

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Strukturní studie serpinu Iripin-4 z klíšťat *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Věra Vopátková

Školitelka: Mgr. Barbora Kašáková

Konzultantka: Mgr. Petra Havlíčková

České Budějovice 2022

Vopátková, V., 2022: Strukturní studie serpinu Iripin-4 z klíšťat *Ixodes ricinus*. [Structural study of serpin Iripin-4 from ticks *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Optimal conditions for serpin Iripin-4 expression and purification were studied. Then, suitable conditions for protein crystal growth were investigated. These conditions were optimized and the formed crystals were tested.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Barboře Kašćákové za odborné vedení, věnovaný čas a přátelský přístup, dále své konzultantce Mgr. Petře Havlíčkové za veškerou ochotu. Také chci poděkovat Mgr. Michalu Kutému, Ph. D. za pomoc při výběru tématu pro bakalářskou práci. V neposlední řadě děkuji své rodině, která mi pomáhala po celou dobu studia.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Klíště <i>Ixodes ricinus</i>	2
2.1 Vývoj klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	2
2.1.1 Nalezení hostitele	2
2.1.2 Kousnutí klíštětem a přenos slin	3
3 Nemoci přenášené klíštětem <i>Ixodes ricinus</i>	4
3.1 Klíšťová encefalitida	4
3.2 Lymeská borelióza	4
3.2.1 Současná strategie v boji proti nákaze	4
3.2.2 Imunitní systém klíšťat.....	5
4 Serpiny	6
4.1 Serpiny ve slinách klíštěte.....	6
4.2 Struktura serpinů	7
4.2.1 Mechanismus inhibice proteáz serpiny	10
5 Krystalografie.....	12
6 Cíl práce	14
7 Materiál a metody.....	15
7.1 Transformace.....	15
7.2 Pilotní exprese	16
7.3 Analýza vzorků	19
7.3.1 SDS – PAGE elektroforéza	19
7.4 Exprese ve velkém měřítku	20
7.5 Homogenizace buněk	21
7.6 Purifikace	21
7.6.1 Iontově výměnná chromatografie.....	21
7.6.2 Gelová chromatografie	21

7.6.3 Zakoncentrování.....	22
7.7 Krystalizace modelového proteinu – lysozymu	22
7.8 Krystalizace Iripinu-4.....	22
7.9 Optimalizace krystalizačních podmínek	23
8 Výsledky.....	24
8.1 Pilotní exprese Iripinu-4.....	24
8.2 Exprese ve velkém měřítku	27
8.3 Purifikace	28
8.4 Krystalizace lysozymu	33
8.5 Krystalizace Iripinu-4.....	33
8.6 Optimalizace podmínek pro růst krystalů Iripinu-4	37
9 Diskuze.....	39
10 Závěr.....	42
11 Seznam použité literatury	43
12 Seznam příloh.....	48

1 Úvod

Serpiny, nacházející se ve slinách klíštěte, v současné době představují potenciální adepty na výrobu léčiv. Díky své široké škále účinků na imunitní systém člověka by mohly představovat řešení pro pacienty trpící např. problémy se srážlivostí krve, chronickými záněty nebo poruchami komplementového systému. Pro správné určení funkce jednotlivých serpinů je však klíčové znát jejich chemickou strukturu.

Tato práce se zabývá hledáním ideálních podmínek pro expresi serpinu Iripin-4 z *Ixodes ricinus*. V průběhu práce byly k transformaci použity různé typy buněk, kultivace probíhala v několika typech živného media a při různých teplotách, také byla vyzkoušena různá koncentrace indukčního faktoru. Následně byl protein purifikován pomocí vybraných chromatografických metod a byly hledány podmínky, ve kterých by mohlo dojít k růstu proteinových krystalů. Tyto podmínky byly následně optimalizovány s cílem vypěstovat dostatečné množství velkých monokrystalů serpinu v difrakční kvalitě.

2 Klíště *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus neboli klíště obecné spadá do podtřídy roztočů, kteří žijí parazitním způsobem života. Živí se zcela krví obratlovců, přičemž se přichytí a zůstávají na kůži hostitele několik dní (Sonenshine & Roe, 2014a).

2.1 Vývoj klíštěte *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus potřebuje ke svému správnému vývoji tři různé hostitele, jedná se tedy o tzv. tříhostitelský cyklus. Druh hostitele se odvíjí podle vývojového stádia klíštěte. Larvy parazitují na drobných hlodavcích, ještěrkách a ptácích, podobně jako nymfy, které už ale vyhledávají i větší obratlovce. Dospělé samice napadají hlavně větší lesní zvěř, dále pak domácí kopytníky, psy a kočky. Na tomto konečném hostiteli dochází kromě sání krve také k oplození samice klíštěcím samcem (Volf & Horák, 2007). Po úplném nasátí značně zvětšené samice odpadnou a čekají, až se začnou produkovat vajíčka, kterých se vytváří několik tisíc. Tato vajíčka pak nakladou na zem a umírají. Mezi časté hostitele patří samozřejmě i člověk, který může být napaden během jakéhokoliv vývojového stupně klíštěte (Votýpka *et al.*, 2018).

Za optimálních podmínek délka vývoje trvá dva roky, ovšem v přirozených podmínkách vývoj trvá nejčastěji tři roky. Za nepříznivých podmínek, zejména v případě nepřítomnosti hostitele pro jednotlivá stádia, může vývin trvat až šest let. Na délku vývojového cyklu má také vliv roční období, ve kterém dochází k nasátí krve larvami, nymfami či dospělými samicemi. Období nasátí krve ovlivňuje, zda se klíště metamorfuje ještě v tom samém roce nebo až v roce následujícím. Z epidemiologického hlediska je důležité i to, zda klíště přezimuje hladové nebo nasáté. Právě fyziologický stav určuje, zda klíště zimu přežije. Bylo zjištěno, že nasáté larvy a nymfy přežijí zimu úspěšněji, než nenasátá klíšťata (Stanko & Slovák, 2019).

2.1.1 Nalezení hostitele

Klíště *Ixodes ricinus* je slepé, tudíž je nuceno své okolí vnímat prostřednictvím různých chemických signálů. Tyto chemické signály jsou zaznamenávány tzv. Hallerovým orgánem, umístěným na konci předních končetin, proto samice číhají na své hostitele na vegetaci, kde jsou schopné přední končetiny doširoka roztáhnout. Hallerův orgán je

vysoce citlivý i na nepatrné rozdíly v koncentraci vydechovaného oxidu uhličitého a dalších látek, které upozorní samici na přítomnost potenciálního hostitele. K průniku do pokožky hostitele, fixaci ve tkáni a následnému sání slouží samicím specificky uzpůsobený chobotek, tzv. hypostom, který je vidět na Obr. 1 (Votýpka *et al.*, 2018).



Obrázek 1: Hypostom klíštěte obecného (Pelánek, 2019)

2.1.2 Kousnutí klíštětem a přenos slin

Mechanismus kousnutí je velmi sofistikovaný. Po nalezení vhodného místa na kůži se klíště přichytí a přisaje se pomocí hypostomu. Do vzniklé rány je následně sekretována látka, tzv. cement, která zabraňuje klíštěti v předčasném odpadnutí. Úloha slin je stále studována, přičemž většina molekul v nich již byla identifikována. Látky obsažené ve slinách mají farmakologické účinky (např. na srážení krve) a zároveň inhibují imunitní odpověď hostitele prostřednictvím imunosupresivních molekul specializovaných na různé typy buněk imunitního systému. Mezi takové imunosupresivní molekuly patří inhibitory proteáz: serpiny, Kunitzovy inhibitory a cystatiny (Prevot *et al.*, 2007).

3 Nemoci přenášené klíštětem *Ixodes ricinus*

V Evropě je *Ixodes ricinus* nejvíce rozšířeným druhem klíštěte. Tento druh je přenašečem viru klíšťové encefalitidy a bakterie *Borrelia burgdorferi*, která je původcem lymeské boreliózy. Z hlediska medicíny se klíštěti přikládá velký význam zejména proto, že proti lymeské borelióze zatím neexistuje vakcína (Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

3.1 Klíšťová encefalitida

Průběh klíšťové encefalitidy má zpravidla dvě fáze. První fáze je provázena prodromálními symptomy připomínajícími chřipku. Ve druhé fázi dochází k rozvoji poruch, jako jsou aseptická meningitida, encefalitida nebo meningoencefalitida. Skoro 50 % pacientů má po nakažení klíšťovou encefalitidou trvalé následky (Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

3.2 Lymeská borelióza

Příznaky boreliózy jsou rozděleny do tří stádií: počáteční, diseminovaná a pozdní. Mezi příznaky počáteční fáze patří horečka, zimnice, bolest hlavy, únava, bolest svalů a kloubů. Nejčastějším počátečním projevem je červená skvrna v místě kousnutí klíštětem. Červená skvrna, nazývána erythema migrans (EM), se u většiny lidí objevuje cca sedmý den po kousnutí, obvykle před nástupem horečky. K přenosu bakterií *Borrelia burgdorferi* do těla hostitele dochází během 36 až 72 hodin. K druhé fázi, diseminované, může dojít po několika dnech i týdnech od počátečních příznaků. U pacientů může pokračovat horečka, únava a bolest hlavy. Mohou se ovšem přidat i závažnější komplikace jako jsou bolest zad a končetin, obrna hlavových nervů a zánět mozkových blan. Ve vzácnějších případech se může objevit srdeční zánět projevující se horečkami, silným bušením srdce, bolestí na hrudi a dušností. Mezi nejčastější příznaky pozdní fáze nemoci patří artritida v jednom nebo ve více velkých kloubech. Méně častými příznaky jsou encefalopatie a neuropatie (Sonenshine & Roe, 2014b).

3.2.1 Současná strategie v boji proti nákaze

Jedním ze způsobů, jak předejít přemnožení klíšťat a tím snížit riziko nákazy, je použití akaricidů. Akaricidy jsou ovšem z dlouhodobého hlediska nevhodné, jelikož si klíšťata mohou na tyto přípravky vytvořit toleranci a zároveň znečišťují životní prostředí.

Zároveň je vývoj nových akaricidů dlouhý a finančně náročný. Klasickým způsobem obrany před klíšťaty je použití repelentu. Ideální repelent by měl poskytovat ochranu minimálně po dobu osmi hodin, měl by být nedráždivý a bez zápachu. Současným problémem repelentů je obsah toxických látek. Nejznámější toxickou látkou nacházející se v repelentech je permethrin. Nicméně jsou zde i jiné metody. Například genetické modifikace klíšťat, jejichž cílem by bylo snížení počtu kousnutí nebo útok klíšťat na jiné živočichy, u kterých nákaza nehrozí. Prevence lidí před klíšťaty stále do značné míry závisí na akaricidech a repelentech, ale v genovém inženýrství klíšťat nyní dochází k velkým pokrokům. V porovnání s těmito všemi způsoby prevence před nákazou se však jako nejlepší řešení jeví vakcinace. Na složení vakcíny pracují vědci z celého světa a bylo zjištěno, že samotné klíštěcí sliny obsahují důležité látky, které by pro vývoj vakcíny mohly být klíčové (Boulanger *et al.*, 2019).

3.2.2 Imunitní systém klíšťat

Larvy klíštěte *Ixodes ricinus* jsou po vylíhnutí z vajíček zdravá, až teprve při kontaktu s kůží a krví hostitele dochází k nákaze samotného klíštěte. Klíšťata jsou zároveň ve svém prostředí vystavena patogenním mikroorganismům i v době, kdy na hostitelích neparazitují. Proto imunitní systém klíšťat musí být stále aktivní (Fogaça *et al.*, 2021).

U klíšťat se objevují obě složky specifické imunity: buněčná a humorální. Hlavními zdroji molekul a buněk nutných pro správný průběh imunitní reakce jsou hemolymfa, slinné žlázy a tukové těleso. Důležitou součástí buněčné imunity jsou hemocyty, buňky volně cirkulující v hemolymfě. Hemocyty hrají významnou roli při obraně proti mikrobiální infekci a jejich počet se zvyšuje v reakci na bakterie či viry. Zralé hemocyty pak zprostředkovávají např. fagocytózu (Aguilar-Díaz & Cossío-Bayúgar, 2018).

Hemocyty také produkují řadu molekul, které jsou uvolňovány do hemolymfy, odkud jsou dále transportovány do dalších tkání, např. do slinných žláz. Tyto molekuly jsou součástí humorální imunity a patří mezi ně proteázy, inhibitory proteáz, koagulační faktory a antimikrobiální peptidy. Funkcí těchto molekul je především ochrana tkání a zabíjení patogenů (Aguilar-Díaz & Cossío-Bayúgar, 2018). Klíšťata během sání krve z hostitele vylučují imunosupresivní látky, mezi které patří právě serpiny, aby byla potlačena imunitní odpověď hostitele a nebylo tak ohroženo zdraví samotného klíštěte.

4 Serpiny

Serpiny patří mezi inhibitory serinových proteáz. Proteázy jsou všudypřítomné enzymy štěpící proteiny na menší peptidy a aminokyseliny. Činnost proteáz je klíčová pro řadu fyziologických procesů, jako je např. vývoj tkání. Mnohem důležitější je ovšem skutečnost, že řada proteáz zprostředkovává obranné a homeostatické procesy jak u bezobratlých, tak u obratlovců. Takovými procesy jsou zejména koagulace plazmy, perforace bakteriální stěny komplementem, aktivace cytokinů a fagocytóza. Kromě serpinů se mezi inhibitory serinových proteáz ve slinách klíštěte řadí inhibitory typu Kunitz a Kazal a trypsinové inhibitory. Všechny tyto skupiny se mezi sebou liší jak strukturou, tak i svými účinky. Ovšem zatím nejvíce dostupných informací máme o serpínech, jelikož je velký zájem o pochopení jejich funkce (Blisnick *et al.*, 2017).

4.1 Serpiny ve slinách klíštěte

Vzhledem k tomu, že klíšťata potřebují relativně dlouhou dobu na nasátí krve, vyvinuly se u nich mechanismy, které potlačují obranné reakce hostitele. Mezi takové mechanismy patří vypuštění slin do rány, což umožní klíštěti úspěšné nakrmení. Sliny klíšťat totiž obsahují serpiny, které dokážou potlačit imunitní odpověď a zabraňují vytváření krevních sraženin. Prvním charakterizovaným serpinem v klíštěcích slinách je imunosupresor Iris. Iris zabraňuje srážení krve a brání adhezi krevních destiček pomocí neznámého mechanismu. Kromě působení na hemostázu Iris inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů jako jsou IFN- γ a IL-6 (Meekins *et al.*, 2017).

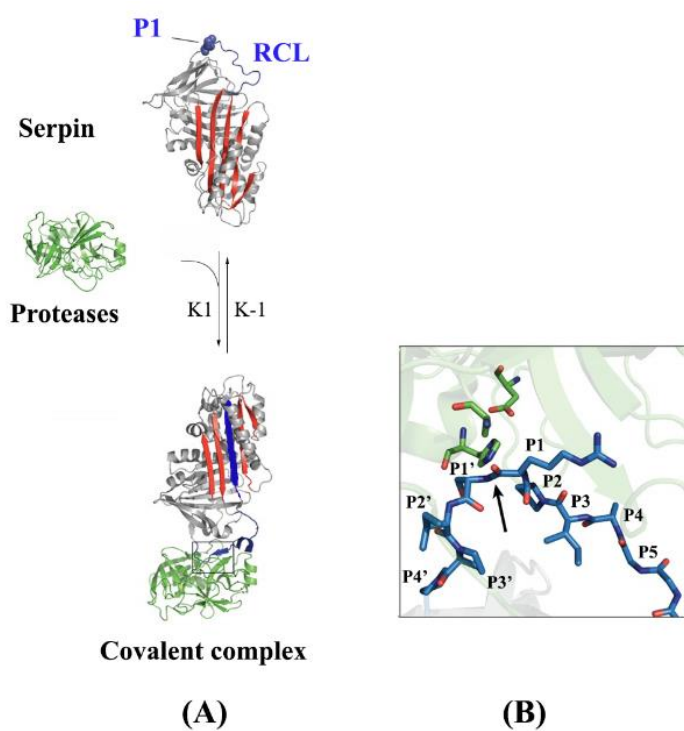
Dalšími dobře popsányými serpiny v klíštěcích slinách jsou IRS-2, Iripin-3, Iripin-5 a Iripin-8. Účinkem Iripinu-2 je zabraňování tvorby edému a inhibice prozánětlivých proteáz jako jsou katepsin G, chymáza žírných buněk a trombin. Inhibice katepsinu G přispívá k inhibici shlukování krevních destiček. Nedávné studie dokonce naznačují, že IRS-2 může interferovat s mechanismy adaptivní imunity (Meekins *et al.*, 2017). Iripin-3 silně inhibuje proteolytickou aktivitu serinových proteáz kallikreinu a matriptázy. Při pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že Iripin-3 je schopný regulovat adaptivní imunitní odpověď oslabením proliferace CD4⁺ T lymfocytů. Kromě vlivu na získanou imunitu Iripin-3 inhibuje vnější hemokoagulační kaskádu a snižuje produkci cytokinů IL-6 prostřednictvím makrofágů (Chlastáková *et al.*, 2021). Iripin-5 působí jako regulátor obranyschopnosti hostitele tím, že zhoršuje migraci neutrofilů, potlačuje produkci oxidu

dusnatého a mění funkce komplementu (Kašćáková *et al.*, 2021). Iripin-8 inhibuje serinové proteázy zapojené do průběhu koagulace a funkce komplementu. Mezi tyto proteázy patří trypsin, trombin, faktor Xa, faktor XIa, faktor VIIa, faktor IXa, kallikrein a plasmin (Kotál *et al.*, 2021).

4.2 Struktura serpinů

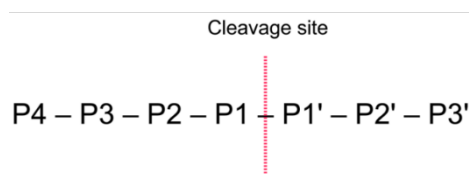
Serpiny jsou tvořeny přibližně 400 aminokyselinami a zaujímají metastabilní nativní konformaci, která je klíčová pro jejich správnou funkci. Tato konformace sestává z konzervované sekundární struktury složené z β -skládaných listů A, B, C a nejméně 7 α -helixů (Silverman *et al.*, 2001).

Charakteristickým znakem serpinů je reaktivní centrální smyčka (tzv. reactive centre loop – RCL), který se nachází mezi A a C β -skládanými listy. Jedná se o oblast tvořenou přibližně 20 aminokyselinami, ve které dochází ke štěpení vazby mezi pozicemi P1 a P1' při reakci s proteázou. Když je vazba rozštěpena, RCL se přesouvá spolu s navázanou proteázou na opačnou stranu serpinu a vytváří s proteázou komplex prostřednictvím kovalentní vazby. Tento proces je znázorněn na Obr. 2 (van Gent *et al.*, 2003).



Obrázek 2: Struktura serpinu a mechanismus tvorby komplexu (Mkaouar *et al.*, 2019)

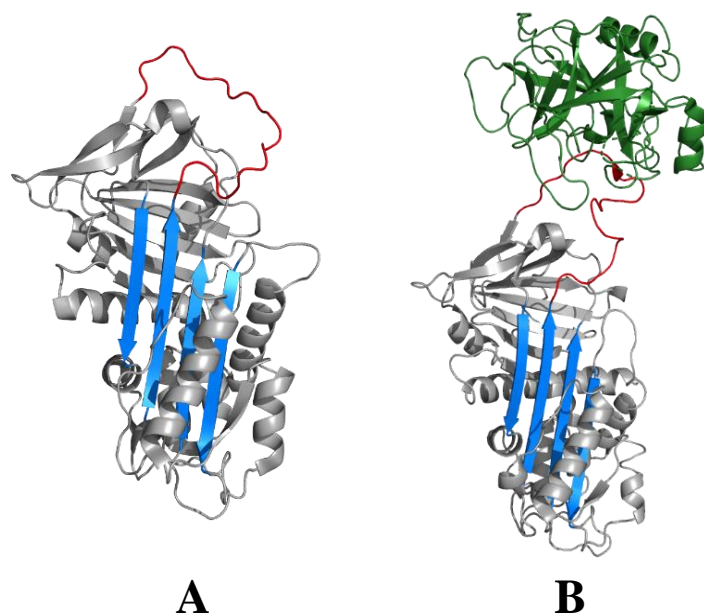
Označení místa štěpení je dáno podle vzdálenosti dvou aminokyselin, mezi kterými ke štěpení dochází. Od N-konce proteinu jde číslování pozic v pořadí P4, P3, P2, P1. Od C-konce proteinu jde číslování pozic stejným způsobem, pouze s upraveným značením P1', P2', P3', P4' (Rawlings *et al.*, 2018). Místo štěpení mezi pozicemi P1 a P1' je znázorněno na Obr. 3.



Obrázek 3: Označení pozic aminokyselin, kde dochází k rozštěpení proteinu (Rawlings *et al.*, 2018)

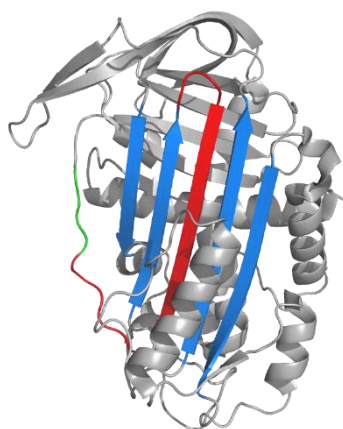
Serpiny mohou zaujmout buď běžné, nebo abnormální konformace. Abnormálními konformacemi jsou polymery serpinů a tzv. δ -formy, mezi běžné konformace patří nativní, částečně vložená nativní, latentní a rozštěpená. Do samotné inhibice jsou ovšem zapojené pouze nativní, latentní a rozštěpená (Dunstone & Whisstock, 2011).

Nativní forma, nebo také S („stressed“) forma, reaguje s příslušnou proteázou. RCL je zde nerozštěpeno a vyčnívá směrem ven tak, aby bylo možné vytvořit komplex s proteázou (Whisstock *et al.*, 1998). Vytvořený komplex s aktivním místem proteázy se nazývá Michaelisův komplex a proteáza je zde k RCL vázaná nekovalentní vazbou (Dunstone & Whisstock, 2011). Schémata těchto forem serpinu jsou na Obr. 4.



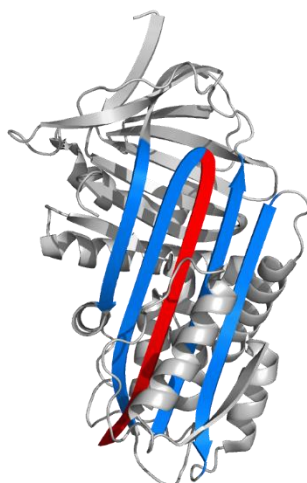
Obrázek 4: A – nativní forma serpinu, B – Michaelisův komplex (vytvořeno v PyMOL).
Na obrázku jsou A β -sheety znázorněny modře, RCL červeně a reagující proteáza je zeleně.

Z nativní formy mohou serpiny přejít do latentní konformace, která je více stabilní a která již není schopná nijak interagovat s proteázou. V tomto typu konformace se RCL vsouvá doprostřed β -sheetů A tím, že se přesune s1C vlákno, na které je RCL vázáno. Tento přesun s1C vlákna z β -sheetů C a vmezeření RCL mezi β -sheety B vytváří ohyb ze spodní strany serpinu. Serpiny v latentní konformaci mohou být přeměněny zpět na nativní formu díky denaturaci (Silverman *et al.*, 2001). Latentní konformace serpinu je zobrazena na Obr. 5.



Obrázek 5: Latentní konformace serpinu (vytvořeno v PyMOL). Zde jsou A β -sheety znázorněny modře a RCL červeně, s1C vlákno je vyznačeno zeleně.

Nejvíce stabilní formou serpinu je jeho rozštěpená forma, tzv. R („relaxed“) forma. K vytvoření této formy dochází tím, že celé RCL je vsunuto mezi β -sheety A, ale tentokrát je s1C vlákno od RCL odštipnuto (Silverman et al., 2001). Rozštěpená forma serpinu je na Obr. 6.

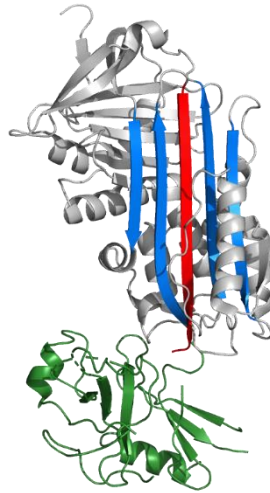


Obrázek 6: Rozštěpená konformace serpinu (vytvořeno v PyMOL). A β -sheety jsou znázorněny modře a RCL červeně.

Po navázání proteázy na RCL a vytvoření Michaelisova komplexu dochází k přesunu RCL na opačnou stranu serpinu. V této poloze je vytvořen komplex serpin-enzym, v němž jsou tyto dvě molekuly spojeny kovalentní vazbou (Obr. 7) (Silverman *et al.*, 2001).

4.2.1 Mechanismus inhibice proteáz serpinu

Serpiny inhibují proteázy zvláštním ireverzibilním mechanismem. Tím, že se proteázy navážou na serpin a vytvoří s ním komplex, proteázy podstupují velkou konformační změnu, která naruší jejich aktivní místo. Na začátku je vytvořen nekovalentní Michaelisův komplex prostřednictvím vazeb mezi aktivním místem proteázy a RCL serpinu v místech P1-P1', kde také později dochází ke štěpení. Po navázání aktivního místa serinové proteázy na RCL dochází k vytvoření kovalentní esterové vazby mezi proteázou a uhlovodíkovým řetězcem RCL v pozici P1, zároveň v pozici P1-P1' dochází k rozštěpení vlákna. Je pravděpodobné, že právě v tomto stádiu se RCL začíná vsouvat mezi vlákna β -sheetu A a tímto způsobem s sebou přenáší i kovalentně navázanou proteázu (Silverman *et al.*, 2001). Takto vytvořený komplex je zobrazen na Obr. 7.



Obrázek 7: Komplex serpin-enzym spojený kovalentní esterovou vazbou (vytvořeno v PyMOL). A β -sheety jsou znázorněny modře, RCL červeně a reagující proteáza je zeleně.

Po kompletním přesunu RCL mezi vlákna β -sheetů A je proteáza přemístěna o více než 70 Å a její aktivní místo je narušeno. Aktivní místo je narušeno tím způsobem, že poloha katalytické triády (tři aminokyseliny v aktivním místě proteázy zodpovědných za proteolytickou reakci) je změněna o 3 Å – potvrzeno u trypsinu (Chen *et al.*, 2019). Zdeformování proteázy, a tím i její inaktivace, je důsledek vložení RCL mezi vlákna β -sheetů A a tak způsobeného tlačení proteázy proti základně serpinu. Energie potřebná na mechanismus inhibice pochází z přechodu do mnohem stabilnější, rozštěpené konformace v porovnání s nativní formou serpinu (Silverman *et al.*, 2001).

5 Krystalografie

K objasnění struktury proteinů se používají různé metody jako např. nukleární magnetická rezonance (NMR spektroskopie), kryoelektronová mikroskopie (cryoEM) nebo makromolekulární krystalografie, která je v této práci popisována. Vlastnosti a funkce makromolekul jsou dány jejich strukturou, proto je nutné její objasnění (Rupp, 2010). Aby bylo možné tyto informace získat, je nezbytné nejdříve vykrystalizovat vhodné proteinové krystaly, které dobře difraktují paprsky rentgenového záření. Ovšem krystalizace proteinů je náročná, jelikož existuje velké množství faktorů, které ovlivňuje její výsledek (Kutá Smatanová, 2006). Faktory ovlivňující vznik krystalů jsou uvedeny v Tab. I.

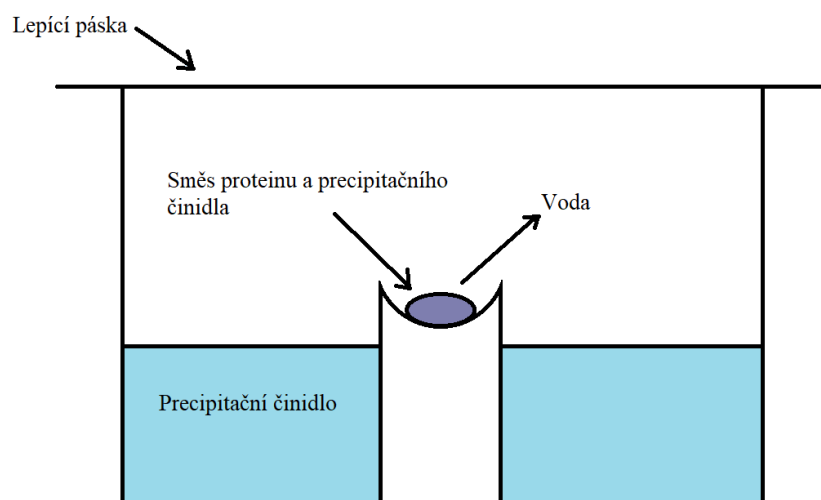
Tabulka I: Faktory ovlivňující vznik a růst krystalů (Krauss *et al.*, 2013)

Fyzikální faktory	Chemické faktory	Biochemické faktory
Teplota	Koncentrace precipitačního činidla	Homogenita vzorku
Tlak	pH	Modifikace v sekvenci
Viskozita	Typ pufru	Posttranslační modifikace
Vibrace a zvuk	Koncentrace vzorku	Chemické modifikace
Čas	Kovové ionty	Agregace
Povrch krystalizační destičky	Těžké kovy	Proteolýza
Manipulace se vzorkem	Nečistoty	Ligandy, kofaktory a inhibitory

Základním principem krystalizace je snížení rozpustnosti proteinu tím, že do roztoku je přidáno precipitační činidlo. Mezi základní precipitační činidla patří soli (např. NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2) a organická rozpouštědla (např. methanol, ethanol, aceton). Pokud koncentrace roztoku proteinu překročí limit rozpustnosti, roztok se stává přesyceným. V těchto podmínkách následně vznikají krystalizační jádra, jejichž postupným růstem vznikají krystaly (Kutá Smatanová, 2006).

Nejpoužívanější metodou k růstu krystalů je difúze par. Krystalizace založena na difúzi par je nejčastěji aplikována pro kapky sedící (tzv. „sitting drop“). Mezi další možné difuze par patří visící kapka (tzv. „hanging drop“) a sendvičová kapka (tzv. sandwich

drop“). U metody sedící kapky je kapka usazena ve stojánku umístěném v rezervoáru. Kapka je tvořena směsí roztoku proteinu a precipitačního činidla (Rupp, 2010). Při počátečních pokusech je tento roztok nejběžněji připravován v poměru 1:1, později může být tento poměr upravován podle potřeby. Uvnitř rezervoáru je precipitační činidlo. Těsnění otvoru rezervoáru v krystalizační destičce je zabezpečeno nejčastěji křišťálově čistou těsnicí páskou. Vzhledem k tomu, že v kapce je nižší koncentrace precipitantu než v samotném precipitačním činidle, dochází k vypařování vody z kapky do rezervoáru. Společně za působení vhodných fyzikálně-chemických faktorů pro růst krystalů konkrétního proteinu se mohou vytvořit krystaly (Kutá Smatanová, 2006). Schéma této metody je na Obr. 8.



Obrázek 8: Schéma sedící kapky

Pro počáteční pokusy je výhodné nejdříve používat komerčně dostupné sady krystalizačních činidel, tzv. screening kits. Jedná se o screening velkého množství podmínek za použití relativně malého množství proteinu. Na základě těchto výsledků se mohou dále optimalizovat podmínky krystalizace jako jsou fyzikálně-chemické faktory pro růst lépe uspořádaných krystalů (Kutá Smatanová, 2006).

6 Cíl práce

Serpiny ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* jsou imunologicky aktivní a farmakologicky významné molekuly. Pro lepší objasnění funkce je nutné určit strukturu proteinu. Tato práce je zaměřena na dosud strukturně neprozkoumaný protein Iripin-4.

Cílem této práce je zvládnutí krystalizačních metod na modelovém proteinu. Dále exprese a purifikace proteinu Iripin-4 pomocí standardních chromatografických metod a jeho následná krystalizace. Po určení vhodných krystalizačních podmínek je záměrem práce optimalizace krystalů v difrakční kvalitě, jejich otestování a pokus o získání difrakčních dat.

7 Materiál a metody

7.1 Transformace

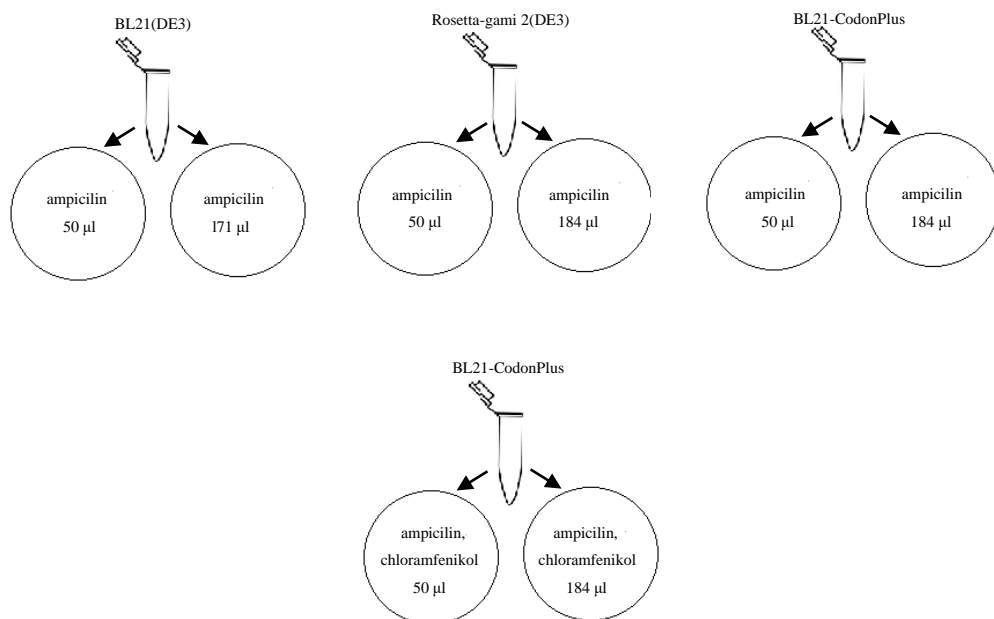
K transformaci byly použity tři typy kompetentních buněk. Jejich názvy a specifikace jsou uvedeny v následující Tab. II.

Tabulka II: Kompetentní buňky použité k transformaci

Typ buněk	Výrobce
BL21(DE3) Competent Cells	New England Biolabs
Rosetta-gami 2(DE3) Competent Cells	Sigma-Aldrich
BL21-CodonPlus Competent Cells	Agilent Technologies

Protein Iripin-4 byl již naklonován v klonovacím vektoru pET-17b o koncentraci 68 ng/μl a byl poskytnut Katedrou medicínské biologie PŘF JU.

Buňky musely být nejdříve rozmrazeny ponecháním na ledu, dokud nezmizely poslední ledové krystaly. K buňkám bylo následně přidáno po 1 μl plazmidové DNA o již zmíněné koncentraci. Vzniklé směsi byly lehce promíchány a umístěny na led na dobu 30 minut. Po 30 minutách byly všechny tři mikrozkuřavky umístěny do vodní lázně o teplotě 42 °C. Buňky BL21(DE3) zde byly ponechány po dobu 10 vteřin, buňky BL21-CodonPlus 20 vteřin a buňky Rosetta-gami 2(DE3) 30 vteřin, vše bylo prováděno podle protokolu určeným výrobcem. Během tohoto procesu, tzv. heat shock, dochází k přijetí vektoru do komplementní buňky přes póry v buněčné stěně. Poté byly mikrozkuřavky opět ponechány na ledu na 5 minut. Následně bylo ke každé směsi napipetováno 200 μl SOC media o pokojové teplotě. Úkolem SOC media je obnova a stabilizace kompetentních buněk po transformaci. Po přidání SOC media byly všechny tři směsi umístěny do třepačky předeřáté na 37 °C a byly tam ponechány po dobu 60 minut při 180 rpm. Mezitím byly nahřáty na 37 °C Petriho misky s agarem obsahující buď jen samotný ampicilin nebo ampicilin společně s chloramfenikolem. Po uplynutí 60 minut byly směsi rozetřeny dle následujícího schématu na Obr. 9.



Obrázek 9: Schéma roztěru buněk na agar

Byly aplikovány různé objemy, aby mohla být následně ověřena účinnost antibiotik. Petriho misky s naočkovanými buňkami byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

7.2 Pilotní exprese

Pilotní exprese byla provedena z toho důvodu, aby bylo zjištěno, které podmínky umožňují proteinu nejvyšší expresi.

Pomocí špičky byla z agaru odebrána kolonie buněk a umístěna do 15 ml živného media, do kterého byl přidán ampicilin, jehož konečná koncentrace v roztoku činila 0,05 mg/ml. V případě kompetentních buněk BL21-CodonPlus byl do roztoku přidán chloramfenikol o stejné výsledné koncentraci. Byly použity dva typy media – lysogeny broth a terrific broth medium (dále jen LB a TB medium) pro každý typ kompetentních buněk. Rozdílem mezi těmito živnými medii je to, že TB medium obsahuje navíc glycerol, který představuje zdroj energie pro množící se kompetentní buňky. Tyto kultury byly uloženy na třepačku a inkubovány přes noc při 37 °C a 220 rpm.

Následující den bylo do 48 kónických zkumavek napipetováno 15 ml živného media. Do živného media byl přidán ampicilin, v případě kompetentních buněk BL21-CodonPlus ještě navíc chloramfenikol, o výsledné koncentraci 0,05 mg/ml. Do takto připravených

živných medií byla po 1 ml přidána přes noc namnožená buněčná kultura. Následně byly tyto zkumavky uloženy na třepačku o teplotě 37 °C. Buněčné směsi byly třepány do té doby, dokud se jejich optická hustota (OD_{600}) nepohybovala v rozmezí 0,5 – 0,6. Po dosažení požadovaných hodnot byl do buněčných kultur přidán Izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid (IPTG) tak, aby konečná koncentrace IPTG v roztoku byla 1 mM. Účelem přidání IPTG je indukce exprese proteinu tím, že spouští transkripci lac operonu. Tyto kultury byly umístěny do tří třepaček o rozdílné teplotě – 18 °C, 25 °C a 37 °C s otáčkami 180 rpm. IPTG bylo přidáno pouze k polovině kultur, a to z důvodu, abychom byli později schopni porovnat expresi proteinu v indukovaném a neindukovaném mediu. Různé podmínky pro expresi proteinu jsou shrnuty v následující Tab. III.

Tabulka III: Podmínky pro expresi proteinu Iripin-4

Typ buněk	Kultivační medium	Antibiotikum v kultivačním mediu	Teplota	Koncentrace IPTG		
BL21(DE3)	LB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
			25 °C	0,001 M		
					0 M	
				37 °C	0,001 M	
					0 M	
	TB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
25 °C			0,001 M			
				0 M		
			37 °C	0,001 M		
				0 M		
Rosetta-gami 2(DE3)	LB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
			25 °C	0,001 M		
					0 M	
				37 °C	0,001 M	
					0 M	
	TB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
25 °C			0,001 M			
				0 M		
			37 °C	0,001 M		
				0 M		
BL21-CodonPlus	LB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
			25 °C	0,001 M		
						0 M
					37 °C	0,001 M
						0 M
		ampicilin, chloramfenikol	18 °C	0,001 M		
				0 M		
			25 °C	0,001 M		
						0 M
					37 °C	0,001 M
						0 M
	TB medium	ampicilin	18 °C	0,001 M		
				0 M		
			25 °C	0,001 M		
						0 M
				37 °C	0,001 M	
					0 M	
	ampicilin, chloramfenikol	18 °C	0,001 M			
			0 M			
					0,001 M	
					0 M	
			37 °C	0,001 M		
				0 M		

Těsně před inkubací byl odebrán kontrolní vzorek v čase 0 hodin. Pak z kultur inkubovaných v teplotách 25 °C a 37 °C byl odebrán po 3 hodinách a po 6 hodinách 1 ml vzorku. Z kultur inkubovaných v 18 °C byl 1 ml odebrán ihned po umístění na třepačku, po 6 hodinách a další den ráno. Takto odebrané vzorky byly umístěny do centrifugy na 1 minutu a 14 000 rpm, aby se od sebe oddělily buňky a živné medium – pelet a supernatant. Ponechán byl pouze pelet, který byl uskladněn do mrazáku o teplotě –18 °C.

7.3 Analýza vzorků

K rozmraženým peletům z pilotní exprese bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru (50 mM K₃PO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM Imidazol; pH 7,8). Pomocí vortexu byly pelety s lyzačním pufrem řádně promíchány a ponořeny na 3 minuty do tekutého dusíku. Po 3 minutách byly vzorky z dusíku vyjmuty a umístěny na plotnu o teplotě 42 °C. Po rozpuštění peletů byl tento proces opakován ještě třikrát. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty při 15 000 rpm ve 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant do nových mikrozkušavek a pelet byl ponechán v původních mikrozkušavkách. K 200 µl supernatantu bylo přidáno 66 µl 4x SDS - PAGE vzorkového pufru a k peletu bylo přidáno 250 µl 1x SDS – PAGE vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly vařeny na plotně o teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly následně analyzovány na základě výsledků z SDS – PAGE elektroforézy a byly vybrány podmínky, ve kterých došlo k nejvyšší expresi proteinu.

7.3.1 SDS – PAGE elektroforéza

K SDS – PAGE elektroforéze byly použity 12,5 % gely. Chemikálie potřebné pro přípravu koncentračního a separačního gelu jsou uvedeny v následující Tab. IV.

Tabulka IV: Chemikálie a jejich objemy potřebné pro přípravu jednoho 12,5 % gelu

Koncentrační gel		Separační gel	
40 % akrylamid	250 µl	40 % akrylamid	1,56 ml
H ₂ O	1,46 ml	H ₂ O	2,08 ml
1M Tris, pH = 6,8	250 µl	1,5M Tris, pH = 8,8	1,25 ml
10 % SDS	20 µl	10 % SDS	50 µl
10 % APS	20 µl	10 % APS	50 µl
TEMED	2 µl	TEMED	5 µl

Do první jamky byl napipetován marker PageRuler Protein Prestained Ladder od firmy Thermo Fischer Scientific. Do dalších jamek byly pipetovány jednotlivé frakce dle pořadí odběru. Po dokončení SDS – PAGE elektroforézy byl gel promýván ve fixačním roztoku po dobu 30 minut, následně po dobu 30 minut v destilované vodě a nakonec byl ponechán v roztoku barviva Coomassie Blue do doby, než byl gel dostatečně obarven.

7.4 Expres ve velkém měřítku

Podmínky, ve kterých došlo k nejvyšší expresi proteinu, byly zopakovány při expresi ve velkém měřítku.

Pomocí špičky byla z agaru, z předchozí transformace do buněk, odebrána kolonie buněk a umístěna do 15 ml živného media obsahujícího ampicilin o výsledné koncentraci 0,05 mg/ml. Tyto kultury byly uloženy na třepačku a inkubovány přes noc při 37 °C a 220 rpm.

Následující den bylo do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk nalito 800 ml živného media s přidaným ampicilinem o výsledné koncentraci 0,05 mg/ml. Do takto připravené směsi bylo přidáno 15 ml namnožené buněčné kultury exprimované přes noc. Následně byly Erlenmeyerovy baňky uloženy na třepačku o teplotě 37 °C. Buněčné směsi byly třepány do té doby, dokud se jejich optická hustota (OD_{600}) nepohybovala v rozmezí 0,5 – 0,6. Po dosažení požadovaných hodnot bylo do buněčných kultur přidáno IPTG, jejíž výsledná koncentrace v buněčné směsi byla přizpůsobena výsledkům z pilotní exprese. Následně byly buněčné kultury umístěny do třepaček s otáčkami 180 rpm a o teplotách, ve kterých došlo k nejvyšší expresi proteinu. Z těchto kultur byl odebírán 1 ml vzorku po uplynutí 6 hodin od započetí inkubace pro pozdější analýzu, která byla prováděna stejně jako analýza vzorků z pilotní exprese. Po 6 hodinách byla také ukončena inkubace a obsah Erlenmeyerových baněk byl přelit do centrifugačních lahví. Centrifugace byla prováděna při 4200 rpm po dobu 30 min ve 4 °C. Poté byla vylita většina supernatantu tak, aby v lahvi zbylo přibližně 20 ml a pomocí pipety byl v tomto zbytku supernatantu rozpuštěn usazený pelet. Resuspendované buňky byly přemístěny do kónických zkumavek o objemu 50 ml a byla provedena opětovná centrifugace při 4200 rpm po dobu 20 min ve 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelety byly uloženy do mrazáku o teplotě -80 °C.

7.5 Homogenizace buněk

Nejdříve bylo připraveno 100 ml lyzačního pufru (50 mM sodium-fosfát, 500 mM NaCl; pH 7,5). Poté byla do pufru přidána 1 tableta proteázového inhibitoru Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free od výrobce SIGMAFAST. K peletu z exprese ve velkém měřítku bylo přidáno 15 ml tohoto pufru, DNA-áza o výsledné koncentraci 10 µg/ml a RNA-áza o výsledné koncentraci 50 µg/ml.

K fyzikálnímu rozbíjení buněk byl použit French press, ve kterém jsou buňky drceny vysokým tlakem. Poté byl roztok stočen na centrifuze při 40 000 rpm a 4 °C po dobu 60 minut. Po stočení byl k purifikaci použit pouze získaný supernatant.

7.6 Purifikace

7.6.1 Iontově výměnná chromatografie

Na iontově výměnnou chromatografii byla použita kolona HiTrap Q HP od výrobce GE Healthcare o objemu 5 ml.

K purifikaci byl použit ekvilibrační pufr (50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) a eluční pufr (50 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA). Oba pufry byly zfiltrvány a zdegasovány.

Kolona byla nejdříve promyta 5 objemy kolony ultračisté vody, poté 5 objemy kolony ekvilibračního pufru, poté 5 objemy elučního pufru a nakonec opět 5 objemy ekvilibračního pufru. Po ekvilibraci bylo na kolonu aplikováno 15 ml supernatantu. Proud vzorku byl nastaven na 1 ml/min. Poté byla kolona opět promyta ekvilibračním pufrem až do ustálení absorbance na 280 nm. Následně byl protein eluován při koncentračním gradientu elučního pufru.

7.6.2 Gelová chromatografie

Frakce z iontově výměnné chromatografie, která měla nejvyšší koncentraci proteinu, byla dále purifikována pomocí gelové chromatografie za použití pufru (50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA). Na gelovou chromatografii byla použita kolona Superdex 75 Increase 10/300 GL od výrobce GE Healthcare o objemu 23,5 ml.

Kolona byla nejdříve promyta destilovanou vodou a poté byla ekvilibrována 2 objemy kolony ekvilibračním puforem. Následně byl na kolonu aplikován 1 ml frakce. Proud vzorku byl nastaven na 0,5 ml/min. Při zvyšujícím se UV byly sbírány jednotlivé frakce eluovaného proteinu o objemu 500 μ l. Po ukončení sbírání frakcí byla kolona znovu promyta 2 objemy kolony ekvilibračním puforem, následně vodou a nakonec 20 % etanolem.

7.6.3 Zakoncentrování

Frakce, které dle vyhodnocení z SDS-PAGE elektroforézy byly nejčistší, byly zakoncentrovány pomocí Amicon Ultra-4 10 K Device. Počáteční objem vzorku byl 2 ml, po ukončení zakoncentrovávání byl konečný objem vzorku 1 ml.

7.7 Krystalizace modelového proteinu – lysozymu

Jako modelový protein pro osvojení metod proteinové krystalizace byl použit enzym lysozym. K růstu lysozymových krystalů byla použita metoda visící a sedící kapky. V obou případech byla krystalizace prováděna na destičce s 24 rezervoáry. V případě visící kapky byly tyto rezervoáry po svém okraji opatřeny vrstvou silikonu. Do rezervoárů byla napipetována různá precipitační činidla, v tomto případě roztoky 50 mM octanu sodného s různou koncentrací NaCl, konkrétně: 4 %, 6 %, 8 %, 10 % a 12 %. Následně byl napipetován vzorek lysozymu v poměru 1:1 k roztoku NaCl v krystalizační jamce. Vzorky lysozymu, které byly ke krystalizaci použity, měly koncentraci 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml a 100 mg/ml. U metody visící kapky byla kapka napipetována na krycí sklíčko, které bylo lehce přitisknuto na rezervoár se silikonem tak, aby kapka směřovala dolů a sklíčko dobře těsnilo rezervoár. U metody sedící kapky tato kapka byla napipetována do jamky umístěné uprostřed rezervoáru a celá destička byla následně přelepena křišťálově čistou, průhlednou páskou.

7.8 Krystalizace Iripinu-4

Ke krystalizaci Iripinu-4 byly použity krystalizační destičky s 96 rezervoáry MRC 2 Lens Crystallisation Plate od výrobce Swissci. Jako precipitační činidla byly použity komerčně dostupné sady, jejichž seznam je uveden v následující Tab. V.

Tabulka V: Seznam použitých krystalizačních sad

Krystalizační činidlo	Výrobce
PEG/Ion	Hampton Research
Index HT	Hampton Research
PEG – Rx HT	Hampton Research
JCSG – plus	Molecular Dimensions

Do každého z 96 rezervoárů bylo napipetováno 50 μ l z 96 různých precipitačních činidel jednotlivých krystalizačních sad dle seznamu od výrobce. Následně byly do obou jamek nad rezervoáry napipetovány dvě kapky. Jedna kapka byla tvořena proteinem o koncentraci 1,17 mg/ml a precipitačním činidlem v poměru 1:1 (1 μ l proteinu:1 μ l činidla), druhá kapka byla tvořena proteinem o stejné koncentraci a precipitačním činidlem v poměru 1:0,5 (1 μ l proteinu:0,5 μ l činidla). K tomuto procesu byl použit krystalizační robot OryxNano od firmy Douglas Instruments. Růst krystalů probíhal v lednici při 4 °C.

7.9 Optimalizace krystalizačních podmínek

K získání krystalů v dostatečné difrakční kvalitě bylo potřeba optimalizovat podmínky jejich růstu. K optimalizaci byl zvolen poměr proteinu vůči té podmínce, ve které došlo k růstu krystalů. Pomocí krystalizačního robota byl vytvořen koncentrační gradient proteinu. Na začátku destičky byla koncentrace proteinu 80 % a na jejím konci 20 %. K dosažení procentuálního gradientu byla použita ultračistá voda. Konečný objem v každé jamce byl 2 μ l. Byla použita krystalizační destička s 96 rezervoáry MRC 3 Lens Crystallisation od výrobce Swissci. Do rezervoáru bylo napipetováno 50 μ l precipitačního činidla. Růst krystalů opět probíhal v lednici při 4 °C.

K detekci, zda narostlé krystaly jsou skutečně krystaly proteinu, byl použit zobrazovací systém JANSi UVEXm od výrobce JAN Scientific. V případě, že se jednalo o proteinové krystaly, v zobrazovacím systému pod UV zářením krystal emitoval viditelné světlo. Krystaly budou následně analyzovány na synchrotronu BESSY II v Berlíně, kde tuto analýzu provádí pouze řádně proškolený personál.

8 Výsledky

8.1 Pilotní exprese Iripinu-4

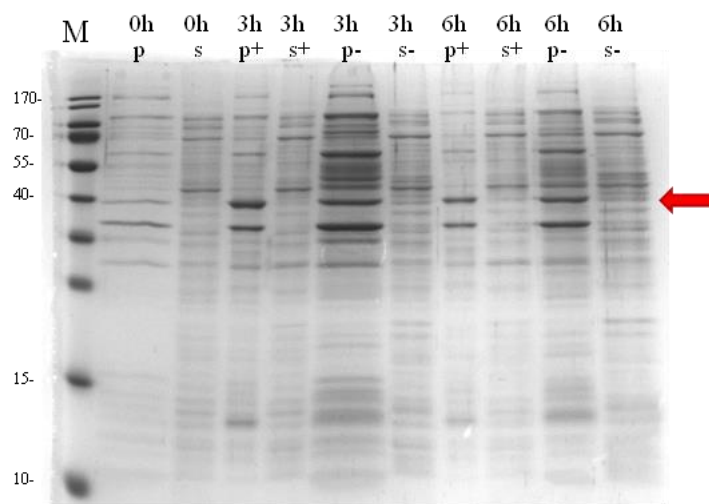
Účinnost antibiotik byla potvrzena nárůstem většího počtu buněčných kolonií na agaru, na který byl aplikován vyšší objem buněčné směsi. Pro zjištění, zda je namnoženo již dostatečné množství buněk, bylo nutné změřit optickou hustotu dané buněčné kultury. V následující Tab. VI jsou zaznamenány naměřené hodnoty optické hustoty těsně před zahájením indukce.

Tabulka VI: Optická hustota vzorků z pilotní exprese před zahájením indukce

Typ buněk	Kultivační medium	Antibiotikum v kultivačním mediu	Optická hustota
BL21(DE3)	LB medium	ampicilin	0,511
	TB medium	ampicilin	0,442
Rosetta-gami 2(DE3)	LB medium	ampicilin	0,540
	TB medium	ampicilin	0,406
BL21-CodonPlus	LB medium	ampicilin	0,676
		ampicilin, chloramfenikol	0,579
	TB medium	ampicilin,	0,425
		ampicilin, chloramfenikol	0,412

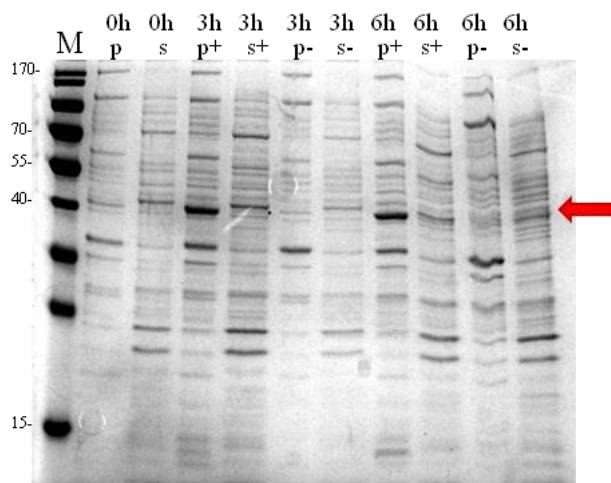
Po dosažení zmíněných hodnot OD_{600} bylo ke kulturám přidáno IPTG pro zahájení indukce a tyto kultury byly rozmístěny do odlišných kultivačních podmínek s různou teplotou a stálým třepáním 180 rpm.

Koncentrace proteinu Iripin-4 v jednotlivých expresních podmínkách byla analyzována dle výsledků z SDS-PAGE elektroforézy. K nejvyšší expresi proteinu v buňkách BL21(DE3) došlo při kultivaci v LB mediu a při inkubaci v 37 °C. Protein se exprimoval primárně v peletu, ale pro pozdější purifikaci je žádoucí hlavně exprese v supernatantu, kde došlo k expresi také. Výsledek nejvyšší exprese proteinu v buňkách BL21(DE3) je na Obr. 10.



Obrázek 10: Exprese proteinu Iripin-4 v buňkách BL21(DE3). Pelety jsou označeny jako „p“, supernatanty jsou označeny jako „s“. Frakce, které byly indukovány IPTG jsou označeny „+“, které nebyly indukovány „-“. Označení 0h, 3h, 6h je označení času, ve kterém došlo k odběru vzorku. „M“ značí marker a velikost markeru v jednotkách kDa je uvedena podél levého okraje gelu. Iripin-4 má molekulovou hmotnost 41,938 kDa, jeho poloha na gelu je zvýrazněna červenou šipkou.

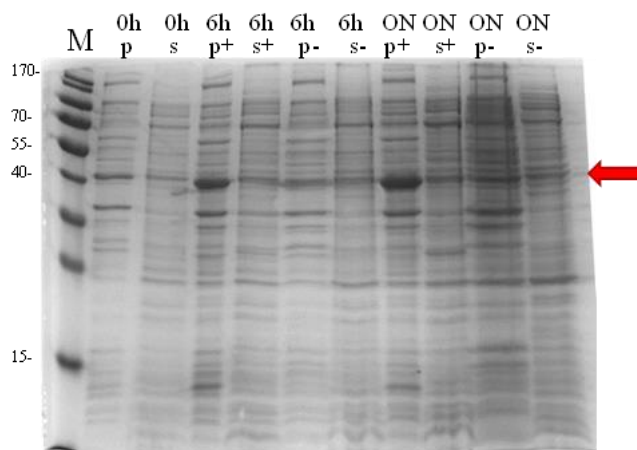
Výsledek nejvyšší exprese proteinu v buňkách Rosetta-gami 2(DE3) je uveden na Obr. 11. K nejvyšší expresi proteinu v buňkách Rosetta-gami 2(DE3) došlo při kultivaci v LB mediu a při inkubaci ve 25 °C. Nejlepší čas pro odběr vzorku je po 6 hodinách.



Obrázek 11: Výsledek nejvyšší exprese proteinu Iripin-4 v buňkách Rosetta-gami 2(DE3).

Pelety jsou označeny jako „p“, supernatanty jsou označeny jako „s“. Frakce, které byly indukovány IPTG jsou označeny „+“, které nebyly indukovány „-“. Označení 0h, 3h, 6h je označení času, ve kterém došlo k odběru vzorku. „M“ značí marker a velikost markeru v jednotkách kDa je uvedena podél levého okraje gelu. Iripin-4 má molekulovou hmotnost 41,938 kDa, jeho poloha na gelu je zvýrazněna červenou šipkou.

K nejvyšší expresi proteinu v buňkách BL21-CodonPlus došlo při kultivaci v TB mediu v přítomnosti antibiotik ampicilinu a chloramfenikolu, při inkubaci v 18 °C. Výsledek nejvyšší exprese proteinu v buňkách BL21-CodonPlus je uveden na Obr. 12.



Obrázek 12: Výsledek nejvyšší exprese proteinu Iripin-4 v buňkách BL21-CodonPlus. Pelety jsou označeny jako „p“, supernatanty jsou označeny jako „s“. Frakce, které byly indukovány IPTG jsou označeny „+“, které nebyly indukovány „-“. Označení 0h, 6h, ON (overnight) je označení času, ve kterém došlo k odběru vzorku. „M“ značí marker a velikost markeru v jednotkách kDa je uvedena podél levého okraje gelu. Iripin-4 má molekulovou hmotnost 41,938 kDa, jeho poloha na gelu je zvýrazněna červenou šipkou.

Všechny výsledky z SDS-PAGE elektroforézy frakcí pilotní exprese jsou uvedeny v Příloze č. 1, č. 2, č. 3 a č. 4.

8.2 Exprese ve velkém měřítku

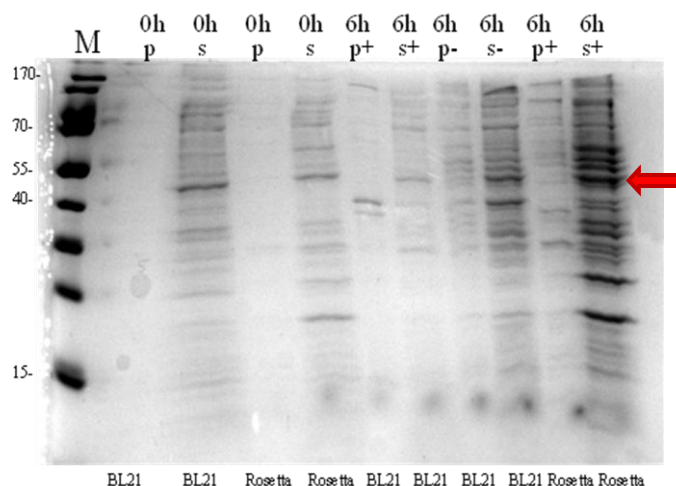
Na základě výsledků z pilotní exprese byly vybrány podmínky, při kterých se protein nejvíce exprimoval. K expresi ve velkém měřítku byly zvoleny pouze ty podmínky, které zahrnovaly kultivaci buněk v LB mediu. Po zahájení kultivace bylo opět nutné změřit optickou hustotu. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tab. VIII.

Tabulka VII: Optická hustota vzorků z exprese ve velkém měřítku

Typ buňky	Živné medium	Antibiotikum	Optická hustota
BL21(DE3)	LB	ampicilin	0,501
Rosetta-gami 2(DE3)	LB	ampicilin	0,766

Kompetentní buňky BL21(DE3) byly po dosažení požadované hranice indukovány přidáním IPTG tak, aby koncentrace IPTG v mediu byla 1 mM. Tato buněčná kultura byla umístěna na třepačku do teploty 37 °C.

Kompetentní buňky Rosetta-gami 2(DE3) byly indukovány přidáním IPTG o výsledné koncentraci 0,5 mM. Kultura s buňkami Rosetta-gami 2(DE3) byla po indukci uložena na třepačku do teploty 25 °C. Výsledky z SDS – PAGE elektroforézy jsou na Obr. 13.

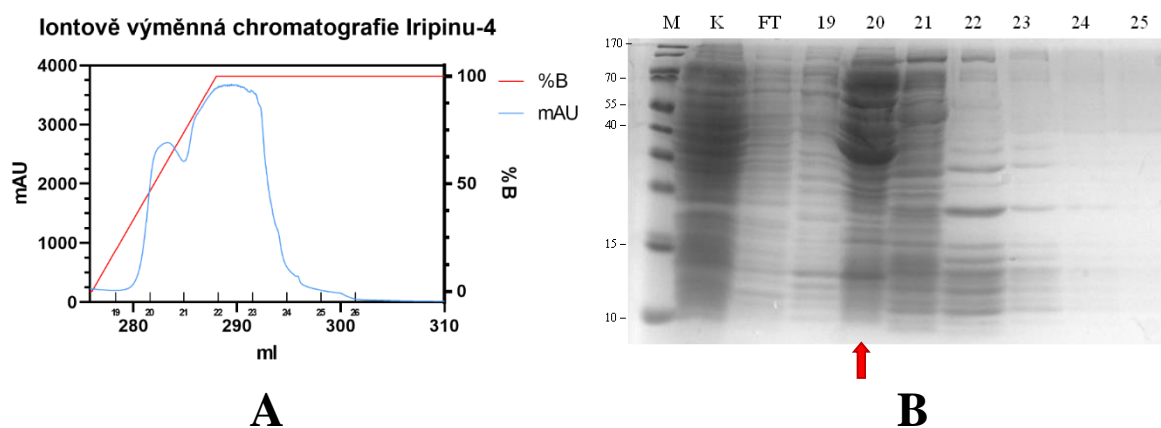


Obrázek 13: Výsledek exprese ve velkém měřítku. Pelety jsou označeny jako „p“, supernatanty jsou označeny jako „s“. Frakce, které byly indukovány IPTG jsou označeny „+“, které nebyly indukovány „-“. Označení 0h, 3h, 6h je označení času, ve kterém došlo k odběru vzorku. „M“ značí marker a velikost markeru v jednotkách kDa je uvedena podél levého okraje gelu. Iripin-4 má molekulovou hmotnost 41,938 kDa, jeho poloha na gelu je zvýrazněna červenou šipkou. Kompetentní buňky, ve kterých byl protein exprimován, jsou popsány v dolní části obrázku.

8.3 Purifikace

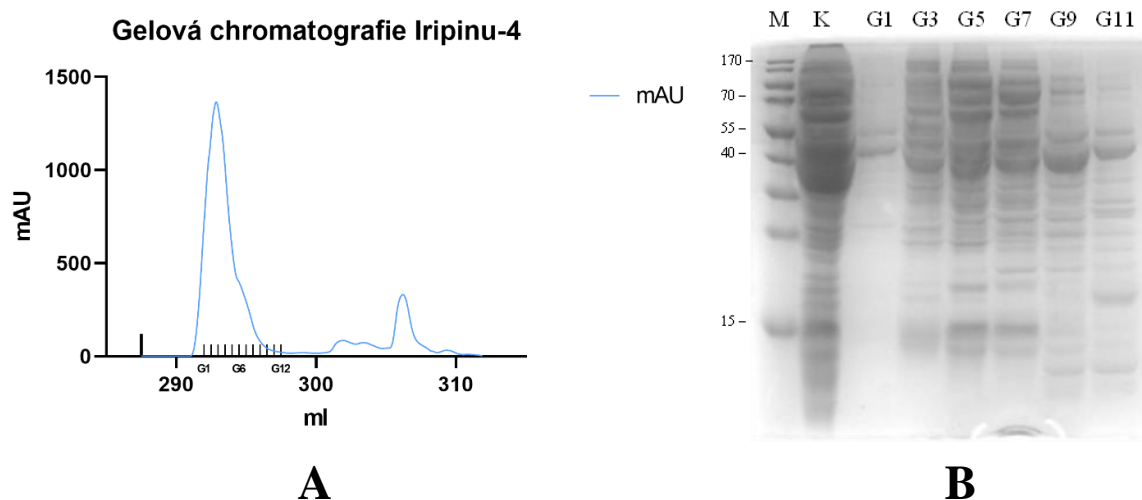
Nejlepšího výsledku bylo dosaženo purifikací proteinu, jehož exprese proběhla v buňkách BL21(DE3), které nebyly indukovány IPTG.

Nejdříve byla provedena iontově výměnná chromatografie. Průběh purifikace a výsledek jednotlivých frakcí je zobrazen na Obr. 14.



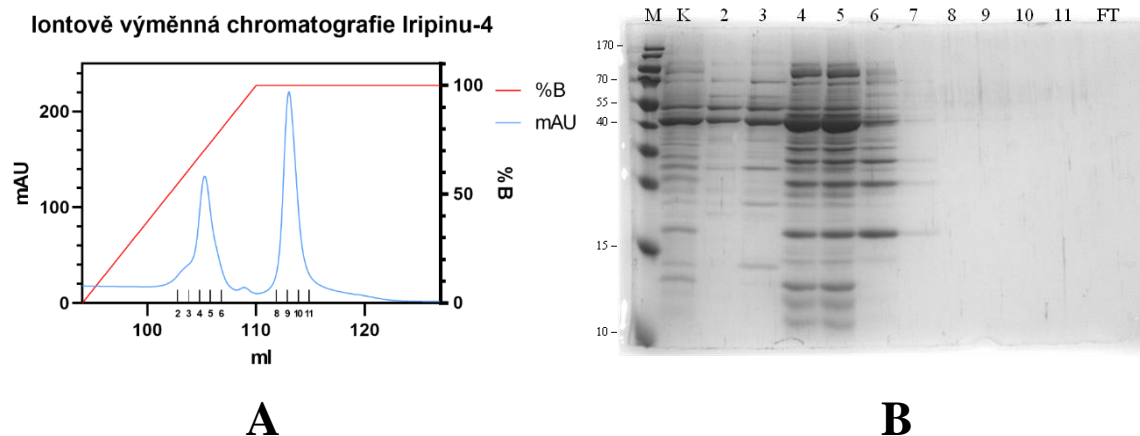
Obrázek 14: A – Chromatogram první iontově výměnné chromatografie Iripinu-4. Sběr frakcí začal při 21 % koncentraci elučního pufru. B – Výsledek frakcí získaných touto purifikací. Na gelu je označení jednotlivých frakcí následující: „K“ je pojmenování frakce, která byla nanášena na kolonu. „FT“ představuje vzorek, který nebyl kolonou zachycen a protekl. Z gelu je patrné, že nejvyšší koncentrace proteinu se nachází ve frakci 20, která je označena šipkou.

Frakce 20 byla následně purifikována pomocí gelové chromatografie. Průběh této purifikace a výsledek jednotlivých frakcí je zobrazen na Obr. 15.



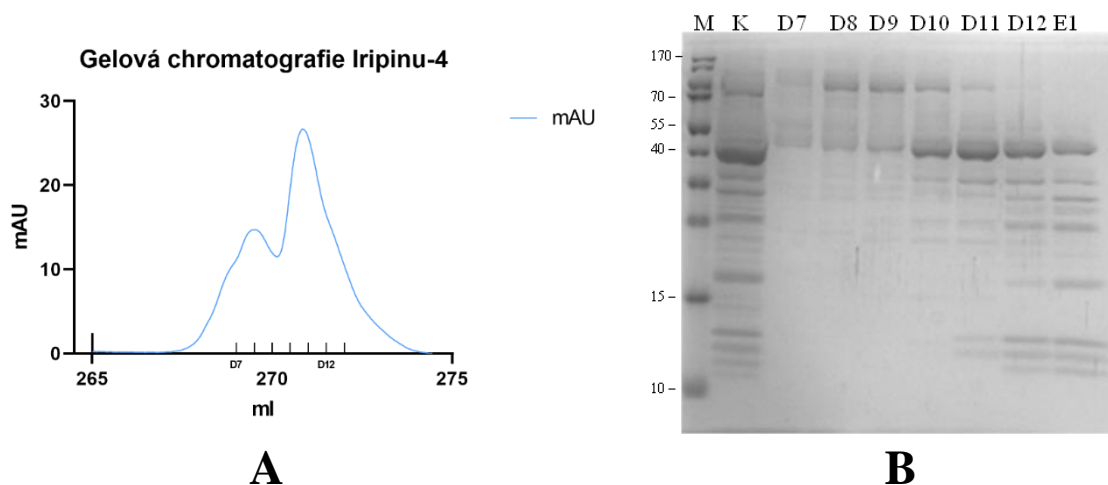
Obrázek 15: A – Chromatogram první gelové chromatografie Iripinu-4. Objem vzorku naneseného na kolonu činil 1 ml. Z grafu je patrné, že absorbance začala růst ve chvíli, kdy kolonou proteklo 5 ml vzorku. Nejvyšší peak značí protečení proteinu Iripin-4, zatímco menší peaky na konci chromatogramu znázorňují protečení menších proteinů, pravděpodobně se jedná o proteázové inhibitory použité v lyzačním pufru. B – Výsledek frakcí získaných touto purifikací. „K“ označení opět platí pro frakci, která byla nanesena na kolonu.

Frakce, které se dle SDS-PAGE elektroforézy jeví jako ty nejčistší, byly zakonzentrovány pomocí Amicon Ultra-4 10 K Device. Dohromady byly filtrovány frakce G9, G10, G11, G12 tak, aby byl získán 1 ml vzorku. Takto vzniklý vzorek opět putoval na iontově výměnnou chromatografii, jejíž průběh a frakce jsou na Obr. 16.



Obrázek 16: A – Chromatogram druhé iontově výměnné chromatografie Iripinu-4. Sběr frakcí začal při 60 % koncentraci elučního pufru. B – Výsledek frakcí získaných touto purifikací. Na gelu je označení jednotlivých frakcí následující: „K“ je pojmenování frakce, která byla nanesena na kolonu. „FT“ představuje vzorek, který nebyl kolonou zachycen a protekl. Ve frakcích 4 a 5 se dle gelu nachází nejvyšší koncentrace Iripinu-4.

Frakce 5 byla následně opět purifikována pomocí gelové chromatografie. Průběh gelové chromatografie frakce 5 a její výsledek je zobrazen na Obr. 17.



Obrázek 17: A – Chromatogram druhé gelové chromatografie Iripinu-4. Na kolonu byl opět nanesen 1 ml vzorku. Absorbance začala růst po protečení 5 ml vzorku. B – Jednotlivé frakce získané touto purifikací. „K“ označení opět platí pro frakci, která byla nanesena na kolonu.

Koncentrace jednotlivých frakcí jsou uvedeny v Tab. VIII.

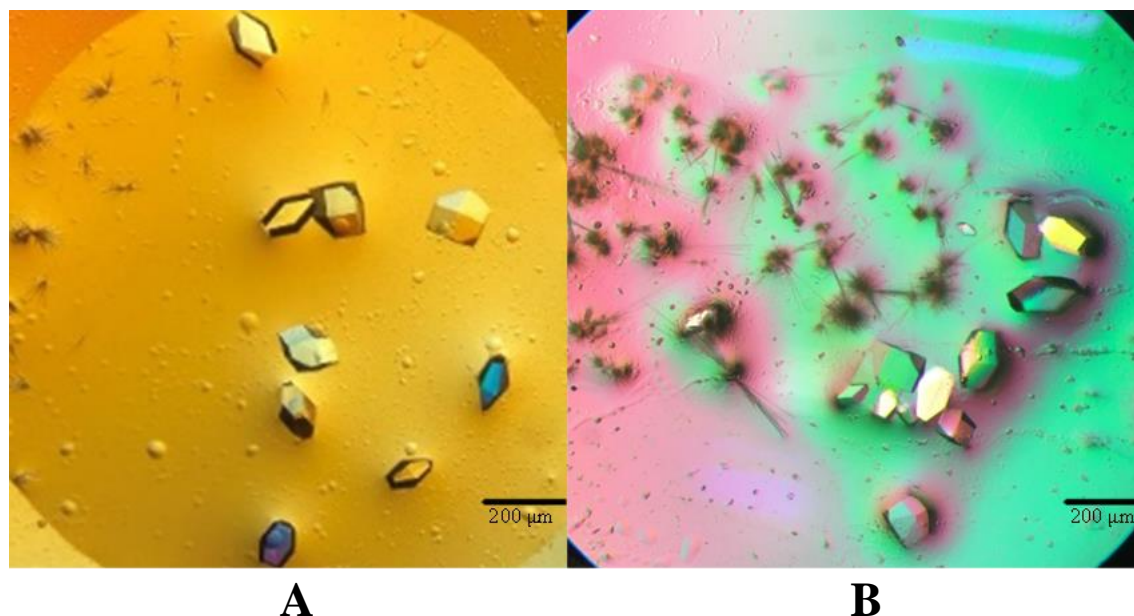
Tabulka VIII: Koncentrace frakcí druhé gelové chromatografie

Frakce	Koncentrace (mg/ml)
D7	0,066
D8	0,086
D9	0,088
D10	0,118
D11	0,178
D12	0,142
E1	0,102

Frakce D10, D11, D12 a E1 byly zakoncentrovány pomocí Amicon Ultra-4 10 K Device na konečný objem 0,5 ml. Výsledná koncentrace takto vzniklého vzorku činila 1,17 mg/ml a tento byl také následně použit ke krystalizaci.

8.4 Krystalizace lysozymu

Krystaly, které byly pěstovány metodou visící kapky, nejlépe narostly v podmínkách, ve kterých se lysozym nacházel v koncentraci 40 mg/ml a roztok NaCl byl 4 %. Krystaly pěstovány metodou sedící kapky nejlépe narostly v podmínce, kde koncentrace lysozymu je 40 mg/ml a roztok NaCl je 6 %. Krystaly z obou těchto podmínek jsou na Obr. 18.



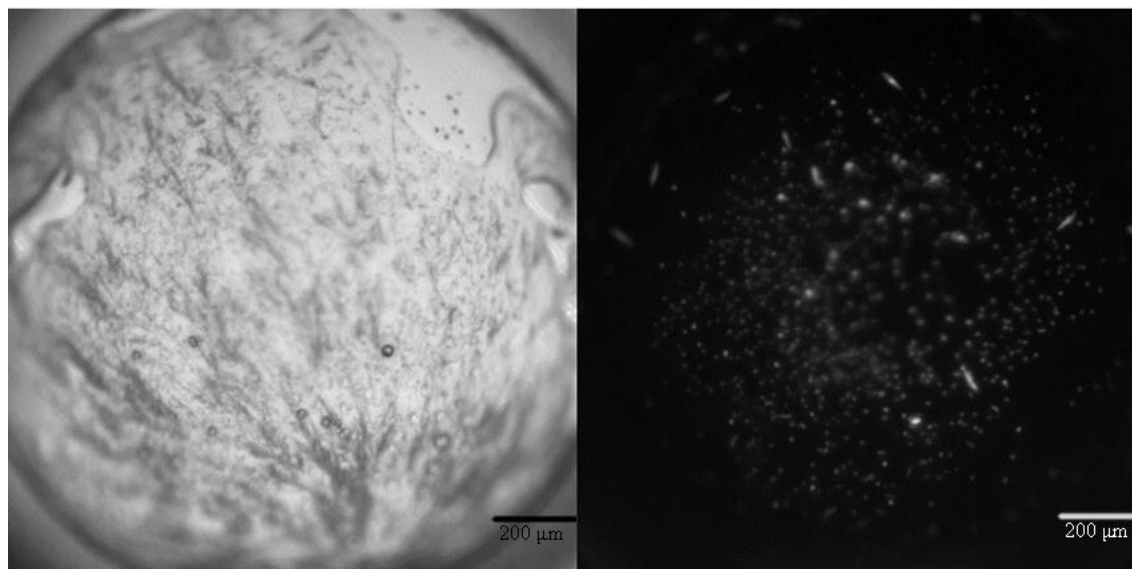
Obrázek 18: A – Proteinové krystaly lysozymu vzniklé metodou visící kapky v podmínce 4 % NaCl a lysozym v koncentraci 40 mg/ml. B – Krystaly pěstovány metodou sedící kapky v podmínce, kde koncentrace lysozymu je 40 mg/ml a roztok NaCl je 6 %.

Z obrázku je patrné, že se krystaly v každé podmínce liší množstvím tzv. mořských ježků. V podmínce s vyšší koncentrací NaCl se těchto struktur nachází více a ve větších velikostech. Kromě mořských ježků se převážně na obrázku B objevuje větší množství jehličkových krystalů.

8.5 Krystalizace Iripinu-4

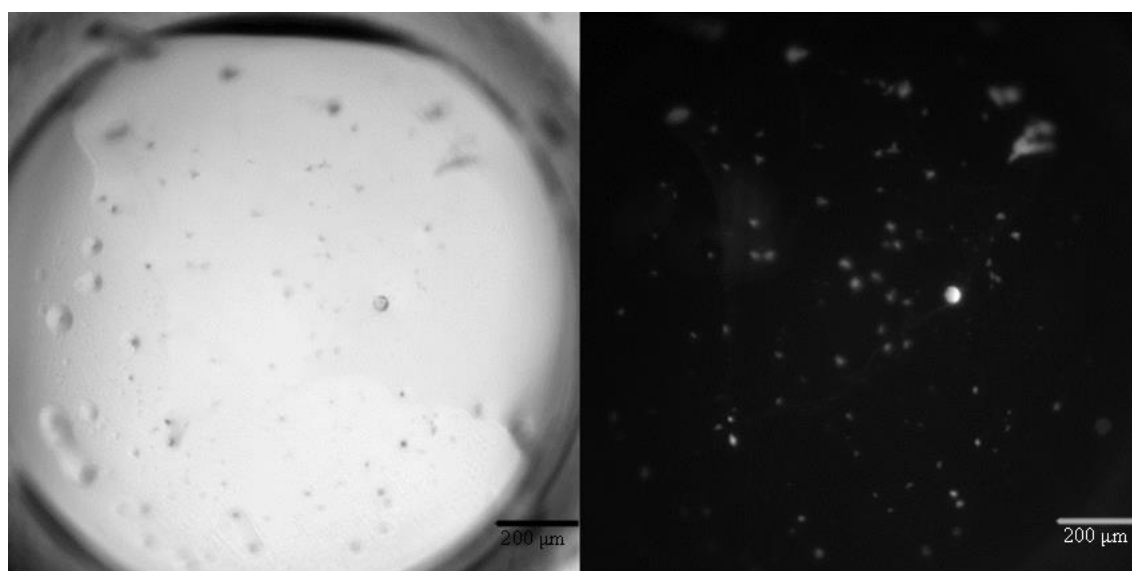
Aby byl protein vhodný ke krystalizaci, musí být dostatečně čistý a mít dostatečnou koncentraci. Ke krystalizačnímu procesu byl použit protein Iripin-4, jehož koncentrace činila 1,17 mg/ml. Seznam podmínek pro jednotlivé sady precipitačních činidel a vyznačené podmínky, ve kterých došlo k růstu krystalů, je uveden v Příloze č. 5, č. 6, č. 7 a č. 8.

Krystaly, vypěstované za použití sady Peg/Ion, se nacházely v jamce s poměrem 1:1 proteinu a podmínky D2, která obsahovala 0,2 M dibazický vinan amonný pH 6,6 a 20 % polyethylenglykol. Krystaly v této podmínce byly následně otestovány pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEXm. Tyto krystaly jsou na Obr. 19. Vzhledem k vysoké míře precipitace tato podmínka nebyla dále optimalizována.



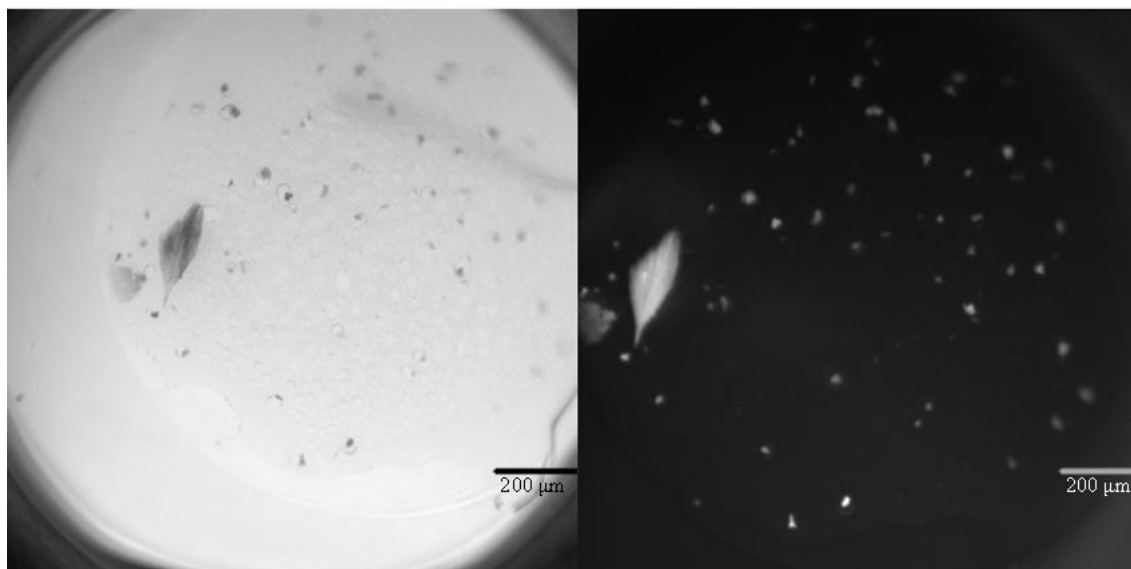
Obrázek 19: Krystaly vypěstované v podmínce D2 sady Peg/Ion

Na Obr. 20 jsou zobrazeny otestované krystaly vypěstované za použití sady Index HT v jamce s poměrem 1:1 proteinu a podmínky F2, která obsahuje 0,2 M trimethylamin N-oxid dihydrát, 0,1 M Tris pH 8,5 a 20 % polyethylenglykol monomethylether. V této podmínce byl růst krystalů následně i optimalizován.



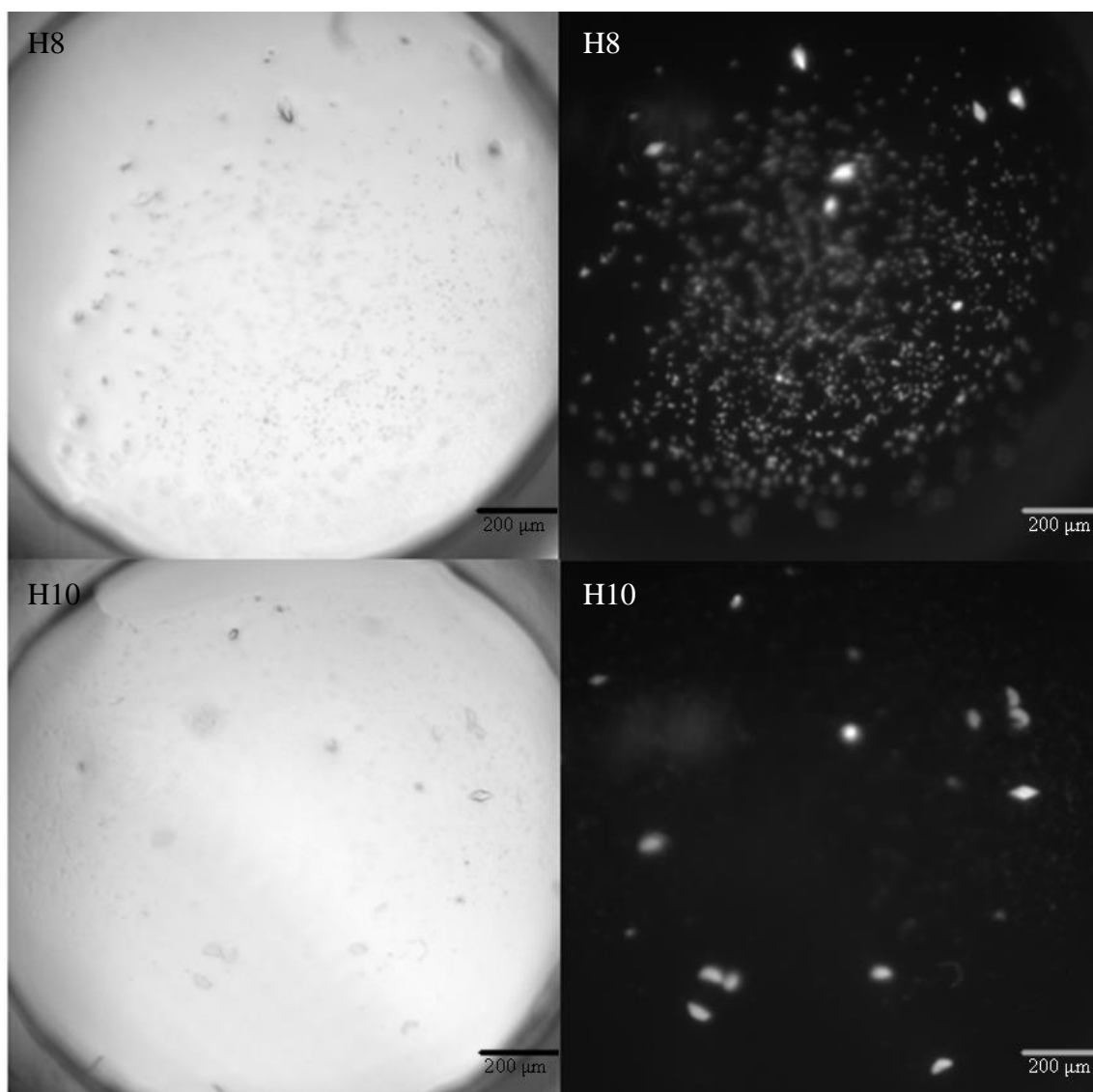
Obrázek 20: Krystaly vypěstované v podmínce F2 sady Index HT

Při použití sady PEGRx HT byl nejlepší krystal nalezen v jamce s poměrem 1:1 proteinu a podmínky F11 obsahující 4 M mravenčan draselný, 0,1 M bis – Tris propan pH 9 a 20 % polyethylenglykol monomethylether. Snímek krystalu včetně otestování v této podmínce je na Obr. 21. Také tato podmínka byla zvolena k následné optimalizaci.



Obrázek 21: Krystaly vypěstované v podmínce F11 sady PEGRx HT

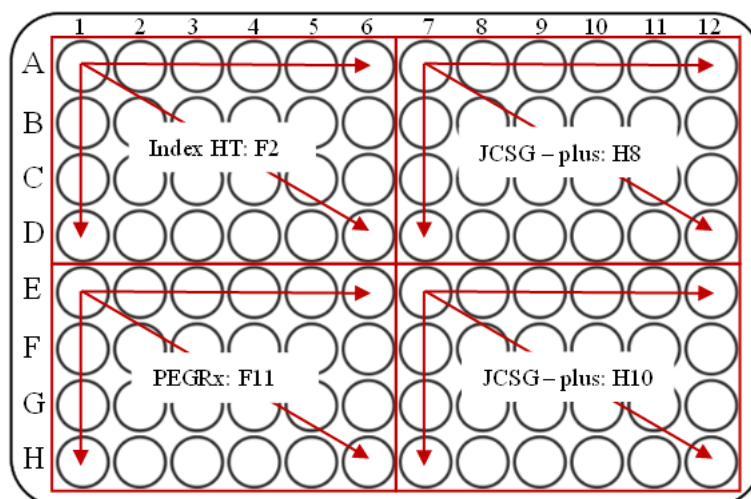
Poslední sadou, která byla použita ke krystalizaci, byla sada JCSG – plus. Zde byly ve dvou podmínkách nalezeny samostatné krystaly, které byly následně i otestovány. Tyto krystaly jsou vidět na Obr. 22. Krystaly narostly v horních jamkách v podmínkách H8 a H10. Podmínka H8 obsahuje 0,2 M NaCl, 0,1 M bis – Tris pH 5,5 a 25 % PEG, H10 obsahuje 0,2 M octan amonný, 0,1 M bis – Tris pH 5,5 a 25 % PEG. Růst krystalů v těchto podmínkách byl optimalizován. Krystaly o větší velikosti narostly v podmínce H10.



Obrázek 22: Krystaly vypěstované v podmínkách H8 a H10 sady JCSG – plus

8.6 Optimalizace podmínek pro růst krystalů Iripinu-4

Podmínky, ve kterých došlo k růstu krystalů, byly při optimalizaci zopakovány. 50 μ l příslušné podmínky bylo napipetováno do rezervoáru destičky a pomocí krystalizačního robota byl vytvořen koncentrační gradient proteinu dle následujícího schématu na Obr. 23.



Obrázek 23: Schéma optimalizace podmínek

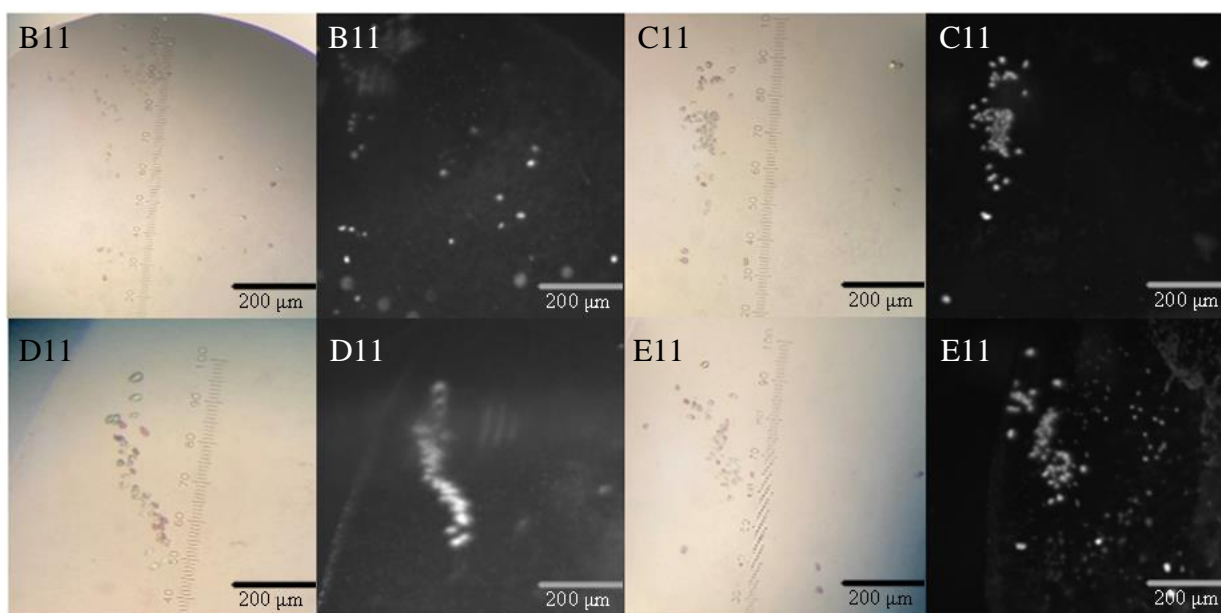
Koncentrační gradient byl vytvořen směrem od 80 % po 20 % proteinu. K růstu krystalů došlo v pozicích B11, C11, D11 a E11. Koncentrace proteinu a precipitačního činidla v těchto pozicích na krystalizační destičce jsou vypsány v následující Tab. IX.

Tabulka IX: Koncentrace proteinu a precipitačního činidla

Pozice	Koncentrace proteinu	Koncentrace precipitantu
B11	60 %	32 %
C11	40 %	32 %
D11	20 %	32 %
E11	80 %	32 %

Zda skutečně došlo k růstu proteinových krystalů bylo ověřeno pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEXm.

Nalezené a otestované proteinové krystaly Iripinu-4 jsou na Obr. 24.



Obrázek 24: Krystaly vypěstované v optimalizovaných podmínkách sady JCSG – plus a snímky krystalů z těchto podmínek pod UV zářením

Z obrázku je patrné, že se skutečně jedná o krystaly proteinu. Tyto krystaly jsou dostatečně velké pro rentgenovou difrakci a budou poslány na měření do Berlína na synchrotron BESSY II. Hlavní výhodou tohoto synchrotronu je produkce velmi intenzivního rentgenového záření, které umožňuje detailní studium biologických struktur na základě směru a intenzity difraktovaného záření.

9 Diskuze

Z výsledků SDS-PAGE pilotních frakcí je patrné, že se serpin Iripin-4 exprimoval hlavně v peletu, tedy ve formě inkluzních tělísek. Purifikace proteinů nacházejících se ve formě inkluzních tělísek je velmi časově náročná, jelikož ještě před samotnou purifikací musí být proveden tzv. refolding – obnovení enzymatické aktivity proteinu. Proces refoldingu je pro každý protein specifický, důležitou roli zde hrají hodnoty pH používaného pufru, typ a koncentrace solí či teplota (de Bernardez Clark *et al.*, 1998).

V případě řešení struktury serpinů IRS-2 a Iripin-3 byl refolding proveden. U obou zmíněných serpinů byla inkluzní tělíska nejdříve promyta pufrem, aby byly zbaveny nečistot v podobě proteinů absorbovaných do inkluzních tělísek. Poté byly oba serpiny promyty v jiném typu pufru, aby byly odstraněny zejména nukleové kyseliny a látky tvořící buněčnou membránu. V případě IRS-2 i Iripinu-3 byla nakonec provedena dialýza. Podmínky dialýzy byly u obou serpinů opět rozdílné, co se týče použitých pufrů a membránových filtrů (Kovářová *et al.*, 2010, Chlastáková *et al.*, 2021). Pro svoji velkou časovou náročnost v této práci refolding proveden nebyl, ačkoliv by jeho realizací mohlo dojít k získání většího množství čistého proteinu, jak je potvrzeno v těchto citovaných článcích dle snímků z SDS-PAGE elektroforézy (Kovářová *et al.*, 2010, Chlastáková *et al.*, 2021).

Objasněním struktury Iripinu-4 mohou být objasněny jeho funkce v obranyschopnosti lidského organismu. Na základě těchto výsledků není vyloučeno, že by právě Iripin-4 mohl mít potenciální využití v medicíně. Díky již existujícím studiím je zřejmé, že serpiny regulují zánětlivé procesy tím, že inhibují cílové proteázy. Je zde také mnoho studií, které dokazují, že inhibice proteázy serpinem má vliv na reakce vedoucí k buněčné proliferaci nebo apoptóze. Například inhibice katepsinu G serpinem α 1-antichymotrypsin stimuluje tvorbu interleukinu 6 a aktivuje NADPH oxidázu (Kurdowska & Travis, 1990; Schuster *et al.*, 1992). Dále bylo zjištěno, že serpin α 1-antichymotrypsin je také schopný formovat komplexy s leukotrienem B₄, protizánětlivým mediátorem produkovaným neutrofily. Tento komplex následně reguluje signální dráhy vedoucí ke vzniku zánětu. Tento objev naznačuje, že serpin α 1-antichymotrypsin by v budoucnu mohl hrát roli při zánětlivých onemocněních (O'Dwyer *et al.*, 2015).

Kromě struktury serpinu Iripin-4 je důležitá také samotná aminokyselinová sekvence jeho reaktivní centrální smyčky (reactive centre loop – RCL). Pro vznik komplexu serpin-proteáza je tato sekvence klíčová. Na základě této sekvence je určeno, která proteáza, respektive její aktivní místo, rozštěpí RCL a tím se serpinem vytvoří komplex. I pouze malá změna v sekvenci RCL může vést ke změně specifity serpinu. Například serpin α 1-antitrypsin je za normálních okolností potenciálním inhibitorem elastázy neutrofilů, trypsinu, chymotrypsinu, kallikreinu 7 a 14, katepsinu G a proteinázy 3. Všechny tyto proteázy jsou zapojeny do ochrany organismu při vznikajícím zánětu. Ovšem mutace RCL v pozici P1 (M358R) způsobí, že α 1-antitrypsin se přeměňuje na inhibitor trombinu, aktivovaného proteinu C, plasminu, faktoru XIa, faktoru Xa a faktoru XIIa, čili na inhibitor proteáz zapojených do procesu koagulace. U pacientů postižených touto mutací se projevuje doživotní krvácivá porucha (Lewis *et al.*, 1978; Owen *et al.*, 1983). Navzdory této skutečnosti byla mutace M358R dále zkoumána jakožto možnost potenciální léčby při koagulopatiích a sepsích. Zatímco u mutantních prasečích modelů byl zaznamenán pokles koagulopatie a úmrtí v souvislosti se sepsí (Colman *et al.*, 1988), u modelu primáta se tento výsledek neopakoval (Harper *et al.*, 1998).

V této práci se podařilo získat krystaly Iripinu-4 v difrakční kvalitě, které byly otestované na domácím zdroji UV záření. Pro budoucí krystalizační experimenty Iripinu-4 je žádoucí vymezit postupy, které mohou vést k získání větších a kvalitnějších krystalů. K nárůstu velkého množství malých krystalů mohlo dojít kvůli tomu, že použitý roztok s proteinem obsahoval nečistoty, které sloužily jako nezamýšlená místa nukleace (Chayen, 2009).

Jedním z faktorů stojícím za vznikem velkého množství malých krystalů Iripinu-4 mohl být příliš rychlý proces samotné krystalizace. Zpomalení průběhu krystalizace se zajišťuje nanesením olejové vrstvy přes jamku, ve které k růstu krystalu dochází (Chayen, 1997). Tato vrstva oleje zajišťuje oddálení vzniku rovnováhy mezi vytvořenými krystaly proteinu a volnými molekulami proteinu v roztoku. Tato metoda je známá jako tzv. „microbatch under oil“.

Kromě krystalizace samotného serpinu je také nutné připravit krystaly komplexu serpin – proteáza, abychom plně porozuměli mechanismu, kterým serpin proteázu inhibuje.

Tyto krystaly jsou připraveny přidáním konkrétní proteázy do roztoku proteinu. Ovšem inhibiční aktivita serpinů může být řízena vazbou specifických kofaktorů, jako je tomu např. u antitrombinu. Antitrombin je relativně slabý inhibitor trombinu a faktoru Xa, dokud jeho funkce není aktivována navázáním heparinu (Rezaie, 1998). Nízká aktivita antitrombinu je způsobena částečným vsunutím RCL mezi β -sheety A, což zapříčiňuje zhoršenou dostupnost proteázy k místu štěpení RCL (Carrell *et al.*, 1994, Schreuder *et al.*, 1997). Ovšem v případě interakce antitrombinu s heparinem dochází ke konformačnímu přeskupení serpinu, během kterého je RCL vytlačeno z vláken β -sheetu A, tím je jeho místo štěpení odhaleno a v této formě je RCL přístupné pro proteázu. Kromě odhalení místa štěpení pro proteázu může heparin vázat jak serpin, tak navázaný enzym a tím urychlit inhibiční reakci (Jin *et al.*, 1997).

10 Závěr

V této práci byl získán dostatečně čistý Iripin-4 purifikací proteinu exprimovaného v kompetentních buňkách BL21(DE3), které byly kultivovány v LB mediu při teplotě 37 °C a bez použití indukčního faktoru IPTG. Větší čistoty proteinu by bylo dosaženo použitím afinitní chromatografie, která v této práci ovšem použita nebyla, jelikož protein nebyl opatřen afinitní značkou. I přesto se však podařilo Iripin-4 vypurifikovat pomocí iontově výměnné a gelové chromatografie tak, aby bylo možné vypěstovat difraktující krystaly. Na základě optimalizace krystalizačních experimentů byly určeny nejvhodnější podmínky pro růst serpinových krystalů. Práce poskytuje návrh metod na zlepšení difrakční kvality krystalů pro budoucí experimenty. Tato práce dále obsahuje informace potřebné k tomu, aby mohla být struktura Iripinu-4 v budoucnu vyřešena a díky tomu mohla být zkoumána jeho biologická aktivita ze strukturního hlediska.

11 Seznam použité literatury

1. Aguilar-Díaz, H., & Cossío-Bayúgar, R. (2018). Immune System and Its Relationships with Pathogens: Structure, Physiology, and Molecular Biology. *InTech*, 21-45. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72635>
2. Blisnick, A. A., Foulon, T., & Bonnet, S. I. (2017). Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(199), 1-24. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00199>
3. Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., & Hansmann, Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 42(2), 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>
4. Carrell, R. W., Stein, P. E., Fermi, G., & Wardell, M. R. (1994). Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. *Structure*, 2(4), 257-270. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00028-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00028-9)
5. Colman, R. W., Flores, D. N., de La Cadena, R. A., Scott, C. F., Cousens, L., Barr, P. J., Hoffman, I. B., Kueppers, F., Fisher, D., Idell, S., & Pisarello, J. (1988). Recombinant α 1-Antitrypsin Pittsburgh Attenuates Experimental Gram-Negative Septicemia. *American Journal of Pathology*, 130(2), 418-426.
6. De Bernardez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S., & Maachupalli-Reddy, J. (1998). Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnology Progress*, 14(1), 47-54. <https://doi.org/10.1021/bp970123w>
7. Dunstone, M. A., & Whisstock, J. C. (2011). Crystallography of serpins and serpin complexes. *Methods in Enzymology*, 501(63-87), 63-87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385950-1.00005-5>
8. Fogaca, A. C., Sousa, G., Pavanelo, D. B., Esteves, E., Martins, L. A., Urbanová, V., Kopáček, P., & Daffre, S. (2021). Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. *Frontiers in Immunology*, 12, 1-23. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>
9. Harper, P. L., Taylor, F. B., DeLa Cadena, R. A., Courtney, M., Colman, R. W., & Carrell, R. W. (1998). Recombinant antitrypsin Pittsburgh undergoes proteolytic cleavage during E. coli sepsis and fails to prevent the associated coagulopathy in a primate model. *Thrombosis and haemostasis*, 80(5), 816-821.

10. Chayen, N. E. (1997). A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. *Journal of Applied Crystallography*, *30*, 198-202. <https://doi.org/10.1107/S0021889896013532>
11. Chayen, N. E. (2009). Rigorous filtration for protein crystallization. *Journal of Applied Crystallography*, *42*, 743-744. <https://doi.org/10.1107/S0021889809021700>
12. Chen, X., Riley, B. T., de Veer, S. J., Hoke, D. E., Van Haeften, J., Leahy, D., Swedberg, J. E., Brattsand, M., Hartfield, P. J., Buckle, A. M., & Harris, J. M. (2019). Potent, multi-target serine protease inhibition achieved by a simplified β -sheet motif. *PLOS One*, *14*(1), 1-15. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0210842>
13. Chlastáková, A., Kotál, J., Beránková, Z., Kaščáková, B., Martins, L. A., Langhansová, H., Prudnikova, T., Ederová, M., Kutá Smatanová, I., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2021). Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From Ixodes ricinus Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties In Vitro. *Frontiers in Immunology*, *12*(12), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626200>
14. Jin, L., Abrahams, J. P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R. N., & Carrell, R. W. (1997). The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *International Journal of Medical Sciences*, *94*(26), 14683-14688. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14683>
15. Kaščáková, B., Kotál, J., Martins, L. A., Beránková, Z., Langhansová, H., Calvo, E., Crossley, J. A., Havlíčková, P., Dyčka, F., & Prudnikova, T. (2021). Structural and biochemical characterization of the novel serpin Iripin-5 from Ixodes ricinus. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, *77*(9). <https://doi.org/10.1107/S2059798321007920>
16. Kotál, J., Polderdijk, S. G. I., Langhansová, H., Ederová, M., Martins, L. A., Beránková, Z., Chlastáková, A., Hajdušek, O., Kotsyfakis, M., Huntington, J. A., & Chmelař, J. (2021). Ixodes ricinus Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22179480>
17. Kovářová, Z., Chmelař, 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 Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, *1*(66), 1453–1457. <https://doi.org/10.1107/S1744309110032343>

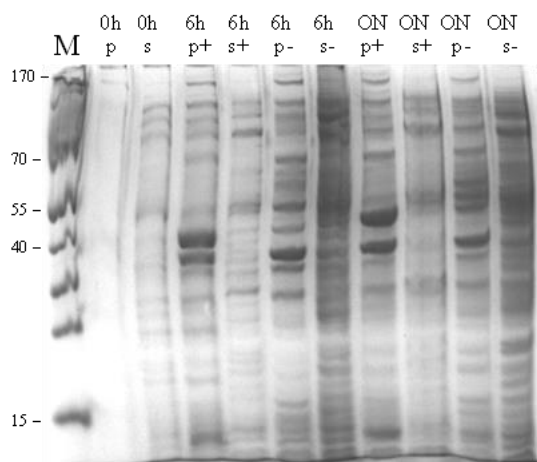
18. Kurdowska, A., & Travis, J. (1990). Acute Phase Protein Stimulation by α 1-Antichymotrypsin-Cathepsin G Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(34), 21023-21026.
19. Kutá Smatanová, I. (2006). Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi, 1-8.
20. Lewis, J. H., Iammarino, R. M., Spero, J. A., & Hasiba, U. (1978). Antithrombin Pittsburgh: an alpha1-antitrypsin variant causing hemorrhagic disease, 51(1), 129-137.
21. Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., & Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), 1-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>
22. Meekins, D. A., Kanost, M. R., & Michel, K. (2017). Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 62, 105-109. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.09.001>
23. Mkaouar, H., Akermi, N., Kriaa, A., Abraham, A. -L., Jablaoui, A., Soussou, S., Mokdad-Gargouri, R., Maguin, E., & Rhimi, M. (2019). Serine protease inhibitors and human wellbeing interplay: new insights for old friends. *PeerJ*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.7717/peerj.7224>
24. O'Dwyer, C. A., O'Brien, M. E., Wormald, M. R., White, M. M., Banville, N., Hurley, K., McCarthy, C., McElvaney, N. G., & Reeves, E. P. (2015). The BLT1 Inhibitory Function of α -1 Antitrypsin Augmentation Therapy Disrupts Leukotriene B4 Neutrophil Signaling. *The Journal of Immunology*, 2015(195), 3628–3641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.150003>
25. Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., & Carell, R. W. (1983). Mutation of Antitrypsin to Antithrombin — α 1-Antitrypsin Pittsburgh (358 Met \rightarrow Arg), a Fatal Bleeding Disorder. *The New England Journal of Medicine*, 309(12), 694-698. <https://doi.org/10.1056/NEJM198309223091203>
26. Pelanek, M. (2019). *The sucker of the bean tick (Ixodes ricinus) under the microscope. Sucker with white background close up*. Shutterstock.com. Retrieved August 18, 2021, from <https://www.shutterstock.com/cs/image-photo/sucker-bean-tick-ixodes-ricinus-under-380813053>
27. Prevot, P. P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., & Godfroid, E. (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, 25(17), 3284-3292. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.008>

28. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. *Bioinformatics explained: Proteolytic cleavage*. Resources.qiagenbioinformatics.com. Retrieved August 30, 2021, from http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/BE_Proteolytic_cleavage.html
29. Rezaie, A. R. (1998). Calcium Enhances Heparin Catalysis of the Antithrombin-Factor Xa Reaction by a Template Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 16824-16827. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16824>
30. Rupp, B. (2010). In *Biomolecular crystallography* (pp. 1-808). Garland Science.
31. Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11643-11691. <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>
32. Schreuder, H., de Boer, B., Pronk, S., Hol, W., Dijkema, R., Mulders, R., & Theunissen, H. (1993). Crystallization and preliminary X-ray analysis of human antithrombin III. *Journal of Molecular Biology*, 229(1), 249-250. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1024>
33. Schuster, M. G., Enriguez, P. M., Curran, P., Cooperman, B. S., & Rubin, H. (1992). Regulation of Neutrophil Superoxide by Antichymotrypsin-Chymotrypsin Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5056-5059.
34. Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, 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. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33293-33296. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200>.
35. Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (Eds.). (2014). *Biology of ticks*. In (2nd ed., pp. 3-560). Oxford University Press.
36. Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (Eds.). (2014). In *Biology of ticks: Volume 2* (2nd ed., pp. 3-488). Oxford University Press.
37. Stanko, M., & Slovák, M. (2019). In *História výskumov ekológie kliešťov na území Česka a Slovenska do roku 2000* (pp. 3-544). VEDA.
38. van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K., & Kalsheker, N. (2003). Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(11), 1536-1547. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00134-1)

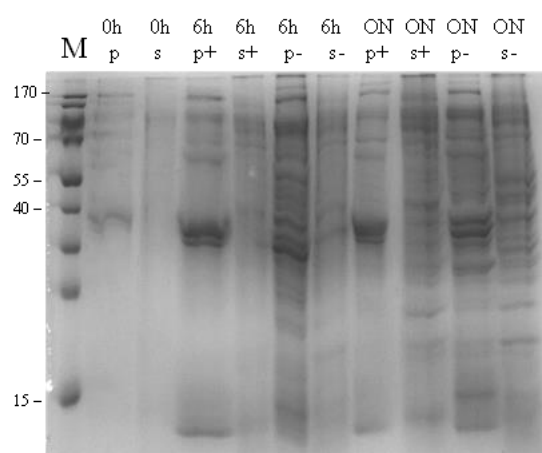
39. Volf, P., & Horák, P. (2007). In *Paraziti a jejich biologie* (pp. 5-318). Triton.
40. Votýpka, J., Kolářová, I., & Horák, P. (2018). In *O parazitech a lidech* (pp. 3-342). Triton.
41. Whisstock, J., Skinner, R., & Lesk, A. M. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(2), 63-67.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01172-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01172-9)

12 Seznam příloh

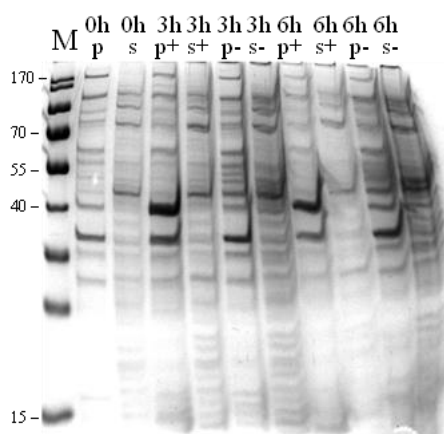
Příloha č. 1: Výsledky pilotní exprese v buňkách BL21(DE3)



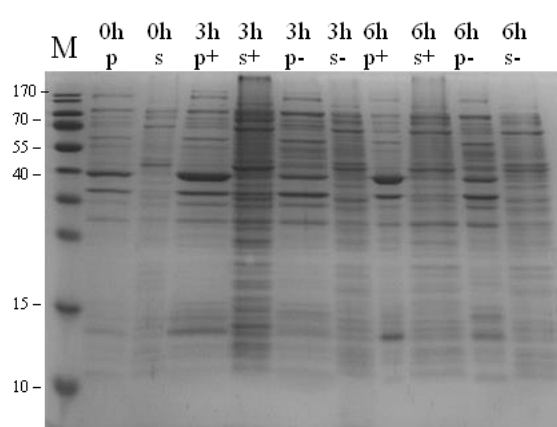
Expres v LB mediu při 18 °C



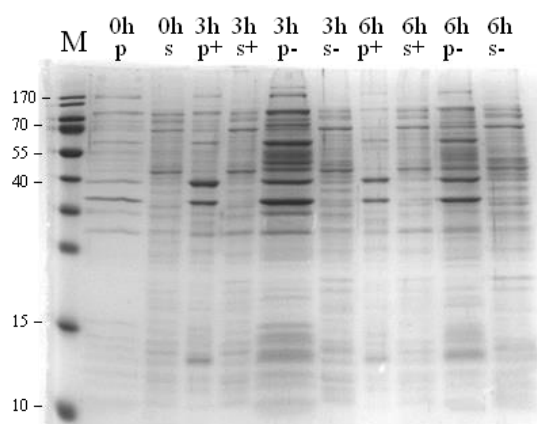
Expres v TB mediu při 18 °C



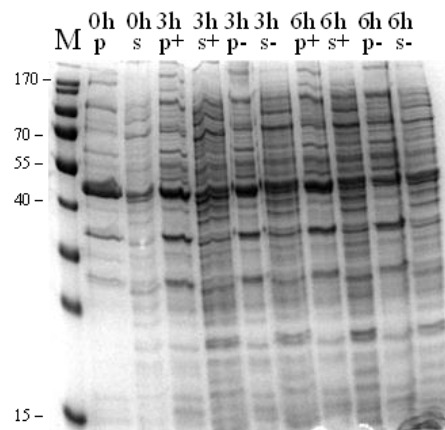
Expres v LB mediu při 25 °C



Expres v TB mediu při 25 °C

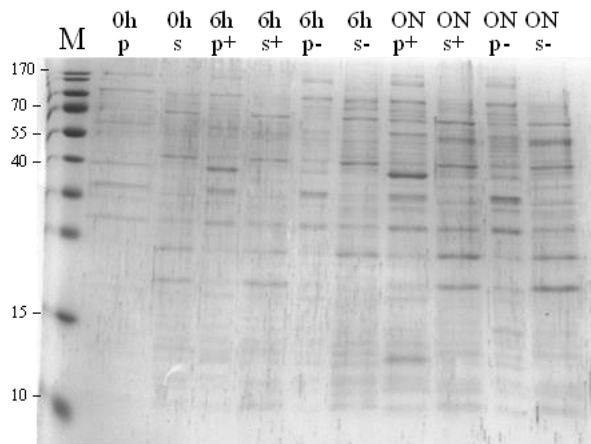


Expres v LB mediu při 37 °C

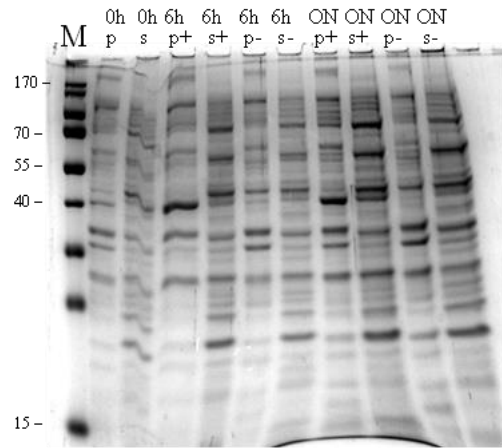


Expres v TB mediu při 37 °C

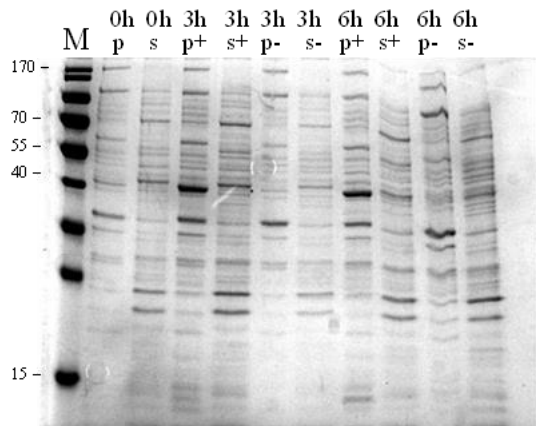
Příloha č. 2: Výsledky pilotní exprese v buňkách Rosetta-gami 2(DE3)



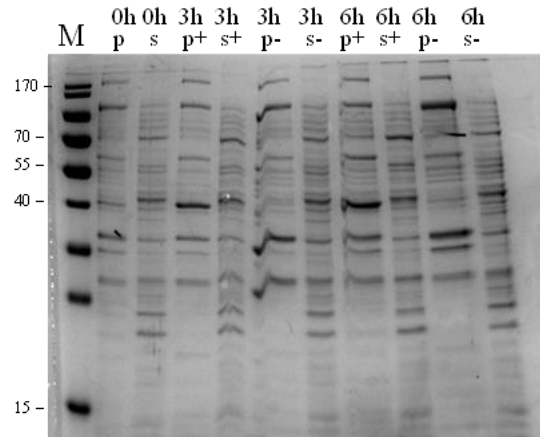
Expresse v LB mediu při 18 °C



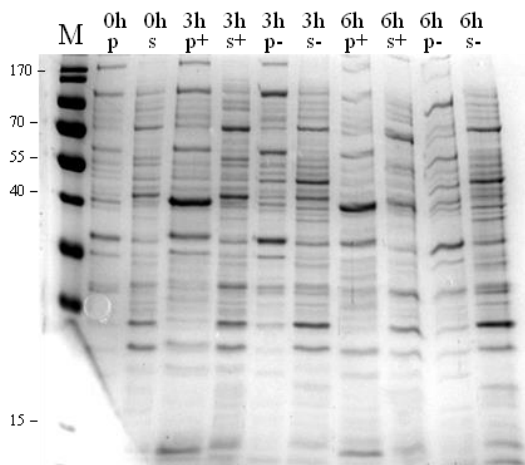
Expresse v TB mediu při 18 °C



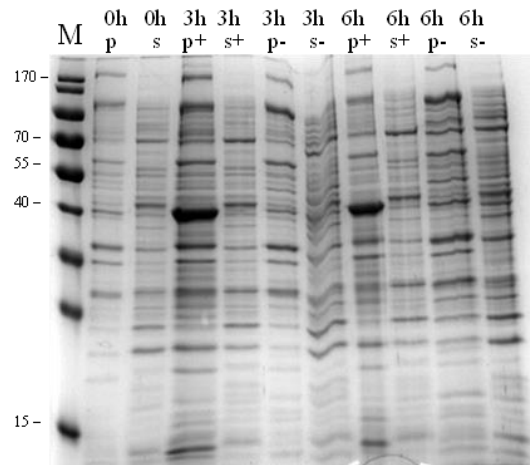
Expresse v LB mediu při 25 °C



Expresse v TB mediu při 25 °C

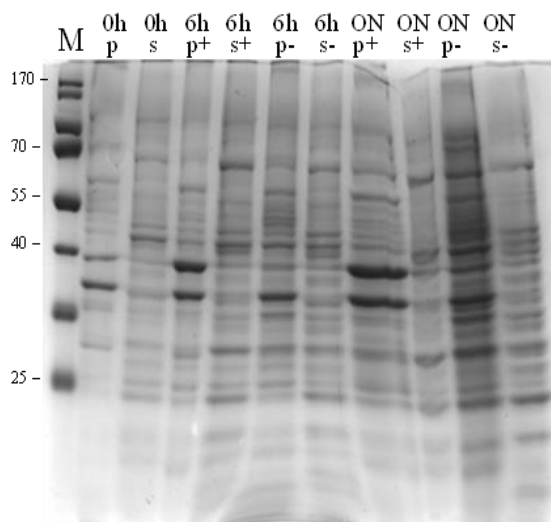


Expresse v LB mediu při 37 °C

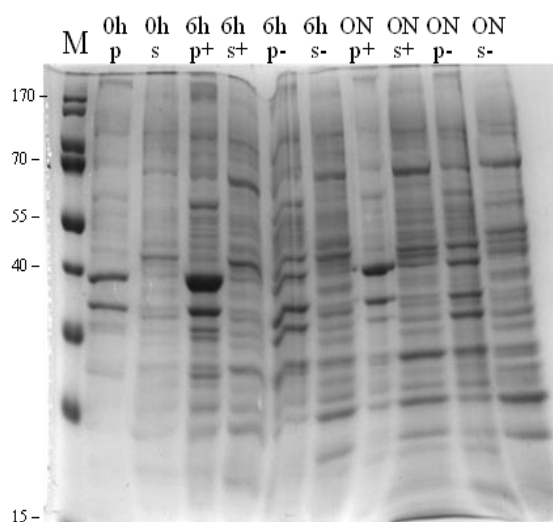


Expresse v TB mediu při 37 °C

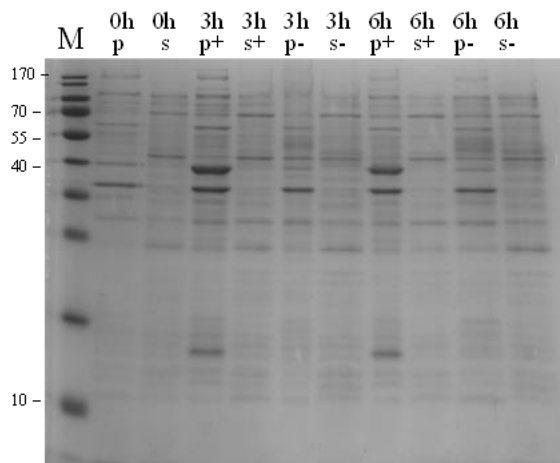
Příloha č. 3: Výsledky pilotní exprese v buňkách BL21-CodonPlus za přítomnosti samotného ampicilinu



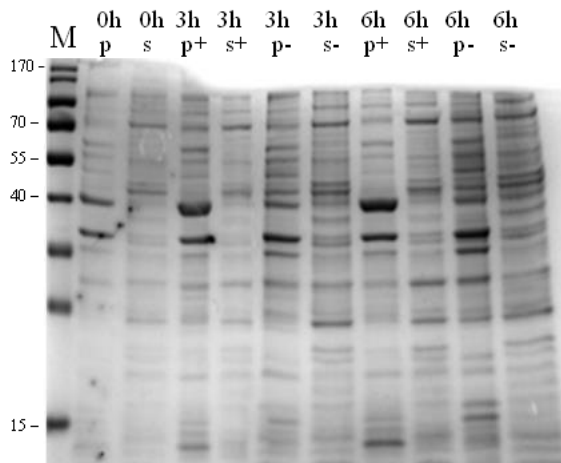
Expres v LB mediu při 18 °C



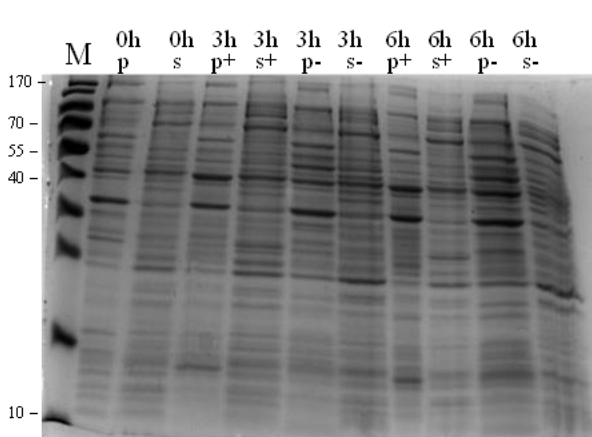
Expres v TB mediu při 18 °C



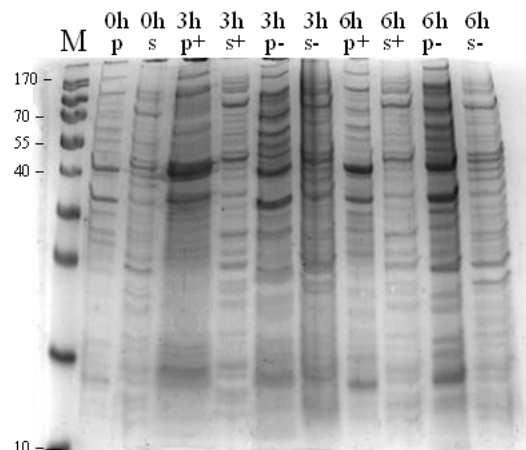
Expres v LB mediu při 25 °C



Expres v TB mediu při 25 °C

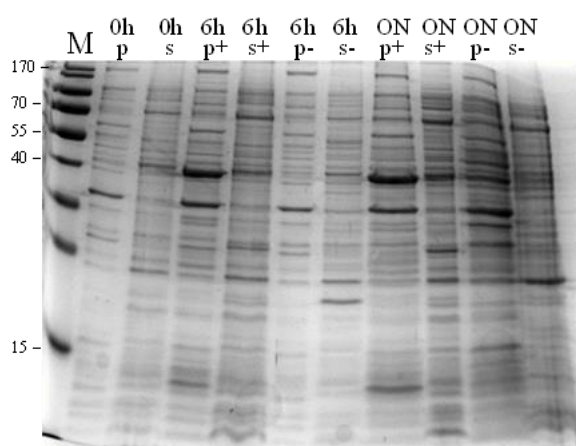


Expres v LB mediu při 37 °C

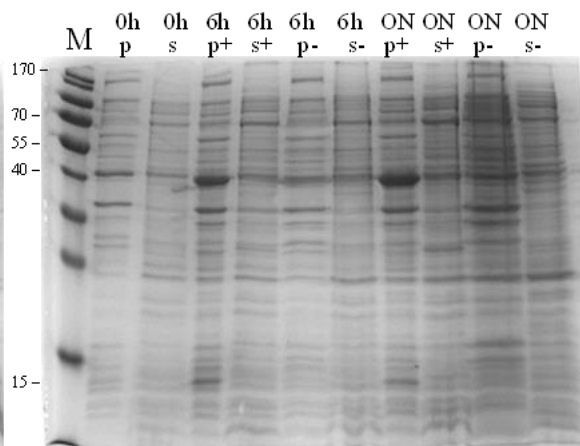


Expres v TB mediu při 37 °C

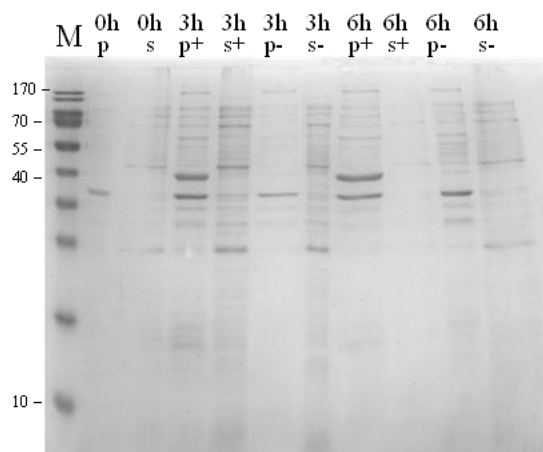
Příloha č. 4: Výsledky pilotní exprese v buňkách BL21-CodonPlus za přítomnosti ampicilinu a chloramfenikolu



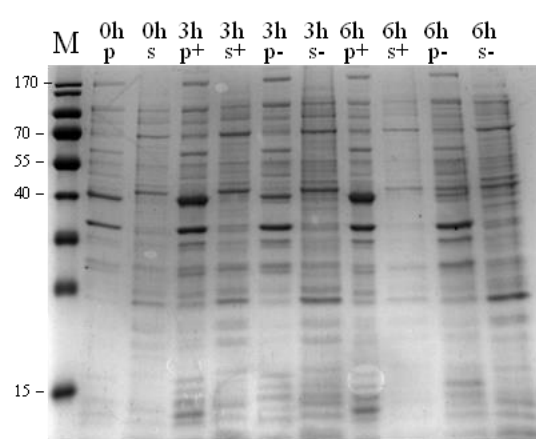
Expres v LB mediu při 18 °C



Expres v TB mediu při 18 °C



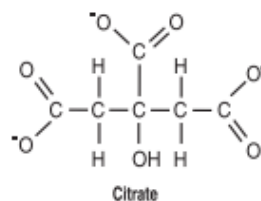
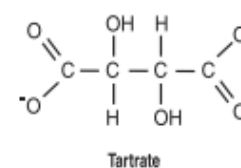
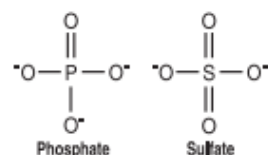
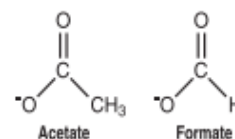
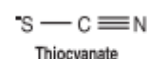
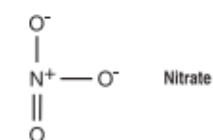
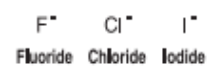
Expres v LB mediu při 37 °C



Expres v TB mediu při 37 °C

Příloha č. 5: Seznam podmínek krystalizace pro sadu Peg/Ion

Well #	Salt	Well #	Polymer	Well #	pH °
1. (A1)	0.2 M Sodium fluoride	1. (A1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	1. (A1)	7.3
2. (A2)	0.2 M Potassium fluoride	2. (A2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	2. (A2)	7.3
3. (A3)	0.2 M Ammonium fluoride	3. (A3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	3. (A3)	6.2
4. (A4)	0.2 M Lithium chloride	4. (A4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	4. (A4)	6.8
5. (A5)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	5. (A5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	5. (A5)	5.9
6. (A6)	0.2 M Sodium chloride	6. (A6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	6. (A6)	6.9
7. (A7)	0.2 M Calcium chloride dihydrate	7. (A7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	7. (A7)	5.1
8. (A8)	0.2 M Potassium chloride	8. (A8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	8. (A8)	7.0
9. (A9)	0.2 M Ammonium chloride	9. (A9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	9. (A9)	6.3
10. (A10)	0.2 M Sodium iodide	10. (A10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	10. (A10)	7.0
11. (A11)	0.2 M Potassium iodide	11. (A11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	11. (A11)	7.0
12. (A12)	0.2 M Ammonium iodide	12. (A12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	12. (A12)	6.2
13. (B1)	0.2 M Sodium thiocyanate	13. (B1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	13. (B1)	6.9
14. (B2)	0.2 M Potassium thiocyanate	14. (B2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	14. (B2)	7.0
15. (B3)	0.2 M Lithium nitrate	15. (B3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	15. (B3)	7.1
16. (B4)	0.2 M Magnesium nitrate hexahydrate	16. (B4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	16. (B4)	5.9
17. (B5)	0.2 M Sodium nitrate	17. (B5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	17. (B5)	6.8
18. (B6)	0.2 M Potassium nitrate	18. (B6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	18. (B6)	6.8
19. (B7)	0.2 M Ammonium nitrate	19. (B7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	19. (B7)	6.2
20. (B8)	0.2 M Magnesium formate dihydrate	20. (B8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	20. (B8)	7.0
21. (B9)	0.2 M Sodium formate	21. (B9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	21. (B9)	7.2
22. (B10)	0.2 M Potassium formate	22. (B10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	22. (B10)	7.3
23. (B11)	0.2 M Ammonium formate	23. (B11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	23. (B11)	6.6
24. (B12)	0.2 M Lithium acetate dihydrate	24. (B12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	24. (B12)	7.9
25. (C1)	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	25. (C1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	25. (C1)	7.9
26. (C2)	0.2 M Zinc acetate dihydrate	26. (C2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	26. (C2)	6.4
27. (C3)	0.2 M Sodium acetate trihydrate	27. (C3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	27. (C3)	8.0
28. (C4)	0.2 M Calcium acetate hydrate	28. (C4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	28. (C4)	7.5
29. (C5)	0.2 M Potassium acetate	29. (C5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	29. (C5)	8.1
30. (C6)	0.2 M Ammonium acetate	30. (C6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	30. (C6)	7.1
31. (C7)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	31. (C7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	31. (C7)	6.0
32. (C8)	0.2 M Magnesium sulfate heptahydrate	32. (C8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	32. (C8)	6.0
33. (C9)	0.2 M Sodium sulfate decahydrate	33. (C9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	33. (C9)	6.7
34. (C10)	0.2 M Potassium sulfate	34. (C10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	34. (C10)	6.8
35. (C11)	0.2 M Ammonium sulfate	35. (C11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	35. (C11)	6.0
36. (C12)	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate	36. (C12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	36. (C12)	7.3
37. (D1)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	37. (D1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	37. (D1)	7.4
38. (D2)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic	38. (D2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	38. (D2)	6.6
39. (D3)	0.2 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	39. (D3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	39. (D3)	4.7
40. (D4)	0.2 M Sodium phosphate dibasic dihydrate	40. (D4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	40. (D4)	9.1
41. (D5)	0.2 M Potassium phosphate monobasic	41. (D5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	41. (D5)	4.8
42. (D6)	0.2 M Potassium phosphate dibasic	42. (D6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	42. (D6)	9.2
43. (D7)	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43. (D7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	43. (D7)	4.6
44. (D8)	0.2 M Ammonium phosphate dibasic	44. (D8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	44. (D8)	8.0
45. (D9)	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate	45. (D9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	45. (D9)	8.4
46. (D10)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	46. (D10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	46. (D10)	8.3
47. (D11)	0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate	47. (D11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	47. (D11)	8.3
48. (D12)	0.2 M Ammonium citrate dibasic	48. (D12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	48. (D12)	5.1



° Measured pH at 25 ° C

PEG/Ion HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

Well #	Salt	Well #	Buffer ◊	Well #	Polymer
49.(E1)	0.1 M Sodium malonate pH 4.0	49.(E1)	None	49.(E1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
50.(E2)	0.2 M Sodium malonate pH 4.0	50.(E2)	None	50.(E2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
51.(E3)	0.1 M Sodium malonate pH 5.0	51.(E3)	None	51.(E3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
52.(E4)	0.2 M Sodium malonate pH 5.0	52.(E4)	None	52.(E4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
53.(E5)	0.1 M Sodium malonate pH 6.0	53.(E5)	None	53.(E5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
54.(E6)	0.2 M Sodium malonate pH 6.0	54.(E6)	None	54.(E6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
55.(E7)	0.1 M Sodium malonate pH 7.0	55.(E7)	None	55.(E7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
56.(E8)	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	56.(E8)	None	56.(E8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
57.(E9)	4% w/v Tacsimate™ pH 4.0	57.(E9)	None	57.(E9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
58.(E10)	8% w/v Tacsimate™ pH 4.0	58.(E10)	None	58.(E10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
59.(E11)	4% w/v Tacsimate™ pH 5.0	59.(E11)	None	59.(E11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
60.(E12)	8% w/v Tacsimate™ pH 5.0	60.(E12)	None	60.(E12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
61.(F1)	4% w/v Tacsimate™ pH 6.0	61.(F1)	None	61.(F1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.(F2)	8% w/v Tacsimate™ pH 6.0	62.(F2)	None	62.(F2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
63.(F3)	4% w/v Tacsimate™ pH 7.0	63.(F3)	None	63.(F3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
64.(F4)	8% w/v Tacsimate™ pH 7.0	64.(F4)	None	64.(F4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
65.(F5)	4% w/v Tacsimate™ pH 8.0	65.(F5)	None	65.(F5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
66.(F6)	8% w/v Tacsimate™ pH 8.0	66.(F6)	None	66.(F6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.(F7)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	67.(F7)	None	67.(F7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.(F8)	0.2 M Succinic acid pH 7.0	68.(F8)	None	68.(F8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.(F9)	0.1 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	69.(F9)	None	69.(F9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.(F10)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	70.(F10)	None	70.(F10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.(F11)	0.1 M DL-Malic acid pH 7.0	71.(F11)	None	71.(F11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.(F12)	0.2 M DL-Malic acid pH 7.0	72.(F12)	None	72.(F12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.(G1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	73.(G1)	None	73.(G1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.(G2)	0.2 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	74.(G2)	None	74.(G2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.(G3)	0.1 M Sodium formate pH 7.0	75.(G3)	None	75.(G3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.(G4)	0.2 M Sodium formate pH 7.0	76.(G4)	None	76.(G4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.(G5)	0.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	77.(G5)	None	77.(G5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.(G6)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	78.(G6)	None	78.(G6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.(G7)	2% w/v Tacsimate™ pH 4.0	79.(G7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	79.(G7)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.(G8)	2% w/v Tacsimate™ pH 5.0	80.(G8)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	80.(G8)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.(G9)	2% w/v Tacsimate™ pH 6.0	81.(G9)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	81.(G9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.(G10)	2% w/v Tacsimate™ pH 7.0	82.(G10)	0.1 M HEPES pH 7.5	82.(G10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.(G11)	2% w/v Tacsimate™ pH 8.0	83.(G11)	0.1 M Tris pH 8.5	83.(G11)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.(G12)	None	84.(G12)	0.07 M Citric acid, 0.03 M BIS-TRIS propane / pH 3.4	84.(G12)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.(H1)	None	85.(H1)	0.06 M Citric acid, 0.04 M BIS-TRIS propane / pH 4.1	85.(H1)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.(H2)	None	86.(H2)	0.05 M Citric acid, 0.05 M BIS-TRIS propane / pH 5.0	86.(H2)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.(H3)	None	87.(H3)	0.04 M Citric acid, 0.06 M BIS-TRIS propane / pH 6.4	87.(H3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.(H4)	None	88.(H4)	0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane / pH 7.6	88.(H4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.(H5)	None	89.(H5)	0.02 M Citric acid, 0.08 M BIS-TRIS propane / pH 8.8	89.(H5)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.(H6)	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate, 0.02 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	90.(H6)	None	90.(H6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.(H7)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate	91.(H7)	0.1 M HEPES sodium pH 7.0	91.(H7)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.(H8)	0.02 M Zinc chloride	92.(H8)	None	92.(H8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.(H9)	0.15 M Cesium chloride	93.(H9)	None	93.(H9)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.(H10)	0.2 M Sodium bromide	94.(H10)	None	94.(H10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.(H11)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	95.(H11)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	95.(H11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
96.(H12)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	96.(H12)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	96.(H12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350

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

PEG/lon HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

Příloha č. 6: Seznam podmínek krystalizace pro sadu Index HT

Well #	Salt	Well #	Buffer ◊	Well #	Precipitant
1. (A1)	None	1. (A1)	0.1 M Citric acid pH 3.5	1. (A1)	2.0 M Ammonium sulfate
2. (A2)	None	2. (A2)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	2. (A2)	2.0 M Ammonium sulfate
3. (A3)	None	3. (A3)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	3. (A3)	2.0 M Ammonium sulfate
4. (A4)	None	4. (A4)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	4. (A4)	2.0 M Ammonium sulfate
5. (A5)	None	5. (A5)	0.1 M HEPES pH 7.5	5. (A5)	2.0 M Ammonium sulfate
6. (A6)	None	6. (A6)	0.1 M Tris pH 8.5	6. (A6)	2.0 M Ammonium sulfate
7. (A7)	None	7. (A7)	0.1 M Citric acid pH 3.5	7. (A7)	3.0 M Sodium chloride
8. (A8)	None	8. (A8)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	8. (A8)	3.0 M Sodium chloride
9. (A9)	None	9. (A9)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	9. (A9)	3.0 M Sodium chloride
10. (A10)	None	10. (A10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	10. (A10)	3.0 M Sodium chloride
11. (A11)	None	11. (A11)	0.1 M HEPES pH 7.5	11. (A11)	3.0 M Sodium chloride
12. (A12)	None	12. (A12)	0.1 M Tris pH 8.5	12. (A12)	3.0 M Sodium chloride
13. (B1)	None	13. (B1)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	13. (B1)	0.3 M Magnesium formate dihydrate
14. (B2)	None	14. (B2)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	14. (B2)	0.5 M Magnesium formate dihydrate
15. (B3)	None	15. (B3)	0.1 M HEPES pH 7.5	15. (B3)	0.5 M Magnesium formate dihydrate
16. (B4)	None	16. (B4)	0.1 M Tris pH 8.5	16. (B4)	0.3 M Magnesium formate dihydrate
17. (B5)	None	17. (B5)	None - pH 5.6	17. (B5)	1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.14 M Potassium phosphate dibasic
18. (B6)	None	18. (B6)	None - pH 6.9	18. (B6)	0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.91 M Potassium phosphate dibasic
19. (B7)	None	19. (B7)	None - pH 8.2	19. (B7)	0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 1.344 M Potassium phosphate dibasic
20. (B8)	None	20. (B8)	0.1 M HEPES pH 7.5	20. (B8)	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
21. (B9)	None	21. (B9)	None	21. (B9)	1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0
22. (B10)	None	22. (B10)	None	22. (B10)	0.8 M Succinic acid pH 7.0
23. (B11)	None	23. (B11)	None	23. (B11)	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
24. (B12)	None	24. (B12)	None	24. (B12)	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
25. (C1)	None	25. (C1)	None	25. (C1)	3.5 M Sodium formate pH 7.0
26. (C2)	None	26. (C2)	None	26. (C2)	1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0
27. (C3)	None	27. (C3)	None	27. (C3)	2.4 M Sodium malonate pH 7.0
28. (C4)	None	28. (C4)	None	28. (C4)	35% v/v Tacsimate pH 7.0
29. (C5)	None	29. (C5)	None	29. (C5)	60% v/v Tacsimate pH 7.0
30. (C6)	0.1 M Sodium chloride	30. (C6)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	30. (C6)	1.5 M Ammonium sulfate
31. (C7)	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	31. (C7)	0.1 M Tris pH 8.5	31. (C7)	0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32. (C8)	1.0 M Ammonium sulfate	32. (C8)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	32. (C8)	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
33. (C9)	1.1 M Sodium malonate pH 7.0	33. (C9)	0.1 M HEPES pH 7.0	33. (C9)	0.5% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
34. (C10)	1.0 M Succinic acid pH 7.0	34. (C10)	0.1 M HEPES pH 7.0	34. (C10)	1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
35. (C11)	1.0 M Ammonium sulfate	35. (C11)	0.1 M HEPES pH 7.0	35. (C11)	0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000
36. (C12)	15% v/v Tacsimate pH 7.0	36. (C12)	0.1 M HEPES pH 7.0	36. (C12)	2% w/v Polyethylene glycol 3,350
37. (D1)	None	37. (D1)	None	37. (D1)	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
38. (D2)	None	38. (D2)	0.1 M HEPES pH 7.0	38. (D2)	30% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
39. (D3)	None	39. (D3)	0.1 M HEPES pH 7.0	39. (D3)	30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
40. (D4)	None	40. (D4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	40. (D4)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
41. (D5)	None	41. (D5)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	41. (D5)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
42. (D6)	None	42. (D6)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	42. (D6)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
43. (D7)	None	43. (D7)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	43. (D7)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
44. (D8)	None	44. (D8)	0.1 M HEPES pH 7.5	44. (D8)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
45. (D9)	None	45. (D9)	0.1 M Tris pH 8.5	45. (D9)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
46. (D10)	None	46. (D10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	46. (D10)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
47. (D11)	None	47. (D11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	47. (D11)	28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
48. (D12)	0.2 M Calcium chloride dihydrate	48. (D12)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	48. (D12)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

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

Index HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

Well #	Salt	Well #	Buffer ◊	Well #	Precipitant
49.(E1)	0.2 M Calcium chloride dihydrate	49.(E1)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	49.(E1)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
50.(E2)	0.2 M Ammonium acetate	50.(E2)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	50.(E2)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
51.(E3)	0.2 M Ammonium acetate	51.(E3)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	51.(E3)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
52.(E4)	0.2 M Ammonium acetate	52.(E4)	0.1 M HEPES pH 7.5	52.(E4)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
53.(E5)	0.2 M Ammonium acetate	53.(E5)	0.1 M Tris pH 8.5	53.(E5)	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
54.(E6)	0.05 M Calcium chloride dihydrate	54.(E6)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	54.(E6)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
55.(E7)	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	55.(E7)	0.1 M HEPES pH 7.5	55.(E7)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
56.(E8)	0.2 M Potassium chloride	56.(E8)	0.05 M HEPES pH 7.5	56.(E8)	35% v/v Polyethylene glycol 400
57.(E9)	0.05 M Ammonium sulfate	57.(E9)	0.05 M BIS-TRIS pH 6.5	57.(E9)	30% w/v Polyethylene glycol 600
58.(E10)	None	58.(E10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	58.(E10)	45% v/v Polypropylene glycol P 400
59.(E11)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	59.(E11)	0.1 M HEPES pH 7.5	59.(E11)	22% w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100
60.(E12)	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	60.(E12)	0.1 M Tris pH 8.5	60.(E12)	20% w/v Polyvinylpyrrolidone K 15
61.(F1)	0.2 M L-Proline	61.(F1)	0.1 M HEPES pH 7.5	61.(F1)	10% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.(F2)	0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate	62.(F2)	0.1 M Tris pH 8.5	62.(F2)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
63.(F3)	5% v/v Tacsimate pH 7.0	63.(F3)	0.1 M HEPES pH 7.0	63.(F3)	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
64.(F4)	0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.005 M Cadmium chloride hydrate, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	64.(F4)	0.1 M HEPES pH 7.5	64.(F4)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
65.(F5)	0.1 M Ammonium acetate	65.(F5)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	65.(F5)	17% w/v Polyethylene glycol 10,000
66.(F6)	0.2 M Ammonium sulfate	66.(F6)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	66.(F6)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.(F7)	0.2 M Ammonium sulfate	67.(F7)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	67.(F7)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.(F8)	0.2 M Ammonium sulfate	68.(F8)	0.1 M HEPES pH 7.5	68.(F8)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.(F9)	0.2 M Ammonium sulfate	69.(F9)	0.1 M Tris pH 8.5	69.(F9)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.(F10)	0.2 M Sodium chloride	70.(F10)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	70.(F10)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.(F11)	0.2 M Sodium chloride	71.(F11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	71.(F11)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.(F12)	0.2 M Sodium chloride	72.(F12)	0.1 M HEPES pH 7.5	72.(F12)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.(G1)	0.2 M Sodium chloride	73.(G1)	0.1 M Tris pH 8.5	73.(G1)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.(G2)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	74.(G2)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	74.(G2)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.(G3)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	75.(G3)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	75.(G3)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.(G4)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	76.(G4)	0.1 M HEPES pH 7.5	76.(G4)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.(G5)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	77.(G5)	0.1 M Tris pH 8.5	77.(G5)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.(G6)	0.2 M Ammonium acetate	78.(G6)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	78.(G6)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.(G7)	0.2 M Ammonium acetate	79.(G7)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	79.(G7)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.(G8)	0.2 M Ammonium acetate	80.(G8)	0.1 M HEPES pH 7.5	80.(G8)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.(G9)	0.2 M Ammonium acetate	81.(G9)	0.1 M Tris pH 8.5	81.(G9)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.(G10)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	82.(G10)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	82.(G10)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.(G11)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	83.(G11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	83.(G11)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.(G12)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	84.(G12)	0.1 M HEPES pH 7.5	84.(G12)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.(H1)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	85.(H1)	0.1 M Tris pH 8.5	85.(H1)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.(H2)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	86.(H2)	None	86.(H2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.(H3)	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	87.(H3)	None	87.(H3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.(H4)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	88.(H4)	None	88.(H4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.(H5)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	89.(H5)	None	89.(H5)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.(H6)	0.2 M Sodium formate	90.(H6)	None	90.(H6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.(H7)	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	91.(H7)	None	91.(H7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.(H8)	0.1 M Magnesium formate dihydrate	92.(H8)	None	92.(H8)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.(H9)	0.05 M Zinc acetate dihydrate	93.(H9)	None	93.(H9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.(H10)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	94.(H10)	None	94.(H10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.(H11)	0.1 M Potassium thiocyanate	95.(H11)	None	95.(H11)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
96.(H12)	0.15 M Potassium bromide	96.(H12)	None	96.(H12)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000

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

Index HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

Příloha č. 7: Seznam podmínek krystalizace pro sadu PEGRx HT

Well #	Buffer ◊	Well #	Polymer
1. (A1)	0.1 M Citric acid pH 3.5	1. (A1)	34% w/v Polyethylene glycol 200
2. (A2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	2. (A2)	38% w/v Polyethylene glycol 200
3. (A3)	0.1 M HEPES pH 7.5	3. (A3)	42% w/v Polyethylene glycol 200
4. (A4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	4. (A4)	30% w/v Polyethylene glycol 300
5. (A5)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	5. (A5)	25% w/v Polyethylene glycol 300
6. (A6)	0.1 M BICINE pH 8.5	6. (A6)	20% w/v Polyethylene glycol 300
7. (A7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	7. (A7)	15% w/v Polyethylene glycol 400
8. (A8)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	8. (A8)	22% w/v Polyethylene glycol 400
9. (A9)	0.1 M Tris pH 8.0	9. (A9)	30% w/v Polyethylene glycol 400
10. (A10)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	10. (A10)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
11. (A11)	0.1 M Imidazole pH 7.0	11. (A11)	25% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
12. (A12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	12. (A12)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
13. (B1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	13. (B1)	10% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
14. (B2)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	14. (B2)	20% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
15. (B3)	0.1 M Tris pH 8.0	15. (B3)	30% w/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
16. (B4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	16. (B4)	14% w/v Polyethylene glycol 1,000
17. (B5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	17. (B5)	22% w/v Polyethylene glycol 1,000
18. (B6)	0.1 M HEPES pH 7.5	18. (B6)	30% w/v Polyethylene glycol 1,000
19. (B7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	19. (B7)	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
20. (B8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	20. (B8)	20% w/v Polyethylene glycol 1,500
21. (B9)	0.1 M BICINE pH 8.5	21. (B9)	15% w/v Polyethylene glycol 1,500
22. (B10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	22. (B10)	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
23. (B11)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	23. (B11)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
24. (B12)	0.1 M Tris pH 8.0	24. (B12)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
25. (C1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	25. (C1)	30% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
26. (C2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	26. (C2)	20% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
27. (C3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	27. (C3)	10% w/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
28. (C4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	28. (C4)	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
29. (C5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	29. (C5)	18% w/v Polyethylene glycol 3,350
30. (C6)	0.1 M HEPES pH 7.5	30. (C6)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
31. (C7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	31. (C7)	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
32. (C8)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	32. (C8)	14% w/v Polyethylene glycol 4,000
33. (C9)	0.1 M Tris pH 8.0	33. (C9)	28% w/v Polyethylene glycol 4,000
34. (C10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	34. (C10)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
35. (C11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	35. (C11)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
36. (C12)	0.1 M BICINE pH 8.5	36. (C12)	8% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
37. (D1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	37. (D1)	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
38. (D2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	38. (D2)	20% w/v Polyethylene glycol 6,000
39. (D3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	39. (D3)	30% w/v Polyethylene glycol 6,000
40. (D4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	40. (D4)	28% w/v Polyethylene glycol 8,000
41. (D5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	41. (D5)	16% w/v Polyethylene glycol 8,000
42. (D6)	0.1 M HEPES pH 7.5	42. (D6)	4% w/v Polyethylene glycol 8,000
43. (D7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	43. (D7)	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
44. (D8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	44. (D8)	16% w/v Polyethylene glycol 10,000
45. (D9)	0.1 M BICINE pH 8.5	45. (D9)	20% w/v Polyethylene glycol 10,000
46. (D10)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	46. (D10)	18% w/v Polyethylene glycol 20,000
47. (D11)	0.1 M Imidazole pH 7.0	47. (D11)	12% w/v Polyethylene glycol 20,000
48. (D12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	48. (D12)	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.

PEGRx™ 1 (Deep Well Block) contains forty-eight unique reagents beginning at position A1.

Well #	Additive / Salt / Volatile Organic / Polyol	Well #	Buffer ◊	Well #	Polymer
49.(E1)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	49.(E1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	49.(E1)	4% w/v Polyethylene glycol 200
50.(E2)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	50.(E2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	50.(E2)	26% w/v Polyethylene glycol 200
51.(E3)	0.05 M Calcium chloride dihydrate	51.(E3)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	51.(E3)	45% w/v Polyethylene glycol 200
52.(E4)	28% w/v 2-Propanol	52.(E4)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	52.(E4)	3% w/v Polyethylene glycol 200
53.(E5)	20% w/v Tacsimate pH 7.0	53.(E5)	0.1 M HEPES pH 7.5	53.(E5)	2% w/v Polyethylene glycol 200
54.(E6)	10% w/v 2-Propanol	54.(E6)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	54.(E6)	26% w/v Polyethylene glycol 400
55.(E7)	0.2 M Ammonium acetate	55.(E7)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	55.(E7)	24% w/v Polyethylene glycol 400
56.(E8)	0.2 M Ammonium sulfate	56.(E8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	56.(E8)	18% w/v Polyethylene glycol 400
57.(E9)		57.(E9)	0.1 M HEPES pH 7.5	57.(E9)	40% w/v Polyethylene glycol 400
58.(E10)	6% w/v 2-Propanol	58.(E10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	58.(E10)	26% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
59.(E11)	1.8 M Ammonium sulfate	59.(E11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	59.(E11)	2% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
60.(E12)	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	60.(E12)	0.1 M Imidazole pH 7.0	60.(E12)	22% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
61.(F1)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	61.(F1)	0.1 M BICINE pH 8.5	61.(F1)	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
62.(F2)	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	62.(F2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	62.(F2)	20% w/v Polyethylene glycol 1,000
63.(F3)	0.1 M Sodium malonate pH 8.0	63.(F3)	0.1 M Tris pH 8.0	63.(F3)	30% w/v Polyethylene glycol 1,000
64.(F4)	4% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol	64.(F4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	64.(F4)	20% w/v Polyethylene glycol 1,500
65.(F5)	0.2 M L-Proline	65.(F5)	0.1 M HEPES pH 7.5	65.(F5)	24% w/v Polyethylene glycol 1,500
66.(F6)	10% w/v 2-Propanol	66.(F6)	0.1 M BICINE pH 8.5	66.(F6)	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
67.(F7)	0.1 M Sodium chloride	67.(F7)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	67.(F7)	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
68.(F8)	0.02 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate	68.(F8)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	68.(F8)	24% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
69.(F9)	20% w/v 2-Propanol	69.(F9)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	69.(F9)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
70.(F10)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	70.(F10)	0.1 M Imidazole pH 7.0	70.(F10)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
71.(F11)	4.0 M Potassium formate	71.(F11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	71.(F11)	2% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
72.(F12)	50% w/v Tacsimate pH 4.0	72.(F12)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	72.(F12)	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.(G1)	0.10% w/v n-Octyl-β-D-glucoside	73.(G1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	73.(G1)	22% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.(G2)	2% w/v Tacsimate pH 7.0, 5% w/v 2-Propanol	74.(G2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	74.(G2)	8% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.(G3)	2% w/v 1,4-Dioxane	75.(G3)	0.1 M Tris pH 8.0	75.(G3)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.(G4)	18% w/v 2-Propanol	76.(G4)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	76.(G4)	20% w/v Polyethylene glycol 4,000
77.(G5)	6% w/v Tacsimate pH 6.0	77.(G5)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	77.(G5)	25% w/v Polyethylene glycol 4,000
78.(G6)	0.2 M Magnesium formate dihydrate	78.(G6)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	78.(G6)	18% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
79.(G7)	2% w/v Polyethylene glycol 400	79.(G7)	0.1 M Imidazole pH 7.0	79.(G7)	24% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
80.(G8)	0.2 M Sodium formate	80.(G8)	0.1 M BICINE pH 8.5	80.(G8)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
81.(G9)	4% w/v 2-Propanol	81.(G9)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	81.(G9)	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
82.(G10)	6% w/v Ethylene glycol	82.(G10)	0.1 M Citric acid pH 3.5	82.(G10)	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
83.(G11)	0.15 M Lithium sulfate monohydrate	83.(G11)	0.1 M Citric acid pH 3.5	83.(G11)	18% w/v Polyethylene glycol 6,000
84.(G12)	10% w/v 2-Propanol	84.(G12)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	84.(G12)	22% w/v Polyethylene glycol 6,000
85.(H1)	0.2 M Sodium chloride	85.(H1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	85.(H1)	22% w/v Polyethylene glycol 8,000
86.(H2)	20% w/v 2-Propanol	86.(H2)	0.1 M Tris pH 8.0	86.(H2)	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
87.(H3)	10% w/v Polyethylene glycol 200	87.(H3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	87.(H3)	18% w/v Polyethylene glycol 8,000
88.(H4)	15% w/v 2-Propanol	88.(H4)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	88.(H4)	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
89.(H5)	0.4 M Sodium malonate pH 6.0	89.(H5)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	89.(H5)	0.5% w/v Polyethylene glycol 10,000
90.(H6)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	90.(H6)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	90.(H6)	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
91.(H7)	5% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol	91.(H7)	0.1 M HEPES pH 7.5	91.(H7)	10% w/v Polyethylene glycol 10,000
92.(H8)	0.2 M Ammonium acetate	92.(H8)	0.1 M Tris pH 8.0	92.(H8)	16% w/v Polyethylene glycol 10,000
93.(H9)	5% w/v 2-Propanol	93.(H9)	0.1 M Citric acid pH 3.5	93.(H9)	6% w/v Polyethylene glycol 20,000
94.(H10)	1.0 M Sodium malonate pH 5.0	94.(H10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	94.(H10)	2% w/v Polyethylene glycol 20,000
95.(H11)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	95.(H11)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	95.(H11)	10% w/v Polyethylene glycol 20,000
96.(H12)	3% w/v Dextran sulfate sodium salt	96.(H12)	0.1 M BICINE pH 8.5	96.(H12)	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.

PEGRx™ 2 (Deep Well Block) contains forty-eight unique reagents beginning at position E1.

Příloha č. 8: Seznam podmínek krystalizace pro sadu JCSG – plus

Well #	Conc.	Salt	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
A1	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	50 % w/v	PEG 400
A2		None	0.1 M	Sodium citrate	5.5	20 % w/v	PEG 3000
A3	0.2 M	Ammonium citrate dibasic		None		20 % w/v	PEG 3350
A4	0.02 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
A5	0.2 M	Magnesium formate dihydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
A6	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20 % w/v	PEG 1000
A7		None	0.1 M	CHES	9.5	20 % w/v	PEG 8000
A8	0.2 M	Ammonium formate		None		20 % w/v	PEG 3350
A9	0.2 M	Ammonium chloride		None		20 % w/v	PEG 3350
A10	0.2 M	Potassium formate		None		20 % w/v	PEG 3350
A11	0.2 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Tris	8.5	50 % v/v	MPD
A12	0.2 M	Potassium nitrate		None		20 % w/v	PEG 3350
B1	0.8 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Citrate	4.0		None
B2	0.2 M	Sodium thiocyanate		None		20 % w/v	PEG 3350
B3		None	0.1 M	BICINE	9.0	20 % w/v	PEG 6000
B4		None	0.1 M	HEPES	7.5	10 % w/v	PEG 8000
						8 % v/v	Ethylene glycol
B5		None	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	40 % v/v	MPD
						5 % w/v	PEG 8000
B6		None	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40 % v/v	Ethanol
						5 % w/v	PEG 1000
B7		None	0.1 M	Sodium acetate	4.6	8 % w/v	PEG 4000
B8	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	7.0	10 % w/v	PEG 8000
B9		None	0.1 M	Citrate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
B10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	50 % v/v	PEG 200
B11	1.6 M	Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5		None			None
B12	0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
C1	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20 % w/v	PEG 8000
C2	1.0 M	Lithium chloride	0.1 M	Citrate	4.0	20 % w/v	PEG 6000
C3	0.2 M	Ammonium nitrate		None		20 % w/v	PEG 3350
C4		None	0.1 M	HEPES	7.0	10 % w/v	PEG 6000
C5	0.8 M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		None
	0.8 M	Potassium phosphate monobasic		None			
C6		None	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40 % v/v	PEG 300
C7	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	10 % w/v	PEG 3000
C8		None	0.1 M	Tris	8.5	20 % v/v	Ethanol
C9		None	0.1 M	Sodium/potassium phosphate	6.2	25 % v/v	1,2-Propanediol
						10 % v/v	Glycerol
C10		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % w/v	PEG 20,000
						2 % v/v	1,4-Dioxane
C11	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6		None
C12		None		None		10 % w/v	PEG 1000
						10 % w/v	PEG 8000
D1		None		None		24 % w/v	PEG 1500
						20 % v/v	Glycerol
D2	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	PEG 400
D3	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium/potassium phosphate	6.2	50 % v/v	PEG 200
D4	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	30 % w/v	PEG 8000
D5		None	0.1 M	HEPES	7.5	70 % v/v	MPD
D6	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 8000
D7	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Tris	8.5	40 % v/v	PEG 400
D8		None	0.1 M	Tris	8.0	40 % v/v	MPD
D9	0.17 M	Ammonium sulfate		None		25.5 % w/v	PEG 4000
						15 % v/v	Glycerol
D10	0.2 M	Calcium acetate hydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	40 % v/v	PEG 300
D11	0.14 M	Calcium chloride dihydrate	0.07 M	Sodium acetate	4.6	14 % v/v	2-Propanol
						30 % v/v	Glycerol
D12	0.04 M	Potassium phosphate monobasic		None		16 % w/v	PEG 8000
						20 % v/v	Glycerol

Well #	Conc.	Salt	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
E1	1.0 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		None
E2	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		None
	0.2 M	Sodium chloride					
E3	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.5	10 % v/v	2-Propanol
E4	1.26 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Tris	8.5		None
	0.2 M	Lithium sulfate					
E5		None	0.1 M	CAPS	10.5	40 % v/v	MPD
E6	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Imidazole	8.0	20 % w/v	PEG 3000
E7	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	10 % v/v	2-Propanol
E8	1.0 M	Ammonium phosphate dibasic	0.1 M	Sodium acetate	4.5		None
E9	1.6 M	Magnesium sulfate heptahydrate	0.1 M	MES	6.5		None
E10		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % w/v	PEG 6000
E11	0.16 M	Calcium acetate hydrate	0.08 M	Sodium cacodylate	6.5	14.4 % w/v	PEG 8000
						20 % v/v	Glycerol
E12		None	0.1 M	Imidazole	8.0	10 % w/v	PEG 8000
F1	0.05 M	Cesium chloride	0.1 M	MES	6.5	30 % v/v	Jeffamine® M-600
F2	3.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Citrate	5.0		None
F3		None	0.1 M	Tris	8.0	20 % v/v	MPD
F4		None	0.1 M	HEPES	7.5	20 % v/v	Jeffamine® M-600
F5	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	50 % v/v	Ethylene glycol
F6		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % v/v	MPD
F7	0.8 M	Succinic acid pH 7.0		None			None
F8	2.1 M	DL-Malic acid pH 7.0		None			None
F9	2.4 M	Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0		None			None
F10	1.1 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	0.1 M	HEPES	7.0	0.5 % v/v	Jeffamine® ED-2003
F11	1.0 M	Succinic acid	0.1 M	HEPES	7.0	1 % w/v	PEG 2000 MME
F12		None	0.1 M	HEPES	7.0	30 % v/v	Jeffamine® M-600
G1		None	0.1 M	HEPES	7.0	30 % v/v	Jeffamine® ED-2003
G2	0.02 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.5	22 % w/v	Poly(acrylic acid sodium salt) S100
G3	0.01 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	Polyvinylpyrrolidone
G4	0.2 M	TMAO	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 2000 MME
G5	0.005 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.5	12 % w/v	PEG 3350
	0.005 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)					
	0.005 M	Magnesium chloride hexahydrate					
	0.005 M	Nickel(II) chloride hexahydrate					
G6	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
G7	0.1 M	Succinic acid		None		15 % w/v	PEG 3350
G8	0.15 M	DL-Malic acid		None		20 % w/v	PEG 3350
G9	0.1 M	Potassium thiocyanate		None		30 % w/v	PEG 2000 MME
G10	0.15 M	Potassium bromide		None		30 % w/v	PEG 2000 MME
G11	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
G12	3.0 M	Sodium chloride	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
H1	0.3 M	Magnesium formate dihydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
H2	1.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	1 % w/v	PEG 3350
H3		None	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H4	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	45 % v/v	MPD
H5	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	45 % v/v	MPD
H6	0.1 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	17 % w/v	PEG 10,000
H7	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H8	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H9	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H10	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H11	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
H12	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	HEPES	7.5	45 % v/v	MPD