 3350
G3	0.01 M	Zinc sulfate heptahydrate			0.1 M	MES	6.5	25 % v/v	PEG 550 MME
G4	0.2 M	Sodium tartrate dibasic dihydrate						20 % w/v	PEG 3350
G5								60 % v/v	T-mate pH 7.0
G6	0.5 M	Ammonium sulfate	1.0 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
G7								30 % w/v	PEG 1500
G8	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 8000
G9	0.2 M	Ammonium tartrate dibasic						20 % w/v	PEG 3350
G10	0.2 M	Sodium fluoride						20 % w/v	PEG 3350
G11	0.2 M	Sodium chloride	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		
G12	0.1 M	Sodium chloride	1.6 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
H1	0.2 M	Ammonium formate						20 % w/v	PEG 3350
H2	0.2 M	Lithium citrate tribasic tetrahydrate						20 % w/v	PEG 3350
H3	0.2 M	Ammonium iodide						20 % w/v	PEG 3350
H4	0.2 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
H5								30 % w/v	PEG 4000
H6					0.1 M	Tris	8.5	25 % w/v	PEG 3350
H7	0.2 M	Ammonium fluoride						20 % w/v	PEG 3350
H8	0.1 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	Bis-Tris	5.5	17 % w/v	PEG 10000
H9	0.2 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	Imidazole	8.0	10 % w/v	PEG 8000
H10	0.2 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Tris	8.5	25 % w/v	PEG 3350
H11					0.1 M	CHES	9.0	20 % w/v	PEG 8000
H12	4.3 M	Sodium chloride			0.1 M	Sodium HEPES	7.5		

Obrázek 44: Podmínky E1 – H12 obsaženy v komerčním kitu SG1-HT96 (Molecular Dimensions, Sheffield, United Kingdom).