

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Krystalizační studie vybraných klíčtějších proteinů**

**Bakalářská práce**

**Marie Kubátová**

Školitel: Mgr. Petra Havlíčková

Konzultant: prof. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, PhD., Mgr. Barbora Kašćáková

České Budějovice

2021

Kubátová, M., 2021: Krystalizační studie vybraných klišťecích proteinů. (Crystallization studies of selected tick proteins. Bc. Thesis, in Czech) – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This bachelor thesis is based on crystallization experiments of the selected proteins from tick. The main aim of this work was to find crystalization conditions suitable for growth of protein crystals. Diffraction data will be used for structural analysis.

### **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2021

.....

Marie Kubátová

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce Mgr. Petře Havlíčkové za příkladné vedení bakalářské práce, odborné rady a cenné připomínky poskytnuté při práci na této bakalářské práci. Konzultantce Mgr. Barboře Kašákové děkuji za trpělivost a vedení praktické části práce. Také bych chtěla poděkovat prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové PhD. za poskytnuté zázemí a možnost pracovat v laboratoři.

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární přehled .....	2
2.1. Historie krystalizace .....	2
2.2. Úvod do krystalizace .....	3
2.3. Podstata krystalizace .....	4
2.4. Krystalizační metody .....	5
2.5. Metody založené na difuzi par .....	5
2.5.1. Metoda sedící kapky – Sitting-drop vapor diffusion .....	6
2.5.2. Metoda visící kapky – Hanging-drop vapor diffusion .....	6
2.5.3. Metoda sendvičové kapky – Sandwich-drop vapor diffusion .....	7
2.6. Metody založené na dialýze .....	9
2.6.1. Mikrodialýza – Microdialysis .....	9
2.7. Metody založené na přímém přesycení roztoku .....	10
2.7.1. Dávková metoda – Batch metod .....	10
2.7.2. Mikrokrystalizace pod olejem – Microbatch under oil .....	11
2.8. Pokročilé metody založené na difuzi .....	12
2.8.1. Metoda volné difuze – Free interface diffusion metod .....	12
2.8.2. Metoda difuze přes překážku – Counter diffusion .....	13
2.9. Metody založené na indukci nukleace využitím fyzikálních vlivů .....	15
2.9.1. Krystalizace proteinů pomocí magnetického pole .....	15
2.9.2. Krystalizace proteinů pomocí elektrického pole .....	16
2.9.3. Krystalizace proteinů za použití ultrazvuku .....	16
2.10. Mikrogravitační krystalizace proteinů .....	17
2.11. Krystalizační metody zahrnující aditiva .....	17
2.11.1. Křížová krystalizace – Cross crystallization metod .....	18
2.12. Očkovací metody .....	19

2.12.1.	Makroočkovací metoda – Macroseeding.....	20
2.12.2.	Očkování pomocí laseru – Laser seeding.....	21
2.12.3.	Mikroočkovací metoda – Microseeding.....	22
2.12.4.	Vlasové očkování – Streak seeding.....	23
2.12.5.	Microseed matrix screening.....	24
2.12.6.	Očkování příbuzným krystalem – Cross seeding.....	24
2.12.7.	Automatizace krystalizačních metod.....	24
2.13.	Serpiny.....	25
2.14.	Modulace aktivity serpinů.....	26
3.	Materiál a metody.....	27
3.1.	Krystalizace serpinu 1 z <i>Ixodes ricinus</i> (Iripin-1).....	27
3.1.1.	Srážecí činidla.....	27
3.1.2.	Vlastní krystalizace Iripin-1.....	27
3.2.	Krystalizace serpinu 3 z <i>Ixodes ricinus</i> (Iripin-3).....	28
3.2.1.	Srážecí činidla.....	28
3.2.2.	Vlastní krystalizace Iripin-3.....	28
3.3.	Testy krystalů.....	29
4.	Výsledky.....	30
4.1.	Výsledky krystalizace serpinu 1 z <i>Ixodes ricinus</i> (Iripin-1).....	30
4.1.1.	Krystalizace Iripin-1 s fondaparinuxem pomocí screenu MORPHEUS® II.....	30
4.1.2.	Krystalizace Iripin-1 s fondaparinuxem pomocí screenu SG1™.....	32
4.2.	Výsledky krystalizace serpinu 3 z <i>Ixodes ricinus</i> (Iripin-3).....	34
4.2.1.	Krystalizace Iripin-3 s heparinem pomocí PGA screen™.....	35
5.	Diskuze.....	40
6.	Závěr.....	42
7.	Literatura.....	43
8.	Seznam obrázků.....	51
9.	Seznam tabulek.....	53

10. Přílohy .....	54
11. Seznam zkratk.....	62

# 1. Úvod

Poznatky o strukturách proteinů pomáhají objasnit fungování a působení těchto látek na molekulární úrovni. Tyto znalosti se dále využívají v mnoha oborech. Účinnou metodou pro získávání informací o trojrozměrné struktuře je rentgenová difrakční analýza. Limitujícím faktorem pro tyto výzkumy je proteinový krystal, který je k analýze nezbytný. Tvorbou krystalů biologických látek se zabývá krystalizace a jde o velmi náročný, nepredikovatelný a zdoluhavý proces. Krystalizace se zabývá hledáním optimálních podmínek pro pěstování krystalů, které by mohly být použity pro strukturní analýzu.

Teoretická část této bakalářské práce popisuje princip krystalizace, krystalizační metody, zaměřuje se hlavně na pokročilé a alternativní. Obsahuje i informace o serpinech a jejich funkcích u parazitických členovců.

Praktická část bakalářské práce se zabývá krystalizačními experimenty s vybranými klíštěcími proteiny, které patří do skupiny serpinů a byly získány z klíštěte *Ixodes ricinus*. Jedná se o serpin 1 z *Ixodes ricinus* (Iripin-1) a serpin 3 z *Ixodes ricinus* (Iripin-3).

Cílem práce bylo:

- Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody
- Nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů vybraných klíštěcích proteinů
- Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly vybraných klíšťových proteinů v difrakční kvalitě
- Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

## 2. Literární přehled

### 2.1. Historie krystalizace

První zmínky o krystalizaci makromolekul se objevily již v roce 1840, kdy byly náhodně objeveny krystaly hemoglobinu v krevních vzorcích [1]. Následně byly pozorovány krystaly globulinů v extraktech ze semen rostlin. Krystalizací těchto látek se aktivně zabýval Tomas B. Osborne, který se pomocí ní snažil tyto látky získat v čisté podobě [2]. V roce 1909 fyziolog Edward T. Reichert a mineralog Amos P. Brown publikovali 600 mikroskopických fotografií krystalů hemoglobinu z 200 organismů s popsány postupy pro získávání těchto krystalů [3]. Krystalizace proteinů se až skoro do 2. poloviny 20. století využívala hlavně k purifikaci. Možnost využití krystalů pro strukturní analýzu přišla až s vývojem rentgenových metod, a tedy se vznikem krystalografie [4].

Vědci si všimli důležitosti solí, organických rozpouštědel, pH a teploty pro krystalizaci, účinky solí se ukázaly jako kritické pro pochopení krystalizace proteinů. Do 30. let 20. století byly krystaly získávány vysoušením a odpařováním surových biologických materiálů, a to zejména z extraktů upravených vodou, alkoholem, horkou kyselinou octovou nebo solemi. Tyto postupy však pracovaly s velkými objemy látek [5].

Postupně byly vyvíjeny nové krystalizační metody, jejichž společnou charakteristikou bylo výrazné snížení objemů, a to přibližně až stokrát. Z mililitrů se požadované objemy vzorků snížily až na mikrolitry. Tato skutečnost umožnila rozsáhlejší průzkum různých krystalizačních podmínek [5].

Jako první byly v 60. letech 20. století vytvořeny metody založené na difúzi par, ve verzi sedící kapky a následně vytvořeny varianty visící a sendvičové kapky. Na počátku 70. let se začaly využívat vylepšené dialyzační metody, které pracovaly s novým uspořádáním, například dialyzační knoflíky [6, 7]. Současně se také zpopularizovala metoda difúze volného rozhraní a s tím i její varianty [8]. Praktickým zájmem byla také miniaturizace dávkové metody na úroveň mikrolitrů. Takové experimenty se provádějí v sedících kapkách pod olejem, aby se zabránilo odpařování [9]. Teoretický základ principu krystalizace vzešel až v 80. letech ze spolupráce biologů a fyziků [5].

Krystalizace od počátků prošla velkými změnami a teoretický základ, otevřel nové cesty pro racionálnější a účinnější postupy, které se používají až do dnešních dob. Od 90. let 20. století byly navrženy nové strategie pro kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení různých kroků procesu růstu krystalů a byly objeveny specifické rysy krystalizace. Automatizace, která



začala v 90. letech se postupně stala nezbytnou. V neposlední řadě dostalo pole krystalizace biologických makromolekul podporu vesmírných agentur, které podporovaly výzkum krystalizace v mikrogravitaci [5].

## 2.2. Úvod do krystalizace

Krystalizace je proces, při kterém se hledají vhodné podmínky pro pěstování proteinových krystalů. Nalezené podmínky se dále optimalizují, tyto úpravy mají vliv na rozpustnost. Účelem tohoto procesu je získání kvalitních proteinových krystalů, které je možné použít pro rentgenovou strukturní analýzu. Při krystalizaci je snahou přivést systém do sníženého stavu rozpustnosti, tedy aby došlo k přesycení roztoku, což je nutnou podmínkou pro vznik proteinových krystalů. Proces krystalizace ovlivňuje velké množství faktorů a mezi nimi i teplotní gradient, který ovlivňuje kondenzaci molekul plynu a kapaliny. Pokud je krystalizační experiment úspěšný získáme proteinové krystaly či stabilní krystalizační jádra. Většina krystalizačních experimentů neposkytne proteinové krystaly a považují se za neúspěšné. Může dojít ke vzniku sraženiny proteinu tzv. precipitaci, také nemusí dojít k žádným pozorovaným změnám a k řadě dalších stavů [10].

Proces krystalizace se skládá ze tří fází, jimiž jsou nukleace, růst a ukončení růstu krystalu. Během nukleační fáze dochází k molekulárním interakcím, které v přesyceném roztoku začnou tvořit stabilní uspořádané agregáty. Tímto procesem vzniknou krystalická jádra či precipitace. Druhou fází je fáze růstu krystalu, při které se krystal zvětšuje. Principem této fáze je interakce molekul s povrchem krystalického jádra a jejich uspořádání na tomto povrchu, tím se postupně krystal zvětšuje. Růst výrazně ovlivňují také faktory jako je pH, teplota, koncentrace a další. Poslední fází procesu krystalizace je ukončení růstu krystalu, kdy se krystal již nadále nemůže zvětšovat. Nejideálnější je ten krystalizační experiment, který poskytne menší množství větších krystalů, které jsou dostatečně kvalitní a vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu [10].

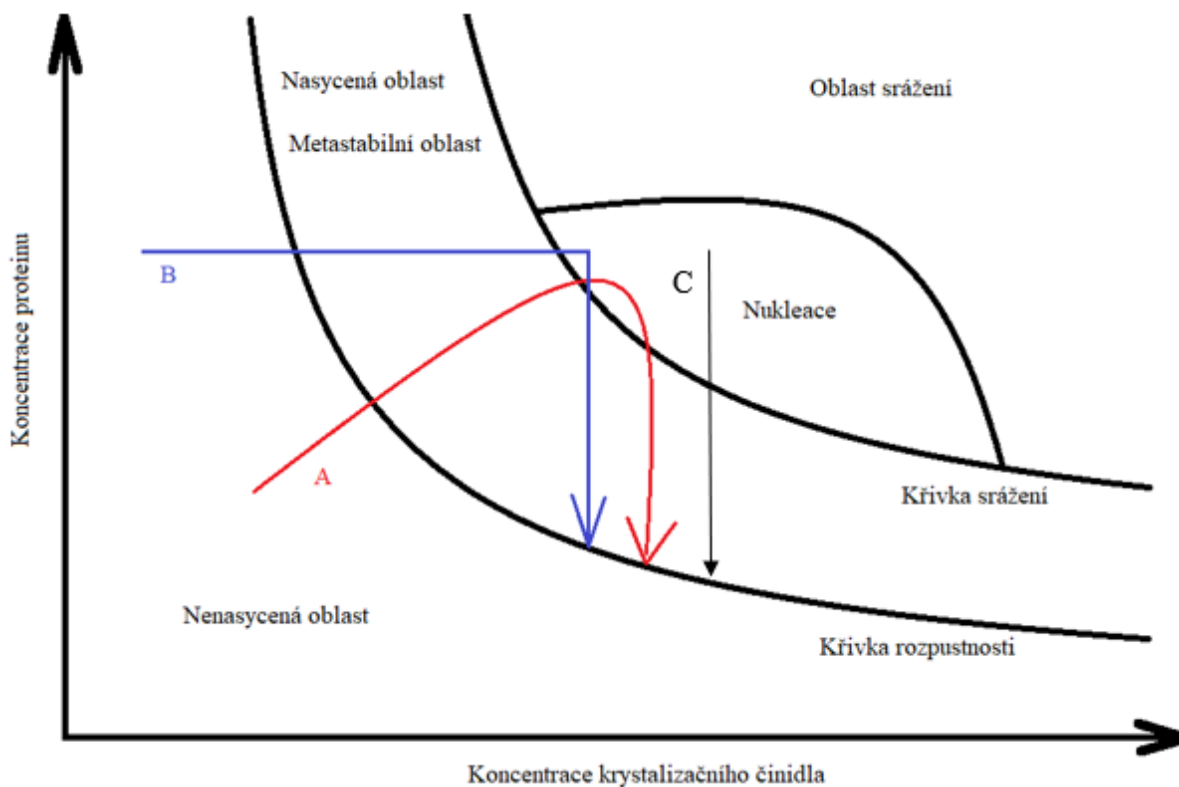
Krystalizace je složitým procesem také kvůli tomu, že neexistuje žádný teoretický návod, který by přesně dokázal předpovědět podmínky pro krystalizaci proteinu. Můžeme tedy čerpat pouze informace z předchozích úspěšných pokusů [11, 12]. V minulosti byly snahy o překonání tohoto problému, testovaly se různé kombinace srážecích látek, solí, organických rozpouštědel a dalších. Tyto snahy vedly k tvorbě komerčně dostupných krystalizačních sad roztoků, které se používají jako startovací bod pro hledání vhodných podmínek krystalizace. Každá z těchto sad má jiný přístup ke krystalizaci proteinů [13, 14].

### 2.3. Podstata krystalizace

Velmi zjednodušeně lze krystalizaci popsat jako formu uspořádaného srážení. Jde o vztah krystalizačního činidla a proteinu, jenž popisuje fázový diagram. Krystalizace probíhá v přesycené oblasti diagramu, nenasycený roztok neumožňuje krystalizaci [15]. Rychlost, s jakou se dosáhne přesycení roztoku, je jedním z nejdůležitějších parametrů v krystalizaci proteinů. Krystalizace je popsána fázovým diagramem, který je na Obr. 1. Stavů přesycení lze dosáhnout okamžitě, a to pomocí dávkových metod (proces znázorňuje C), kdy se smícháním proteinu se srážecím činidlem rovnou dosáhne přesycení roztoku. V roztoku při nastavení správných krystalizačních podmínek dochází k nukleaci a vznikají krystalizační jádra, z nichž následně rostou proteinové krystaly až do doby dosažení křivky rozpustnosti [16]. Přesycení lze také dosáhnout progresivně pomocí difuze par, kontinuálně difuzí či dialýzou [17].

U metod založených na difuzi či dialýze postupně dochází k nasycování roztoku, což se děje buď díky difuzi par (znázornění procesu A) či dialýze (proces B). Následně se dosáhne stavu, kdy dochází k nukleaci a tvorbě stabilních krystalizačních jader. Tato jádra se zvětšují, čímž se snižuje obsah proteinu v rozpouštědle, dokud koncentrace proteinu nedosáhne limitu rozpustnosti. Při těchto procesech nemusí docházet pouze ke krystalizaci proteinu, může dojít i k jeho precipitaci, či ke krystalizaci části krystalizačního činidla [15].

Možným výsledkem krystalizačních experimentů je také stav, kdy kapka zůstává čirá. K tomu dochází, když systém nepřekročí mez rozpustnosti a nedosáhne se tak přesycení. V tomto případě je nemožné získat krystaly. Čirá kapka může být způsobena i nedostatečnou nukleací [14].



Obr. 1: Fázový diagram procesu krystalizace (vytvořeno autorkou, inspirováno [18]).

## 2.4. Krystalizační metody

Ke tvorbě krystalů může dojít pouze za stavu přesycení. Stavů přesycení lze dosáhnout různými způsoby, k čemuž slouží různé krystalizační metody [15, 16]. V průběhu let vývoj krystalizačních metod spíše převážně k jejich automatizaci a miniaturizaci [19].

## 2.5. Metody založené na difuzi par

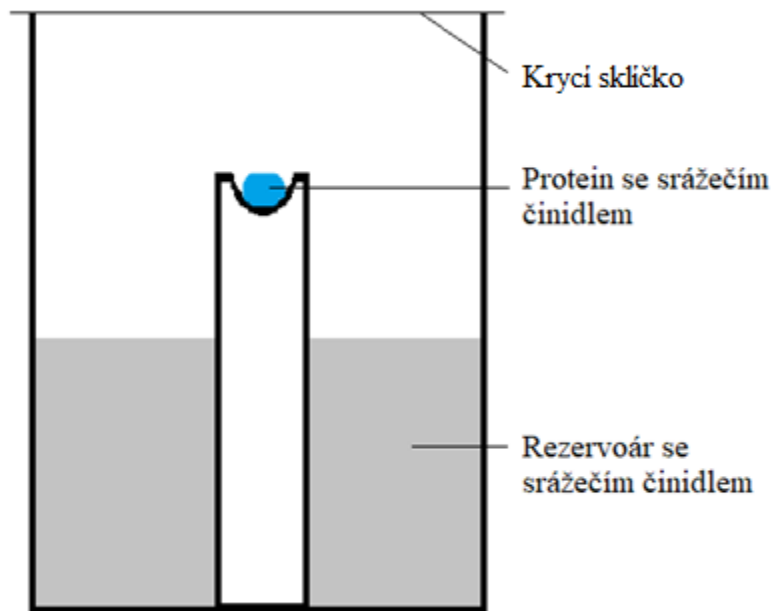
Metody založené na difuzi par přesycení roztoku dosahují vypařováním par rozpouštědla. Při těchto metodách dochází k migraci molekul rozpouštědla z kapky do rezervoáru či obráceně. K transportu molekul dochází na základě rozdílných koncentrací proteinu a precipitačního činidla. Kapka, která obsahuje rozpuštěný protein s odděleným precipitátem je neprodyšně uzavřena od okolního prostředí. Rezervoár a kapka mají stejné složení až na přítomnost proteinu v kapce. Složení precipitačního činidla je v rezervoáru i kapce stejné, kapka navíc obsahuje i proteinový roztok. Díky rozdílným koncentracím v kapce a rezervoáru dochází k vypařování těkavých látek a jejich následné kondenzaci. Tím dojde k dosažení rovnováhy. Metody založené na difuzi par jsou následující: metoda visící, sedící a sendvičové kapky [10].

### 2.5.1. Metoda sedící kapky – Sitting-drop vapor diffusion

Metoda sedící kapky, je jedna z nejpoužívanějších metod krystalizace proteinů [20]. Pro provádění metody se nejčastěji používají krystalizační destičky s 96 jamkami, které umožňují prozkoumání velkého množství krystalizačních podmínek. Destičky obsahují rezervoáry, které se plní srážecími činidly a vyvýšená místa, kde je usazena kapka. Tato místa mohou být na kraji rezervoáru či uprostřed v podobě sloupku, jak je znázorněno na Obr. 2. U jednoho rezervoáru může být více míst pro usazení kapky, což umožňuje vytvoření kapek s různými poměry vzorku a srážecího činidla [21].

Kapka je tvořena směsí proteinového roztoku a srážecího činidla v různých poměrech. Kapka obsahuje nižší koncentraci srážecího činidla než rezervoár. Systém ideálně dosahuje rovnováhy a vyrovnává koncentraci srážecího činidla v kapce a rezervoáru. Dochází k přechodu molekul rozpouštědla z malé kapky do zásobníku, čímž dochází k přesycení roztoku proteinu [20].

Tato metoda je velmi výhodná díky časové nenáročnosti, nízkým nákladům, poloha kapky vsedě je velmi stabilní [20]. Tato metoda je plně automatizovaná a nejčastěji se používá pro screening počátečních krystalizačních podmínek [19].



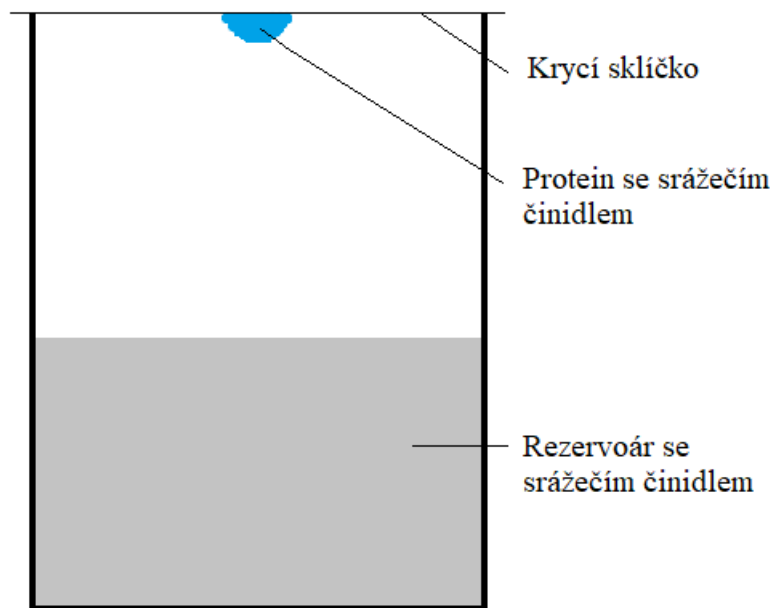
Obr. 2: Schéma metody sedící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).

### 2.5.2. Metoda visící kapky – Hanging-drop vapor diffusion

Metoda visící kapky je jednou z nejpoužívanějších a relativně nenáročných krystalizačních metod. Metoda je schematicky znázorněna na Obr. 3. Při této metodě je kapka proteinu a srážecího činidla nanášena na vnitřní stranu krycího sklíčka, které uzavírá systém.

Krycí sklíčko je umístěno nad rezervoár se srážecím činidlem a utěsněno pomocí silikonového tuku [10].

Nevýhodou této metody je nestabilita kapky při uzavírání systému, může docházet k poklesnutí či dokonce ke sklouznutí kapky. Negativem této metody jsou také velké rozměry destiček [22]. Výhodou naopak je snadné otevírání, což umožňuje snadnou manipulaci. Jednoduše se při této metodě odebírají krystaly či doplňuje množství srážecího činidla a jamky se opět snadno uzavírají stejným sklíčkem [23].



Obr. 3: Schéma metody visící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).

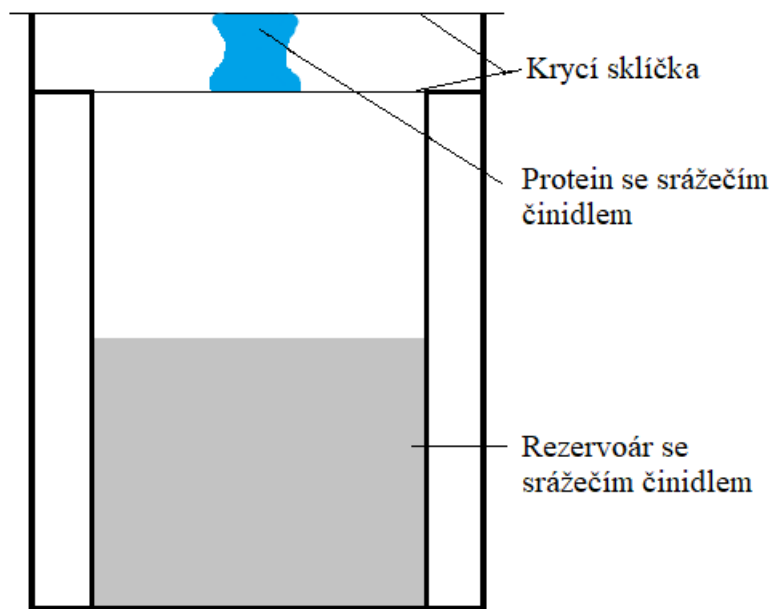
### 2.5.3. Metoda sendvičové kapky – Sandwich-drop vapor diffusion

Metoda sendvičové kapky, znázorněna na Obr. 4, je založena na sevření kapky proteinu se srážecím činidlem mezi dvěma sklíčky. Jedno z těchto sklíček zároveň uzavírá celou jamku [24]. Při této metodě často dochází k vysychání kapek, tomu se zabraňuje pomocí vrchního sendviče ze skla, v případě používání plastů se systém utěšňuje pomocí tuku či parafinového filmu [25, 26].

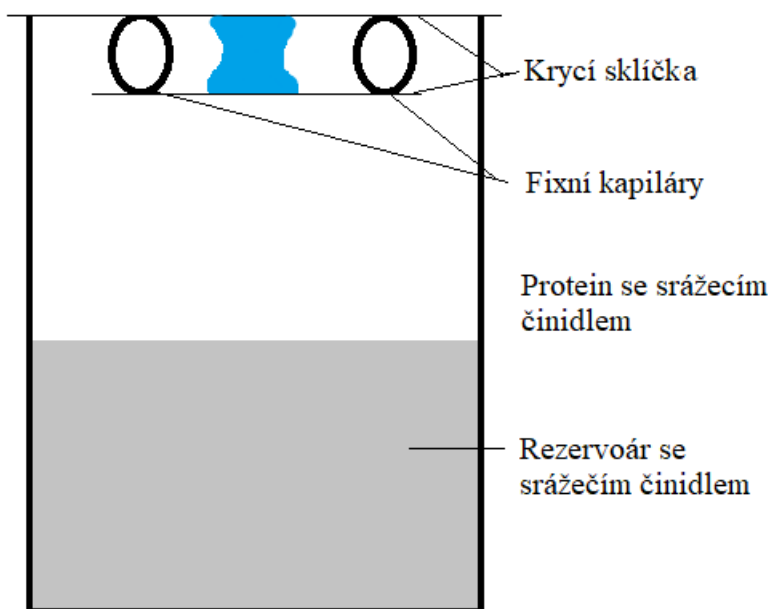
Výhodou této metody je zmenšení povrchu kapky a tím zpomalení difuze par. Kvůli této skutečnosti je prostředí stabilnější pro růst krystalů než u metod sedící i visící kapky [24]. Klasicky používané destičky pro tuto metodu však, znesnadňují přístup ke vzorkům a manipulaci s krystaly [25].

Tato metoda často při stejných krystalizačních podmínkách poskytuje kvalitnější krystaly než metoda visící kapky [22].

Byla popsána nově vyvinutá metoda sendvičové kapky, která umožňuje mnohem snadnější manipulaci a úpravu podmínek systému než klasická metoda. Při této metodě udržují druhé sklíčko na místě takzvané fixní kapiláry, díky čemuž se dá nastavit výška kapky pouze změnou průměru kapilár [22]. Schéma metody podle Sun et al. (2010) je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 4: Schéma metody sendvičové kapky dle Hampton Research (2019) (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).



Obr. 5: Schéma metody sendvičové kapky podle Sun et al., (2010) (vytvořeno autorkou inspirováno [22]).

## 2.6. Metody založené na dialýze

Při metodách založených na dialýze dochází k difuzi malých molekul a iontů přes semipermeabilní membránu, ta odděluje vnitřní roztok s rozpuštěným proteinem, od vnějšího roztoku s precipitátem. Na rozhraní polopropustné membrány se tvoří koncentrační gradient, díky kterému dochází k difuzi molekul přes membránu. Proteinový roztok zůstává uvnitř vnitřního roztoku a dochází k jeho postupnému nasycení, tvorbě krystalických jader a následnému růstu krystalů. Rychlost tvorby jader závisí na rychlosti přesycení, tedy na propustnosti membrány, velikosti koncentračního gradientu a na teplotě [10].

### 2.6.1. Mikrodialýza – Microdialysis

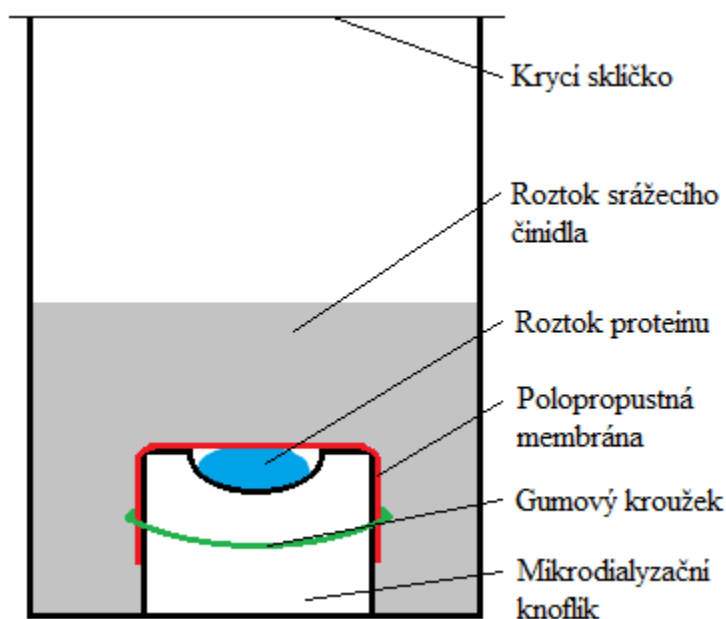
Tato metoda je založena na principu dialýzy, ovšem od klasické dialýzy se liší tím, že pracuje s mnohem menšími objemy. Díky tomu může být prováděna i se vzorky, které jsou k dispozici pouze v omezeném množství. Proteinový roztok je uzavřen buď v kapilárách nebo ve speciálních mikrodialyzačních tlačítkách. Ty jsou od okolního prostředí odděleny polopropustnou membránou. Celé toto uspořádání je poté ponořeno do roztoku srážecího činidla a celý systém je uzavřen. Na stranách membrány jsou dva systémy s odlišnými vlastnostmi a celý systém dosahuje rovnováhy pohybem molekul přes membránu. K tomuto pohybu dochází pouze v případě, že srážecím činidlem je látka s malými molekulami, které mohou proniknout přes membránu. Většinou se jedná o soli či alkoholy. Přes membránu nemůže proniknout vzorek, a proto nedochází ke kontaminaci srážecích činidel, které mohou být znovu použity [27].

Nejčastěji se pro mikrodialýzu používá mikrodialyzační knoflík. Výhodou je nízká nákladnost na objemy vzorků a možnost opakovaného použití. Tato metoda umožňuje velmi snadnou úpravu krystalizačních podmínek [27]. Změna krystalizačních podmínek spočívá pouze v přesunutí knoflíku z jednoho srážecího činidla do druhého a je možno tento proces provádět opakovaně. Díky tomu dochází ke kontinuální recyklaci roztoku vzorku, dokud nejsou nalezeny správné podmínky pro krystalizaci [24].

Vzorek proteinu se vkládá do malé komory umístěné v horní části dialyzačního tlačítka, které je následně překryto dialyzační membránou. Membránu na místě drží gumový kroužek, který se přes knoflík přetáhne a zapadne do otvoru na dialyzačním knoflíku. Poté je takto připravený dialyzační knoflík umístěn do roztoku srážecího činidla [7].

U této metody, jejíž schéma je zobrazeno na Obr. 6, lze ovlivňovat rychlost dialýzy změnou rozdílu koncentrací uvnitř a vně membrány. Metodu nelze provádět s příliš koncentrovanými srážecími činidly, protože v takových případech dochází ke spotřebě

veškeré vody z roztoku proteinu a dochází ke vzniku sraženin. Rychlost dialýzy také záleží na velikosti tlačítka, objemu zásobníku, viskozitě kapaliny a na dalších fyzikálně chemických parametrech [24]. Její rychlost lze snížit, čímž se dosáhne větší kontroly krystalizačního procesu pomocí dvojité dialýzy. Ta se provádí umístěním knoflíku se vzorkem, překrytým dialyzační membránou, do srážecího činidla. Následně je tento zásobník také překryt dialyzační membránou a vložen do srážecího činidla s vyšší koncentrací [28].



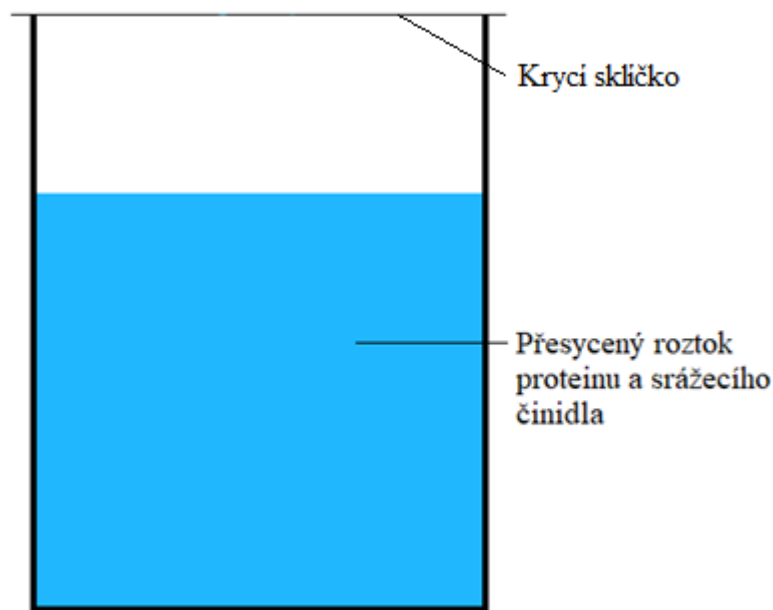
Obr. 6: Schéma mikrodialyzační metody pomocí mikrodialyzačního knoflíku (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

## 2.7. Metody založené na přímém přesycení roztoku

### 2.7.1. Dávková metoda – Batch metod

Dávková metoda je znázorněna na Obr. 7. Při těchto experimentech je přesycení roztoku dosaženo přímo. Vzorek je smíchán se srážecím činidlem, čímž se vytvoří přesycený roztok, který je uzavřen a ponechán bez dalších zásahů. Tato metoda většinou pracuje s většími objemy [24]. Jedná se o nejjednodušší metodu krystalizace, u které se velmi snadno nastavují experimentální podmínky, jsou stabilní a tím umožňují prozkoumání většího množství proměnných. První experimenty touto metodou se prováděly v litrovém měřítku a sloužily k čištění vzorku. V moderních laboratořích se však tato metoda ke krystalizaci proteinů nepoužívá. Během let došlo k jejímu zdokonalení a miniaturizaci. V této podobě se používá v laboratořích a stala se účinnou i pro krystalizaci malých objemů biologických molekul [29].





Obr. 7: Schéma dávkové metody (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

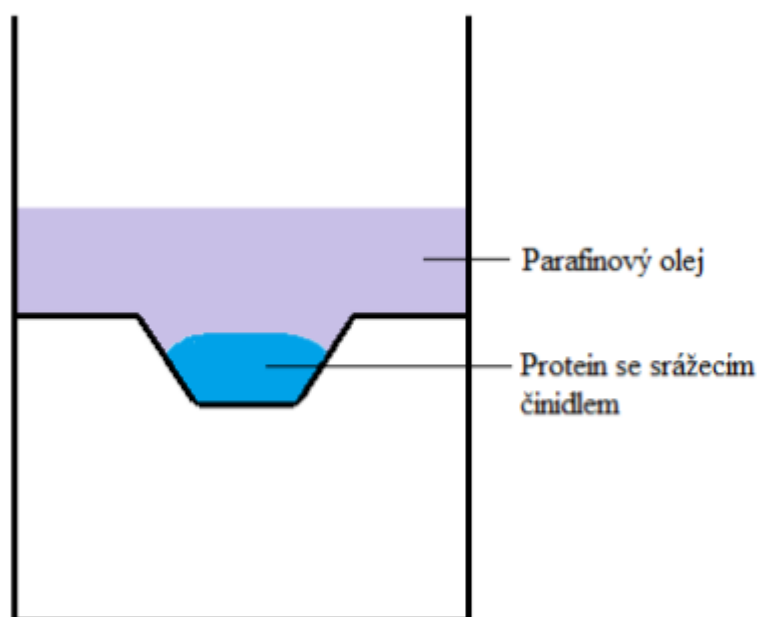
### 2.7.2. Mikrokrytalizace pod olejem – Microbatch under oil

Tato metoda, znázorněna na Obr. 8, je pouze miniaturizovanou formou dávkové metody. Na rozdíl od této metody pracuje s mnohem menšími objemy vzorků. Při této metodě je smíchán proteinový roztok se srážecím činidlem pod olejem s nízkou hustotou. Nejčastěji se používá parafinový, silikonový olej nebo jejich směs [30-32]. Kapka zůstává na dně jamky a je kryta vrstvou oleje, která zabraňuje odpařování kapek a díky tomu je zajištěn konstantní objem vzorku. Olej také zajišťuje neměnnost pH a koncentrace rozpuštěné látky [29]. Stejně jako u dávkové metody je přesycení roztoku dosaženo přímo smícháním proteinového roztoku a srážecího činidla [30].

Mikrokrytalizace pod olejem je ideální pro hledání optimálních krystalizačních podmínek pro proteiny, u kterých je krystalizace obtížná, nebo jsou-li k dispozici v omezeném množství. Nevýhodou této metody je obtížnost získávání proteinových krystalů kvůli přítomnosti oleje [33].

Přítomnost oleje má hlavně zajistit konstantní objem vzorku. Parafinový olej je používán nejvíce, protože během průměrné doby potřebné pro krystalizační experiment se přes něj odpaří pouze zanedbatelné množství vody. I přesto, že jsou voda a oleje nemísitelné, oleje umožňují vypařování vody. K vypařování však dochází mnohem pomaleji než při jeho nepřítomnosti. Rychlost odpařování závisí převážně na typu oleje. Parafinové oleje zabraňují odpařování vody účinněji než ty silikonové [34]. Experimenty odhalily, že přítomnost oleje také ovlivňuje krystalizační proces ve fázi nukleace a růstu krystalů a zvyšuje stabilitu

vzniklých krystalů [31, 35]. Použitím silikonového i parafinového oleje v různých poměrech se krystalizační proces urychlí. Stejného efektu lze dosáhnout i změnou tloušťky oleje [31, 34].



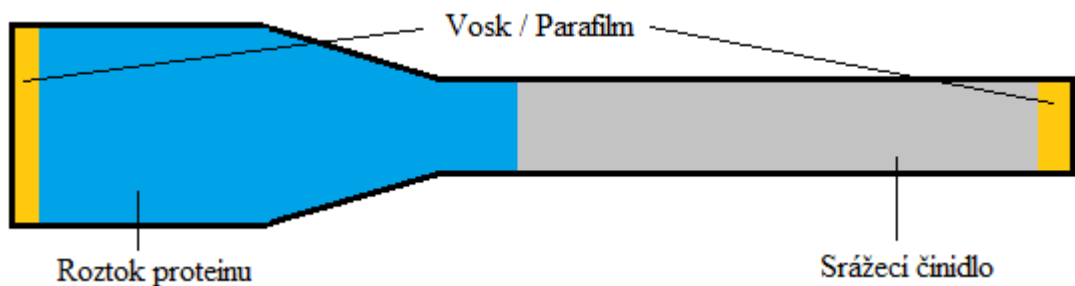
Obr. 8: Schéma metody mikrokystalizace pod olejem (vytvořeno autorkou, inspirováno [23]).

## 2.8. Pokročilé metody založené na difuzi

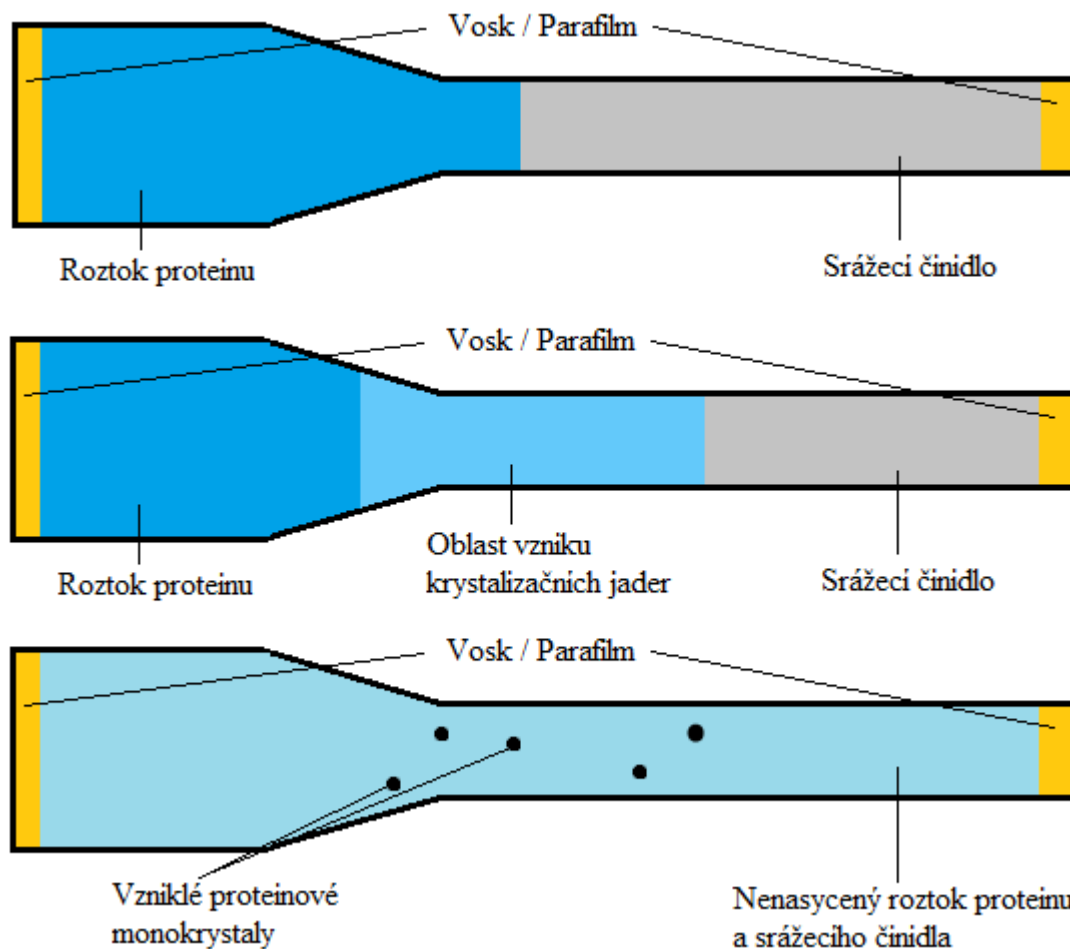
### 2.8.1. Metoda volné difuze – Free interface diffusion method

Tato metoda využívá volnou difuzi mezi koncentrovaným roztokem proteinu a srážecím činidlem. Díky difuzi dochází k nasycení roztoku, což je nezbytné pro nukleaci a následný růst krystalů. Proteinové roztoky a srážecí roztoky jsou vrstveny přímo na sebe do malé zkumavky či do kapiláry. Nádoba je následně uzavřena, aby nedocházelo k vysychání roztoků, nejčastěji pomocí vosku či parafilmu. Na začátku je znatelné rozhraní mezi roztoky, poté však dochází k difuzi molekul v místě styku. Vzniká přechodné přesycení roztoku, což vede k tvorbě krystalizačních jader. Jak difuze pokračuje, klesají relativní koncentrace až dosáhnou rovnováhy. V rovnovážném stavu je koncentrace celého objemu podstatně nižší než koncentrace potřebná ke krystalizaci proteinu. To zapříčiňuje, že krystaly rostou velmi pozvolna a vzniká menší množství velkých krystalů. Tato metoda je poměrně jednoduchá a umožňuje velmi snadnou manipulaci [8].

Metoda volné difuze je používána vesmírnou agenturou NASA pro mikrogravitační krystalizační pokusy [36]. Schéma metody volnou difuzí v kapiláře je na Obr. 9 a na Obr. 10 je graficky znázorněn proces krystalizace pomocí metody volné difuze.



Obr. 9: Schéma metody volné difuze v kapiláře (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

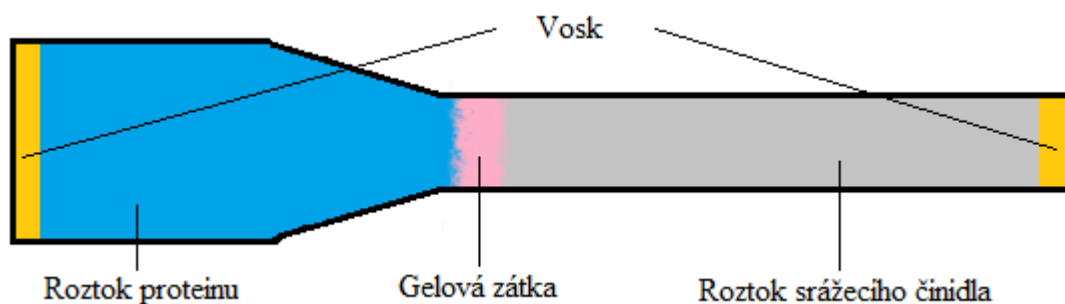


Obr. 10: Proces krystalizace proteinů pomocí metody volné difuze (vytvořeno autorkou, inspirováno [23]).

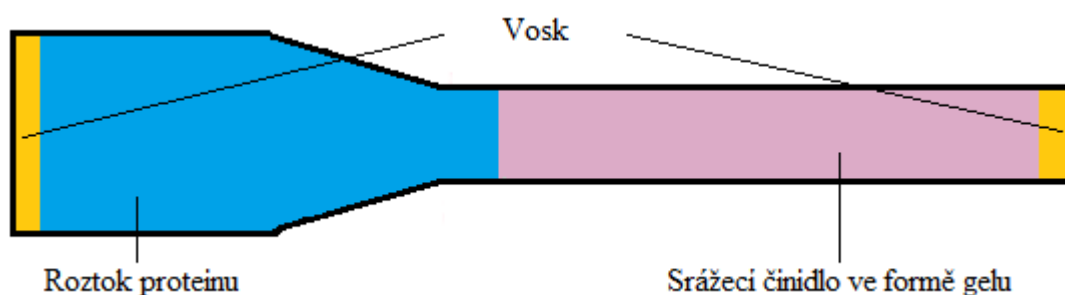
### 2.8.2. Metoda difuze přes překážku – Counter diffusion

Metoda difuze přes překážku je modifikací metody volné difuze, která je také prováděna v kapilárách. Při této technice však nedochází k volné difuzi, ale molekuly difundují přes překážku, kterou tvoří gel [24]. Metoda může být prováděna několika způsoby. Jedním ze způsobů je využití gelové zátky, která odděluje roztok srážecího činidla a roztok proteinu. Schéma provedení metody s gelovou zátkou je zobrazeno na Obr. 11. Také je možno jeden z těchto roztoků nechat zgelovatět před zavedením do kapiláry, schéma této techniky je

na Obr. 12 [37]. Nejčastěji se však využívá metoda GAME, krystalizace za přítomnosti gelu [38].

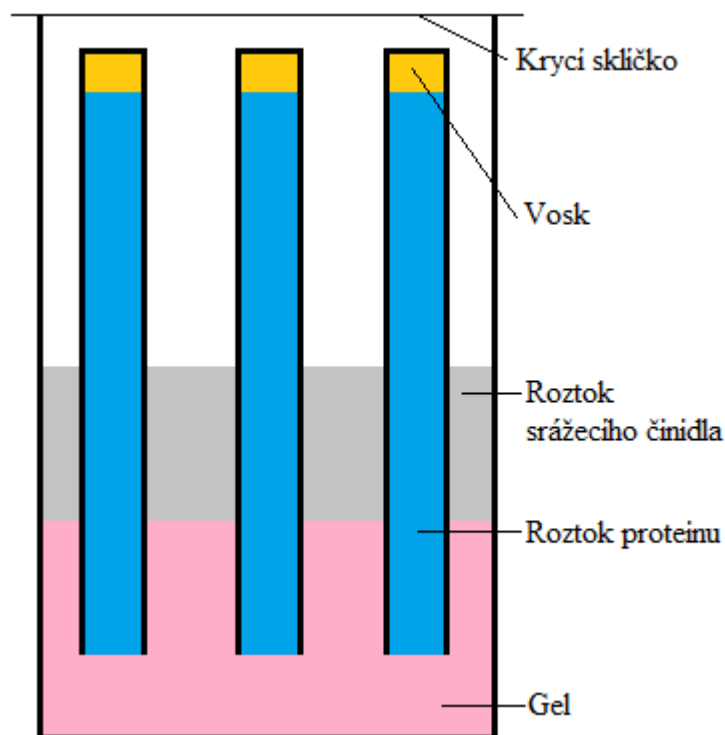


Obr. 11: Schéma metody difuze přes překážku. Technika oddělení roztoků gelovou zátkou (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).



Obr. 12: Schéma metody difuze přes překážku. Technika, kdy srážecí činidlo je ve formě gelu (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

U techniky GAME, která je zobrazena na Obr. 13, je krystalizační nádoba naplněna roztokem, který se nechá zgelovat. Do tohoto gelu jsou poté vtlačeny konce kapilár, které jsou naplněny proteinovým roztokem a druhé konce mají utěsněny často pomocí vosku. Následně je gel překryt roztokem srážecího činidla. Celý systém je uzavřen a udržován při konstantní teplotě. Postupně dochází k difuzi srážecího činidla přes gel do roztoku proteinu. Po prostoupení srážecího činidla do roztoku proteinu dochází k přesycení roztoku a dochází ke vzniku mikrokrytalů. Koncentrace následně klesá a díky tomu, stejně jako u metody volné difuze, dochází ke vzniku několika větších krystalů. Při této metodě je důležitou proměnou tloušťka kapiláry, která ovlivňuje rychlost difuze [39].



Obr. 13: Schéma metody counter diffusion. Technika GAME (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

## 2.9. Metody založené na indukci nukleace využitím fyzikálních vlivů

Takovéto metody jsou založeny na indukci nukleace vystavením krystalizačního prostředí specifickým fyzikálním podmínkám. Může se jednat o vystavení kapky elektrickému, magnetickému poli nebo působení ultrazvuku na krystalizační prostředí. Takovéto fyzikální vlivy příznivě působí na nukleaci a na vznik proteinových krystalů [40].

### 2.9.1. Krystalizace proteinů pomocí magnetického pole

Tyto metody využívají působení magnetické pole, k tvorbě proteinových krystalů za sníženého času nutného ke krystalizaci. Pro tyto experimenty mohou být použity dva typy magnetického pole, rovnoměrné a gradient magnetického pole [41].

Přesné vysvětlení působení rovnoměrného magnetického pole na krystalizaci proteinů není známo. Nejspíše ale souvisí se zvyšováním viskozity tekutiny, které vyvolává. Působením homogenního magnetického pole dochází ke zvýšení viskozity tekutiny až o 30 %. Tato změna přetrvává i po vypnutí magnetického pole. Zvýšením viskozity je podpořena krystalizace [41].

Gradient magnetického pole působící na krystalizační prostředí tlumí gravitační vlivy a tím zlepšuje podmínky pro krystalizaci proteinů [42]. Působením gradientu vertikálního

magnetického pole na vzorek se tvoří magnetická síla. Tato síla by měla být opakem ke gravitační síle, čímž dochází ke snížení gravitace a vytváří se situace podobná podmínkám mikrogravitace [43]. Tímto postupem lze získat menší počet kvalitnějších krystalů [41].

### **2.9.2. Krystalizace proteinů pomocí elektrického pole**

Tato metoda využívá vlivu vnějšího elektrického pole na nabitě molekuly uvnitř krystalizačního roztoku [44].

Biologické makromolekuly obsahují různé iontové a polární skupiny. Díky tomu mají poměrně značný náboj, který závisí na pH roztoku [45]. Nabitě molekuly uvnitř roztoku interagují s extrémním vnějším elektrickým polem. Tato interakce může změnit rozložení molekul uvnitř roztoku a vést k nukleaci. Vnější silné elektrické pole podporuje krystalizaci proteinů a mírně snižuje počet vzniklých krystalů v kapce. Použití elektrického pole se také pojí s dobrou kvalitou a velikostí vzniklých krystalů [44].

Tato metoda se provádí umístěním sedící kapky mezi dvě elektrody, aniž by se jich dotýkala. Následně je generováno silné elektrické napětí, které přesahuje 1000 V. Toto napětí způsobí migraci nabitých molekul uvnitř kapky směrem k elektrodám. Vznikají krystaly, které se hromadí u jedné z elektrod v závislosti na jejich náboji. K tvorbě krystalů dochází i v blízkosti povrchu kapky, protože zde je elektrické pole nejsilnější. Experimenty využívající pro nukleaci proteinů elektrické pole, poskytují menší počet proteinových krystalů. Krystaly vzniklé za působení elektrického pole mají méně defektů a jsou podstatně větší [44].

### **2.9.3. Krystalizace proteinů za použití ultrazvuku**

Ultrazvukové pole je dalším fyzikálním faktorem, jenž ovlivňuje a usnadňuje nukleaci. Tato metoda také slouží pro studium procesu nukleace. Vystavení systému vnějšímu ultrazvukovému signálu je možné praktikovat různými způsoby. Základním předpokladem pro jeho aplikaci je nutnost udržování stálé teploty systému, aby nedocházelo k zahřívání, a tím k denaturaci proteinu. K tomuto účelu se nejčastěji používá chladicí lázeň, která zajišťuje stálou teplotu systému [46].

Působení ultrazvuku na krystalizační prostředí podporuje nukleaci krystalů. Nevýhodou této metody je poškozování jader ultrazvukem, které záleží na době a míře ozáření. Nejideálnější nastavení je takové, kde je systém ultrazvukovému signálu exponován pouze krátce, čímž je podpořena nukleace a zároveň nedojde k poškození vzniklých jader [47].

## 2.10. Mikrogravitační krystalizace proteinů

Neustálá snaha o vývoj nových a spolehlivých krystalizačních metod, které by zefektivnily proces krystalizace, vedla k optimalizaci všech příslušných fyzických parametrů. Na základě studií podporovaných NASA a dalšími kosmickými agenturami různých zemí bylo jasně prokázáno, že gravitační efekty musí být zahrnuty jako klíčový krystalizační parametr [48]. Tyto metody pracují se sníženou hodnotou gravitace během procesů krystalizace.

Pro zkoumání gravitačních vlivů jsou experimenty prováděny v prostředí mikrogravitace. Toto prostředí je možné simulovat na Zemi, ale nejideálnější je proces krystalizace zkoumat ve vesmíru, kde je působení gravitačních sil nižší [48]. Ukázalo se, že krystaly pěstované ve vesmíru jsou v mnoha ohledech lepší než ekvivalentní krystaly pěstované v laboratořích na Zemi. Krystaly pěstované v mikrogravitaci dosahují průměrně větších rozměrů a mají lepší kvalitu. Tyto krystaly jsou méně zatíženy defekty a také obsahují méně nečistot [49].

Při vyšších koncentracích má většina makromolekul sklon k tvorbě agregátů, které mohou znečistit vznikající krystaly proteinů jejich začleněním do krystalické mřížky. V mikrogravitačním prostředí je jejich pohyb značně snížen a tím je snížena i pravděpodobnost interakce s rostoucími proteinovými krystaly [49].

## 2.11. Krystalizační metody zahrnující aditiva

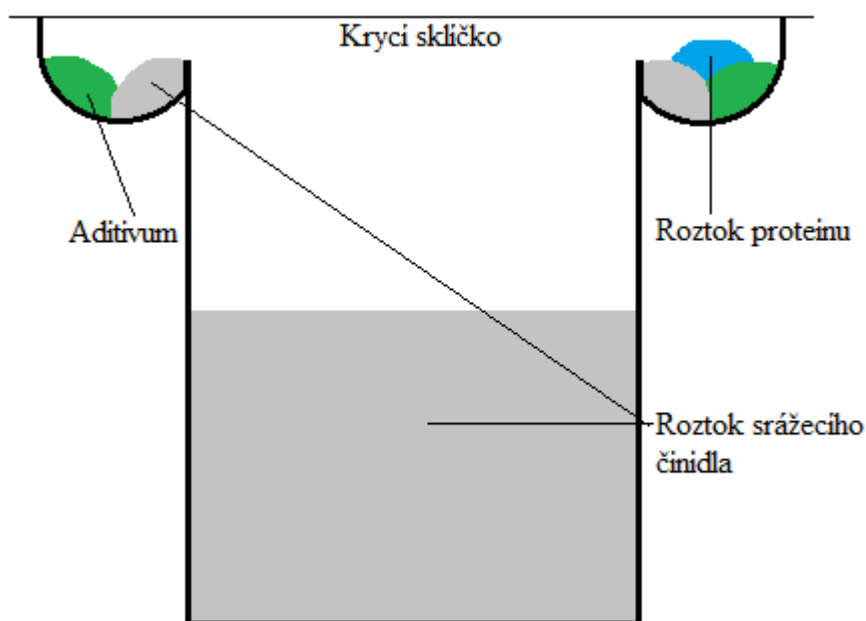
Alternativní metody za použití aditiv, založené nikoli na optimalizaci tradičních proměnných, jako je koncentrace srážecího činidla, proteinu a hodnotě pH, ale na myšlence že některé látky s malými molekulami, mohou příznivě ovlivňovat krystalizaci, a to díky jejich vlivu na různé procesy během krystalizace [50]. Tyto látky, které nejsou srážecím činidlem a do systému se přidávají záměrně, jsou označovány jako aditiva, bez ohledu na jejich koncentraci [51]. Aditiva se mohou na proteiny vázat, a tím celou strukturu stabilizovat. Tyto látky též ovlivňují mezimolekulární interakce, čímž stabilizují konformaci proteinů a také redukuje mezimolekulární interakce mezi molekulami srážecího činidla a proteinu. Aditiva využívaná pro tyto účely jsou rozpustná ve vodě, většinou se jedná o kofaktory, inhibitory, ionty kovů, substrátové skupiny či detergenty [50, 52]. Aditiva by měla zvýšit úspěšnost krystalizačních pokusů, díky využívání fyzikálně chemických vlastností krystalizace proteinů. Přesto úspěšné stanovení podmínek krystalizace pro konkrétní protein zůstává vysoce empirickým procesem. Aditiva jsou vhodná hlavně pro optimalizaci krystalizačních podmínek [53, 54].

### 2.11.1. Křížová krystalizace – Cross crystallization metod

Křížová krystalizace je metoda, které pracuje s aditivu [53]. Při tomto postupu se využívá standartní metoda difuze par v podobě sedící či visící kapky. Do systému jsou přidány aditiva v podobě dalších kapek a mírně mění tlak páry vody, čímž ovlivňují ostatní přítomné kapky, a tedy i vzorek proteinu [54].

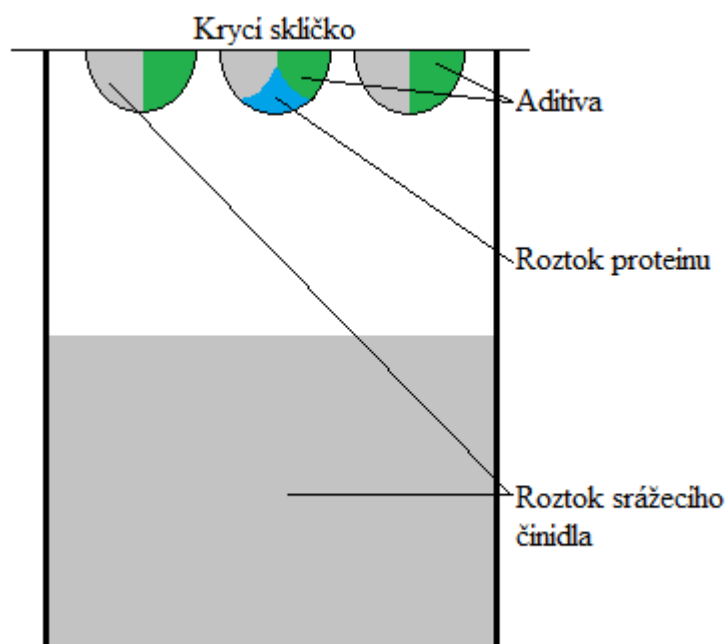
Používají se klasické krystalizační destičky s jedním centrálním rezervoárem, který je obklopen čtyřmi jamkami. Každá z jamek obsahuje srážecí činidlo a různá aditiva, do jedné z jamek je navíc přidán protein. Při použití visící kapky jsou kapky umístěny na krycí sklíčko systému, jsou však blíže u sebe [54].

Metoda křížové krystalizace je zobrazena na Obr. 14 ve formě sedící kapky a na Obr. 15 ve formě visící kapky.



Obr. 14: Schéma metody křížové krystalizace ve formě sedící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [54]).





Obr. 15: Schéma metody křížové krystalizace ve formě visící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [54]).

## 2.12. Očkovací metody

Jedním z paradoxů krystalizace je velký rozdíl mezi ideálními podmínkami pro vznik proteinových krystalů a pro jejich následný růst. Spontánní nukleace je pravděpodobnější, když je úroveň přesycení roztoku vysoká, zatímco pro pomalý uspořádaný růst velkých krystalů je ideální nižší hladina přesycení. Ideální experiment by měl poskytovat co nejpríznivější podmínky pro obě tyto fáze. Aby bylo dosaženo obou požadavků, je nutné oddělit proces nukleace od růstu, což umožňuje metoda očkování. Princip očkovacích metod spočívá v přenesení dříve vzniklých krystalů nebo krystalických materiálů do nových kapek s nižšími úrovněmi přesycení, kde slouží jako krystalizační jádra. Tím se snižuje čas potřebný k pěstování krystalů [55].

Nový roztok, do kterého jsou jádra zaváděna, má takovou úroveň nasycení, že umožňuje růst krystalů proteinů z jader, ale neumožňuje nukleaci. Umístění jader nebo roztoku jader do kapky s nižší úrovní nasycení umožňuje pomalejší růst krystalů s nižší pravděpodobností vzniku defektů. Díky tomu tyto metody poskytují větší a kvalitnější proteinové krystaly. Řízením počtu jader zavedených do kapky lze upravovat počet pěstovaných krystalů. U přenášení malých krystalů, kde nejde regulovat, jaké množství přeneseme, se počet jader upravuje pomocí série ředění koncentrovaného původního materiálu [56].

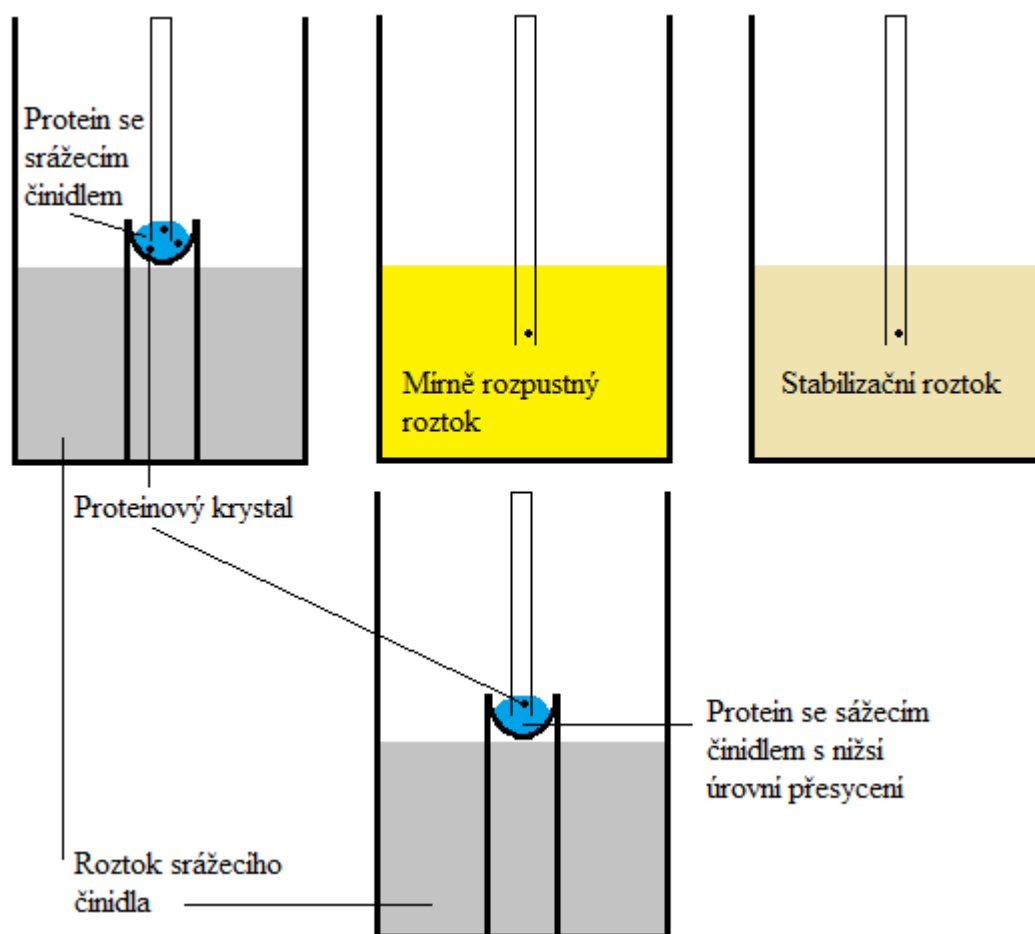
Kvalita krystalů, které budou při těchto experimentech vznikat je ovlivněna kvalitou původních krystalů, které byly k očkování použity. Celkovou kvalitu lze zlepšit opakovaným očkováním, ke kterému se vybírají ty nejkvalitnější dostupné krystaly [57, 58].

### **2.12.1. Makroočkovací metoda – Macroseeding**

Princip této metody spočívá v zavedení jediného krystalu do nových podmínek, které neumožňují nukleaci, ale jsou optimální pro růst krystalu. Tato metoda pracuje s velkými krystaly obvykle o velikostech 5–50  $\mu\text{m}$  [55]. Z původního prostředí se vyjme krystal za použití kapiláry. Vyjmutý krystal se několikrát promyje v mírně rozpustném roztoku, aby se zbavil nečistot. Krystal je následně omyt stabilizačním roztokem, aby se zabránilo dalšímu rozpouštění. Ze stabilizačního roztoku se krystal zavádí do nového prostředí [56].

Makroočkování je náročnější očkovací metodou, protože vyžaduje zdlouhavé převody mateřského krystalu, manipulace s krystaly je náročnější. Navíc se musí pečlivě vybírat vhodná koncentrace rozpouštěcího roztoku. Tato metoda je výhodná zejména pokud chceme dosáhnout zvětšení krystalu [55].

Proces makroočkovací metody je zobrazen na Obr. 16.



Obr. 16: Schéma procesu makroočkovací metody (vytvořeno autorkou, inspirováno [56]).

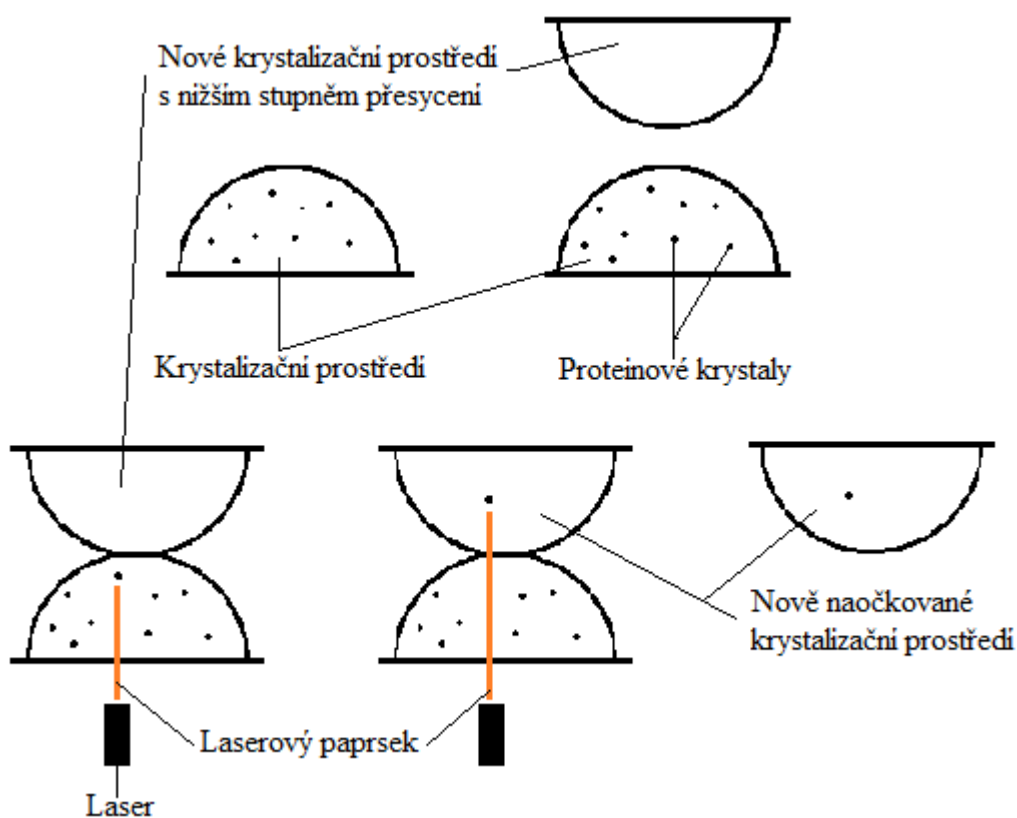
### 2.12.2. Očkování pomocí laseru – Laser seeding

Očkování pomocí laseru zjednodušuje manipulaci s krystaly a usnadňuje očkování nových krystalizačních podmínek. Metoda využívá optické síly generované zaostřeným laserovým paprskem k výběru a přenosu jednotlivých mikroskopických očkovacích krystalů [59]. Očkování pomocí laseru je zobrazeno na Obr. 17.

Nad kapku, která obsahuje očkovací krystaly se umístí kapka s novým prostředím, do které se budou očkovací krystaly přenášet. Mezi těmito kapkami se postupně zmenšuje vzdálenost, až dojde k jejich spojení a vzniká jedna sendvičová kapka. Takto připravená kapka je vystavena laserovému paprsku, který do ní vstupuje svisle zespodu a je zaostřen na jádro vybrané pro přenos do nového prostředí [59].

Výkon laseru se postupně zvyšuje, dokud nedojde k přenosu vybraného očkovacího krystalu k vrcholu kapky. Když částice dosáhne úrovně horního sklíčka, krycí sklíčka jsou od sebe oddělena a opět vznikají dvě kapky, přičemž vybraný krystal je zachycen v kapce visící z horního krycího sklíčka. Zásobní krystaly nevybrané laserem, zůstávají v původní kapce. Naočkováná kapka je použita jako visící kapka při metodě difúze par [59].

Tato metoda výrazně zjednodušuje makroočkování a umožňuje použití extrémně malých, ale individuálně odlišitelných jader. Přenos krystalů je jednoduchý, efektivní a časově nenáročný [59].



Obr. 17: Schéma procesu očkování pomocí laseru (vytvořeno autorkou, inspirováno [55]).

### 2.12.3. Mikroočkovací metoda – Microseeding

Mikroočkovací metody pracují s malými krystaly, které jsou před zavedením do proteinového roztoku s nižším stupněm přesycení rozdrceny [55]. Tato metoda má tři základní kroky, přípravu očkovacího materiálu, opakované ředění a samotné očkování [56].

Pro přípravu očkovacího materiálu se tři nebo čtyři malé krystaly promyjí v mírně rozpustném roztoku, aby se odstranily povrchové vady nebo amorfní sraženina na povrchu krystalu. Krystaly se poté stabilizují v příslušném srážecím roztoku a následně se rozdrtí. Poté jsou vloženy do dalšího stabilizačního roztoku, který slouží k promytí jader z rozdrcených krystalů. Takto získaný roztok se označuje jako očkovací materiál. Ve většině případů lze takto připravenou směs skladovat pro budoucí použití. Tento roztok se postupně ředí, čímž se zajišťuje, aby do každého nového experimentu bylo zavedeno jen malé množství krystalických jader. Díky tomu v nové kapce po naočkování vzniká malý počet velkých krystalů. Roztoky vzniklé ředěním obsahují různý počet krystalických jader, optimálně se však tento počet pohybuje mezi 2-10 a 7-10 krystalickými jádry. Takto připravené roztoky jsou zaváděny do

nového prostředí [56]. Nevýhodou mikroočkovacích metod je obtížnost kontroly přesného počtu jader, která jsou zaváděna do nového prostředí [55].

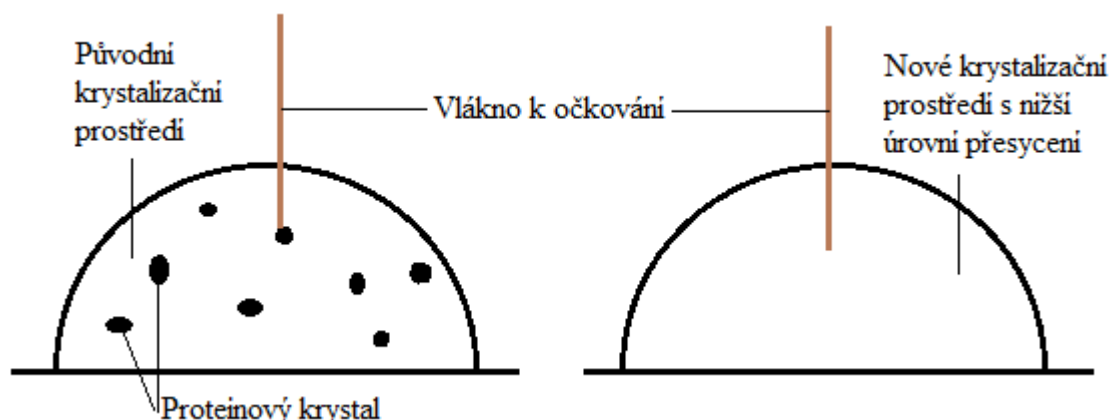
#### 2.12.4. Vlasové očkování – Streak seeding

Jedná se o velmi oblíbenou metodu očkování, která se nejčastěji provádí formou sedící kapky. Při této metodě se používá vlákno, pomocí, kterého se přenáší krystalická jádra do nového krystalizačního prostředí. Toto vlákno je připevněno na tyčince a nejčastěji je zvířecího původu [56]. Nejpoužívanější jsou chlupy z koňských ocasů, protože mají stejnou šířku v celé své délce, díky čemuž je množství přenesených krystalických jader dobře reprodukovatelné. Oblíbené jsou také kočičí vousy pro jejich tvrdost a také možnost je nařezat na vlákna o různých šířkách [55].

Vlákno se použije k dotyku již existujícího krystalu, čímž se uvolní krystalická jádra a není tedy nutné krystal rozbít. Některá jádra zůstávají připojena k vláknu, které je vytaženo svisle z roztoku. U této metody úhel dotyku vlákna roztoku ovlivňuje množství zachycených krystalizačních jader, proto se povětšinou udržuje vlákno kolmo k roztoku, aby množství přenesených jader bylo co nejvíce reprodukovatelné. Vlákno je následně protaženo novou kapkou, přičemž se zachycená jádra uvolní do nového prostředí. Krystaly, které v nové kapce vznikají, kopírují dráhu protažení vlákna kapkou [56].

Tato metoda může být použita také pro očkování nových kapek u metody mikroočkování. V takovém případě nepřichází vlákno do kontaktu s krystalem ale s připraveným očkovacím roztokem [56].

Metoda vlasového očkování je na Obr. 18.



Obr. 18: Schéma procesu metody vlasového očkování (vytvořeno autorkou, inspirováno [56]).

### **2.12.5. Microseed matrix screening**

Jde o formu mikroočkování při které jsou krystalická jádra, vytvořená za určitých krystalizačních podmínek, přenesena do zcela nových krystalizačních podmínek. Ty se od původních neliší pouze úrovní přesycení, jak je to u očkovacích metod běžné, ale i typem srážecího činidla. Pokusy o produkci krystalů v těchto nových podmínkách bez přítomnosti jader bývají neúspěšné. Hlavní podmínka pro úspěšnou krystalizaci je tedy přítomnost krystalizačních jader [60]. Provádění této metody je v podstatě stejné jako u metod založených na difúzi par. Rozdíl je pouze v tom, že se do každé kapky k proteinu a zásobnímu roztoku přidává navíc i očkovací materiál. Nejprve se tento experiment provádí s neřaděným očkovacím roztokem, při dalších pokusech se roztok může ředit, čímž se ovlivňuje množství a velikost krystalů, které budou v novém prostředí vznikat [61].

Použití této metody vede k nárůstu počtu podmínek úspěšné krystalizace. Často dochází ke zlepšení kvality krystalů a zkracuje se doba nutná pro vznik krystalů [62].

### **2.12.6. Očkování příbuzným krystalem – Cross seeding**

Při této metodě se krystalý či jejich fragmenty používají jako nukleanty pro usnadnění krystalizace příbuzných proteinů [55]. Při heterogenní nukleaci se využívají materiály, které interagují s proteiny a snižují energetickou bariéru nukleace. Umožňují tak vznik krystalizačního jádra při nižším stupni přesycení, který je ideální pro růst krystalů [63].

U této metody se dříve získaný krystal či jeho fragment vloží do nového roztoku, který tvoří srážecí činidlo a protein, který je příbuzný k proteinu, jenž tvoří krystal [56]. Krystal vložený do prostředí příbuzného proteinu slouží jako nukleační činidlo a podporuje nukleaci příbuzného proteinu [55].

### **2.12.7. Automatizace krystalizačních metod**

Automatizace je proces, při kterém provádění pokusů přebírají úplně či částečně stroje, v tomto případě s jedná o krystalizační roboty. Dochází ke zjednodušení pokusů, snižuje se jejich časová náročnost a také spotřeba vzorků. Protože se pracuje s menšími objemy roztoků, snižují se i náklady. Ruční provádění krystalizačních experimentů je zdoluhavé a vzhledem k enormnímu počtu možných experimentálních podmínek také časově neefektivní [19].

První krystalizační experimenty s daným vzorkem mají za úkol prozkoumat co nejvíce krystalizačních podmínek. Tento proces se nazývá počáteční screening a je prováděn se speciálně vytvořenými komerčními krystalizačními sadami roztoků, tzv. screening kity [14]. Pro tuto fázi experimentů se krystalizační roboti využívají nejvíce, protože umožňují provedení těchto experimentů ve velkém měřítku s velmi malou spotřebou vzorků.

Krystalizační roboti jsou schopni pracovat s objemy 50-1000 nl. Při práci s malými objemy je však nutné pamatovat i na vyšší rychlost vypařování kapek [19].

Krystalizační roboti umožňují různé stupně automatizace krystalizačních pokusů, lze je využít i pro optimalizaci specifických krystalizačních podmínek. Pracují se speciálními krystalizačními destičkami, které jsou uzpůsobeny nejčasněji pro metodu sedící kapky či krystalizaci pod olejem. Krystalizační destičky mají nejčastěji 72 či 96 jamek pro různé krystalizační podmínky [64]. Krystalizační roboti se dělí podle toho, zda je u nich nutné ručně naplnit rezervoáry srážecím činidlem či tento krok zvládnou samostatně. Roboti, u kterých je nutné ruční naplnění rezervoárů jsou mnohem flexibilnější v nastavení poměru míchání proteinu a srážecího činidla. Roboti, kteří dokáží rezervoáry naplnit srážecím činidlem sami, takovou míru flexibility nemají, ovšem jsou mnohem samostatnější a někdy dokáží krystalizační destičku i sami uzavřít [19].

### **2.13. Serpiny**

Serpiny jsou velkou, široce rozšířenou skupinou proteinů. Vyskytují se u vyšších zvířat, hlístic, hmyzu, rostlin i virů. Serpiny jsou inhibitory proteáz [65]. Na rozdíl od dalších skupin inhibitorů proteáz dojde u serpinů k výrazné konformační změně při inhibici cílových enzymů [66]. Všechny proteiny patřící do skupiny serpinů, mají velmi podobný strukturní základ [67]. Obsahují charakteristickou reaktivní středovou smyčku, která umožňuje interakci s cílovými enzymy. Tato základní oblast je přítomna ve všech serpinech, ovšem její reaktivita je různá. V některých případech dochází k omezení její přístupnosti, čímž se výrazně snižuje či úplně zaniká inhibiční aktivita proteinu [68, 69]. Serpiny s inhibiční funkcí mohou reagovat s cílovými enzymy pouze jednou. Při interakci enzymu se serpinem dochází ke štěpení specifické peptidové vazby, nazývané scissilní vazba, uvnitř reaktivní středové smyčky proteinu, čímž se mění jeho celková konformace. Dochází ke vzniku kovalentní vazby a tím pádem je inhibice ireverzibilní [70, 71].

Zajímavé funkce zastávají serpiny u členovců. Přesto že většina serpinů členovců je produkována a vylučována do hemolymfy za účelem regulace vnitřních fyziologických procesů, několik serpinů se nachází v extracelulárních tekutinách produkových speciálně pro přenos do jiných organismů, včetně slin a jedu. Tyto serpiny se vyskytují hlavně u parazitických členovců a slouží k manipulaci s fyziologií hostitele. Hlavním účelem je zajištění příznivého prostředí pro příjem živin a přežití. Tuto strategii využívají hlavně členovci, kteří se živí krví. Ti používají své sliny k regulaci hemostatických a protizánětlivých procesů v krvi hostitele [72].

Klíšťata patří mezi krev sající ektoparazity a vytváří velké množství serpinů, které jim umožňují tento způsob života. Za účelem získání krve vylučují klíšťata prostřednictvím slin stovky různých látek do těla hostitele. Tyto molekuly mají antihemostatické, protizánětlivé, antikomplementové a imunomodulační vlastnosti. Jejich funkcí je překonat či obejít obranné mechanismy hostitele, a to včetně imunitní odpovědi. Serpiny se v klíštěcích slinách objevují nejhojněji a jsou odpovědné za modulaci mnoha různých obranných drah hostitele, nejčastěji inhibují prozánětlivé a prokoagulační proteázy hostitele [73, 74].

## **2.14. Modulace aktivity serpinů**

Aktivita některých serpinů je modulována glykosaminoglykany, mezi které patří heparin a příbuzný fondaparinux [75]. Tyto látky se navazují na serpin, s nímž tvoří komplex, a slouží k přemostění na proteázu. Kvůli této vlastnosti zvyšují rychlost vzniku vazby serpin-proteáza. Pověšinou tyto látky mají schopnost zvýšit rychlost vzniku vazby v případě, že přirozená konformace serpinu má nízkou aktivitu a při vazbě s glykosaminoglykany vzniká výhodnější konformace [76]. Tato získaná stabilnější konformace nejen že pomáhá zlepšovat funkci proteinu, ale také má pozitivní vliv na krystalizaci. Komplex, který vzniká po navázání ligandu na reaktivní místo proteinu je stabilnější, což usnadňuje jeho krystalizaci [52]. Jednou z běžných metod získávání krystalů komplexu protein-ligand je kokrystalizace, kdy se ligand přidává k proteinu za vzniku komplexu, který se následně použije při krystalizačních pokusech [77].



### **3. Materiál a metody**

Cílem bakalářské práce bylo nalézt vhodné krystalizační podmínky pro proteiny ze skupiny serpinů získané z klíštěte *Ixodes ricinus*. Konkrétně se jednalo o proteiny Iripin-1 a Iripin-3.

#### **3.1. Krystalizace serpinu 1 z *Ixodes ricinus* (Iripin-1)**

Serpin 1 z *Ixodes ricinus* (Iripin-1) byl dodán z laboratoře doktora Jindřicha Chmelaře (Katedra medicínské biologie, PřF JU) ve formě roztoku o koncentraci 0,9 mg/ml. Tato koncentrace byla potvrzena jako vhodná pro krystalizační experimenty na základě prekrytalizačního testu z předchozího krystalizačního experimentu. Protein Iripin-1 byl pro krystalizační experimenty smíchán s fondaparinuxem (Merck KGaA, GE) a se srážecími činidly z komerčně dostupných sad.

##### **3.1.1. Srážecí činidla**

Pro krystalizaci tohoto proteinu byly použity dvě sady komerčně dostupných krystalizačních činidel. Jednalo se o MORPHEUS® II a SG1™.

##### **3.1.2. Vlastní krystalizace Iripin-1**

Pro krystalizační experiment byl použit roztok proteinu Iripin-1 o koncentraci 0,9 mg/ml, dvě sady komerčních srážecích roztoků, fondaparinux a dvě krystalizační destičky pro metodu sedící kapky typu Swissci 2-drop s 96 jamkami. Byly použity automatické pipety, univerzální optická těsnící páska a krystalizační robot OryxNano (Douglas Instruments, UK).

Před samotnou krystalizací byl připraven roztok fondaparinuxu. Fondaparinux byl v práškové formě a pro krystalizační experimenty byl připraven jeho 150 mM roztok. Takto připravený roztok byl smíchán s Iripin-1 v nadbytku, aby bylo zajištěno, že Iripin-1 a fondaparinux zreagují. Bylo smícháno 150  $\mu$ l proteinu a 15  $\mu$ l fondaparinuxu, aby výsledná koncentrace fondaparinuxu v reakční směsi byla 1 mM. Takto připravená směs fondaparinuxu s proteinem byla uložena na led a inkubována 30 minut, než byla vložena do krystalizačního robotu a uvedena do krystalizačních destiček.

Obě krystalizační destičky s 96 jamkami byly připraveny stejným způsobem. U každého rezervoáru se nachází 2 jamky, kam je napipetován vzorek smíchaný se srážecím činidlem v konkrétním poměru. Všechny 96 jamek bylo ručně pomocí automatické pipety naplněno 50  $\mu$ l srážecích roztoků. Jednotlivé jamky se plnily tak, že rezervoár A1 byl naplněn srážecím roztokem označeným v seznamu číslem 1, do A2 byl napipetován srážecí roztok

označený číslem 2, tímto principem byla naplněna celá krystalizační destička. Celkově je možné na jedné destičce otestovat 192 různých krystalizačních podmínek

Takto připravená krystalizační destička byla vložena do krystalizačního robotu. Každá jamka byla naplněna 0,5  $\mu$ l roztoku proteinu Iripin-1 a fondaparinuxu. Do horní jamky bylo přidáno 0,5  $\mu$ l a do spodní 0,25  $\mu$ l příslušného srážecího roztoku. Iripin-1 s fondaparinuxem byl tedy v horní jamce smíchán v poměru 1:1 a v dolní jamce v poměru 2:1. Po ukončení experimentu byla krystalizační destička důkladně uzavřena pomocí optické těsnící pásky a umístěna do inkubátoru o teplotě 4°C. Následně se krystalizační destičky pravidelně kontrolovaly.

### **3.2. Krystalizace serpinu 3 z *Ixodes ricinus* (Iripin-3)**

Serpin 3 z *Ixodes ricinus* (Iripin-3) byl dodán z laboratoře doktora Jindřicha Chmelaře (Katedra medicínské biologie, PřF JU) ve formě roztoku o koncentraci 3,93 mg/ml. Tato koncentrace byla potvrzena jako vhodná pro krystalizační experimenty na základě předchozího prekrystalizačního testu. Iripin-3 byl pro krystalizační pokus smíchán s heparinem a se srážecími činidly z komerčně dostupné sady srážecích činidel.

#### **3.2.1. Srážecí činidla**

Pro krystalizaci proteinu Iripin-3 byla využita sada komerčně dostupných srážecích činidel PGA screen <sup>TM</sup>.

#### **3.2.2. Vlastní krystalizace Iripin-3**

Pro krystalizační experiment byl použit protein Iripin-3 o koncentraci 3,93 mg/ml, sada komerčně dostupných srážecích činidel PGA screen <sup>TM</sup>, heparin, krystalizační destička pro metodu sedící kapky typu Swissci 2-drop s 96 jamkami. Byla použita automatická pipeta, krystalizační robot OryxNano (Douglas Instruments, UK) a univerzální optická těsnící páska.

Krystalizační destička byla nejprve ručně naplněna pomocí automatické pipety srážecími činidly. Jako první byl naplněn rezervoár označený A1 roztokem, z komerčně dostupné sady PGA screen <sup>TM</sup>, s pořadovým číslem 1. Rezervoár nesoucí označení A2 byl naplněn srážecím roztokem 2 a tímto principem byla naplněna celá krystalizační destička. Objem srážecího činidla v rezervoáru činil 50  $\mu$ l. Takto připravená krystalizační destička byla upevněna do krystalizačního robotu, který byl nastaven pro dávkování proteinu a heparinu a smíchání této směsi s příslušným srážecím činidlem. Do horní jamky byl vkládán protein, heparin a srážecí činidlo v poměru 1:1:1 o objemech 0,5  $\mu$ l a dolní kapka byla plněna v poměru 2:1:1. Aby bylo dosaženo poměru proteinu a heparinu 1:1 vkládá se 5 jednotek heparinu na

1  $\mu$ l. Takto naplněná krystalizační destička byla uzavřena univerzální optickou těsnící páskou a vložena do inkubátoru kde byla uchovávána při teplotě 4°C. Následně byla destička pravidelně kontrolována.

### **3.3. Testy krystalů**

Testování vzniklých krystalů probíhalo pomocí přístroje Jans Uvex (JAN Scientific inc, USA), který slouží k určení, zda pozorované krystaly jsou tvořeny proteinem či nikoli. Přístroj Jans Uvex (JAN Scientific inc, USA) využívá k odhalení proteinových krystalů UV fluorescenci. Po ozáření v oblasti 300-400 nm dochází u proteinových krystalů k fluorescenci, což je přístroj schopen odhalit. Fluorescenci proteinů převážně způsobují zbytky aminokyselin tryptofanu a tyrosinu, díky tomu lze detekovat většinu molekul proteinu.

## 4. Výsledky

Tato kapitola praktické části této bakalářské práce shrnuje výsledky krystalizačních experimentů s klíštěcími proteiny Iripin-1 a Iripin-3. Také zahrnuje fotky vzniklých krystalů ve vhodných krystalizačních podmínkách a fotky z testování krystalů pomocí přístroje Jans Uvex (JAN Scientific inc, USA).

### 4.1. Výsledky krystalizace serpinu 1 z *Ixodes ricinus* (Iripin-1)

Krystalizační destičky obsahující protein Iripin-1 smíchaný s fondaparinuxem ve formě sedící kapky byly průběžně pozorovány po dobu třech měsíců pomocí mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při zvětšení 570x. Krystalizační experimenty, ve kterých došlo k výrazným změnám či ke vzniku krystalů byly nafoceny pomocí mobilního telefonu Xiaomi Mi A1, pomocí mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při zvětšení 570x, či pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) sloužící k testování krystalů.

Při krystalizaci proteinu Iripin-1 smíchaným s fondaparinuxem, byly použity dvě krystalizační destičky s 96 jamkami a dvě sady komerčně dostupných srážecích činidel, konkrétně se jednalo o MORPHEUS® II a SG1™. Celkem tedy bylo prozkoumáno 192 krystalizačních podmínek s různými srážecími činidly. Celková variabilita krystalizačních podmínek však byla vyšší, protože u každého z 96 rezervoárů s konkrétním srážecím činidlem se nacházely dvě jamky, kam byl dávkován protein Iripin-1 a fondaparinuxem se srážecím činidlem v různých poměrech. Tím se prozkoumané množství krystalizačních podmínek zvyšuje na 384. Ve většině jamek zůstala kapka čirá, v některých z nich došlo ke vzniku sraženiny tzv. precipitaci, k vyschnutí kapky a fázové separaci, jen v minimálním množství krystalizačních podmínek došlo ke vzniku proteinových krystalů, které byly testovány pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA). V jediném případě došlo ke vzniku proteinového krystalu. Konkrétní výsledky jsou dále uvedeny v podobě tabulek vytvořených v MS Word.

#### 4.1.1. Krystalizace Iripin-1 s fondaparinuxem pomocí screenu MORPHEUS® II

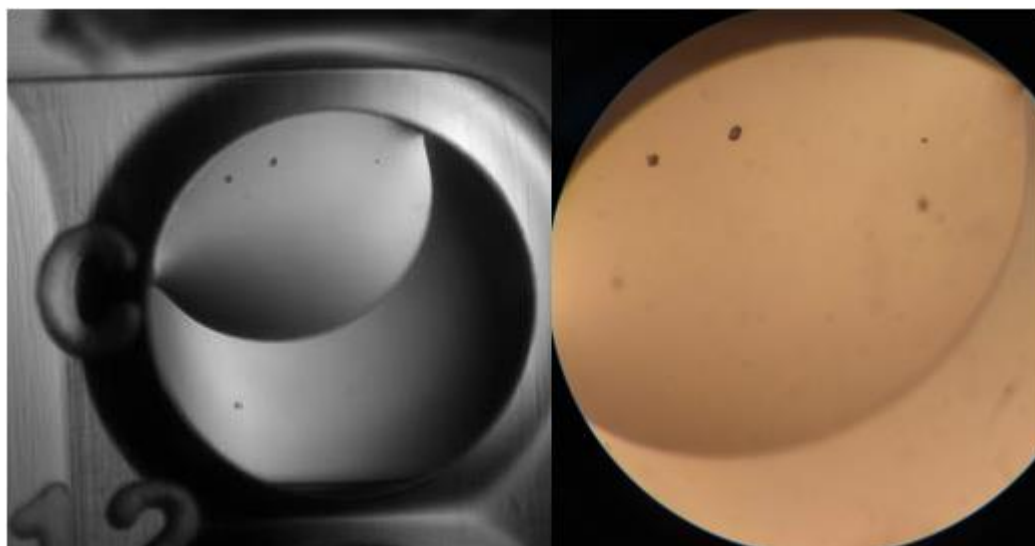
Krystalizace proteinu Iripin-1 ve směsi s fondaparinuxem pomocí MORPHEUS® II byla celkově nejneúspěšnější. Celkově tyto experimenty poskytly pouze jediný proteinový krystal jinak kapky zůstaly čiré a pouze v několika z nich došlo k precipitaci. Výsledky z krystalizační destičky, ve které byl smíchan protein Iripin-1 a fondaparinux se sadou krystalizačních činidel MORPHEUS® II jsou shrnuty v Tab. I. Písmeno O a bílá barva v tabulce označuje jamky v krystalizační destičce, kde kapka zůstala čirá. V jamkách, které

jsou označeny pomocí písmene P a modrou barvou došlo k precipitaci proteinu a písmeno K a žlutá barva značí jamky, kde došlo ke vzniku proteinových krystalů.

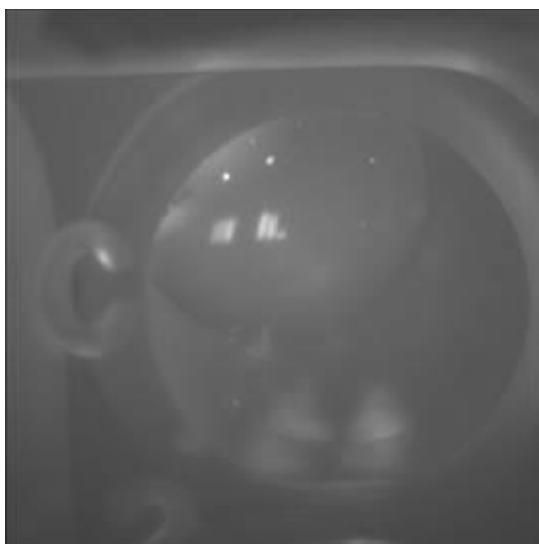
Tab. I: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-1 a fondaparinuxu se sadou srážecích činidel MORPHEUS® II metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
A <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
B <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
B <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C <sup>1</sup>	O	O	O	P	P	P	P	P	P	P	P	K
C <sup>2</sup>	O	P	P	P	P	P	O	O	O	O	O	O
D <sup>1</sup>	O	O	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
E <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
E <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
F <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
F <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
G <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
G <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Jamka C<sup>1</sup>12 obsahující krystaly byla vyfotografována a následně byly krystaly vzniklé v této kapce testovány pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA), zaznamenaná fluorescence patrná na pořízené fotografii potvrzuje že se jedná o proteinové krystaly. Fotka Jamky C<sup>1</sup>12, je na Obr. 19 vlevo je fotografie pořízená přístrojem Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) a vpravo je fotografie pořízena mobilním telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskop Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při 570x zvětšení. Fotka z testování krystalů je na Obr. 20. obě tyto fotografie byly pořízeny přístrojem Jansi Uvex při 50x zvětšení.



Obr. 19: Fotografie jamky C<sup>1</sup>12 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).



Obr. 20: Fotografie z testování jamky C<sup>1</sup>12 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vytvořeno autorkou).

#### **4.1.2. Krystalizace Iripin-1 s fondaparinuxem pomocí screenu SG1<sup>TM</sup>**

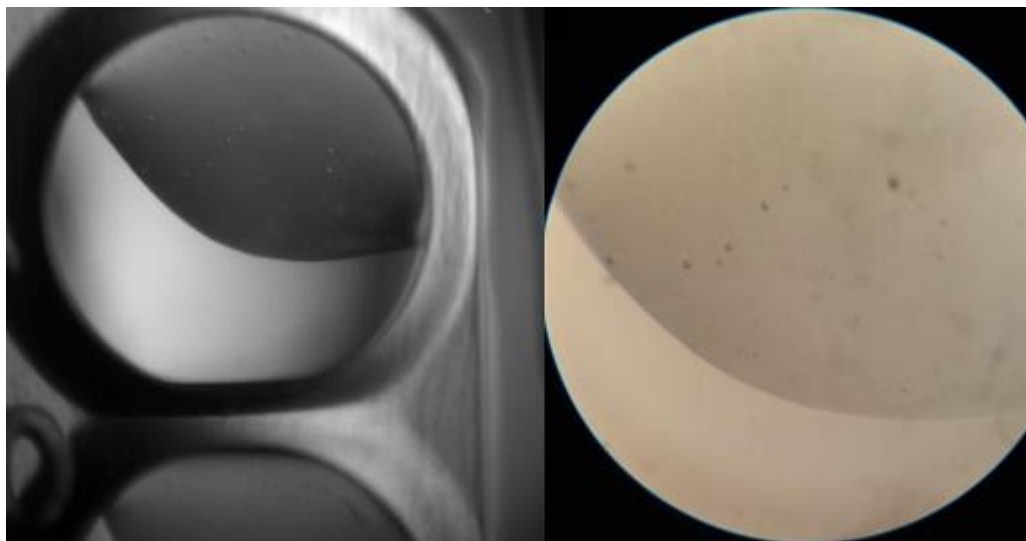
Krystalizace proteinu Iripin-1 ve směsi s fondaparinuxem pomocí screenu SG1<sup>TM</sup> byla o něco úspěšnější. Krystalizační experimenty pomocí sady srážecích činidel SG1<sup>TM</sup> poskytly proteinové krystaly, pouze v jedné jamce došlo ovšem také ke vzniku fázové separace v několika jamkách. V jedné jamce této krystalizační destičky také byly pozorovány jehlovitá uskupení proteinu tzv. Whiskers, needle clusters. Dále byly pozorovány čiré kapky, v několika jamkách došlo k precipitaci a objevilo se několik vyschlých jamek.

Výsledky z krystalizační destičky, ve které byl smíchán protein Iripin-1 a fondaparinux se sadou krystalizačních činidel SG1<sup>TM</sup> jsou shrnuty v Tab. II. Písmeno O a bílá barva označuje jamky v krystalizační destičce, kde kapka zůstala čirá. V jamkách, které jsou označeny pomocí písmene P a modré barvy došlo k precipitaci proteinu a písmeno K a žlutá barva značí jamky, kde došlo ke vzniku proteinových krystalů. NC a zelená barva označuje vznik Whiskers, needle clusters, FS spolu s oranžovou barvou značí fázovou separaci a fialová barva a písmeno V značí vyschnutí jamky.

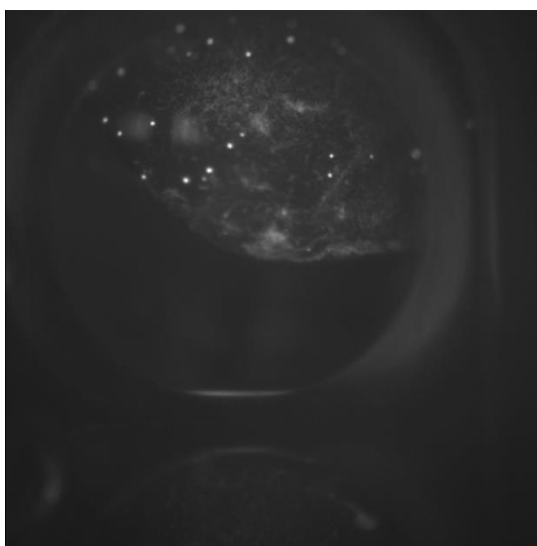
Tab. II: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-1 a fondaparinuxu se sadou srážecích činidel SG1<sup>TM</sup> metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sup>1</sup>	O	FS	P	O	O	O	O	FS	P	K	P	P
A <sup>2</sup>	O	FS	P	O	O	O	O	O	P	P	P	P
B <sup>1</sup>	O	P	P	O	NC	O	O	O	O	P	P	P
B <sup>2</sup>	O	P	P	O	P	O	O	O	O	P	P	P
C <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	P	O	O	O	O
D <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	P	O	O	O	O
E <sup>1</sup>	O	P	P	O	O	O	P	O	P	O	O	FS
E <sup>2</sup>	O	P	P	O	O	O	P	O	P	O	O	P
F <sup>1</sup>	FS	O	O	O	O	P	O	P	O	O	O	O
F <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	P	O	P	O	O	O	O
G <sup>1</sup>	P	O	O	P	O	O	O	P	O	P	FS	O
G <sup>2</sup>	P	O	O	P	O	O	O	P	O	P	O	O
H <sup>1</sup>	O	O	O	V	V	P	O	O	V	V	V	O
H <sup>2</sup>	O	O	O	V	V	P	O	O	V	V	V	O

Jamka A<sup>1</sup>10 ve které byly objeveny krystaly byla vyfotografována a následně testována pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR). Zaznamenaná fluorescence na pořízené fotografii potvrzuje že jamka A<sup>1</sup>10 obsahuje proteinové krystaly. Fotka Jamky A<sup>1</sup>10, je na Obr. 21 vlevo je fotografie pořízená přístrojem Jansi Uvex (Olympus, ČR) a vpravo je fotografie pořízena mobilním telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu SZX9 při 570x zvětšení. Fotka z testování krystalů je na Obr. 21 a byla pořízena přístrojem Jansi Uvex (Olympus, ČR) při 50x zvětšení.



Obr. 21: Fotografie jamky A<sup>1</sup>10 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).



Obr. 22: Fotografie z testování jamky A<sup>1</sup>10 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vytvořeno autorkou).

#### 4.2. Výsledky krystalizace serpinu 3 z *Ixodes ricinus* (Iripin-3)

Krystalizační destička obsahující protein Iripin-3 smíchaný s heparinem a srážecími činidly ze sady PGA screen<sup>TM</sup> ve formě sedící kapky byla průběžně pozorována pomocí mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při zvětšení 570x. Kapky, ve kterých došlo k výrazným změnám či ke vzniku krystalů, pozorovaných po 6ti týdnech od provedení experimentu, byly nafoceny pomocí mobilního telefonu Xiaomi Mi A1, přes mikroskop Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při zvětšení 570x, či pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN



Scientific inc, USA) sloužící k testování krystalů. Vzniklé krystaly byly testovány přístrojem Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA).

Při krystalizaci proteinu Iripin-3 smíchaným s heparinem byla použita krystalizační destička s 96 jamkami a sada komerčně dostupných srážecích činidel PGA screen<sup>TM</sup>. Celkem tedy bylo prozkoumáno 96 krystalizačních podmínek s různými srážecími činidly, a to vždy ve dvou různých poměrech proteinu, heparinu a srážecího činidla celková variabilita krystalizačních podmínek byla tedy 192. Většina kapek v krystalizační destiček zůstala čirá, v některých došlo k precipitaci či fázové separaci a ve třech jamkách došlo ke vzniku proteinových krystalů, které byly následně testovány pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA). Konkrétní výsledky jsou dále uvedeny v podobě tabulek vytvořených v MS Word.

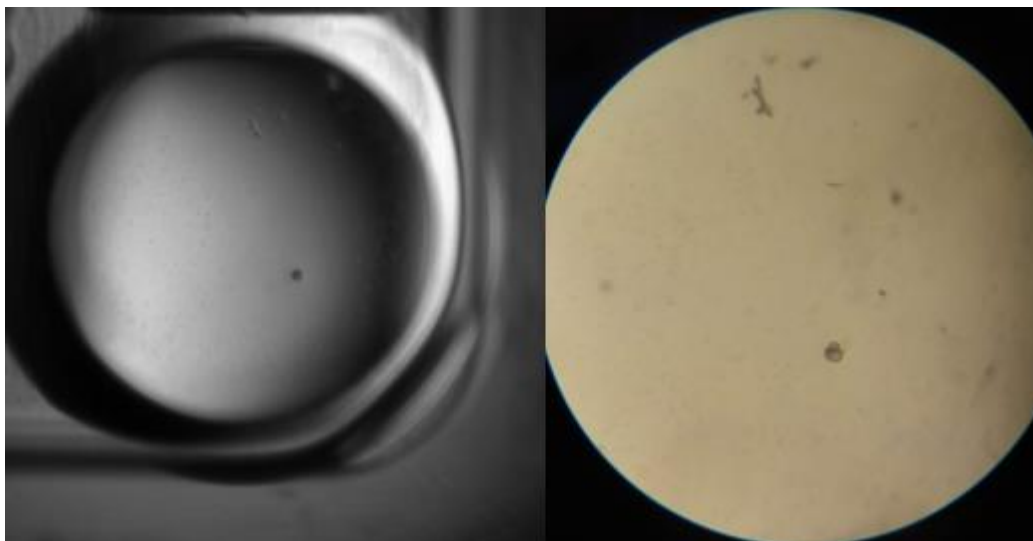
#### **4.2.1. Krystalizace Iripin-3 s heparinem pomocí PGA screen<sup>TM</sup>**

Krystalizace proteinu Iripin-3 ve směsi s heparinem pomocí sady srážecích činidel PGA screen<sup>TM</sup> byla úspěšná, celkově z prováděných pokusů byla nejméně úspěšná. Došlo ke vzniku proteinových krystalů ve třech krystalizačních podmínkách a bylo objeveno i velké množství fázových separací. Konkrétní výsledky z těchto krystalizačních experimentů jsou shrnuty v Tab. III. V této tabulce písmeno O a bílá barva označuje čirou kapku, P a modrá barva značí precipitaci a PS spolu s oranžovou barvou označuje jamku ve které došlo k fázové separaci.

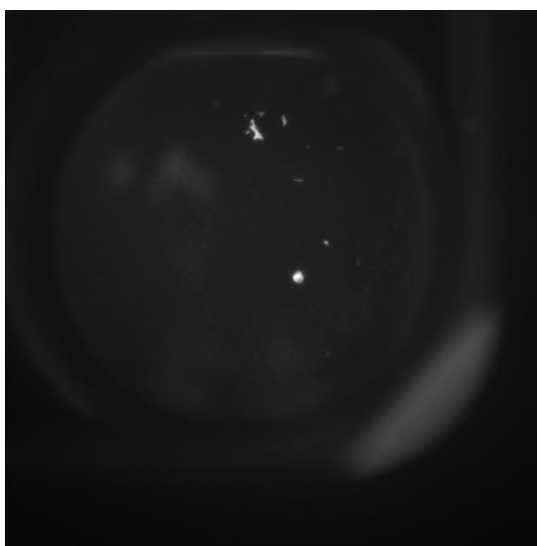
Tab. III: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-3 a heparinu se sadou srážecích činidel PGA screen™ metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sup>1</sup>	P	O	O	O	P	P	O	O	P	P	FS	FS
A <sup>2</sup>	O	K	O	O	P	P	O	O	P	P	O	O
B <sup>1</sup>	P	O	O	O	FS	FS	P	O	O	O	O	P
B <sup>2</sup>	K	O	O	O	FS	FS	P	O	O	O	O	P
C <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C <sup>2</sup>	O	K	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D <sup>1</sup>	O	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D <sup>2</sup>	O	P	O	O	O	O	O	O	P	O	O	P
E <sup>1</sup>	O	FS	O	O	P	P	P	P	O	O	O	O
E <sup>2</sup>	O	FS	O	O	P	P	P	P	O	O	O	O
F <sup>1</sup>	P	O	O	O	O	O	O	O	P	P	P	P
F <sup>2</sup>	P	O	O	O	O	O	O	O	P	P	P	P
G <sup>1</sup>	FS	O	P	O	O	O	O	O	O	FS	O	P
G <sup>2</sup>	FS	O	P	O	O	O	O	O	O	FS	O	P
H <sup>1</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H <sup>2</sup>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

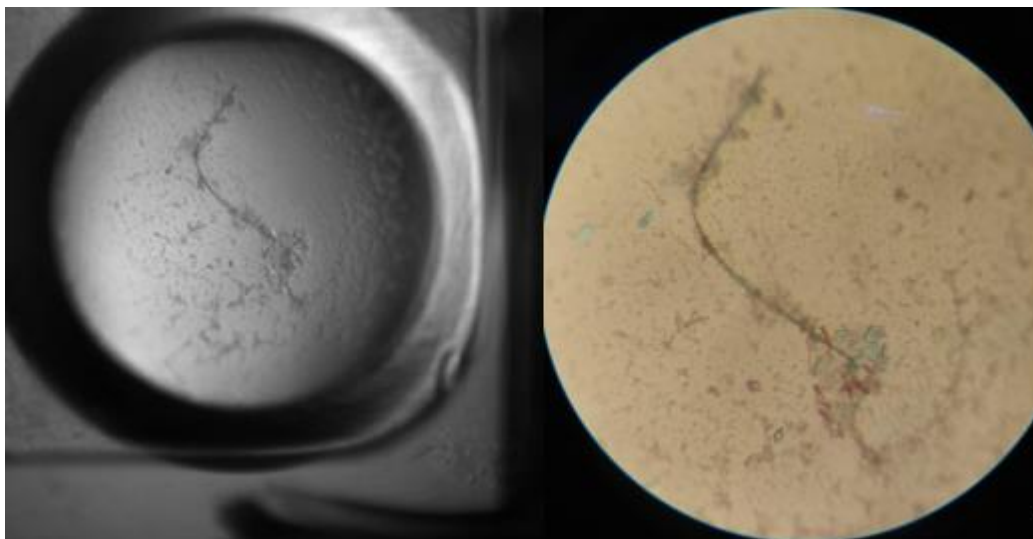
Jamky A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> obsahující krystaly byly vyfotografovány a následně testovány pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA). Zaznamenaná fluorescence krystalů v těchto jamkách potvrzuje že se jedná o krystaly proteinu. Fotka jamky je vždy složena ze dvou částí, vlevo je fotografie pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) a vpravo je barevná fotografie pořízena mobilním telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) při 570x zvětšení. Fotka jamky A<sup>2</sup>, je na Obr. 23. Fotka z testování krystalů je na Obr. 24. Fotka jamky B<sup>2</sup> s krystaly na Obr. 25. Fotka z testování těchto krystalů je na Obr. 26. Jamka C<sup>2</sup> je vyfotografována na Obr. 27 a test přístrojem Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) je na Obr. 28. Všechny fotografie z testů krystalů byly pořízeny přístrojem Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) při 50x zvětšení.



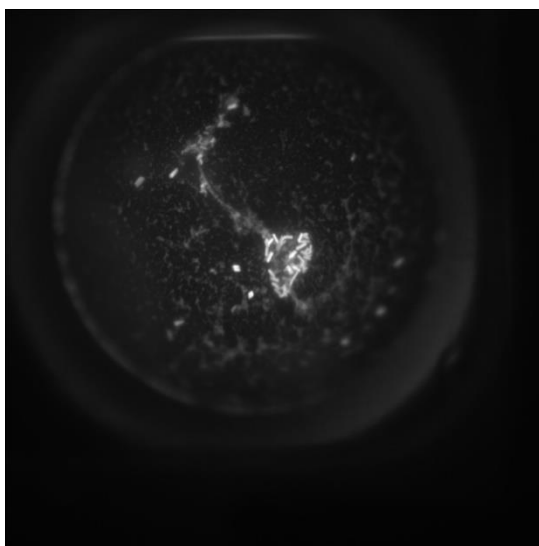
Obr. 23: Fotografie jamky A<sup>2</sup> pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).



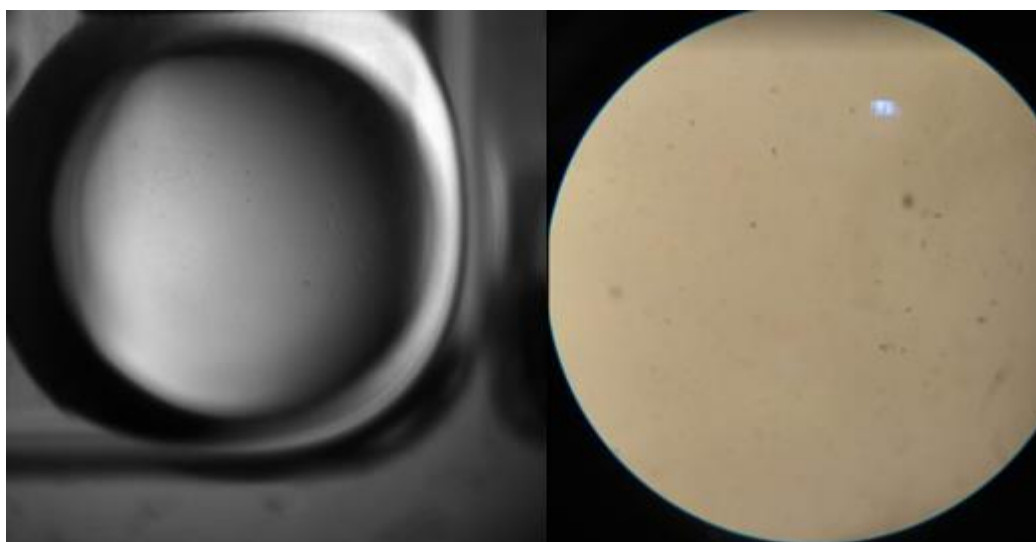
Obr. 24: Fotografie z testování jamky A<sup>2</sup> na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).



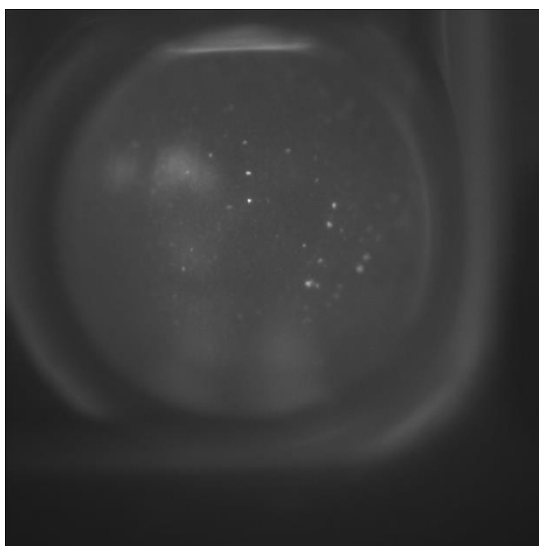
Obr. 25: Fotografie jamky B<sup>2</sup>1 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).



Obr. 26: Fotografie z testování jamky B<sup>2</sup>1 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).



Obr. 27: Fotografie jamky C<sup>2</sup> pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).



Obr. 28: Fotografie z testování jamky A<sup>2</sup> na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).

## 5. Diskuze

V rámci praktické části bakalářské práce byly krystalizovány klíštěcí proteiny Iripin-1 a Iripin-3. Byly provedeny krystalizační experimenty k nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro vznik a růst krystalů těchto dvou vybraných klíštěcích proteinů ze skupiny serpinů. Testované proteiny byly izolované z klíštěte *Ixodes ricinus* v laboratoři doktora Jindřicha Chmelaře (PřF JU).

Pro protein Iripin-1 smíchaný s fondaparinuxem byly krystalizační experimenty prováděny s dvěma sadami komerčně dostupných sad srážecích činidel MORPHEUS<sup>®</sup> II a SG1<sup>™</sup>. Celkem bylo pro tento protein otestováno 384 krystalizačních podmínek z čehož dvě poskytly proteinové krystaly. Úspěšnost krystalizačních experimentů pro protein Iripin-1 ve směsi s fondaparinuxem byla 0,52 %. Proteinové krystaly vznikly ve směsi se srážecím činidlem s číslem 36 (složení: 5% (w/v) PEG 2000, 1% (w/v) 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propan, 25% (w/v) NDSB 195, součástí jsou aditiva 1 mM octan barnatý, octan cesný, octan strontnatý a chlorid rubidný, jako pufr slouží 0.1 M GlyGly/AMPD, srážecí činidlo má pH 8.5) ze sady MORPHEUS<sup>®</sup> II. Protein Iripin-1 smíchaný s fondaparinuxem byl se srážecím činidlem s číslem 36 smíchán v poměru 1:1. Další úspěšnou krystalizační podmínkou se stal roztok číslo 10 (složení: 30% (w/v) PEG 40 000, 0,2 M síran lithný, jako pufr slouží 0,1 M Tris, srážecí činidlo má pH 8,5) smíchán s proteinem Iripin-1 a fondaparinuxem v poměru 1:1. Toto srážecí činidlo pochází ze sady SG1<sup>™</sup>.

Protein Iripin-3 smíchaný s heparinem, byl krystalizován pomocí krystalizační sady komerčně dostupných srážecích činidel PGA screen<sup>™</sup>. Celkem bylo otestováno 192 krystalizačních podmínek z čehož tři poskytly proteinové krystaly. Úspěšnost této krystalizace byla 1,56 %. Proteinové krystaly s navázaným heparinem vznikly ve směsi se srážecím činidlem číslo 2 (složení: 0.2 M chlorid hořečnatý, 8% (w/v)  $\gamma$ -PGA (Na<sup>+</sup> form, LM), jako pufr slouží 0.1 M octan sodný, srážecí činidlo má pH 5.0) číslo 13 (5% (w/v)  $\gamma$ -PGA (Na<sup>+</sup> form, LM), 20% (w/v) PEG 3350, jako pufr slouží 0.1 M octan sodný, srážecí činidlo má pH 5.0) a číslo 26 (0.1 M síran amonný, 0.3 M mravenčan sodný, 3% (w/v)  $\gamma$ -PGA (Na<sup>+</sup> form, LM), 20% (w/v) PEG 500 MME, jako pufr slouží 0.1 M octan sodný, srážecí činidlo má pH 5.0). Ve všech těchto úspěšných krystalizačních podmínkách byl poměr jednotlivých složek 2:1:1.

Doposud bylo na úrovni sekvence u klíšťat rodu *Ixodes* identifikováno více než 60 serpinů, ale funkčně byly dále charakterizovány pouze dva serpiny z *Ixodes ricinus* [78-80]. Jedním z nich je protein *Ixodes ricinus* imunosupresor (Iris), který se vyskytuje ve slinách klíštěte

*Ixodes ricinus*. Tento protein moduluje imunitní odpověď hostitele, a to jak vrozenou, tak získanou. Bylo zkoumáno působení tohoto proteinu, nebyl však krystalizován [81]. Druhým charakterizovaným proteinem z klíštěte *Ixodes ricinus* je protein *Ixodes ricinus* serpin 2 (IRS-2), u něhož jsou známa i krystalizační data [82]. Protein IRS-2 byl také objeven ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* a potlačuje protizánětlivé reakce [74].

Protein IRS-2 byl před krystalizačními experimenty kontaminován proteázami pocházejícími z bakteriálního expresního systému. Protein IRS-2 byl tedy před krystalizací částečně proteolyzován. Tento proces napodobuje specifické štěpení proteinu cílovou proteázou a způsobuje konformační přechod serpinové molekuly do stabilnější formy. Tato forma během této krystalizační studie poskytla krystaly vhodné pro difrakční analýzu. Krystalizace probíhala pomocí difuze par za použití metody visící kapky. Krystaly proteolyzovaného proteinu IRS-2 vznikly z počátečního screeningu za pět dní ve srážecím činidle se složením 12% (w/v) PEG 20 000, 0.1 M MES pH 6.5. Z optimalizace podmínek byly krystaly získány ze směsi se srážecím činidlem se složením 9% (w/v) PEG 20 000, 75 mM MES pH 6.5 [82].

Částečná proteolýza je důležitou událostí, která je nutná pro úspěšnou krystalizaci mnoha proteinových vzorků. Bylo zaznamenáno mnoho úspěšných krystalizací proteinů po proteolýze proteinu náhodnou kontaminací vzorku [83]. Také se dnes stává běžnou praktikou záměrné zahrnutí proteázy do krystalizačního experimentu [84]. U většiny proteinů vychází pozitivní účinek omezené proteolýzy na krystalizaci vznikem stabilnější struktury [82].

Stabilizující a tím i pozitivní účinek na proces krystalizace mají i další ligandy, které se mohou navázat na protein. Při tomto procesu vzniká stabilnější konformace proteinu, což má pozitivní účinek na krystalizaci. Nejčastěji se ligand přidává k proteinu za vzniku komplexu, který se následně použije při krystalizačních pokusech [77].

Stejně jako u krystalizace IRS-2 bylo využito u krystalizace proteinů Iripin-1 a Iripin-3 pozitivního účinku navázaných ligandů na stabilizaci proteinu. Když však srovnáme vhodné krystalizační podmínky pro protein IRS-2 a proteiny Iripin-1 a Iripin-3 nenalezneme v nich podobnost. Pro krystalizaci Iripin-1 je vhodné pH srážecího činidla rovno 8,5 a poměr proteinu se srážecím činidlem je 1:1. Složení vhodných srážecích činidel a jejich pH se však u proteinu Iripin-1 a proteinu IRS-2 výrazně liší. U vhodných krystalizačních podmínek pro IRS-2 a Iripin-3 je možné najít paralelu v rámci hodnoty pH srážecího činidla, které se pohybuje v kyselých hodnotách a to od 5-6,5. Přesto by bylo vhodné pro proteiny získat více krystalů, a to hlavně z optimalizačního procesu.

## 6. Závěr

Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na objasnění principu krystalizace a popisuje typy krystalizačních metod a zaměřuje se především na pokročilé a alternativní. Tato část bakalářské práce také zahrnuje stručné seznámení s velkou skupinou proteinů, serpinů, mezi které patří i proteiny Iripin-1 a Iripin-3, které byly v praktické části krystalizovány. Popis serpinů se zaměřuje hlavně na jejich inhibiční funkci u parazitických organismů, jako je druh klíštěte *Ixodes ricinus*, ze kterého proteiny pro krystalizační experimenty byly získány.

Praktická část bakalářské práce se zabývá krystalizací klíštěcích proteinů Iripin-1 a Iripin-3 s navázanými ligandy ve formě sedící kapky. V případě proteinu Iripin-1 se jednalo o fondaparinux a u proteinu Iripin-3 o heparin.

Prvotním cílem bakalářské práce bylo osvojit si základní a pokročilé krystalizační metody, což bylo nutným předpokladem k provádění dalších krystalizačních experimentů. Hlavním cílem bakalářské práce bylo určit vhodné podmínky pro získání proteinových krystalů vybraných klíštěcích proteinů. Pro krystalizační experimenty byly vybrány proteiny Iripin-1, který byl smíchán s fondaparinuxem a Iripin-3 smíchán s heparinem. Pro určení vhodných krystalizačních podmínek pro protein Iripin-1 smíchaný s fondaparinuxem byly vybrány dvě sady komerčně dostupných srážecích činidel, a to konkrétně MORPHEUS® II a SG1™. Za použití metody sedící kapky bylo takto otestováno celkem 384 krystalizačních podmínek z čehož dvě poskytly krystaly. Vzniklé krystaly byly testovány pomocí UV fluorescenčního přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA), k prokázání jejich proteinového charakteru. Pro zjištění vhodných krystalizačních podmínek pro protein Iripin-3 smíchaný s heparinem byla vybrána sada komerčně dostupných srážecích činidel PGA screen™. Formou metody sedící kapky bylo otestováno 192 krystalizačních podmínek z nichž tři poskytly krystaly, které byly testovány pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) k určení jejich původu.

Dalším cílem bakalářské práce bylo pokusit se získat difrakční data. Těchto cílů nebylo dosaženo, kvůli nemožnosti měření na zdroji synchrotronového záření z důvodu pandemie.



## 7. Literatura

- [1] Hünefeld F. L. (1840): Der Chemismus in der thierischen Organisation. Leipzig: F. A. Brockhaus.
- [2] Osborne T. B. (1892): Crystallized vegetable proteids. American Chemical Society 14, 662-689.
- [3] Reichert E. T., Brown A. P. (1909): The Differentiation and specificity of corresponding proteins and othes vital substances in relation to biological classification and organic evolution: the crystallography of hemoglobins. Carnegie Institution of Washington, Washington DC.
- [4] Jaskolski M., Dauter Z., Wlodawer A. (2014): A brief history of macromolecular crystallography, ilustrated by a family tree and its Nobel fruits. The FEBS Journal 281, 3985-4009.
- [5] Giegé R. (2013): A historical perspective on protein crystallization from 1840 to present day. The FEBS Journal 280, 6456-6497.
- [6] Lagerkvist U., Rymo L., Lindqvist O., Andersson E. (1972): Appendix: Some properties of crystals of lysine transfer ribonucleic acid ligase from yeast. Journal of Biological Chemistry 247, 3897-3899.
- [7] Reid B. R., Koch G. L., Boulanger Y., Hartley B. S., Blow D. M. (1973): Letter: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on tyrosyl-transfer RNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Molecular Biology 80, 199-201.
- [8] Salemme F. R. (1972): A Free Interface Diffusion Technique for Crystallization of Proteins for X-Ray Crystallography. Archives of Biochemistry and Biophysics 151, 533-539.
- [9] Chayen N. E., Shaw Stewart P. D., Maeder D. L., Blow D. M. (1990): An automated systém for micro-batch protein crystallization and screening. Journal of Applied Crystallography 23, 297-302.
- [10] Kutá Smatanová I. (2006): Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi. ústav fyzikální biologie JU České Budějovice a Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR Nové Hradý.

- [11] Overton I. M., Padovani G., Girolami M. A., Barton G. (2008): ParCRys: a Parzen window density estimation approach to protein crystallization propensity prediction. *Bioinformatics* 24, 901-907.
- [12] Chen L., Kurgan L., Rahbari M. (2007): Prediction of protein crystallization using collocation of amino acid pairs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, 764-769.
- [13] Brzozowski A., Walton J. (2001): Clear strategy screens for macromolecular crystallization. *Journal of Applied Crystallography* 34, 97-101.
- [14] Jancarik J., Kim S. -H. (1991): Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24, 409-411.
- [15] Cordara G., Krenzel U. (2013): Structure determination of lectins by x-ray crystallography – a hands-on approach. *Carbohydrate Chemistry* 39, 222-246.
- [16] Garcia-Ruiz J. M. (2003): Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology* 142, 22-31.
- [17] Oberthuer D., Melero-García E., Dierks K., Meyer A., Betzel C., Garcia-Caballero A., Gavira J. A. (2012): Monitoring and Scoring Counter-Diffusion Protein Crystallization Experiments in Capillaries by in situ Dynamic Light Scattering. *PLoS One* 7, 1-6.
- [18] Chayen N. E. (2004): Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 577-583.
- [19] Stewart P. S., Mueller-Dieckmann J. (2014): Automation in biological crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communicatuons* 70, 686-696.
- [20] Hampton Research (2019): *Crystal Growth 101*. Journey 34, 1-65.
- [21] Sauter C., Lorber B., McPherson A., Giegé R. (2012): Crystallization – General Methods. *International tables for crystallography vol. F*, 99-121.
- [22] Sun L., Li J., Xu C., He J. (2010): The sandwich method for protein crystallization and its effect on crystal growth. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 42, 332-336.
- [23] Rupp B. (2010): *Biomolecular crystallography: Principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science, New York.

- [24] Russo Krauss I., Merlino A., Vergara A., Sica F. (2013): An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 11643-11691.
- [25] Huang C. Olieric V., Ma P., Panepucci E., Diederichs K., Wang M., Caffrey M. (2015): In meso in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins. *Acta crystallographica Section D Biological Crystallography* 71, 1238-1256.
- [26] Axford D., Aller P., Sanchez-Weatherby J., Sandy J. (2016): Applications of thin-film sandwich crystallization platforms. *Structural Biology Communications* 72, 313-319.
- [27] McPherson A. (1990): Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry* 189, 1-23.
- [28] Thomas D. H., Rob A., Rice D. W. (1989): A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering Design and Selection* 2, 489-491.
- [29] Bergfors T. E. (2009): Protein Crystallization. International University line.
- [30] Chayen N. E. (1992): Microbatch crystallization under oil – a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *Journal of Crystal Growth* 122, 176-180.
- [31] D'Arcy A., Elmore C., Stihle M., Johnston J. (1996): A novel approach to crystallising proteins under oil. *Journal of Crystal Growth* 168, 175-180.
- [32] D'Arcy A., MacSweeney A., Haber A. (2004): Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization. *Methods* 34, 323-328.
- [33] Ranatunga W. K., Su D., Romero M. F. (2014): Obtaining Crystals. *Molecular life science*, 1-9.
- [34] Chayen N. E. (1997): The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure* 5, 1269-1274.
- [35] Baldock P., Mills V., Stewart S. (1996): A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions. *Journal of Crystal Growth* 168, 170-174.
- [36] McPherson A., Gavira J. A. (2014): Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 70, 2-20.

- [37] Otalora F., Gavira J. A., Ng J. D., Garcia-Ruiz J. M. (2009): Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 101, 26-37.
- [38] Garcia Ruiz J. M., Moreno A., Viedma C., Coll M. (1993): Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Materials Research Bulletin* 28, 541-546.
- [39] Garcia-Ruiz J. M., Morena A. (1994): Investigations on protein growth by the gel acupuncture metod. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 50, 484-490.
- [40] Moreno A. (2017): Advanced Methods of Protein Crystallization. *Methods in Molecular Biology* 1607, 51-76.
- [41] Zhong C., Wang L., Wakayama N. I. (2001): Effect of high magnetic field on protein crystal growth – magnetic field induced order in aqueous protein solutions. *Journal of Crystal Growth* 233, 561-566.
- [42] Qi J., Wakayama N. I., Ataka M. (2001): Magnetic suppression of convection in protein crystal growth processes. *Journal of Crystal Growth* 232, 132-137.
- [43] Wakayama M. (2003): Effects of strong magnetic field on pprotein crystal growth. *Crystal Growth & Design* 3, 17-24.
- [44] Taleb M., Didierjean C., Jelsch C., Mangeot J. P., Capelle B., Aubury A. (1999): Crystallization of protins under an external eletric field. *Journal of Crystal Growth* 200, 575-582.
- [45] Kostyuk P. G., Grozdinski D. M., Zima V. P., Magura I. S., Sidorik E. P., Shuba M.F. (1988): *Biophysics. Vyshcha Shkola, Kiev*, 389.
- [46] Nanev C. N., Penkova A. (2001): Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields. *Journal of Crystal Growth* 232, 285-293.
- [47] Kakinouchi K., Adachi H., Matsumara H., Inoue T., Murakami S., Mori Y., Koga Y., Takano K., Kanaya S. (2006): Effect of ultrasonic irradiation on protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* 292, 437-440.
- [48] McPherson A., DeLucas L. J. (2015): Microgravity protein crystallization. *Npj Microgravity* 1, 1-20.

- [49] McPherson A., Malkin A. J. Kuznetsov Y. G., Koszelak S., Wells M., Jenkins G., Howard J., Lawson G. (1999): The effects of microgravity on protein crystallization: evidence for concentration gradients around growing crystals. *Journal of Crystal Growth* 196, 572-586.
- [50] McPherson A., Nguyen C., Larson S. B., Day J. S., Cudney B. (2007): Development of alternative approach to protein crystallization. *Journal of Structural and Functional Genomics* 8, 193-198.
- [51] Sangwal K. (1998): Growth kinetics and surface morphology of crystals grown from solutions: Recent observations and their interpretations. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 36, 163-248.
- [52] Qiu W., Zhou M., Mazumdar M., Azzi A., Ghanmi D., Luu-The V., Labrie F., Lin S. X. (2007): Structure-based Inhibitor Design for an enzyme that binds different steroids. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 8368-8379.
- [53] Tomčová I., Branca R.M.M., Bodó G., Bagyinka C.; Kutá Smatanová I. (2006): Cross-crystallization method used for the crystallization and preliminary diffraction analysis of a novel di-haem cytochrome c4. *Acta Crystallographica Section F* 62, 820-824.
- [54] Tomčová I., Kutá Smatanová, I. (2007): Copper co-crystallization and divalent metal salts cross-influence effect: A new optimization tool improving crystal morphology and diffraction quality. *Journal of Crystal Growth* 306, 383-389.
- [55] Bergfors T. E. (2003): Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology* 142, 66-76.
- [56] Stura E. A., Wilson I. A. (1990): Analytical and Production Seeding Techniques. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1, 38-49.
- [57] Thaller C., Weaver L. H., Eichele G., Wilson E., Karlsson R., Jensonius J. N. (1981): Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins. *Journal of Molecular Biology* 147, 456-469.
- [58] Bergfors T. E., Rouvinen J., Lehtovaara P., Caldentey X., Tomme P., Claeysens M., Pettersson G., Teeri T., Knowles J., Jones T. A. (1989): Crystallization of the core protein of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Journal of Molecular Biology* 209, 167-169.
- [59] Bancel P. A., Cajipe V., Rodier F., Witz J. (1998): Laser seeding for biomolecular crystallization. *Journal of Crystal Growth* 191, 537-544.

- [60] Ireton G. C., Stoddard B. (2004): Microseed matrix screening to improve crystals of yeast cytosine deaminase. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 60, 601-605.
- [61] D'Arcy A., Bregfors T., Crowan-Jacob S. W., Marsh M. (2014): Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: What have we learned? *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 70, 1117-1126.
- [62] D'Arcy A., Villard F., Marsh M. (2007): An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 63, 550-554.
- [63] Durbin S. D., Feher G. (1996): Protein crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry* 47, 171-204.
- [64] Gorrec F., Löwe J. (2018): Automated Protocols for Macromolecular Crystallization at the MRC Laboratory of Molecular Biology. *Journal of Visualized Experiments* 131, 55790.
- [65] Irving J. A., Pike R. N., Lesk A. M., Whisstock J. C. (2000): Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research* 10, 1845-1864.
- [66] Carrell R. W., Huntington J. A. (2003): How serpins change their fold for better and for worse. *Biochemical Society symposium* 70, 163-178.
- [67] Doolittle R. F. (1983): Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* 222, 417-419.
- [68] Mottonen J., Strand A., Symersky J., Sweet R. M., Danley D. E., Geoghegan K. F., Gerard R. D., Goldsmith E. J. (1992): Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 355, 270-273.
- [69] Hekman C. M., Loskutoff D. J. (1985): Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *Journal of Biological Chemistry* 260, 11581-11587.
- [70] Stein P., Chothia C. (1991): Serpin tertiary structure transformation. *Journal of Molecular Biology* 221, 615-621.

- [71] Li J., Wang Z., Canagarajah B., Jiang H., Kanost M., Goldsmith E. J. (1999): The structure of active serpin 1K from *Manduca sexta*. *Structure* 7, 103-109.
- [72] Meekins D., Kanost M., Michel K. (2016): Serpins in anthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 62, 105-119.
- [73] Brossard M., Wikel S. K. (2004): Tick immunobiology. *Parasitology* 129, 161-176.
- [74] Chmelar J., Calvo E., Pedra J. H., Francischetti I. M., Kotsyfakis M. (2012): Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics* 75, 3842-3854.
- [75] Rau J. C., Beaulieu L. M., Huntington J. A., Church F. C. (2007): Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (Suppl. 1), 102-115.
- [76] Baglin T. P., Carrell R. W., Church F. C., Esmon C. T., Huntington J. A. (2002): Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11079-11084.
- [77] Hassell A. M., An G., Bledsoe R. K., Bynum J. M. Carter H. L. III, Deng S. J., Gampe R. T., Grisand T. E., Masauss K. P., Nolte R. T., Rocque W. J., Wang L., Weaver K. L., Williams S. P., Wisely G. B., Xu R., Shewchuk L. M. (2007): Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D* 63, 72-79.
- [78] Mulenga A., Khumthong R., Blandon M. A. (2007): Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *Journal of Experimental Biology* 210, 3188-3198.
- [79] Mulenga A., Khumthong R., Chalaire K. C. (2009): *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics* 10, 217.
- [80] Mulenga A., Tsuda A., Onuma M., Sugimoto C. (2003): Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 267-276.
- [81] Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen, A., Godfroid E. (2002): Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry* 277, 10083-10089.

- [82] Kovářová Z., Chmelar J., Sandra M. Brynda J., Mareš M., Rezacova P. (2010): Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 66, 1453-1457.
- [83] Mandel C. R., Gebauer D., Zhang H. & Tong L. (2007): A serendipitous Discovery that in situ proteolysis is essential for the crystallization of yeast CPSF-10 (Ydh1p). *Acta Crystallographica Section F* 62, 1041-1045.
- [84] Dong A., Xu X., Edwards A. M., Midwest Center for Structural Genomics, Structural Genomics Consortium (2007): In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nature Methods* 4, 1019-1021.



## 8. Seznam obrázků

Obr. 1: Fázový diagram procesu krystalizace (vytvořeno autorkou, inspirováno [18]).

Obr. 2: Schéma metody sedící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).

Obr. 3: Schéma metody visící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).

Obr. 4: Schéma metody sendvičové kapky dle Hampton Research (2019) (vytvořeno autorkou, inspirováno [20]).

Obr. 5: Schéma metody sendvičové kapky podle Sun et al., (2010) (vytvořeno autorkou inspirováno [22]).

Obr. 6: Schéma mikrodialyzační metody pomocí mikrodialyzačního knoflíku (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 7: Schéma dávkové metody (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 8: Schéma metody mikrokrytalizace pod olejem (vytvořeno autorkou, inspirováno [23]).

Obr. 9: Schéma metody volné difuze v kapiláře (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 10: Proces krystalizace proteinů pomocí metody volné difuze (vytvořeno autorkou, inspirováno [23]).

Obr. 11: Schéma metody difuze přes překážku. Technika oddělení roztoků gelovou zátkou (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 12: Schéma metody difuze přes překážku. Technika, kdy srážecí činidlo je ve formě gelu (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 13: Schéma metody counter diffusion. Technika GAME (vytvořeno autorkou, inspirováno [24]).

Obr. 14: Schéma metody křížové krystalizace ve formě sedící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [54]).

Obr. 15: Schéma metody křížové krystalizace ve formě visící kapky (vytvořeno autorkou, inspirováno [54]).

Obr. 16: Schéma procesu makroočkovací metody (vytvořeno autorkou, inspirováno [56]).

Obr. 17: Schéma procesu očkování pomocí laseru (vytvořeno autorkou, inspirováno [55]).

Obr. 18: Schéma procesu metody vlasového očkování (vytvořeno autorkou, inspirováno [56]).

Obr. 19: Fotografie jamky C<sup>1</sup>12 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).

Obr. 20: Fotografie z testování jamky C<sup>1</sup>12 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vytvořeno autorkou).

Obr. 21: Fotografie jamky A<sup>1</sup>10 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).

Obr. 22: Fotografie z testování jamky A<sup>1</sup>10 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vytvořeno autorkou).

Obr. 23: Fotografie jamky A<sup>2</sup>2 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).

Obr. 24: Fotografie z testování jamky A<sup>2</sup>2 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).

Obr. 25: Fotografie jamky B<sup>2</sup>1 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).

Obr. 26: Fotografie z testování jamky B<sup>2</sup>1 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).

Obr. 27: Fotografie jamky C<sup>2</sup>2 pořízena pomocí přístroje Jansi Uvex (Olympus, ČR) (vlevo), fotografie pořízená telefonem Xiaomi Mi A1, přes mikroskopu Olympus SZX9 (Olympus, ČR) (vpravo) (vytvořeno autorkou).

Obr. 28: Fotografie z testování jamky A<sup>2</sup>2 na přítomnost proteinových krystalů. Pořízená pomocí přístroje Jansi Uvex (JAN Scientific inc, USA) (vytvořeno autorkou).

## **9. Seznam tabulek**

Tab. I: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-1 a fondaparinuxu se sadou srážecích činidel MORPHEUS® II metodou sedící kapky.

Tab. II: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-1 a fondaparinuxu se sadou srážecích činidel SG1™ metodou sedící kapky.

Tab. III: Výsledky krystalizace proteinu Iripin-3 a heparinu se sadou srážecích činidel PGA screen™ metodou sedící kapky.

## 10. Přílohy

Seznam krystalizačních činidel ze sady MORPHEUS® II (Molecular Dimension, USA).

Screen ID	Well #	Conc	Ligands	Conc	Buffer	pH	Conc	Precipitant
1-1	A1	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-2	A2	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-3	A3	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-4	A4	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-5	A5	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-6	A6	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-7	A7	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-8	A8	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-9	A9	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-10	A10	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-11	A11	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-12	A12	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-13	B1	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-14	B2	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-15	B3	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-16	B4	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-17	B5	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-18	B6	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-19	B7	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-20	B8	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-21	B9	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-22	B10	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-23	B11	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-24	B12	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-25	C1	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-26	C2	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-27	C3	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-28	C4	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-29	C5	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-30	C6	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-31	C7	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-32	C8	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-33	C9	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-34	C10	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-35	C11	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-36	C12	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-37	D1	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-38	D2	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-39	D3	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-40	D4	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-41	D5	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-42	D6	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-43	D7	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-44	D8	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
1-45	D9	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
1-46	D10	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
1-47	D11	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
1-48	D12	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4

Tube	Well	Conc	Ligands	Conc	Buffer	pH	Conc	Precipitant
2-1	E1	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-2	E2	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-3	E3	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-4	E4	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-5	E5	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-6	E6	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-7	E7	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-8	E8	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-9	E9	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-10	E10	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-11	E11	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-12	E12	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-13	F1	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-14	F2	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-15	F3	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-16	F4	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-17	F5	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-18	F6	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-19	F7	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-20	F8	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-21	F9	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-22	F10	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-23	F11	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-24	F12	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-25	G1	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-26	G2	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-27	G3	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-28	G4	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-29	G5	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-30	G6	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-31	G7	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-32	G8	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-33	G9	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-34	G10	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-35	G11	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-36	G12	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-37	H1	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-38	H2	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-39	H3	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-40	H4	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-41	H5	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-42	H6	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-43	H7	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-44	H8	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4
2-45	H9	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 1
2-46	H10	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 2
2-47	H11	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 3
2-48	H12	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5 % v/v	Precipitant Mix 4

Seznam PDB ligandů (aditiv) v sadě krystalizačních činidel MORPHEUS® II (Molecular Dimension, USA).

PDB ligand name	Class	PDB ID (main)	No. of structures*
Lithium sulfate	Common salt	LI	51
Sodium chloride	Common salt	NA	4726
Potassium sulfate	Common salt	K	1638
Manganese chloride tetrahydrate	Divalent cation	MN	1938
Cobalt chloride hexahydrate	Divalent cation	CO	474
Nickel chloride hexahydrate	Divalent cation	NI	699
Zinc acetate dihydrate	Divalent cation	ZN	8413
Barium acetate	Alkali	BA	91
Cesium acetate	Alkali	CS	75
Rubidium chloride	Alkali	RB	34
Strontium acetate	Alkali	SR	101
Sodium chromate tetrahydrate	Oxometalate	CR	7
Sodium molybdate dihydrate	Oxometalate	MOO	20
Sodium orthovanadate	Oxometalate	VO4	73
Sodium tungstate dihydrate	Oxometalate	WO4	47
Erbium (III) chloride hexahydrate	Lanthanide	ER3	2
Terbium (III) chloride hexahydrate	Lanthanide	TB	11
Ytterbium (III) chloride hexahydrate	Lanthanide	YB	57
Yttrium (III) chloride hexahydrate	Lanthanide	YT3	33
Xylitol	Monosaccharide	XYL	25
D-(-)-fructose	Monosaccharide	FRU; FUD	36; 4
D-sorbitol	Monosaccharide	SOR	12
Myo-inositol	Monosaccharide	INS	16
L-rhamnose monohydrate	Monosaccharide	RAM	43
DL-threonine	Amino-acid	DTH; THR	23; n/a
DL-histidine, HCl, H2O	Amino-acid	DHI; HIS	24; n/a
DL-5-hydroxylysine, HCl	Amino-acid	n/a; LYZ	0; 7
Trans-4-hydroxy-L-proline	Amino-acid	HYP	149
Spermine, 4HCl	Polyamine	SPM	103
Spermidine, 3HCl	Polyamine	SPD	32
1,4-diaminobutane, 2HCl	Polyamine	PUT	22
DL-ornithine, HCl	Polyamine	ORD; ORN	3; 56
NDSB 256	Surfactant	DMX	4
NDSB 195	Surfactant	NDS	7
Bis-tris	Buffer	BTB	114

Seznam pufrů v sadě krystalizačních činidel MORPHEUS® II (Molecular Dimension, USA).

Mix name	Conc.	pH @ 20°C	Composition	Catalogue Number (100 mL)	Catalogue Number (250 mL)
Buffer System 1	1.0M	6.5	Imidazole; MES monohydrate (acid)	MD2-100-100	MD2-250-100
Buffer System 2	1.0M	7.5	Sodium HEPES; MOPS (acid)	MD2-100-101	MD2-250-101
Buffer System 3	1.0M	8.5	Tris (base); BICINE	MD2-100-102	MD2-250-102

Mix name*	Conc.	pH @ 20°C	Composition	Catalogue Number (100 ml)	Catalogue Number (250 ml)
Buffer System 4	1.0M	6.5	MOPSO, Bis-Tris	MD2-100-243	MD2-250-243
Buffer System 5	1.0M	7.5	BES, Triethanolamine (TEA)	MD2-100-244	MD2-250-244
Buffer System 6	1.0M	8.5	Gly-Gly, AMPD	MD2-100-245	MD2-250-245

Seznam precipitačních mixů v sadě krystalizačních činidel MORPHEUS® II (Molecular Dimension, USA).

Mix name	Old Mix Name	Composition	Catalogue Number (100 mL)	Catalogue Number (250 mL)
60% Precipitant Mix 1	P500MME_P20K	40% v/v PEG 500* MME; 20% w/v PEG 20000	MD2-100-81	MD2-250-81
60% Precipitant Mix 2	EDO_P8K	40% v/v Ethylene glycol; 20% w/v PEG 8000	MD2-100-82	MD2-250-82
60% Precipitant Mix 3	GOL_P4K	40% v/v Glycerol; 20% w/v PEG 4000	MD2-100-83	MD2-250-83
75% Precipitant Mix 4	MPD_P1K_P3350	25% v/v MPD; 25% PEG 1000; 25% w/v PEG 3350	MD2-100-84	MD2-250-84

Mix name*	Composition	Catalogue Number (100 ml)	Catalogue Number (250 ml)
72% Precipitant Mix 5	30% w/v PEG 3000, 40% v/v 1, 2, 4-Butanetriol, 2% w/v NDSB 256	MD2-100-239	MD2-250-239
65% Precipitant Mix 6	25% w/v PEG 4000, 40% w/v 1,2,6-Hexanetriol	MD2-100-240	MD2-250-240
60% Precipitant Mix 7	20% w/v PEG 8000, 40% v/v 1,5-Pentanediol	MD2-100-241	MD2-250-241
62% Precipitant Mix 8	10% w/v PEG 20000, 50% w/v Trimethylpropane, 2% w/v NDSB 195	MD2-100-242	MD2-250-242

## Seznam krystalizačních činidel ze sady SG1™ (Molecular Dimension, USA).

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



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

## Seznam krystalizačních činidel ze sady PGA screen™ (Molecular Dimension, USA).

Well #	Conc.	Salt 1	Conc.	Salt 2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant	Conc.	Precipitant2
A1	0.3 M	Potassium bromide			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A2	0.2 M	Magnesium chloride			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A3	0.3 M	Sodium malonate dibasic monohydrate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A4	0.6 M	Sodium formate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A5	1 M	Ammonium formate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A6	0.2 M	Potassium thiocyanate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A7	0.2 M	L-Proline			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A8	0.2 M	L-Arginine			0.1 M	Sodium acetate	5.0	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
A9					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
A10					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 500 MME
A11					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	MPD
A12					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 2000 MME
B1					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 3350
B2					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v	PEG 4000
B3					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v	PEG 8000
B4					0.1 M	Sodium acetate	5.0	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v	PEG 20000
B5	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
B6	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
B7	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
B8	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
B9	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
B10	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
B11	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
B12	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
C1	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
C2	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
C3	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
C4	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
C5	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
C6	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
C7	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
C8	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
C9	0.3 M	Potassium Bromide			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
C10	0.2 M	Magnesium chloride			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
C11	0.3 M	Sodium malonate dibasic monohydrate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
C12	0.6 M	Sodium formate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
D1	1 M	Ammonium formate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
D2	0.2 M	Potassium thiocyanate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
D3	0.2 M	L-Proline			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
D4	0.2 M	L-Arginine			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
D5					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
D6					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 500 MME
D7					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	MPD
D8					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 2000 MME
D9					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 3350
D10					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v	PEG 4000
D11					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v	PEG 8000
D12					0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v	PEG 20000

Well #	Conc.	Salt 1	Conc.	Salt 2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant	Conc.	Precipitant2
E1	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
E2	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
E3	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
E4	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
E5	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
E6	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
E7	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
E8	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
E9	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
E10	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
E11	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
E12	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
F1	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
F2	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
F3	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
F4	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
F5	0.3 M	Potassium bromide			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F6	0.2 M	Magnesium chloride			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F7	0.3 M	Sodium malonate dibasic monohydrate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F8	0.6 M	Sodium formate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F9	1 M	Ammonium formate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F10	0.2 M	Potassium thiocyanate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F11	0.2 M	L-Proline			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
F12	0.2 M	L-Arginine			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
G1					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
G2					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 500 MME
G3					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	MPD
G4					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 2000 MME
G5					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 3350
G6					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v	PEG 4000
G7					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v	PEG 8000
G8					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v	PEG 20000
G9	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
G10	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
G11	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
G12	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
H1	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
H2	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
H3	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
H4	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
H5	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
H6	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
H7	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
H8	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
H9	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
H10	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
H11	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
H12	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000

## 11. Seznam zkratek

AMPD – 2-amino-2-methyl-1,3-propandiol

GAME – metoda gelové akupunktury

GlyGly – dipeptid glycyglycerin

LM – nízkomolekulární polymer

MME – monomer ether

MES – 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina

NASA – Národní úřad pro letectví a vesmír

NDSB – skupina sloučenin, které mohou snižovat agregaci a pomáhat při skládání proteinů, číslo následující za zkratkou udává průměrnou molární hmotnost

PEG – polyethylenglykol, číslo následující za zkratkou udává průměrnou molární hmotnost v g/mol

PGA – polymer kyseliny poly- $\gamma$ -glutamové

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan