Utjecaj halogenidnih iona na kristalizaciju te molekulsku i kristalnu strukturu bakrovog(II), niklovog(II) i kobaltovog(II) derivata ljudskog inzulina

Gomaz, Boris

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:727797

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Boris Gomaz

UTJECAJ HALOGENIDNIH IONA NA KRISTALIZACIJU TE MOLEKULSKU I KRISTALNU STRUKTURU BAKROVOG(II), NIKLOVOG(II) I KOBALTOVOG(II) DERIVATA LJUDSKOG INZULINA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2020. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Biserke Prugovečki i dr. sc. Ivane Kekez.

Zahvale

Hvala mentoricama prof. dr. sc. Biserki Prugovečki i dr. sc. Ivani Kekez
bez kojih ne bih uspio ono što sada jesam.
Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima
bez kojih ne bih bio ono što sada jesam.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **IX**
ABSTRACT ..... **XI**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **2**
2.1. Inzulin **2**
2.1.1. Općenito o proteinima *2*
2.1.2. Peptidna veza *3*
2.1.3. Općenito o inzulinu *4*
2.1.4. Biosinteza inzulina *5*
2.1.5. Struktura inzulina *6*
2.1.6. Konformacija inzulina *9*
2.1.7. Šećerna bolest (Diabetes mellitus) *10*
2.2. Kristali **10**
2.2.1. Simetrija u kristalima *12*
2.2.2. Proteinska kristalografija *14*
2.2.3. Općenito o kristalizaciji *14*
2.3. Rendgenska strukturna analiza **18**
2.3.1. Rendgenska cijev *19*
2.3.2. Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu *21*
2.3.3. Sinkrotron *22*
2.3.4. Strukturni faktor *23*
2.3.5. Problem faza *23*
2.3.6. Utočnjavanje strukture *25*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **27**
3.1. Priprava otopina za kristalizaciju **27**
3.1.1. Bakrove soli *27*
3.1.2. Niklove soli *27*
3.1.3. Kobaltove soli *28*
3.1.4. Otopine halogenida *28*
3.1.5. Otopina citratnog pufera *29*
3.1.6. Otopine kiselina *29*
3.1.7. Otopine proteina *29*

3.2. Kristalizacija bakrovih(II), niklovih(II) i kobaltovih(II) derivata inzulina.....31
3.3. Rješavanje i utočnjavanje kristalnih struktura.....33
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 34
4.1. Kristalizacija i sakupljanje difrakcijskih podataka.....34
4.2. Rješavanje i utočnjavanje kristalnih struktura.....39
4.2.1. Niklov(II) derivat inzulina (D5C4).....39
4.2.2. Niklov(II) derivat inzulina (D5A1).....42
4.2.3. Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3).....46
§ 5. ZAKLJUČAK 57
§ 6. LITERATURNI IZVORI..... 59
§ 7. DODATAK.....XV
§ 8. ŽIVOTOPIS XXXIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ HALOGENIDNIH IONA NA KRISTALIZACIJU TE MOLEKULSKU I KRISTALNU STRUKTURU BAKROVOG(II), NIKLOVOG(II) I KOBALTOVOG(II) DERIVATA LJUDSKOG INZULINA

Boris Gomaz

Kristalizacijom inzulina s metalnim ionima (bakar(II), nikal(II) i kobalt(II)) u prisustvu različitih koncentracija halogenidnih iona (Cl^-, Br^- i I^-) dobiveno je 28 različitih jediničnih kristala koji su analizirani rendgenskom difrakcijom. Riješene su kristalne strukture triju derivata inzulina. Niklov(II) derivat inzulina kristaliziran u prisustvu bromidnih iona (c = 0,898 mol dm^{-3}) kristalizira u prostornoj grupi *H*32 s jednim monomerom inzulina u asimetričnoj jedinici dok u prisustvu niže koncentracije bromidnih iona (c = 0,148 mol dm^{-3}) kristalizira u prostornoj grupi *H*3 s jednim dimerom inzulina u asimetričnoj jedinici. Kobaltov(II) derivat inzulina kristaliziran u prisustvu kloridnih iona (c = 0,248 mol dm^{-3}) također kristalizira u prostornoj grupi *H*3, ali s dva dimera inzulina u asimetričnoj jedinici. U svim analiziranim strukturama heksameri inzulina su T_6 forme te sadrže dva metalna iona (Ni/Co) koordinirana s tri dušikova atoma iz simetrijski ovisnih molekula histidina i tri kisikova atoma iz tri molekule vode, ali su različite stabilnosti.

(91 stranica, 29 slika, 29 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: bakar, halogenidni ioni, heksamer, inzulin, kobalt, kristalizacija, nikal

Mentori: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki, dr. sc. Ivana Kekez, poslijedoktorand

Ocjenitelji:
1. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
3. prof. dr. sc. Davor Kovačević

Zamjena: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Datum diplomskog ispita: 24. rujna 2020.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

INFLUENCE OF HALIDE IONS ON CRYSTALLIZATION AND MOLECULAR AND CRYSTAL STRUCTURE OF COPPER(II), NICKEL(II) AND COBALT(II) DERIVATIVES OF HUMAN INSULIN

Boris Gomaz

Crystallization of insulin with metal ions (copper(II), nickel(II) and cobalt(II)) in the presence of different concentrations of halide ions (Cl^-, Br^- i I^-) yielded 28 different single crystals which were analyzed by X-ray diffraction method. The crystal structures of three insulin derivatives were solved. Nikel(II) insulin derivative crystallized in the presence of bromide ions (c = 0,898 mol dm^{-3}) crystallizes in the *H*32 space group with one insulin monomer in the asymmetric unit, while in the presence of lower concentration of bromide ions (c = 0,148 mol dm^{-3}) crystallizes in the *H*3 space group with one dimer in the asymmetric unit. The cobalt(II) insulin derivative crystallized in the presence of chloride ions (c = 0,248 mol dm^{-3}) also crystallizes in the *H*3 space group, but with two dimers in the asymmetric unit. In all analyzed structures, insulin hexamers are in T_6 form and two metal ions (Ni/Co) are octahedrally coordinated by three symmetry-related nitrogen atoms of three histidine molecules and three oxygen atoms from three water molecules, but with different stability.

(91 pages, 29 figures, 29 tables, 35 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: cobalt, copper, crystallization, halide ions, hexamer, insulin, nickel

Mentors: Dr. Biserka Prugovečki, Professor, Dr. Ivana Kekez, Research Associate

Reviewers:
1. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
2. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
3. Dr. Davor Kovačević, Professor

Substitute: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Professor

Date of exam: The 24th of September, 2020

§ 1. UVOD

Svjetske procjene govore da 463 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina živi sa šećernom bolešću. U Hrvatskoj je u 2019. bilo preko 315 tisuća osoba sa šećernom bolesti, a broj oboljelih povećava se iz godine u godinu.[1] Kako je u terapiji šećerne bolesti tipa I neophodan inzulin, postoji veliko zanimanje znanstvene zajednice za taj važan hormonski protein. Poznavanje strukture novih derivata inzulina i njihovog djelovanja od velike je važnosti u pronalaženju novih metoda za kontroliranje raznih poremećaja razine glukoze u krvi.

Inzulin je polipeptidni hormon koji se sastoji od dvaju lanaca: A lanca koji sadrži 21 aminokiselinu i B lanca koji sadrži 30 aminokiselina. Molekula inzulina pokazuje tendenciju stvaranja dimera u otopini zahvaljujući stvaranju vodikovih veza između C-terminalnih dijelova B lanaca. Uz prisustvo cinkovih iona dimeri inzulina se povezuju u puno stabilniji heksamer koji služi kao skladišni inzulin, dok je biološki aktivan kao monomer.[2] Pokazano je da i drugi metalni ioni mogu tvoriti heksamere inzulina te da različiti kristalizacijski uvjeti vode nastajanju triju različitih formi heksamera inzulina T_6, T_3R_3 i R_6. Pokazano je da se T_6 forma može prirediti kristalizacijom pri niskoj koncentraciji kloridnih iona i uz odsustvo fenola i njegovih derivata. T_3R_3 forma nastaje kristalizacijom iz medija u kojem je povećana koncentracija kloridnih iona dok R_6 forma heksamera inzulina nastaje kristalizacijom uz prisustvo fenola i fenolnih derivata.[3–5] Sve tri kristalne forme heksamera inzulina koriste se pri formulaciji inzulinskih pripravaka u tretiranju dijabetesa tipa I.

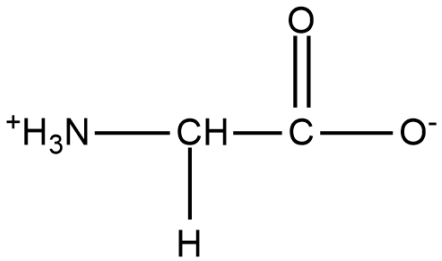
Cilj ovog rada bio je odrediti kristalizacijske uvjete za dobivanje jediničnih kristala novih derivata inzulina s različitim metalnim ionima (bakar(II), nikal(II) i kobalt(II)) u prisustvu različitih koncentracija halogenidnih iona (Cl^-, Br^-, I^-). Ispitan je utjecaj koncentracije halogenidnih iona na nastajanje različitih kristalnih formi derivata inzulina. Kristalizacija se provodila metodom difuzije para u visećoj kapi pri 20 °C. U slučaju dobivanja pogodnih jediničnih kristala za difrakcijski eksperiment, kristalografski podatci su sakupljeni na sinkrotronu *Elettra* u Trstu. Nakon prikupljanja difrakcijskih podataka slijedilo je rješavanje kristalnih struktura te njihovo utočnjavanje i usporedba sa sličnim poznatim strukturama u bazi podataka proteinskih makromolekula, *Protein Data Bank* (PDB).[6]

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Inzulin

2.1.1. Općenito o proteinima

Građevne jedinice proteina su aminokiseline kojih u prirodi postoji mnogo, no nisu sve proteinogene, odnosno ne grade sve proteine. Onih koje sudjeluju u nastajanju proteina ima 20 i nazivaju se standardnim aminokiselinama. Uz ovakve aminokiseline postoje i nestandardne koje nastaju ili sintetski ili u stanicama kao intermedijeri u metaboličkim putevima, od kojih se razlikuju u strukturi bočnog ogranka. Sve aminokiseline sadrže α-ugljikov atom na koji su vezane amino skupina, karboksilna skupina te aminokiselinski bočni ogranak. Uz gore navedene skupine vezane na α-ugljikov atom, vezan je također i jedan vodik što ugljikov atom čini kiralnim centrom. Stereoizomeri koji mogu postojati kod aminokiselina su D i L, prema D, L sustavu, no u prirodi su aminokiseline gotovo uvijek u svojoj L konfiguraciji dok se D konfiguracija može pronaći jedino kod nekih malih peptida u bakterijskim staničnim stijenkama te kod nekih peptidnih antibiotika.[2] Glicin je jedina aminokiselina koja nema kiralni centar (slika 1).



Slika 1. Strukturna formula aminokiseline glicina u njezinom dipolarnom obliku (*zwitterion*) s neto-nabojem nula kao primjer jedine aminokiseline koja nema kiralni centar.

Povezivanjem više aminokiselina u lanac nastaju peptidi i proteini. Aminokiseline se povezuju na način da karboksilna skupina jedne aminokiseline reagira s amino skupinom druge aminokiseline prilikom čega nastaje peptidna veza. Dakle, ovako nastali polimeri mogu imati samo nekoliko aminokiselinskih ostataka (peptidi) ili pak tisuće njih (proteini). Uz peptidnu

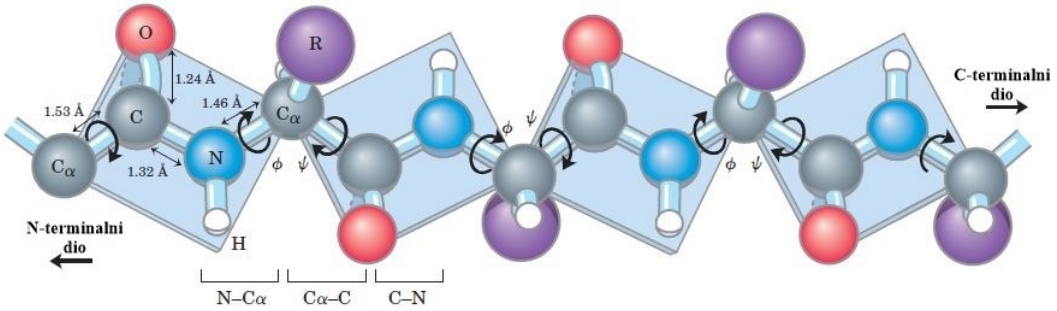
vezu, između cisteinskih ostataka može doći do stvaranja disulfidnih mostova, gdje se dva sumporova atoma iz različitih cisteina kovalentno povezuju. Povezivanjem aminokiselina dobiva se okosnica proteina koja se smata na različite načine čime se dobivaju strukturno različiti elementi. Shodno tome, može se napraviti strukturna klasifikacija proteina na četiri različite razine:[2]

a) primarna struktura – polipeptidni lanac aminokiselina povezanih kovalentnom vezom (peptidnom ili disulfidnom); aminokiselinska sekvenca,
b) sekundarna struktura – prostorni raspored aminokiselina koje se u aminokiselinskom slijedu međusobno nalaze u blizini, npr. α-zavojnica, β-nabrana ploča, β-okret, Ω-omča,
c) tercijarna struktura – trodimenzijska struktura svih aminokiselina jednog polipeptidnog lanca,
d) kvaterna struktura – prostorna organizacija podjedinica proteina, ako ih isti ima dvije ili više.

2.1.2. Peptidna veza

Peptidna veza kao što je već ranije navedeno, nastaje povezivanjem karboksilne skupine jedne aminokiseline i amino skupine druge aminokiseline u reakciji kondenzacije. Biosinteza peptidne veze odvija se na ribosomu prilikom translacije u strogo kontroliranim staničnim uvjetima. Nastajanje peptidne veze u nestaničnim uvjetima također je složen proces zbog reaktivnosti mnogih bočnih ogranaka što zahtijeva različite reagense kao zaštitne skupine. Peptidna veza je rigidna i ima karakteristike dvostruke veze zbog čega je grupa atoma oko peptidne veze koplanarna kao što se može vidjeti na slici 2. Također se može uočiti kako duljina veze C–N iznosi 1,32 Å iz čega se zaključuje kako je ova veza kraća od jednostruke kovalentne veze između ugljika i dušika.[7]

Kut ϕ definira se kao rotacija kod C_α atoma za vezu N–C_α (torzijski kut C(i) – N(i) – C_α(i) – C(i+1)) dok se kut ψ definira kao rotacija kod C_α atoma za vezu C–C_α (torzijski kut (N(i–1) – C(i) – C_α(i) – N(i)) gdje su atomi N i C atomi iz peptidne veze, a i označava i-tu aminokiselinu u polipeptidnom lancu. Oba od navedenih kutova imaju raspon od –180° do 180° no mnogi od tih vrijednosti su zabranjene zbog steričkih interakcija polipeptidne okosnice i aminokiselinskih bočnih ogranaka. Dopuštene vrijednosti kutova ϕ i ψ grafički se prikazuju ovisnošću kuta ψ o kutu ϕ u Ramachandranovu dijagramu.[2,7]



Slika 2. Planarna grupa atoma oko peptidne veze u aminokiselinskom slijedu (preuzeto i prilagođeno iz reference 2).

2.1.3. Općenito o inzulinu

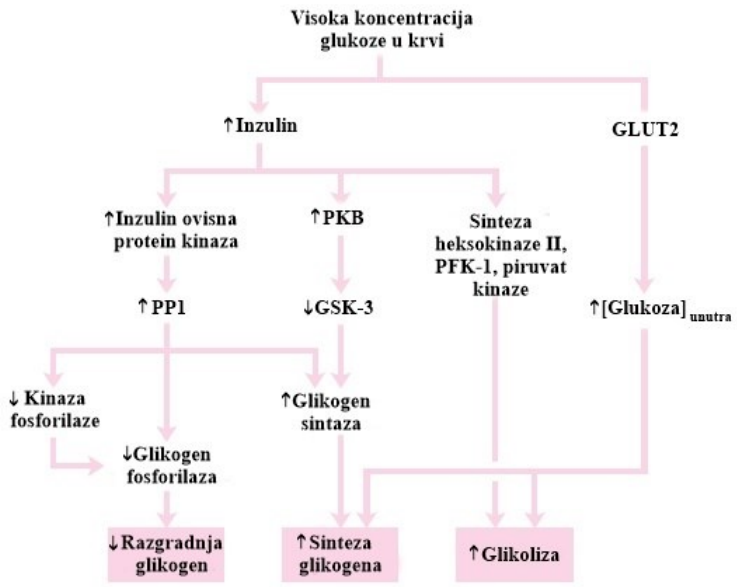
Istraživanja vezana uz inzulin počinju puno prije no što se znalo što je to inzulin, odakle se luči ili što to uzrokuje šećernu bolest. Godine 1921. dr. F. Banting sa svojim je kolegama uspio proizvesti ekstrakt gušterače koji je sadržavao Langerhansove otočiće, a time i inzulin. Tretiranjem životinje oboljele od dijabetesa, takav ekstrakt pokazao se uspješnim u kontroli razine glukoze u krvi. J. J. R. MacLeod godinu je kasnije uspješno reproducirao rezultate kod ozbiljno oboljelog dječaka te je zajedno s dr. F. Bantingom 1923. zasluženo dobio Nobelovu nagradu.[8]

Nadalje, 1926. godine J. J. Abel prvi je uspješno priredio kristale inzulina, a F. Sanger je 1955. godine prvi uspješno sekvencirao goveđi inzulin. Sva gore navedena otkrića zasigurno su pomogla pri otkrivanju trodimenzijskog rasporeda atoma inzulina u kristalu što je učinila D. Hodgkin sa suradnicima 1969. godine odredivši kristalnu strukturu svinjskog inzulina rendgenskom strukturnom analizom pri rezoluciji od 2,8 Å.[8,9] D. A. Scott je uočio kako se u kristalnom inzulinu ioni cinka mogu zamijeniti drugim ionima poput nikla, kobalta i kadmija.[10]

Najvažniji ljudski hormon u regulaciji ugljikohidrata, inzulin, luči se u krvotok nakon konzumacije šećerima bogatog obroka. Povećanje koncentracije glukoze u krvi uzrokuje njezin unos u specijalizirane stanice gušterače koje se nazivaju Langerhansovim otočićima. Iste se sastoje od α-stanica, β-stanica i δ-stanica te svake od njih imaju svoju ulogu u regulaciji metaboličkih puteva tako što luče polipeptidne hormone. Dakle, specifično govoreći, glukoza ulazi u β-stanice gušterače gdje se fosforilira te staničnim oksidacijskim procesima dovodi do povećanja citosolne koncentracije ATP-a koji pak indirektno utječe na izbacivanje inzulina iz stanica egzocitozom. Ovako izlučen inzulin stimulira unos glukoze u mišićna i adipozna tkiva te u jetri također aktivira glikogen-sintazu i inaktivira glikogen-fosforilazu što se može vidjeti

na slici 3. Uz sve procese koji se mogu vidjeti na slici 3, inzulin također stimulira pohranu viška energije u tijelu u obliku masti.

Ovaj polipeptidni hormon sastoji se od dvaju lanaca: A lanca koji sadrži 21 aminokiselinu i B lanca koji sadrži 30 aminokiselina. Međusobno su ova dva lanca povezana dvjema disulfinim vezama te se još jedna disulfidna veza nalazi u lancu A.[2]

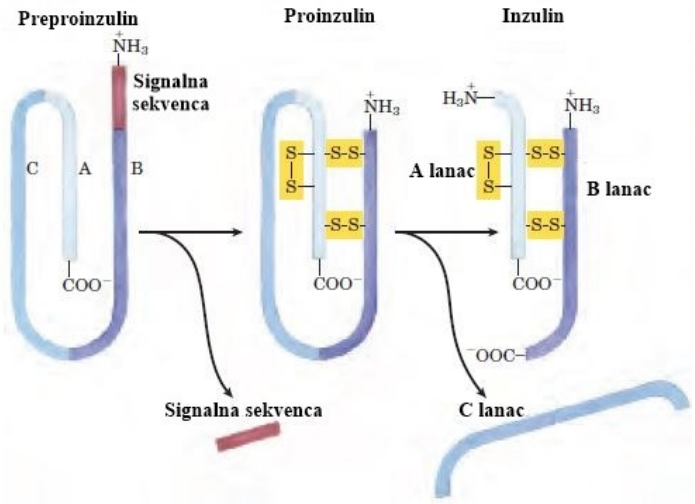


Slika 3. Regulacija metabolizma ugljikohidrata u stanicama jetara (preuzeto i prilagođeno iz reference 2).

2.1.4. Biosinteza inzulina

Molekula inzulina, građena od dva polipeptidna lanca ne nastaje takvom odmah nakon translacije već se prije toga odvijaju brojne transformacije. U jezgri β-stanica Langerhansovih otočića gušterače gen za inzulin najprije se transkribira u odgovarajuću mRNA te ta glasnička RNA izlaskom u citoplazmu dolazi na ribosom gdje se translatira. Translacijom nastaje preproinzulin koji na N-kraju sadrži signalnu sekvencu duljine 24 aminokiseline. Ova signalna sekvenca interagira sa ribonukleoproteinskim kompleksom SRP (engl. *signal recognition particle*) koji dovodi ribosom, na kojem se translatira inzulinska mRNA, do endoplazmatskog retikuluma (ER) na čijoj se membrani nastavlja sinteza prehormona u lumen ER. Nastali preproinzulin je kratko živući jer podliježe cijepanju signalne sekvence odmah pri dolasku u lumen čime nastaje proinzulin. Nakon toga slijedi smatanje proinzulina u odgovarajuću konformaciju te formiranje disulfidnih mostova na točno određenim pozicijama u čemu uvelike

pomaže mašinerija šaperona u ER. Proinzulin se sastoji od lanaca A, B i C te se razlikuje od inzulina samo u lancu C. Prisutnost lanca C prilikom smatanja je od ključne važnosti kod povezivanja cisteina u disulfidne mostove budući da ih baš taj lanac pozicionira jedan do drugog. Pravilno smotani proteini zatim idu prema Golgijevom aparatu gdje se pakiraju u nezrele sekrecijske vezikule zajedno s enzimima za doradu. Nakon djelovanja peptidaza dolazi do odcjepljenja lanca C čime nastaje inzulin. Proinzulin i inzulin u sekrecijskiim vezikulama mogu formirati dimer ili heksamer stabiliziran cinkom no kod proinzulina ne dolazi do nastajanja heksamera kao kod inzulina. U vremenskom periodu od 20 minuta do 2 sata od preproinzulina nastaje inzulin koji se izlučuje u krvotok nakon čega može sudjelovati u svom signalnom nizvodnom putu prikazanom na slici 3 u prijašnjem odjeljku. Ipak, mala količina proinzulina se ne transformira u inzulin te kao takav odlazi u krvotok. Kako ne dolazi do daljnje dorade ili cijepanja proinzulina u krvotoku, napravljena su mjerenja aktivnosti proinzulina. U usporedbi s inzulinom, proinzulin pokazuje od 3% do 5% biološke aktivnosti.[11] Na slici 4 može se vidjeti proces nastajanja inzulina.



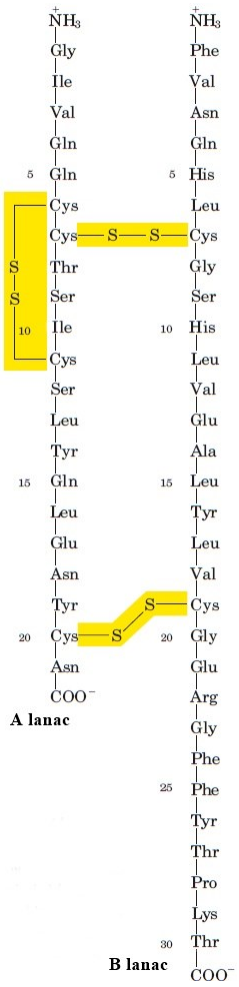
Slika 4. Proces nastajanja inzulina iz preproinzulina (preuzeto i prilagođeno iz reference 2).

2.1.5. Struktura inzulina

Kao što je gore već navedeno, karakteristika proteina su njihove strukturne razine pa prema tome ni inzulin nije iznimka.

1. Primarna struktura inzulina

Ovaj mali peptidni hormon sastoji se od dva lanca. Lanac A sadrži 21 aminokiselinu, dok lanac B sadrži 30 aminokiselina. Jedna od strukturnih karakteristika inzulina su njegova tri disulfidna mosta. Na slici 5 nalazi se aminokiselinski slijed ljudskog inzulina koji se od inzulina drugih životinja razlikuje u svega nekoliko aminokiselina. Tako se npr. od goveđeg inzulina razlikuje u tri aminokiseline i to Thr**A8**Ala, Ile**A10**Val i Thr**B30**Ala, a od svinjskog inzulina u samo jednoj aminokiselini Thr**B30**Ala. Ova činjenica bila je korištena kod liječenja dijabetesa prije napretka tehnologije rekombinantne DNA koja omogućuje proizvodnju ljudskog inzulina. Na slici 5 su također vidljive i gore spomenute disulfidne veze te se može vidjeti kako su lanci A i B povezani preko cisteina Cys**A7**–Cys**B7** te Cys**A20**–Cys**B19**. Treća disulfidna veza je intramolekulska i nalazi se u lancu A između Cys**A6** i Cys**A11**.[12] Brojevi aminokiselina dodijeljeni su prema konvenciji, brojanje kreće od N-terminalnog dijela prema C-terminalnom dijelu.



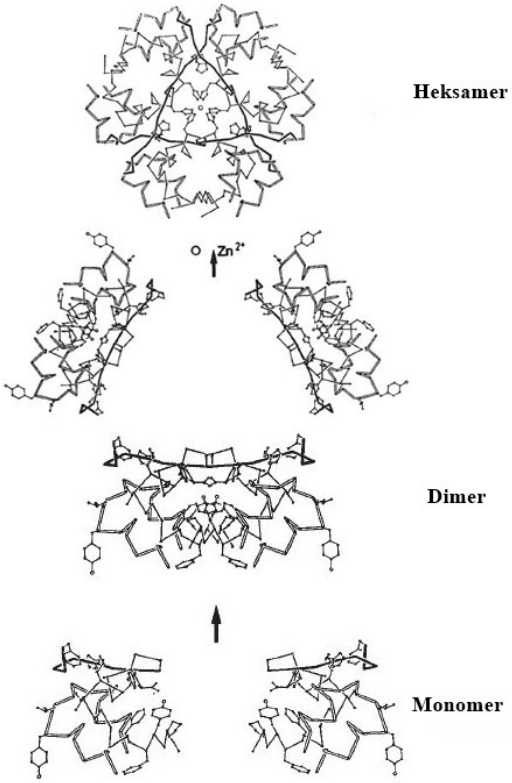
Slika 5. Aminokiselinska sekvenca ljudskog inzulina (preuzeto i prilagođeno iz reference 2).

2. Sekundarna struktura inzulina

Sekundarne strukture koje se javljaju u lancu A su dvije antiparalelne α-zavojnice između koji se nalazi slobodna omča. Na krajevima zavojnica također se nalazi nekoliko aminokiselina koje nisu sadržane u njima. U lancu B je obrnuta situacija, α-zavojnica se nalazi u središnjem dijelu, između dvaju krajeva lanca bez ikakvih sekundarnih struktura.

3. Tercijarna i kvaterna struktura inzulina

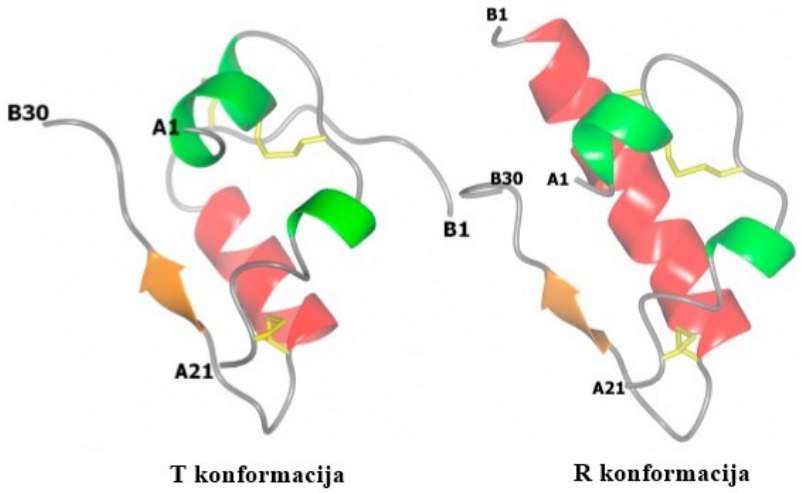
Povezani lanci A i B, kao što je gore opisano, tvore AB monomer. Takav monomer u kiselom okruženju najčešće tvori dimer te heksamer uz prisustvo metalnog kationa. U krvotoku je inzulin prisutan kao monomer budući da je kao takav biološki aktivan. U stanicama gušterače dolazi do nastajanja heksamera inzulina, nalik onima u kristalu, u čijoj strukturi se nalaze cinkovi ioni. U *in vitro* uvjetima dolazi do kristalizacije različitih formi heksamera inzulina, a samim time i smještanja različitog broja cinkovih iona u strukturu. Kako će u nastavku biti prikazano, umjesto cinka, heksamer može nastati i uz drugačije dvovalentne metalne ione. Stvaranje dimera, a zatim i heksamera inzulina prikazano je na slici 6.



Slika 6. Stvaranje dimera i heksamera inzulina (preuzeto i prilagođeno iz reference 13).

2.1.6. Konformacija inzulina

N-terminalni dio B lanca monomera inzulina može poprimiti dvije konformacije koje su nazvane T = *tense* i R = *relaxed* još davne 1989. godine.[14] Prije toga, različiti konformeri heksamera inzulina nazivali su se 2Zn i 4Zn čime se označavao broj cinkovih iona sadržanih u njihovoj strukturi. No, kako su se u broju cinkovih iona u strukturi pojavile određene "anomalije", bilo je potrebno uvesti novo nazivlje. T konformacija označava monomer inzulina u kojem se kod B lanca aminokiseline od B1 do B8 nalaze u izduženoj formi dok kod R konformacije one tvore α-zavojnice (slika 7). Na temelju ovakvih pravila moguća su tri različita konformera heksamera inzulina: T_6, T_3R_3/$T_3R_3^f$ te R_6. Svih šest monomernih jedinica se kod T_6 i R_6 stanja nalaze u T odnosno R konformaciji dok se kod T_3R_3 tri nalaze u T i tri u R konformaciji. Kod konformacije R^f dolazi do već gore spomenutog produženja α-zavojnice no samo do B4 aminokiseline čime aminokiseline B1–B3 ostaju u izduženoj konformaciji. T_6 i R_6 konformeri sadrže dva cinkova iona u strukturi, a T_3R_3 konformer sadrži različit broj cinkovih iona, najviše četiri. T_6 heksamer je moguće dobiti bez dodatka ili pri niskoj koncentraciji halogenidnih iona. Promjena $T_6 \rightarrow T_3R_3^f$ inducirana je dodatkom veće koncentracije halogenidnih ili pseudohalogenidnih iona dok je za postizanje R_6 konformacije potrebno dodati fenol ili neki drugi ciklički alkohol. Fiziološka uloga, T odnosno R konformacije, još nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavlja se kako T konformacija uvelike pomaže prilikom biosinteze inzulina, odnosno pri pravilnom smatanju. Nadalje, R konformacija nije konformacija u kojoj se inzulin veže na inzulinski receptor (IR). Shodno tome, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se bolje razumjela interakcija inzulin–IR i priroda skladištenja inzulina čime bi se poboljšao dizajn njegovih novih analoga, a samim time i borba protiv šećerne bolesti.[15]



Slika 7. Razlika u strukturi B lanca kod T (lijevo) i R (desno) konformacije inzulina gdje se uočava produljenje α-zavojnice na aminokiseline B1−B8 kod R konformacije (preuzeto i prilagođeno iz reference 15).

2.1.7. Šećerna bolest (*Diabetes mellitus)*

Šećerna bolest je bolest uzrokovana smanjenjem lučenja inzulina u krvotok ili nastaje uslijed neosjetljivosti nekih receptora na sam hormon. Ovisno o uzrocima bolesti, postoje dva tipa dijabetesa: dijabetes tipa I ili *diabetes mellitus* ovisan o inzulinu (IDDM) i dijabetes tipa II ili *diabetes mellitus* neovisan o inzulinu (NIDDM). Kod IDDM, bolesnici reagiraju na injekcije inzulina budući da kod ovog tipa bolesti nema dovoljno β-stanica gušterače i posljedično tome nema dovoljne proizvodnje hormona. Dijabetes tipa I se javlja u mlađoj dobi, dok se dijabetes tipa II češće javlja kod starijih i pretilih osoba. Kod pacijenata s NIDDM ne pomažu injekcije inzulina budući da se hormon proizvodi u tijelu no neka komponenta sustava za odgovor je u kvaru.[2] Postoji još jedan tip dijabetesa i to je gestacijski dijabetes koji se javlja u trudnica i nestaje nakon poroda. Povišena razina šećera najčešće se regulira injekcijama inzulina.

2.2. Kristali

Kristal je pravilno, periodičko, trodimenzijsko uređenje motiva (atoma, iona ili molekula) koji rendgenskom difrakcijom daje difrakcijsku sliku. Kristalizacija je proces nastajanja kristala. Kod kristalizacije malih molekula, poput nekih anorganskih soli ili čak organske molekule nije potrebno ugoditi toliko parametara kao kod proteina. Uvjeti koji moraju biti zadovoljeni kod

kristalizacije proteina su čistoća uzorka, homogenost uzorka, pH okruženja, koncentracija proteina, koncentracija precipitanta, temperatura. Kada se kristal proteina i dobije, moraju se na umu imati njegova specifična svojstva. Ovakvi kristali veoma su krhki i osjetljivi zbog slabih interakcija između molekula proteina čime se u samom kristalu stvaraju kanali ispunjeni otapalom. Zbog oponašanja fizioloških procesa, najčešće otapalo je voda koje u kristalu ima od 20% do 80%. S proteinskim kristalima treba pažljivo rukovati budući da se zbog velikog udjela vode ne smiju isušiti. Kao što je gore navedeno, kristali imaju pravilnu trodimenzijsku raspoređenost koja se kod proteina može lagano narušiti zbog njihove velike strukture i mobilnosti sekundarnih motiva, omči.

Molekule proteina na koje se ne može primijeniti nikakav element simetrije opisuju asimetričnu jedinicu. Ako se pak na tu asimetričnu jedinicu primjeni simetrija, dobiva se jedinična ćelija. Translacijom jedinične ćelije u sva tri smjera dobiva se kristal. Jedinična ćelija je dakle, građevna jedinka kristala definirana s kristalografskim osima a, b i c te kutovima α, β i γ. Definiranjem osnovnih parametara jedinične ćelije, može se definirati sedam kristalnih sustava prikazanih u tablici 1.

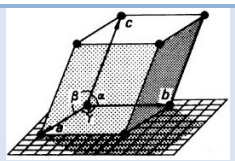
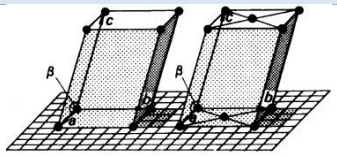
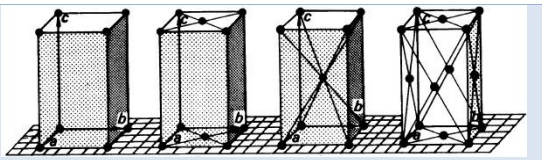
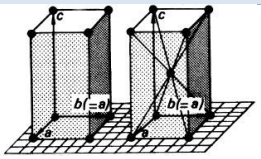
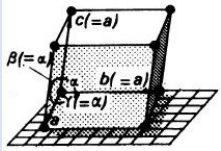
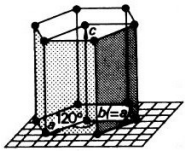
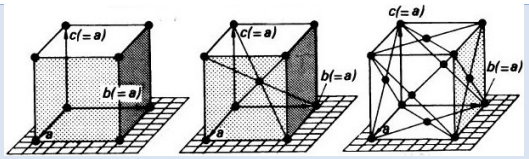
Tablica 1. Sedam kristalnih sustava.

Kristalni sustav	**Karakteristična osi rotacije**	**Parametri jedinične ćelije**
TRIKLINSKI	Nema	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90°$
MONOKLINSKI	Os rotacije drugog reda	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90°, \beta \neq 90°$
ORTOROMPSKI	Tri osi rotacije drugog reda	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90°$
TETRAGONSKI	Jedna os rotacije četvrtog reda	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90°$
TRIGONSKI	Jedna os rotacije trećeg reda	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90°$
HEKSAGONSKI	Jedna os rotacije šestog reda	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90°, \gamma = 90°$
KUBIČNI	Četiri osi rotacije trećeg reda	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90°$

2.2.1. Simetrija u kristalima

Vanjština kristala direktna je posljedica mikroskopske uređenosti u njima. Elemente simetrije koje možemo pronaći u kristalima su zrcalne ravnine, osi rotacije te centri inverzije. Ovi elementi simetrije mogu se kombinirati te se sve kombinacije svrstavaju u točkine grupe. Točkine grupe su zapravo grupe simetrijskih operacija koje povezuju plohe kristala, a elementi simetrije od kojih se točkina grupa sastoji svi prolaze kroz jednu točku. Kako se kod ovih elemenata simetrije ne uzima u obzir translacija, definirane su 32 točkine grupe. Te grupe se zatim mogu razvrstati u točno sedam kristalnih sustava prikazanih u tablici 1. Svaki kristalni sustav ima karakterističnu rotacijsku os koja mora biti sadržana u kristalu točno određenog kristalnog sustava.[16] Trodimenzijske rešetke odnosno Bravaisove rešetke predstavljaju daljnju kategorizaciju kristala, odnosno prikazuju gdje se u jediničnoj ćeliji nalaze atomi odnosno skupine atoma. Bravaisovih rešetki ima 14 i raspodijeljene su između sedam kristalnih sustava (tablica 2).

Tablica 2. 14 Bravaisovih rešetki (preuzeto i prilagođeno iz reference 17).*

Kristalni sustav	Prostorni prikaz Bravaisovih rešetki
TRIKLINSKI	 *P*
MONOKLINSKI	 *P* *C*
ORTOROMPSKI	 *P* *C* *I* *F*
TETRAGONSKI	 *P* *I*
TRIGONSKI	 *R*
HEKSAGONSKI	 *P*
KUBIČNI	 *P* *I* *F*

*U tablici 2 nalaze se jednoslovne kratice Bravaisovih rešetki i one označavaju: *P* – primitivna rešetka, *A*, *B* i *C* – rešetka centrirana po (100), (010) i (001) plohi, *I* – prostorno centrirana, *F* – plošno centrirana i *R* – romboedarska rešetka. Kod trigonskog sustava moguća su dva odabira glavne osi, romboedarski i heksagonski te se shodno tome jednoslovna kratica zapisuje kao *R*, odnosno *H*.

Daljnjom kombinacijom 32 točkine grupe, 14 Bravaisovih rešetki te dozvoljenih operatora translacije (klizne ravnine i helikoidalne osi) dobivamo 230 prostornih grupa koje u potpunosti opisuju simetriju kristalne strukture. Zrcalna ravnina i centar inverzije bi L-aminokiseline preveli u D-aminokiseline što nije dopušteno te se ovakvim ograničenjem broj prostornih grupa koje mogu biti prisutne kod proteinskih makromolekula smanjuje s 230 na 65.

2.2.2. Proteinska kristalografija

Proučavanjem trodimenzijske strukture proteina, nukleinskih kiselina i velikih bioloških kompleksa bavi se kristalografija biomakromolekula. Kako su od ovih triju sustava, proteini najviše istraženi, ova grana znanosti još se naziva i proteinskom kristalografijom. Glavna metoda rješavanja strukture biomakromolekula je rendgenska strukturna analiza, no nije jedina. Također se koristi difrakcija neutronskog zračenja, metoda višedimenzionalne nuklearne magnetske rezonancije (NMR)[18] i krio-elektronska mikroskopija.

Proteinska kristalografija, datira još od 19. stoljeća, odnosno od 1840. godine kada su otkrivene kristalne forme u uzorcima krvi. Kristali proteina su se češće dobivali slučajno nego namjerno, no počelo ih se sve više koristiti u svrhu pročišćavanja. Kristalografija se razvila tek nakon stotinjak i više godina kada su kristali mioglobina (1958. godine) podvrgnuti rendgenskom zračenju i dobivena je njegova trodimenzijska struktura. Razvojem instrumentacije i kompjuterskih programa riješene su strukture sve većih proteina te su se pronalazili optimalni uvjeti kristalizacije za sve veći broj proteina.[19] Kada je riječ o procesu određivanja strukture proteina dolazi se do jako puno prepreka, od ekspresije, kristalizacije, difrakcije pa do samog rješavanja strukture. Današnja tehnologija omogućila je automatizaciju nekih od gore navedenih koraka. Sinkrotronsko zračenje i kompjutorski programi koji omogućavaju brže rješavanje struktura uvelike su pomogli pri rješavanju struktura proteina. Do trenutka pisanja ovog rada je riješeno 163 414 struktura[20] koje su pohranjene u bazu podataka PDB te se ovaj broj svakim danom povećava.

2.2.3. Općenito o kristalizaciji

Od svih koraka koji se obavljaju u problematici rješavanja strukture biomakromolekule, dobivanje jediničnog kristala je najmanje istražen, a samim time i najmanje shvaćen korak. U procesu kristalizacije kristal se polagano izdvaja iz otopine, no ovisno o vremenu i odabranim

parametrima u kristalizacijskoj otopini mogu nastati mikrokristali, jedinični kristali ili pak amorfni produkti koji nisu korisni u rendgenskoj strukturnoj analizi.

Proces kristalizacije uključuje četiri važna koraka:

1. Pročišćavanje proteina.

   Čistoća proteina mora biti iznimno visoka. Ako tijekom kristalizacije nije došlo do pojave kristala, potrebna su daljnja pročišćavanja.

2. Otapanje proteina u pogodnom otapalu.

   Protein se otapa u pogodnom otapalu uz dodatak soli ili nekog organskog agensa (obično se koriste vodene otopine pufera)...

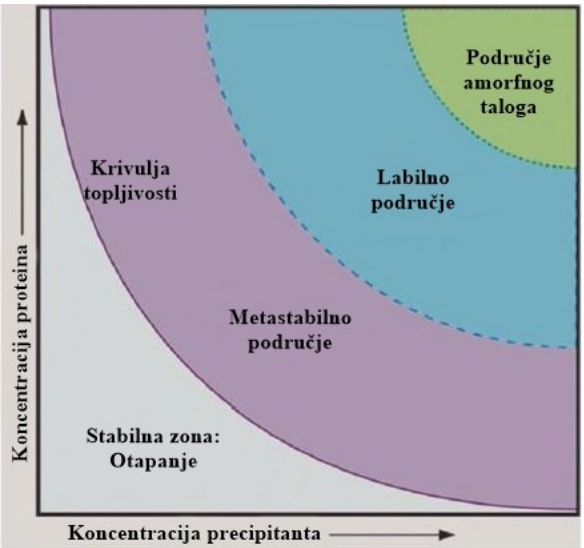
3. Prezasićenje otopine proteina dodavanjem taložnih reagensa i mijenjanjem drugih uvjeta (temperature, pH, koncentracija...).

   Priređena otopina proteina dovodi se do prezasićenja prilikom čega dolazi do formiranja malih agregata, odnosno jezgri kristalizacije. Svaki protein ima svoju površinsku napetost i kada molekula prevlada tu energetsku barijeru dolazi do slaganja molekula proteina jednog do drugog što inicira kristalni rast.

4. Rast kristala na jezgrama kristalizacije uz reduciranje prezasićenja.

   Povezivanje nove molekule proteina na površinu kristala događa se prije na nesavršenim nego na ravnim površinama. Nesavršenosti mogu nastati zbog defekta u kristalnom uređenju ili pak prilikom dodatne nukleacije na samoj površini već nastale jezgre.

Na slici 8 nalazi se fazni dijagram topljivosti proteina. Protein je tijekom kristalizacije potrebno dovesti u zonu prezasićenja (obojeni dio – iznad krivulje topljivosti). Ta zona prezasićene proteinske otopine je podijeljena u tri dodatna područja: metastabilno područje, labilno područje i područje amorfnog taloga. Nukleacija i rast kristala događaju se u labilnom području. Smanjenjem koncentracije otopljenog proteina uslijed kristalizacije dolazi se u metastabilno područje gdje se nastavlja rast kristala, ali tu nema nukleacije. Kristal raste do krivulje topljivosti gdje je u ravnoteži s otopljenim proteinom. Zona najvećeg prezasićenja je područje amorfnog taloga.[18]



Slika 8. Fazni dijagram topljivosti proteina (preuzeto i prilagođeno iz reference 18).

Postoje razne tehnike kristalizacije, nadalje su nabrojene i ukratko objašnjene neke o njih:[16]

1. *Batch* kristalizacija

   Ova metoda jedna je od najstarijih i najjednostavnijih metoda kristalizacije proteina. Princip je u tome da se kristalizacijska otopina koja sadrži precipitant dodaje direktno u otopinu proteina čime se otopina proteina dovodi do prezasićenja. U najboljem slučaju, kristali proteina postepeno rastu iz otopine, što ne zahtjeva daljnje postupke u samoj kristalizaciji. Moguće su razne izvedbe ove metode npr. µbatch kristalizacija u uljnoj kapi.

2. Difuzija tekuće–tekuće

   U metodi difuzije tekuće–tekuće koristi se kapilara u kojoj su kristalizacijska otopina i otopina proteina jedna iznad druge uz pravilo da je donja otopina uvijek ona veće gustoće. Između otopina se stvara oštra granica faza te takve otopine postepeno difundiraju jedna u drugu.

3. Difuzija para

   To je najčešće korištena tehnika kristalizacije proteina koja ima dvije izvedbe:

   a) Metoda difuzije para iz viseće kapi

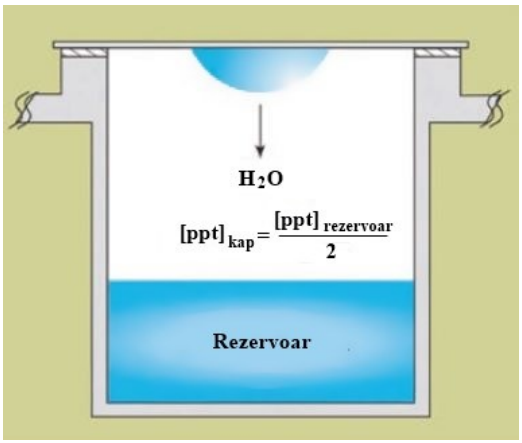
   Priprema se kristalizacijska otopina koja se stavlja u spremnik kristalizacijske posudice, te se zasebno pripremi otopina proteina koja se stavlja na silikonizirano stakalce. Otopini proteina na silikoniziranom stakalcu se dodaje najčešće isti volumen kristalizacijske otopine iz spremnika i stakalce se okrene tako da kapljica

visi nad sadržajem spremnika. Između spremnika i stakalca potrebno je staviti ulje ili mast kako bi se sustav hermetički zatvorio.

b) Metoda difuzije para iz sjedeće kapi

Izvedba je slična metodi viseće kapi, no u ovom slučaju se smjesa otopine proteina i kristalizacijske otopine iz spremnika nalazi pored spremnika. Metoda sjedeće kapi je pogodnija kada otopina proteina ima malu površinsku napetost zbog čega se ne može koristiti metoda viseće kapi.

Difuzija para se temelji na ravnoteži vode i lako hlapivih tvari između kapljice koja sadrži otopinu proteina i kristalizacijsku otopinu te otopine spremnika koji sadrži kristalizacijsku otopinu. U ovom eksperimentu se koristila metoda difuzija para iz viseće kapi te se njena izvedba nalazi na slici 9.



Slika 9. Prikaz jednog spremnika i stakalca s kapljicom kod metode difuzija para iz viseće kapi (preuzeto i prilagođeno iz reference 18).

4. Dijaliza

Ova metoda također ima nekoliko izvedbi gdje se prema količini dostupnog proteina određuje koja će se od njih koristiti. Princip metode je takav da se otopina proteina uroni u kristalizacijsku otopinu, a između otopina se nalazi polupropusna membrana. Kroz polupropusnu membranu mogu prolaziti molekule iz kristalizacijske otopine ali ne i proteinska makromolekula.

2.3. Rendgenska strukturna analiza

Otkriće rendgenskih zraka 1895. godine jedno je od najvećih svjetskih otkrića, a tehnike u kojima se koristi rendgensko zračenje se unaprjeđuju kako napreduje i sama znanost. Wilhelm Conrad Röntgen otkrio je da fluorescentni zaslon (barijev tetracijanoplatinat) kada se približi Crookesovoj ili Lenardovoj cijevi blještavo svijetli te fluorescira, no pod uvjetom da se nalazi dva metra od nje. Röntgen je zaključio kako se ova pojava desila uslijed izlaganju novim nevidljivim zrakama koje je on nazvao X-zrakama. Za ovako veliko otkriće Röntgen je dobio Nobelovu nagradu iz fizike 1901. godine te je time također zaintrigirao svjetsku znanstvenu zajednicu budući da se od tad moglo "fotografirati" nevidljivo. Rendgensko zračenje ima široku primjenu u područjima medicine, fizike, kemije, mineralogije itd.[21]

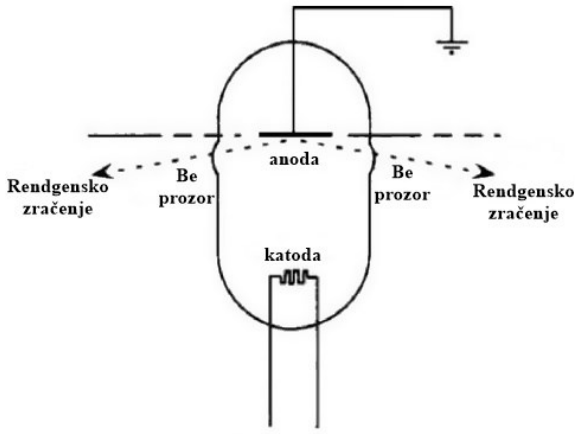
Iste godine napravljena je prva i vjerojatno najpoznatija rendgenska fotografija. Na fotografiji se nalazi lijeva ruka žene W. C. Röntgena, Anne Berthe (slika 10). Rendgensko zračenje je otkriveno nešto ranije od nastanka ove fotografije, točnije 08. listopada, čime se na taj dan obilježava svjetski dan radiologije.

Slika 10. Rendgenska fotografija ruke žene W. C. Röntgena (preuzeto iz reference 22).

Rendgenske zrake su visokoenergetske elektromagnetske zrake čija valna duljina je između 10 pikometara i 10 nanometara što ih smješta između ultraljubičastog i gama zračenja u elektromagnetskom spektru. Za istraživanja koja se provode na kristalima koristi se rendgensko zračenje valne duljine između 0,5 Å i 2,5 Å. O valnoj duljini naravno ovisi i sama energija zračenja te dubina prodora zračenja u materiju. U kristalografiji se koristi rendgensko zračenje gore navedenih valnih duljina, a te valne duljine odgovaraju redu veličine atoma i međuatomske udaljenosti.

2.3.1. Rendgenska cijev

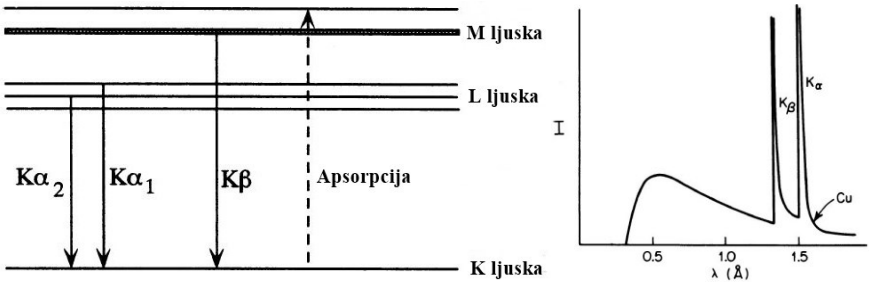
Rendgensko zračenje se generira u rendgenskim cijevima koje imaju dvije bitne komponente, a to su katoda i anoda (antikatoda). Katoda je u većini slučajeva napravljena od volframa te se zagrijava i kao takva je izvor elektrona. Zbog razlike potencijala između katode i anode elektroni iz volframove niti imaju veoma velike brzine. Kada takvi brzi elektroni dolaze do anode, materija ih apsorbira i značajno se zagrije, dok se oko 1% energije elektrona iskoristi za generiranje rendgenskih zraka. Anodu je potrebno hladiti kako se ne bi užarila, odnosno rastalila. Uz opisanu izvedbu statične anode, postoji i rendgenska cijev s rotirajućom anodom. Zbog kružnog kretanja anode imamo efikasnije hlađenje i može se dobiti intenzivniji snop rendgenskog zračenja.[16] Na slici 11 vidi se pojednostavljen prikaz rendgenske cijevi koji prikazuje njezine glavne elemente. Također, mogu se vidjeti berilijevi prozorčići kroz koje izlazi rendgensko zračenje. Berilij slabo apsorbira rendgensko zračenje što ga čini idealnim materijalom za propuštanje rendgenskih zraka iz vakuumom ispunjene rendgenske cijevi.



Slika 11. Shematski prikaz rendgenske cijevi (preuzeto i prilagođeno iz reference 16).

Anoda apsorbira brze elektrone pristigle s katode koji zatim izbijaju elektrone nižih energetskih orbitala njezinih atoma, na čije mjesto dolaze elektroni viših energetskih orbitala. Ovakvim prijelazom emitiraju se rendgenske zrake. Na slici 12 može se vidjeti shematski prikaz nastajanja karakterističnog zračenja (lijevo) te spektar kontinuiranog i karakterističnog rendgenskog zračenja s bakrenom anodom (desno). Orbitale elemenata podijeljene su u ljuske te tako poznajemo K, L i M ljusku. Ako se apsorpcijom energije u K ljuski izbije jedan njen elektron te zatim dođe do popunjavanja njegova mjesta elektronom iz neke ljuske više energije, događa se emisija rendgenskog zračenja specifične valne duljine. Ako se to popunjavanje desi

elektronom iz L ljuske govori se o K_α zračenju koje se zapravo sastoji od $K_{\alpha 1}$ i $K_{\alpha 2}$ linije (slika 12). Ako se pak tranzicija desi iz M ljuske u tu istu K ljusku govori se o K_β zračenju.[16] Na slici 12 u emisijskom spektru bakrenog zračenja može se uočiti zračenje karakterističnih valnih duljina (K_α i K_β) te također na nižim valnim duljinama možemo vidjeti kontinuirano zračenje, koje nastaje zbog usporavanja nadolazećih elektrona uslijed interakcije s atomskim jezgrama.



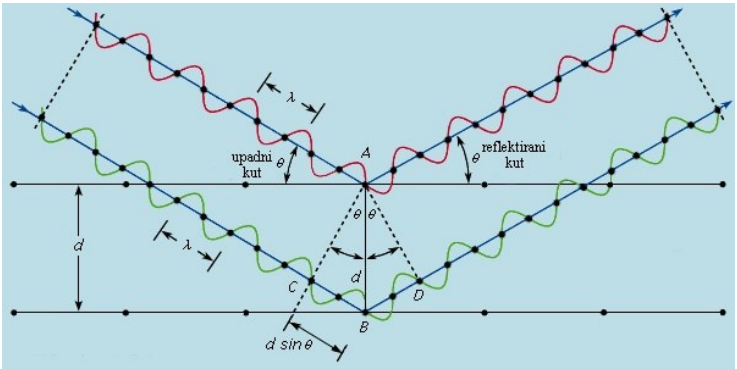
Slika 12. Shematski prikaz nastajanja karakterističnog rendgenskog zračenja (lijevo) i spektar kontinuiranog i karakterističnog bakrenog zračenja (desno). Valne duljine karakterističnog zračenja bakra iznose: λ ($K_{\alpha 1}$) = 1,54051 Å, λ ($K_{\alpha 2}$) = 1,54433 Å, λ (K_β) = 1,39217 Å. (preuzeto i prilagođeno iz reference 16).

Kod difrakcije rendgenskog zračenja kao materijal anode najčešće se koriste molibden i bakar zbog svojih karakterističnih valnih duljina K_α zračenja čije srednje vrijednosti valnih duljina iznose 0,7107 Å za molibden i 1,5418 Å za bakar. Rendgenska cijev s molibdenovom anodom koristi se kod određivanja struktura malih molekula, dok se anoda od bakra koristi kod određivanja struktura makromolekula ili malih organskih molekula.

Za rendgensku strukturnu analizu najčešće se ne koristiti cijeli spektar rendgenskog zračenja već zračenje treba biti monokromatsko. Da bismo dobili monokromatsko rentgensko zračenje koristimo filtere ili monokromatore. Bakar je u periodnom sustavu elemenata na poziciji točno iza nikla, a pokazalo se kako je upravo nikal dobar filter bakrenom zračenju. Nikal ima granicu apsorpcije pri 1,4886 Å što tu granicu smješta točno između K_α i K_β apsorpcijskih maksimuma bakra. Što znači da, ako rendgensko zračenje izašlo iz bakrene mete prođe kroz tanku foliju nikla, dolazi do apsorpcije K_β zračenja i kontinuiranog zračenja, odnosno da je propušteno zračenje monokromatsko.[17]

2.3.2. Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu

Kada monokromatsko rendgensko zračenje dolazi do kristala koji djeluje kao trodimenzijska rešetka, atomi raspršuju to zračenje u mjeri koja ovisi o broju elektrona u tom atomu. Difrakcija rendgenskih zraka se zato može promatrati kao refleksija na rešetci kristala dok atomi predstavljaju centre raspršenih zraka što je 1912. godine uočio William Lawrence Bragg. Na slici 13 može se vidjeti grafički prikaz difrakcije na mrežnim ravninama u kristalu.



Slika 13. Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu (preuzeto i prilagođeno iz reference 23).

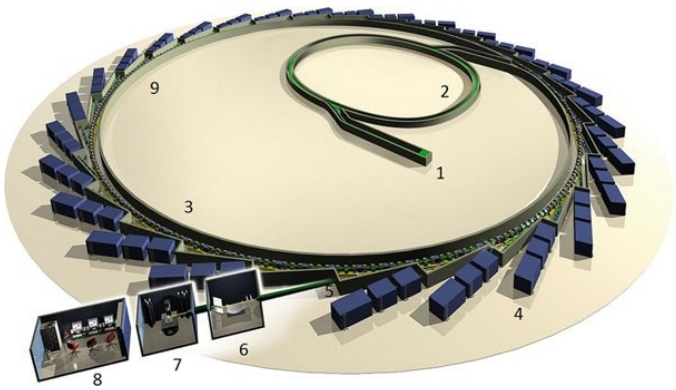
Kao što se na slici 13 može vidjeti, dvije paralelne zrake padaju na dvije ravnine međusobno udaljene za vrijednost d. Te paralelne zrake imaju upadni kut θ i dolaze do točaka A i B na mrežnim ravninama. Zrake se od tih točaka reflektiraju pod kutom θ koji je isti kao i upadni kut. Također se može uočiti kako difraktirana zraka označena zelenom bojom prevali dulji put od crvene zrake i to za put CB+BD. Crvena i zelena zraka će biti u fazi točno onda kad je njihova razlika puteva jednaka umnošku cijelog broja i valne duljine upadnog zračenja što se jednostavnije može iskazati jednadžbom 1 odnosno Braggovim zakonom.

$$2d \sin\theta = n\lambda \tag{1}$$

Kada se kristal stavi u područje rendgenskih zraka do difrakcije dolazi samo s onih mrežnih ravnina u kristalu koje su orjentirane tako da zadovoljavaju Braggov zakon.[16]

2.3.3. Sinkrotron

Sinkrotroni su uređaji u kojima električki nabijene čestice (elektroni ili pozitroni), kruže brzinom približno jednakom brzini svjetlosti. Na slici 14 može se vidjeti shema *Diamond* sinkrotrona (Harwell) te se na toj shemi mogu vidjeti njegovi glavni elementi. Elektroni veoma visoke energije pakirani u serije pulsova nastaju u sistemu za injektiranje (1) nakon čega dolaze do linearnog akceleratora (LINAC) gdje se njihova energija još poveća. Tako nastali elektroni ulaze u sinkrotronski prsten (2) gdje se uz pomoć magneta mijenja njihova putanja te povećava energija. Zatim se oni izbacuju u prsten za pohranu (3) gdje kruže u visokom vakuumu prilikom čega im je brzina 98,6% brzine svjetlosti. Elektroni kružeći u tom prstenu tangencijalno emitiraju rendgensko zračenje koje se zatim fokusira u prednjem kraju (5) čime zraka ulazi u sinkrotronske linije (*beamline*) (4) gdje se odvijaju različiti znanstveni pokusi. Sinkrotronske linije se sastoje od tri dijela: optička kućica (6), eksperimentalna kućica (7) i kontrolna kućica (8). Radiofrekventna šupljina (9) sastoji se od elektromagnetskog polja koje nadoknađuje energiju koju su elektroni izgubili prilikom nastajanja sinkrotronskog zračenja u samom prstenu.



Slika 14. *Diamond* sinkrotron (Harwell), brojevi su objašnjeni u tekstu iznad (preuzeto iz reference 17).

Originalno ovi uređaji su napravljeni za visokoenergetske pokuse iz fizike kao što je akcelerator čestica gdje su se primarno proučavali sudari te je zračenje koje nastaje u njima bila nuspojava bespotrebnog gubitka energije. No, kemičari i molekularni biolozi su uvidjeli korist u zračenju koje nastaje budući da se može koristiti u molekularnoj kristalografiji.[16,17] Jedinični kristali koji se koriste za sinkrotron mogu biti manjih dimenzija od onih koji se koriste na klasičnom difraktometru.

2.3.4. Strukturni faktor

Strukturni faktor predstavljen jednadžbom 2 bezdimenzijska je veličina i odnosi se na skupno raspršenje rendgenskog zračenja na svih *n* atoma u jediničnoj ćeliji.

$$\mathbf{F}(hkl) = \sum_{j=1}^{n} f_{j,\theta} \exp\left[i2\pi\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)\right] \tag{2}$$

Atomski faktor raspršenja $f_{j,\theta}$ ovisi o raspodjeli elektronske gustoće tog atoma te o kutu θ. Kako su atomi u molekulama povezani kemijskim vezama, oni ne miruju već osciliraju oko svojih ravnotežnih položaja što utječe na samu funkciju raspodjele elektronske gustoće. Također je atomski faktor raspršenja potrebno dodatno korigirati temperaturnim faktorom. Temperaturni ili B–faktor proporcionalan je srednjem kvadratu pomaka atoma iz nekog referentnog položaja. Bit rendgenske strukturne analize je u određivanju strukturnih faktora na temelju difrakcijskih podataka u svrhu računanja elektronske gustoće u jediničnoj ćeliji. Ono što se iz kristalografskog eksperimenta zapravo dobiva je intenzitet difraktiranog rendgenskog zračenja. Intenziteti pojedinih refleksa *hkl* proporcionalni su kvadratu amplitude pripadnog strukturnog faktora što je prikazano u jednadžbi 3.[17]

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2 \tag{3}$$

Strukturni faktori se koriste u računanju mapa elektronske gustoće iz kojih se mogu odrediti položaji atoma u jediničnoj ćeliji:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V}\sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-i2\pi(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)] \tag{4}$$

2.3.5. Problem faza

Kako bi se riješila struktura neke molekule potrebno je izračunati elektronsku gustoću i parametre termičke vibracije za svaki atom molekule, te simetriju po kojoj se molekula ponavlja u prostoru. Iz relacije 3 može se iz intenziteta izračunati amplituda strukturnog faktora no faza difraktiranog vala ($\alpha(hkl)$) se ne može direktno odrediti iz samog eksperimenta.

U proteinskoj rendgenskoj kristalografiji postoji nekoliko najčešćih načina rješavanja problema faza, a oni su sljedeći:[16]

1. Metoda jednostruke ili višestruke izomorfne zamjene (SIR – *single isomorphous replacement*, MIR – *multiple isomorphous replacement*)

   Kako bi se odredila struktura proteina metodom izomorfne zamjene potrebno je pripraviti jedan ili više derivata nativnog proteina s teškim atomom. No, pritom je potrebno paziti da se pozicija i orijentacija molekula proteina u kristalu nativnog proteina i u kristalu proteina s teškim atomom ne mijenja kao ni parametri jedinične ćelije, potrebno je postići izomorfizam. Nakon priprave kristala proteina i kristala njegova derivata s teškim atomom potrebno je od oba prikupiti difrakcijske podatke te se Pattersonovom funkcijom određuje pozicija teškog atoma. Potom se parametri teškog atoma utočne te se izračunaju faze ostalih atoma nakon čega je moguće izračunavanje njihove elektronske gustoće. Pattersonova funkcija je također Furierova sumacija kao i funkcija za elektronsku gustoću samo se kod Pattersonove uvodi aproksimacija da su svi fazni kutovi jednaki nuli čime se dobiva funkcija prikazana jednadžbom 5.

$$\rho(uvw) = \frac{1}{V}\sum_{hkl}|F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \qquad (5)$$

   Također se uvodi takozvana Pattersonova ćelija čije su relativne koordinate *u, v* i *w* zapravo identične koordinatama prave jedinične ćelije.

2. Metoda anomalne disperzije s više valnih duljina (MAD – *multiple wavelength anomalous dispersion*)

   Za ovu metodu potrebno je prirediti derivat proteina, koji sadrži teški atom u strukturi samog proteina te takva molekula ne mora nužno biti direktno za njega vezana. Jedino što je bitno je da kod teškog atoma dolazi do pojave anomalnog raspršenja koje se javlja zbog činjenice da se njegovi elektroni ne smatraju u potpunosti slobodnim elektronima. Kao posljedica anomalnog raspršenja javlja se razlika u intenzitetima refleksa *h k l* i njegovog Bijvoet para *–h –k –l* koji više nisu isti. Aplikacija ovog uvjeta je ta da se valna duljina pažljivo odabire kako bi se optimizirala razlika u intenzitetima Bijvoet para te između difrakcija za više valnih duljina.

3. Anomalna disperzija s jednom valnom duljinom (SAD – *single wavelength anomalous dispersion*)
   Kako bi se doskočilo mani anomalne disperzije s više valnih duljina gdje se kristal dugo izlaže zračenju prilikom čega se uništava, koristi se samo jedna valna duljina prilikom čega je potrebno prirediti kristal proteina s teškim atomom koji dovoljno jako raspršuje zračenje.

4. Molekulska zamjena (MR – *molecular replacement*)
   Preduvjet za korištenje ove metode je dostupnost modelne strukture koja se od nepoznate puno ne razlikuje (najčešće je preduvjet dobrog modela ako je sličnost proteinskih sekvenci veća ili jednaka 40%; može i manja ako je prostorna orijentacija domena u strukturama slična), npr. može se koristiti homologni protein.

2.3.6. Utočnjavanje strukture

Za utočnjavanje strukture nepoznatog proteina koriste se mnogi programi u kojima se vizualizira mapa elektronske gustoće. Odnosno, vizualizira se razlika mapa elektronske gustoće difrakcijskih podataka dobivenih s instrumenta i difrakcijskih podataka modela. Time se dobivaju pozitivne i negativne vrijednosti gustoće koje govore o tome smješta li se dio molekule, koji se trenutno tamo nalazi, baš na tu određenu poziciju. Ako je mapa pozitivna znači da na te koordinate potrebno staviti još elektrona, odnosno dio molekule, a ako je negativna znači da na tim koordinatama ima viška elektrona. Proces utočnjavanja je prilagođavanje modela kako bi se računati i izmjereni strukturni faktori što bolje poklapali. Prilagođavanje modela se dakle sastoji od promjene nekoliko parametra kao što su tri prostorne koordinate te temperaturni faktor za sve nevodikove atome. Vodikovi atomi ne ulaze u proces utočnjavanja budući da je i nevodikovih atoma u strukturama proteina veoma puno. Ako bi se u utočnjavanje uključili vodikovi atomi, broj parametara bi se značajno povećao. Kako se pretpostavlja da se aminokiseline u proteinima i u malim peptidnim lancima ponašaju jednako, u programe za utočnjavanje se ugrađuje postojeće znanje o duljinama veza, kutovima, torzijskim kutovima, planarnosti aromatskih prstena, itd. Ovakvim aproksimacijama se smanjuje broj već spomenutih parametara što onako kompliciran račun ipak uspijeva pojednostavniti i ubrzati. Proces utočnjavanja je iterativan što vrijeme u samom poslu čini dosta važnim parametrom.

Kako bi se znalo je li neki model dobar potrebno je provesti njegovu validaciju. Za takve potrebe uvode se posebni faktori. Faktor neslaganja, R, se računa prema jednadžbi 6 te predstavlja globalnu točnost između modela i difrakcijskih podataka te se u njemu ne vide neki manji lokalni problemi. U jednadžbi F_{obs} predstavlja izmjereni strukturni faktor a F_{calc} predstavlja izračunati strukturni faktor, a k predstavlja faktor skale.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\mathrm{obs}}| - k|F_{\mathrm{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\mathrm{obs}}|} \tag{6}$$

Kod utočnjavanja uvodi se dodatni parametar vrednovanja, neovisni R–faktor, R_{free}. Neovisni R–faktor računa se prema formuli 7 gdje k predstavlja faktor skale, a $h\ k\ l \subset T$ predstavlja nasumično odabrane reflekse koji pripadaju skupu T prema kojima se vrši sam proces utočnjavanja (uzima se najčešće 5% difrakcijskih podataka koji se izuzimaju iz utočnjavanja i onda se uspoređuje koliko dobro model nakon utočnjavanja preostalih 95% podataka odgovara tih 5% podataka koji su izuzeti na samom početku).

$$R_{\mathrm{free}} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \left| |F_{\mathrm{obs}}| - k|F_{\mathrm{calc}}| \right|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{\mathrm{obs}}|} \tag{7}$$

Što su faktori R i R_{free} niži to je riješena struktura točnija i kvalitetnija. R_{free} je bolji pokazatelj točnosti no vrijednosti faktora R i R_{free} ne smiju previše odudarati jedna od druge.[16]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprava otopina za kristalizaciju

Sve priređene otopine navedene u nastavku, osim otopina proteina, pročišćene su pomoću filtera od polietersulfona (*LLG-PES syringe filter 0,2 μm*) čime su se uklonile eventualne nečistoće ili zaostali talog uslijed nemogućnosti potpunog otapanja.

3.1.1. Bakrove soli

Zeleni prah bakrovog(II) klorida, $CuCl_2$ (molarna masa, M = 134,45 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* mase 1,01 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina plave boje koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}.

Crni kristali bakrovog(II) bromida, $CuBr_2$ (molarna masa, M = 223,36 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,67 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina plavo–zelene boje koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}.

Plavo–zeleni kristali bakrovog(II) acetata monohidrata, $Cu(C_2H_3O_2)_2 \cdot H_2O$ (molarna masa, M = 199,65 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,50 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina plave boje koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}.

3.1.2. Niklove soli

Zeleni prah niklovog(II) klorida heksahidrata, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (molarna masa, M = 237,63 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,77 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina zelene boje koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}.

Narančasti prah niklovog(II) bromida, $NiBr_2$ (molarna masa, M = 218,45 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,64 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina zelene boje koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}.

Sivi kristali niklovog(II) jodida, NiI_2 (molarna masa, $M = 312,44$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 2,34 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina smeđe boje koncentracije manje od, $c = 0,15$ mol dm^{-3}. Nakon filtracije zaostaje talog koji se nije otopio.

3.1.3. Kobaltove soli

Ružičasti prah kobaltovog(II) klorida heksahidrata, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (molarna masa, $M = 237,92$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,80 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina rozo–crvene boje koncentracije, $c = 0,15$ mol dm^{-3}.

Zeleni prah kobaltovog(II) bromida, $CoBr_2$ (molarna masa, $M = 218,74$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 1,64 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina crvene boje koncentracije, $c = 0,15$ mol dm^{-3}.

Sivi prah kobaltovog(II) jodida, CoI_2 (molarna masa, $M = 312,73$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 2,35 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva otopina smeđe boje koncentracije manje od, $c = 0,15$ mol dm^{-3}. Nakon filtracije zaostaje talog koji se nije otopio.

3.1.4. Otopine halogenida

Bijeli kristali natrijevog klorida, NaCl (molarna masa, $M = 58,44$ g mol^{-1}), proizvođača *Alkaloid Skopje*, mase 14,61 g otapaju se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, $c = 5,0$ mol dm^{-3}.

Bijeli kristali natrijevog bromida, NaBr (molarna masa, $M = 102,89$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika*, mase 25,72 g otapaju se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, $c = 5,0$ mol dm^{-3}.

Bijeli kristali natrijevog jodida, NaI (molarna masa, $M = 149,89$ g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* mase 37,47 g otapaju se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, $c = 5,0$ mol dm^{-3}.

3.1.5. Otopina citratnog pufera

Bijele granule monohidrata limunske kiseline, $C_3H_5O(COOH)_3 \cdot H_2O$ (molarna masa, M = 210,14 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* mase 10,51 g otapaju se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, c = 1,0 mol dm^{-3}.

Bijeli prah natrijevog citrata dihidrata, $C_3H_5O(COONa)_3 \cdot 2H_2O$ (molarna masa, M = 294,10 g mol^{-1}), proizvođača *Merck,* mase 14,71 g otapa se u 50 mL redestilirane MiliQ vode čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, c = 1,0 mol dm^{-3}.

Dobivene dvije otopine pomiješaju se te se željena pH vrijednost od 6,4 podesi pomoću vodenih otopina klorovodične kiseline i natrijevog hidroksida pomoću pH metra.

3.1.6. Otopine kiselina

Bezbojna otopina klorovodične kiseline, HCl (maseni udio, w = 36%, molarna masa, M = 36,46 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* volumena 3,4 μL razrjeđuje se do 2 mL redestiliranom MiliQ vodom čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije , c = 0,02 mol dm^{-3}.

Žuta otopina bromovodične kiseline, HBr (maseni udio, w = 49%, molarna masa, M = 80,91 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* volumena 4,4 μL razrjeđuje se do 2 mL redestiliranom MiliQ vodom čime se dobiva bezbojna otopina koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3}.

Smeđa otopina jodovodične kiseline, HI (maseni udio, w = 57%, molarna masa, M = 127,91 g mol^{-1}), proizvođača *Kemika,* volumena 5,3 μL razrjeđuje se do 2 mL redestiliranom MiliQ vodom čime se dobiva žuta otopina koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3}.

3.1.7. Otopine proteina

Korišten je ljudski inzulin bez cinka dvaju proizvođača, *Sigma* i *Novo Nordisk*. Budući da ovaj protein nije dobro topiv u vodi, za njegovo otapanje koriste se priređene otopine kiselina čime se dobiva šest otopina inzulina. Tijekom kristalizacije u svaki kristalizacijski uvjet postavljaju se obje otopine proteina prilikom čega se inzulin proizvođača *Novo Nordisk* uvijek postavlja lijevo i označava točkom (●).

Proizvođač *Sigma*:

Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,1 mg otapa se u 150 μL otopine klorovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3} čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 7,3 mg cm^{-3}.

Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,1 mg otapa se u 150 μL otopine bromovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3} čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 7,3 mg cm^{-3}.

Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,3 mg otapa se u 150 μL otopine jodovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3} čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 8,7 mg cm^{-3}.

Proizvođač *Novo Nordisk*:

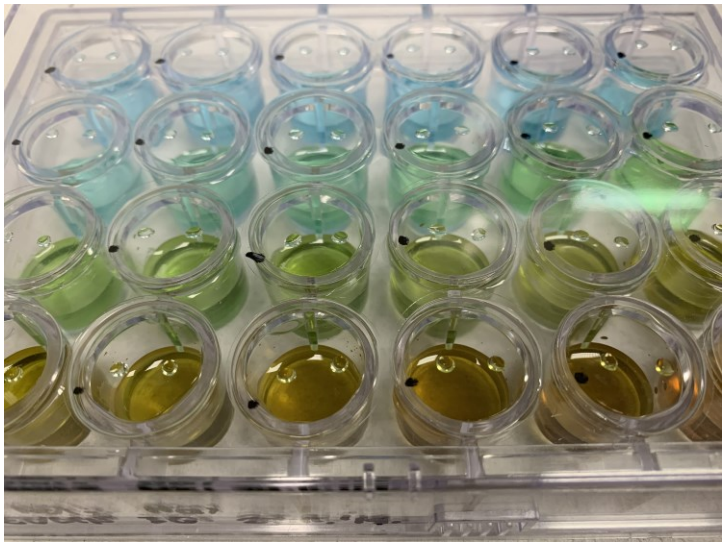
Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,3 mg otapa se u 150 μL otopine klorovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3}čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 8,7 mg cm^{-3}.

Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,2 mg otapa se u 150 μL otopine bromovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3} čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 8,0 mg cm^{-3}.

Bijeli prah ljudskog inzulina bez cinka, mase 1,4 mg otapa se u 150 μL otopine jodovodične kiseline koncentracije, c = 0,02 mol dm^{-3} čime se dobiva bezbojna otopina masene koncentracije, γ = 9,3 mg cm^{-3}.

3.2. Kristalizacija bakrovih(II), niklovih(II) i kobaltovih(II) derivata inzulina

Kristalizacija se provodi metodom difuzije para iz viseće kapi pomoću *Hampton Research VDX* ploča koje sadrže 24 spremnika (4 reda x 6 stupaca). Redci su označeni slovima A – D, a stupci brojevima 1 – 6 (slika 15). Svi kristalizacijski uvjeti prikazani su u Dodatku u tablicama D1 – D9 gdje se može vidjeti kako je ukupni volumen spremnika nakon dodatka kristalizacijskih otopina 1 mL. Nakon ispunjavanja spremnika, na silikonizirano pokrovno stakalce nanosi se otopina proteina volumena 1 μL, u ovom slučaju dvije kapi zbog dva različita proizvođača proteina. U te kapi također se dodaje isto toliki volumen tj. 1 μL sadržaja spremnika. Na rubove spremnika nanosi se silikonska mast te se potom na to stavlja stakalce s kapljicama okrenutim prema sadržaju spremnika.



Slika 15. *Hampton Research VDX* ploča koja sadrži 24 spremnika.

Dizajn uvjeta kristalizacije napravljen je s ciljem dobivanja jediničnih kristala različitih derivata inzulina mijenjanjem koncentracije halogenidnih iona u kristalizacijskom spremniku. Postavljeni su kristalizacijski uvjeti za dobivanje niklovih(II), kobaltovih(II) i bakrovih(II) derivata inzulina uz različitu koncentraciju halogenidnih iona (Cl^-, Br^- i I^-).

Kristali metalnih (niklovi(II), kobaltovi(II) i bakrovi(II)) derivata inzulina pripravljaju se tako da se u kristalizacijsku otopinu dodaje 150 μL otopine metalne soli pripadnog halogenida (klorida, bromida ili jodida) koncentracije, c = 0,15 mol dm^{-3}, 150 μL citratnog

pufera pH vrijednosti 6,4 (koncentracije, c = 1,0 mol dm^{-3}), 100 μL acetona (masenog udjela, w = 70%), otopina pripadnog halogenida od 50 μL do 510 μL (koncentracije, c = 5 mol dm^{-3}) te MiliQ vode toliko da se ukupno u spremniku nalazi 1 mL kristalizacijske otopine. Soli metala te otopine halogenida koje se koriste navedene su u odlomku prije. Na svako silikonizirano pokrovno stakalce iznad spremnika nanose se dvije kapi proteina otopljenog u odgovarajućoj halogenovodičnoj kiselini (npr. ako je sol u spremniku metalni klorid onda se protein otapa u klorovodičnoj kiselini) volumena 1 μL. U te kapi također se dodaje 1 μL sadržaja spremnika.

Gore opisanim dizajnom eksperimenta dobiva se ukupno 216 različitih kristalizacijskih uvjeta u kojima je koncentracija halogenidnih iona u rasponu od 0,148 mol dm^{-3} do 1,298 mol dm^{-3}. Željelo se ispitati kako promjena koncentracije halogenidnih iona utječe na nastajanje jediničnih kristala, njihovu morfologiju i samim time na strukturu derivata inzulina. Proces kristalizacije provodi se pri konstantnoj temperaturi od 20°C. Nakon nekoliko tjedna dobiveni su jedinični kristali zadovoljavajućih karakteristika uz prisustvo kloridnih i bromidnih iona. Kristalizacijom uz jodidne ione kristali su nastajali nakon duljeg vremenskog perioda (mjesec dana i više). Produkti kristalizacija svih kristalizacijskih uvjeta promatrani su svjetlosnim mikroskopom *Olympus SZX 12* te su slikani pomoću digitalnog fotoaparata *Olympus C–4040 ZOOM*. Ovako dobivene fotografije nalaze se u Dodatku u tablicama D1 – D9. Jedinični kristali zadovoljavajuće kvalitete su uz pomoć etilenglikola (masenog udjela, w = 30%) kao krioprotektanta smrznuti na temperaturu tekućeg dušika.

Difrakcijski podatci prikupljeni su na sinkrotronu *Elettra* u Trstu na XRD2 sinkrotronskoj liniji gdje je sakupljanje difrakcijskih podataka provedeno na 100 K pri valnoj duljini monokromatskog zračenja od 0,99990 Å.

3.3. Rješavanje i utočnjavanje kristalnih struktura

Nakon prikupljanja difrakcijskih podataka pristupa se procesiranju podataka za što se koristi program MOSFLM.[24] Potom slijedi rješavanje molekulskih i kristalnih struktura za tri odabrana derivata inzulina metodom molekulske zamjene. Navedena metoda rješavanja faznog problema odabrana je jer u bazi podataka proteinskih struktura postoje već riješene strukture sličnih derivata inzulina. Rješavanje struktura provodi se pomoću programa AMoRe[25] i Phaser MR[26] koji se nalaze unutar programskog paketa CCP4.[27] Nadalje, model se utočnjava metodom najveće vjerojatnosti koja je sadržana u programu REFMAC.[28] Vizualizacija i manualna manipulacija parametrima poput koordinata i okupancije u svrhu iterativnog procesa utočnjavanja strukture pri visokoj rezoluciji na temelju izračunate i opažene mape elektronske gustoće vrši se u programu COOT.[29] Također, korištenjem parametara dobivenih pomoću internetskog servisa za analizu kvalitete utočnjenog modela MolProbity,[30] određena je kvaliteta utočnjavanja i na temelju dobivenih podataka dodatno su utočnjene strukture proteina. Analize interakcija i udruživanja dobivene su pomoću internetskog servisa: PDBePISA.[31] Konačna vizualizacija gotovih struktura vrši se u programu CCP4MG[32] kojim se dobivaju sve slike koje se nalaze u rezultatima. Rješavanjem i utočnjavanjem dobivaju se molekulske strukture dosad neopisanih derivata inzulina koje je potrebno usporediti međusobno te s već poznatim, deponiranim molekulskim strukturama u bazi podataka proteinskih makromolekula, PDB.[6]

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kristalizacija i sakupljanje difrakcijskih podataka

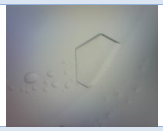
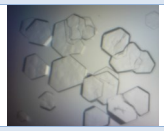
Pregledom svih kristalizacijskih uvjeta uočava se različitost u nastalim kristalima ovisno o vrsti dodanog halogenida. Dobiveni su jedinični kristali derivata inzulina sa svim metalnim kationima (bakar(II), nikal(II) i kobalt(II)) u prisustvu kloridnih i bromidnih iona, dok u prisustvu jodidnih iona kristalizacija izostaje ili su nastali kristali koji nisu zadovoljavajuće kvalitete za difrakcijski eksperiment. Nadalje, dobiveno je mnogo kristala, ali nisu svi od njih pogodni za daljnju obradu zbog njihove veličine (nisu dovoljno veliki) ili pak njihovih nesavršenosti (srasli ili ispucali kristali). Pregledom kristalizacijskih ploča pod Olympus mikroskopom odabrano je 28 kristala koji su podvrgnuti difrakciji rendgenskog zračenja na sinkrotronu *Elettra*, Trst te su to:

1. bakrov(II) derivat u prisustvu klorida D1B6* (dva kristala),
2. bakrovi(II) derivati u prisustvu bromida D2C2, D2D5 i D2D6,
3. niklovi(II) derivati u prisutvu klorida D4A2, D4A4, D4C3, D4D3 i D4D6,
4. niklovi(II) derivati u prisustvu bromida D5A1, D5C2, D5C3, D5C4, D5C5, D5D3, D5D5 (tri kristala) i D5D6,
5. kobaltovi(II) derivati u prisustvu klorida D7A3 (dva kristala) i D7A4 (dva kristala),
6. kobaltovi(II) derivati u prisustvu bromida D8A2, D8C3 i D8D6 (dva kristala).

*Imena struktura dobivena su prema tablicama D1 – D9 odnosno kristalizacijskim uvjetima u kojima je nastao jedinični kristal, npr. D1A1 znači da se radi o kristalizacijskom uvjetu A1 iz tablice D1 u Dodatku.

Preliminarnim snimanjem utvrđeno je kako su neki od nastalih jediničnih kristala derivata inzulina već literaturno opisani čime se isključuju iz daljnje obrade. Također neki od kristala nisu bili jedinični kristali proteina već kristalizirana sol. Broj pogodnih jediničnih kristala ovako se već smanjio i nakon utvrđivanja kvalitete difrakcijskih podataka (kvaliteta difrakcijskih maksimuma i rezolucija sakupljenih podataka) ostaje ih samo devet. Slike tih jediničnih kristala izdvojene su iz Dodatka te se zajedno sa sažetim kristalografskim podatcima nalaze u tablici 3.

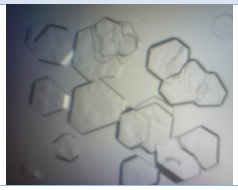
Tablica 3. Slike kristala i sažetak kristalografskih podataka devet derivata inzulina.

	Bakrovi(II) derivati inzulina				
Fotografija					
Kristalizacijski uvjet	D2C2	D2D5			
Halogenid	Bromid	Bromid			
Rezolucija	1,40 Å	1,73 Å			
Prostorna grupa	$P4_12_12$	$P4_12_12$			
Parametri jedinične ćelije	a = 93,04 Å b = 93,04 Å c = 126,36 Å α = 90° β = 90° γ = 90°	a = 92,80 Å b = 92,80 Å c = 126,02 Å α = 90° β = 90° γ = 90°			
	Niklovi(II) derivati inzulina				
Fotografija					
Kristalizacijski uvjet	D4D6	D5A1	D5C3	D5C4	D5D3
Halogenid	Klorid	Bromid	Bromid	Bromid	Bromid
Rezolucija	1,35 Å	1,41 Å	1,44 Å	1,23 Å	1,63 Å
Prostorna grupa	$H32$	$H3$	$H32$	$H32$	$P4_12_12$
Parametri jedinične ćelije	a = 45,86 Å b = 45,86 Å c = 116,99 Å α = 90° β = 90° γ = 120°	a = 81,09 Å b = 81,09 Å c = 33,75 Å α = 90° β = 90° γ = 120°	a = 45,80 Å b = 45,80 Å c = 117,21 Å α = 90° β = 90° γ = 120°	a = 45,85 Å b = 45,85 Å c = 117,22 Å α = 90° β = 90° γ = 120°	a = 92,77 Å b = 92,77 Å c = 126,54 Å α = 90° β = 90° γ = 90°
	Kobaltovi(II) derivati inzulina				
Fotografija					
Kristalizacijski uvjet	D7A3	D8D6			
Halogenid	Klorid	Bromid			
Rezolucija	1,05 Å	1,73 Å			
Prostorna grupa	$H3$	$P4_12_12$			
Parametri jedinične ćelije	a = 81,94 Å b = 81,94 Å c = 68,26 Å α = 90° β = 90° γ = 120°	a = 92,85 Å b = 92,85 Å c = 126,06 Å α = 90° β = 90° γ = 90°			

Promjena morfologije kristala najbolje se može vidjeti kod niklovih(II) derivata inzulina u prisustvu bromidnih iona budući da je njih najviše nastalo. Uočava se kako je kod koncentracije 0,148 mol dm^{-3} kristal (D5A1) jedne morfologije (nepravilna četverostrana prizma) koji kristalizira u trigonskom sustavu u prostornoj grupi *H*3 i ima parametre jednične ćelije a = 81,09 Å, b = 81,09 Å, c = 33,75 Å, α = 90°, β = 90° i γ = 120°. Povećanjem koncentracije bromidnih iona u rasponu 0,848 – 0,898 mol dm^{-3} dolazi do promjene morfologije kristala (D5C3 i D5C4) u oblik nepravilne spljoštene heksagonske prizme. Ovi kristali kristaliziraju također u trigonskom sustavu, ali u prostornoj grupi *H*32 s parametarima jednične ćelije a = 45,80 Å, b = 45,80 Å, c = 117,21 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 120° kod kristala D5C3 i a = 45,85 Å, b = 45,85 Å, c = 117,22 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 120° kod kristala D5C4. Dodatnim povećanjem koncentracije do 1,148 mol dm^{-3} nastaje kristal (D5D3) kojem se opet promijenila morfologija (nastaje četverostrana bipiramida), no ovaj put promijenio se i kristalni sustav tj. dolazi do kristalizacije u tetragonskom sustavu (prostorna grupa $P4_12_12$). Nastali kristal ima parametre jedinične ćelije a = 92,77 Å, b = 92,77 Å, c = 126,54 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90° (tablica 3). U slučaju bakrovih(II) derivata inzulina nije uočen gore opisan trend već je većina kristalizacijskih uvjeta u zadnjoj zoni prezasićenja, odnosno nastaje amorfni talog, dok pri visokim koncentracijama kloridnih i bromidnih iona dolazi do nastajanja kristala u obliku četverostranih bipiramida. Niklovi(II) derivati inzulina u prisustvu kloridnih iona djelomično pokazuju gore opisan trend, no izostaje nastajanje kristala u obliku četverostranih bipiramida, međutim pri visokim koncentracijama klorida nastaju kristali u obliku nepravilnih spljoštenih heksagonskih prizmi. Kobaltovi(II) derivati inzulina opet su drugačiji te u gore opisanom trendu izostaju kristali u obliku nepravilnih spljoštenih heksagonskih prizmi, a uz dodatak bromida nastaju kristali oblika četverostrane bipiramide, dok uz dodatak klorida jedino s ovim metalom nastaju kristali romboedarskog oblika s poduplanom c osi (a = 81,94Å, b = 81,9Å, c = 68,26Å, α = 90°, β = 90°, γ = 120°, tablica 3).

Detaljnijim pregledom baze podataka i već poznatih kristalnih struktura derivata inzulina, utvrđeno je kako je nekoliko struktura dosad neopisano te se kreće u pobliže proučavanje njih tri: D5C4, D5A1 i D7A3. Kristalizacijski uvjeti i fotografije kristala tih triju struktura izdvojeni su iz Dodatka i nalaze se u tablici 4.

Tablica 4. Kristalizacijski uvjeti i fotografije kristala triju derivata inzulina.

	Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)	**Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)**	**Kobaltov(II) derivat inzulin (D7A3)**
Izvor metala / μL (c = 0,15 mol dm^{-3})*	150	150	150
Citratni pufer / μL (c = 1,0 mol dm^{-3})	100	100	100
Aceton / μL	100	100	100
Izvor halogenida / μL (c = 5,0 mol dm^{-3})**	350	50	60
Redestilirana voda / μL	300	600	560
Fotografija			

* Korištena je sol $NiBr_2$ kao izvor nikla kod dobivanje D5C4 i D5A1 te $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ kao izvor kobalta kod dobivanje D7A3.

** Korištena je sol NaBr kao izvor bromida kod dobivanja D5C4 i D5A1 te NaCl kao izvor klorida kod dobivanja D7A3.

Tri gore opisana jedinična kristala su zatim podvrgnuta sakupljanju difrakcijskih podataka te rješavanju i utočnjavaju njihovih struktura. Statistika sakupljenih podataka, procesiranja i utočnjavanja nalazi se u tablici 5.

Tablica 5. Statistika sakupljenih podataka, procesiranja i utočnjavanja struktura derivata inzulina. Vrijednosti za vanjsku ljusku nalaze se u zagradama.

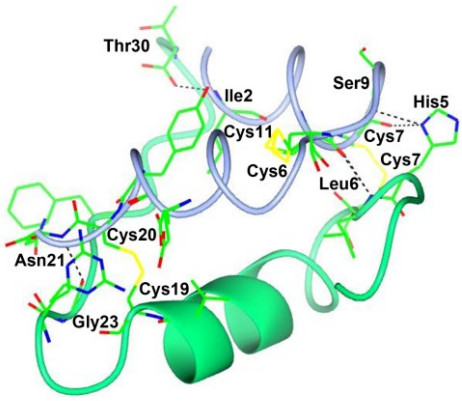
	Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)	**Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)**	**Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3)**
Kristalografski podatci			
Kristalni sustav	Trigonski	Trigonski	Trignoski
Prostorna grupa	*H*32	*H*3	*H*3
Valna duljina / Å	0,99990	0,99990	0,99990
Parametri jedinične ćelije: *a* / Å *b* / Å *c* / Å *α* / ° *β* / ° *γ* / °	 45,850 45,850 117,220 90,00 90,00 120,00	 81,090 81,090 33,751 90,00 90,00 120,00	 81,940 81,940 68,261 90,00 90,00 120,00
Z Jedinična ćelija Asimetrična jedinica	 18 1	 9 2	 9 4
Raspon rezolucije / Å	39,08 – 1,23 (1,25 – 1,23)	40,54 – 1,41 (1,43 – 1,41)	40,97 – 1,05 (1,07 – 1,05)
R_{merge}	0,070 (0,900)	0,097 (0,325)	0,093 (0,679)
$\langle I/\sigma(I)\rangle$	19,1 (3,3)	12,3 (3,6)	10,8 (2,1)
Kompletnost podataka / %	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)
Multiplicitet	16,8 (16,6)	8,1 (7,3)	8,2 (6,5)
Utočnjavanje			
R_{work} / R_{free}	0,1929 / 0,2511	0,1683 / 0,2196	0,1888 / 0,2187
Broj atoma proteina / broj atoma otapala	558 / 44	838 / 41	1639 / 146
Srednja vrijednost *B* / Å^2	24,392	18,619	15,509
R.M.S.D. od idealne vrijednosti			
Duljine veza / Å	0,021	0,016	0,020
Kutovi veza / °	2,248	2,179	2,309
Geometrija			
Povoljan Ramachandran / %	93,62	97,87	96,28
Nepovoljan Ramachandran / %	0,00	0,00	0,00
Nepovoljni rotameri / %	3,17	0,00	0,53
Ukupni rezultat	2,39	1,05	1,49

4.2. Rješavanje i utočnjavanje kristalnih struktura

Riješene su i utočnjene tri nove kristalne strukture derivata ljudskog inzulina i to: niklov(II) derivat inzulina (D5C4) utočnjen do R faktora 19,29% i R_{free} do 25,11% pri rezoluciji 1,23 Å, niklov(II) derivat inzulina (D5A1) utočnjen je do R faktora 16,83% i R_{free} do 21,96% pri rezoluciji 1,41 Å i kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3) utočnjen je do R faktora 18,88% i R_{free} do 21,87% pri rezoluciji 1,05 Å (Tablica 5).

4.2.1. Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)

Niklov(II) derivat inzulina kristaliziran u prisustvu bromidnih iona koncentracije 0,898 mol dm^{-3} kristalizira u trigonskom sustavu s parametrima jedinične ćelije a = 45,85 Å, b = 45,85 Å, c = 117,22 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 120° u prostornoj grupi $H32$. Asimetrična jedinica sadrži samo lance A i B, tj. jedan monomer. Na slici 16 mogu se vidjeti interakcije koje su zaslužne za stvaranje monomera lanaca A i B. Vrste tih interakcija su disulfidni mostovi i vodikove veze. Disulfidni mostovi su CysA6–CysA11, CysA7–CysB7 i CysA20–CysB19 te se njihove udaljenosti mogu vidjeti u tablici 6. Vodikove veze su IleA2–ThrB30, CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, SerA9–HisB5 i AsnA21–GlyB23 te se njihove udaljenosti nalaze se u tablici 7.



Slika 16. Vodikove veze i disulfidni mostovi u monomeru niklovog(II) derivata inzulina (D5C4). Plavom bojom je označen lanac A, a zelenom bojom lanac B. Žuta crta označava disulfidne mostove CysA6–CysA11, CysA7–CysB7 i CysA20–CysB19, a crna isprekidana crta označava vodikove veze između IleA2–ThrB30, CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, SerA9–HisB5 i AsnA21–GlyB23.

Tablica 6. Dislufidni mostovi između lanca A i B. Aminokiseline lanca A Cys6 i Cys11 imaju dva konformera koji oba tvore disulfidni most različitih duljina.

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac A** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Cys6 [SG:A]	Cys11 [SG:A]	2,08
Cys6 [SG:B]	Cys11 [SG:B]	2,04
Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,12
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,02

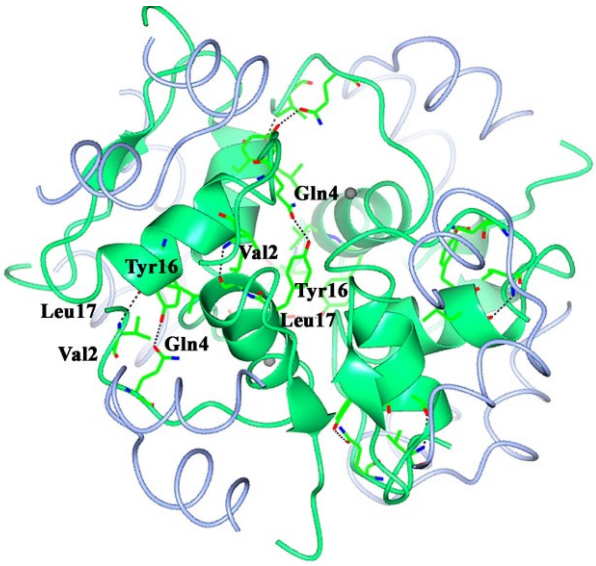
Tablica 7. Vodikove veze koje su zaslužne za nastajanje monomera.

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Ile2 [N]	Thr30 [OXT]	2,90
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,89
Cys7 [O]	His5 [ND1]	2,94
Ser9 [O]	His5 [ND1]	2,88
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,91

Dobiveni monomeri zatim se dalje vodikovim vezama između aminokiselina ValB2−LeuB17, GlnB4−TyrB16, TyrB16−GlnB4 i LeuB17−ValB2 povezuju u heksamer što se može vidjeti na slici 17 te se u tablici 8 mogu vidjeti njihove udaljenosti.

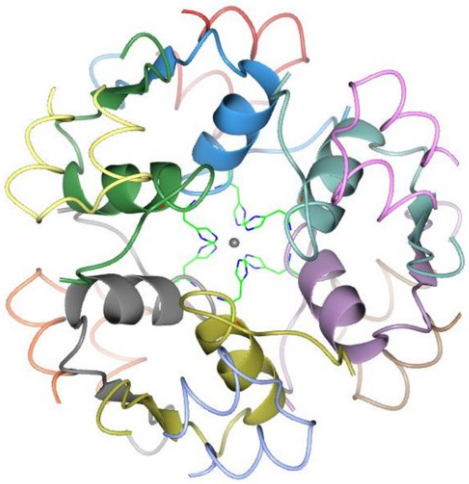
Tablica 8. Vodikove veze zaslužne za stvaranje heksamera niklovog(II) derivata inzulina (D5C4).

Lanac B Aminokiselina [atom]	**Simetrijski lanac B** **(simetrijski operator** **Y + 1/3, X – 1/3, –Z + 2/3)** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Val2 [N]	Leu17 [O]	2,95
Gln4 [OE1]	Tyr16 [OH]	2,69
Tyr16 [OH]	Gln4 [OE1]	2,69
Leu17 [O]	Val2 [N]	2,95

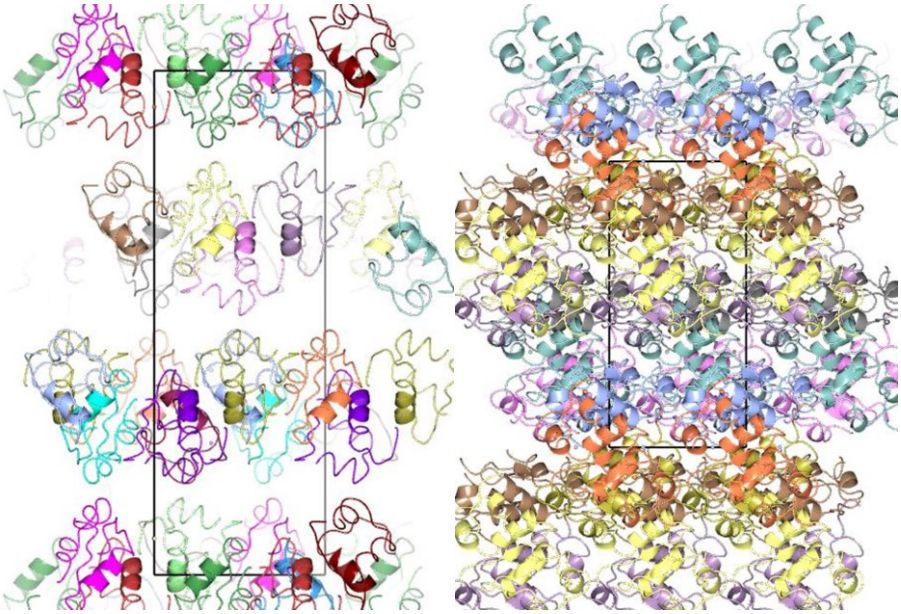


Slika 17. Vodikove veze u heksameru niklovog(II) derivata inzulina (D5C4). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, a siva kuglica predstavlja niklov atom. Vodikove veze iz lanca B te njegovog simetrijskog lanca (simetrijski operator Y + 1/3, X – 1/3, –Z + 2/3) ValB2–LeuB17, GlnB4–TyrB16, TyrB16–GlnB4 i LeuB17–ValB2 prikazane su crnom isprekidanom crtom.

Za usporedbu s ovom strukturom uzeta je struktura 3EXX[33] iz baze podataka PDB budući da se ona koristila kao model kod procesa rješavanja strukture. Bitno je napomenuti kako se u asimetričnoj jedinici strukture 3EXX nalaze lanci A, B, C i D tj. dimer inzulina te da je njena prostorna grupa *H*3. U istraživanoj strukturi digira se smješta upravo između monomera AB i CD, odnosno preslikava jedan monomer u drugi. S tim na umu prilikom rješavanja strukture, ručno su se iz modela 3EXX obrisali lanci C i D čime ostaju samo lanci A i B koji su se koristili i za usporedbu. Obje strukture imaju dva niklova iona po heksameru T_6 konformacije. Na slici 18 može se vidjeti heksamer novo dobivene strukture, a na slici 19 pakiranje u jediničnoj ćeliji novo dobivene strukture te pakiranje u jediničnoj ćeliji strukture 3EXX. Iz pakiranja u jediničnoj ćeliji može se vidjeti kako duž kristalografske osi *a* u novo dobivenoj strukturi dolazi do slojevitog slaganja heksamera što kod već poznate strukture nije slučaj. Također, u strukturi novog derivata inzulina nalazi se 44 molekule vode i jedna molekula etilenglikola. Niklovi atomi, smješteni na osi rotacije trećeg reda (trigiri), su koordinirani s tri simetrijski ovisna dušikova atoma iz histidina (His10 iz lanca B) i tri kisikova atoma iz triju simetrijski ovisnih molekula vode.



Slika 18. Prikaz heksamera niklova(II) derivata inzulina (D5C4) i koordinacije niklova atoma. Molekule vode su izostavljene radi preglednosti. Niklovi atomi su na slici prikazani kao sive kuglice jedan iznad drugog.

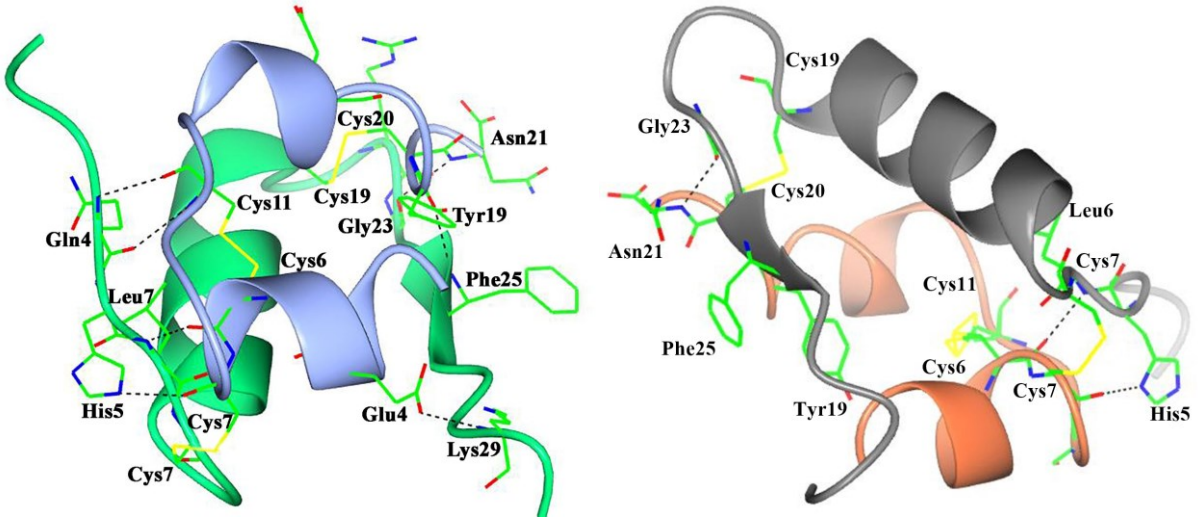


Slika 19. Prikaz pakiranja u jediničnoj ćeliji duž kristalografske osi *a* novo dobivene strukture (lijevo) i strukture 3EXX (desno). Molekule vode izostavljene su radi preglednosti.

4.2.2. Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)

Sljedeći derivat inzulina također je niklov(II) derivat, ali kristaliziran u prisustvu bromidnih iona koncentracije 0,148 mol dm^{-3}. Ovakav derivat inzulina kristalizira isto u trigonskom sustavu ali u prostornoj grupi *H*3 što ga razlikuje od prijašnjeg derivata. U ovoj strukturi nema

osi rotacije drugog reda (digire) između monomera AB i CD što u asimetričnu jedinicu smješta sva četiri lanca tj. jedan dimer. Heksamer ovog derivata inzulina kristaliziran pri niskoj koncentraciji bromidnih iona je u T_6 konformaciji što je u skladu s dosad opisanim strukturama.[2–4] Na slici 20 (lijevo) nalaze se interakcije u monomeru inzulina tj. između lanaca A i B (disulfidni mostovi CysA6–CysA11, CysA7–CysB7 i CysA20–CysB19 i vodikove veze GluA4–LysB29, CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, CysA11–GlnB4, TyrA19–PheB25 i AsnA21–GlyB23). Na slici 20 (desno) nalaze se interakcije u monomeru CD (disulfidni mostovi CysC6–CysC11, CysC7–CysD7 i CysC20–CysD19 i vodikove veze CysC6–LeuD6, CysC7–HisD5 i AsnC21–GlyD23). Udaljenosti gore navedenih interakcija nalaze se u tablicama 9 i 10.



Slika 20. Vodikove veze i disulfidni mostovi u monomeru niklovog(II) derivata inzulina (D5A1): monomera AB (lijevo) i monomera CD (desno). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, a sivom bojom lanac D. Žuta crta predstavlja disulfidne mostove CysA6–CysA11, CysA7–CysB7 i CysA20–CysB19 za oba monomera, a crna isprekidana crta predstavlja vodikove veze GluA4–LysB29, CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, CysA11–GlnB4, TyrA19–PheB25 i AsnA21–GlyB23 za monomer AB i vodikove veze CysC6–LeuD6, CysC7–HisD5 i AsnC21–GlyD23 za monomer CD.

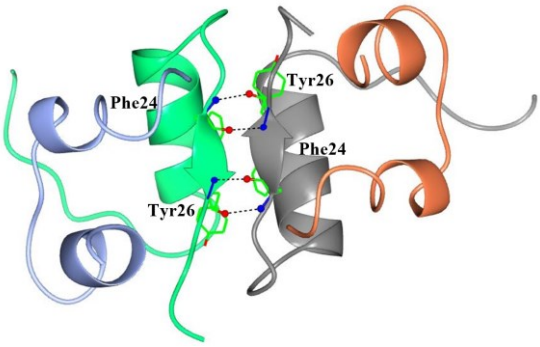
Tablica 9. Dislufidni mostovi između lanca A i B te lanaca C i D. Aminokiseline lanca C Cys6 i Cys11 imaju dva konformera koji oba tvore disulfidni most različitih duljina.

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac A** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Cys6 [SG]	Cys11 [SG]	2,07
Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,08
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,05
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac C** Aminokiselina [atom]	
Cys6 [SG:A]	Cys11 [SG:A]	2,00
Cys6 [SG:B]	Cys11 [SG:B]	1,99
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,05
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,05

Tablica 10. Vodikove veze u monomeru niklovog(II) derivata inzulina (D5A1). Monomera A–B (iznad) i monomera C–D (ispod).

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Glu4 [OE2]	Lys29 [N]	2,59
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,80
Cys7 [O]	His5 [NE2]	2,74
Cys11 [O]	Gln4 [N]	2,81
Cys11 [N]	Gln4 [O]	2,91
Tyr19 [O]	Phe25 [N]	3,02
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,96
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,91
Cys7 [O]	His5 [ND1]	2,76
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,90

Na slici 21 i tablici 11 date su vodikove veze PheB24–TyrD26 i TyrB26–PheD24 zaslužne za stvaranje dimera.

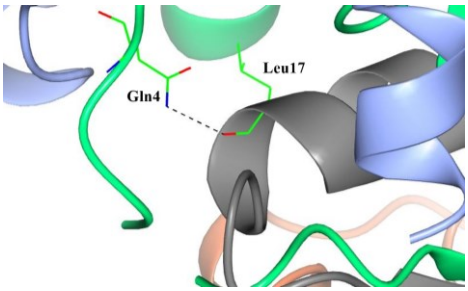


Slika 21. Vodikove veze u dimeru niklovog(II) derivata inzulina (D5A1). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, a sivom bojom lanac D. Crnom isprekidanom crtom označene su vodikove veze PheB24–TyrD26 i TyrB26–PheD24.

Tablica 11. Vodikove veze zaslužne za nastajanje dimera niklovog(II) derivata inzulina (D5A1).

Lanac B Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Phe24 [N]	Tyr26 [O]	2,80
Phe24 [O]	Tyr26 [N]	2,91
Tyr26 [N]	Phe24 [O]	2,76
Tyr26 [O]	Phe24 [N]	2,97

Gore spomenuti dimeri još se dalje povezuju vodikovim vezama u heksamere. Interakcija od važnosti je između aminokiselina GlnB4–LeuD17 što se može vidjeti na slici 22, a njena udaljenost iznosi 2,85 Å (tablica 12).

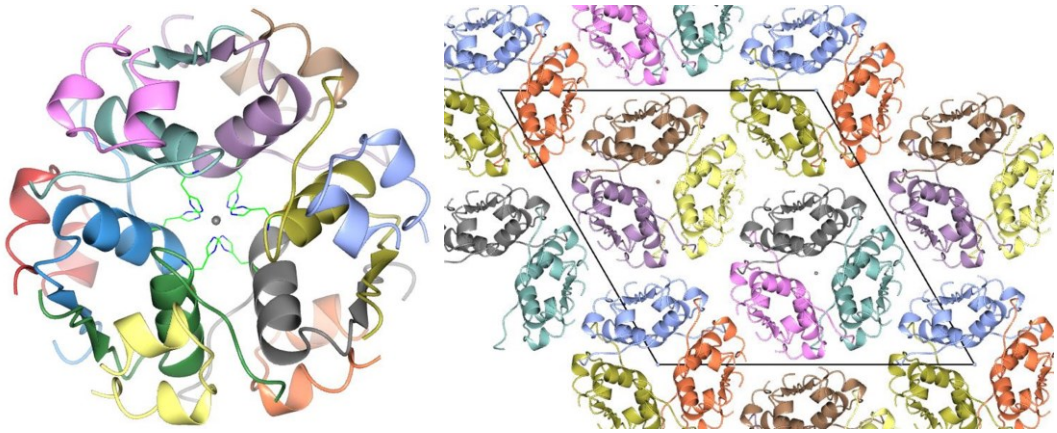


Slika 22. Vodikova veza zaslužna za stvaranje heksamera niklovog(II) derivata inzulina (D5A1). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, a sivom bojom lanac D. Vodikova veza GlnB4–LeuD17 označena je crnom isprekidanom crtom.

Tablica 12. Vodikova veza zaslužna za stvaranje heksamera niklovog(II) derivata inzulina (D5A1)

Lanac B Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Gln4 [NE2]	Leu17 [O]	2,85

Dobivena struktura veoma je slična strukturi koja se koristila kao model (struktura 3EXX[33] iz PDB baze podataka). U obje od navedenih struktura nalaze se dva atoma nikla na trigiri koji su koordinirani s tri simetrijski ovisna dušikova atoma iz histidina (His10 iz lanca B ili D, ovisno o kojem od dva niklova atoma se govori) i tri kisika iz triju simetrijski ovisnih molekula vode. Heksameri oba derivata inzulina su T_6 konformacije. Na slici 23 može se vidjeti heksamer novo dobivene strukture i koordinacija niklovog iona (lijevo) i njegovo pakiranje u jediničnoj ćeliji gledano duž kristalografske osi *c*. Također, u novo dobivenoj strukturi nalaze se 41 molekula vode i jedna molekula acetona dok se kod poznate strukture nalazi 151 molekula vode i jedan natrijev ion. Druga razlika između uspoređivanih struktura je ta da je novo dobivena kristalizirana u prisustvu bromidnih iona dok kod strukture 3EXX nije bilo nikakvog halogenidnog iona u kristalizacijskom uvjetu.

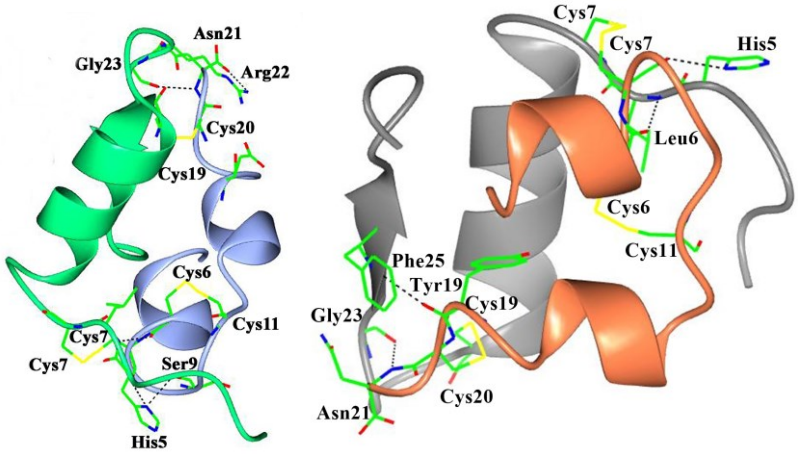


Slika 23. Prikaz heksamera niklova(II) derivata inzulina (D5A1) i koordinacije niklova atoma (lijevo) i pakiranja u jediničnoj ćeliji duž kristalografske osi *c* (desno). Niklovi atomi su na slici prikazani kao sive kuglice, jedan iznad drugog.

4.2.3. Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3)

Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3) je kristaliziran u prisustvu kloridnih iona koncentracije 0,248 mol dm^{-3}. Ova struktura zanimljiva je već od preliminarnog snimanja kristala gdje su

ustanovljeni kristalografski podatci te je uočeno duplo produljene kristalografske osi *c* od prijašnje strukture, odnosno od klasičnih T_6 struktura derivata inzulina.[2–4] Asimetrična jedinica novo dobivene strukture sadrži dva dimera: ABCD i EFGH. Disulfidni mostovi kod svih monomera su CysA(C,E,G)6–CysA(C,E,G)11, CysA(C,E,G)7–CysB(D,F,H)7 i CysA(C,E,G)20–CysB(D,F,H)19 te se njihove udaljenosti nalaze u tablicama 13 i 15. Vodikove veze kod nastajanja monomera AB su CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, SerA9–HisB5, AsnA21–GlyB23 i AsnA21–ArgB22, kod nastajanja monomera CD su CysC6–LeuD6, CysC7–HisD5, TyrC19–PheD25 i AsnC21–GlyD23, kod nastajanja monomera EF su GluE4–LysF29, CysE6–LeuF6, CysE7–HisF5, CysE11–GlnF4, TyrE19–PheF25 i AsnE21–GlyF23, a kod nastajanja monomera GH su GluG4–LysH29, CysG6–LeuH6, CysG7–HisH5, CysG11–GlnH4 i AsnG21–GlyH23. Udaljenosti navedenih vodikovih veza nalaze se u tablicama 14 i 16 te se također sve navedene interakcije nalaze na slikama 24 i 25.



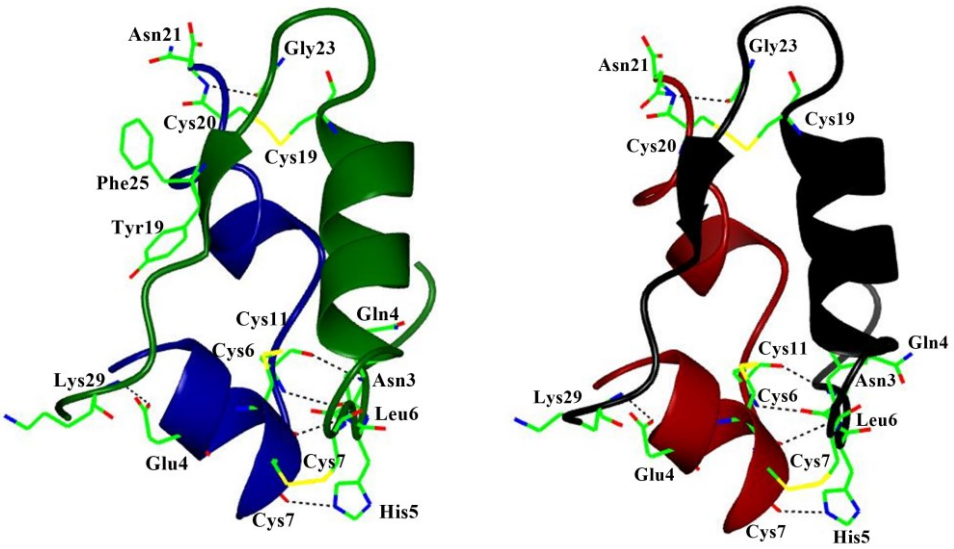
Slika 24. Vodikove veze i disulfidni mostovi zaslužni za stvaranje monomera AB (lijevo) i monomera CD (desno) kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, a sivom bojom lanac D. Disulfidni mostovi CysA(C)6–CysA(C)11, Cys A(C)7–CysB(D)7 i Cys A(C)20–CysB(D)19 označeni su žutom crtom, a vodikove veze CysA6–LeuB6, CysA7–HisB5, SerA9–HisB5, AsnA21–GlyB23 i AsnA21–ArgB22 za monomer AB i vodikove veze CysC6–LeuD6, CysC7–HisD5, TyrC19–PheD25 i AsnC21–GlyD23 za monomer CD označene su crnom isprekidanom crtom.

Tablica 13. Dislufidni mostovi između lanaca A i B i lanaca C i D.

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac A** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Cys6 [SG]	Cys11 [SG]	2,16
Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,07
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,00
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac C** Aminokiselina [atom]	
Cys6 [SG]	Cys11 [SG]	2,00
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,04
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,04

Tablica 14. Vodikove veze koje su zaslužne za nastajanje monomera AB i monomera CD kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3).

Lanac A Aminokiselina [atom]	**Lanac B** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,82
Cys7 [O]	His5 [ND1]	2,76
Ser9 [O]	His5 [ND1]	2,93
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,98
Asn21 [OXT]	Arg22 [NH2]	2,54
Lanac C Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,97
Cys7 [O]	His5 [ND1]	2,83
Tyr19 [O]	Phe25 [N]	3,10
Asn21 [N]	Gly23 [O]	3,01



Slika 25. Vodikove veze i disulfidni mostovi zaslužni za stvaranje monomera EF (lijevo) i monomera GH (desno) kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3). Tamno plavom bojom je označen lanac E, tamno zelenom bojom lanac F, tamno crvenom bojom lanac G, a crnom bojom lanac H. Disulfidni mostovi CysE(G)6–CysE(G)11, Cys E(G)7–CysF(H)7 i Cys E(G)20–CysF(H)19 označeni su žutom crtom, a vodikove veze GluE4–LysF29, CysE6–LeuF6, CysE7–HisF5, CysE11–GlnF4, TyrE19–PheF25 i AsnE21–GlyF23 za monomer EF i GluG4–LysH29, CysG6–LeuH6, CysG7–HisH5, CysG11–GlnH4 i AsnG21–GlyH23 za monomer GH su označene crnom isprekidanom crtom.

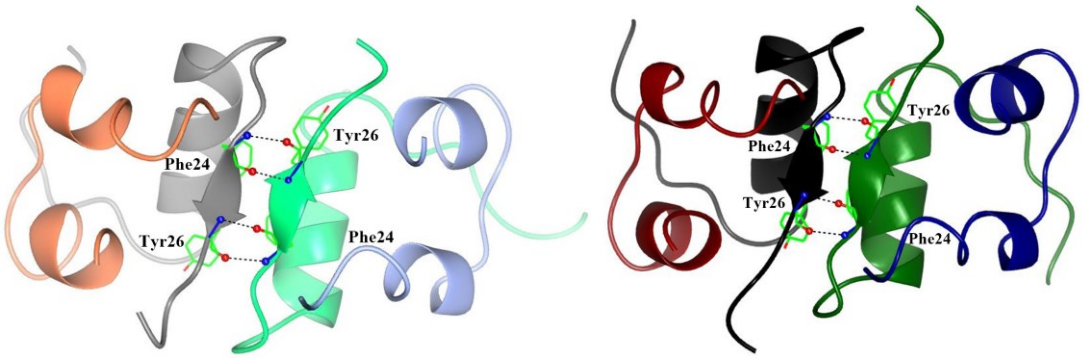
Tablica 15. Dislufidni mostovi između lanaca E i F i lanaca G i H.

Lanac E Aminokiselina [atom]	**Lanac E** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Cys6 [SG]	Cys11 [SG]	2,04
Lanac E Aminokiselina [atom]	**Lanac F** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,12
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,03
Lanac G Aminokiselina [atom]	**Lanac G** Aminokiselina [atom]	
Cys6 [SG]	Cys11 [SG]	2,06
Lanac G Aminokiselina [atom]	**Lanac H** Aminokiselina [atom]	
Cys7 [SG]	Cys7 [SG]	2,08
Cys20 [SG]	Cys19 [SG]	2,02

Tablica 16. Vodikove veze koje su zaslužne za nastajanje monomera EF i monomera GH kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3).

Lanac E Aminokiselina [atom]	**Lanac F** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Glu4 [OE2]	Lys29 [N]	2,57
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,86
Cys7 [O]	His5 [NE2]	2,73
Cys11 [N]	Gln4 [O]	2,88
Cys11 [O]	Gln4 [N]	2,83
Tyr19 [O]	Phe25 [N]	3,00
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,91
Lanac G Aminokiselina [atom]	**Lanac H** Aminokiselina [atom]	
Glu4 [OE2]	Lys29 [N]	2,83
Cys6 [O]	Leu6 [N]	2,85
Cys7 [O]	His5 [NE2]	2,71
Cys11 [N]	Gln4 [O]	2,95
Cys11 [O]	Gln4 [N]	2,84
Asn21 [N]	Gly23 [O]	2,89

Gore navedeni monomeri podliježu daljnjem povezivanju vodikovim vezama između aminokiselina PheB(F)24–TyrD(H)26 i TyrB(F)26–PheD(H)24 čime nastaju dva dimera i to dimeri ABCD te EFGH. Na slici 26 se nalaze interakcije koje su zaslužne za stvaranje tih dimera te se u tablici 17 nalaze njihove udaljenosti.

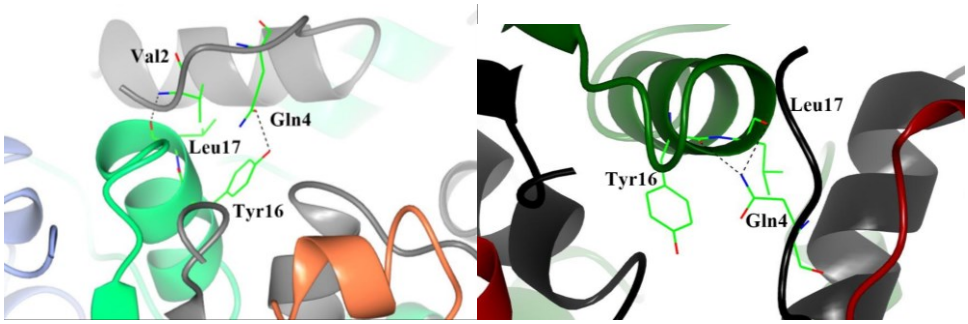


Slika 26. Vodikove veze u dimeru ABCD (gore) i EFGH (dolje) kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, sivom bojom lanac D, tamno plavom bojom lanac E, tamno zelenom bojom lanac F, tamno crvenom bojom lanac G, a crnom bojom lanac H. Crnom isprekidanom crtom označene su vodikove veze PheB(F)24–TyrD(H)26 i TyrB(F)26–PheD(H)24.

Tablica 17. Vodikove veze koje su zaslužne za nastajanje dimera ABCD i dimera EFGH kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3).

Lanac B Aminokiselina [atom]	**Lanac D** Aminokiselina [atom]	**Udaljenost / Å**
Phe24 [N]	Tyr26 [O]	3,04
Phe24 [O]	Tyr26 [N]	2,88
Tyr26 [N]	Phe24 [O]	2,81
Tyr26 [O]	Phe24 [N]	3,01
Lanac F Aminokiselina [atom]	**Lanac H** Aminokiselina [atom]	
Phe24 [N]	Tyr26 [O]	2,86
Phe24 [O]	Tyr26 [N]	2,91
Tyr26 [N]	Phe24 [O]	2,92
Tyr26 [O]	Phe24 [N]	3,06

Ovako dobivena dva dimera zatim se udružuju sa svojim simetrijskim lancima čime nastaju dva heksamera. Vodikove veze zaslužne za nastajanje oba heksamera su između aminokiselina TyrB16–GlnD4 i LeuB17–ValD2 za heksamer ABCD te TyrF16–GlnH4 i LeuF17–GlnH4 za heksamer EFGH (slika 27 i tablica 18).



Slika 27. Vodikove veze zaslužne u heksameru, lanaca ABCD (simetrijski operator –Y, X – Y, Z) (gore) i heksamera lanaca EFGH (simetrijski operator –Y – 1, X – Y, Z) (dolje), kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3). Plavom bojom je označen lanac A, zelenom bojom lanac B, narančastom bojom lanac C, sivom bojom lanac D, tamno plavom bojom lanac E, tamno zelenom bojom lanac F, tamno crvenom bojom lanac G, a crnom bojom lanac H. Crnom isprekidanom crtom označene su vodikove veze TyrB16–GlnD4 i LeuB17–ValD2 za heksamer ABCD te TyrF16–GlnH4 i LeuF17–GlnH4 za heksamer EFGH.

Tablica 18. Vodikove veze zaslužne za stvaranje heksamera lanaca ABCD i heksamera lanaca EFGH kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3).

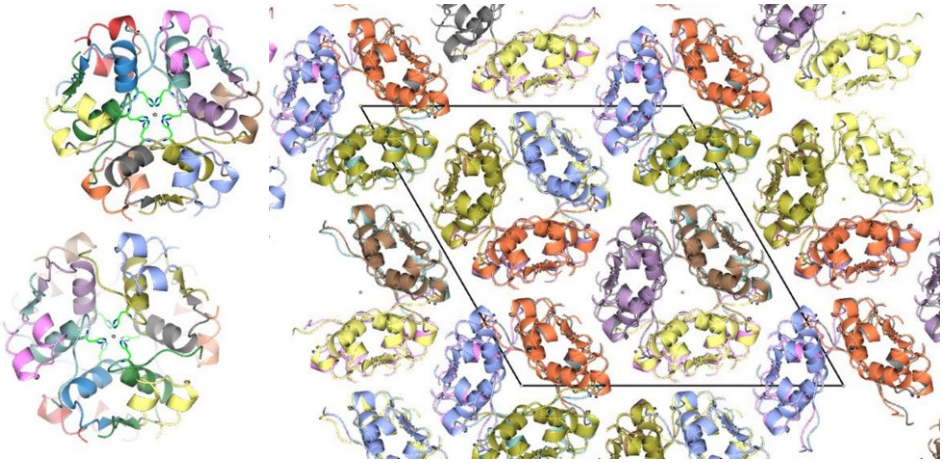
Heksamer lanaca ABCD

Lanac B Aminokiselina [atom]	**Simetrijski lanac D (simetrijski operator –Y, X – Y, Z)** Aminokiselina [atom]	Udaljenost / Å
Tyr16 [OH]	Gln4 [OE1]	2,60
Leu17 [O]	Val2 [N]	2,82

Heksamer lanaca EFGH

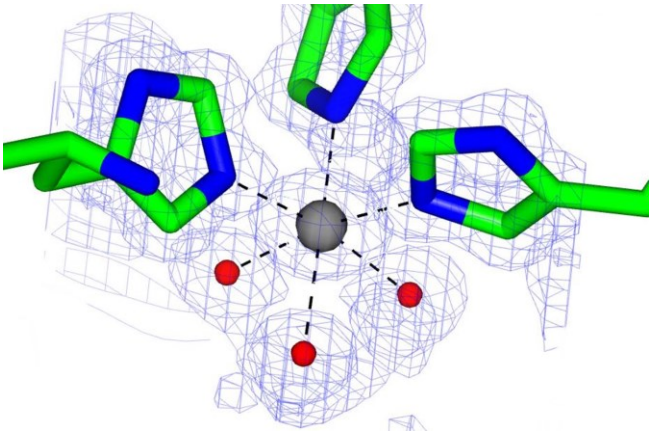
Lanac F Aminokiselina [atom]	**Simetrijski lanac H (simetrijski operator –Y – 1, X – Y, Z)** Aminokiselina [atom]	
Tyr16 [O]	Gln4 [NE2]	2,95
Leu17 [O]	Gln4 [NE2]	3,05

Struktura ovog derivata inzulina također je nova. Njoj sličnih ima u PDB bazi podataka,[34,35] no s drugačijim metalnim ion u središtu heksamera. Novo dobivena struktura uspoređuje se s već poznatom 3IR0[35] strukturom. Obje navedene imaju slične duljine kristalografskih osi što znači da obje imaju duplo dužu *c* os u usporedbi s klasičnom strukturom derivata inzulina. Također u obje strukture su heksameri inzulina T_6 konformacije. Ono što ih razlikuje je metal koji se nalazi u središtu tih heksamera, a to je bakar kod 3IR0 strukture i kobalt kod novo dobivene strukture. Također novo dobivena struktura je prostorne grupe *H*3 s dva dimera u asimetričnoj jedinici, a već poznata struktura je prostorne grupe *P*3 sa šest dimera u asimetričnoj jedinici. Na slici 28 lijevo mogu se vidjeti oba heksamera novo dobivene strukture, a pakiranje navedene strukture gledano duž kristalografske osi *c* nalazi se na istoj slici desno. U novo dobivenoj strukturi pronađeno je 146 molekula vode.



Slika 28. Prikaz oba heksamera kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3) i koordinacije kobaltova atoma (lijevo) i pakiranja u jediničnoj ćeliji duž kristalografske osi *c* (desno).

Kod svih novo dobivenih struktura, niklovog(II) derivata inzulina (D5C4), niklovog(II) derivata inzulina (D5A1) i kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3), javlja se T_6 konformacija heksamera što znači da se u jednom heksameru nalaze dva metalna iona koji se nalaze na osi rotacije trećeg reda gdje je svaki od njih oktaedarski koordiniran s tri simetrijski ovisna dušikova atoma iz histidinskih bočnih ogranka (atom NE2 iz aminokiseline His10) i s tri kisikova atoma iz triju molekula vode. Kako se radi o istoj oktaedarskoj koordinaciji, na slici 29 nalazi se njezin prikaz te se u tablici 19 nalaze udaljenosti za sve navedene strukture. Prosječna udaljenost *d*(Ni-NE2 His10) kod niklovog(II) derivata inzulina (D5C4) iznosi 2,05 Å dok prosječna udaljenost *d*(Ni-O H_2O) iznosi 2,00 Å. Prosječna udaljenost *d*(Ni-NE2 His10) kod niklovog(II) derivata inzulina (D5A1) iznosi 2,10 Å dok prosječna udaljenost *d*(Ni-O H_2O) iznosi 2,10 Å. Prosječna udaljenost *d*(Ni-NE2 His10) kod kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3) iznosi 2,09 Å dok prosječna udaljenost *d*(Ni-O H_2O) iznosi 2,11 Å.



Slika 29. Koordinacija kobaltova(II) iona strukture D7A3 u mapi elektronske gustoće 2m*F*o-D*F*c (označena plavom bojom). His10 iz lanca B, D, F i H te njegove simetrijske aminokiseline (simetrijski operator X, Y, Z) koordiniraju metalni ion sa svojim NE2 atomom dušika. Ostala tri koordinacijska mjesta popunjava molekula vode te njene simetrijske molekule (simetrijski operator X, Y, Z). Kobaltov atom je prikazan kao siva kuglica, kisikovi atomi iz voda kao crvene kuglice, histidinski bočni ogranak zelenim štapićima, a njegovi dušikovi atomi plavim štapićima.

Tablica 19. Udaljenosti metalnog iona i vezanih atoma kod svih heksamera svih triju novo dobivenih struktura.

Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)

Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	Udaljenost / Å
Nikal [Ni]	His10 [NE2] – lanac B	2,05
Nikal [Ni]	H_2O [O]	2,00

Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)

Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	Udaljenost / Å
Nikal [Ni]	His10 [NE2] – lanac B	2,09
Nikal [Ni]	H_2O [O]	2,09
Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	
Nikal [Ni]	His10 [NE2] – lanac D	2,11
Nikal [Ni]	H_2O [O]	2,10

Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3)

Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	Udaljenost / Å
Kobalt [Co]	His10 [NE2] – lanac B	2,08
Kobalt [Co]	H_2O [O]	2,11
Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	
Kobalt [Co]	His10 [NE2] – lanac D	2,09
Kobalt [Co]	H_2O [O]	2,13
Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	
Kobalt [Co]	His10 [NE2] – lanac F	2,08
Kobalt [Co]	H_2O [O]	2,11
Metalni ion	**Vezani atom** Aminokiselina [atom]	
Kobalt [Co]	His10 [NE2] – lanac H	2,09
Kobalt [Co]	H_2O [O]	2,08

Izračunate su površine dostupne otapalu kod heksamera te površine dostupne otapalu kod monomera nakon udruživanja u heksamer koje se nalaze u tablici 20. Njihove slične vrijednosti upućuju na podjedanku stabilnost različitih kristalnih formi. Međutim, uspoređujući broj interakcija odgovornih za udruživanje molekula inzulina u heksamer može se uočiti da je u strukturi niklovog(II) derivat inzulina (D5C4) prisutan najveći broj interakcija (četiri vodikove veze, tablica 8) koje mogu pridonijeti većoj stabilnosti kompleksa u odnosu na ostala dva derivata inzulina. Kod kobaltovog(II) derivata inzulina (D7A3) prisutne su dvije vodikove veze (tablica 18) dok u stvaranju heksamera niklovog(II) derivata inzulina (D5A1) sudjeluje samo jedna vodikova veza (tablica 12) ukazujući na najmanju stabilnost ovog derivata inzulina. Različita stabilnost priređenih kristalnih formi derivata inzulina mogla bi imati potencijalnu terapeutsku primjenu. Heksamer inzulina stabilnije kristalne forme teže će se razgraditi do biološki aktivnog monomera te bi kao takav bio pogodniji za razvoj sporije otpuštajućeg inzulina u liječenju dijabetesa, dok bi nestabilniji heksamer bio pogodniji za primjenu u potrebi brže otpuštajućeg inzulina. Da bi se potkrijepila spomenuta ideja, potrebna su daljnja otopinska istraživanja aktivnosti dobivenih različitih formi inzulina.

Tablica 20. Površine dostupne otapalu kod heksamera te površine dostupne otapalu kod monomera nakon udruživanja u heksamer.

	Površina dostupna otapalu kod heksamera / Å^2
Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)	13990
Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)	13370
Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3)	12840/14390
	Površina dostupna otapalu kod monomera nakon udruživanja u heksamer / Å^2
Niklov(II) derivat inzulina (D5C4)	18350
Niklov(II) derivat inzulina (D5A1)	19790
Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3)	20150/17690

§ 5. ZAKLJUČAK

Istraženi su kristalizacijski uvjeti za nastajanje jediničnih kristala niklovih(II), kobaltovih(II) i bakrovih(II) derivata ljudskog inzulina u prisustvu različitih koncentracija halogenidnih iona (kloridi, bromidi i jodidi u rasponu koncentracija 0,148 mol dm^{-3} – 1,298 mol dm^{-3}). Dobiveni su jedinični kristali bakrovog(II), niklovog(II) i kobaltovog(II) derivata inzulina u prisustvu kloridnih i bromidnih iona, dok u prisustvu jodidnih iona kristalizacija izostaje ili su nastali kristali koji nisu zadovoljavajuće kvalitete za difrakcijski eksperiment.

Uvidjelo se da promjenom koncentracije halogenidnih iona dolazi do nastajanja jediničnih kristala različitih morfologija te su difrakcijskom analizom određeni različiti parametri jedinične ćelije. Kod koncentracije bromida od 0,148 mol dm^{-3} nastali su jedinični kristali morfologije nepravilne četverostrane prizme koji kristaliziraju u trigonskom sustavu u prostornoj grupi *H*3. Povećanjem koncentracije bromidnih iona u rasponu 0,848 – 0,898 mol dm^{-3} dolazi do promjene morfologije kristala u nepravilne spljoštene heksagonske prizme. Pokazalo se da ti kristali kristaliziraju također u trigonskom sustavu, ali u prostornoj grupi *H*32. Dodatnim povećanjem koncentracije bromidnih iona do 1,148 mol dm^{-3} nastaju kristali morfologije četverostrane bipiramide. Za navedene kristale je pokazano da kristaliziraju u tetragonskom sustavu u prostornoj grupi $P4_12_12$. Ovakva kategorizacija, u prisustvu bromidnih iona, vrijedi samo kod niklovih(II) derivata inzulina, budući da kod kobaltovih(II) derivata inzulina izostaju kristali u obliku nepravilnih spljoštenih heksagonskih prizmi. Također, gore opisan trend ne pojavljuje se ni kod derivata kristaliziranih u prisustvu kloridnih iona. Ovisno o metalu s kojim se provodi kristalizacija, izostaju ili kristali morfologije nepravilnih spljoštenih heksagonskih prizmi (kobalt) ili morfologije četverostranih bipiramida (nikal). Dodatno se još samo kod kobaltovih(II) derivata inzulina uz prisustvo kloridnih iona (c = 0,248 mol dm^{-3}) javlja kristal morfologije nepravilne četverostrana prizme čija se duljina kristalografske osi c duplo produljila. Kod bakrovih(II) derivata inzulina nastaje amorfni talog, pri nižim koncentracijama halogenidnih iona, i kristali u obliku četverostranih bipiramida, pri višim koncentracijama halogenidnih iona.

Za strukturno istraživanje odabrana su tri jedinična kristala: niklov(II) derivat inzulina (D5A1) kristaliziran pri niskoj koncentraciji bromidnih iona (c = 0,148 mol dm^{-3}), kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3) kristaliziran pri niskoj koncentraciji kloridnih iona (c = 0,248 mol dm^{-3}) te niklov(II) derivat inzulina (D5C4) kristaliziran pri višoj koncentraciji bromidnih iona (c = 0,898 mol dm^{-3}).

Niklov(II) derivat inzulina (D5C4) je T_6 heksamer koji u asimetričnoj jedinici sadrži samo monomer AB te je po prvi puta opisana takva struktura inzulina. Niklov(II) derivat ljudskog inzulina (D5A1) također je T_6 konfomer, koji u asimetričnoj jedinici sadrži jedan dimer ABCD. Slična struktura postoji u PDB bazi podataka, no drugačiji su kristalizacijski uvjeti pri kojima nastaju kristali navedenog niklovog(II) derivata inzulina. Kobaltov(II) derivat inzulina (D7A3) je također T_6 konformer, no zanimljivost oko ove strukture je da je kristalografska os c duplo veća te da se sadržaj asimetrične jedinice duplo povećava u odnosu na prethodnu strukturu što znači da su u njoj sadržana dva dimera (ABCD i EFGH). U literaturi su opisane slične strukture derivata inzulina koje sadrže cink ili bakar kao središnji metalni ion, ali su kristali nastali u različitim kristalnim sustavima.[34,35]

Proučene su interakcije koje dovode do stvaranja monomera, dimera i heksamera novih derivata inzulina. Sve opisane strukture tvore heksamer u kojem je metalni ion (Ni/Co) oktaedarski koordiniran s tri simetrijski ovisna dušikova atoma iz histidinskih bočnih ogranka (atom NE2 iz aminokiseline His10) i s tri kisikova atoma iz triju molekula vode. Najveći broj interakcija koje sudjeluju u udruživanju molekula inzulina u heksamer je prisutan u strukturi niklovog(II) derivat inzulina (D5C4) koje mogu doprinijeti najvećoj stabilnosti ovog heksamera inzulina u odnosu na ostala dva derivata inzulina. Tako priređene kristalne forme derivata inzulina različite stabilnosti mogle bi imati potencijalnu primjenu u razvoju terapeutskih pripravaka inzulina različitih svojstava (brzo i sporo otpuštajućeg) u liječenju dijabetesa.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1 https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-koordinaciju-i-provodenje-programa-i-projekata-za-prevenciju-kronicnih-nezaraznih-bolest/dijabetes/ (preuzeto 02. rujna 2020.).

2 D. L. Nelson i M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition, W. H. Freeman and Company, USA (2005), str. 589, 902–910.

3 B. Prugovečki, N. Ivetić, D. Matković-Čalogović, *Maced. J. Chem. Chem. En.* **34** 1 (2015) 67–72.

4 R. Sreekanth, V. Pattabhi, S. S. Rajan, *Int. J. Biol. Macromol* **44** (2009) 29–36.

5 G. D. Smith, E. Ciszak, L. A. Magrum, W. A. Pangborn, R. H. Blessing, *Acta Cryst.* **D56** (2000) 1541–1548.

6 H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 235–242.

7 L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *PNAS* **37** (1951) 4 205–211.

8 I. Vecchio, C. Tornali, N. L. Bragazzi, M. Martini, *Front. Endocrinol.* **9** (2018) 613 1–8.

9 M. J. Adams, T. L. Blundell, E. J. Dodson, G. G. Dodson, M. Vijayan, E. N. Baker, M. M. Harding, D. C. Hodgkin, B. Rimmer, S. Sheats, *Nature* **224** (1969) 491–495.

10 D. A. Scott, *Biochem J.* **28** (1934) 4 1592–1602.

11 D. F. Steiner, *The Biosynthesis of Insulin* u S. Seino, G. I. Bell (ur.) *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease,* Springer, Tokyo (2008) str. 31–49.

12 R. Mo, T. Jiang, J. Di, W. Tai, Z. Gu, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 10 3595–3629.

13 U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson i R. E. Hubbard, *Insulin Structure* u P. Cuatrecasas, S. Jacobs (ur.) *Insulin. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin **92** (1990) str. 23–39.

14 N. C. Kaarsholm, H. C. Ko, M. F. Dunn, *Biochemistry* **28** (1989) 4427-4435.

15 L. Kosinova, V. Veverka, P. Novotna, M. Collinsova, M. Urbanova, N. R. Moody, J. P. Turkenburg, J. Jiraček, A. M. Bizozowski, L. Žakova, *Biochemistry* **53** (2014) 3392–3402.

16 J. Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, Third edition, Springer, USA (2007) str. 58.

17 M. Ladd, R. Palmer, *Structure Determination by X-ray Crystallography*, Fifth edition, Springer, USA (2013) str. 55.

18 A. McPherson, *Protein Crystallization* u A. Wlodawer, Z. Dauter i M. Jaskolski (ur.) *Protein Crystallography, Methods and Protocols*, Springer, USA (2017) 17–50.

19 R. Giege, *FEBS J.* **280** (2013) 6456–6497.

20 https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures (preuzeto 04. svibnja 2020.).

21 N. Robotti, *Rend. Fis. Acc. Lincei* **24** (2013) 7–18.

22 https://roentgenmuseum.de/ (preuzeto 07. svibnja 2020.).

23 https://www.britannica.com/science/Bragg-law (preuzeto 13. svibnja 2020.).

24 T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. W. Leslie, *Acta Cryst.* **D67** (2011) 271–281.

25 J. Navaza, *Acta Cryst.* **A50** (1994) 157–163.

26 A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **40** (2007) 658–674.

27 M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Cryst.* **D67** (2011) 235–242.

28 G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Cryst.* **D53** (1997) 240–255.

29 P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Cryst.* **D66** (2010) 486–501.

30 C. J. Williams, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, B. W. Arendall 3rd, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Protein Sci.* **27** (2018) 293–315.

31 E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **372** (2007) 774–797.

32 S. McNicholas, E. Potterton, K. S. Wilson, M. E. M. Noble, *Acta Cryst.* **D67** (2011) 386–394.

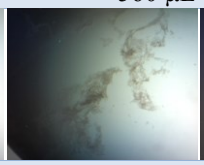
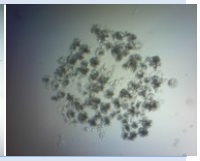
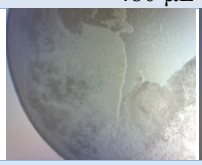
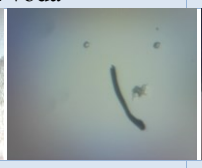
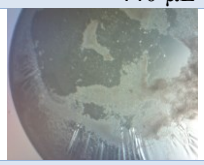
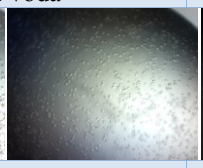
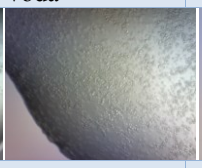
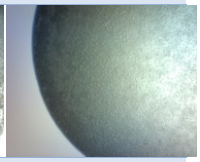
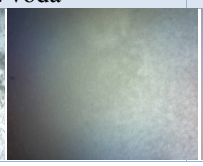
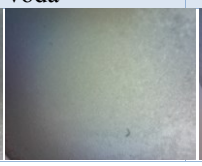
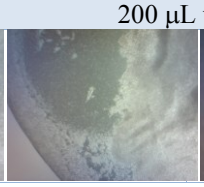
33 B. Prugovečki, E. Dodson, G. Dodson, D. Matković-Čalogović, *Croat. Chem. Acta* **82** (2009) 433–438.

34 M. Murayoshi, K. Sasaki, N. Sakabe, K. Sakabe, (2013) Crystal structure of dodecamer human insulin with double C-axis lenght of the hexamer 2 Zn insulin cell doi: 10.2210/pdb3W80/pdb.

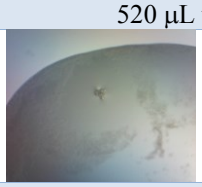
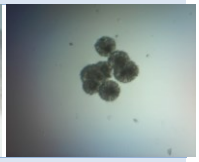
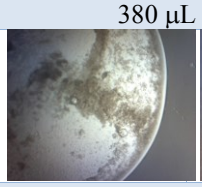
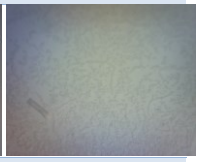
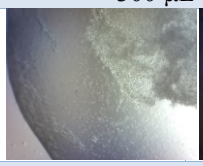
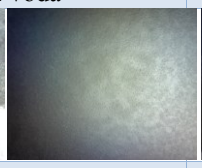
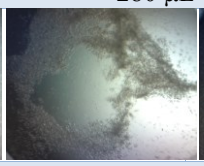
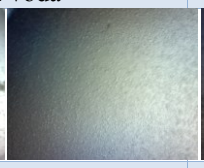
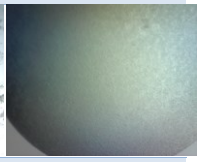
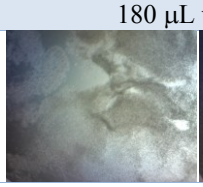
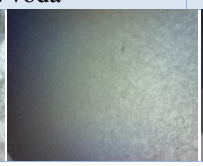
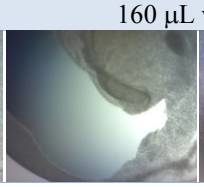
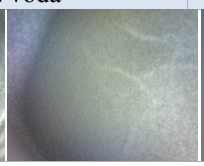
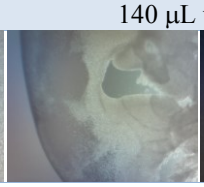
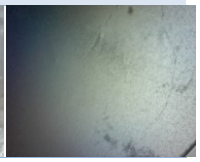
35 N. Raghavendra, V. Pattabhi, S. S. Rajan, (2010) Crystal Structure of Human Insulin complexed with Cu^{2+} metal ion doi: 10.2210/pdb3IR0/pdb.

§ 7. DODATAK

Tablica D1. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije bakrovog(II) derivata inzulina u prisustvu kloridnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

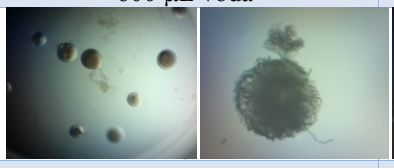
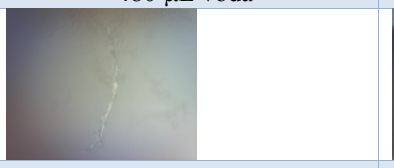
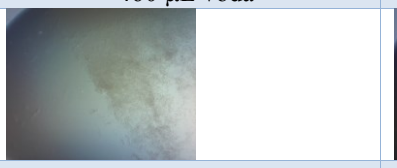
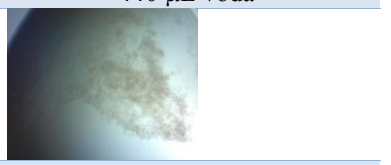
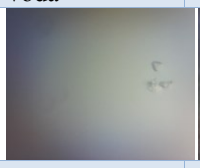
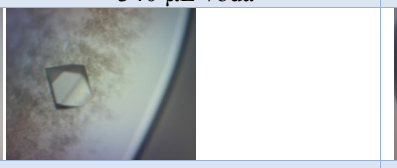
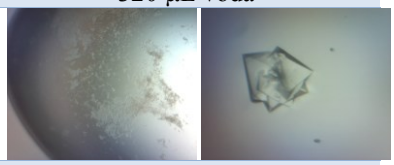
	1	2	3
A	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaCl 600 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaCl 580 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaCl 560 µL voda
			 
B	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaCl 480 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaCl 460 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaCl 440 µL voda
	 		
C	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaCl 360 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaCl 340 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaCl 320 µL voda
			
D	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaCl 240 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaCl 220 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaCl 200 µL voda
			

Nastavak tablice D1.

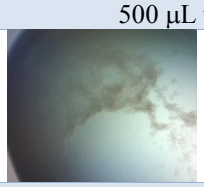
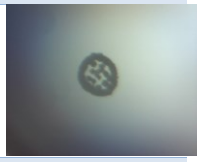
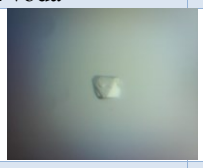
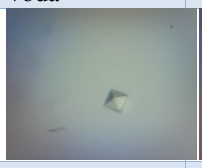
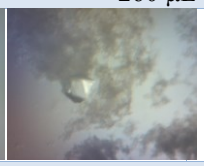
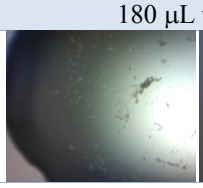
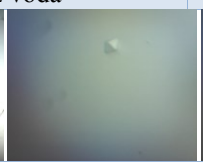
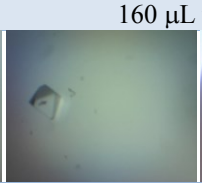
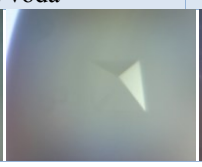
	4	5	6
A	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaCl 540 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaCl 520 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaCl 500 µL voda
			
B	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaCl 420 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaCl 400 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaCl 380 µL voda
			 
C	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaCl 300 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaCl 280 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaCl 260 µL voda
	 	 	
D	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaCl 180 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaCl 160 µL voda	150 µL $CuCl_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaCl 140 µL voda
	 	 	 

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HCl)
c ($CuCl_2$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaCl) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D2. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije bakrovog(II) derivata inzulina u prisustvu bromidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

	1	2	3
A	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaBr 600 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaBr 580 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaBr 560 µL voda
			
B	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaBr 480 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaBr 460 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaBr 440 µL voda
			
C	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaBr 360 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaBr 340 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaBr 320 µL voda
			
D	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaBr 240 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaBr 220 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaBr 200 µL voda

Nastavak tablice D2.

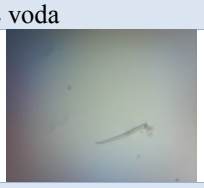
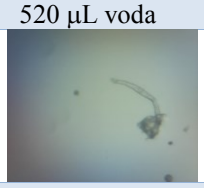
	4	5	6
A	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaBr 540 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaBr 520 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaBr 500 µL voda
			
B	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaBr 420 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaBr 400 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaBr 380 µL voda
			
C	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaBr 300 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaBr 280 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaBr 260 µL voda
			
D	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaBr 180 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaBr 160 µL voda	150 µL $CuBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaBr 140 µL voda
	 	 	

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HBr)
c ($CuBr_2$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaBr) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D3. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije bakrovog(II) derivata inzulina u prisustvu jodidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

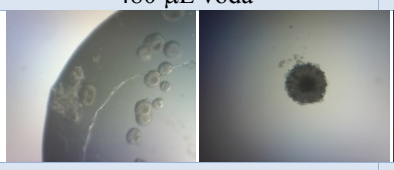
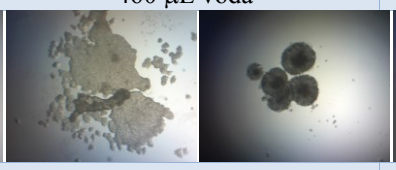
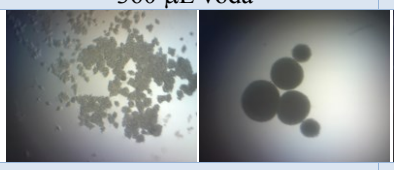
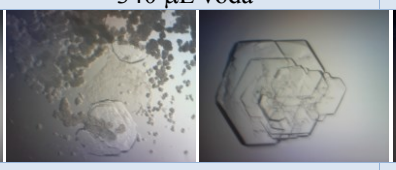
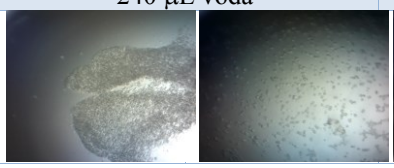
	1	**2**	**3**
A	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaI 600 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaI 580 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaI 560 µL voda
B	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaI 480 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaI 460 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaI 440 µL voda
C	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaI 360 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaI 340 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaI 320 µL voda
D	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaI 240 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaI 220 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaI 200 µL voda

Nastavak tablice D3.

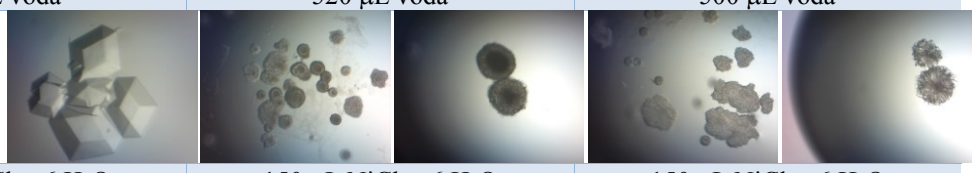
	4	5	6
A	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaI 540 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaI 520 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaI 500 µL voda
			
B	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaI 420 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaI 400 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaI 380 µL voda
C	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaI 300 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaI 280 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaI 260 µL voda
D	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaI 180 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaI 160 µL voda	150 µL $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaI 140 µL voda

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HI)
c ($Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaI) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D4. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije niklovog(II) derivata inzulina u prisustvu kloridnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

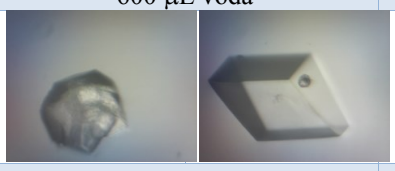
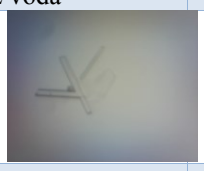
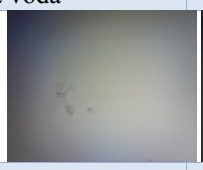
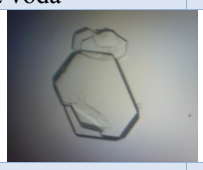
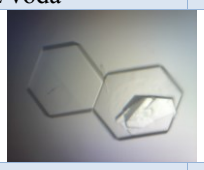
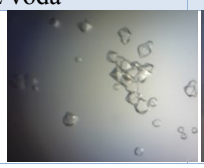
	1	2	3
A	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaCl 600 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaCl 580 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaCl 560 µL voda
B	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaCl 480 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaCl 460 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaCl 440 µL voda
			
C	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaCl 360 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaCl 340 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaCl 320 µL voda
			
D	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaCl 240 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaCl 220 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaCl 200 µL voda
			

Nastavak tablice D4.

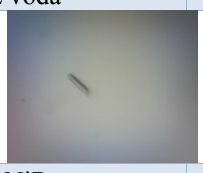
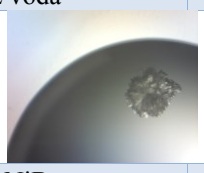
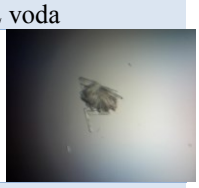
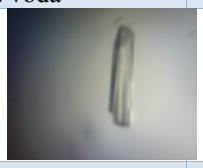
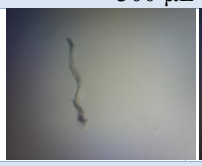
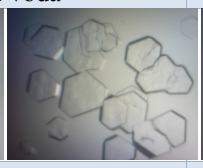
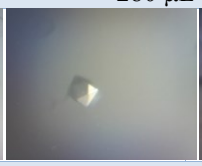
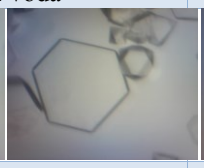
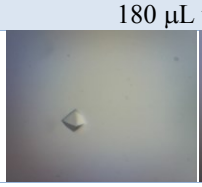
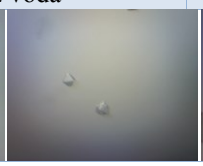
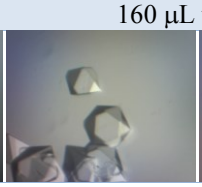
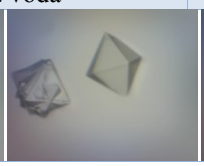
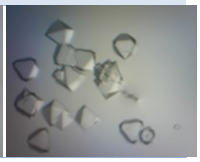
	4	5	6
A	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaCl 540 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaCl 520 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaCl 500 µL voda
			
B	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaCl 420 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaCl 400 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaCl 380 µL voda
C	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaCl 300 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaCl 280 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaCl 260 µL voda
D	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaCl 180 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaCl 160 µL voda	150 µL $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaCl 140 µL voda

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HCl)
c ($NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaCl) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D5. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije niklovog(II) derivata inzulina u prisustvu bromidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

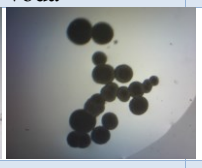
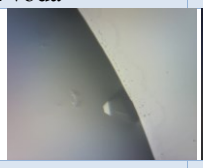
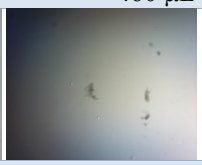
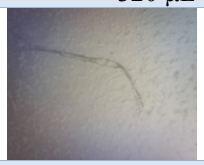
	1	2	3
A	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaBr 600 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaBr 580 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaBr 560 µL voda
			
B	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaBr 480 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaBr 460 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaBr 440 µL voda
			
C	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaBr 360 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaBr 340 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaBr 320 µL voda
			
D	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaBr 240 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaBr 220 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaBr 200 µL voda
			

Nastavak tablice D5.

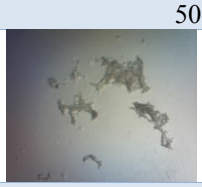
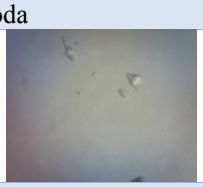
	4	5	6
A	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaBr 540 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaBr 520 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaBr 500 µL voda
			
B	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaBr 420 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaBr 400 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaBr 380 µL voda
			
C	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaBr 300 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaBr 280 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaBr 260 µL voda
	 	 	
D	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaBr 180 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaBr 160 µL voda	150 µL $NiBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaBr 140 µL voda
	 	 	

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HBr)
c ($NiBr_2$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaBr) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D6. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije niklovog(II) derivata inzulina u prisustvu jodidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

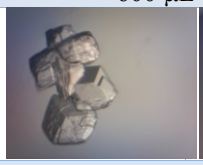
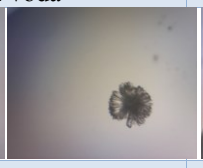
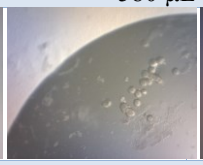
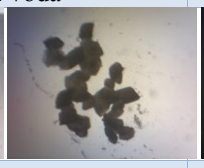
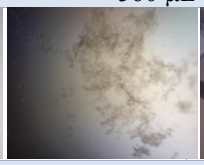
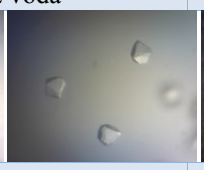
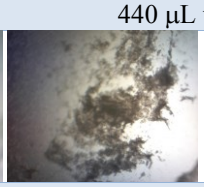
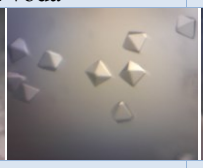
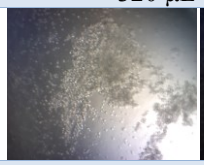
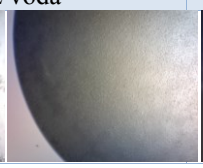
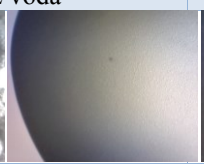
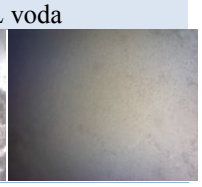
	1	2	3
A	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaI 600 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaI 580 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaI 560 µL voda
			
B	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaI 480 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaI 460 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaI 440 µL voda
			
C	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaI 360 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaI 340 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaI 320 µL voda
			
D	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaI 240 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaI 220 µL voda	150 µL NiI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaI 200 µL voda

Nastavak tablice D6.

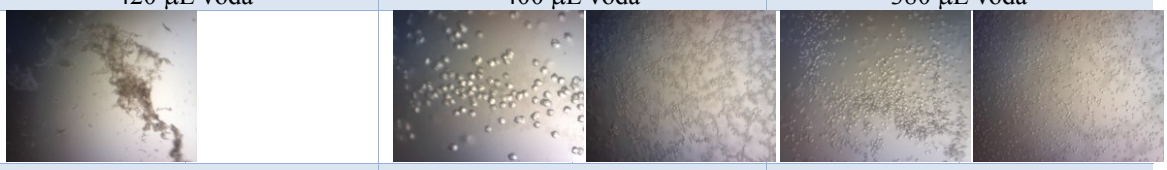
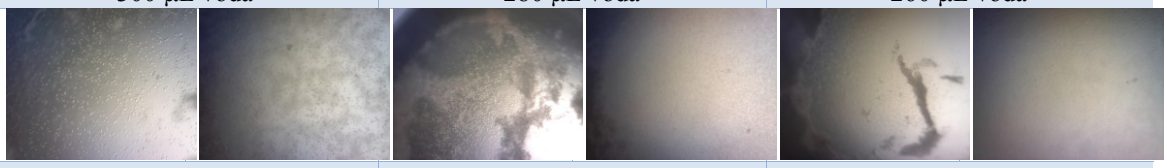
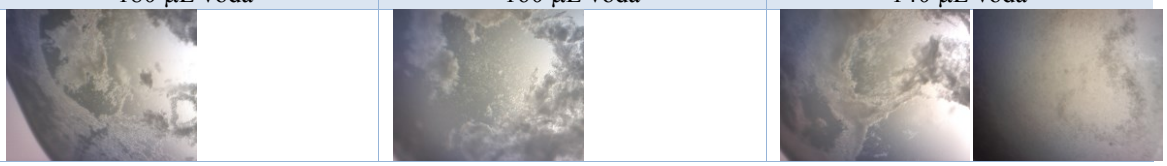
	4	5	6
A	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 110 μL NaI 540 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 130 μL NaI 520 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 150 μL NaI 500 μL voda
			 
B	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 230 μL NaI 420 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 250 μL NaI 400 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 270 μL NaI 380 μL voda
C	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 350 μL NaI 300 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 370 μL NaI 280 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 390 μL NaI 260 μL voda
D	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 470 μL NaI 180 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 490 μL NaI 160 μL voda	150 μL NiI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 510 μL NaI 140 μL voda

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HI)
c (NiI_2) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaI) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D7. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije kobaltovog(II) derivata inzulina u prisustvu kloridnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

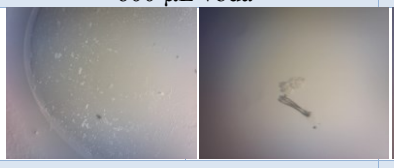
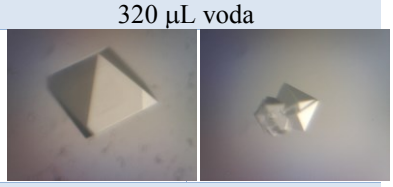
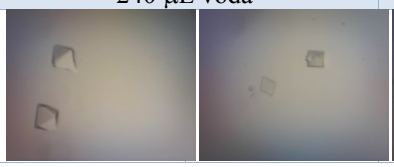
	1	2	3
A	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaCl 600 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaCl 580 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaCl 560 µL voda
	 	 	
B	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaCl 480 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaCl 460 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaCl 440 µL voda
			
C	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaCl 360 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaCl 340 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaCl 320 µL voda
			
D	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaCl 240 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaCl 220 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaCl 200 µL voda
			

Nastavak tablice D7.

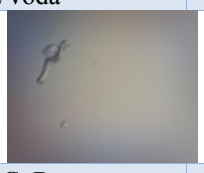
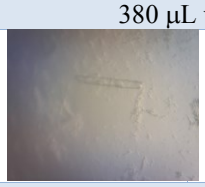
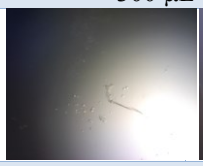
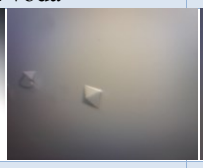
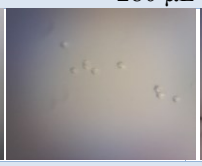
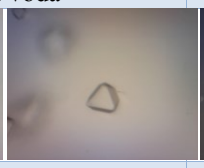
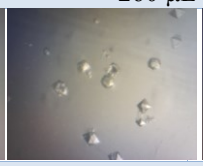
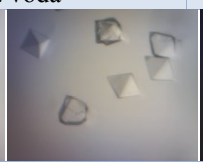
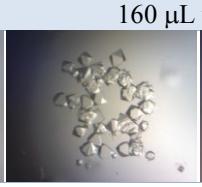
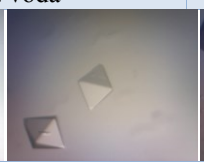
	4	5	6
A	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaCl 540 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaCl 520 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaCl 500 µL voda
B	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaCl 420 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaCl 400 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaCl 380 µL voda
			
C	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaCl 300 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaCl 280 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaCl 260 µL voda
			
D	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaCl 180 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaCl 160 µL voda	150 µL $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaCl 140 µL voda
			

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HCl)
c ($CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaCl) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D8. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije kobaltovog(II) derivata inzulina u prisustvu bromidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

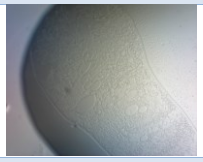
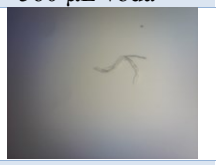
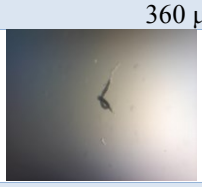
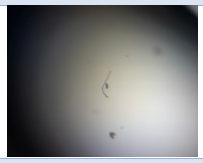
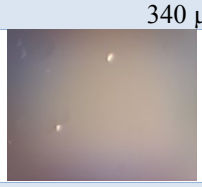
	1	2	3
A	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaBr 600 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaBr 580 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaBr 560 µL voda
			
B	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaBr 480 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaBr 460 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaBr 440 µL voda
C	50 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaBr 360 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaBr 340 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaBr 320 µL voda
			
D	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaBr 240 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaBr 220 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaBr 200 µL voda
			

Nastavak tablice D8.

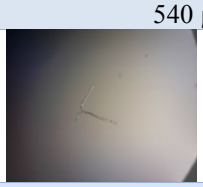
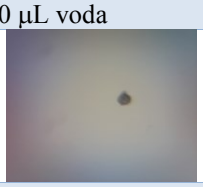
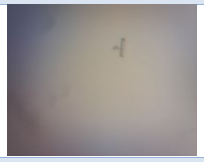
	4	5	6
A	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 110 µL NaBr 540 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 130 µL NaBr 520 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 150 µL NaBr 500 µL voda
			
B	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 230 µL NaBr 420 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 250 µL NaBr 400 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 270 µL NaBr 380 µL voda
			
C	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 350 µL NaBr 300 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 370 µL NaBr 280 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 390 µL NaBr 260 µL voda
	 	 	
D	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 470 µL NaBr 180 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 490 µL NaBr 160 µL voda	150 µL $CoBr_2$ 100 µL pufer 100 µL aceton 510 µL NaBr 140 µL voda
		 	

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HBr)
c ($CoBr_2$) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaBr) = 5 mol dm^{-3}

Tablica D9. Kristalizacijski uvjeti i fotografije produkata kristalizacije kobaltovog(II) derivata inzulina u prisustvu jodidnih iona. U svakom kristalizacijskom uvjetu slika lijeva predstavlja inzulin proizvođača *Novo Nordisk*. Ako uvjet nema fotografiju, znači da je kapljica ostala bistra.

	1	2	3
A	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 50 µL NaI 600 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 70 µL NaI 580 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 90 µL NaI 560 µL voda
			
B	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 170 µL NaI 480 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 190 µL NaI 460 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 210 µL NaI 440 µL voda
C	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 290 µL NaI 360 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 310 µL NaI 340 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 330 µL NaI 320 µL voda
	 		
D	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 410 µL NaI 240 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 430 µL NaI 220 µL voda	150 µL CoI_2 100 µL pufer 100 µL aceton 450 µL NaI 200 µL voda

Nastavak tablice D9.

	4	5	6
A	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 110 μL NaI 540 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 130 μL NaI 520 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 150 μL NaI 500 μL voda
			
B	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 230 μL NaI 420 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 250 μL NaI 400 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 270 μL NaI 380 μL voda
			
C	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 350 μL NaI 300 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 370 μL NaI 280 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 390 μL NaI 260 μL voda
D	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 470 μL NaI 180 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 490 μL NaI 160 μL voda	150 μL CoI_2 100 μL pufer 100 μL aceton 510 μL NaI 140 μL voda

γ (Zn-free inzulin) = 7,5 mg / mL (inzulin otopljen u 0,02 mol dm^{-3} HI)
c (CoI_2) = 0,15 mol dm^{-3}
c (citratni pufer) = 1 mol dm^{-3}, pH = 6,4
c (NaI) = 5 mol dm^{-3}

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Boris Gomaz

Datum rođenja: 14. prosinca 1995.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2002–2010	Osnovna škola Sveti Đurđ, Sveti Đurđ
2010–2014	Druga gimnazija Varaždin, Varaždin
2014–2018	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. XIII. susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 20. i 21. veljače 2020., Knjiga sažetaka, str. 160.

B. Gomaz, I. Kekez, D. Matković-Čalogović, B. Prugovečki, Kristalizacija derivata inzulina