

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Řešení struktur serpinů IRS-1 a IRS-4 z *Ixodes ricinus*

Diplomová práce

Bc. Rudolf Binder

Školitel: Mgr. Barbora Kašáková, Ph.D.

Konzultant: prof. Mgr. Ivana Kutá-Smatanová, Ph.D.

České Budějovice 2021

Binder, R., 2023: Řešení struktur serpinů IRS-1 a IRS-4 z *Ixodes ricinus*. [The solution of structures of serpins IRS-1 and IRS-4 from *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 62 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The master thesis deals with determination of structures of serpins Iripin-1 (formerly IRS-1) and Iripin-4 (formerly IRS-4). The theoretical part gives information about *Ixodes ricinus* and serpins. About serpins, their special mechanism of inhibition of proteases and their role in tick biology and feeding are also discussed. In the second half, the principle of protein structure determination is explained.

The experimental part shows results of diffraction data processing and also refinement and validation of both structures. The results provide numerous parameters, tables and images of structures. Lastly, both structures are compared to each other.

Prohlášení

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

.....

Místo a datum

.....

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Barboře Kaščákové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, za cenné připomínky a za pomoc. Také bych chtěl poděkovat konzultantce prof. Mgr. Ivana Kutá-Smatanová, Ph.D. za přátelský přístup a rady jak při diplomové práci, tak i v celém studiu.

Děkuji mé rodině za podporu. A hlavně mé snoubence za pomoc, podporu a pochopení.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíle práce.....	3
3. Teoretická část	4
3.1. <i>Ixodes Ricinus</i>	4
3.2. Serpiny	5
3.2.1. Konformace serpinů.....	6
3.2.2. Mechanismus inhibice proteáz	10
3.2.3. Funkce serpinů	13
3.3. Rentgenová krystalografie proteinů.....	14
3.3.1. Rentgenová difrakce a zpracování dat	14
3.3.2. Fázování	18
3.3.3. Molekulární nahrazení („Molecular replacement,“ MR)	18
3.3.4. Konstrukce modelu	20
3.3.5. Rafinace modelu („refinement“).....	21
3.3.6. Validace („validation“) a zobrazení modelu.....	21
4. Materiál a metody.....	23
4.1. Molekulární nahrazení	23
4.2. Rafinace pomocí programu <i>REFMAC5</i>	23
4.3. Manuální rafinace v programu <i>Coot</i>	23
4.4. Validace.....	24
4.5. Modelování ligandů (iontů).....	25
4.6. Zobrazování a úprava struktur – program <i>PyMOL</i>	25
5. Výsledky	26
5.1. Iripin-1	26
5.2. Iripin-4	31
5.3. Porovnání struktur Iripinu-1 A Iripinu-4	38
6. Diskuse.....	41
7. Závěr	47
8. Seznam použité literatury	49
9. Seznam použitých zkratk	59
10. Seznam příloh	61

1. Úvod

Po celé Evropě jsou rozšířeni zástupci čeledi *Ixodidae*, konkrétněji klíště obecné *Ixodes ricinus*. Jedním z jeho možných hostitelů může být také člověk, na kterém samičky sají krev. Dělají to přitom tak, aby obešly hostitelské obranné mechanismy – jako je imunitní systém a srážení krve. Krom toho do hostitele skrze své sliny vpravují množství patogenů, které způsobují nemoci jako lymfskou boreliózu, tulamérii nebo klíšťovou encefalitidu. Přesný proces inhibice obrany hostitele a podpory rozvoje patogenů však není rozluštěný.

Z toho důvodu jsou zkoumány látky přítomné v klíštěcích slinách, které hrají při krmení významnou roli a mají výše zmíněné vlastnosti. Těmito farmakoaktivními molekulami jsou nejrůznější proteiny, např. proteázové inhibitory. Ve slinách *Ixodes ricinus* se vyskytují celkem čtyři druhy proteázových inhibitorů, v diplomové práci jsou však zkoumány pouze serpiny. Ty inhibují serinové proteázy, odkud také získaly svůj název.

Serpiny mají speciální mechanismus inhibice, kdy část jejich struktury, zvaná „reactive center loop“ (RCL) vytvoří s aktivním místem proteázy nekovalentní komplex. Následně se začne RCL, spolu s navázanou proteázou, zasouvat do centrálního β -skládaného listu, čímž vzniká další antiparalelní β -strand. Proteáza je tímto procesem přesunuta na druhou stranu serpinu a její činnost je tím inhibována. Serpin se z této konformace již nemůže vrátit do výchozího stavu, a proto je tento mechanismus přezdíván jako „sebevražedný.“

Pro dokonalé pochopení rolí těchto látek v klíštěcím organismu a objasnění přesného mechanismu inhibice proteáz je nutné určit strukturu serpinů. K dnešnímu dni již bylo takto strukturně validováno několik serpinů ze slin *Ixodes ricinus*, příkladem mohou být Iris, Iripin-2, Iripin-3, Iripin-5 nebo Iripin-8.

K určení struktury proteinů je dnes stále nejpoužívanější metoda rentgenové krystalografie, i když je znatelný pokrok v jiných metodách, jako je cryo-EM, která se stává více oblíbenou. Při rentgenové krystalografii je nutné nejdříve vypěstovat krystal, což bývá ta nejobtížnější část. Je totiž nutné vyladit velké množství podmínek (pH, teplota, ...), aby bylo možné získat krystal v difrakční kvalitě.

Jelikož je krystal pravidelné struktury, je možné na něm provést rentgenovou difrakční analýzu, která je v práci popsána. Jejím výsledkem je difrakční obrazec a pomocí nejrůznějších

softwarů a programů je dnes možné informace z něj postupně převést až na model struktury proteinu. Ten je dále rafinován a validován, aby mohl reprezentovat reálnou strukturu.

Data z rentgenové difrakční analýzy serpinů Iripin-1 (starší název IRS-1) a Iripin-4 (starší název IRS-4) byla poskytnuta školitelkou. Diplomová práce se poté zabývá jejich zpracováním, včetně vyřešení fázového problému. Ten spočívá ve fázích, které není možné získat z difrakce a je nutné je získat pomocí jiných experimentálních metod nebo pomocí molekulárního nahrazení.

Následně jsou v práci struktury upřesněny do takové míry, aby bylo možné je deponovat do proteinové data banky (Protein Data Bank, PDB). Díky vysoké strukturní homologii serpinů je možné předpokládat, že oba modely struktur budou velmi podobné. Proto jsou následně struktury obou serpinů porovnány mezi sebou.

2. Cíle práce

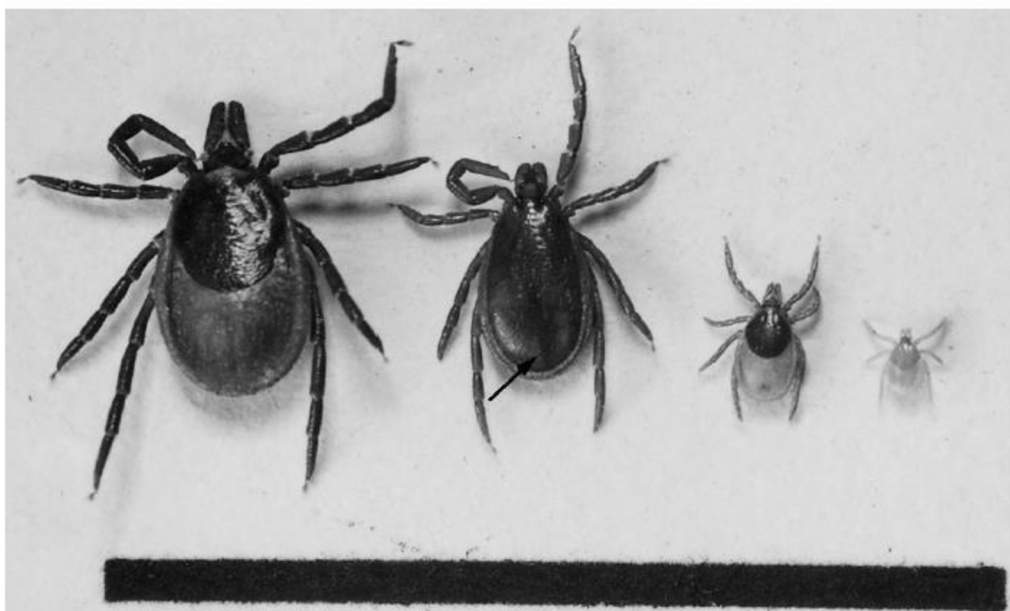
1. Zvládnutí základních a pokročilých krystalografických metod.
2. Zpracování difrakčních dat získaných z krystalů proteinů IRS-1 a IRS-4.
3. Vyřešení fázového problému pro proteiny IRS-1 a IRS-4.
4. Upřesnění struktur studovaných proteinů.
5. Příprava struktur proteinů pro deponování do PDB.
6. Porovnání struktur IRS-1 a IRS-4 s podobnými proteinovými strukturami.
7. Příprava obrázků 3D struktur serpinů.

3. Teoretická část

3.1. *Ixodes Ricinus*

Ixodes ricinus, českým názvem klíště obecné, se řadí do čeledi klíšťatovitých (*Ixodidae*). Jejich velikost a vzhled se liší v závislosti na pohlaví. Samečci jsou zbarveni do hněda s délkou 2,5 mm a šířkou 1,5 mm. U samiček nastávají rozdíly i podle toho, zda nasály krev. Tedy normální rozměry samičky jsou: délka 4 mm a šířka 3 mm (po nasátí až 11 mm a 7 mm) a její zbarvení je také hnědé (po nasátí olovené) (Kavina, 1940). Životní cyklus klíšťat trvá 2–3 roky, ale může trvat až 6 let v závislosti na podmínkách prostředí (Parola a Raoult, 2001). Klíšťata dokážou pomocí senzorických orgánů detekovat světlo, teplotu, vlhkost a dokonce vibrace, čímž mohou rozpoznat přítomnost hostitele (Medlock et al., 2013).

Klíšťata využívají techniku přepadení, při které se na hostitele dostanou z okolní vegetace (Medlock et al., 2013). Když se larvy takto dostanou na hostitele, přichytí se na něj a sají jeho krev. Po několika týdnech se mění na nymfy, které také sají krev, ale tentokrát na jiném hostiteli. Po osmi týdnech se z nymfy stává dospělé klíště, které si hledá nového hostitele. Po odtržení od hostitele samička klade 500–1000 vajíček, ze kterých se po 3 až 5 dnech vylíhnou larvy (Kavina 1940). Dospělí jedinci a nymfy mají čtyři páry nohou, zatímco larvy mají páry pouze tři (Obr. 1) (Parola & Raoult, 2001).



Obrázek 1: Čtyři vývojová stádia nenakrmených klíšťat. Zleva: samička, samec, nymfa a larva (referenční čára 1 cm) (Parola & Raoult, 2001).

Zástupci druhu *Ixodes ricinus* se vyskytují na vlhkých místech a dokážou přežít i teploty pod 0°C. Vyskytují se v Evropě (až po pohoří Ural) (Estrada-Peña, 2001), nejčastěji v opadavých a jehličnatých lesech, na pastvinách, v parcích a na vřesovištích a rašeliništích (Medlock et al., 2013).

Dospělí jedinci *Ixodes ricinus* se živí saním krve ze středních, ale i větších savců, jako jsou hospodářská zvířata (Medlock et al., 2013), přičemž larvy a nymfy se živí i na malých savcích, ptácích a plazech (Parola & Raoult, 2001). V každém vývojovém stádiu se jedinci krmí pouze jednou (Sonenshine, 1991). Přitom mohou přenášet slinami několik patogenů, jako např. *Borrelia burgdorferi* s.l. (způsobuje lymskou boreliózu), *Rickettsia monacensis* (způsobuje skvrnitou horečkou – rickettsiázu), *Francisella tularensis* (způsobuje tulamérii) (Medlock et al., 2013) a virus klíšťové encefalidity („Tick-borne encephalitis virus,“ TBEV), který způsobuje klíšťovou encefalitidu (Sudhindra, 2018). Bakterie se přenáší nejen mezi jednotlivými vývojovými stádii, ale také mezi klíšťecími generacemi (Parola & Raoult, 2001). V letech 2000–2010 se v několika státech Evropy zvýšil výskyt lymské boreliózy (Hubalek, 2009), především díky častějšímu kontaktu klíšťat s lidmi (Medlock et al., 2013).

Při krmení klíšťata vylučují ve slinách do hostitele stovky různých farmakoaktivních molekul (Chmelař et al., 2017). Ty mají za účel překonat obranné mechanismy hostitele včetně imunitní odpovědi (Chmelař et al., 2012). K tomuto účelu mají klíšťecí sliny protizánětlivé, antihemostatické a imunomodulační vlastnosti (Brossard & Wikel, 2004). Navíc se sliny chovají jako „lepidlo,“ díky kterému se klíšťe udrží na hostiteli (Francischetti et al., 2009) a jednotlivé složky slin také usnadňují a podporují proniknutí patogenů do těla hostitele (Pal et al., 2004). Významnou skupinou látek takto ovlivňující hostitelský obranný mechanismus jsou proteázové inhibitory.

V klíšťatech byly pozorovány čtyři druhy proteázových inhibitorů – Kunitz, Kazal Serpiny a inhibitory s doménami bohatými na cystein podobné inhibitoru trypsinu („trypsin inhibitor-like cysteine rich domain inhibitors“, TIL) (Chmelař et al., 2017).

3.2. Serpiny

Název serpin vznikl ze začátků slovního spojení anglických slov „serine protease inhibitors.“ Z hlediska organické chemie jsou serpiny proteiny (Silvermann et al., 2001). Jedná se o skupinu proteázových inhibitorů objevenou v roce 1994 (Potempa et al., 1994). Jedna

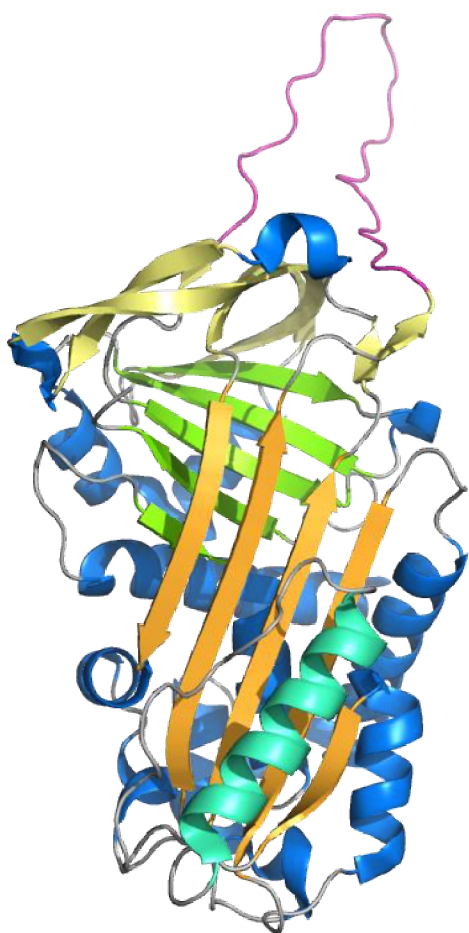
molekula serpinu obsahuje 350–500 aminokyselin (Silvermann et al., 2001) a její molekulární hmotnost je 35–45 kDa (Huntington et al., 2000). První struktura serpinu o vysokém rozlišení (konkrétně 3,1 Å) byla určena v roce 1984 Löbermannem (Löbermann et al., 1984). K dubnu 2023 bylo v Proteinové Data Bance (PDB) uloženo 215 rentgenových krystalických struktur serpinů.

Mají speciální mechanismus inhibice, kdy díky změně své konformace dokážou proteázu inhibovat, a to nejčastěji proteázy ze skupiny chymotrypsinů (Silvermann et al., 2001). Důležitým nástrojem k porozumění jejich funkce a mechanismu inhibice je určení jejich struktury pomocí rentgenové difrakční analýzy (Mahon a McKenna, 2018).

Serpiny jsou jako jediná skupina inhibitorů zastoupeny ve všech živočišných říších (Rawlings et al., 2004). Také mají několik odlišných funkcí, kdy zastávají role jako např. transport hormonů a regulace krevního tlaku (Potempa et al., 1994). Díky svému mechanismu inhibice mohou okolním molekulám signalizovat přítomnost proteáz (Whisstock a Bottomley, 2006). Jejich špatné fungování může mít za následek různé nemoci – cirhózu, hypertenzi anebo demenci (Kim et al., 1995; Davis et al., 1999; Ekeowa et al., 2009; Huntington a Li, 2009; Lomas et al., 2016).

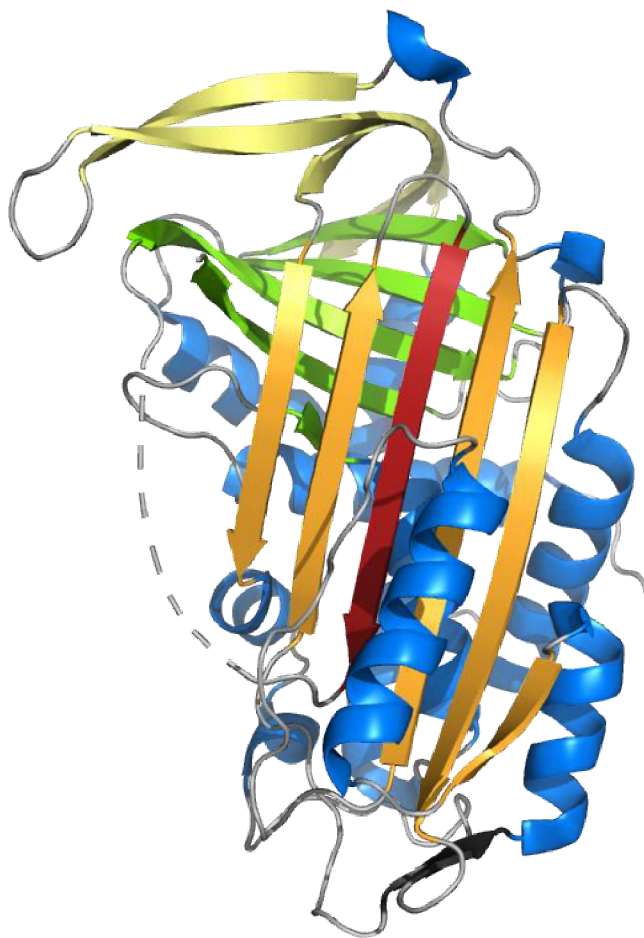
3.2.1. Konformace serpinů

Sekundární struktura serpinů je vždy složena ze tří β -skládaných listů (A, B a C) a ze sedmi až devíti α -helixů (Silvermann et al., 2001). Mezi β -skládaným listem-A a β -skládaným listem-C se nachází tzv. RCL („reactive centre loop“) – jedná se o 20–25 aminokyselin dlouhou smyčku („loop“), ke které se váže proteáza (Whisstock a Bottomley, 2006). Právě tato část struktury má největší vliv na změnu konformace serpinu a tím pádem i na inhibici proteázy (Silvermann et al., 2001). Konformaci s volným RCL se říká nativní (Obr. 2).



Obrázek 2: Nativní konformace serpinu Iripin-8 (PDB ID: 7PMU). Modře jsou vyznačeny α -helixy a dalšími barvami jednotlivé β -skládané listy (β -skládaný list-A oranžově, β -skládaný list-B zeleně a β -skládaný list-C žlutě). Flexibilní část struktury RCL je obarvena růžově. Tyrkysový je α -helix-F, který stericky brání RCL a jeho vsunutí do β -skládaného listu-A. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Další konformací, kterou může serpin zaujmout, je konformace latentní. RCL je vsunutý do β -skládaného listu-A a vzniká tak antiparalelní β -skládaný list. Při tomto pohybu se s RCL přemístí také část β -skládaného listu-C a vzniká tak nechráněný ohyb na spodní straně serpinu (Obr. 3) (Silvermann et al., 2001). V této konformaci se serpin stává inaktivním a již nemůže inhibovat proteázy (Whisstock a Bottomley, 2006). Je ale možný návrat zpět do aktivní nativní konformace procesem denaturace a zpětného složení („refolding“) (Silvermann et al., 2001).

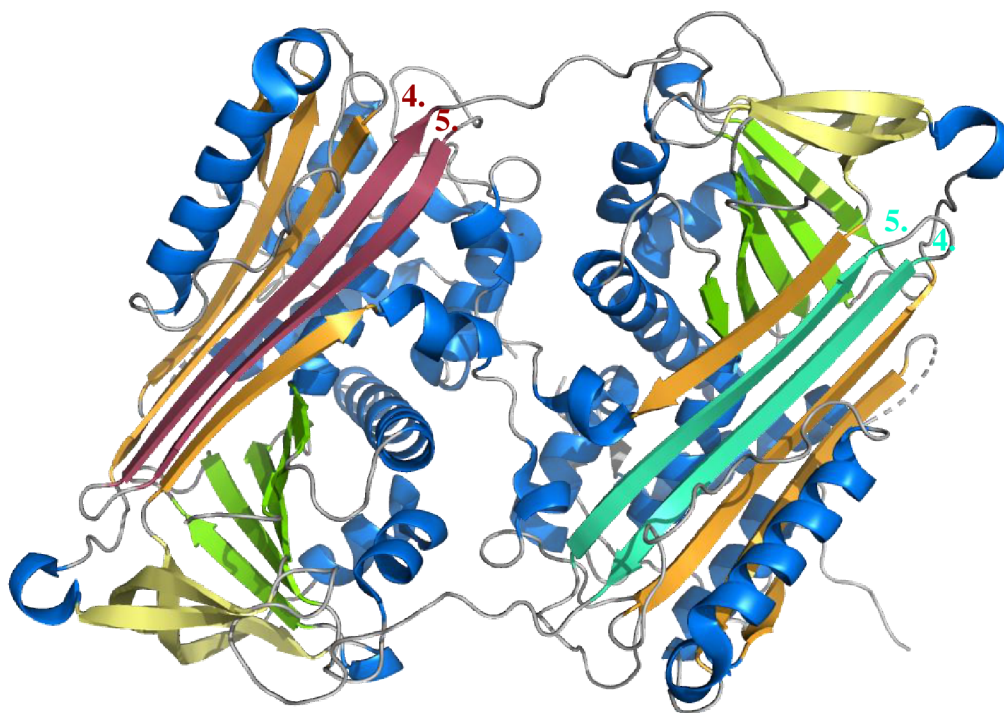


Obrázek 3: Latentní konformace Tengpinu – termofilního serpinu (PDB ID: 2PEF). V modelu jsou α -helixy vyobrazeny modře a odlišné β -skládané listy pak následovně: β -skládaný list-A oranžově, β -skládaný list-B zeleně a β -skládaný list-C žlutě. β -skládaný list-A je antiparalelní a obsahuje šest β -strandů. Je tomu proto, že čtvrtý β -stran zprava (červená barva) je původní RCL, který podstoupil přechod do latentní konformace. Při tomto pohybu se přemístil také jeden β -strand z β -skládaného listu-C. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Některé serpiny samovolně přecházejí z nativní do latentní konformace, jelikož je to pro ně energeticky výhodnější (Whisstock a Bottomley, 2006). To může mít za následek přírodní mutace (Silvermann et al., 2001), které způsobují celou řadu nemocí – tzv. serpinopatie (Lomas a Carrell, 2002). Alespoň 90 přírodních serpinových mutací je spojeno s lidskými nemocemi (Stein a Carrell, 1995). I přes energetickou nevýhodnost však většina serpinů zůstává překvapivě v nativní konformaci, kdy ještě mohou inhibovat proteázy

(Whisstock a Bottomley, 2006). Odpovědí na to mohou být meziproducty, které kineticky brání změně konformace. Konkrétně stav, kdy je část α -helixu-F vložena do β -skládaného listu-A a blokuje tak RCL, který se nemůže přesunout (viz nativní konformace na Obr. 2) (Gooptu et al., 2000).

Předpokládá se, že serpiny dokážou, kromě vsunutí vlastního RCL, do své struktury vložit také RCL cizího serpinu (Whisstock a Bottomley, 2006). Při vyšších teplotách mohou takto vytvářet inaktivní polymery (Obr. 4), ale najdou se i výjimky, které inhibují i za vyšších teplot (např. Thermophin) (Fulton et al., 2004). Vzniklé dimery až oligomery (Silvermann et al., 2001) mohou svým nahromaděním v endoplazmatickém retikulu usmrtit buňku, a taky až poškodit orgány (Fulton et al., 2004). Při změně konformace tedy serpiny „závodí,“ aby stihly dokončit přechod k latentní konformaci a aby nevznikaly polymery – i ty jsou totiž termodynamicky stabilnější (Whisstock a Bottomley, 2006).

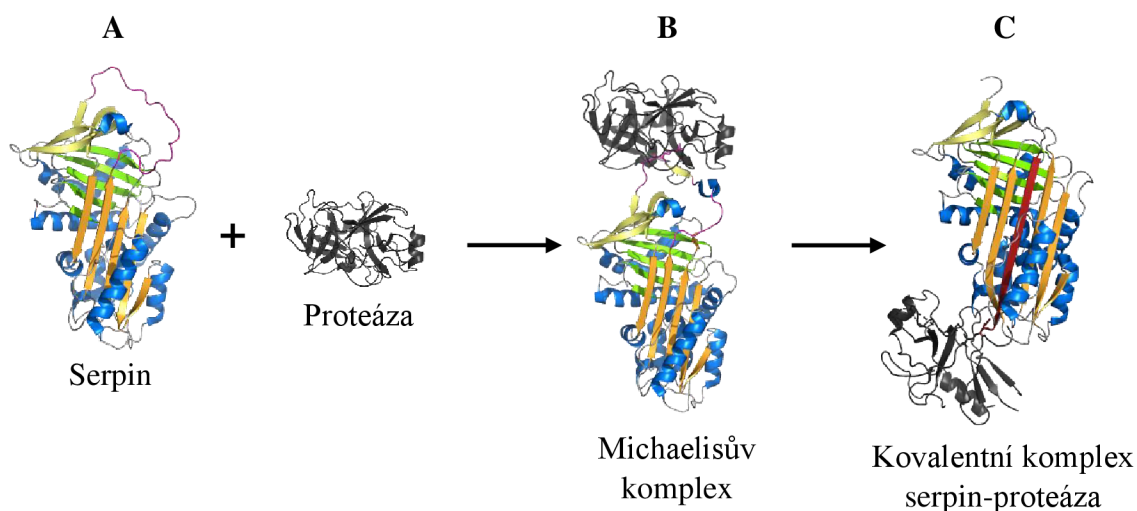


Obrázek 4: Krystalická struktura dimeru serpinu Antithrombin-III (PDB ID: 2ZNH). Barevné schéma modelu je: β -skládaný list-A oranžově, β -skládaný list-B zeleně, β -skládaný list-C žlutě a α -helixy modře. V tomto dímeru jsou vínově vyznačeny β -strandy, které byly do β -skládaného listu-A vsunuty z jiného serpinu. Konkrétně čtvrtý zleva je původní RCL a pátý byl β -strand. Stejným způsobem byly do druhé struktury vloženy tyrkysové β -strandy, z nichž

původním RCL byl čtvrtý zprava. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

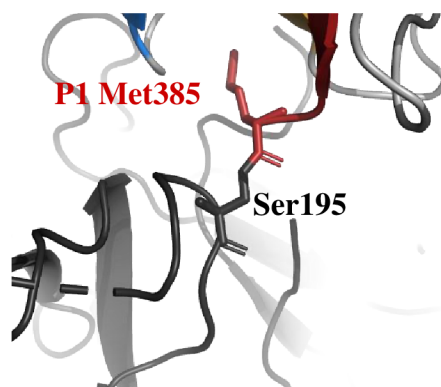
3.2.2. Mechanismus inhibice proteáz

Nejprve se vytvoří, interakcí RCL serpinu, přesněji karbonylu P1 rezidua, a aktivního místa proteázy (které obsahuje serin nebo cystein), nekovalentní Michaelisův komplex (Obr. 5 B). Tento vzniklý komplex je stabilnější než nativní stav. V dalším kroku se vytvoří mezi karbonylem a aktivním místem proteázy kovalentní esterová vazba (Obr. 6) a zároveň dochází k přerušení peptidové vazby v RCL. Následně je zahájen přesun RCL i s navázanou proteázou do β -skládaného listu-A. Jelikož je tento proces na rozdíl od latentní konformace nevratný, říká se mu sebevražedný mechanismus a jeho výsledkem je kovalentní komplex serpin-proteáza (Silvermann et al., 2001) (Obr. 5 C). Celý tento proces úspěšné inhibice je znázorněn na Obr. 5. Dle Silvermana (2001) jsou pro úspěšnou inhibici důležité tyto parametry: vhodná délka a také složení RCL a přítomnost serinu v aktivním místě proteázy (nebo také cysteinu).



Obrázek 5: Úspěšný mechanismus inhibice proteázy serpinem. **A** Serpin (konkrétně α -1-antitrypsin, PDB ID: 1QLP) v nativním stavu a volná proteáza Trypsin (PDB ID: 2BTC). **B** Vytvořený nekovalentní Michaelisův komplex mezi karbonylem P1 rezidua RCL α -1-antitrypsinu a aktivním místem trypsinu (Ser195) (PDB ID: 1OPH). **C** Po úspěšné inhibici je RCL s již kovalentně navázanou proteázou vsunuto do β -skládaného listu-A (červený β -strand). Proteáza je tak deaktivována a vzniká kovalentní komplex mezi α -1-antitrypsinem a trypsinem (PDB ID: 1EZXX). Sekundární struktura serpinu je obarvena tak, že α -helixy mají

modrou barvu, β -skládaný list-A je oranžový, β -skládaný list-B je zelený a β -skládaný list-C žlutý. Volný RCL je růžový a vsunutý RCL do β -skládaného listu-A je červený. Proteáza má černou barvu. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

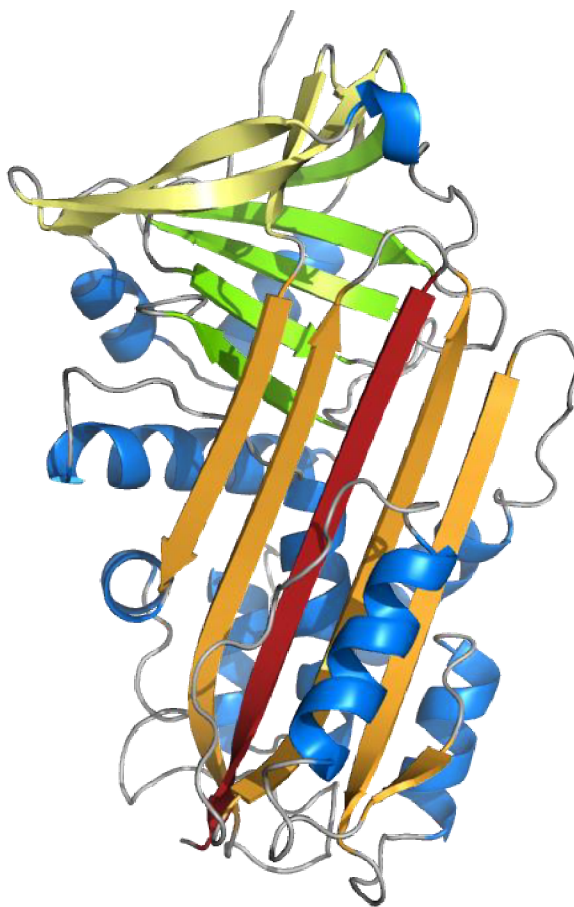


Obrázek 6: Vznik kovalentní vazby mezi α -lantitrypsinem a aktivním místem Ser195 trypsinu. Methionin je P1 reziduem, které reakcí se serinem a vytváří kovalentní esterovou vazbu. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Po dokončení inhibice je proteáza přemístěna o 75 Å, její aktivní místo je deaktivováno (Fulton et al., 2004) a její struktura až z 40 % nevykazuje žádnou elektronovou hustotu ve vyřešených strukturách pomocí rentgenové krystalografie – dochází tedy ke zkreslení proteázy (Silvermann et al., 2001). Tato deaktivace vychází z komprese proteázy vůči serpinu, která je zapříčiněna délkou RCL (Silvermann et al., 2001). Celé to musí pravděpodobně proběhnout rychle, aby se celý komplex vyhnul hydrolyze a následnému uvolnění proteázy (Whisstock a Bottomley, 2006). Proteáza je totiž vazbou v komplexu v „kinetické pasti“, jelikož deacylace je zpomalená o 6–8 řádů. Přesný okamžik vzniku této „kinetické pasti“ však není znám (Silvermann et al., 2001).

Pokud serpin nedokáže proteázu včas přemístit, může proběhnout deacylace a proteáza se uvolní (Silvermann et al., 2001). Mohlo by se tak stát např. pokud by RCL bylo bráněno v pohybu, díky čemuž by proteáza měla dostatek času na uvolnění se z Michaelisova komplexu (Whisstock a Bottomley, 2006). Výsledkem je poté volná aktivní proteáza a inaktivní serpin, který se ale už nemůže vrátit do původní konformace. Po dokončení tohoto děje se serpin nachází v tzv. rozštěpené formě („cleaved form“) (Obr. 7), která je ze všech

konformací nejvíce stabilní (Silvermann et al., 2001). Celému procesu se také říká přechod od S (stressed) k R (relaxed) konformaci (Fulton et al., 2004).



Obrázek 7: Rozštěpená („cleaved“) konformace serpinu Antichymotrypsinu A347R (PDB ID: 3CAA). Ve struktuře jsou α -helixy modré a β -skládaný list-A oranžový, β -skládaný list-B zelený a β -skládaný list-C žlutý. β -strand červené barvy v β -skládaném listu-A je odštipnutý a vložený původní RCL. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

V některých případech může být vyžadována přítomnost kofaktorů pro správnou inhibici proteázy (Fulton et al., 2004). Díky nim je pro serpiny možné buď lépe navázat proteázu, nebo i zrychlit celou jejich vzájemnou interakci (Whisstock a Bottomley, 2006). Kofaktory mohou také zamezit samovolnému vzniku neaktivní latentní konformace (Dunstone a Whisstock, 2011).

3.2.3. Funkce serpinů

Serpiny jsou zastoupeny ve slinách klíštěte – nalezeno jich bylo k roku 2017 36, funkčně validováno skoro 20 (Chmelař et al., 2017). Příkladem jsou např.: Iris, Iripin-2 (Blisnick et al., 2017), Iripin-3, Iripin-5 a Iripin-8. Jejich úkolem je modulovat imunitní systém hostitele (Chmelař et al., 2017) a homeostatickou rovnováhu (Nash et al., 1998). V savcích pak serinové proteázy a serpiny ovlivňují důležité funkce, jako např. proces srážení krve, fibrinolýzu, trávení, oplodnění, zánětlivé procesy a imunitní odpověď (Mulenga et al., 2001). Látky v klíštěcích slinách tedy tyto procesy dokáží ovlivňovat.

Iris, jehož název vznikl ze slov „*Ixodes ricinus immunosuppressor*“ byl identifikován v roce 2002 (Leboulle et al., 2002a). Jedná se o první identifikovaný klíštěcí serpin, který působí na obranný mechanismus hostitele (Leboulle et al., 2002a,b). Ve struktuře svého RCL obsahuje methionin a cystein a postrádá signální peptid, což naznačuje spíše vnitrobuněčnou funkci (Chmelař et al., 2017). Jeho exprese je vyvolána při krmení samiček klíšťat ve slinných žlázách. Iris brání ve fibrinolýze inhibicí aktivátoru tkáňového plasminogenu a elastázy, která je produkována leukocyty (Blisnick et al., 2017). Jedná se také o silně imunosupresivní molekulu (Leboulle et al., 2002a), kdy na místě kousnutí klíštětem díky inhibici elastázových proteáz potlačuje vznik zánětu (Prevot, 2006). I když inhibuje několik serinových proteáz zodpovědných za srážení krve, není považován za silný antikoagulant (Prevot, 2006).

Druhým objeveným serpinem v klíštěti obecném byl Iripin-2 (*Ixodes ricinus serpin-2*) (Chmelař et al., 2017), v jehož P1 reziduu je tryptofan (Kovářová et al., 2010; Chmelař et al., 2011). Ve slinných žlázách klíštěte obecného je nejvíce produkován dva dny po přichycení k hostiteli, což poukazuje na jeho roli v brzkých stádiích sání krve (Blisnick et al., 2017). Vykazuje inhibiční aktivitu vůči chymáze a cathepsinu G z mastocytů – jedná se o dvě proteázy zodpovědné za zánětlivé procesy. V hostiteli zamezuje otékání tkáně a přesunu neutrofilů do zanícené oblasti (Chmelař et al., 2011).

Iripin-3 byl strukturně a funkčně charakterizován roku 2021 (Chlastáková et al., 2021). Jedná se o protein produkováný ve slinných žlázách *Ixodes ricinus* při sání krve u nymf i dospělých jedinců, s účelem v místě přichycení ovlivňovat hostitelovu obrannou reakci. V RCL se nachází P1 reziduum arginin, z čehož je možné vyvodit inhibici trypsinových („trypsin-like“) serinových proteáz (Olsen et al., 2004). Iripin-3 konkrétně silně inhibuje kallikrein a matriptázu, čímž potlačuje zánětlivou odpověď organismu spojenou se svěděním

a bolestí. Tento serpin také inhibuje srážení krve a snižuje produkci prozánětlivého cytokinu interleukinu-6 (Chlastáková et al., 2021).

Další serpin ze slinných žláz *Ixodes ricinus* je Iripin-5, který byl charakterizován roku 2021. Díky jeho mRNA expresi je považován za velmi důležitý serpin využívaný klíštětem k ovlivňování obranných mechanismů hostitele. Ve svém RCL obsahuje arginin, který je potenciálním P1 místem důležitým pro inhibici (Kaščíková et al., 2021). Iripin-5 tak cílí na trypsinové („trypsin-like“) proteázy, hlavně pak na řetězce s argininem a lysinem jako P1 reziduum (Barrett et al., 2004). Inhibuje zánětlivou aktivitu organismu tím, že zhoršuje pohyb neutrofilů a u makrofágů potlačuje produkci oxidu dusnatého (NO) (Kaščíková et al., 2021).

Iripin-8 ovlivňuje hostitelský komplement a kaskádu srážení krve, čímž usnadňuje klíštěcí krmení (Ricklin et al., 2010). Tento serpin obsahuje nezvykle dlouhý RCL s P1 argininem. Díky této délce může Iripin-8 inhibovat mnoho proteáz, jelikož RCL může interagovat s proteázou i na větší vzdálenost (Kotál et al., 2021). Iripin-8 inhibuje kallikrein a trypsin, který ovlivňuje trávení krve a vznik zánětů (Awuoche, 2012; Caljon et al., 2006), a také silně inhibuje plasmin (Kotál et al., 2021). Plasmin je proteáza, která má vliv na degradaci fibrinu a odstraňování sraženin (Caljon et al., 2010). V těle klíštěte funguje Iripin-8 jako antikoagulant, který zabraňuje srážení trávené krve ve středním střevě (Kotál et al., 2021).

3.3. Rentgenová krystalografie proteinů

3.3.1. Rentgenová difrakce a zpracování dat

Celý proces určování struktury proteinů se skládá z několika kroků, které jsou stejné pro všechny biomolekuly: 1. vypěstovat kvalitní krystaly, 2. získat a zpracovat data z rentgenové difrakce, 3. určit fáze a mapy elektronové hustoty a 4. zrefinovat a validovat vytvořený 3D model (Mahon a McKenna, 2018). První krystalizace byla publikována roku 1898 – jednalo se o ovalbumin z vaječných bílků (Hopkins a Pinkus, 1898). První struktura serpinu byla však určena až 100 let poté (Engh et al., 1989).

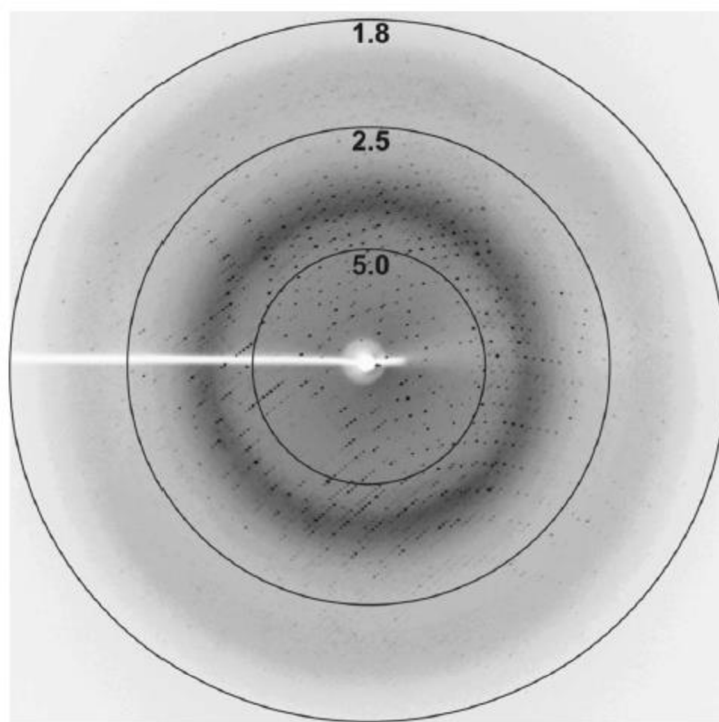
Po vykrystalizování proteinu je nejprve třeba krystaly z krystalizačního roztoku izolovat. Nejčastěji je krystal fyzicky vyjmutý pomocí nylonových smyček anebo je krystal pomocí pipety přemístěn do křemenných kapilár. Pro přepravu jsou následně zamrazeny tekutým dusíkem (na 100 K) (Mahon a McKenna, 2018). Kromě přepravy je výhodné za této

teploty i měřit difrakční data, jelikož se minimalizuje poškození krystalu rentgenovými paprsky (Sliz et al., 2003).

Krystaly na vzduchu dehydrují – poškozují se a degradují. Proto je potřeba s nimi manipulovat velmi rychle. Je také možné pod mikroskopem přidat 1–2 μl ochranného roztoku („cryoprotection“) ke krystalu (Mahon a McKenna, 2018). Poté může být krystal změřen na zdroji rentgenové difrakce.

Zdroj rentgenové difrakce produkuje monochromatické rentgenové záření (0,8 – 1,6 Å), které je možné namířit na krystal a získat tak difrakční obrazec (Obr. 8) skrze detektor. Také je používán goniometr, aby krystal rotoval kolem ortogonální osy ve směru k paprsku (rotační metoda). Tím je zajištěno několik různých orientací krystalu a získán dostatek dat k určení struktury. Data jsou z jednoho krystalu získávána tak dlouho, dokud není zajištěn dostatek difrakčních obrazců, nebo dokud není krystal příliš poškozený na získání dalších dat (Mahon a McKenna, 2018).

Děj difrakce probíhá při interakci rentgenových paprsků s elektrony v pravidelně uspořádaných atomech krystalu. Podle Braggova zákona buď nastane konstruktivní interference (zesílení intenzity) nebo destruktivní interference (zeslabení intenzity) (Mahon a McKenna, 2018). Druh interference závisí na tom, zda jsou vlny ve fázi (konstruktivní) nebo v protifázi (destruktivní), kde se vyruší. Vyrušení má za následek vznik černých difrakcí na difrakčním obrazci. Po získání difrakčních obrazců je možné je analyzovat a také určit parametry krystalové „unit cell“ (elementární buňky) a prostorovou grupu („space group“) (Mahon a McKenna, 2018).



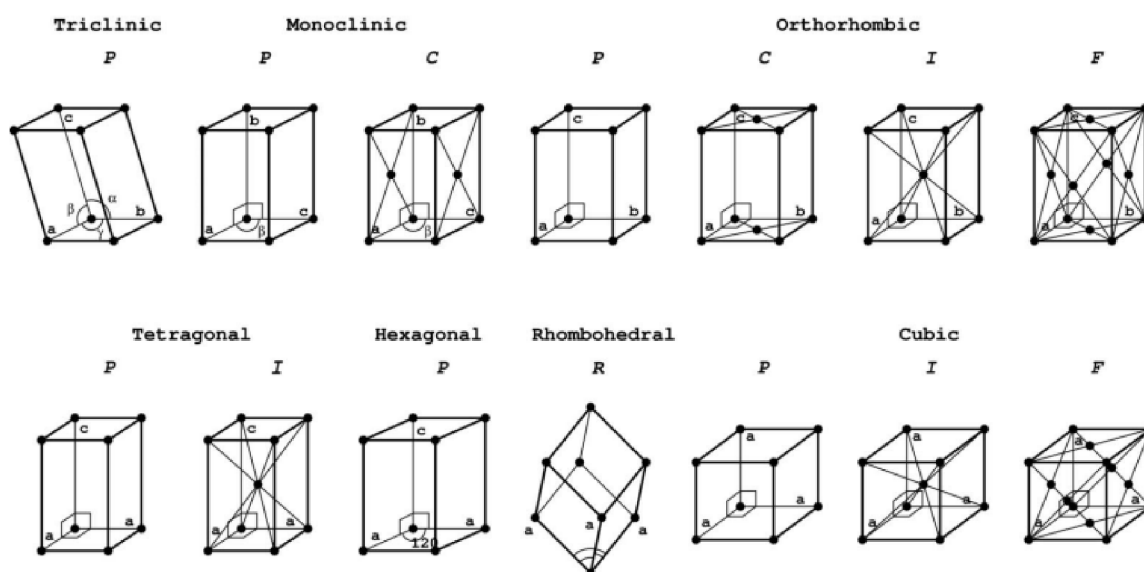
Obrázek 8: Difrakční obrazec: jeden z 3600 obrazců zaznamenaných detektorem jako výsledek rentgenové difrakční analýzy krystalu Iripinu-2 (čísla reprezentují rozlišení v Å) (Kovářová et al., 2010).

Po získání těchto dat je za pomoci Fourierových transformací vytvořena mapa elektronové hustoty (1), která reprezentuje strukturní složení krystalu. Její kvalita může být ovlivněna např. poměrem signál-šum a limitovaným rozlišením dat. Mapa je takový ohraničený prostor, do kterého se musí vejít struktura 3D modelu (Mahon a McKenna, 2018).

Ke zpracování difrakčních dat se využívají různé programy, které se liší metodami indexování (rychlá Fourierova transformace nebo shlukování diferenčních vektorů – „difference vector clustering“), integrace (dvou- a trojrozměrná úprava profilu – „profile fitting“) a také úrovní automatizace (Krug et al., 2012). Příklady jsou *MOSFLM* (Leslie, 2006), *HKL-200* (Otwinowski & Minor, 1997) a *XDS* (Kabsch, 1993).

Program *XDS* (Kabsch, 1993) funguje v prostředí Linux, a kromě automatizovaného zpracování dat také generuje grafické tabulky různých statistik. Ve statistikách je zahrnut např. R faktor každého snímku – ten může sloužit k identifikaci těch snímků z data setu, které mají velmi nízkou kvalitu (Krug et al., 2012).

Program *XDS* (Kabsch, 1993) byl vyvinut pro zpracování dat jednoho krystalu z monochromatické difrakce při rotační metodě (Kabsch, 1993). Dokáže přiřadit a určit nejpravděpodobnější prostorovou grupu (Obr. 9), vygenerovat statistiky a také provést testy pro možné problémy jako je například pseudosymetrie (Krug et al., 2012). Struktura s prostorovou grupou H je pseudosymetrická vzhledem k supergrupě G , pokud lze pozice r_j atomů j popsat jako $r_j = r_j^0 + u_j$, kde u_j jsou malá posunutí a virtuální pozice atomů r_j^0 mají větší symetrii popsanou supergrupou G . Čím je rozdíl vzdáleností původních a virtuálních atomů menší, tím větší je pseudosymetrie (Friese & Grzechnik, 2014).



Obrázek 9: Typy prostorových grup: zobrazení všech 14 jedinečných tvarů unit cell známé jako Bravaisovy mřížky („Bravais lattices“). Parametry a , b a c označují délky hran a písmena α , β a γ úhly mezi nimi. Nejjednodušší primitivní (P) případ obsahuje uzly („nodes“) pouze ve vrcholech unit cell. I -typ obsahuje uzel navíc uprostřed, C -typ zase dva uzly na středech protějších stěn. F -typ obsahuje uzel uprostřed každé stěny a ve vrcholech (Dauter & Jaskolski, 2010).

V knihovně programů *CCP4* (Winn et al., 2011) lze najít programy, které se využívají pro zlepšení zpracovaných dat před jejich dalším zpracováním (před molekulárním nahrazením a rafinací). Program *POINTLESS* (Evans, 2006) například identifikuje Laueovu grupu krystalu z nesloučeného souboru dat (Evans, 2006). Program to dělá na základě analýzy

systematických absencí. Druhotně také testuje volbu indexování a soubor přeindexuje, pokud je to třeba. Po zvolení prostorové grupy program *SCALA* (Evans, 2006) rafinuje parametry škálovací funkce („scaling function“) pro nesloučený soubor dat (Evans, 2006). Aplikuje stupně každého pozorování reflexe, sloučí všechna tato pozorování a tím vzniká průměrná intenzita. Také poskytuje vylepšený odhad nejistoty z každé intenzity (Winn et al., 2011).

3.3.2. Fázování

Nevýhodou rentgenové difrakce je to, že poskytuje málo informací o fázových úhlech (α v (1)) (informace o vlnové délce a amplitudách, díky rozdílnému zaznamenání pozic jednotlivých difrakčních rovin). Tomuto nedostatku se říká fázový problém (Taylor, 2003). Tyto fáze jsou důležité k vypočítání mapy elektronové hustoty, ale je nutné je získat experimentálně pomocí různých metod (Mahon a McKenna, 2018).

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)] \quad (1)$$

V rovnici (1) mapy elektronové hustoty $\rho(xyz)$ jsou souřadnice charakterizovány parametry x , y , z a indexy odrazu h , k , l . V je objem unit cell, F je amplituda reflexe a α je fáze reflexe.

Takovými experimentálními metodami pro určení fází je např. několikanásobné isomorfnní těžko-atomové nahrazení (multiple isomorphous heavy-atom replacement, MIR) (Kendrew et al., 1960). Dále to také může být fázování skrz jedno/mnoho délkové anomální disperze (SAD a MAD) (Cowtan, 2003). Nejčastěji je však využíváno molekulární nahrazení („molecular replacement,“ neboli MR), které je možné provést bez dalších potřebných měření (Rossmann, 1990).

3.3.3. Molekulární nahrazení („Molecular replacement,“ MR)

MR využívá fáze známých homologních (někdy identických) struktur k extrapolaci fází neznámé molekuly (Rossmann, 1990). Pro proteiny tato metoda funguje, pokud už byly určeny souřadnice struktur, které jsou homologní (kopírují strukturu neznámého proteinu,

např. serpinu) anebo pokud byly krystalizovány ve stejné prostorové grupě („space group“) (Mahon a McKenna, 2018).

I když serpiny sdílejí jen 30 % sekvenční homologie (záleží na isomorfismu a na organismu, ze kterého jsou získány) (Mahon a McKenna, 2018), sdílejí vysoce zakonzervovanou sekundární strukturu, která je důležitá pro jejich fungování jako serinové proteázové inhibitory. Díky této vysoké strukturní homologii lze na základě objevu vlastnosti jednoho zástupce zobecnit tuto vlastnost na celou skupinu serpinů (Huntington, 2011). Existuje software, který umožňuje alignment („zarovnání“) sekvencí – pomocí toho je možné najít homologní proteiny se známou strukturou. Takovým softwarem je např. *BLAST* (Altschul et al., 1990).

Při využití MR je třeba najít orientaci a pozici modelu proteinu v unit cell neznámé struktury – k tomu jsou využita rotační (hledání orientace) a translační (hledání umístění v modelu) funkce, které je možné opakovat (Mahon a McKenna, 2018). Škálování strukturních faktorů je založeno na škálování odpovídajících Pattersonových původních vrcholů („origin peaks“) (Rogers, 1965). Velmi využívaný je program *MOLREP* (Vagin a Teplyakov, 1997), který je součástí sady z nabídky programů *CCP4* (Winn et al., 2011).

MOLREP (Vagin a Teplyakov, 1997) je automatický program, který sám vybírá parametry a řešení, přičemž následně vytvoří model, který je zasazen do unit cell. Výpočet rotační a translační funkce může být proveden samostatně i v jiných programech. Pro každou orientaci a pozici modelu jsou rychlou Fourierovou transformací elektronové hustoty vypočítány strukturní faktory. Dnes jeden cyklus MR pro středně velký protein (20 kDA) při rozlišení 3 Å zabere méně než 10 minut. Výhodou této metody je její využití i při nízkém rozlišení (Vagin a Teplyakov, 1997).

Pro molekulární nahrazení využívá *CCP4* (Winn et al., 2011) také: *MrBUMP* (Keegan a Winn, 2007) a *BALBES* (Long et al., 2008) – ten je založený na programu *MOLREP* (Vagin a Teplyakov, 1997). Oba programy pracují se zpracovanými daty a cílovou sekvencí proteinu – výsledkem je řešení složené z umístěných a částečně rafinovaných modelů. *BALBES* (Long et al. 2008) k tomu využívá vlastní databázi a také proteinové struktury z Proteinové data banky (PDB), přičemž *MrBUMP* (Keegan a Winn, 2007) využívá veřejné databáze (Winn et al., 2011), jako např. SCOP databázi (Murniz et al., 1995; Lo Conte et al., 2002).

3.3.4. Konstrukce modelu

Do výsledné mapy elektronové hustoty mohou být namodelovány atomy, a tak i zkonstruován celý 3D model struktury proteinu. Poté je třeba podívat se individuálně na každou aminokyselinu a umístit je i s postranními řetězci správně do mapy. Je také možné přidávat ligandy a molekuly vody, které se mohou ve struktuře vyskytovat (Mahon a McKenna, 2018). Při této práci musí být v pořádku geometrie mezi atomy (délka a úhel vazby, chiralita, φ/ψ úhly) a Ramachandranova statistika (Rhodes, 2006). Pro celý tento proces bývá využíván program *Coot* (Emsley et al., 2010), který je také součástí knihovny *CCP4* (Winn et al. 2011).

Coot (Emsley et al., 2010) je grafická aplikace pro tvorbu modelu a validaci biologických makromolekul. Zobrazuje mapy elektronové hustoty a atomové modely, se kterými je možné manipulovat pomocí různých nástrojů: refinement („rafinace“), rotace a translace, rigid-body fitting (vestavení tuhého tělesa), hledání ligandů, mutace, rotamery a Ramachandranova idealizace. Program si klade za cíl být co nejjednodušší pro vědce, kteří začínají pracovat s daty z difrakční rentgenové analýzy (Emsley et al., 2010).

Program sestává z velkého množství softwarových knihoven a také své vlastní, což mu umožňuje obsahovat mnoho nástrojů pro modelování i zobrazování struktur. Tyto knihovny poskytují grafické uživatelské rozhraní (OpenGL, X Window System a GTK+), matematické nástroje (GNU Scientific Library) a krystalografické nástroje spolu s typy dat (Clipper (Cowtan, 2003)) a Molecular Modeling Database *MMDB* (Krissinel et al, 2004) (Emsley et al., 2010).

Coot (Emsley et al., 2010) poskytuje tři různé typy nástrojů pro zobrazování trojrozměrných dat. Atomové modely (zobrazované jako vektory spojující atomy ve vazbě), mapy elektronové hustoty a obecné grafické objekty (nekrystalografické rotační osy). Uživatel může pomocí různých nástrojů toto grafické rozhraní ovlivňovat – otáčet a přemisťovat pohled a určovat, která data se zobrazí a v jakém módu (Emsley et al., 2010).

Hlavní představové a rafinační nástroje jsou všechny na jednom místě pod setem „Model/Fit/Refine“. Základem je přístup pro zdokonalení v reálném prostoru („real-space refinement engine“), který zařizuje rafinaci modelu vůči mapě elektronové hustoty a reguluje ho vzhledem ke geometrickým podmínkám (Emsley et al., 2010).

3.3.5. Rafinace modelu („refinement“)

Mapa elektronové hustoty musí být rafinována, aby mohla reprezentovat konečný model (Messerschmidt, 2007). Musí projít procesem modifikace elektronové hustoty, kdy je původní mapa na základě upravené mapy přepočítána tak, aby nevznikly žádné chyby (Podjarny et al., 1996).

Rafinace je prováděná pro optimalizování hodnot parametrů modelu a je pro ni využíván program *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997), který je součástí softwarového nástroje *CCP4* (Winn et al. 2011). *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) upřesňuje souřadnice atomů, parametry atomárního izotropního a anizotropního posunu (Murshudov et al., 1997), aj. Největší zájem bývá o části krystalu, které neobsahují protein – navázané ligandy, kofaktory a kovy. Ty *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) určuje pomocí seznamu možných ligandů (Vagin et al., 2004).

3.3.6. Validace („validation“) a zobrazení modelu

Nakonec je nutné validovat strukturu a geometrii proteinu a případných ligandů nacházejících se v krystalu. Při validaci je třeba kontrolovat a opravit nevhodné interakce atomů (vodíkové můstky) a zajistit správnost namodelovaných ligandů v molekule (Mahon a McKenna, 2018). K tomu je možné použít webový program *MolProbity* (Chen).

MolProbity (Chen et al., 2010) je využíván k validaci struktury proteinu a nukleových kyselin (dostupný na adrese <http://molprobity.biochem.duke.edu>). Pomocí optimalizovaného umístění vodíků a analýzy kontaktů mezi všemi atomy dokáže objevit některé chyby vzniklé při úpravě struktury proteinu. Těmi mohou být např. Ramachandranovy odlehle hodnoty (Ramachandran outliers) a otočené postranní řetězce. Výsledky validace jsou prezentovány v tabulkách, grafech a jsou přístupné taky ve formě upravených souborů ke stažení (Chen et al., 2010).

Nejprve je do webového rozhraní nahrán soubor se souřadnicemi ve formátu PDB (Chen et al., 2010). Program následně přidá a optimalizuje pomocí softwaru *REDUCE* (Word et al., 1999) vodíkové atomy do modelu, pokud nejsou přítomné (Chen et al., 2010). Navíc provede automaticky opravu 180° otočení aminokyselin asparaginu, glutaminu a histidinu (Word et al., 1999). K tomuto otočení dochází, protože elektronová hustota nestačí na určení

správné orientace těchto aminokyselin. Stejný software *REDUCE* (Word et al., 1999) tato otočení dokáže opravit tím, že analyzuje překrytí atomů a vodíkové vazby (Chen et al., 2010).

MolProbity dále nabízí analýzu kontaktů všech atomů navzájem a také analýzu geometrie (Chen et al., 2010). K tomu využívá program *PROBE* (Word et al., 1999), který kolem atomů roluje kouli o průměru 0,5 Å, čímž měří, zda se atomy nepřekrývají. Pokud je zjištěné překrytí větší než 0,4 Å, program označí toto místo jako vážnou srážku atomů a zaznamená ho. Pokud by byl model struktury sestaven správně, takové srážky by se v něm neměly objevit (Chen et al., 2010).

V tabulce výsledků validace je uvedeno „clashscore“ (skóre srážek), které udává poměr počtu vážných srážek na 1000 atomů. Tento ukazatel je poté přepočítán na percentil v daném rozlišení. Také jsou analyzovány Ramachandranovy φ a ψ úhly, rotamery a tzv. C^β deviace (Chen et al., 2010). Pokud se na α uhlíku aminokyseliny vyskytne problém s řetězcem nebo s postranním řetězcem, tak tato skutečnost ovlivní vazebné nebo dihedrální úhly na β uhlíku (Lovell et al., 2003). Program toto zkreslení od ideálního stavu C^β vyhodnotí a pokud je větší než 0,25 Å, tak ho i zaznamená (Chen et al., 2010).

Validace je důležitým nástrojem k diagnóze chyb, které vznikly při utváření (i při ruční rafinaci) modelu struktury proteinu. Pokud je struktura proteinu rafinovaná a validovaná, je možné ji považovat za vyřešenou. Struktury proteinů (a ostatních biomolekul) je možné zobrazit např. pomocí programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC). Jedná se o molekulární grafický systém, který je volně dostupný ke stažení (DeLano, 2002).

PyMOL (Version 2.0 Schrödinger, LLC) umožňuje mnoho běžných zobrazení struktury makromolekul, jako např. „wire bonds“ (drátové vazby), „cylinders“ (válce), „spheres“ (koule), „ball-and-stick“ (koule a tyčinka), „dot surface“ (bodový povrch), „solid surface“ (pevný povrch), „ribbons“ (stuhy), „cartoon ribbons“ (kreslené stuhy) aj. Molekuly mohou být nahrány jako PDB soubory souřadnic, ale i jako jiné formáty (DeLano, 2002). Program dokáže přečíst i soubory map elektronové hustoty z *CCP4* (Winn et al. 2011) a dokáže je aplikovat na určitý úsek struktury a zobrazit (DeLano, 2002). Pomocí metody „ray-tracing“ (sledování paprsků) je možné 3D struktury exportovat do obrázků v publikovatelné kvalitě a formátu PNG (DeLano, 2002).

4. Materiál a metody

4.1. Molekulární nahrazení

Rentgenová difrakce krystalů serpinů Iripin-1 (starší název IRS-1) a Iripin-4 (starší název IRS-4) byla provedena v Německu na zdroji BL14.2, BESSY II. Detektorem byl PILATUS 6M a vlnová délka záření byla 0,9184 Å. Nasbíraná data byla zpracována v programu *XDSAPP* (Sparta et al., 2016). Výstup z tohoto programu byl dále použit jako vstup do programu *POINTLESS* (Evans, 2006). Poté byly spuštěny programy *SCALA* (Evans, 2006) a *BALBES* (Long et al. 2008), který vygeneroval vhodný homologní model pro další využití jako model v programu *MOLREP* (Vagin a Teplyakov, 1997) v základním nastavení parametrů.

4.2. Rafinace pomocí programu *REFMAC5*

Následovala rafinace za pomoci programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997), ve kterém byl zapnut parametr ignorování použití vodíkových atomů, i když byly v souboru („Use hydrogen atoms: ignore even if present in file“). U serpinu Iripin-1 byl navíc vypnutý parametr „Exclude data with freeR label.“ U serpinu Iripin-4 bylo nutné vybrat soubor mapy elektronové hustoty, jelikož program *XDSAPP* (Sparta et al., 2016) poskytl jeden HKL soubor a dvě mapy elektronové hustoty, protože určil různé prostorové grupy při výpočtu. Podle hodnot parametrů z programů *MOLREP* (Vagin a Teplyakov, 1997) a *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) byl vybrán soubor, který byl použit jako vstup do další rafinace a validace.

4.3. Manuální rafinace v programu *Coot*

V programu *Coot* (Emsley et al., 2010) probíhala manuální rafinace a validace modelu. Jako vstupní soubory souřadnic i mapy elektronové hustoty byly použity výsledky z programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997). Byly nastaveny parametry kontroly a rafinace a regularizace („Refine/Regularize Control,“ R/RC), a to: použití „torzního omezení“ (torsion restraints), „Ramachandranovo omezení“ (Ramachandran restraints) „omezení planárních peptidů“ (planar peptide restraints) a určení hodnoty „hmotnostní matice“ (weight matrix) – „hmotnost rafinace“ (refinement weight). Nejprve byla ručně zkontrolována každá aminokyselina, jestli její namodelovaná reprezentace odpovídá také

sekvenci serpinu. Pokud tomu tak nebylo, tak byla aminokyselina pomocí nástroje „Mutate & Autofit“ zmutovaná na správnou. Zde byla nápomocná také validační analýza *Rotamer analysis*, která zobrazuje kromě rotamerových outlierů také chybějící atomy aminokyselin.

Poté byla celá struktura upravována pomocí analýz v tomto pořadí: *Ramachandran plot*, *Geometry analysis* a *Rotamer analysis*. Nejprve byly nalezeny Ramachandranovy outliery a opraveny. Poté byla zkontrolována a napravena geometrie serpinu, a nakonec byly namodelovány správné rotamery. Vše bylo rafinované pomocí rafinačního nástroje *Real Space Refine Zone*, a to buď samostatná aminokyselina, jejich trojice anebo úsek struktury ve sféře (díky tomu se rafinovaly i okolní řetězce a předešlo se srážkám). Pomocí nástroje *Rotamers...* byly vybrány správné rotamery, a nástrojem *Regularize zone* byla vylepšovaná geometrie mezi trojicí atomů. Pomocí analýzy *Density fit analysis* bylo průběžně zjišťováno, jak moc se model nachází v mapě elektronové hustoty.

4.4. Validace

Takto upravený soubor se souřadnicemi byl také nahráván po rafinaci v programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) do internetového programu *MolProbity* (Chen et al., 2010) k validaci. Nejprve byly vypsány převrácené aminokyseliny: asparagin (Asn), glutamin (Gln) a histidin (His), které bylo třeba převrátit do správné polohy v programu *Coot* (Emsley et al., 2010) pomocí nástroje *Sidechain 180° flip*. Následně byla vygenerována tabulka analýzy kontaktů a geometrie všech atomů. Pomocí této analýzy byly opraveny všechny problémy, které validace odhalila. Celý krok validace byl prováděn souběžně s rafinací a také po ní.

Po validaci byl opět spuštěn program *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) a celý proces s ruční rafinací a validací se opakoval, dokud nebyly výsledné parametry dostatečné. U serpinu Iripin-4 bylo nutné určit ručně omezit rozlišení na 2,30 Å kvůli výskytu ice ringů ve struktuře. Když měl model vhodné hodnoty parametrů, byl spuštěn *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997), ale s tím rozdílem, že byly vygenerovány do modelu molekuly vody pomocí *Run Coot:findwaters to automatically add/remove waters to refined structure*.

Pro takovou strukturu byly při rafinaci v programu *Coot* (Emsley et al., 2010) kontrolovány i nově přidané molekuly vody pomocí nástroje *Check/delete waters* s parametry: B faktor větší než 60.00 Å² („B factor greater than 60 Å²“), ignorace „částečných obsazení blízkých kontaktů“ (partial occupancy close contacts) a ignorace „molekul vody s nulovou

obsazeností“ (waters with zero occupancy). Ostatní parametry zůstaly výchozí). Vyhledané molekuly vody byly ručně zkontrolovány a popřípadě zrafinované nebo vymazané.

4.5. Modelování ligandů (iontů)

Pomocí nástroje *Unmodelled blobs* byla vyhledána místa v mapě elektronové hustoty, která byla příliš velká, než aby to byly molekuly vody – jednalo se o ligandy. Pomocí internetového programu *Check my metal* bylo odhadnuto, o jaké kovové ionty se jednalo a ty byly do modelu přidány. Následovala poslední automatická rafinace programem *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) a validace v programu *MolProbity* (Chen et al., 2010)

4.6. Zobrazování a úprava struktur – program *PyMOL*

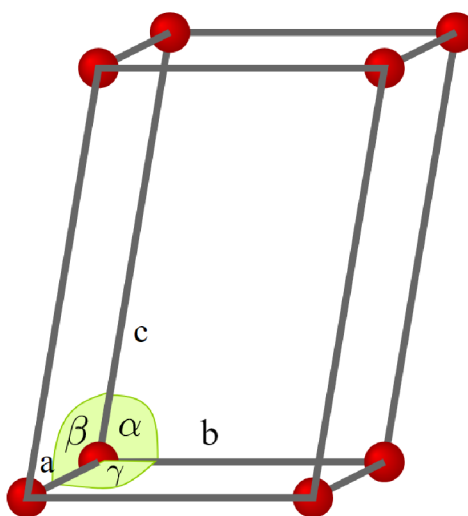
Při vytváření struktury Iripinu-1 nebyl celou dobu vypočítaný R_{free} faktor, proto bylo nutné při rafinacích v programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) ponechat vypnuté nastavení „Exclude data with freeR label.“ Nakonec byl tento faktor do souboru vygenerován pomocí programu *F2mtz (import)* z nabídky knihovny programů *CCP4* (Winn et al. 2011).

V knihovně *CCP4* (Winn et al. 2011) byly následně pomocí programu *FFT* ve výchozím nastavení vytvořeny mapy elektronové hustoty, které je možné zobrazit v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC). Následně byly v tomto programu pořízeny snímky struktur, RCL anebo ligandů. Oba modely struktur Iripinu-1 a Iripinu-4 byly nakonec zarovnány a porovnány mezi sebou.

5. Výsledky

5.1. Iripin-1

Informace o sběru dat jsou uvedeny v tabulce I. Jako prostorová grupa byla určena $P12_11$ (Obr. 10) a v asymetrické jednotce se nacházely dvě molekuly. Program *POINTLESS* (Evans, 2006) potvrdil prostorovou grupu s konfidencí 0,848. Bylo také potvrzeno, že nedochází ke twinningu. Unit cell rozměry potom byly $a = 48,82 \text{ \AA}$, $b = 91,0 \text{ \AA}$, $c = 95,83 \text{ \AA}$ s úhly $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97,53^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.



Obrázek 10: Bravaisova monoklinická jednoduchá mřížka, která odpovídá prostorové grupě $P12_11$ Iripinu-1. V této mřížce jsou uzly umístěny ve vrcholech (P), a pro rozměry unit cell platí $a \neq b \neq c$ a jeden z úhlů α, β, γ není pravý. (Staženo z <https://www.physics-in-a-nutshell.com/article/6/symmetry-crystal-systems-and-bravais-lattices>, dne 12.4.2023.)

Následují výsledky z programu *SCALA* (Evans, 2006). Celkový počet reflexí v souboru byl 331 018, přičemž počet těch jedinečných z nich byl 48 350. Celková úplnost byla stanovena na 92,2 % a na vnější vrstvě („outershell“) při rozlišení 2,10 Å byla dokonce 97,7 %. Rozsah rozlišení byl od 48,40 Å až po maximální rozlišení 2,10 Å . Pearsonův korelační koeficient $CC_{\frac{1}{2}}$ měl celkovou hodnotu 99,8 a na vnější vrstvě při maximálním rozlišení pak hodnotu 66,3. Průměrná mozaikovitost byla 0,19.

Pro potřeby MR byl pomocí *BALBESu* (Long et al. 2008) vygenerován vhodný homologní model – konkrétně krystalická struktura antigenu lidského spinocelulárního

karcinomu 1 (Crystal structure of human squamous cell carcinoma antigen 1) SCCA1 (PDB ID: 2ZV6). Po MR byla určena hodnota kontrastu 10,81. Po několika cyklech programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) a ruční rafinaci v programu *Coot* (Emsley et al., 2010) byly výsledné parametry rafinace: R faktor 0,200, R_{free} faktor 0,249, r.m.s. délky vazeb 0,007 a r.m.s. vazebných úhlů 1,525°. Při rafinaci byl podle mapy elektronové hustoty doplněn kationt Mg^{2+} , jelikož ostatní možné ionty se do modelu nehodily a Mg^{2+} byl přítomný v krystalizačních podmínkách. Další údaje o získaných datech a rafinaci jsou uvedeny v tabulce I. V tabulce II jsou uvedeny výsledné hodnoty validace.

Tabulka I: Data z rentgenové difrakce a statistiky rafinace nativního serpínu Iripin-1.

SBĚR DAT	
Zdroj rentgenové difrakce	BL14.2, BESSY II, Německo
Vlnová délka (Å)	0,9184
Detektor	PILATUS 6M
Vzdálenost krystal-detektor (mm)	346,829
Rozsah otáčení na snímek (°)	0,10
Celkový rozsah otáčení (°)	360,00
Doba expozice na snímek (s)	0,10
Rozsah rozlišení (Å)	50,00-2,10 (2,33-2,10)
Prostorová grupa	P12 ₁ 1 (4)
Molekuly v asymetrické jednotce	2
Unit-cell rozměry: a, b, c (Å)	48,82 91,00 95,83
Unit-cell rozměry: α , β , γ (°)	90,00 97,53 90,00
Mozaikovitost (°)	0,193
Celkový počet reflexí	331018 (52480)
Počet jedinečných reflexí	48350 (7680)
Průměrné I/σ (I)	11,12 (1,62)
Úplnost (%)	99,2 (97,7)
$CC \frac{1}{2}$	99,8 (68,9)
R_{meas} (%) ^a	116,8 (14,3)
Celkový B faktor z Wilsonovy mapy (Å ²)	31,0
RAFINACE	
Rozsah rozlišení (Å)	48,40-2,10
Počet reflexí v pracovní sadě	48 355
Konečná hodnota R^b (%) / Konečná hodnota R_{free}^c (%)	0,200/0,249
Průměrná B hodnota (Å)	44,683
POČET ATOMŮ (NE VODÍKŮ) V ASYMETRICKÉ JEDNOTCE	
Protein	5946
Ligand – kationt Mg^{2+}	1
Voda	596

Celkem	6543
R.M.S. ODCHYLKY	
Vazeb (Å)	0,007
Úhlů (°)	1,525
Průměrné B faktory (Å²) celkem	33,148
RAMACHANDRANOVA MAPA	
Nejpříznivější (%)	96,27 %
Povolené (%)	3,73 %
Molprobity skóre	97. percentil*

Data v závorkách odkazují na nejvyšší rozlišení pláště („shell“)

$${}^a R_{meas} = \frac{\sum_h \left(\frac{n_h}{n_h - 1} \right)^{1/2} \sum_i |I_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i I_{h,i}}, \text{ kde je průměrná intenzita } \langle I_h \rangle \text{ brána přes všechny}$$

měřené ekvivalenty symetrie, a I_{hkl} je měřená intenzita pro danou reflexi.

$${}^b R_{value} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{2\alpha \sum |F_{obs}|}, \text{ kde } F_{obs} \text{ a } F_{calc} \text{ jsou po řadě pozorované a vypočítané}$$

faktory.

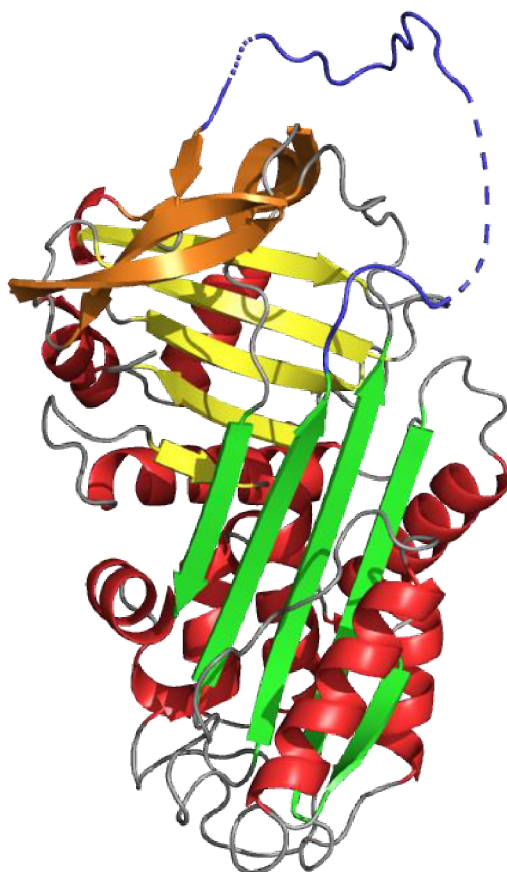
${}^c R_{free}$ je ekvivalentní R hodnotě, ale je vypočítaná pro 1,87 % z náhodně vybraných reflexí a je vynechán proces rafinace

* 100. percentil je nejlepší ze všech porovnávaných struktur podobného rozlišení; 0. percentil je nejhorší.

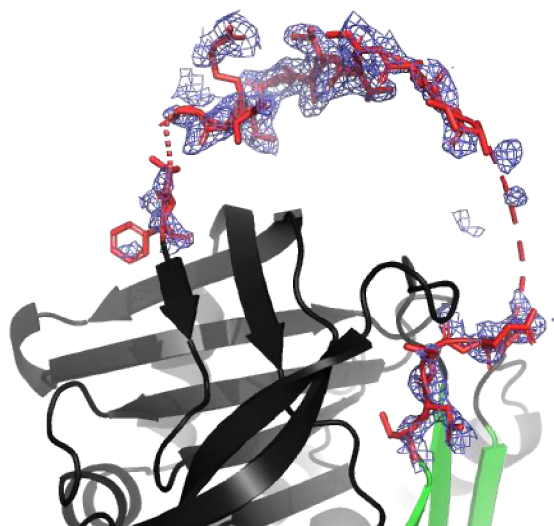
Tabulka II: Výsledky validace programu *MolProbity* (Chen et al., 2010) pro strukturu serpínu Iripin-1.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	5.69	97 th percentile* (N=576, 2.10Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00% Goal: <0.3%
	Favored rotamers		0.00% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	722	96.27% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-0.47 ± 0.28	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	1.56	97 th percentile* (N=11758, 2.10Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	4	0.57% Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 6063	0.00% Goal: 0%
	Bad angles:	5 / 8200	0.06% Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 22	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/914	
	Waters with clashes	22/596	3.69% See UnDowser table for details

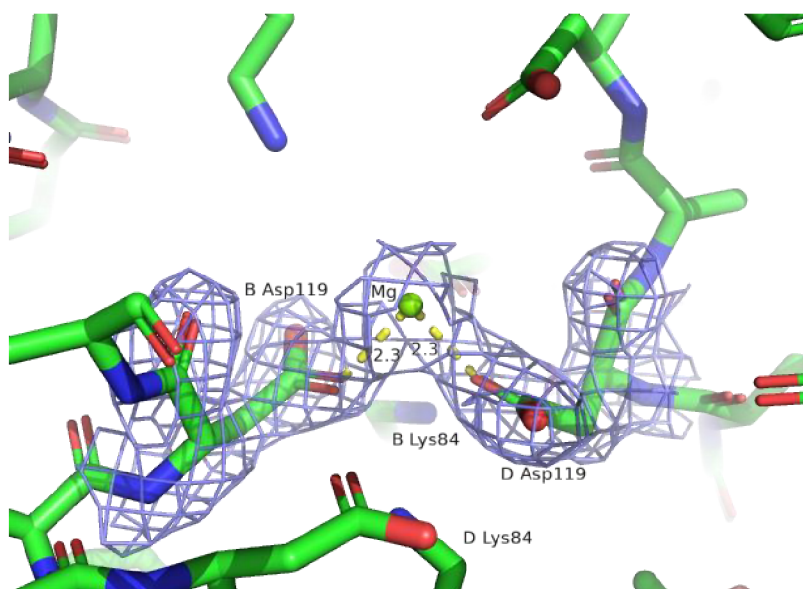
Při validaci bylo výsledné Clashcore v 97. percentilu a MolProbity skóre také v 97. percentilu. Aminokyselin favorizovaných podle Ramachandrana bylo 722 z celkového počtu 754 (96,27 %) a nevyskytovaly se žádné outliers. Cβ deviace větší než 0,25 Å byly 4 (0,57 %), špatných úhlů bylo 5 (0,06 %) a špatné vazby se v modelu nenacházely.



Obrázek 11: Zkonstruovaná struktura serpinu Iripin-1. Červeně jsou vyznačeny α -helixy, β -skládaný list-A je zelený, β -skládaný list-B je žlutý, β -skládaný list-C je oranžový). Modře je označen RCL. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 12: Pohled na RCL rezidua serpinu Iripin-1 s mapou elektronové hustoty. RCL (obarvený červeně) je velmi mobilní část struktury, proto zde mapa elektronové hustoty (modrá barva) není příliš v některých částech vidět. Kvůli tomu byla ze struktury odstraněna následující rezidua: Ser329 – Ala332 (Ser329, Glu330, Ala331, Ala332) a Thr345 – Gln346. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

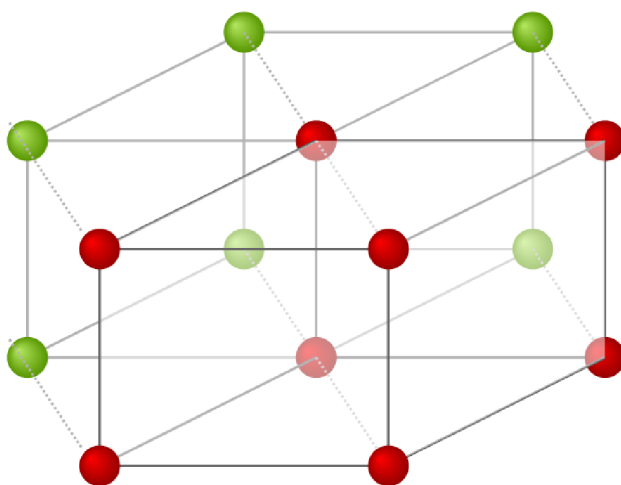


Obrázek 13: Zobrazení kationtu Mg^{2+} mezi dvěma řetězci serpinu Iripin-1, konkrétně B a D, s mapou elektronové hustoty. Kationt se nachází mezi kyselinami asparagovými 119 (Asp119), kdy jedna pochází z řetězce B a druhá z řetězce D. Jsou také pojmenovány aminokyseliny blízko kationtu, konkrétně lysiny (Lys84), opět z řetězců B a D. Byly změřeny

vzdálenosti atomu Mg^{2+} od aminokyselin B Asp119 a D Asp119 v jednotkách Å – atom je od obou vzdálený 2,3 Å. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

5.2. Iripin-4

Souhrnné informace o sběru dat z rentgenové difrakce jsou uvedeny v tabulce III. Prostorová grupa krystalu Iripinu-4 byla $P3_121$ (Obr. 14), což bylo potvrzeno programem *POINTLESS* (Evans, 2006) s konfidencí 0,943. Rozměry unit cell byly následující: $a = 78,93 \text{ Å}$, $b = 78,93 \text{ Å}$, $c = 117,78 \text{ Å}$, s úhly $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$.



Obrázek 14: Bravaisova (trigonální) hexagonální mřížka (červeně), která odpovídá prostorové grupě $P3_121$ Iripinu-4. V této mřížce jsou uzly umístěny ve vrcholech (P), a pro rozměry unit cell platí $a = b \neq c$ a jeden z úhlů α, β, γ má velikost 120° , přičemž ostatní dva jsou pravé. (Staženo z <https://www.physics-in-a-nutshell.com/article/6/symmetry-crystal-systems-and-bravais-lattices>, dne 12.4.2023.)

Další byly výsledky z programu *SCALA* (Evans, 2006), který určil celkový počet reflexí na 289 930, z čehož bylo 19 373 jedinečných. Celková úplnost měla hodnotu 97,7 %, stejně jako úplnost na „outershell“, kde byla také 97,7 %. Rozlišení se pohybovalo v rozsahu 44,61-2,30 Å. Celková hodnota Pearsonova korelačního koeficientu byla 99,90, při maximálním rozlišení na „outershell“ potom 79,70. Průměrná mozaikovitost byla stanovena na 0,25.

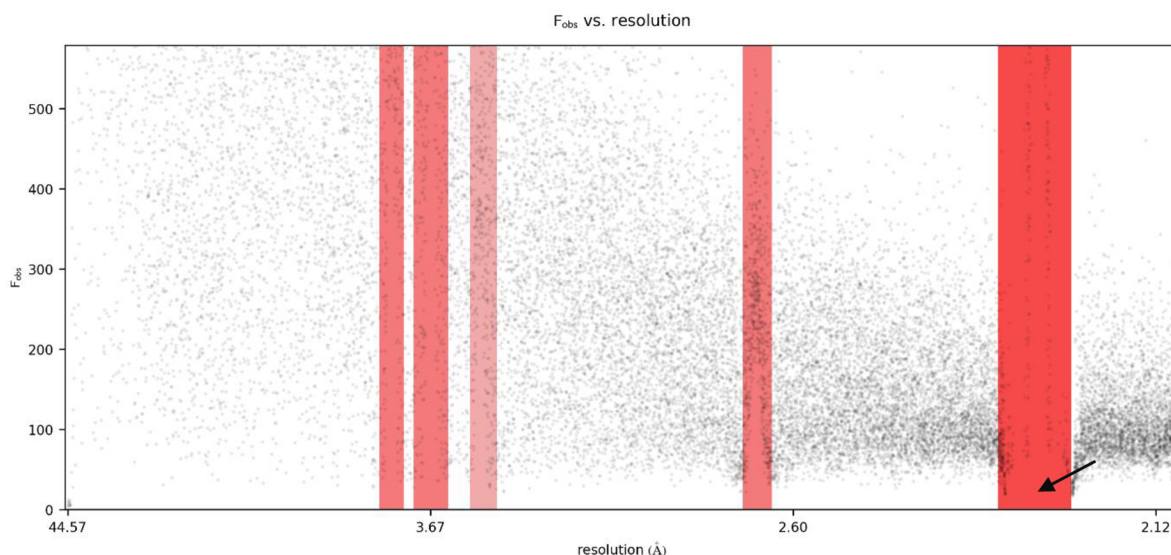
Pomocí programu *BALBES* (Long et al. 2008) byl vybrán jako homologní model serpin Iripin-2 (PDB ID: 3NDA). Následně byl jako vhodná mapa elektronové hustoty vybrán soubor 152-F, který byl jedním z výstupů z programu *XDSAPP* (Sparta et al., 2016). Hodnoty jednotlivých parametrů důležitých pro výběr jsou zaznamenány v tabulce III.

Tabulka III: Hodnoty parametrů pro výběr ideálního souboru pro následné MR.

	Prostorová grupa	Kontrast	R faktor	R _{free} faktor
.HKL	P3 ₂ 21	8,74	0,538	-
152-F.mtz	P3₁21	20,26	0,468	0,509
154-F.mtz	P3 ₂ 21	4,54	0,581	0,587

Při konstruování modelu struktury serpinu Iripin-4 bylo nutné vybrat, který soubor bude vybrán jako výchozí mapa elektronové hustoty. Mezi kandidáty byly výstupy z programu *XDSAPP* (Sparta et al., 2016): jeden HKL soubor a dvě mapy elektronové hustoty s koncovkou .mtz. Pro soubory byla určena Laue prostorová grupa a také porovnán parametr kontrast z molekulárního nahrazení. Ten pro hodnoty větší než 3 znamená, že jsou nalezená správná řešení. Proto byla vybírána největší hodnota tohoto parametru, což bylo 20,26 pro mapu 152-F.mtz. Dále byly sledovány R a R_{free} faktory, které vyjadřují chyby a nepřesnosti v data setu. Zde byly naopak vybírány co nejnižší hodnoty, které opět patřily souboru 152-F.mtz. Tato mapa měla R faktor rovný 0,468 a R_{free} faktor 0,509. Proto bylo dále pracováno s touto mapou elektronové hustoty (vyznačeno tučně).

Před rentgenovou difrakcí jsou vzorky zmrazeny, aby byly co nejlépe uchovány. Někdy však při samotném získávání dat nejsou podmínky pro ablaci ledu, čímž vznikají ledové prstence – tzv. ice ringy. Je proto nezbytné při zpracování vyloučit ty reflexe, které byly ice ringy nejvíce ovlivněné (Chapman & Somasundaram, 2010). Pomocí programu *AUSPEX* (Thorn et al., 2017) byla data zanalyzována a určeno rozlišení 2,25 Å, ve kterém se nacházel ice ring (Obr. 15). Z toho důvodu bylo při rafinaci v programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) omezeno rozlišení na 2,3 Å, díky čemuž byly ice ringy eliminovány.



Obrázek 15: Graf závislosti pozorovaných amplitud strukturního faktoru F_{obs} na rozlišení (v Å). Vytvořeno v programu *AUPEX* (Thorn et al., 2017). Jako body jsou vyobrazeny pozorované amplitudy strukturního faktoru F_{obs} v závislosti na rozlišení. Tyto amplitudy jsou vypočtené z integrací vrcholů rentgenových obrazců. V přítomnosti ice ringů tyto hodnoty velmi silně divergují (Thorn et al., 2017). Černou šipkou je ukázán ice ring, který se nacházel ve vzorku při rozlišení 2,25 Å.

Výslednými parametry z rafinace v programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997) byly R faktor 0,222, R_{free} faktor 0,332, r.m.s. délky vazeb 0,009 a r.m.s. vazebných úhlů $1,621^\circ$. Také byl do modelu přidán ligand – konkrétně kationt Ni^{2+} . Ten byl jedinou možnou volbou a do struktury se nejspíše dostal v průběhu afinitní purifikace. Další údaje spojené s rentgenovou difrakční analýzou a rafinací jsou uvedeny v tabulce IV. Následuje také tabulka V, ve které jsou zaznamenány výsledky validace Iripinu-4.

Tabulka IV: Data z rentgenové difrakce a statistiky rafinace nativního serpinu Iripin-4.

SBĚR DAT	
Zdroj rentgenové difrakce	BL14.2, BESSY II, Německo
Vlnová délka (Å)	0,9184
Detektor	PILATUS 6M
Vzdálenost krystal-detektor	175,66
Rozsah otáčení na snímek (°)	0,10
Celkový rozsah otáčení (°)	270,00
Doba expozice na snímek (s)	0,10

Rozsah rozlišení (Å)	44,61-2,30 (2,44-2,30)
Prostorová grupa	P3 ₁ 21 (152)
Molekuly v asymetrické jednotce	1
Unit-cell rozměry: a, b, c (Å)	78,93 78,93 117,78
Unit-cell rozměry: α, β, γ (°)	90,00 90,00 120,00
Mozaikovitost (°)	0,105
Celkový počet reflexí	289930 (43011)
Počet jedinečných reflexí	19373 (3085)
Multiplicita	14,97
Průměrné I/σ(I)	22,47 (4,30)
Úplnost (%)	99,70 (99,70)
CC $\frac{1}{2}$	99,90 (79,70)
R_{meas} (%)^a	9,60 (62,40)
Celkový B faktor z Wilsonovy mapy (Å²)	39,20
RAFINACE	
Rozsah rozlišení (Å)	44,57-2,30
Počet reflexí v pracovní sadě	18992
Konečná hodnota R^b (%) / Konečná hodnota R_{free}^c (%)	0,222/0,332
Průměrná B hodnota (Å)	31,705
POČET ATOMŮ (NE VODÍKŮ) V ASYMETRICKÉ JEDNOTCE	
Protein	2954
Ligand – kationt Ni²⁺	1
Voda	312
Celkem	3267
R.M.S. ODCHYLKY	
Vazeb (Å)	0,009
Úhlů (°)	1,621
Průměrné B faktory (Å²) celkem	34,225
RAMACHANDRANOVA MAPA	
Nejpříznivější (%)	98,91 %
Povolené (%)	1,08 %
Molprobability skóre	100. percentil*

Data v závorkách odkazují na nejvyšší rozlišení pláště („shell“)

$${}^a R_{meas} = \frac{\sum_h \left(\frac{n_h}{n_h - 1} \right)^{1/2} \sum_i \langle I_h \rangle - I_{h,i}}{\sum_h \sum_i I_{h,i}}, \text{ kde je průměrná intenzita } \langle I_h \rangle \text{ brána přes všechny}$$

měřené ekvivalenty symetrie, a I_{hkl} je měřená intenzita pro danou reflexi.

$${}^b R_{value} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{2a \sum |F_{obs}|}, \text{ kde } F_{obs} \text{ a } F_{calc} \text{ jsou po řadě pozorované a vypočítané}$$

faktory.

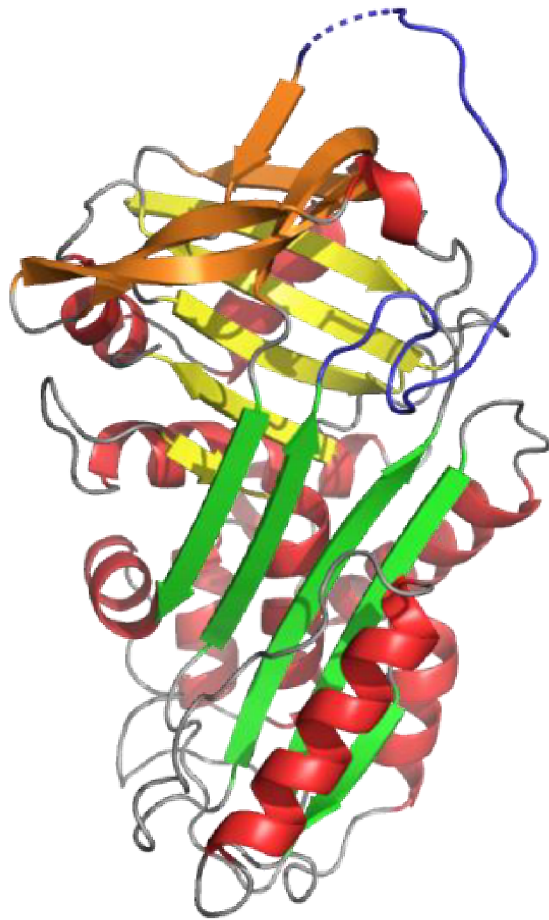
^cR_{free} je ekvivalentní R hodnotě, ale je vypočítaná pro 1,87 % z náhodně vybraných reflexí a je vynechán proces rafinace

* 100. percentil je nejlepší ze všech porovnávaných struktur podobného rozlišení; 0. percentil je nejhorší.

Tabulka V: Výsledky validace programu *MolProbity* (Chen et al., 2010) pro serpin Iripin-4.

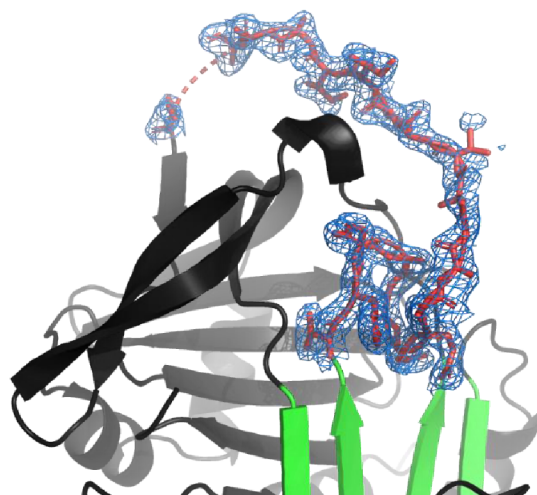
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	6.32		98 th percentile* (N=355, 2.30Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	310	98.41%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	364	98.91%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-1.45 ± 0.38		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	1.35		100 th percentile* (N=8909, 2.30Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	1	0.29%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 2975	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	0 / 4030	0.00%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 11	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/467		
	Waters with clashes	8/298	2.68%	See UnDowser table for details

Výsledky validace v programu *MolProbity* ukázaly Clashscore v 98. percentilu a MolProbity skóre ve 100. percentilu. Všechny ostatní statistiky byly v pořádku – nevyskytovaly se žádné špatné rotamery, Ramachandranovy outliers ani špatné vazby. Ramachandranových favorizovaných aminokyselin bylo 364 (98,91 %), povolené tedy byly 4 (1,08 %). Ve struktuře se nacházela jedna Cβ deviace větší než 0,25 Å.

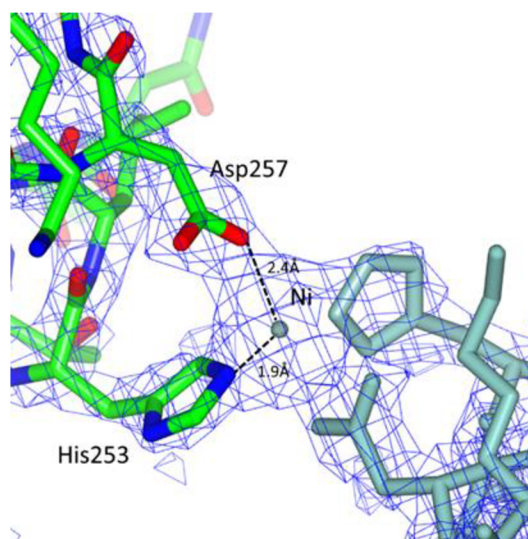


Obrázek 16: Zkonstruovaná struktura serpinu Iripin-4. Červeně jsou vyznačeny α -helixy a β -skládaný list-A je zelený, β -skládaný list-B je žlutý, β -skládaný list-C je oranžový. Modře je označen RCL. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Ve struktuře Iripinu-4 se RCL nenachází volně v prostoru, nýbrž je vidět počátek jeho vsunutí do β -skládaného listu-A. β -strandů tohoto β -skládaného listu jsou také lehce odkloněné, aby RCL mohl vytvořit antiparalelní β -skládaný list. Této konformaci se také říká δ -forma, která je mezistupněm při přechodu do latentní konformace (Gooptu et al., 2000). RCL je v této konformaci částečně vsunutý do horní části β -skládaného listu-A, ale kvůli vazbě RCL k β -sheetu C a α -helixu, který blokuje spodní stranu β -skládaného listu-A, nemůže dojít k plnému vsunutí RCL do tohoto místa. Není jisté, proč k této konformaci dochází. Teoriemi jsou, že se jedná o meziprodukt v přechodu do rozštěpené („cleaved“) konformace anebo k ní dochází při vzniku polymerů (Dunstone a Whisstock, 2011).



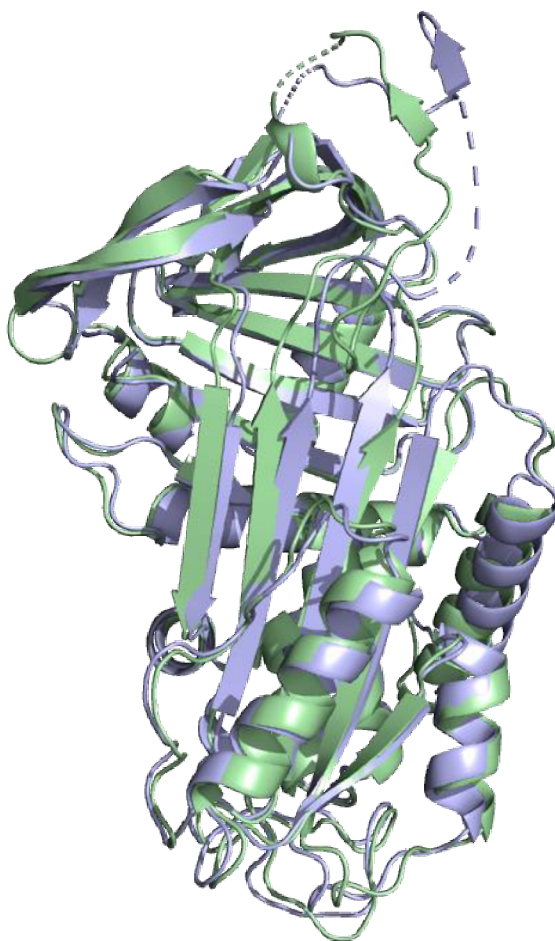
Obrázek 17: Pohled na RCL rezidua serpinu Iripin-4 s mapou elektronové hustoty. Z důvodu mobility RCL (obarveno červeně) mapa elektronové hustoty (modrá barva) v jednom místě chybí. Z toho důvodu bylo ze struktury odstraněno reziduum: Ser342 – Glu345 (Ser342, Leu343, Val344, Glu345). Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 18: Zobrazení kationtu Ni^{2+} mezi dvěma molekulami Iripinu-4 v krystalu. Jsou označeny aminokyseliny histidin (His253) a kyselina asparagová (Asp257), které s tímto kationtem Ni^{2+} reagují. Jsou také zobrazeny vzdálenosti, konkrétně 1,9 Å mezi His253 a Ni^{2+} a 2,4 Å mezi Asp257 a Ni^{2+} . Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

5.3. Porovnání struktur Iripinu-1 A Iripinu-4

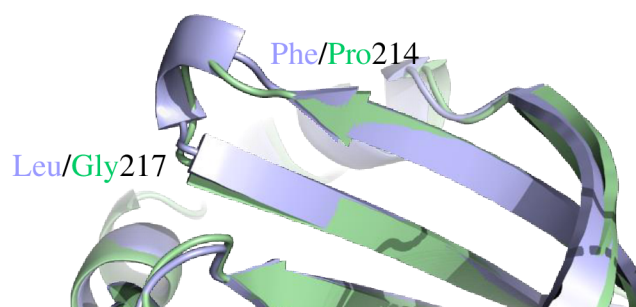
Obě struktury se samozřejmě nejvíce liší v těch nejflexibilnějších částech – v ohybech („loopech“) a konkrétně nejvíce v RCL. Obě RCL mají stejnou délku 24 reziduí, ale u Iripinu-4 se již částečně začal zasouvat do β -skládaného listu-A. Tento pohyb měl vliv i na β -strandy v již zmíněném β -skládaném listu, které jsou lehce rozestoupené a vytvářejí tak prostor pro RCL. Ve struktuře Iripinu-1 je pak RCL zcela volný v prostoru a nemá žádný vliv na β -skládaný list-A.



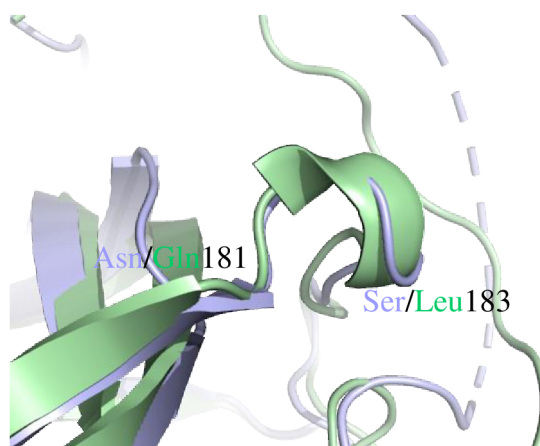
Obrázek 19: Porovnání struktur serpinů Iripinu-1 a Iripinu-4. Fialově je zbarvena struktura Iripinu-1 a zeleně je vyobrazena struktura Iripinu-4. Skóre MatchAlign bylo 1005,5 a bylo srovnáno celkem 2537 atomů. Hodnota r.m.s.d. byla 0,939 Å (2011 ku 2011 atomům) při pěti cyklech zarovnání. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Je možné pozorovat další rozdíly ve strukturách. Porovnání reziduí 214 – 217 obou struktur je přiblíženo na Obr. 20. U Iripinu-1 je zde vymodelován α -helix, kdežto u Iripinu-4 je zde pouze ohyb. Podobný rozdíl se nachází také v reziduích 181 – 183 s tím rozdílem, že

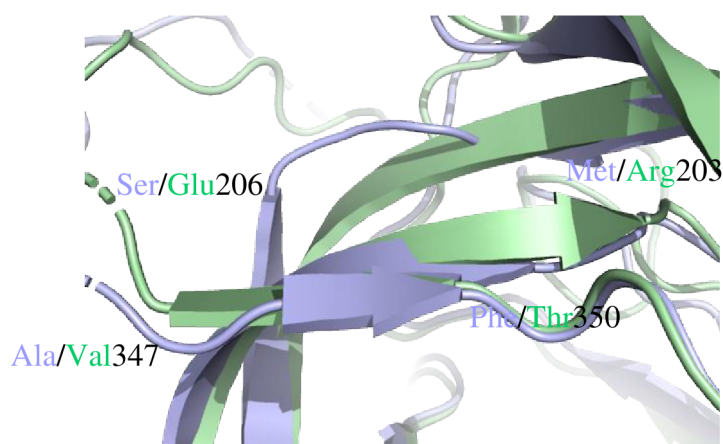
tentokrát se nachází α -helix v modelu Iripinu-4, kdežto u Iripinu-1 je pouze ohyb (Obr. 21). Posledním rozdílem jsou jiné délky namodelovaných β -strandů v β -skládaném listu-C (Obr. 22). U struktury Iripinu-1 je dokonce β -strand rozdělen na dva s ohybem v reziduu Met203 – Gly205.



Obrázek 20: Přibližné porovnání reziduí 214 – 217 obou struktur. Iripin-1 je obarven fialově a v tomto úseku obsahuje po řadě aminokyseliny Phe214, Arg215, Asp216 a Leu217. Iripin-4 má zelenou barvu a jeho rezidua v tomto úseku jsou Pro214, Pro215, Leu216, Gly217. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 21: Přibližné porovnání reziduí 181 – 183 struktur serpinů Iripin-1 (obarven fialově) a Iripin-4 (obarven zeleně). V tomto úseku Iripin-1 tvoří aminokyseliny Asn181, Lys182, Ser183 a Iripin-4zde má Gln181, Arg182, Leu183. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 22: Přibližné rozdíly v β -skládaném listu-C struktur serpinů Iripin-1 (fialová barva) a Iripin-4 (zelená barva). Porovnávaná rezidua jsou: Pro Iripin-1: Met203 – Ser206 (Met203, Met204, Gly205, Ser206) a pro Iripin-4 Arg203 – Glu206 (Arg203, Gly204, Val205, Glu206). Dalšími rezidui, kde lze nalézt rozdíly jsou: pro Iripin-1 Ala347 – Phe350 (Ala347, Phe348, Ala349, Phe350) a pro Iripin-4 Val347 – Thr350 (Val347, Glu348, Phe349, Thr350). Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

6. Diskuse

Klíšťata přenášením patogenů představují zdravotní riziko, jelikož způsobují nemoci, které není možné léčit. Lidé přicházejí častěji do kontaktu s klíštětem a tím se zvyšuje i riziko jeho napadením a přenosu patogenu (Parola & Raoult, 2001) – v České republice právě druhem *Ixodes ricinus*. Proto je důležité vyvíjet nové způsoby kontroly, především vakcíny. Ty by měly cílit na fyziologii klíštěte a jejich krmení, čímž by bylo možné nejen limitovat přenos patogenů, ale také snížit populaci klíšťat (Blisnick et al., 2017).

Takové farmakoaktivní látky jsou vyvíjeny buď umělou syntézou nebo izolováním potenciálních kandidátů z různých organismů i parazitů (Cherniack, 2011). Ke kontrole klíšťat se používají hlavně repelenty – akaricidy („acaricides“), které ale mají negativní dopad na životní prostředí a na ostatní organismy, na které vůbec nemají cílit. Navíc také posilují klíštěcí rezistenci (Blisnick et al., 2017).

Je tedy třeba přicházet s novými vakcínami a léky, které by byly více účinné. K tomuto účelu jsou zkoumány proteiny v klíštěti, které hrají nějakou roli v klíštěcí biologii a procesu sání krve, ale nejsou přesně známy jejich funkce. Takovou skupinou látek jsou i proteázové inhibitory, konkrétně serpiny.

Serpiny mají různé biologické funkce, které nesouvisí jen s ireverzibilní inhibicí proteáz (Silvermann et al., 2001). Nacházejí se také v obratlovcích, kde jsou ve velké míře známy jejich funkce. Díky tomu je možné předpovídat, na které procesy a reakce budou cílit klíštěcí proteiny (Chmelař et al., 2017). V klíšťatech jsou pak serpiny zapojeny do důležitých fyziologických procesů, jako je vrozený imunitní systém a srážení hemolymfy. Také jsou produkovány ve vaječnících a vajíčkách, která chrání před mikroorganismy. Je tedy možné předpokládat, že hrají roli při kladení vajíček a také při jejich samotném vývoji (Blisnick et al., 2017).

Klíště využívá při přisání na hostitele a při sání krve různé proteiny obsažené v jeho slinách. Nacházejí se tu stovky proteinů s antihemostatickými vlastnostmi (Maritz-Olivier et al., 2007) a protizánětlivými a imunomodulačními účinky (Kazimirova a Stibarínova, 2013). Serpiny jsou zapojeny do sání krve a jejího následného trávení ve středním střevě (Blisnick et al., 2017). Nacházejí se ve především ale ve slinných žlázách, kde inhibují hostitelův proces srážení krve, a tím pádem i její snazší sání. Také mají vliv na přenos patogenu a jeho následný

rozvoj v hostiteli tím, že v jeho organismu k tomu vytvoří vhodné podmínky (Blisnick et al., 2017).

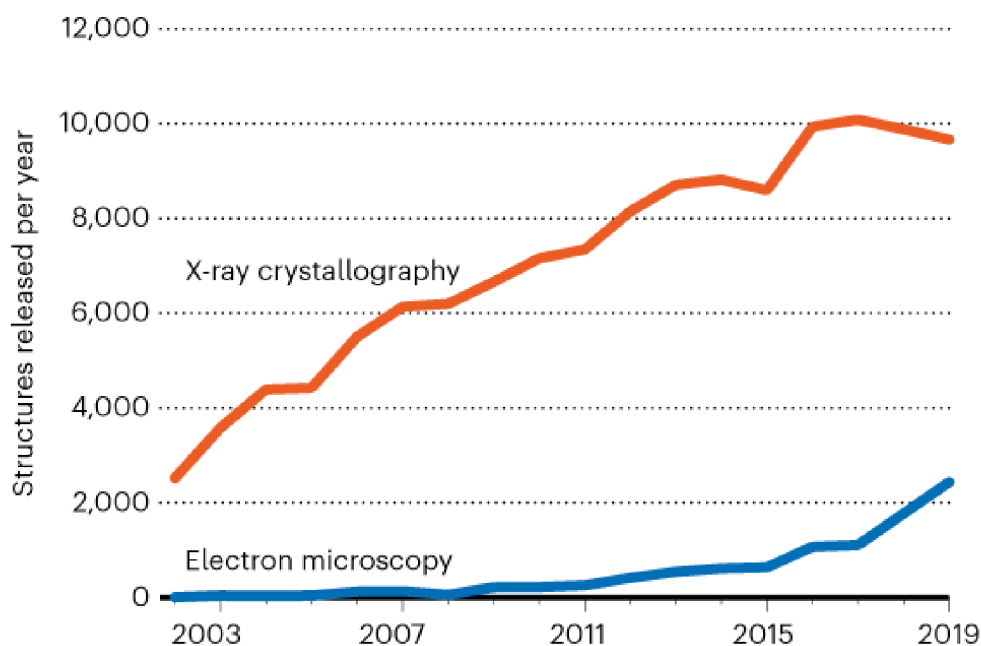
Příkladem ovlivňování imunitní odpovědi ve prospěch patogenu v savcích je cytokine response modifier (CrmA) (Ray et al., 1992). Je to serpin kódovaný virem kravských neštovic a funguje jako silný inhibitor enzymu konvertující cysteinovou proteázu interleukin-1 β (Howard et al., 1995). Bylo ukázáno, že CrmA inhibuje apoptózu, která je vyvolána tumor nekrotizujícím faktorem nebo Fas ligandem (Enari et al., 1995; Miura et al., 1995; Tewari et al., 1995).

S rozvojem rentgenové krystalografie je možné provádět experimenty na náročnějších vzorcích. Zlepšila se také kvalita dat a snížil se čas potřebný pro vyřešení struktury proteinů (Mahon a McKenna, 2018). Vylepšené jsou například detektory, software, zaostřovací zrcadla („focusing mirrors“) (Graber et al., 2011) ale také zdroje synchrotronového záření – dnes již třetí generace. Existuje i čtvrtá generace laserů s rentgenovým zářením bez elektronů, tzv. XFEL („fourth-generation Xray free-electron lasers“). Ty umožňují větší tok záření díky fokusovanému paprsku (Levantino et al., 2015; Spence, 2017).

Kromě rentgenové difrakční analýzy se vyvíjejí a stále více využívají i jiné metody, sloužící k určení struktury proteinů. Díky tomu může narůstat počet objasněných struktur. Neutronová krystalografie využívá neutronové difrakce pro nalezení pozic vodíkových atomů v rozlišení okolo 2 Å. Celý proces probíhá za pokojové teploty bez potřeby chlazení a bez poškození krystalu paprsky (Gerlits et al., 2017). Pro serpiny je toto možné využít při hledání vodíkových atomů při interakci serpin-ligand a komplexu serpin-proteáza (Mahon a McKenna, 2018).

Pomocí (kryo-) elektronové mikroskopie (Cryo-EM) je možné řešit i struktury o nízkém rozlišení (méně než 3 Å) (Banerjee et al., 2016). Kvůli ochraně vzorku je vzorek zmražen na 70 K a následně je ozáren vysokoenergetickým paprskem elektronů (Thompson et al., 2016; Milne et al., 2013). Tato metoda umožňuje studium velkých agregátů serpinových komplexů, které souvisí se serpinopatiemi (Belorgey et al., 2007; Lomas a Carrell, 2002). Je tak možné hledat nejen konkrétní příčiny, ale i léčbu specifických serpinopatií (Mahon a McKenna, 2018). Výhodou je především fakt, že není nutné vypěstovat krystal, což často bývá ta nejnáročnější část rentgenové krystalografie.

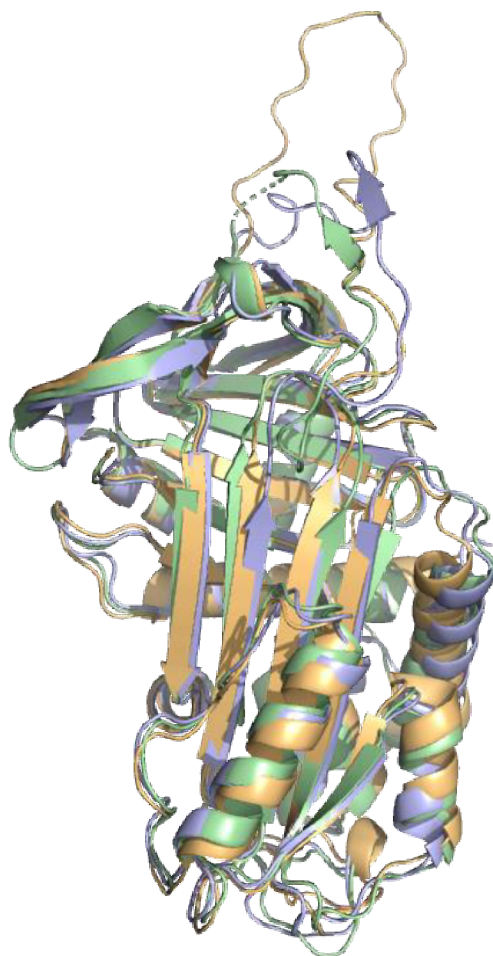
Dříve byla drtivá většina proteinových struktur objasněna metodou rentgenové krystalografie. Ale s nástupem a rozvojem nových metod tomu tak nemusí být i v budoucnu. Jak je vidět na Obr. 23, od roku 2011 se začal zvyšovat počet struktur, které byly vyřešeny metodou cryo-EM. V roce 2019 měla tato metoda dokonce v počtu struktur strmě stoupající tendence, zatímco rentgenová krystalografie poprvé zaznamenala pokles oproti předchozím letům (Callaway, 2020).



Obrázek 23: Graf srovnání počtu vyřešených proteinových struktur (a dalších biomolekul) v průběhu let pomocí metod rentgenové krystalografie a elektronové mikroskopie (Callaway, 2020).

Je možné pozorovat, že rentgenová krystalografie má obrovský náskok v počtu vyřešených struktur, čímž stále kraluje všem strukturním metodám. Její náročnost, především vypěstování krystalu, však způsobuje nárůst oblíbenosti metody cryo-EM mezi vědci. Ještě bude jistě několik let trvat, než se vůbec obě metody dostanou na stejné množství vyřešených struktur za rok. Je však jasné, že dnes mají vědci možnost volby metody, která by jim vyhovovala. Výsledkem bude stále více vyřešených struktur každý rok, jelikož bude možné používat obě metody.

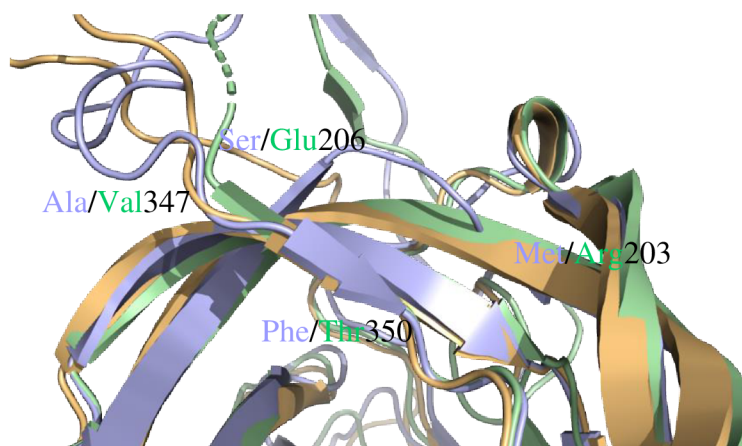
Následně byly serpiny Iripin-1 a Iripin-4 porovnány s jiným nativním serpinem Iripinem-8.



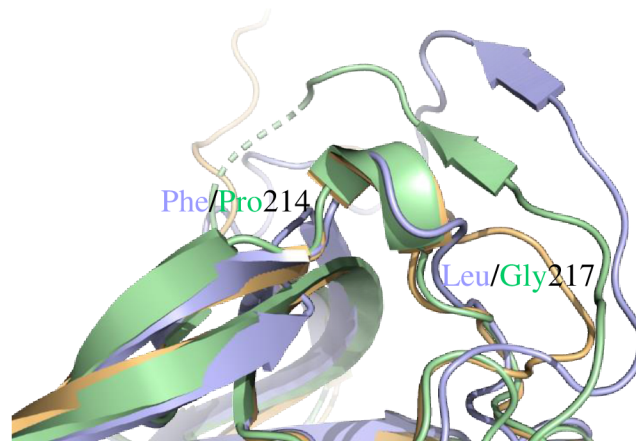
Obrázek 24: Porovnání struktur serpinů Iripinu-1, Iripinu-4 a Iripinu-8 (PDB ID: 7PMU). Struktura Iripinu-1 má fialovou barvu, Iripin-4 má poté zelenou barvu a nakonec Iripin-8 má barvu oranžovou. Hodnota r.m.s.d. byla při zarovnání 1,146 Å (celkem 1920 atomů). Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Struktury všech tří serpinů se nejvíce liší v délce RCL, jelikož Iripin-8 má abnormálně dlouhý RCL, konkrétně 29 reziduí oproti 24 reziduím Iripinu-1 a Iripinu-4. Další rozdíl v RCL je ten, že u Iripinu-8 je volný, kdežto u Iripinu-4 je částečně vsunutý do β -skládaného listu-A (jak již bylo v práci diskutováno). Struktury se také liší na obou svých koncích, což je možné očekávat, jelikož je zde struktura flexibilní.

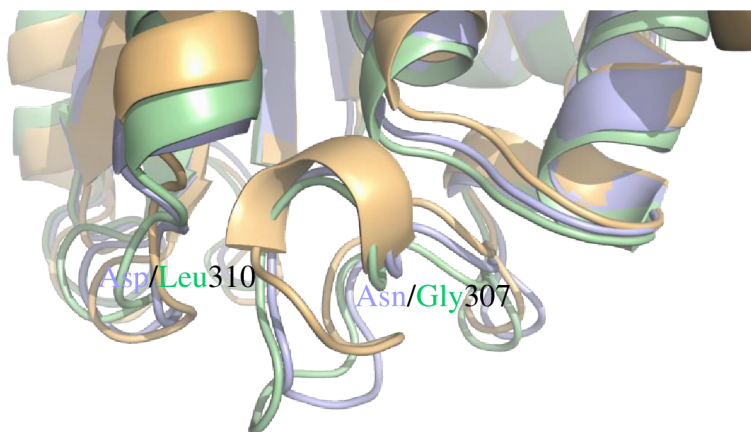
Následuje analýza vzájemných rozdílů mezi strukturami. Struktura Iripinu-8 více kopíruje strukturu Iripinu-4. Na obrázku 25 je vidět, že se struktura Iripinu-4 a Iripinu-8 se na daném úseku alespoň přibližně shoduje, avšak jak již bylo diskutováno, struktura Iripinu-1 se zde liší. Podobný problém nastává u reziduí Iripinu-1 Pro214 – Leu217, kde je pouze ohyb, ovšem ve stejných místech Iripin-4 i Iripin-8 mají α -helix (Obr. 26). U reziduí Asn307 – Asp310 Iripinu-1 a Gly307 – Leu310 Iripinu-4 mají oba serpiny podobnou strukturu ohybu. U Iripinu-8 ale odpovídající rezidua mají strukturu α -helixu (Obr. 27).



Obrázek 25: Přibližné rozdíly v β -skládaném listu-C struktur serpinů Iripin-1 (fialová barva), Iripin-4 (zelená barva) a Iripin-8 (oranžová barva). Rozdíly v délce β -strandů se nacházejí mezi rezidui Iripinu-1 Ala347 – Phe350, Iripinu-4 Val347 – Thr350 a odpovídajícími rezidui Iripinu-8. Rozdíl v přerušném β -strandu se nachází v reziduích Iripinu-1 Met203 – Ser206, Iripinu-4 Arg203 – Glu206 a odpovídajících reziduích serpinu Iripin-8. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 26: Přibližné porovnání reziduí Iripinu-1 Phe214 – Leu217, Iripinu-4 Pro214 – Gly217 a odpovídajících reziduí Iripinu-8. Iripin-1 je obarven fialově, Iripin-4 zeleně a Iripin8 oranžově. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).



Obrázek 27: Přibližné porovnání struktur Iripinu-1 (fialová barva), Iripinu-4 (zelená barva) a Iripinu-8 (oranžová barva). V reziduích Iripinu-1 Asn307 – Asp310 a Iripinu-4 Gly307 – Leu310 se nachází pouze ohyb. V odpovídajících reziduích Iripinu-8 se ale nachází α -helix. Vytvořeno v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC).

7. Závěr

Data pro oba serpiny byla získána v Německu na synchrotronu BESSY II. se zdrojem BL14.2. Detektorem byl PILATUS 6M a vlnová délka rentgenového záření měla hodnotu 0,9184 Å. Tato data byla k následné analýze a zpracování poskytnuta školitelkou.

Data z rentgenové difrakční analýzy byla dále zpracována v programech *XDSAPP* (Sparta et al., 2016), *POINTLESS* (Evans, 2006) a *SCALA* (Evans, 2006). Pro serpin Iripin-1 byla potvrzena prostorová grupa $P12_12$ s konfidencí 0,848 a s rozměry unit cell $a = 48,82 \text{ \AA}$, $b = 91,0 \text{ \AA}$, $c = 95,83 \text{ \AA}$ a úhly $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97,53^\circ$ a $\gamma = 90^\circ$. Iripin-4 krystalizoval v prostorové grupě $P3_121$, což bylo potvrzeno s konfidencí 0,943. Rozměry unit cell tohoto serpinu byly $a = 78,93 \text{ \AA}$, $b = 78,93 \text{ \AA}$, $c = 117,78 \text{ \AA}$; s úhly $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ a $\gamma = 120^\circ$.

Program *BALBES* (Long et al. 2008) následně vybral pro oba serpiny vhodné homologní proteiny díky vysoké strukturní homologii, které byly následně využity jako modely pro molekulární nahrazení. Pro serpin Iripin-1 se jednalo o krystalickou strukturu antigenu lidského spinocelulárního karcinomu 1 SCCA1 (PDB ID: 2ZV6). Pro Iripin-4 byl vybraným modelem serpin Iripin-2 (PDB ID: 3NDA).

Následně bylo provedeno molekulární nahrazení v programu *MOLREP* (Vagin a Teplyakov, 1997), čímž byl vyřešen fázový problém. Struktury byly rafinovány a validovány ručně a pomocí programu *REFMAC5* (Murshudov et al., 1997). Výsledné vypovídající parametry pro serpin Iripin-1 byly: R faktor 0,2003, R_{free} faktor 0,2497 r.m.s. délky vazeb 0,007 a r.m.s. vazebných úhlu $1,525^\circ$. Maximální rozlišení struktury tohoto serpinu je $2,10 \text{ \AA}$. U druhého serpinu Iripinu-4 byly tyto parametry následující: R faktor 0,222, R_{free} faktor 0,332, r.m.s. délky vazeb 0,009 a r.m.s. vazebných úhlů $1,621^\circ$. Maximální rozlišení struktury Iripinu-4 bylo omezeno na $2,3 \text{ \AA}$, a to z důvodu výskytu ice ringu na rozlišení $2,25 \text{ \AA}$.

Do obou struktur byly namodelovány kovové ionty jako ligandy. Pro Iripin-1 to byl kationt Mg^{2+} a pro Iripin-4 kationt Ni^{2+} . Struktura Iripinu-1 byla vymodelována s clashscore v 97. percentilu a MolProbity skóre také v 97. percentilu. Celkem struktura obsahovala 96,27 % Ramachandranových favorizovaných amikyselin bez outlierů. Clashscore při validaci Iripinu-4 bylo v 98. percentilu a MolProbity skóre ve 100. percentilu. Favorizovaných Ramachandranových aminokyselin se ve struktuře nacházelo 98,51 % bez jakýchkoliv outlierů.

Následně byly modely graficky zobrazeny v programu *PyMOL* (Version 2.0 Schrödinger, LLC). Byly také porovnány mezi sebou a proběhla analýza možných rozdílů.

8. Seznam použité literatury

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608–614.
- AWUOCHE, E.O. (2012). Tsetse fly saliva: Could it be useful in fly infection when feeding in chronically aparasitemic mammalian hosts. *Open Vet. J.* 2, 95–105.
- BANERJEE, S., BARTESAGHI, A., MERK, A., RAO, P., BULFER, S. L., YAN, Y., GREEN, N., MROCKOWSKI, B., NEITZ, R. J., WIPF, P., FALCONIERI, V., DESHAIES, R. J., MILNE, J. L. S., HURYN, D., ARKIN, M., SUBRAMANIAM, S. (2016). 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* 351, 871–875.
- BARRETT, A. J., RAWLINGS, N. D., WOESSNER, J. F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes, 2. vydání. Academic Press, Londýn.
- BELORGEY, D., HÄGGLÖF, P., KARLSSON-LI, S., LOMAS, D. A. (2007). Protein misfolding and the serpinopathies. *Prion* 1, 15–20.
- BLISNICK, A. A., FOULON, T., BONNET, S. I. (2017). Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Thick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 1–24.
- BROSSARD, M., WIKEL, S. K. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology* 129 (Suppl.), S161–S176.
- CALJON, G., DE RIDDER, K., DE BAETSELIER, P., COOSEMANS, M., VAN DEN ABBEELE, J. (2010) Identification of a tsetse fly salivary protein with dual inhibitory action on human platelet aggregation. *PLoS ONE* 5, e9671.
- CALJON, G., VAN DEN ABBEELE, J., STERNBERG, J.M., COOSEMANS, M., DE BAETSELIER, P., MAGEZ, S. (2006). Tsetse fly saliva biases the immune response to Th2 and induces anti-vector antibodies that are a useful tool for exposure assessment. *Int. J. Parasitol.* 36, 1025–1035.
- CALLAWAY, E. (2020). Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology. *Nature* 578, 201.

- COWTAN, K. (2003). Phase Problem in X-ray Crystallography, and Its Solution, *Encyklopedia of life sciences*. Wiley, Chichester.
- COWTAN, K. (2003). The Clipper C++ libraries for X-ray crystallography. *IUCr Comput. Commun. Newsl.* 2, 4–9.
- DAUTER, Z., JASKOLSKI, M. (2010). How to read (and understand) Volume A of International Tables for Crystallography: and introduction for nonspecialists. *J. Appl. Cryst.* 43, 1150–1171.
- DAVIS, R. L., SHRIMPTON, A. E., HOLOHAN, P. D., BRADSHAW, C., FEIGLIN, D., COLLINS, G. H., SONDEREGGER, P., KINTER, J., BECKER, L. M., LACBAWAN, F., KRASNWICH, D., MUENKE, M., LAWRENCE, D. A., YERBY, M. S., SHAW, C. M., GOOPTU, B., ELLIOTT, P. R., FINCH, J. T., CARRELL, R. W., LOMAS, D. A. (1999). Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376–379.
- DELANO, W. (2002). PyMol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography* 40, 44–70.
- DUNSTONE, M. A., WHISSTOCK, J. C. (2011). Crystallography of Serpins and Serpin Complexes. *Methods in Enzymology* 501, 53–87.
- EKEOWA, U. I., GOOPTU, B., BELORGEY, D., HAGGLOF, P., KARLSSON-LI, S., MIRANDA, E., ET AL. (2009). alpha1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies. *Clin. Sci.* 116 (12), 837–850.
- EMSLEY, P., COWTAN, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W. G., COWTAN, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Cryst. D* 66, 486–501.
- ENARI, M., HUG, H., NAGATA, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature (Lond.)* 375, 78–81.
- ENGH, R., LÖBERMANN, H., SCHNEIDER, M., WIEGAND, G., HUBER, R., LAURELL, C. B. (1989). The S variant of human alpha1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Eng* 2, 407–415.
- ESTRADA-PEÑA, A. (2001). Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Vet Parasitol* 98, 111–132.

EVANS, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.

FRANNCISCHETTI, I. M. B., SÁ-NUNES, A., MANS, B. J., SANTOS, I. M., RIBEIRO, J. M. C. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Biocciences* 14, 2051–2088.

FRIESE, K., GRZECHNIK, A. (2014). Twinning and pseudosymmetry under high pressure. *Z. Kristallogr.* 229 (2), 158–168.

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

GERLITS, O., KEEN, D. A., BLAKELEY, M. P., LOUIS, J. M., WEBER, I. T., KOVALEVSKY, A. (2017). Room temperature neutron crystallography of drug resistant HIV-1 protease uncovers limitations of X-ray structural analysis at 100 K. *J. Med. Chem.* 60, 2018–2025.

GOOPTU, B., HAZES, B., CHANG, W. S., DAFFORN, T. R., CARRELL, R. W., READ, R. J., LOMAS, D. A. (2000). Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 67–72.

GRABER, T., ANDERSON, S., BREWER, H., CHEM, Y. S., CHO, H. S., DASHDORJ, N., HENNING, R. W., KOSHELEVA, I., MACHA, G., MERON, M., PAHL, R., REN, Z., RUAN, S., SCHOTTE, F., SRAJER, V., VICCARO, P. J., WESTFERRO, F., ANFINRUD, P., MOFFAT, K. (2011). BioCARS: a synchrotron resource for time-resolved X-ray science. *J. Synchrotron Radiat* 18, 658–670.

HOPKINS, F. G., PINKUS, S. N. (1898). Observations on the crystallization of animal Proteins. *J. Physiol* 23,130–136.

HOWARD, A. D., PALYHA, O. C., DRIFFIN, P. R., PETERSON, E. P., LENNY, A. B., DING, G. J., PICKUP, D. J., THORNBERRY, N. A., SCHMIDT, J. A., TOCCI, M. J. (1995). Human IL-1 beta procesing and secretion in recombinant baculovirus-infected sf9 cells is blocked by the cowpox virus serpin CrmA. *J. Immunol.* 154, 2321–2332.

- HUBALEK, Z. (2009). Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37, 31–50.
- HUNTINGTON, J. A., (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *J. Thromb. Haemost* (9), 26–34.
- HUNTINGTON, J. A., LI, W. (2009). Structural insights into the multiple functions of protein C inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 113–121.
- HUNTINGTON, J. A., READ, R. J., CARREL, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923–926.
- CHAPMAN, M. S., SOMASUNDARAM, T. (2010). De-icing: recovery of diffraction intensities presence of ice rings. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 741–744.
- CHEN, V. B., ARENDALL III, W. B., HEADD, J. J., KEEDY, D. A., IMMOMINO, R. M., KAPRAL, G. J., MURRAY, L. W., RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C. (2010). *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D* 66, 12–21.
- CHERNIACK, E. P. (2011). Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Altern. Med. Rev.* 16, 50–58.
- CHLASTÁKOVÁ, A., KOTÁL, J., BERÁNKOVÁ, Z., KAŠČÁKOVÁ, B., MERTINS, L. A., LANGHANSOVÁ, H., PRUDNIKOVA, T., EDEROVÁ, M., KUTÁ SMATANOVÁ, I., KOTSYFAKIS, M., CHMELAR, 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.
- CHMELAR, J., OLIVEIRA, C. J., REZACOVA, P., FRANCISCHETTI, I. M., KOVAROVA, Z., PEJLER, G., KOPACEK, P., RIBEIRO, J. M. C., MARES, M. KOPECKY, J., KOTSYFAKIS, M. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736–744.
- CHMELAR, J., CALVO, E., PEDRA, J. H., FRANCISCHETTI, I. M., KOTSYFAKIS, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics* 75, 3842–3854.
- CHMELAR, J., KOTÁL, J., LANGHANSOVÁ, H., KOTSYFAKIS, M. (2017). Protease Inhibitor in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystanins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 7, 1–16.

KABSCH, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26, 795–800.

KAŠČÁKOVÁ, B., KOTÁL, J., MARTINS, L. A., BERÁNKOVÁ, Z., LENGHANSOVÁ, H., CALVO, E., CROSSLEY, J. A., HAVLÍČKOVÁ, P., DYCKA, F., PRUDNIKOVA, T., KUTÝ, M., KOTSYFAKIS, M., CHMELAR, J., KUTÁ SMATANOVÁ, I. (2021). Structural and biochemical characterization of the novel serpin Iripin-5 from *Ixodes ricinus*. *Acta Cryst.* 77, 1183–1196.

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

KAZIMIROVA, M., STIBRANIOVA, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 43.

KEEGAN, R. M., WINN, M. D. (2007). Automated search-model Discovery and preparation for structure solution by molecular replacement. *Acta Cryst. D* 63, 447–457.

KENDREW, J. C., DICKERSON, R. E., STRANDBERG, B. E., HART, R. G., DAVIES, D. R., PHILLIPS, D. C., SHORE, V. C. (1960). Structure of myoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å. resolution. *Nature* 185, 422–427.

KIM, H. S., KREGE, J. H., KLUCKMAN, K. D., HAGAMAN, J. R., HODGIN, J. B., BEST, C. F., JENNETTE, J. C., COFFMAN, T. M., MAEDA, N., SMITHIES, O. (1995). Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2735–2739.

KOTÁL, J., POLDERDIJK, S. G., LANGHANSOVÁ, H., EDEROVÁ, M., MARTINS, L. A., BERÁNKOVÁ, Z., CHLASTÁKOVÁ, A., HAJDUŠEK, O., KOTSYFAKIS, M., HUNTINGTON, J. A., CHMELAR, J. (2021). *Ixodes ricinus* Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (17), 99480.

KOVAROVA, Z., CHMELAR, J., SANDA, M., BRYNDA, J., MARES, M., AND REZACOVA, P. (2010). Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 1453–1457.

KRISSINEL, E. B., WINN, M. D., BALLARD, C. C., ASHTON, A. W., PATEL, P.,

- KRUG, M. WEISS, M. S., HEINEMANN, U., MUELLER, U. (2012). XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J. Appl. Cryst.* 45, 568–572.
- LEBOULLE, G., CRIPPA, M., DECREM, Y., MEJRI, N., BROSSARD, M., BOLLEN, A., GODFROID, E. (2002a). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277, 10083–10089.
- LEBOULLE, G., ROCHEZ, C., LOUAHED, J., RUTI, B., BROSSARD, M., BOLLEN, A., GODFROID, E. (2002b). Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 225–233.
- LESLIE, A. G. W. (2006). The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Cryst. D* 62, 48–57.
- LEVANTINO, M., YORKE, B. A., MONTEIRO, D. C., CAMMARATA, M., PEARSON, A. R. (2015). Using synchrotrons and XFELs for time-resolved X-ray crystallography and solution scattering experiments on biomolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 35, 41–48.
- LO CONTE, L., BRENNER, S. E., HUBBARD, T. J. P., CHOTHIA, C., MURZIN, A. G. (2002). SCOP database in 2002: refinements accommodate structural genomics. *Nucleic Acids Res.* 30, 264–267.
- LÖBERMANN, H., TOKUOKA, R., DEISENHOFER, J., HUBER, R. (1984). α 1-Proteinase inhibitor. *J. Mol. Biol.* 177, 531–556.
- LOMAS, D. A., CARRELL, R. W. (2002). Serpinopathies and the Conformational Dementias. *Nat. Rev. Genet.* 3, 759–768.
- LOMAS, D. A., HURST, J. R., GOOPTU, B. (2016). Update on alpha-1 antitrypsin deficiency: new therapies. *J. Hepatol.* 65, 413–424.
- LONG, F., VAGIN, A. A., YOUNG, P. MURSHUDOV, G. N. (2008). BALBES: a molecular-replacement pipeline. *Acta Cryst. D* 64, 125–132.
- LOVELL, S. C., DAVIS, I. W., ARENDALL, W. B. III, DE BAKKER, P. I. W., WORD, J. M., PRISANT, M. G., RICHARDSON, J. S. & RICHARDSON, D. C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and beta deviation. *Proteins* 50, 437–450.

- MAHON, B. P., MCKENNA, R. (2018). Methods for Determining and Understanding Serpin Structure and Function: X-Ray Crystallography. Lucas, A. (eds) Serpin. Methods in Molecular Biology 1826. Humana Press, New York.
- MARITZ-OLIVIER, C., STUTZER, C., JONGEJAN, F., NEITZ, A.W., GASPAR, A. R. (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* 23, 397–407.
- MEDLOCK, J. M., HANSFORD, K. M., BOMANE, A. DERDAKOVA, M., ESTRADA-PEÑA, A., GEORGE, J.-C., GOLOVLJOVA, I., JAENSON, T. G. T., JENSEN, J.-K., JENSEN, P. M., KAZIMIROVA, M., OTEO, J. A., PAPA, A., PFISTER, K., PLANTARD, O., RANDOLPH, S. E., RIZZOLI, A., SANTOS-SILVA, M. M., SPRONG, H., VIAL, L., HENDRICKX, G., ZELLER, H., VAN BORTEL, W. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. *Parasites & Vectors* 6, 1–11.
- MESSERSCHMIDT, A. (2007). X-ray crystallography of biomacromolecules. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- MILNE, J. L. S., BORGNIA, M. J., BARTESAGHI, A., TRAN, E. E. H., EARL, L. A., SCHRAUDER, D. M., LENGYEL, J., PIERSON, J., PATWARDHAN, A., SUBRAMANIAM, S. (2013). Cryo-electron microscopy – a primer for the non-microscopist. *FEBS J.* 280, 28–45.
- MIURA, Y., FRIENDLANDER, R. M., YUAN, J. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8318–8322.
- MULENGA, A., SUGINO, M., NAKAJIMA, M., SUGIMOTO, CH., ONUMA, M. (2001). Tick-Encoded Serine Protease Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (10), 1063–1069.
- MURZIN, A. G., BRENNER, S. E., HUBBARD, T., CHOTHIA, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 757–760.
- NASH, P., WHITTY, A., HANDWERKER, J., MACENT, J., MCFADEN, G. (1998). Inhibitory specificity of the anti-inflammatory Myxoma virus serpin, SERP-1. *J. Biol. Chem.* 273, 20982–20991.

- OLSEN, J. V., ONG, S.-E., MANN, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608–614.
- OTWINOWSKI, Z., MINOR, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- PAL, U., LI, X., WANG, T., MONTGOMERY, R. R., RAMAMOORTHY, N., DESILVA, A. M., ET AL. (2004). TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi. *Cell* 119 457–468.
- PAROLA, P., RAOULT, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases* 32, 897–928.
- PODJARNY, A. D., REES, B., URZHUMTSEV, A. G. (1996). Density modification in X-ray crystallography, Crystallographic methods and protocols. *Method Mol Biol.* 56, 205–226.
- POTEMPA, J., KORZUS, E., TRAVIS, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 269(23), 15957–15960.
- POTTERTON, E. A., MCNICHOLAS, S. J., COWTAN, K. D., EMSLEY, P. (2004). The new CCP4 Coordinate Library as a toolkit for the design of coordinate-related applications in protein crystallography. *Acta Cryst. D* 60, 2250–2255.
- PREVOT, P. P. (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus. *J. Biol. Chem.* 281, 26361–26369.
- RAWLINGS, N. D., TOLLE, D. P., BARRETT, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378 (3), 705–716.
- RAY, C. A., BLACK, R. A., KRONHEIN, S. R., GREENSTREET, T. A., SLEATH, P. R., SALVESEN, G. (1992). Viral inhibition of inflammation. Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin 1 β converting enzyme. *Cell* 69, 597–604.
- RHODES, G. (2006). Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models, Complementary science series, 3. edice. Elsevier; Academic Press, Amsterdam; Boston.
- ROGERS, D. (1965). Computing Methods in Crystallography. *Oxford University Press.* 117–148.

- ROSSMANN, M. G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Crystallogr A* 46(Pt 2), 73–82.
- SILVERMAN, G. A., BIRD, P. I., CARELL, R. W., CHURCH, F. C., COUGHLIN, P. B., GETTINS, P. G. W., IRVING, J. A., LOMAS, D. A., LUKE, C. J., MOYER, R. W., PEMBERTON, P. A., REMOLD-O'DONNELL, E., SALVESEN, G. S., TRAVIS, J., WHISSTOCK, J. C. (2001). The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36), 33293–33296.
- SLIZ, P., HARRISON, S. C., ROSENBAUM, G. (2003). How does radiation damage in protein crystals depend on X-ray dose? *Structure* 11, 13–19.
- SONENSHINE, D. E. (1991). *Biology of ticks*. New York: Oxford University, Press 1.
- SPARTA, K. M., KRUG, M., HEINEMANN, U., MUELLER, U., WEISS, M. S. (2016). XDAPP2.0. *J. Appl. Cryst.* 49, 1085–1092.
- SPENCE, J. C. H. (2017). XFELs for structure and dynamics in biology. *IUCrJ* 4, 322–339.
- STEIN, P. E., CARRELL, R. W. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease. *Nat. struct. Biol.* 2, 96–113.
- SUDHINDRA, P. (2018). Chapter 10 – Tick-Borne Infections of the Central Nervous System. *Clinical Microbiology: Diagnosis, Treatments and Prophylaxis of Infections* 3, 173–195.
- TAYLOR, G. (2003). The phase problem. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1881–1890.
- TAYLOR, G., (2003). The phase problem. *Acta Cryst.* 59, 1881–1890.
- TEWARI, M., TELFORD, W. G., MILLER, R. A., DIXIT, V. M. (1995). CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocytes-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270, 22705–22708.
- THOMPSON, R. F., WALKER, M., SIEBERT, C. A., MUENCH, S. P., RANSON, N. A. (2016). An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods* 100, 3–15.

THORN, A., PARKHURST, J. M., EMSLEY, P., NICHOLLS, ., EVANS, G., VOLLMAR, M., MURSHUDOV, G. N. (2017). AUSPEX: a graphical tool for X-ray diffraction data analysis. *Acta Cryst. D.* 73, 729–737.

VAGIN, A., TEPLYAKOV, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* 30, 1022–1025.

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

WINN, M. D., BALLARD, CH. C., COWTAN, K. D., DODSON, E. J., EMSLEY, P., EVANS, P. R., KEEGAN, R. M., KRISINEL, E. B., LESLIE, A. G. W., MCCOY, A., MCNICHOLAS, S. J., MURSHUDOV, G. N., PANNU, N. S., POTTERTON, E. A., POWELL, H. R., READ, R. J., VAGIN, A., WILSON, K. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta. Cryst. D* 67, 235–242.

WORD, J. M., LOVELL, S. C., LABEAN, T. H., TAYLOR, H. C., ZALIS, M. E., PRESLEY, B. K., RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C. (1999). Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: Small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms. *J. Mol. Biol.* 285, 1711–1733.

Internetový zdroj:

Symmetry, Crystal Systems and Bravais Lattices, dostupné z: <https://www.physics-in-a-nutshell.com/article/6/symmetry-crystal-systems-and-bravais-lattices>, citováno 12. 4. 2023.

9. Seznam použitých zkratek

Tabulka VI: Použité zkratky.

Zkratka	Celé znění
Cryo-EM	Kryo-elektronová mikroskopie
MIR	Několikanásobné isomorfní těžko-atomové nahrazení (multiple isomorphous heavy-atom replacement,
MMDB	„Molecular modeling database“
MR	Molekulární nahrazení
NO	Oxid dusnatý
PRB	Proteinová data banka
R/RC	Kontrola rafinace a regularizace
RCL	„Reactive centre loop“
SAD/MAD	Jedno/mnoho délkové anomální disperze
TBEV	Virus klíšťové encefalitidy
TIL	Inhibitory s doménami bohatými na cystein podobné inhibitoru trypsinu
XFEL	„Fourth generation Xray free-electron lasers“
Zkratky aminokyselin	
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Kyselina asparagová
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Kyselina glutamová
Gly (G)	Glycin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Isoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Phe (F)	Fenylalanin
Ser (S)	Serin

Thr (T)	Threonin
Val (V)	Valin
Tyr (T)	Tyrosin
Trp (W)	Tryptofan
Met (M)	Methionin
Cys (C)	Cystein
Pro (P)	Prolin

10. Seznam příloh

Tabulka VII: Přehled původních anglických názvů a autorův volný překlad.

Původní anglický název	Volný překlad
Acaricides	Repelenty (akaricidy)
Alignment	Zarovnání
B factor greater than 60 \AA^2	B faktor větší než 60 \AA^2
Ball-and-stick	Koule a tyčinka
Bravais lattices	Bravaisovy mřížky
Cartoon ribbons	Kreslené stuhy
Clashscore	Skóre srážek
Cleaved form	Rozštěpená forma
Cryoprotection	Ochranný roztok
Crystal structure of human squamous cell carcinoma antigen 1	Krystalická struktura antigenu lidského spinocelulárního karcinomu 1
Cylinders	Válce
Difference vector clustering	Shlukování diferenčních vektorů
Dot surface	Bodový povrch
Focusing mirrors	Zaostřovací zrcadla
Ice ring	Ledový prstenec
Loop	Smyčka
Molecular replacement	Molekulární nahrazení
Multiple isomorphous heavy-atom replacement	Několikanásobné isomorfní těžko-atomové nahrazení
Nodes	Uzly
Outershell	Vnější vrstva
Partial occupancy close contacts	Částečné obsazení blízké kontakty
Patterson origin peaks	Pattersonovy původní vrcholy
Planar peptide restraints	Omezení planárních peptidů
Profile fitting	Úprava profilu
Protein Data Bank	Proteinová Data Banka
Ramachandran outliers	Ramachandranovy odlehlé hodnoty

Ramachandran restraints	Ramachandranova omezení
Ray tracing	Sledování paprsků
Real-space refinement engine	Přístup pro zdokonalené v reálném prostoru
Refine/Regularize control	Kontrola rafinace a regularizace
Refinement	Rafinace
Refinement weight	Hmotnost rafinace
Refolding	Zpětné složení
Ribbons	Stuhy
Rigid-body fitting	Vestavení tuhého tělesa
Scaling function	Škálovací funkce
Shell	Plášť
Solid surface	Pevný povrch
Space group	Prostorová grupa
Spheres	Koule
Tick-borne encephalitis virus	Virus klíšťové encefalitidy
Torsion restraints	Torzni omezení
Trypsin inhibitor-like cysteine rich domain inhibitors	Inhibitory s doménami bohatými na cystein podobné inhibitoru trypsinu
Trypsin-like	Trypsinových
Unit cell	Elementární buňka
Use hydrogen atoms: ignore even if present in file	Použití vodíkových atomů: ignorovat, i když jsou v souboru
Validation	Validace
Waters with zero occupancy	Molekuly vody s nulovou obsazeností
Weight matrix	Hmotnostní matice
Wire bonds	Drátové vazby