

Kristali bioloških makromolekula

Ležaić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:106018>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-02-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Katarina Ležaić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

KRISTALI BIOLOŠKIH MAKROMOLEKULA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

28. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	7
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	8
2.1. Povijesni pregled kristalizacije bioloških makromolekula	8
2.2. Priroda kristala bioloških makromolekula.....	9
2.3. Kristalizacija bioloških makromolekula	10
2.4. Metode kristalizacije.....	12
2.4.1. <i>Metoda kristalizacije u jednom koraku (engl.batch method).....</i>	<i>13</i>
2.4.2. <i>Dijaliza.....</i>	<i>14</i>
2.4.3. <i>Metoda difuzije tekuće-tekuće.....</i>	<i>15</i>
2.4.4. <i>Metoda difuzije para</i>	<i>17</i>
2.4.5. <i>Kristalizacija u gelu.....</i>	<i>20</i>
2.4.6. <i>Metoda obrnute difuzije</i>	<i>21</i>
2.4.7. <i>Ostale metode.....</i>	<i>23</i>
2.5. Odabir uvjeta kristalizacije.....	24
2.5.1. <i>Taložni reagensi ili precipitanti.....</i>	<i>25</i>
2.5.2. <i>Aditivi.....</i>	<i>28</i>
2.5.3. <i>Čistoća i homogenost uzorka</i>	<i>29</i>
2.5.4. <i>Temperatura i temička stabilnost.....</i>	<i>29</i>
2.5.5. <i>pH.....</i>	<i>30</i>
2.6. Analiza kristala bioloških makromolekula	31
2.7. Baza kristalizacije bioloških makromolekula.....	31
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXXIV

§ Sažetak

Kristalizacija je ključan korak u određivanju trodimenzionalne strukture makromolekula metodom difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu.¹ Osim u određivanju molekulske i kristalne strukture, kristalizacija ima važnu primjenu u formulaciji kristalnih terapijskih spojeva, agrokemikalija i lijekova (npr. inzulin), u istraživanju kristalnog rasta te je jedna od metoda pročišćavanja u industrijskoj proizvodnji proteina. Ona je otkrivena prije otprilike 150 godina, a potpun razvoj doživjela je potkraj 19. i početkom 20. stoljeća. Postupak kristalizacije proteina, nukleinskih kiselina i velikih bioloških kompleksa, poput virusa i ribosoma, temelji se na uspostavi prezasićenih uvjeta u otopini koji ne utječu značajno na prirodno stanje makromolekule i pokretanju procesa nukleacije koji povlači sa sobom rast kristala. Ne postoji teorija, vodič niti izvor podataka koji sadrži „upute“ kako kristalizirati određenu makromolekulu, već su iskustvo, literaturni podatci te poznavanje osnovnih načela i metoda kristalizacije ključni za uspješnost eksperimenta.²

Prezasićenje se uspostavlja uz pomoć niza faktora koji utječu na uvjete u otopini. Ti faktori mogu biti fizikalni i kemijski. Kemijski faktori su razni taložni reagensi ili precipitanti kao što su neutralne soli, hlapljiva organska otapala i polimeri, reagensi poput deterdženata ili surfaktanata i pH. Fizikalni faktori su temperatura, tlak, viskoznost medija i brzina uspostave ravnoteže. Oni utječu na smanjenje/povećanje topljivosti, mijenjaju ionsku jakost i dielektričnu konstantu što utječe na interakcije među biološkim makromolekulama. Važni su i faktori koji utječu na strukturno stanje makromolekule, a to mogu biti metalni ioni, inhibitori, kofaktori ili druge male molekule. Postoji niz tehnika koje se koriste u procesu kristalizacije i uspostavi povoljnih uvjeta kristalizacije. Ne postoji najbolja metoda kristalizacije, no najraširenije su metode difuzije para, a zatim slijede metode kristalizacije u jednom koraku (engl. *batch method*), dijaliza i metoda difuzije tekuće-tekuće.²

§ 1. UVOD

Kristalizacija je važan korak u određivanju trodimenzionalne strukture bioloških makromolekula uz pomoć tehnika difrakcije rendgenskog zračenja.¹ Kristalizacija bioloških makromolekulska uključuje dobivanje kristala proteina, nukleinskih kiselina i velikih makromolekulskih struktura poput virusa i ribosoma.

Proces kristalizacije bioloških makromolekula uključuje sustavno istraživanje raspona individualnih parametara koji utječu na rast kristala i nalaženje uvjeta koji daju određeni kristal. Ne postoji vodič koji bi poslužio i vodio znanstvenika kroz kristalizaciju neke specifične makromolekule, no podaci o kristalizaciji sličnih makromolekula mogu pomoći u planiranju eksperimenta. Čak i kada je u pitanju manja biološka makromolekula poput mioglobina ili citokroma *c*, u pitanju su tisuće atoma s tisućama veza i stupnjevima slobode. Za enzimske komplekse i viruse molekularna težina se mjeri u milijunima Daltona, a moguće konformacije i interakcije su neprebrojive.^{2 3} Razvijanjem novih i usavršavanjem postojećih metoda kristalizacije, laboratorijske robotike i pribora koji postaje sve praktičniji i lakši za korištenje, eksperimenti postaju sve uspješniji.²

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Povijesni pregled kristalizacije bioloških makromolekula

Kristalizacija proteina otkrivena je prije više od 150 godina, a njen razvoj dogodio se tek kasnije u 19. stoljeću. Razlozi su bili potreba za određivanjem čistoće uzorka i pročišćavanja proteina iz nečistih smjesa.⁴ Friedrich Ludwig Hünfeld je bio prvi znanstvenik koji je 1840. godine dobio pločaste kristale proteina hemoglobina iz kišne gliste⁵ i to je bilo prvo objavljeno opažanje kristalizacije neke biološke makromolekule. Nakon toga od 1840. do 1853. godine vršena je kristalizacija hemoglobina iz krvi različitih vrsta. No, kristali su ostali nepoznanica sve do 1880-ih kada su Ritthausen (1880., 1881.) i Osborne (1891., 1892., 1894., 1899.) kristalizirali niz proteina iz sjemena biljaka. Bitan uspjeh je i kristalizacija albumina iz kokošjeg jajeta ili ovalbumina 1898. godine.^{2,4} Pročišćavanje i provjera čistoće uzoraka proteina su bili primarni razlozi zbog kojih su se razvile tehnike kristalizacije bioloških molekula sve do 1934. godine kada je rendgenska kristalografija predstavljena u biologiji.⁵

Kristalizacijom su 1927. godine dobiveni kristali inzulina.⁶ Sumner je 1926. pokazao da se enzimi mogu kristalizirati tako što je dobio kristale ureaze, a Northrop kristale pepsina 1929. godine. Ti uspjesi su nastavljeni te je naposljetku Sumneru i Northropu dodijeljena Nobelova nagrada iz kemije 1946. godine za otkriće da enzimi mogu kristalizirati, te za pripremu enzima i virusa u čvrstoj formi.⁶ U kasnim 1930-im godinama kristali su dobili primjenu i u rendgenskoj kristalografiji zahvaljujući Bernalu i Crowfootu, Perutzu i kolegama.⁴ 1960-ih i 1970-ih mladi znanstvenici su bili vrlo motivirani da se počnu baviti proteinskom kristalografijom. 1962. godine je dodijeljena Nobelova nagrada iz kemije Maxu Perutzu i Johnu Kendrewu za istraživanja strukture globularnih proteina mioglobina i hemoglobina.⁶ Nakon nekog vremena, javila se potreba za velikim količinama proteina za pokuse kristalizacije pa se pribjeglo metodi pripreme proteina rekombinantnom DNA tehnologijom. Kada su bile priređene dovoljne količine proteina i isti je pročišćen, moglo se krenuti s dizajnom eksperimenata kristalizacije. U slučaju dobivanja pogodnih jediničnih kristala moglo se sakupiti difrakcijske podatke i određivati trodimenzionalne molekulske i kristalne strukture makromolekule.^{2,4}

2.2. Priroda kristala bioloških makromolekula

Zanimljiva značajka kristala proteinskih makromolekula je da su oni većinom bezbojni, no oni mogu biti i obojeni tako da se zasite bojama ili ko-kristalizacijom.¹

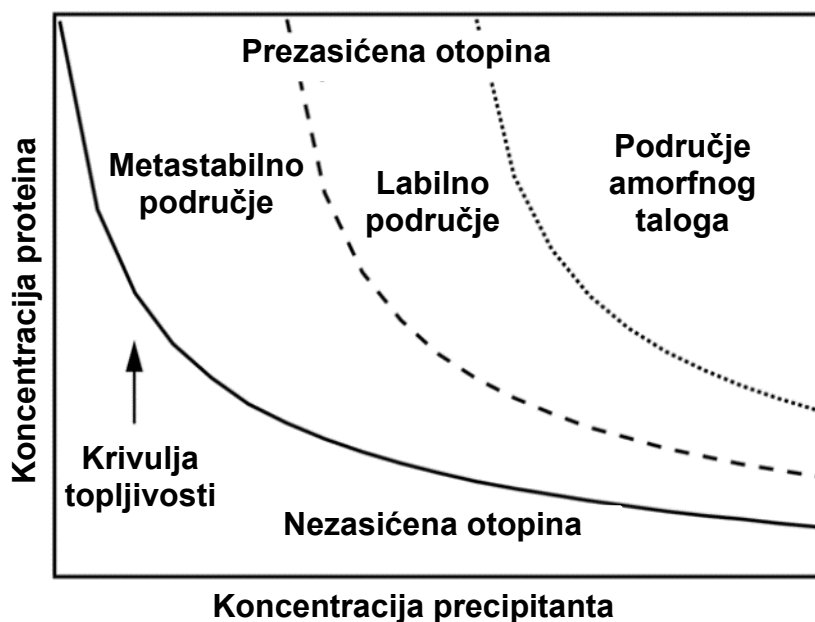
Kristali malih molekula su visoko uređeni sustavi koji su generalno tvdi i krhki, njima se lako rukuje, često su stabilni na zraku, posjeduju optička svojstva te intenzivno difraktiraju rendgensko zračenje. Kristali makromolekula su manjih veličina, mekani, lako se slamaju, nepostojani su na zraku jer se raspadaju tijekom dehidratacije i slabo difraktiraju rendgensko zračenje. Na kvalitetu kristala, njegova difrakcijska svojstva utječe slaganje bioloških makromolekula (defekti, dislokacije) kao i inkluzije, molekule vode, različiti ioni te druge nečistoće.^{2,3,7,8} Kristali bioloških makromolekula osjetljivi su na promjenu temperature i često su podložni oštećenjima nakon duže izloženosti rendgenskom zračenju. Uzrok slabe difrakcije su kanali i džepovi ispunjeni otapalom čiji volumni udio može biti od 25 do 90%.⁸ Kristali bioloških makromolekula kristaliziraju iz složenijih sustava u usporedbi s malim molekulama te imaju veći udio defekata u kristalu.³ Ovisno o kristalizacijskim uvjetima mogu nastati različiti kristalni oblici (npr. lizozim iz bjelanjca kokošjeg jajeta ima poznatu tetragonsku, rompsku, heksagonsku, monoklinsku i triklinsku kristalnu formu). Struktura bilo kojeg kristalnog materijala može se opisati jednom od 230 prostornih grupa dok kod proteinskih makromolekula imamo samo 65 mogućih prostornih grupa jer njihovi kristali ne mogu imati centar inverzije niti zrcalnu ravninu.⁵

Makromolekule su labilne i vrlo lako gube svoju nativnu strukturu te su zbog toga fiziološki uvjeti ti koji osiguravaju rast kristala i njihovu stabilnost. Kristali se uzgajaju u otopinama koje im kemijski odgovaraju, unutar uskog raspona pH, temperature i ionske jakosti. Potrebna je potpuna hidratacija kako bi molekula zadržala strukturu pa se kristali uvijek nalaze u matičnoj otopini.^{2,7,8} Molekularno-kinetički mehanizam nukleacije kristala proteina je vrlo kompleksan jer uključuje uzajamno djelovanje fizikalnih i biokemijskih faktora koji će omogućiti precizno slaganje molekula u stabilan kluster.⁵ Zbog relativno velikog prostora koji se nalazi između dvije susjedne makromolekule u kristalu i zbog toga slabijih interakcija koje djeluju među njima nego kod malih molekula, neće svaka makromolekula zauzeti jednaku orijentaciju i položaj.^{2,7,8}

2.3. Kristalizacija bioloških makromolekula

Postupak kristalizacije možemo podijeliti u tri faze. Prva faza obuhvaća otapanje proteina u prikladnom otapalu. Druga faza uključuje postizanje prezasićene otopine makromolekule i nastajanje jezgri kristalizacije. I naposljetku u trećoj fazi, dolazi do kristalnog rasta na jezgrama kristalizacije uz reduciranje prezasićenja. Mijenjajući uvjete u otopini, kristalograf pokušava prirediti kristale pri čemu može naići na nekoliko poteškoća. Prvo, ništa se ne događa odnosno ne dolazi do rasta kristala proteinske makromolekule. Drugo, pojavljuje se nova faza koja nije kristal nego amorfni talog. Treće, kristali se formiraju, no nisu prikladni za analizu rendgenskom difrakcijom.^{9,10}

Kristalizaciju ju najlakše opisati pomoću faznog dijagrama koji prikazuje stanje tvari kao funkciju neke od važnih varijabli u sustavu (koncentracija, temperatura, pH, ionska jakost, koncentracija i vrsta pufera ili bilo kojeg drugog aditiva). Najčešći oblik faznog dijagrama proteina je prikaz ovisnosti koncentracije proteina o jednom od gore navedenih parametara dok se svi ostali parametri drže konstantnima (slika 1). Krivulja topljivosti dijeli fazni dijagram na nezasićeno i prezasićeno područje. Područje prezasićene otopine dijeli se na tri regije – labilnu u kojoj počine nukleacija tj. nastaju jezgre kristalizacije i počinje rast kristala, metastabilnu u kojoj kristali rastu ali nema nukleacije, te regiju amornog taloga gdje je vrlo velika zasićenost i molekule tvore amorfne agregate (slika 1).¹¹ Kako bi se povezali fazni dijagram i proces kristalizacije možemo sustav promatrati na dva načina. Prvi je da je početni sustav nezasićen, a drugi način je da je početni sustav prezasićen. U slučaju polaska od prezasićene otopine sustav će uspostaviti ravnotežu formiranjem kristala, a ne njihovim otapanjem. Nedostatak metode je što će sustav teže uspostaviti ravnotežu. Razlog tome je kako kristali rastu njihova površina je onečišćena nečistoćama ili pogrešno orijentiranim proteinima. To s vremenom zaustavlja daljnji rast prije nego što se uopće uspostavi ravnoteža između kristala i otopine. Nečistoće se mogu ukloniti, na primjer, protresanjem uzorka, pa se rast nastavi.¹⁰



Slika 1. Dijagram topljivosti podijeljen je na četiri jasno definirana područja. Nezasićeno područje i područje prezasićene otopine razdvojeni su linijom koja označava maksimalnu topljivost pri specifičnoj koncentraciji precipitanta (krivuljom topljivosti). Linija prikazuje ravnotežu između postojeće krute faze i faze slobodnih molekula. Regija prezasićenosti je podijeljena na metastabilno, labilno i područje amornog taloga. U metastabilnom području iz jezgara nastalih nukleacijom nastaju kristali no ne događa se nukleacija. U labilnoj regiji dolazi do nukleacije tj. nastanka jezgri a iz jezgara nastaju kristali. Posljednja regija, pri vrlo visokim koncentracijama je područje amornog taloga.² Slika je preuzeta i prilagođena prema izvoru 10.

Kada je sustav nezasićen, kristalizacija nije moguća jer afinitet proteina prema molekulama vode je veći od afiniteta prema drugim molekulama proteina.⁵ Da bi nastala zasićena otopina, svojstva nezasićene otopine moraju se modificirati tako da se reducira kemijska aktivnost medija odnosno da prestane otapati makromolekulu ili se mora promijeniti neko svojstvo makromolekula da bi se smanjila njihova topljivost i/ili povećala privlačnost između njih. Nije nužno ako se prijeđe granica zasićenja da će se čvrsto stanje razviti jer je potrebna energija analogna energiji aktivacije da bi nastala druga faza to jest kristal. Jednom kada nastane stabilna jezgra, ona će rasti dok sustav ponovno ne postigne ravnotežu.²

Kako uspostaviti prezasićenost? Postupak kreće od otopine, potencijalne matičnice koja sadrži određenu koncentraciju proteina ispod njegove granice topljivosti ili na maksimalnoj topljivosti. Cilj je tada promijeniti uvjete tako da se topljivost značajno smanji i tako otopina postane prezasićena. Ovo se može izvesti na nekoliko načina:

- 1) direktno miješanje otopine proteina i precipitanta
- 2) promjena temperature
- 3) dodatak soli (povećavanje ionske jakosti), *salting out*
- 4) uklanjanje soli (snižavanje ionske jakosti), *salting in*
- 5) promjena pH
- 6) dodatak liganda
- 7) promjena dielektrične konstante
- 8) isparavanje
- 9) dodatak polimera
- 10) uklanjanje otapala kaotropnim reagensima.⁷

Glavni problem makromolekularne kristalizacije je taj što se često, zbog velikog broja nukleacija, tijekom kristalizacije formira jako puno sitnih kristala umjesto nekoliko velikih. Istraživanje nukleacije u području kristalografije je od velikog prioriteta kako bi se omogućilo kontroliranje tog procesa što bi uvelike kristalizaciju proteina učinilo uspješnijom. Kako bi se ona mogla kontrolirati treba se raditi s vrlo čistim otopinama. Na primjer, kod pokusa gdje se kapi otopine proteina drže ispod ulja, uzorci se nikada ne izlažu zraku i tako su zaštićeni od svih onečišćenja.⁵

2.4. Metode kristalizacije

Nijedna metoda kristalizacije bioloških makromolekula se ne smatra boljom od drugih. Izbor metode ovisi o tome koja se molekula želi kristalizirati, u kolikoj količini nam je potrebno prirediti kristale i s kolikom početnom količinom biološke makromolekule raspoložemo. Metoda difuzije para i *batch* metoda kristalizacije su najraširenije tehnike prvenstveno zbog svoje jednostavnosti i općenite razvijenosti metode.⁵ Često se koristi i metoda dijalize i difuzije u sustavu tekuće-tekuće. Osnovni preduvjet kod kristalizacije jeste da imamo čisti uzorak proteina. Ako se ne uklone nečistoće one mogu kompetirati rastućim kristalima i remetiti njihov rast na način da se stvaraju nespecifični agregati, mijenja se topljivost itd.⁸ Koja god se metoda koristila, uvijek je potrebna visoka koncentracija makromolekule u otopini te pažljivo odabrani

uvjeti temperature, pH, ionske jakosti i dodane tvari poput kristalizacijskog agensa, otapala, soli jer bi u krivo odabranim uvjetima moglo doći do promjene svojstava i denaturacije proteinske makromolekule.²

2.4.1. Metoda kristalizacije u jednom koraku (engl. batch method)

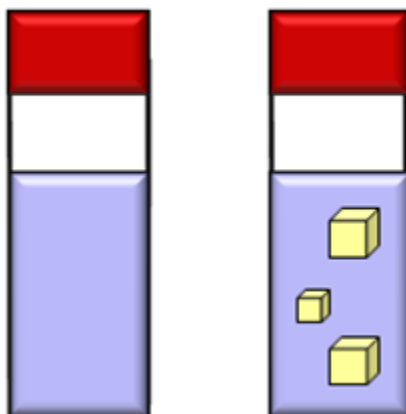
Metoda kristalizacije u jednom koraku je najjednostavnija tehnika kristalizacije bioloških makromolekula. Njen postupak je miješanje otopine makromolekule s kristalizacijskom otopinom dok se ne postigne prezasićenje te se otopina ostavi stajati (slika 2). Ovakav način se koristi za uzgajanje kristala bioloških makromolekula u volumenu od jednog mililitra do nekoliko mikrolitara. Velike kristale je moguće uzgojiti kada je stupanj prezasićenja blizu metastabilnog područja faznog dijagrama otopine. Metoda se može izvesti i na način da se uzorci raspodjeljuju i inkubiraju ispod ulja koji sprječava isparavanje i nekontrolirane promjene u koncentraciji komponenta u mikrokapljicama. Takva metoda se zove *microbatch* metoda (slika 3).¹¹

Zbog nepostojanja kontakta između matične otopine i bilo koje čvrste površine dolazi do smanjenog broja nukleacija i time većih kristala. *Batch* metoda može biti izvedena i pod visokim tlakom i pri termalnom gradijentu sa uzorcima od približno 7 mikrolitara smještenih u mikroeprovete te općenito omogućava kristalizaciju baziranu na termonukleaciji. Takvi načini kristalizacije omogućuju vrlo brzo određivanje optimalnih uvjeta temperature za kristalizaciju i često se formiraju kristali dobre kvalitete za difrakcijsku analizu.⁸

Da se uzgoje kristali pogodni za difrakciju, moraju biti ispunjeni uvjeti: nukleacija mora početi za vrijeme preparacije kapljice kada relativno visoke koncentracije proteina i kristalizacijske otopine dođu u kontakt i nakon miješanja otopina mora biti u metastabilnoj zoni koja garantira uređeni rast. Unatoč tome što je isparavanje vode iz kapljice prekrivene uljem neznatno ono se ipak događa i s vremenom volumen kapljice se smanjuje što rezultira povećanjem koncentracije proteina i ostalih tvari u otopini što može dati kristale tih tvari ili proteina.¹¹

Glavna mana ove metode je da se u mnogim slučajevima ravnoteža uspostavi vrlo brzo i to utječe na brzinu rasta kristala i posljedično na kvalitetu. Alkoholi, deterdženti i lipidi mogu difundirati u ulje. Da se spriječi presušivanje kapljica tijekom dužeg perioda, moguće je kontrolirati smanjenje volumena regulirajući tlak para unutar kristalizacijske posudice. S druge

strane, različitim omjerom propusnih ulja za kontrolu difuzije vode, moguće je postići bržu kristalizaciju.¹¹



Slika 2. *Batch* metoda. Otopina proteina i kristalizacijske otopine u uvjetima prezasićenja je zatvorena i ostavljena da stoji.¹¹



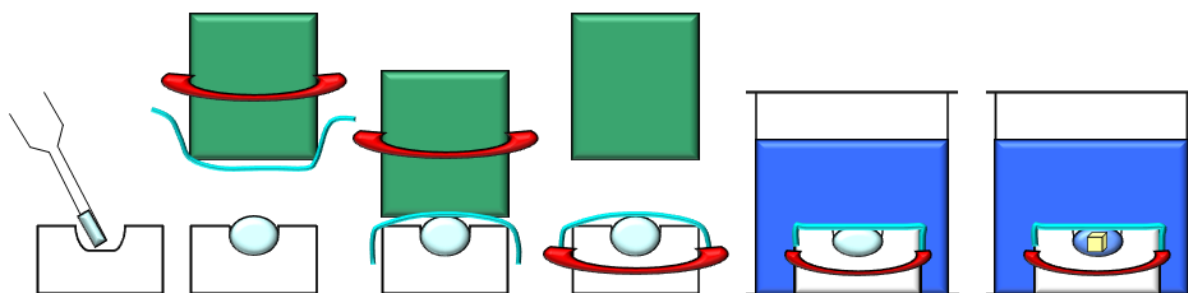
Slika 3. *Microbatch* metoda. Mala kapljica koja sadrži protein i kristalizacijsku otopinu u prezasićenim uvjetima smještena je ispod ulja kako bi se spriječilo isparavanje uzorka.¹¹

2.4.2. Dijaliza

U ovoj metodi je makromolekula odvojena od velikog volumena kristalizacijske otopine polupropusnom membranom koja dopušta prolaz malim molekulama, ali ne i makromolekulama. Difuzijom molekula kroz membranu uspostavlja se prezasićenje i makromolekula kristalizira. Ravnotežna kinetika ovisi o molekulskoj masi molekula koje membrana propušta, omjeru koncentracija tvari unutar i van ćelije gdje se nalazi makromolekula, temperaturi, viskoznosti otopine i geometriji ćelije za dijalizu.^{8,11}

Najjednostavnija tehnika koristi vrećicu za dijalizu (unutarnjeg promjera od 2 mm), no za nju je potrebno najmanje 100 mikrolitara otopine makromolekule po eksperimentu. Kristalizacija dijalizom je adaptirana i na male volumene (10 mikrolitara ili manje) u ćelijama za mikrodijalizu napravljenim od kapilarnih cjevčica zatvorenih membranom ili poliakrilamidnim gelom poznatije pod nazivom *Cambridge button*. U takvoj ćeliji uzorak se smjesti unutar male komorice na vrhu nosača koja može primiti volumen od 5 do 100 mikrolitara. Uzorak se prekrije s odgovarajućom membranom i onda se stavi na rezervoar koji sadrži otopinu s tvarima za kristalizaciju (slika 4). Tom metodom moguće je promijeniti sastav rezervoara tako da se nosač premješta iz jednih uvjeta u druge i pruža mogućnost recikliranja uzoraka sve dok se ne uspostave povoljni uvjeti za rast kristala. Ova metoda ne funkcionira sa koncentriranim otopinama polietilen glikola (PEG) jer one imaju tendenciju odvlačenja vode iz nosača i onemogućuje promjenu koncentracije proteina.¹¹

U postupku dvostruke dijalize, brzina uspostave ravnoteže je reducirana što rezultira poboljšavanjem uvjeta kristalizacije. Brzina uspostave ravnoteže može se modelirati odabirom pogodne membrane u smislu molekularne mase za koju je propusna, razmakom između membrana ili relativnim volumenima. Nosač je smješten unutar rezervoara koji sadrži određenu koncentraciju kristalizacijskih agensa, rezervoar je zatvoren membranom te je smješten u drugi rezervoar s većom koncentracijom kristalizacijskih agensa.⁸



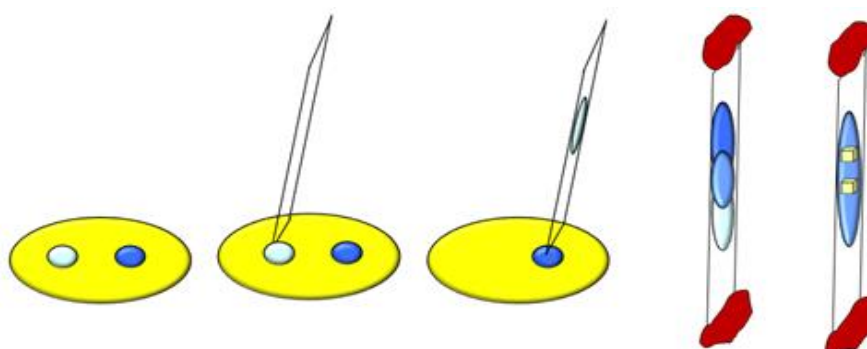
Slika 4. Metoda mikrodijalize. Kapljica otopine proteina smješta se na nosač koji je prekriven membranom za dijalizu i zatvoren. Nosač se stavlja u kristalizacijsku otopinu čije molekule prolaze kroz membranu do uspostave ravnoteže.¹¹

2.4.3. Metoda difuzije tekuće-tekuće

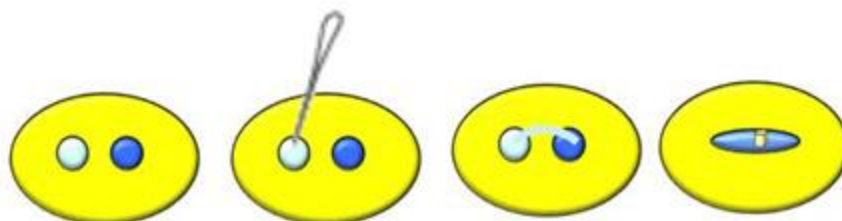
Ova tehnika se temelji na pažljivom raslojavanju otopine s tvarima za taloženje (precipitantima) tj. kristalizacijske otopine i koncentrirane otopine proteina u kapilari čiji su krajevi zatvoreni voskom. Uski promjer kapilare minimizira miješanje. Kada otopine dođu u kontakt i počnu se

miješati, regija otopine proteina koja je susjedna dodirnoj točki kristalizacijske otopine postaje prezasićena i nastaju idealni uvjeti za nastanak nukleacije. Kako vrijeme odmiče tako dvije otopine međusobno difundiraju duž osi kapilare, međusobno se razrjeđuju, tako otapaju manje jezgre i stvaraju veće jezgre nukleacije i na taj način ova metoda omogućuje nastanak kvalitetnih velikih kristala (slika 5).¹¹

Nedostatak ove metode je taj što je potreban velik volumen uzorka i problem stvara razlika u gustoći otopina. Razlika gustoća se djelomično može riješiti tako da se otopina veće gustoće stavi na dno ili da se jedna od otopina zaledi. Uobičajeno je da se kapilara napuni kristalizacijskom otopinom (otopinom s precipitantima) i izloži temperaturi od 193 K. Jednom kad je otopina potpuno smrznuta, kapilara se stavi u kadu sa suhim ledom i potom se doda uzorak proteina. Zatim se sustav pusti da se uravnoteži na željenoj temperaturi. Varijanta metode difuzije tekuće-tekuće je metoda tekućeg mosta u kojoj se kapljica uzorka proteina i kapljica kristalizacijske otopine stave blizu jedna druge na pokriveno stakalce i povežu se tankim tekućim mostom uz pomoć igle (slika 6). Difuzija tekućina između kapljica, zaštićena od zraka, može inducirati rast kristala.¹¹



Slika 5. Metoda difuzije tekuće-tekuće. Otopina proteina i kristalizacijska otopina dolaze u međusobni kontakt u kapilari koja je zatvorena voskom. Na površini dodira one se miješaju, stvaraju se uvjeti prezasićenja i potiče se nukleacija.¹¹



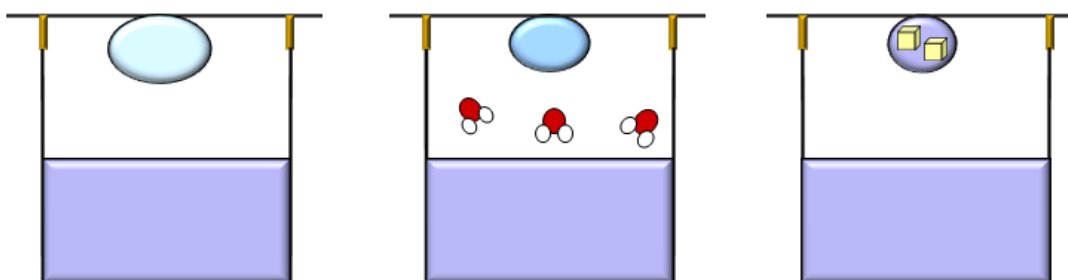
Slika 6. Metoda tekućeg mosta. Kapljica koja sadrži otopinu proteina i kapljica koja sadrži kristalizacijsku otopinu povezuju se tankim tekućinskim mostom.¹¹

2.4.4. Metoda difuzije para

Ova metoda koristi difuziju para otapala između kapljice koja sadrži otopinu makromolekule i kristalizacijsku otopinu te rezervoara (spremnika) koji sadrži kristalizacijsku otopinu, ali veće koncentracije u odnosu na kapljicu.¹¹ Za ovu metodu potrebni su mali volumeni (0,5 – 10 mikrolitara) otopine proteina. Sve inačice ove metode se svode na to da se tlak para kapi koja sadrži otopinu makromolekule i kristalizacijsku otopinu uravnotežuje s tlakom para kristalizacijske otopine u rezervoaru čija je koncentracija veća od one u kapljici. Uspostavljanje ravnoteže se vrši na način da vrste koje mogu ispariti isparavaju sve dok tlak pare kapljice ne bude jednak onom u rezervoaru. Ako dolazi do izmjene vode (ili organskog otapala) iz kapljice u rezervoar, i ako je na primjer početna koncentracija soli u rezervoaru veća nego u kapi, volumen kapljice se smanjuje pa se koncentracija makromolekule u njoj se povećava, dolazi do prezasićenja i rasta kristala u kapljici (slika 10).⁸ Od aparature koriste se pločice s rezervoarima koje se zatvaraju silikoniziranim stakalcima pomoću vakuumske masti, poklopcem ili trakom. Metodom difuzije para može odjednom iskušati velik broj kristalizacijskih uvjeta tako da se mijenja sastav kristalizacijske otopine svakog rezervoara ili povećanjem/smanjenjem koncentracije proteina i mijenjanjem volumena proteina pomiješanim s kristalizacijskom otopinom iz rezervoara kada se postavi kapljica. Postoji više tehnika izvođenja ove metode. Kapljica može biti smještena da visi, da sjedi ili da je u sendviču.¹¹

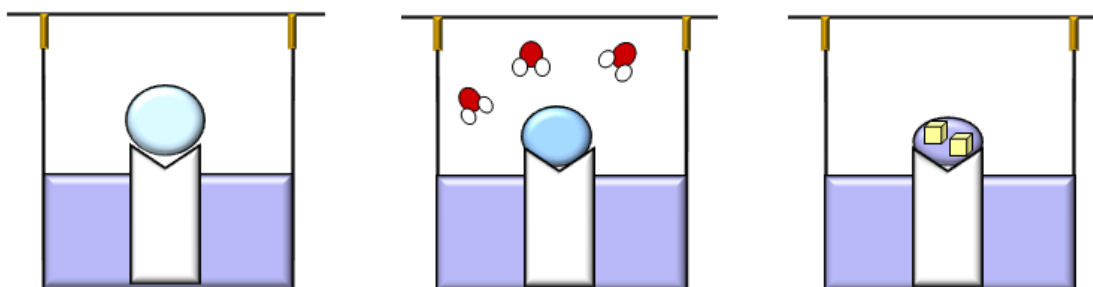
U metodi difuzije para iz viseće kapljice kapljica se smješta na silikonizirano stakalce kojim se pokrije spremnik s kristalizacijskom otopinom tako da kapljica visi nad spremnikom i stakalce se nad spremnik učvrsti pomoću silikonske masti (slika 7).¹¹ Često se za ovu tehniku koriste *Linbro* ploče koje inače služe za kulturu tkiva. *Linbro* ploče sadrže 24 spremnika s volumenom od oko 2 mililitra i unutarnjeg promjera od 16 milimetra. Nad svaki spremnik se

stavi silikonizirano stakalce promjera 22 milimetra. Postupak pripreme uzorka je da se pomiješa određeni volumen otopine makromolekule s isto tolikim volumenom kristalizacijske otopine i smješta na silikonizirano stakalce. Volumen kapljice ne smije prelaziti 35 mikrolitara kako nebi pala sa stakalca u otopinu u rezervoaru. Ako se u kapljici ne primijete kristali ili nastajanje taloga nije postignuta dovoljna zasićenost ili je moguće da je moći postići samo metastabilno stanje. Ako nema kristalizacije koncentracija taložnog agensa u rezervoaru mora biti povećana.⁸



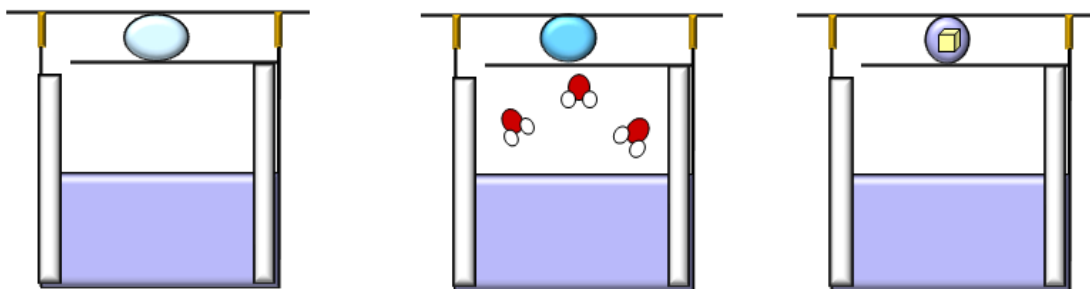
Slika 7. Metoda difuzije para iz viseće kapi. Kapljica se smješta na silikonizirano stakalce koje služi za zatvaranje spremnika.¹¹

U tehnici difuzije para iz sjedeće kapi kapljica se smješta na plastični ili stakleni nosač koji se nalazi iznad površine otopine spremnika (slika 8).¹¹ Sjedeće kapi mogu se staviti i na mikromostove ili poduprijeti plastičnim stupovima u središtima spremnika. Otopine spremnika nalaze se u spremnicima u koje su postavljeni mikromostovi ili potporni stupovi. Pločice s 96 spremnika zatvorenih s bezbojnom trakom pogodne su za velike kapljice i mogu se koristiti za *screening* i optimizaciju uvjeta kristalizacije.⁸



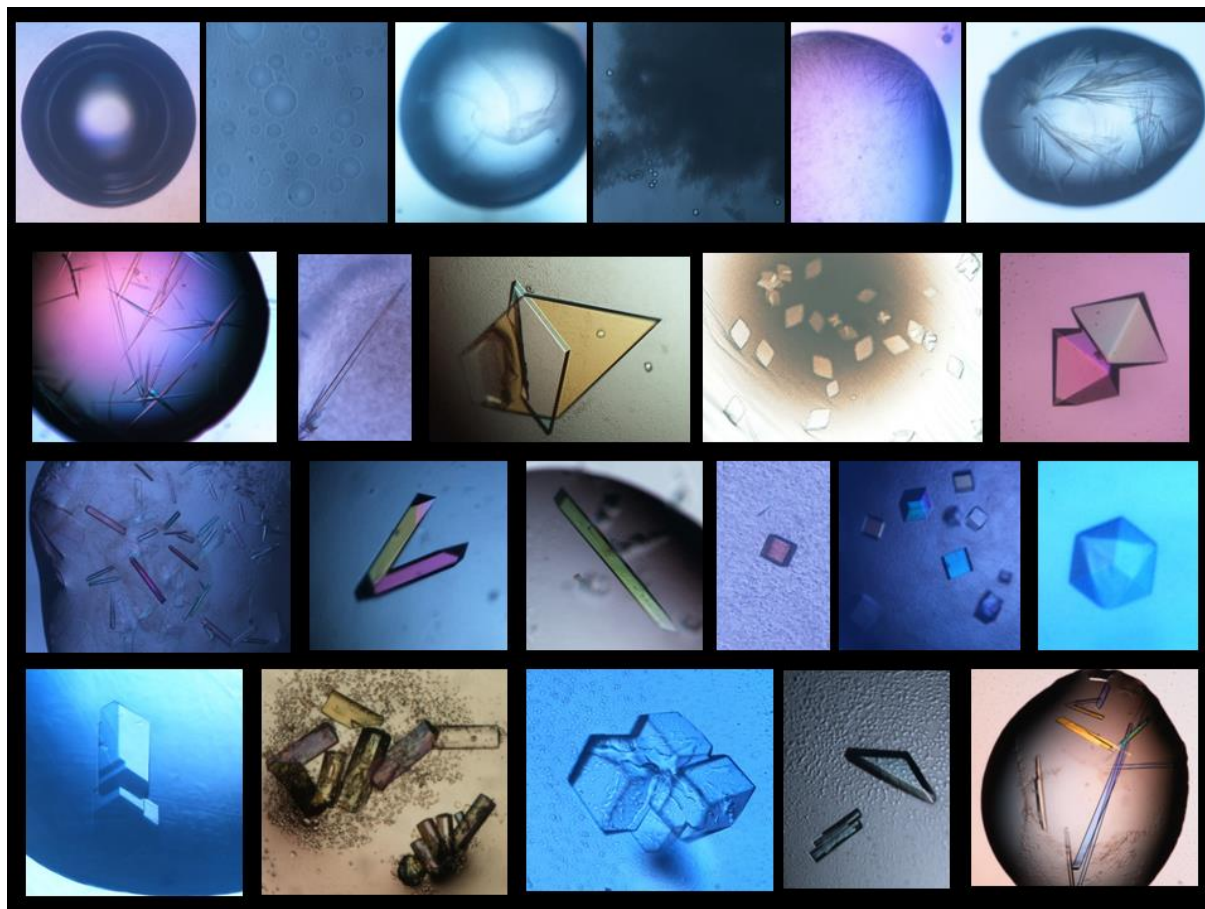
Slika 8. Metoda difuzije para iz sjedeće kapi. Kapljica se smješta na mali most unutar spremnika.¹¹

Sendvič tehnika je ona u kojoj se kapljica biološke makromolekule pomiješa s kristalizacijskom otopinom i smješta između dva poklopca od kojih jedan zatvara spremnik (slika 9). Ova metoda ima prednost što je površina kapljice manja, smanjuje se brzina isparavanja otapala iz kapljice te se usporava proces uspostavljanja ravnoteže.¹¹



Slika 9. Sendvič metoda. Kapljica se smješta između dva poklopca, od kojih jedan zatvara spremnik.¹¹

Kristalizacijska tehnika u kojoj se kapljice nalaze u okomitim staklenim cjevčicama zatvorenim sa staklenim poklopcima poznata je pod nazivom *plug-drop* dizajn. Takve jedinice se postavljaju u spremnike *Linbro* pločica okružene kristalizacijskom otopinom te se spremnici zatvore. Ovom tehnikom kristali ne nastaju na poklopcu već na stijenkama cjevčica. Ovakva tehnika je pogodna za krhke kristale kod kojih može doći do nastanka oštećenja pri premještanju iz kristalizacijskih ćelija u kapilare za difrakciju. Mogućnost variranja pH u spremniku omogućava podešavanje pH u kapljicama. Tehnika sjedećih kapi također je prikladna za epitaksični rast makromolekularnih kristala na mineralnim matricama i drugim površinama.⁸ Na slici 10 prikazano je nekoliko primjera kristalizacijskih kapljica s produktima kristalizacije koji su nastali kristalizacijom raznim metodama difuzije para.



Slika 10. Nekoliko primjera kristalizacijskih kapljica s produktima kristalizacije.¹¹

2.4.5. Kristalizacija u gelu

Budući da konvekcija ovisi o viskoznosti, kristalizacija u gelovima u suštini predstavlja medij bez konvekcije. Zbog toga kvaliteta kristala može biti dosta poboljšana kada su uzgojeni u gelu.⁷ U upotrebi su gelovi poput agaroze, silikagela, akrilamida i *sephadexa*.¹¹ Kod silikagela moguće je korištenje raznih sredstava za kristalizaciju uključujući soli, organska otapala i polimere poput polietilen glikola.⁸ Agarozni gelovi su najčešće korišteni jer je agarozna stabilna u širokom rasponu pH vrijednosti (3,0-9,0), ne otpušta nikakve nusprodukte tijekom skrućivanja i ima nisku temperaturu geliranja (oko 28°C) što omogućuje njezinu upotrebu i u prisutnosti makromolekula osjetljivih na toplinu. Također, ona pruža visoku mehaničku otpornost i elastičnost čak i pri niskim koncentracijama agaroze (< 6% w/v) što služi kao mehanička zaštita za kristale. Hidrogelovi općenito pružaju zaštitu tijekom rukovanja kristalima i transportu, a ne utječu na kvalitetu difrakcijskih podataka (oni su potpuno prozirni za rendgensko zračenje).¹¹

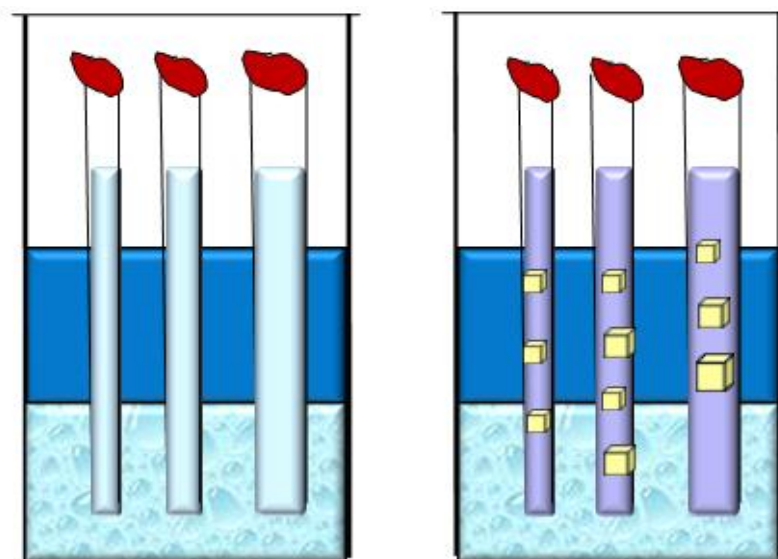
Metoda uzgoja kristala u gelu omogućuje dobru kontrolu pH, temperature i nukleacije te smanjuje postotak oštećenja kod rasta kristala. Jezgre nukleacije se formiraju zarobljene u porama gela. Takvo stabilno okruženje može pogodovati visokoj uređenosti u kristalu i dati kristale koji su manje mozaični i koji imaju manje uklopljenih nečistoća. Prezasićenje u zrncu gela može se kontrolirati promjenom kristalizacijskog agensa i/ili koncentracije proteina u glavnoj otopini, te to omogućuje promjenu brzine nukleacije i rezultira velikim kristalima koji su homogeno raspoređeni u gelu.^{8,11}

U najuspješnijim pokušajima korištenja ove metode dogodila se izravna difuzija gdje je kristalizirajući agens difundirao u gel koji sadrži proteine, ili obrnuto. Nukleacija i rast kristala događaju se sporo, broj nukleacija je manji pa je veličina kristala veća. Na primjer, potvrđeno je da silikagel djeluje kao inhibitor nukleacije lizozima. U agaroznim gelovima, efekt je obrnut. Gel stimulira nukleaciju i kod lizozima kristalizacija je povezana sa stvaranjem klustera. Kristali koji se uzgajaju u gelovima zahtijevaju posebne metode prebacivanja u kapilare za sakupljanje difrakcijskih podataka. Rast u gelu, upravo zbog toga što suzbija konvekciju, korisna je tehnika za analizu gradijenta koncentracije oko rastućih kristala interferometrijskim tehnikama.⁸ Još jedna prednost ove metode je da kristali bolje difraktiraju zračenje u usporedbi s kristalima koji su uzgojeni u otopini, no ne koristi se toliko često jer je kompliciranija od drugih metoda i zahtijeva velike količine uzorka.¹¹

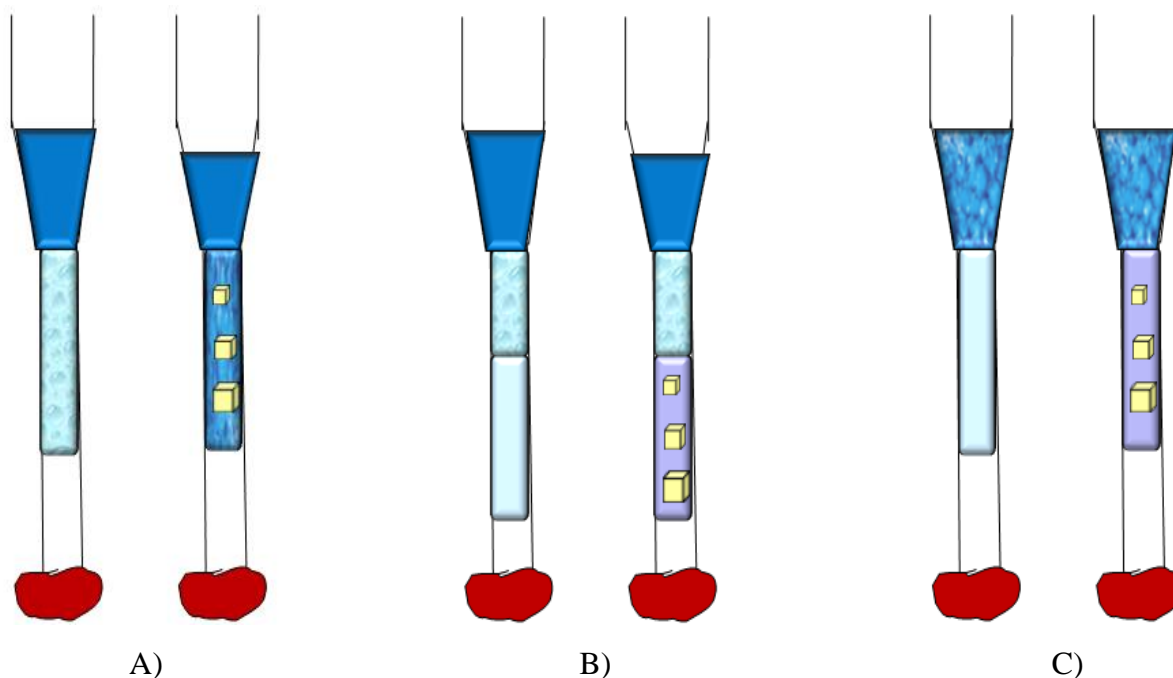
2.4.6. *Metoda obrnute difuzije*

Čepovi od gela se generalno koriste da bi se odvojila otopina proteina od otopine s kristalizacijskim agensima jer u protivnom bi trebalo jednu od otopina najprije gelirati pa unijeti u kapilaru. Taj postupak se poboljšao na način da se razvila metoda "gel-akupunkture". U toj metodi koristi se mala kristalizacijska posudica koja sadrži neki od gelova navedenih kod prošle metode. Kapilara se napuni otopinom proteina i jedan njen kraj se zapečati voskom ili glinom, dok se drugi fiksira u gelu 6-7 milimetara dubine. Zatim se gel prekrije slojem kristalizacijske otopine. Naposljetku okvir za rast drži se u zatvorenom okruženju pri konstantnoj temperaturi (slika 11). Kada kristalizacijska otopina prodire u kapilaru, postiže se visoko prezasićenje i mogu se formirati amorfne forme ili mikrokristali. Kako se prezasićenje smanjuje, kristali postaju veći i kvalitetniji. U kapilari je postignut gradijent koncentracije koji uzrokuje da u različitim točkama kapilare, kristali rastu pri različitoj koncentraciji. Postupak difuzije jako ovisi o debljini kapilare.¹¹ Tako u dijelovima gdje je koncentracija najveća, blizu površine gela,

nastaju mikro kristali, a tamo gdje je manja nastaju veći kristali.² Alternativan postupak je da se otopina za geliranje dodaje izravno u otopinu makromolekule i takva smjesa se usisa u kapilare (slika 12). Kada uzorak molekule poprimi gelastu strukturu, koncentrirana kristalizacijska otopina se izlije na vrh izravno ili se odvoji malim volumenom gela ili se donji kraj kapilare namoči u malu posudu gdje se nalazi kristalizacijska otopina.¹¹



Slika 11. Metoda "gel-akupunture". Kapilare različitih promjera napunjene otopinom proteina stave se u gel koji je prekriven kristalizacijskom otopinom koja prodire kroz gel do otopine proteina.¹¹



Slika 12. Tehnike obrnute difuzije. U svim slučajevima kristalizacijska otopina difundira u otopinu proteina kroz gel. A) Otopina proteina je gelirana i kristalizacijska otopina prekriva njegovu površinu. B) Protein i kristalizacijska otopina su odvojeni malim volumenom gela. C)

Kristalizacijska otopina i gel se pomiješaju i oni su u kontaktu s otopinom proteina.¹¹

2.4.7. Ostale metode

Postoje metode u kojima se odvija kristalizacija u specifičnim fizikalnim uvjetima poput visokog tlaka, pri levitaciji, magnetskom ili električnom polju ili mikrogravitaciji. Učinci koji se dobivaju ovim metodama su višestruki. Na primjer, tlak može mijenjati konformaciju makromolekule, magnetsko polje utječe na orijentaciju, električno polje na nukleaciju, a mikrogravitacija može suzbiti konvekciju. Takve tehnike mogu dakle potaknuti nastanak novih oblika kristala i možda čak i poboljšati kvalitetu istih. Temperatura također može potaknuti nukleaciju bez obzira na metodu koja se koristi. Kristalizacija pod utjecajem promjene temperature mora biti vrlo kontrolirana, no često je ipak neočekivana posljedica uslijed nekontroliranih oscilacija temperature okoline u kojoj se kristal uzgaja.⁸

2.4.8. Cijepljenje (engl. *seeding*)

Često je potrebno ponovno uzgojiti prethodno nastale kristale zbog nedovoljne kvalitete dobivenih, na primjer, ako su premali ili sadrže defekte. U tom slučaju poželjno je inducirati rast na niskim razinama prezasićenja. To se postiže cijepljenjem (engl. *seeding*) metastabilne,

zasićene otopine ranije uzgojenim kristalima. Tehnike cijepjenja dijele se u dvije kategorije. Prva kategorija obuhvaća tehnike koje koriste mikrokristale, a druga tehnike koje uključuju makrokristale. Pripravljena otopina za cijepjenje treba biti malo zasićena kako bi kristal rastao sporo i kontrolirano.^{2,8}

Kao klica mogu se koristiti premali kristali, odlomljeni kristali ili proteinski kristali mutanta. Kod cijepjenja mikrokristalima treba paziti da se ne unese previše jezgara u pripravljenu zasićenu otopinu jer će to rezultirati velikim brojem novih kristala od kojih nijedan neće biti dovoljno dobre kvalitete za difrakcijsku analizu. Kako bi se to spriječilo, otopina mikrokristala se razrjeđuje serijski u vrlo širokom rasponu. Neki uzorci će imati više od jednog mikrokristala po mikrolitru dok će drugi imati nekoliko puta više ili ih uopće neće imati. Alikvot od 1 mikrolitara svakog uzorka u nizu se dodaje pripremljenim uzorcima za novu kristalizaciju. Otopine koje sadrže previše mikrokristala za cijepjenje dat će mikrokristale, a otopine koje imaju prenisku koncentraciju ‘’sjemena’’ uopće neće proizvesti kristale.^{2,8}

Drugi pristup obuhvaća kristale dovoljno velike da se mogu promatrati pod svjetlosnim mikroskopom. Ako se koristi jedan veliki kristal moguće je da se na njegovoj površini nalaze mikrokristali koji se mogu prenijeti u novu otopinu zato se makrokristal ispiru tako da prođe kroz niz različitih otopina. Odaberu li se otopine pravilno, neće se ukloniti samo mikrokristali nego može doći i do određenog stupnja otapanja površine makrokristala što rezultira osvježavanjem površine i poticanjem novog rasta kada se kristal stavi u novu otopinu proteina. Cijepjenje je korisna tehnika za induciranje rasta kristala ili nukleacije i rasta pri nižem stupnju zasićenosti nego li bi se pojavilo spontano.^{2,8}

2.5. Odabir uvjeta kristalizacije

Najteža stvar kod kristalizacije bioloških makromolekula je identifikacija kemijskih, biokemijskih i fizikalnih uvjeta koji daju specifični kristal zato što ne postoji „recept“ ili barem indikacija za uzgoj kvalitetnih kristala. Pronaći optimalne uvjete je važno kako bi proteinske makromolekule bile homogeno raspršene unutar otopine te formirale stabilnu jezgru nukleacije. Jednom kada se dogodi nukleacija kristali spontano rastu. Prema tome, može se reći da je nukleacija ključan korak koji određuje razliku između uspjeha i neuspjeha kristalizacije.⁵ Kako bi eksperiment bio što uspješniji variraju se različiti kristalizacijski uvjeti: pH i temperatura i drugi (vidi tablicu 1.). Jednom kada se pojave kristali, makar mikrokristali, počinje optimizacija kristalizacijskih uvjeta.²

Tablica 1. Faktori koji utječu na kristalizaciju. Tablica je preuzeta i prilagođena prema izvoru 8.

Fizikalni faktori	Kemijski faktori	Biokemijski faktori
Temperatura	pH	Čistoća ili nečistoća makromolekule
Površina	Vrsta kristalizacijskog agensa	Ligandi, inhibitori, efektori
Gravitacija	Koncentracija kristalizacijskog agensa	Posttranzicijske modifikacije
Tlak	Ionska jakost	Izvor makromolekule
Vrijeme	Specifični ioni	Proteoliza ili hidroliza
Vibracije, zvuk i mehaničke preturbacije	Stupanj prezasićenja	Genetska modifikacija
Električno ili magnetsko polje	Redukcijsko ili oksidacijsko okruženje	Stabilnost makromolekule
Dielektrična svojstva medija	Koncentracija makromolekule	Izoelektrična točka
Viskoznost medija	Metalni ioni	Podrijetlo uzorka
Brzina uspostave ravnoteže	Poliatomni ioni	
Homogenost ili heterogenost otopine makromolekule	Deterdženti, surfakanti ili amfofili	
	Nemolekularna onečišćenja	

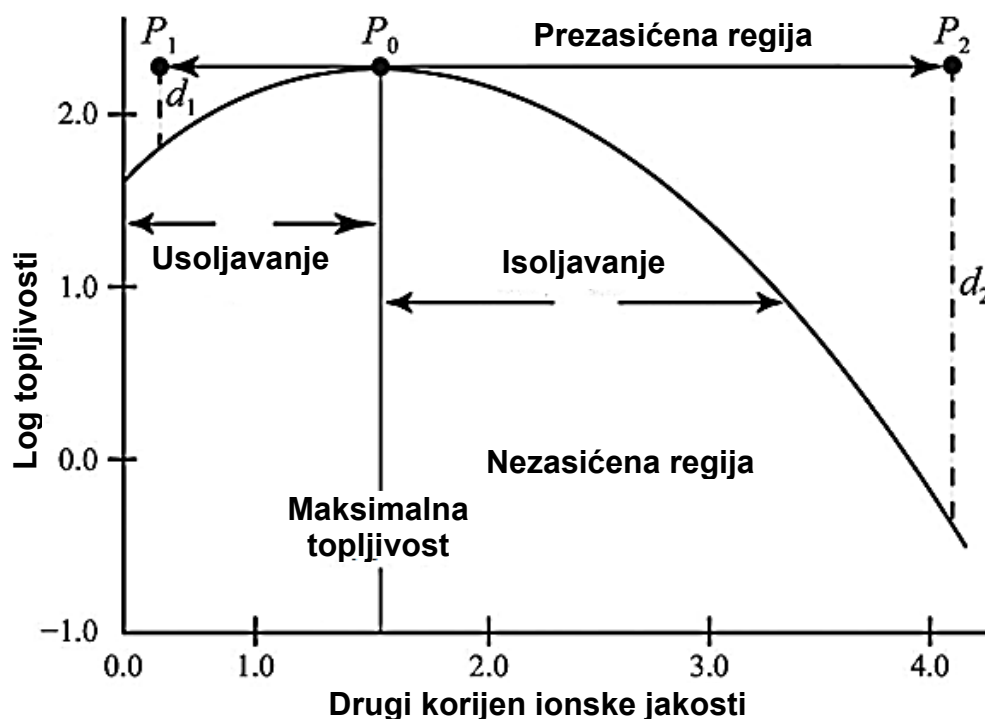
Mnogo je čimbenika koji utječu na kristalizaciju bioloških makromolekula, a velik dio njih je prikazan u Tablici 1. Oni mogu utjecati na brzinu i vjerojatnost nukleacije, brzinu rasta kristala i na krajnju veličinu i kvalitetu kristala. Parametri od velikog značaja su pH, koncentracija dodanih taložnih reagensa, prisutnost ili odsutnost liganda ili inhibitora, raznolikost soli i pufera, tehnika koja se koristi za uspostavu ravnoteže, temperatura i prisutnost deterdženata. Manje važni čimbenici su utjecaj gravitacije, električnog i magnetskog polja te viskoznost.²

2.5.1. Taložni reagensi ili precipitanti

Taložni reagensi (precipitanti) su spojevi koji reduciraju topljivost proteina. Oni jačaju interakcije među biološkim makromolekulama i djeluju tako da mijenjaju kemijsku aktivnost vode ili dielektričnu konstantu otapala. Taložni reagens može modificirati ili stabilizirati proteinske konformacije, ometati interakcije među proteinima ili između proteina i otapala, utjecati na različite faze kristalizacije i promijeniti površinsku energiju kristala.¹¹ Oni se dijele

u četiri kategorije: soli, organska otapala, dugolančani polimeri i polimeri malih molekulskih masa (vidi tablicu 2.). U prve dvije klase se ističu amonijev sulfat i etanol, a u trećoj kategoriji se ističu polimeri poput polietilen glikola 4000. U četvrtoj kategoriji su spojevi nalik 2-metil-2,4-pentandiolu (MPD) i polietilen glikolu (PEG) manjih molekulskih masa.^{2,8} Male organske molekule povećavaju elektrostatske interakcije dugog dosega tako što smanjuju dielektričnu konstantu, i mogu modificirati hidrofobni efekt.¹¹

Soli kompetiraju proteinima za molekule vode i tako ih dehidriraju. Može se reći da se događa kompeticija između iona soli (aniona) i makromolekule za vezanje molekula vode koje su ključne za održavanje topljivosti. Pri relativno visokim koncentracijama soli, makromolekule se povezuju međusobno. Neki ioni iz soli, uglavnom kationi, također su nužni da bi se osigurala topljivost makromolekula. Pri vrlo niskoj ionskoj jakosti, koncentracija kationa nije dovoljna da bi se održala topljivost molekule i onda se pod tim uvjetima mogu formirati kristali (slika 13). Može se zaključiti da je mjera učinkovitosti soli kod kristalizacije proteina ionska jakost. Zbog toga su polivalentni ioni (posebno anioni poput sulfata, citrata i fosfata) najučinkovitiji agensi za kristalizaciju.² Pored dehidratacije ili smanjenja kemijske aktivnosti vode, različite soli različito utječu i na kvalitetu kristala te difrakcijsku moć kristaliziranog proteina.^{2,8}



Slika 13. Krivulja ovisnosti topljivosti o ionskoj jakosti. S jedne strane, topljivost se eksponencijalno smanjuje s povećanjem ionske jakosti, te se ovaj efekt naziva izoljavanje (engl. *salting-out*). Efekt izoljavanja posljedica je kompeticije iona u otopini s nabijenim skupinama površine proteina za molekule otapala. S druge strane, topljivost također ima minimum pri vrlo niskoj ionskoj jakosti (usoljavanje, engl. *salting-in*). Slika je preuzeta i prilagođena prema izvoru 2.

Polietilen glikoli (PEG) su polimeri različitih duljina. Oni niskih molekularnih masa su uljaste tekućine, a one s višom molekularnom masom od 1000 postoje kao tvari slične vosku ili u prahu na sobnoj temperaturi.⁸ Zbog velikih molekularnih masa ne ulaze u kristale, te osim efekta isključenja volumena koji potiču izdvajanje makromolekula iz otopine, PEG-ovi dijele karakteristike sa solima koje kompetiraju za vodu i također uzrokuju dehidraciju, te s organskim otapalima koja smanjuju dielektrična svojstva medija.² Oni također imaju prednost u učinkovitosti pri minimanoj ionskoj jakosti što je važno kako bi se omogućio bolji afinitet vezanja liganda nego što se veže medij velike ionske jakosti. To olakšava dobivanje derivata proteina s teškim atomima i stvaranja kompleksa protein-ligand. Za razliku od proteina nemaju konzistentnu konformaciju, uvijaju se i savijaju nasumično, i u otopini zauzimaju više prostora

nego što im je pruženo.⁸ Kristalizacija proteina uz polietilen glikol pokazala se nauspješnijom kada je ionska jakost mala. Ako se kristalizacija odvija prebrzo, mogu se upotrijebiti neutralne soli kako bi se rast usporio. PEG se može koristiti u cijelom rasponu pH i širokom temperaturnom području.²

Tablica 2. Taložni reagensi (precipitanti) koji se koriste u makromolekulske kristalizaciji. Tablica je preuzeta i prilagođena prema izvoru 2.

Soli	Hlapljiva organska otapala	Polimeri
Amonijev sulfat	Etanol	Polietilen glikol ($M_r = 1000, 3350, 6000, 8000, 20000$)
Amonijev fosfat	Propanol	<i>Jeffamin T, Jeffamin M</i>
Litijski sulfat	Izopropanol	Polietilen glikol monometil ester
Litijski klorid	Dioksan	Polietilen glikol monostearat
Natrijski citrat	Aceton	Polienamin
Amonijev citrat	Izobutanol	
Natrijski fosfat	<i>n</i> -Butanol	
Natrijski klorid	<i>tert</i> -Butanol	
Kalijev klorid	Acetonitril	
Natrijski acetat	Dimetil sulfoksid	
Magnezijski sulfat	1,3-Butirolakton	
Kalcijev klorid		
Natrijski formijat		
Natrijski tartarat		
Kadmijev sulfat		
Natrijski sukcinat		
Natrijski malonat		

2.5.2. Aditivi

Neki od aditiva koji se koriste su polihidroksilni alkoholi poput glicerola, šećeri, zatim aminokiseline ili metilaminokiseline. Redukcijski reagensi, poput glutationa ili 2-merkaptioetanol, koji sprječavaju oksidaciju i neki kelatni spojevi, poput EDTA, koji štite proteine od teških ili prijelaznih metala također mogu biti jako važni aditivi. Inkluzija ovakvih

spojeva u procesu kristalizacije je poželjna kada treba puno vremena da dođe do završetka kristalizacije. Ukoliko se kristalizacija provodi pri sobnoj temperaturi u polietilen glikolu ili drugim otopinama niske ionske jakosti, potrebno je spriječiti rast mikroba jer mogu lučiti enzime koji mogu utjecati na integritet ispitivane makromolekule.⁸

Supstrati, kofaktori, inhibitori i metalni ioni mogu utjecati na makromolekulu tako da ona poprimi kompaktniju i stabilniju formu.^{8,9} Viši stupnjevi strukturne homogenosti se mogu postići tako da se one prije kristalizacije kompleksiraju s njihovim prirodnim ligandom. No, oni mogu dati i suprotan učinak u kristalizaciji i ometati stvaranje kristala. U tom slučaju ih je potrebno pažljivo ukloniti iz matične otopine i iz pročišćenog proteina prije pokušaja kristalizacije.⁸

2.5.3. Čistoća i homogenost uzorka

Kemijska i konformacijska čistoća jako utječu na sposobnost rasta kristala. Kemijska čistoća se može jednostavno odrediti elektroforezom uz natrijev dodecil-sulfat (SDS – od engl. *sodium dodecyl sulfate*) elektroforezom na poliakrilamidnom gelu ili masenom spektrometrijom (MS). Što se tiče konformacijske analize čistoće koriste se dvije tehnike: *Fourier Transform* infracrvena spektroskopija (FT-IR) i ultraljubičasti kružni dikroizam (UV-CD – od engl. *ultraviolet circular dichroism*). Homogenost uzorka također je vrlo važna i ona se može odrediti dinamičkim (DLS – od engl. *dynamic light scattering*) ili statičkim (SLS – od engl. *static light scattering*) raspršivanjem svjetlosti.¹¹ Vrlo je važna za spomenuti metodu raspršivanja rendgenskog zračenja pod malim kutem (SAXS – od engl. *small-angle X-ray scattering*). Ona nudi potpunu informaciju o makromolekularnom smatanju, obliku, agregaciji, konformacijama, domenama povezanim fleksibilnim poveznicama.¹² Konformacijska homogenost uzorka osigurava i prisutnost prirodnih liganada u kristalizacijskoj otopini. Ti ligandi biraju se na osnovi afiniteta vezanja na protein. Neki ligandi mogu se izravno dodati u kap kristalizacije i događa se ko-kristalizacija ili se unaprijed vežu na protein.¹¹

2.5.4. Temperatura i temička stabilnost

Temperatura može biti od velike važnosti, ali može imati i mali utjecaj na kristalizaciju bioloških makromolekula. Najučinkovitije je raditi eksperimente na 4°C i 20°C. Čak i ako ne započne kristalizacija pri istraživanoj temperaturi, tek razlike u topljivost proteina s obzirom na kristalizirajuće agense i ostale molekule koje utječu na kristalizaciju mogu dati odgovor na to koliko je temperatura važna za kristalizaciju specifičnog proteina. Topljivost proteina je više

osjetljiva na temperaturu pri nižoj ionskoj jakosti, brzina difuzije je manja i ravnoteža se uspostavlja sporije pri nižim temperaturama tako da vrijeme potrebno za stvaranje kristala može biti duže. Ne smije se zanemariti ni viša temperatura u intervalu od 35°C do 40°C, posebno za molekule koje imaju tendenciju agregacije i za nukleinske kiseline.⁸

Neki proteini pokazuju karakterističnu topljivost s povećanjem temperature dok drugi pokazuju smanjenu topljivost. Ova ovisnost se javlja zbog toga što konstanta disocijacije bočnih ogranaka aminokiselina koje grade protein ovisi o temperaturi. No, ovisnost topljivosti o temperaturi nije svojstvo samog proteina već cijelog sustava kojeg čine protein i otopina. Temperatura jednako važno utječe i na brzinu nukleacije, rast kristala i ravnotežu sustava.¹¹

Veza između termičke stabilnosti proteina i vjerojatnosti uspješnosti kristalizacije je diskutabilna. Međutim, pokazalo se da ukoliko se taj parametar uključi u protokol eksperimenta, kristalizacija je uspješnija. Postoji brza i jeftina metoda kojom se može odrediti termička stabilnost, a to je test toplinskog pomaka temeljen na fluorescenciji ili drugim nazivom metoda diferencijalne skenirajuće fluorimetrije (DSF – od engl. *differential scanning fluorimetry*).¹¹

2.5.5. pH

pH je važna varijabla jer ukupni naboj makromolekule i posljedice nabijanja makromolekule jako ovise o stanju ionizacije njezinih komponenata. Ne samo da se neto naboj mijenja s pH nego se mijenja i dipolni moment molekule, konformacija, i često, stanje agregacije. Tijek kristalizacije je taj da se prvo provode ispitivanja u grubim intervalima širokog područja pH, a zatim se uzimaju preciznije vrijednosti u blizini onih koje su se pokazale povoljnim. Razlika pH, ne veća od 0,5, može napraviti razliku između amornog taloga, mikrokristala ili velikog jediničnog kristala.⁸ Proteini sadrže velik broj ionizirajućih skupina koje imaju različit pK_a . Posljedica toga jest da se topljivost može promijeniti također za razliku od samo 0,5 pH jedinica, a nekada čak i za 0,1 jedinicu. pH snažno utječe na mogućnost formiranja solnih mostova i vodikovih veza koje su ključne za stvaranje interakcija unutar proteina. Elektrostatske interakcije, koje ovise o protoniranju bočnih ogranaka aminokiselina, imaju ključnu ulogu u specifičnosti vezanja, hidrataciji proteina i u interakcijama s malim molekulama i ionima. Najpogodniji uvjeti za kristalizaciju proteina bili bi pri pH koji je jednak izoelektričnoj točki. S obzirom da je ukupni naboj 0, ne postoji elektrostatsko odbijanje između molekula proteina. Nažalost, ova hipoteza nije potvrđena. Potrebno je istražiti širok raspon pH

koji će odgovarati kristalizaciji, no trebaju se uzeti u obzir vrijednosti pri kojima je struktura proteina u nativnoj konformaciji.¹¹

2.6. Analiza kristala bioloških makromolekula

Difrakcija rendgenskih zraka najpouzdanija je metoda za određivanje trodimenzionalne strukture svih molekula. Problem je što se ona može primijeniti samo na kristale odgovarajuće veličine i kvalitete.^{2,5,13} Rendgenska kristalografija ovisi o veličini i kvaliteti kristala kako bi se dobili najtočniji difrakcijski intenziteti i kako bi kvaliteta krajnjih rezultata bila visoka. Rezultati difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu omogućuju vizualizaciju strukture molekule i razmještaja atoma u njoj. Često je potrebno analizirati više od jednog kristala kako bi se dobili što bolji i točniji rezultati. Kvaliteta difrakcijskih podataka značajno se poboljšala kada su u upotrebu ušli izvori zračenja visokih intenziteta i kada se razvila kriokristalografija.² Za neke male proteine pokazala se učinkovita nuklearna magnetska rezonancija (NMR), no i dalje za molekule molekulske mase veće od 20000 Da, samo rendgenska i neutronska difrakcija mogu dati željene strukturne podatke.¹⁴

2.7. Baza kristalizacije bioloških makromolekula

1989. godine uz pomoć Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (NIST – od engl. *National Institute of Standards and Technology*) odnosno Centra za napredna istraživanja u biotehnologiji (CARB – od engl. *Center for Advanced Research in Biotechnology*) napravljena je Baza kristalizacije bioloških makromolekula (BMCD – od engl. *Biological Macromolecule Crystallization Database*). Početni podatci sastojali su se od uvjeta kristalizacije 1025 kristalnih formi 616 bioloških makromolekula. Ti podatci, koji uključuju većinu protokola kako kristalizirati pojedinu makromolekulu preuzeti su iz *Brookhaven* banke podataka o proteinima. Druga verzija baze podataka je bila objavljena 1991. godine. Novo izdanje sadržavalo je podatke za 1456 kristalnih formi 924 biološke makromolekule. Godine 1994. BMCD je postao NASA-in *Protein Crystal Growth* (PCG) i počelo je uvođenje podataka NASA-inih istraživanja rasta kristala. Tako je baza proširena na 2218 kristalnih oblika 1456 bioloških molekula.⁹

BMCD uključuje podatke o kristalizaciji peptida, proteina, protein-protein kompleksa, nukleinskih kiselina, kompleksa nukleinska kiselina-nukleinska kiselina i virusa za koje su dobiveni kristali bili dobre difrakcijske kvalitete. Uključeni su i podaci iz mikrogravitacijskih

eksperimenata koje su financirale neke druge međunarodne svemirske agencije. Podaci u bazi podataka podijeljeni su u tri glavne kategorije: podaci vezani za biološku makromolekulu, detalji o metodi kristalizacije i kristalografski podaci. Svaka molekula uključena u bazu ima jedinstven opis biopolimera ili biopolimernog kompleksa. Podatci uključuju preferirano ime, sistematski naziv i druga imena makromolekula. Svaki unos sadrži podatke o biološkom izvoru koji se sastoji od zajedničkog imena, roda, vrste, tkiva, stanica i organela iz kojeg je makromolekula izolirana. Također, ako je to moguće, uključeni su podaci za rekombinantne proteine istraživane u stranom domaćinu. Unešeni su i sastavi podjedinica, ukupna molekularna masa te broj i molekulska masa svake zasebne podjedinice koja je dio makromolekule. Podjedinica je definirana kao *in vivo* sklop povezan s drugim podjedinicama nekovalentnim interakcijama. Ako je objavljeno u kristalografskim studijama, evidentirana su i imena prostetičkih skupina povezanih s biološkom makromolekulom. Ako je makromolekula enzim, onda dobiva broj enzimske komisije (EC – od engl. *enzyme commission*) i katalitičku reakciju. Uz svaki slučaj postoje opće napomene koje sadrže značajke koje mogu biti važne ili utjecati na kristalizaciju makromolekule. Svakom unosu biološke makromolekule dodjeljuje se oznaka od četiri alfanumerička znaka koja započinje slovom M.^{9,15}

Podaci o kristalizaciji se sastoje od metode kristalizacije, koncentracije makromolekula, temperature, pH, kemijskih dodataka poput pufera, agensa za kristalizaciju ili stabilizatora i duljine vremena potrebnog za stvaranje kristala veličine pogodne za difrakciju rendgenskim zračenjem. Ako kristalizacija odstupa od standardnog protokola, u komentarima je naveden prikaz odrađenog postupka. Veličina i oblik kristala dati su zajedno s rezolucijom sakupljenih podataka metodom difrakcije rendgenskog zračenja. Kristalografski podaci sadrže dimenzije jedinične ćelije ($a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$), prostornu grupu, broj molekula u jediničnoj ćeliji (Z) i gustoću kristala. Svakom unosu kristala dodijeljena je četveroznamenkasta alfanumerička oznaka koja počinje slovom C.^{9,15}

Razvijanje kristalizacijske strategije uz pomoć baze podataka može biti od velike pomoći ako je makromolekula već ranije kristalizirana, eksperiment se provodi s modificiranom ili mutiranom makromolekulom za čiji nemodificirani ili „divlji“ oblik već postoje informacije ili je molekula homologna prethodno kristaliziranoj. Može biti od pomoći čak i ako biološka makromolekula nije prethodno kristalizirana. Kristalizacijski uvjeti pohranjeni u bazi bi trebali zapravo biti početna točka kristalizacije za odabir pravog pH

područja, koncentracije reaktanata i makromolekule, temperature i same kristalizacijske metode.^{9,15}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. Gomez-Morales, G. Falini, J. M: García-Ruiz, *Crystals* **9** (2019) 1–3.
2. A. McPherson, J. A. Gavira, *Acta Crystallogr.* **F70** (2014) 2–20.
3. A. A. Chernov, *Physics Reports* **288** (1997) 61–75.
4. A. McPherson, *Methods* **34** (2004) 254–265.
5. N. E. Chayen, *J. Cryst. Growth* **198/199** (1999) 649–655.
6. A. McPherson, *J. Cryst. Growth* **110** (1991) 1–10.
7. A. McPherson, A. J. Malkin, Y. G. Kuznetsov, *Structure* **3** (1995) 759–768.
8. M. G. Rossmann (ur.), E. Arnold (ur.), *International Tables for Crystallography*, Vol. F, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/New York, 2001, str. 81–93.
9. G. L. Gilliland, M. Tung, J. Ladner, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **3** (1996) 390–320.
10. N. Aherie, *Methods* **34** (2004) 266–272.
11. I. R. Krauss, A. Merlino, A. Vergara, F. Sica, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 11643–11691.
12. C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, J. A. Tainer, *Q. Rev. Biophys.* **40** (2007) 191–285.
13. G. L. Gilliland, J. E. Ladner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 595–603.
14. F. Rosenberger, *J. Cryst. Growth* **166** (1996) 40–54.
15. G. L. Gilliland, *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 51–59.