

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Bioanorganická chemie



**Optimalizace krystalizačních podmínek pro
přípravu monokrystalů systému komplexní
sloučenina-protein**

Bakalárska práca

Vedúci práce:

Vančo Ján doc. PharmDr. Ph.D.

Autor práce:

Lukáš Masaryk

Meno autora:	Lukáš Masaryk
Názov práce:	Optimalizace krystalizačních podmínek pro přípravu monokrystalů systému komplexní sloučenina-protein
Názov práce v angličtine:	Optimization of crystallization conditions for the preparation of single crystals of the system coordination compound-protein
Druh práce:	bakalárska
Katedra:	Katedra anorganickej chémie
Vedúci práce:	Vančo Ján doc. PharmDr. Ph.D.
Rok obhajoby:	2018

ABSTRAKT:

Metodiky kryštalizácie proteínov predstavujú neustále sa rozvíjajúcu oblasť, ktorá láka pozornosť viacerých prírodovedných odborov. Získanie kvalitných monokrystalov proteínu pre röntgenovú difrakčnú analýzu je empirickým procesom, ktorý musí byť optimalizovaný na konkrétny proteín. Táto práca sa zameriava na optimalizáciu kokryštalizácie vybraných biologicky aktívnych koordinačných zlúčenín s vybranými modelovými proteínmi s následným kvalitatívnym zhodnotením výsledkov experimentov, na základe mikroskopickej analýzy vylúčených kryštálov systému komplexná zlúčenina-modelový proteín. Pri realizácii práce bolo vykonaných viac ako 1400 krystalizačných experimentov, ktoré umožnili upresniť podmienky kokryštalizácie vybraných štyroch koordinačných zlúčenín s modelovým proteínom lyzozýmom. Takto pripravené monokrystály interagujúcich systémov môžu v následnom difrakčnom experimente a vyriešení štruktúry týchto systémov poskytnúť nové cenné informácie o biologických aktivitách vybraných zlúčenín a naznačiť aj ich správanie a osud pri interakcii so zložitými biologickými systémami (napr. krvnou plazmou).

Kľúčové slová:

kryštalizácia proteínov, komplexná zlúčenina, monokrystál, optimalizácia, krystalizačná kvapka, metóda visiacej kvapky

Počet strán: 61

Jazyk: slovenský

Author's name:	Lukáš Masaryk
Title:	Optimization of crystallization conditions for the preparation of single crystals of the system coordination compound-protein
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Inorganic Chemistry
Supervisor:	Vančo Ján Doc. PharmDr.,Ph.D.
The year of presentation:	2018

ABSTRACT:

Methods of protein crystallization are a constantly evolving area that attracts the attention of several natural science disciplines. Obtaining of high-quality single crystals of the protein for X-ray diffraction analysis is an empirical process that has to be optimized for a particular protein. This work aims to optimize the co-crystallization of selected biologically active coordination compounds with selected model proteins, followed by a qualitative evaluation of the results of the experiments, based on the microscopic analysis of the crystals of the complex compound-model protein. In the course of the work, more than 1400 crystallization experiments were carried out, which made it possible to specify the conditions for the co-crystallization of selected four coordination compounds with the lysozyme used as a model protein. The single-crystals of the interacting systems thus prepared can provide new valuable information on the biological activities of the selected compounds in the subsequent diffraction experiment and resolve the structure of these systems and simultaneously indicate their behavior and fate when interacting with complex biological systems (such as blood plasma).

Keywords:

crystallization of proteins, coordination compound, single-crystal, optimization, crystallization drop, hanging drop vapor diffusion method

Number of pages:	61
------------------	----

Language:	Slovak
-----------	--------

POĎAKOVANIE

Rád by som na tomto mieste poďakoval vedúcemu svojej záverečnej práce za trpezlivosť, ochotu a cenné rady, vďaka ktorým mi ukázal krásu a podstatu štúdia bioanorganickej chémie, dôležitého pre môj ďalší osobný rozvoj. Rád by som tiež na tomto mieste poďakoval vedúcemu Katedry anorganickej chémie a Oddelenia bioaktívnych komplexov RCPTM prof. RNDr. Zdeňkovi Trávníčkovi, Ph.D. za umožnenie vykonávať moju záverečnú prácu na miestnej katedre a za vytvorenie optimálnych podmienok k jej úspešnej realizácii.

PREHLÁSENIE

Ja, Lukáš Masaryk , vyhlasujem, že som túto bakalársku prácu spísal samostatne pod odborným dohľadom doc. PharmDr.,Jána Vanča, Ph.D.

Všetku použitú literatúru som uviedol v zozname použitej literatúry.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola sprístupnená v knižnici Katedry anorganickej chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 30.4.2018

vlastnoručný podpis autora

Obsah

I. ÚVOD	8
II. CIELE PRÁCE	9
III. TEORETICKÁ ČASŤ	10
1. HISTORICKÝ VÝVOJ	10
2. PRINCÍP KRYŠTALIZÁCIE PROTEÍNOV	11
2.1. Proces kryštalizácie.....	11
2.2. Faktory ovplyvňujúce kryštalizáciu.....	13
3. METÓDY KRYŠTALIZÁCIE.....	18
3.1. Kryštalizácia proteínov pomocou metódy visiacej kvapky.....	18
3.2. Kryštalizácia proteínov pomocou metódy sediacej kvapky.....	18
3.3. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou sendvičovej kvapky.....	19
3.4. Metóda mikrokryštalizácie pod olejom	20
3.5. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou dialýzy	21
3.6. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou voľnej difúzie.....	22
3.7. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou mikrofluidík	22
4. HĽADANIE POČIATOČNÝCH KRYŠTALIZAČNÝCH PODMIENOK A ICH OPTIMALIZÁCIA	23
5. TECHNIKY INICIÁCIE KRYŠTALIZÁCIE	24
5.1. Technika očkovania mikrokryštálmi.....	24
5.2. Technika očkovania makrokryštálov.....	25
5.3. Technika očkovania príbuzným kryštálom	25
5.4. Technika exipatiálnej nukleácie	25
6. VLASTNOSTI A IDENTIFIKÁCIA PROTEÍNOVÝCH KRYŠTÁLOV	25
6.1. Test dehydratáciou	26
6.2. Test drvením	26
6.3. Test použitím polarizovaného svetla	26
6.4 Test absorpcie farbiva.....	26
6.5 Test fluorescencie.....	27
6.6. Test použitím elektrónovej mikroskopie	27
6.7. Test ohňom	27
7. UCHOVÁVANIE A PRÍPRAVA KRYŠTÁLOV PRED RÖNTGENOVOU DIFRAKČNOU ANALÝZOU.....	27
IV. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
8. POUŽITÉ SYSTÉMY PROTEÍNU A KOMPLEXNÝCH ZLÚČENÍN PRE PRÍPRAVU MONOKRYŠTÁLOV SYSTÉMU KOMPLEXNÁ ZLÚČENINA-PROTEÍN.....	30

8.1 Lyzozým z vaječného bielka (<i>hen egg-white lysozyme</i>).....	30
8.2 Použité komplexné zlúčeniny.....	31
8.3. Hmotnostná spektrometria	33
9. POSTUP KOKRYŠTALIZÁCIE LYZOZÝMU S KOMPLEXNÝMI ZLÚČENINAMI PJ00, PJ02, PJ03 A TA	33
V. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	35
10. HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA.....	35
11. VÝSLEDKY KRYŠTALIZAČNÝCH EXPERIMENTOV	37
11.1. Experiment 1	37
11.2. Experiment 2	39
11.3. Experiment 3	41
11.4. Experiment 4	43
11.5. Experiment 5	45
11.6. Experiment 6	47
11.7. Experiment 7	49
11.8. Experiment 8	51
11.9. Experiment 9	53
11.10. Experiment 10	55
VI. ZÁVER	58
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	59

I. Úvod

Získanie kvalitných proteínových monokryštálov pre röntgenovú difrakčnú analýzu je zdĺhavým a náročným empirickým procesom, zahrňujúcim časovo náročné optimalizácie podmienok či využitie rôznych techník kryštalizácie. Neexistuje žiadna komplexná teória, ktorá by usmerňovala experimentálne pokusy kryštalizácie proteínov. Experimenty kryštalizácie proteínov sú často sprevádzané s veľkým počtom pokusov o optimalizáciu kryštalizačných podmienok pre získanie akostných kryštálov proteínu. Metodiky kryštalizácie proteínov sú stále sa vyvíjajúcim odvetvím, ktoré poskytuje širokú možnosť uplatnenia v rôznych prírodovedných odboroch. Získanie informácie o štruktúre proteínov významne prispelo k nášmu súčasnému chápaniu mnohých základných mechanizmov, ktoré sa podieľajú na životných procesoch.

Práve kokryštalizácia potenciálnych liečiv s modelovými proteínmi je neustále viac využívanou technikou, ako na poli biologických, tak na poli chemických vied, pre lepšie pochopenie mechanizmu biologickej aktivity, týchto liečiv v živých systémoch.

Téma práce i jej výstupy úzko nadväzujú na výskumné zameranie Oddelenia biologicky aktívnych komplexov RCPTM, orientovaného na dizajn, prípravu a štúdium biologicky aktívnych koordinačných zlúčenín s významnou mierou uplatniteľnosti ako potenciálnych liečiv vážnych ľudských chorôb, predovšetkým však nádorových a metabolických ochorení. V súvislosti s väzbou na uvedené výskumné aktivity si dovoľuje autor práce poďakovať za financovanie svojich finančne náročných experimentov prostredníctvom prostriedkov z projektov NPU I LO1305, IGA PrF 2016_007, IGA PrF 2017_018 a IGA PrF 2018_011.

II. Ciele práce

Cieľom bakalárskej práce je vypracovanie literárnej rešerše na tému kryštalizačné metódy pre štúdium interakcii malých molekúl s proteínmi pre účely makromolekulárnej röntgenoštruktúrnej analýzy (podstata, metódy a možnosti ich optimalizácie, kritéria pre mikroskopické, resp. aj ďalšie dostupné hodnotenia kvality kryštálov).

Ďalším cieľom bola optimalizácia kokryštalizácie vybraných biologicky aktívnych koordinačných zlúčenín (zo zbierok Katedry anorganické chémie PŘF UP) s vybranými modelovými proteínmi a následne kvalitatívne zhodnotenie výsledkov, na základe mikroskopickej analýzy, resp. ďalšími dostupnými metódami.

III. Teoretická časť

1. Historický vývoj

Kryštalizáciou proteínov sa začali zaoberať vedci od zhruba polovice 19. storočia. Do objavenia röntgenovej kryštalografie sa využívala predovšetkým na purifikáciu a fyziologickú charakterizáciu bielkovín. Po prvom objasnení štruktúry proteínového kryštálu pomocou röntgenovej difrakčnej analýzy, v roku 1934 sa začala tvárať nová vedecká disciplína nazvaná „kryštalogeneza“, ktorej cieľom bolo pochopiť rast, kvalitu a štruktúru proteínov [Giegé, 2013].

Históriu kryštalizácie proteínov možno datovať od roku 1840, kedy sa v publikácii Friedricha Ludwiga Hünefelda objavuje zmienka o náhodnom objave kryštalického materiálu v krvi dážd'oviek, ošípaných a v ľudskej krvi. Tento kryštalický materiál následne v roku 1864 dostal názov hemoglobín [Hünefeld, 1840]. Prvá zámerne realizovateľná a následne reprodukovateľná kryštalizácia hemoglobínu bola vykonaná v roku 1851 Otto Funkom pomocou pomalého odparovania rozpúšťadla (vody, etanolu a éteru) z proteínového roztoku [Preyer, 1871]. V roku 1855 bola objavená Theodorom Hartigom ďalšia skupina kryštálov proteínov v glutén-obsahujúcej múke, čo viedlo k sérii objavov „kryštaloidov“, ako ich nazval, v iných extraktoch semien rastlín [Hartigom, 1855].

Medzi prvých, ktorí si uvedomili a skúmali účinok solí na rozpustnosť a stabilitu proteínov, patrila Hofmeister, ktorý svoje závery bádania uplatnil pri kryštalizácii slepačieho vaječného albumínu [Hofmeister, 1888]. V roku 1926 sa podarilo Jamesovi B. Sumnersovi vykryštalizovať prvý enzým-ureazu [Sumner, 1926], čo viedlo Johna H. Northropa ku kryštalizácii pepsínu a trypsínu. Northrop sa tiež zaslúžil o vývoj lepších kvantitatívnych nástrojov na čistenie, charakterizáciu a kryštalizáciu proteínov [Northrop, 1939].

K rozšíreniu použiteľnosti kryštalizácie proteínov došlo v roku 1934, kedy John Desmond Bernal a Dorothy Crowfoot zverejnili prvý difrakčný vzor proteínového kryštálu, čím započal zrod röntgenovej difrakčnej analýzy ako metódy pre štúdium štruktúry látok v štruktúrnej biológii [Bernal a Crowfoot, 1934]. Dnes je röntgenová difrakčná analýza jednou zo základných metód, pomocou ktorej bola určená štruktúra už 124926 z celkového počtu 139555 proteínových štruktúr, čo je okolo 90% proteínov v databáze PDB (ku dňu 20.04.2018).

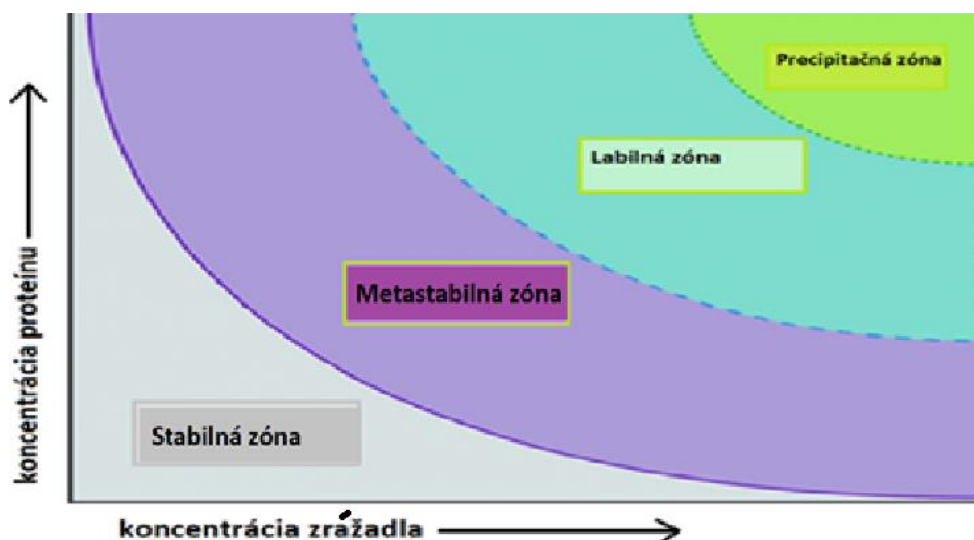
2. Princíp kryštalizácie proteínov

Kryštalizácia je fenoménom fázového prechodu medzi kvapalinou a pevnou fázou. Kryštály vznikajú z proteínových roztokov v stave presýtenia (supersaturácie) [Chayen, 2004]. Podstata spočíva v pomalom privedení systému do stavu zníženej rozpustnosti a dosiahnutia limitného stupňa presýtenia postupnou modifikáciou vlastností systému (teplota, pH, koncentrácia jednotlivých komponentov v roztoku, atď.) [Kutá Smatanová, 2013].

2.1. Proces kryštalizácie

Priebeh tvorby kryštálov prechádza tromi fázami: a.) nukleáciou, b.) rastom, c.) termináciou [Krauss, 2013]. Proces kryštalizácie proteínov nastáva z presýtených (supersaturovaných) roztokov, kedy koncentrácia proteínu presahuje rozpustnosť. Veľké presýtenie je potrebné na prekonanie aktivačnej energetickej (nukleačnej) bariéry. Táto energia reprezentuje voľnú energiu potrebnú na vytvorenie malej mikroskopической skupiny proteínov, ktorú nazývame nukleačné jadro, z ktorého započína rast kryštálov [Asherie, 2004]. Aby došlo k samovoľnému rastu nukleačného jadra, musí prekonať takzvanú kritickú veľkosť, ktorá je daná nukleačnou (energetickou) bariérou. Každé jadro pod touto kritickou veľkosťou bude mať tendenciu rozpustiť sa [Garcia-Ruiz, 2003]. Po vytvorení stabilného nukleačného jadra nasleduje rast kryštálu difúziou častíc na povrchu jadier a ich následným usporiadaním a začlenením do štruktúry. Rast proteínových kryštálov je samovoľný termodynamický výhodný dej, pri ktorom dochádza k minimalizovaniu voľnej energie [Mcpherson, 1990]. Rast kryštálu je ovplyvnený takzvaným depozičným stupňom. Depozičný stupeň reprezentuje rýchlosť odčerpávania pevnej fázy z roztoku. Pokiaľ je depozičný stupeň nízky, nedochádza k tvorbe rastových centier alebo je rýchlosť rastu pomalá a naopak, pokiaľ je depozičný stupeň vysoký, vzniká veľké množstvo drobných nukleačných jadier, rýchlosť rastu je vysoká, čo môže zapríčiniť vznik veľkého počtu defektov [Kutá Smatanová, 2013]. Cieľom systému je dosiahnuť stav rovnováhy, s čím je spojená terminácia prebiehajúceho deja [Mcpherson, 1990]. Predčasnú termináciu rastu proteínových kryštálov môže spôsobiť zmena podmienok kryštalizácie alebo prítomnosť nečistôt v systéme [Durbin a Feher, 1996].

Úroveň presýtenia proteínových roztokov sa delí na tri zóny: vysoké presýtenie (precipitačná zóna), stredné presýtenie (labilná zóna), nízke presýtenie (metastabilná zóna) [Krauss, 2013]. Precipitačná zóna (vysoké presýtenie) je miesto, kde sa prebytok molekúl proteínu oddelí od roztoku za vzniku veľkého počtu amorfných agregátov. Labilná zóna (stredné presýtenie) je miesto, kde prebytok molekúl proteínu agreguje v kryštalickej forme. Umiestnenie presýtenia roztoku v labilnej oblasti zodpovedá za počet vzniknutých nukleačných jadier. Metastabilná zóna (nízke presýtenie) je miestom, kde nemusí dochádzať k tvorbe nukleačných jadier, pokiaľ na systém nepôsobí vonkajšia sila, a teda systém nie je „mechanicky šokovaný“. Ideálny priebeh tvorby dobre usporiadaných a dostatočne veľkých kryštálov proteínu by optimálne mal začínať v labilnej oblasti s takým presýtením, aby došlo k tvorbe jediného nukleačného jadra a prechodu roztoku do metastabilnej oblasti v dôsledku zníženia koncentrácie. Rýchlosť rastu jadra by s jeho narastajúcou veľkosťou klesala, čím sa zabráni tvorbe defektov systému. Celý proces sa ukončí dosiahnutím rovnováhy medzi vzniknutým kryštálom a jeho roztokom [Chirgadze, 2001]. Proces kryštalizácie proteínov popisuje fázový diagram (obrázok 1), čo je 2D graf znázorňujúci závislosť koncentrácie proteínu na určitom parametri roztoku, najčastejšie na koncentrácii roztoku [Mcpherson - Gavira, 2014].



Obr. 1: Fázový diagram popisujúci kryštalizáciu proteínov. Zobrazuje závislosť koncentrácie proteínu na koncentrácii zrážadla v roztoku. Prekreslené z Mcpherson -Gavira 2014

2.2. Faktory ovplyvňujúce kryštalizáciu

Existuje veľký počet fyzikálnych, chemických a biologických premenných, ktoré môžu vo väčšej či menšej miere ovplyvňovať zisk kvalitných kryštálov proteínov [Mcpherson, 1990]. Všetky tieto termodynamické a dynamické procesy môžu byť použité na riadenie presýtenia systému, a teda aj rýchlosti tvorby nukleačných jadier a rastu kryštálov proteínu. Základom úspešnej kryštalizácie je tiež nutnosť vysokej chemickej a biologickej čistoty, ako proteínovej vzorky, tak čistoty ostatných zložiek systému, ktoré môžu výrazne ovplyvniť celkový priebeh kryštalizácie [Krauss, 2013].

2.2.1. Teplota

Závislosť kryštalizácie proteínov na teplote je pre jednotlivé proteíny charakteristická, pričom celkový proces môže ovplyvniť viacej či menej. Niektoré proteíny vykazujú vyššiu rozpustnosť so zvyšujúcou sa teplotou, zatiaľ čo iné vykazujú zníženú rozpustnosť [Mcpherson, 1990]. Samotné proteíny môžu pri rôznych teplotách vykazovať kryštalickú polymorfiu [Abdalla, 2016]. Funkcia rozpustnosti na teplote nie je závislá iba od samotného proteínu, ale predovšetkým od konkrétneho zloženia systému obsahujúceho proteín v roztoku. V laboratóriu sa najčastejšie vykonávajú kryštalizácie proteínov pri teplote 4 °C, kvôli hustotnému paradoxu vody a inhibícii biologickej kontaminácie, a pri teplote 20 °C, teda pri laboratórnej teplote [Krauss, 2013].

2.3.2. Úprava pH

Podobne ako teplota, môže na rozpustnosť proteínov vplývať pH. Rôzne proteíny sú rozpustné pri rôznych hodnotách pH. Hodnoty pH roztoku výrazne ovplyvňujú protonizačný stav nabitých aminokyselín postranných reťazcov proteínu, čo vplýva na tvorbu neväzbových interakcií, ktoré výrazne zodpovedajú za tvorbu kryštálov proteínu. Pri zmene hodnôt pH roztoku musíme taktiež brať do úvahy koncentráciu soli, ktorá výrazne ovplyvňuje elektrostatické interakcie medzi molekulami proteínu. [Dumetz, 2008]. Zníženie rozpustnosti proteínov a s tým spojená agregácia či zrážanie, zvyčajne nastáva v tých prípadoch, keď sa izoelektrický bod molekuly bielkoviny približne rovná pH roztoku. Tento fakt výrazne ovplyvňuje výber tlmivého roztoku pre kryštalizáciu daného proteínu [Abdalla, 2016].

2.4.3. Typ zrážadla

Medzi základné typy precipitantov, ktoré sa navzájom líšia predovšetkým spôsobom pôsobenia, patria a.) soli (napr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, MgCl_2), b.) organické rozpúšťadlá (napr.

metanol, etanol, acetón, 2-methyl-pentan-2,4-diol (MPD) alebo glukóza). Špeciálnu kategóriu organických precipitantov tvoria c.) makromolekulárne polyméry (napr. polypropylénglykol P400, karboxymethylcelulosa, atď.) [Kutá Smatanová, 2013].

a.) Soli:

Patria medzi najbežnejšie používané zrážadlá pre kryštalizáciu biomakromolekúl. Vplyv soli zvyšuje konkurenciu medzi nabitými skupinami na povrchu molekuly proteínu o ióny v roztoku. Za neprítomnosti iónov soli proteín precipituje v dôsledku elektrostatických príťažlivých síl medzi opačne nabitými časťami molekúl proteínov. Po pridaní solí, ako precipitantov, ióny chránia nabité skupiny a zvyšujú rozpustnosť proteínu. Pri stave systému, kedy sa iónová sila zvýši na bod, v ktorom nabité skupiny proteínov a ióny solí súperia o molekuly rozpúšťadla s cieľom udržať svoje hydratačné obaly, dochádza k zvýšeniu rozpustnosti iónov solí a naopak k narušeniu solvatačných obalov, proteín tento stav kompenzuje asociáciou s inými molekulami proteínov za vzniku termodynamicky výhodnejšieho systému [Chirgadze, 2001].

b.) Organické rozpúšťadlá:

Molekuly organického rozpúšťadla interagujú s molekulami vody, čím ich odvádzajú od interakcie s proteínovými atómami, súčasne znižujú dielektrickú konštantu roztoku. Tieto vlastnosti znižujú schopnosť systému plne solvovať molekuly proteínu, v dôsledku čoho dochádza k ich asociácii a vylučovaniu z roztoku. Organické rozpúšťadlá by sa mali používať v nízkych koncentráciách, pretože niekoľkokrát destabilizujú sekundárnu a terciárnu štruktúru molekuly proteínu [Chirgadze, 2001]. Ďalej by sa mali používať pri nízkych teplotách, pričom do roztoku by sa mali pridávať po malých dávkach za stáleho miešania [Mcpherson-Gavira, 2014].

c.) Polyméry:

Medzi najpoužívanejšie a najefektívnejšie polymérne zrážadlá z hľadiska schopnosti precipitácie i nákladov patria polyetylénglykoly (PEG), ktoré sa používajú v rozmedzí rôznych molekulových hmotností od 200 po 1.000.000 Da (daltonov). PEG s menšou molekulovou hmotnosťou ako je 1000 Da sú kvapaliny, nad 1000 Da sa jedná o pevné látky [Chirgadze, 2001]. Konkrétne molekulové hmotnosti polyetylénglykolov sú charakteristické pre kryštalizáciu konkrétnych proteínov, pričom však neexistuje žiadna závislosť medzi veľkosťou

molekulovej hmotnosti polyetylénglykolu a veľkosťou molekulovej hmotnosti kryštalizujúceho proteínu [Mcpherson-Gavira, 2014].

Podobne ako soli, tak aj polyetylénglykoly súperia s rozpustenými molekulami proteínu o molekuly vody, v dôsledku čoho dôjde k narušeniu solvatačných obalov molekúl proteínu a tým k ich asociácii. Avšak, na rozdiel od solí, PEG znižujú dielektrickú konštantu roztoku, čo zvyšuje efektívnu vzdialenosť elektrostatických interakcií medzi molekulami proteínu [Chirgadze, 2001].

2.5.4. Aditíva

Za aditívum považujeme každú látku, ktorá nie je kryštalizovanou zlúčeninou, tlmivým roztokom alebo zrážadlom. Aditívum môže viazať, stabilizovať, či modifikovať proteínovú konformáciu, môže narušiť interakcie medzi molekulami rozpúšťadla a proteínu alebo ovplyvniť rôzne fázy kryštalizácie, či zmeniť povrchovú energiu kryštálu [Krauss, 2013].

Malé molekuly, ako sú analógie substrátov, koenzýmov či malé ióny, sa môžu viazať v aktívnych miestach enzýmov či špecifických miestach na proteínoch a zapríčiniť tým stabilizáciu konformácie alebo potrebnú zmenu konformácie pre kryštalizáciu. Výsledný systém aditíva s proteínom tak môže nadobudnúť menej dynamický charakter a tým menšiu rozpustnosť [Mcpherson-Gavira, 2014].

Chemické ochranné látky sa používajú predovšetkým na chelatáciu iónov ťažkých kovov, v prípade, že ich vplyvom by došlo k zmene alebo stabilizácii konformácie, ktorá nie je vhodná pre proces kryštalizácie. Medzi takéto látky patrí napríklad EDTA. Ďalej sa ako aditíva používajú inhibítory proteolytických enzýmov ako napr. azid sodný alebo 2,2'-bipyridine [Mcpherson-Gavira, 2014].

Ďalšími používanými aditívami sú detergenty, ktoré uľahčujú rozpustnosť niektorých málo rozpustných proteínov, ako sú napríklad hydrofóbne membránové proteíny. Takéto proteíny vytvárajú často v roztoku agregáty nevhodne pre kryštalizáciu. Pôsobením detergentu na proteín sa stáva hydrofilnejším a tým sa zvyšuje jeho rozpustnosť vo vodných roztokoch, pričom nedochádza k zmene jeho fyzikálno-chemických vlastností. Medzi používané detergenty patria napríklad dodecylmaltozid (DDM) alebo beta-oktylglukozid (BOG) [Mcpherson-Cudney, 2014].

Cross-linkery sú látky, ktoré stabilizujú konformáciu a znižujú dynamický charakter proteínu, reverzibilným zasieťovaním nabitých skupín na proteíne alebo tvorbou

intramolekulárnych vodíkových väzieb pomocou povrchu polárnych častí proteínu. Medzi cross-linkery patria multivalentné molekuly, často obsahujúce diamín (napr. benzoguanamin) alebo dikarboxylové kyseliny (napr. kyselina jantárová), či alifatické zlúčeniny rôznych dĺžok nesúce nejakú kombináciu nabitých skupín (napr. kyselina sulfojantárová) [Mcpherson-Gavira, 2014].

Kryoprotektanty sú ďalšími používanými aditívami, ktoré zabráňujú tvorbe mikrokryštálov rozpúšťadla v kryštáloch proteínov. Pridaním kryoprotektantov dochádza ku tvorbe amorfnej pevnej fáze rozpúšťadla, podobnej sklu. Medzi používané kryoprotektanty patria napríklad glycerol alebo ethylenglykol [Jeffrey, 2006].

Redukčné činidlá sú ďalšou skupinou aditív, ktoré zabráňujú nechcenej oxidácii proteínovej vzorky počas procesu kryštalizácie, kedy oxidácia môže viesť k nechcenej agregácii alebo denaturácii proteínu. Medzi redukčné činidlá používané v proteínovej kryštalografii patria napríklad beta-mercaptoethanol (beta-me) alebo dithiothreitol (DTT) [Hampton Research, 2017].

Existuje veľké množstvo ďalších aditív, ktoré môžu výraznejšie či menej výrazne ovplyvňovať celý proces kryštalizácie proteínov. Aditíva patria medzi ďalšie parametre spojené s optimalizáciou kryštalizačných podmienok [Krauss, 2013].

2.6.5. Miešanie

Miešanie kryštalizačného roztoku proteínu môže zvýšiť jednotlivé interakcie medzi molekulami a tým urýchliť celkový rast kryštálu. Rast a morfológia kryštálov sú závislé na rýchlosti miešania. Pri kryštalizácii proteínov sa uprednostňuje pomalé miešanie, aby sa zabránilo problémom, akým sú spontánna nukleácia, denaturácia proteínu či poškodeniu vzniknutých kryštálov [Krauss, 2013].

Existuje ďalšie veľké množstvo faktorov, ktoré ovplyvňujú proces kryštalizácie proteínov. Ich prehľad poskytuje tabuľka 1.

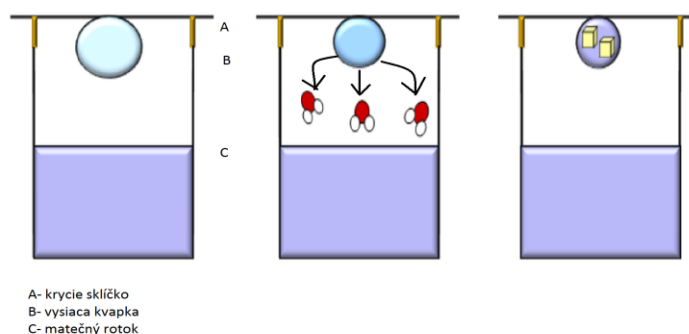
Tabuľka 1. *Fyzikálne, chemické, biochemické faktory ovplyvňujúce kryštalizáciu makromolekúl. Prekreslené z Mcpherson-Gavira 2014.*

fyzikálne	chemické	biochemické
teplota	pH	čistota makromolekúl
objem matečného roztoku	typ zrážadla	substrát/inhibítor
geometria komory či kapilár	konečná koncentrácia zrážadla	agregačný stav makromolekúl
gravitácia	iónová sila	posttranslačná modifikácia
tlak	typ kationu a koncentrácia	zdroj makromolekúl
čas	typ aniónu a koncentrácia	proteolýza
vibrácie	stupeň presýtenia	chemická modifikácia
elektrické/magnetické pole	ox/red prostredie	genetická modifikácia
dielektrické vlastnosti médiá	koncentrácia makromolekúl	vlastná symetria makromolekúl
viskozita médiá	ióny kovov	stupeň denaturácie
	cross-linkery	izoelektrický bod
	detergenty	obsah alfa-helixov
	nečistoty	konformačný stav
		tepelná stabilita
		prístupný rozsah pH
		história vzorky

3. Metódy kryštalizácie

3.1. Kryštalizácia proteínov pomocou metódy visiacej kvapky

Metóda pozostáva z difúzie pár rozpúšťadla medzi kvapkou a matečným roztokom, ide o priamočiaru difúziu v snahe zachovať termodynamickú rovnováhu. Kvapka zložená zo zmesi vzorky proteínu a zrážacieho činidla je umiestnená nad rezervoárom, pričom obsahuje nižšiu koncentráciu zrážadla v porovnaní s rezervoárom. Dochádza k difúzii pár rozpúšťadla z kvapky do matečného roztoku a tým k jej prechodu do stavu supersaturácie. Celý dej sa ukončí dosiahnutím termodynamickej rovnováhy medzi koncentráciou činidla v kvapke a v rezervoári. Výhodou tejto metódy je jej jednoduchá realizovateľnosť, ľahký prístup ku kryštálom a ekonomická nenáročnosť [Hampton Research, 2017].



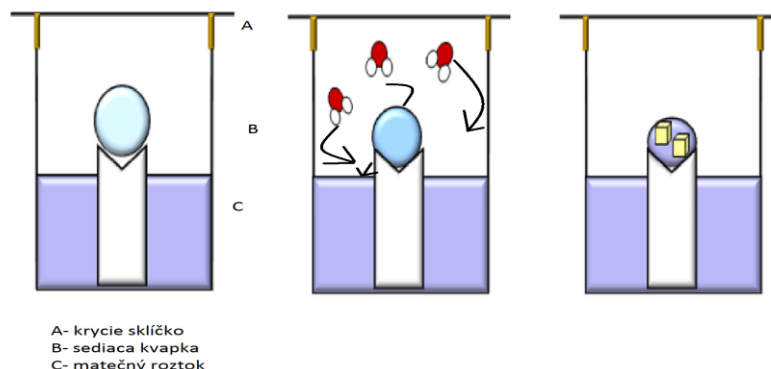
Obr. 2: Schéma kryštalizácie proteínov pomocou metódy visiacej kvapky. Prekreslené z Krauss 2013.

Metóda sa vykonáva v jamkových doštičkách, kde sa každá jamka naplní matečným roztokom a uzavrie silanizovaným sklíčkom alebo plastovým krycím sklíčkom. Sklíčko môže byť utesnené pomocou silikónového oleja alebo vysokotlakovej vazelíny [Chayen, 2008].

3.2. Kryštalizácia proteínov pomocou metódy sediacej kvapky

Je metódou podobnou metóde kryštalizácie proteínov pomocou visiacej kvapky. Ide znovu o metódu priamej difúzie pár rozpúšťadla, založenej na snahe systému dosiahnuť stav termodynamickej rovnováhy medzi kvapkou obsahujúcou nižšiu koncentráciu zrážacieho činidla a matečným roztokom obsahujúcim naopak vyššiu koncentráciu zrážacieho činidla. Výhodou tejto metódy je stabilné umiestnenie kvapiek, a to v pozícii „sedenia“, jednoduchá

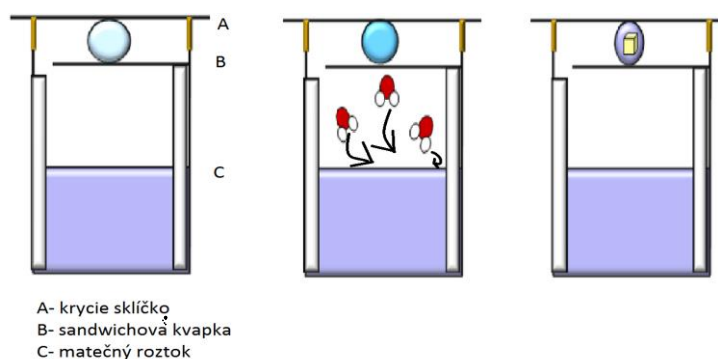
realizovateľnosť a ekonomická nenáročnosť [Hampton Research 2017]. Nevýhodou tejto metódy kryštalizácie proteínov je prirastanie kryštálov k nosnej ploche, čo sťažuje následnú manipuláciu s proteínovými kryštálmi [Krauss 2013].



Obr. 3: Schéma kryštalizácie proteínov pomocou metódy sediacej kvapky. Prekreslené z Krauss 2013.

3.3. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou sendvičovej kvapky

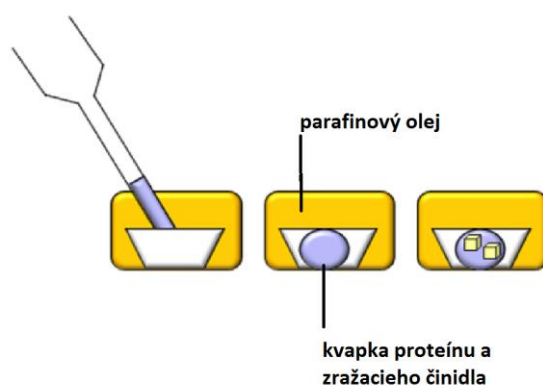
Podobne ako v predchádzajúcich prípadoch ide o metódu založenú na priamej difúzii pár rozpúšťadla z proteínovej kvapky obsahujúcej nižšiu koncentráciu zrážacieho činidla do matečného roztoku s vyššou koncentráciou zrážacieho činidla. Kvapka je umiestnená medzi dve krycie sklíčka nad matečným roztokom v rezervoári. Výhodou tejto metódy je zníženie plochy difúzie pár z kvapky, čím sa spomalí celkový proces dosiahnutia termodynamickej rovnováhy medzi kvapkou a matečným roztokom, čo vedie obvykle k tvorbe kvalitnejších kryštálov proteínu [Krauss, 2013].



Obr. 4: Schéma kryštalizácie proteínov pomocou metódy sendvičovej kvapky. Prekreslené z Krauss 2013.

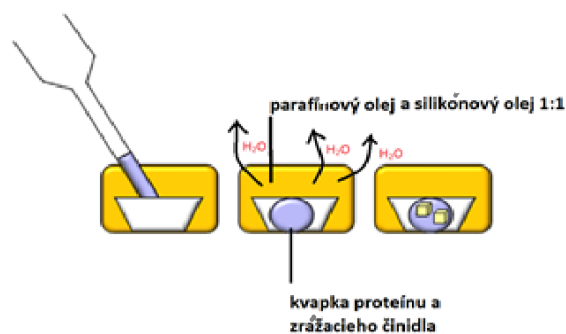
3.4. Metóda mikrokryštalizácie pod olejom

V rámci tejto metódy sa umiestni proteínová kvapka s príslušným obsahom zrážacieho činidla a rôznych aditív pod tenkú vrstvu oleja. Všeobecne používaným olejom je minerálny olej s rozvetvených parafrinov v rozsahu C20+, ktorý neumožňuje difúziu pár rozpúšťadla z proteínovej kvapky [Hampton Research, 2017]. Na získanie kvalitných kryštálov vhodných na difrakčnú analýzu musí byť splnená taká podmienka, že po príprave kvapky nastáva proces nukleácie v dôsledku kontaktu vysokých koncentrácií zrážacieho činidla a proteínu. Následne sa kvapka umiestnená pod olej nachádza v metastabilnej oblasti supersaturácie, ktorá zaručí usporiadaný rast kryštálu proteínu. Táto metóda umožňuje vytvoriť nemenné podmienky rastu proteínových kryštálov v systéme. Nevýhodou metódy je možnosť difúzie rôznych aditív v kvapke do oleja, či rýchle nastolenie termodynamickej rovnováhy, ktorá zabraňuje tvorbe kvalitných kryštálov pre röntgenovú difrakčnú analýzu. [Krauss, 2013].



Obr. 5: Schéma kryštalizácie proteínov metódou mikrokryštalizácie pod olejom. Prekreslené z Krauss 2013.

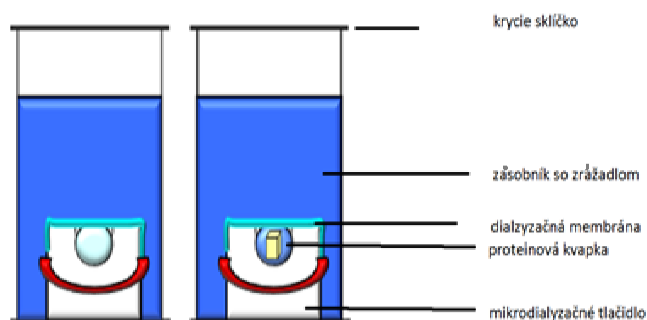
Modifikácia metódy mikrokryštalizácie pod olejom je založená na použití zmesi silikónového oleja a parafrinového oleja v pomere 1:1. Táto zmes umožňuje difúziu pár rozpúšťadla z proteínovej kvapky cez vrstvu zmesi olejov. Tým dochádza k poklesu jej objemu, čo vedie k zvýšeniu koncentrácie proteínu a zrážacieho činidla v kryštalizačnom systéme. Zmenou pomeru zmesi parafrinového a silikónového oleja možno meniť rýchlosť difúzie pár rozpúšťadla a tým ovplyvňovať rýchlosť a kvalitu samotnej kryštalizácie proteínu. [Hampton Research, 2017].



Obr. 6: Schéma kryštalizácie proteínov metódou mikrokryštalizácie pod zmesou parafínového a silikónového oleja. Prekreslené z Krass 2013.

3.5. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou dialýzy

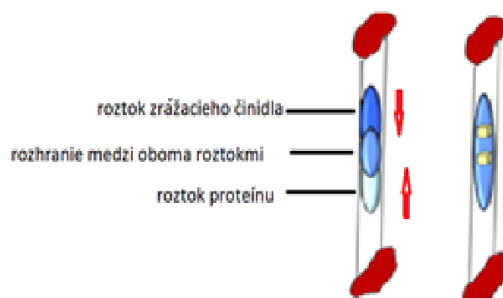
Táto technika využíva difúziu a ekvilibračiu molekúl zrážadla cez semipermeabilnú membránu do proteínovej kvapky, čím sa zvyšuje jej koncentrácia počas vzniku ďalšieho supersaturovaného roztoku. Pre túto metódu sa využívajú tzv. mikrodialyzačné tlačidlá, ktoré umožňujú jednoduchý spôsob kryštalizácie s malým množstvom proteínov. Proteínová vzorka je umiestnená do malej komôrky na povrchu mikrodialyzačného tlačidla a pokrytá dialyzačnou membránou. Následne je celý systém vložený do zásobníka obsahujúceho zrážacie činidlo [Krauss, 2013].



Obr. 7: Schéma kryštalizácie proteínov metódou dialýzy. Prekreslené z Krass 2013.

3.6. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou voľnej difúzie

Táto metóda využíva voľnú difúziu medzi koncentrovaným roztokom proteínu a zrážacieho činidla pre dosiahnutie stavu supersaturácie roztoku potrebnej na tvorbu nukleačných jadier a následný rast kryštálov. Proteínové a zrážacie roztoky sa vrstvia priamo nad sebou v kapiláre, ktorej konce sú utesnené voskom [Salemme, 1972]. Takýto systém pomaly interdifunduje a dosahuje rovnováhu fenoménom protiprúdovej difúzie [Krauss, 2013]. Na začiatku interdifúzie je miesto vzájomného kontaktu, rozhranie medzi oboma roztokmi v stave supersaturácie, čo indukuje tvorbu nukleačných jadier, ktoré slúžia ako miesto ďalšieho rastu proteínových kryštálov [Salemme, 1972]. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou voľnej difúzie nie je široko využívanou vzhľadom na veľký objem vzorky, ktorý je potrebný pre kryštalizáciu či náročnosť vytvorenia vhodného rozhrania [Krauss, 2013].

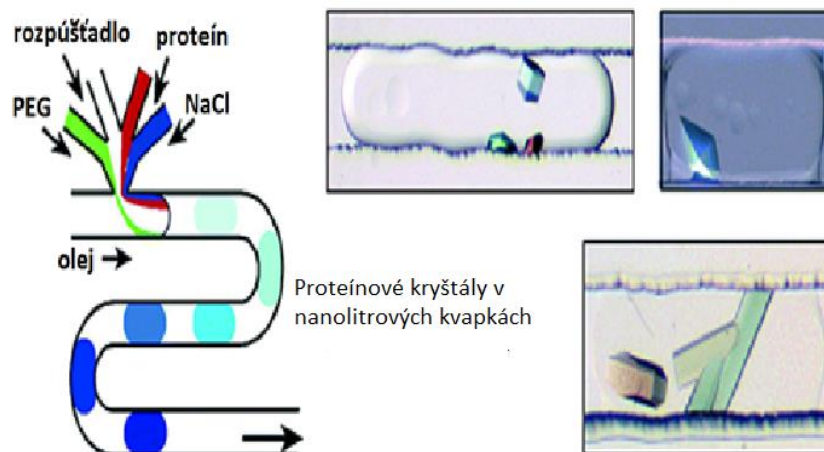


Obr. 8: Schéma kryštalizácie proteínov metódou voľnej difúzie. Prekreslené z Krauss 2013.

3.7. Metóda kryštalizácie proteínov pomocou mikrofluidík

Ide o jednu z novo sa vyvíjajúcich metód, umožňujúcich pracovať s malými množstvami proteínov s pomerne vysokou rýchlosťou kryštalizácie a jednoduchou koncovou manipuláciou kryštálov pre röntgenovú difrakčnú analýzu [Zheng, 2004]. Celá metóda je založená na prúdení tekutín v kapilárach, pričom jednotlivé deje sú závislé na tzv. Reynoldsovom čísle, ktoré dáva do súvislosti rýchlosť prietoku, viskozitu a rozmery kapilár [Whitesides, 2006]. Pri procese kryštalizácie proteínov sa na povrchu kapiláry s nosnou kvapalinou umiestnia kapiláry obsahujúce proteín, zrážadlo, rozpúšťadlo a rôzne aditíva. Dochádza k prechodu a zmiešaniu jednotlivých zložiek kapilár do nosnej kvapaliny. V závislosti od rýchlosti prechodu jednotlivých zložiek možno regulovať ich výsledný obsah v kryštalizačných systémoch vo vedúcej kvapaline. Cieľom je dosiahnutie labilnej oblasti

supersaturácie hneď po zmiešaní jednotlivých zložiek kapilár. Následne po ustálení a ukončení prúdenia môže dôjsť ku kryštalizácii proteínu v jednotlivých vrstvách kapiláry [Zheng, 2003].



Obr. 9: Popis metódy kryštalizácie proteínov pomocou mikrofluidík. Prekreslené z Zheng 2003.

4. Hľadanie počiatočných kryštalizačných podmienok a ich optimalizácia

Príprava kvalitných proteínových kryštálov je proces, ktorý sa dá rozdeliť na dve hlavné fázy: hrubý skríning počiatočných podmienok a následná optimalizácia týchto podmienok. Každá fáza sa uskutočňuje s veľmi empirickým prístupom [Shieh, 1995].

Hľadanie počiatočných podmienok je pomerne náročný proces, ktorý závisí od existencie veľkého množstva kombinácií jednotlivých zložiek. Zmena každej zložky v systéme môže ovplyvniť celý priebeh kryštalizácie [Chirgadze, 2001].

Určenie vhodného zloženia kryštalizačného systému proteínov uľahčujú už vopred existujúce vývojové diagramy alebo kryštalizačné databázy, z ktorých možno vychádzať pri hľadaní vhodných počiatočných podmienok [Mcpherson, 1990].

Počiatočné podmienky kryštalizácie proteínov zahŕňajú možnosť optimalizácie niekoľkých premenných, ako je pH, teplota, iónová sila, typ a špecifické koncentrácie solí, organických prísad a detergentov. Pre zlepšenie je nutné dosiahnuť optimálny stav jednotlivých zložiek kryštalizačného systému pre získanie dostatočne kvalitných mono-kryštálov, vhodných pre röntgenovú difrakčnú analýzu [Stevens, 2000]. Optimálny stav kryštalizácie

získavame modifikáciou zloženia kryštalizačného systému smerom k postupnému zvyšovaniu nerozpustnosti požadovanému pre vznik nukleačných jadier [Kutá Smatanová, 2013].

Optimalizácia kryštalizačných podmienok bola výrazne zjednodušená konštrukciou automatizovaných systémov (robotov), ktoré sú schopne rýchlo vykonať veľké množstvo kryštalizačných pokusov a dávkovať nanolitrové objemy kvapalín. Ďalej znižujú množstvo chýb experimentátora, umožňujú skúmanie väčšieho počtu parametrov kryštalizácie, skracujú čas tvorby kryštálov, čo umožňuje ich rýchlejšiu analýzu, znižujú náklady pre celkový proces [Krauss 2013].

Kryštalizácia proteínov je dynamický proces, ktorý môže byť narušený veľkým množstvom chemických, biochemických alebo fyzikálnych vplyvov, ako už bolo spomenuté. Práve prítomnosť koordinačnej zlúčeniny v kryštalizačnej kvapke môže pôsobiť negatívne na iónovú silu, rozpustnosť alebo konformáciu kryštalizovaného proteínu a tým negatívne vplývať na celý proces kryštalizácie proteínu. Ako jeden zo spôsobov eliminácie niektorých z uvedených interakčných efektov na proces kryštalizácie proteínu, je možné zvoliť statickú techniku namáčania proteínových kryštálov do roztoku vybranej koordinačnej zlúčeniny. V dôsledku prítomnosti kanálov, vytvorených molekulami rozpúšťadla v proteínovom kryštáli, môže preniknúť koordinačná zlúčenina rozpustená v namáčacom roztoku až do vnútornej časti proteínového kryštálu [Hampton Research, 2017].

5. Techniky iniciácie kryštalizácie

Počas priebehu kryštalizácie proteínov je častokrát nutné oddeliť proces nukleácie od rastu kryštálov prenosom nukleačného jadra z labilnej oblasti do metastabilnej oblasti supersaturácie. Na tento prenos sa používajú rôzne očkovacie techniky [Demo, 2014]. Očkovacie techniky sa delia na dva typy homogénne a heterogénne. Medzi homogénne typy patria techniky očkovania mikrokryštálmi a makrokryštálmi. Naopak medzi heterogénne typy patria techniky očkovania príbuzným kryštálom a exipatiálna nukleácia [Kutá Smatanová, 2013].

5.1. Technika očkovania mikrokryštálmi

Technika očkovania mikrokryštálmi využíva ako zárodoky mikrokryštály v očkovačom roztoku [Kutá Smatanová, 2013]. Prenos nukleačných jadier je sprostredkovaný pomocou jemnej sklenenej tyčinky [Chirgadze, 2001]. Zásobný roztok mikrokryštálov je zriedený až do štádia, kedy jedna vzorka bude mať v priemere menej ako jedno rezíduum na mikroliter.

Zriedené vzorky sa následne vložia do čerstvého roztoku proteínu a zrážacieho činidla pre ďalší rast. Zriedenie zabezpečí rast jedného alebo malého počtu nukleačných jadier. [Mcpherson-Gavira, 2014].

5.2. Technika očkovania makrokryštálov

Technika očkovania makrokryštálov zahŕňa manipuláciu a prenos kryštálov dostatočnej veľkosti. Je možné ju realizovať pod mikroskopom. Pred prenosom do čerstvého roztoku proteínu so zrážacím činidlom, pre pomalý a usporiadaný rast, musí byť kryštál dôkladne premytý, aby sa odstránili povrchové nečistoty [Mcpherson-Gavira, 2014].

5.3. Technika očkovania príbuzným kryštálom

Očkovanie príbuzným kryštálom je technika, kedy nastáva indukcia rastu vzorku proteínu na kryštálových plochách príbuzného proteínu, o ktorom sa vie, že kryštalizuje (Kutá Smatanová).

5.4. Technika exipatiálnej nukleácie

Exipatiálna nukleácia je rast kryštálov proteínu na vhodnom neproteínovom povrchu. Príkladom môže byť vlákno celulózy, ktoré iniciuje tvorbu kryštálov proteínu. Medzi ďalšie príklady, ktoré uľahčujú nukleáciu, možno zaradiť rôzne minerály, vlákna. Princíp spočíva v interakcii proteínových molekúl, ktoré elektrostaticky, hydrofóbne či inak vzájomne pôsobia s časťami cudzích molekúl. [Mcpherson-Gavira, 2014].

6. Vlastnosti a identifikácia proteínových kryštálov

Vlastnosti proteínových kryštálov vychádzajú z ich kryštalickej mriežky, pozostávajúcej zo slabých neväzbových interakcií medzi jednotlivými makromolekulami proteínu. Tie majú za následok nízku mechanickú odolnosť a vysokú citlivosť na zmeny podmienok. Kryštály proteínov vo svojej štruktúre obsahujú veľké množstvo rozpúšťadla, čo vedie k prítomnosti veľkých kanálov naplnených týmto rozpúšťadlom. Kanály umožňujú difúziu malých molekúl v proteínových kryštáloch. Pre ďalšie štúdium je nutné rozoznať, či sa v systéme nachádzajú kryštály chceného proteínu, alebo kryštály soli. Pred samotným prechodom k rozlišovacím technikám je nutné si uvedomiť možnosť prítomnosti kryštálov soli v systéme, a to na základe použitých zrážadiel a ďalších aditív. Testy pre určenie prítomnosti

proteínových kryštálov vychádzajú z ich vlastností. Najpresvedčivejšou technikou rozoznania kryštálov je samozrejme röntgenová difrakčná analýza, ktorá výsledky poskytne okamžite s vysokou presnosťou [Chirgadze, 2001].

6.1. Test dehydratáciou

Ide o jednoduchú techniku, pri ktorej je kryštál vybratý zo systému rozpúšťadla a ponechaný na vzduchu. Vyparovanie rozpúšťadla z kryštálu proteínu spôsobí jeho postupnú degradáciu. Naopak kryštály soli obsahujú vo svojej štruktúre nízky obsah rozpúšťadla, v dôsledku čoho nedegradujú, ani nemenia svoj vzhľad [Hampton Research, 2017].

6.2. Test drvením

Ide o deštruktívnu techniku, vychádzajúcu z vysokej krehkosti proteínových kryštálov v porovnaní s kryštálmi soli. Proteínové kryštály sa budú ľahko drviť už pri kontakte so špičkou ihly na rozdiel od kryštálov soli, kde sa na rozdrvenie musí vyvinúť značná sila [Chirgadze, 2001].

6.3. Test použitím polarizovaného svetla

Použitie polarizácie svetla pri mikroskopickom sledovaní kryštálov je jednou zo zložitejších techník, pri ktorej však nedochádza k poškodeniu kryštálov proteínu. U mnohých kryštáloch ich index lomu závisí od smeru polarizácie a šírenia svetla, táto vlastnosť sa nazýva birefringencia (dvojlom). Pokiaľ nejde o kubický kryštál, potom kryštalická zrazenina môže byť identifikovaná dvojfarebnosťou. Birefringencia je tak vlastnosťou makromolekulárnych kryštálov, ako aj kryštálov soli, pričom však kryštály soli sú zväčša silno dvojlomné. Túto techniku je dobre vykonávať na skle z toho dôvodu, že plasty, na ktorých sa kryštály nachádzajú, môžu spôsobovať dvojlom [Calero, 2014].

6.4 Test absorpcie farbiva

Test absorpcie farbiva je technikou, pri ktorej dochádza k zmene farby kryštálu proteínu. Zmena sfarbenia je spôsobená prechodom farbiva s malou molekulovou hmotnosťou cez kanály rozpúšťadiel, na rozdiel od kryštálov soli, ktoré takéto kanály nemajú a neabsorbujú malé molekuly farbiva (Hampton Research).

6.5 Test fluorescencie

Test fluorescencie je založený na absorpcii UV žiarenia aromatickými aminokyselinami proteínu, predovšetkým tryptofanu. Takýmto spôsobom môžu byť v zrazenine identifikované proteíny obsahujúce tryptofan od nefluorescenčných kryštálov solí. Koncentrované oblasti proteínových kryštálov na tryptofan po absorpcii UV žiarenia jasne žiaria (Calero 2014).

6.6. Test použitím elektrónovej mikroskopie

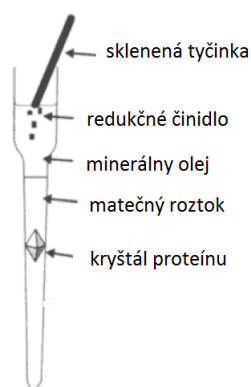
Elektrónová mikroskopia je ďalšou, stále sa rozvíjajúcou technikou pre štúdium proteínovej kryštalizácie, ktorá potenciálne môže zobrazit' rastúce proteínové kryštály a odlíšiť ich od kryštálov solí. Používa sa tiež ako technika pre štúdium kryštalizačného procesu zobrazovaním kryštalizačných podjednotiek. Tiež umožňuje charakterizáciu kryštálov na základe ich difrakcie dopadajúcich elektrónov [Calero, 2014].

6.7. Test ohňom

Test ohňom je znovu veľmi jednoduchou metódou na realizáciu. Vzniknutý kryštál sa vloží pod plameň kahanu až dovtedy, kým sa systém nebude meniť. Pokiaľ sa v sústave zachovávajú kryštály, sú to pravdepodobne kryštály solí, pretože proteínové kryštály by mali pri vyššej teplote degradovať [Hampton Research, 2017].

7. Uchovávanie a príprava kryštálov pred röntgenovou difrakčnou analýzou

Vzniknuté kryštály proteínov sú veľmi citlivé na zmeny vonkajších podmienok, ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole, preto musia byť pre ďalšiu manipuláciu uchovávané v takých podmienkach, aby nedošlo k ich degradácii. Často sa pre ďalšiu prácu používa plastové vrece (glaubox) s rukavicami, napustené interným plynom. Ďalšia možnosť uchovania kryštálov je vloženie pod minerálny olej alebo často používané vloženie do špeciálnej kapiláry (obr. 10). Jeden koniec kapiláry je utesnený zatavením a druhý koniec je utesnený vrstvou minerálneho oleja. Kryštály proteínu sú vložené do matečného lúhu pred utesnením vrchnej časti olejom. Do oleja sa pridáva silné redukčné činidlo, ktoré zabraňuje prechodu kyslíka cez systém. Takýmto spôsobom je možno uchovávať kryštály proteínu pomerne dlhú dobu (maximálna doba okolo jedného roku) [Mcree, 1999].



Obr. 10: Špeciálna kapilára na uchovanie kryštálov proteínu. Prekreslené z Mcree 1999.

Existujú dve techniky prípravy kryštálov pred začiatkom röntgenovej difrakčnej analýzy, ako najpoužívanejšej metódy na získanie informácií o kryštálovej štruktúre, a to tzv. nezmrazovacia a zmrazovacia montáž. Výber je vždy špecifický pre daný typ študovaného proteínu. Pri nezmrazovacej montáži sa používa tenkostenná sklenená kapilára, do ktorej sa vloží študovaný kryštál proteínu, pričom sa odstráni pipetou alebo absorpčným médiom okolitý roztok. Kryštál nikdy nie je úplne vysušený a prilne k stene kapiláry povrchovým napätím. Konce kapiláry sú utesnené olejovými alebo voskovými zátkami a kryštál je udržiavaný v prostredí, ktoré je nasýtené vodnou parou. Hlavnou nevýhodou montáže pri izbovej teplote pre štúdium kryštálov je ich možné poškodzovanie röntgenovým žiarením. Vysoko energetické žiarenie spôsobuje ionizáciu proteínu, čo generuje vznik voľných radikálov a tým aj zvýšenie celkovej teploty kryštálu, ktoré môžu výrazne poškodiť študovaný kryštál. Zmrazovacia montáž je o niečo zložitejšou technikou na realizáciu. Kryštál proteínu sa vloží do slučky na kovovom kolíku, celý systém je upevnený na magnetickom podstavci, ktorý sa následne vkladá na goniostat. Aby sa znížilo poškodenie kryštálu röntgenovým žiarením, využíva sa ochladenie kryštálu parami kvapalného dusíka či kvapalným propánom. Kryštály proteínu obsahujú veľké množstvo rozpúšťadla, ktoré môže pri nízkych teplotách tvoriť mikrokryštály pevnej fázy. Aby sa tomu zamedzilo, využívajú sa látky nazývané kryoprotektanty, najčastejšie glycerol alebo etylénglykol. Pridaním kryoprotektantov dochádza k tvorbe amorfnej pevnej fázy rozpúšťadla podobnej sklu. Častokrát sa indukuje proces kryštalizácie v glycerole, čo umožňuje kontakt kryoprotektantu so vzniknutým kryštálom proteínu bez toho, aby musel byť následne prenášaný do ďalších roztokov glycerolu. Voľba koncentrácie kryoprotektantu, do ktorého bude proteínový kryštál vložený, závisí od samotných podmienok kryštalizácie. Voľné radikály sa pri interakcii s röntgenovým žiarením stále vytvárajú, ale sú uzamknuté na mieste v zmrazenom kryštále [Jeffrey, 2006].

IV. Experimentálna časť

Zoznam použitých chemikálií

V nasledujúcej tabuľke je uvedený zoznam použitých chemikálií pre proteínovú kryštalizáciu. Látky boli použité bez ďalších úprav alebo čistenia. Látky majú vhodnú čistotu, pre použitie v molekulárnej biológii.

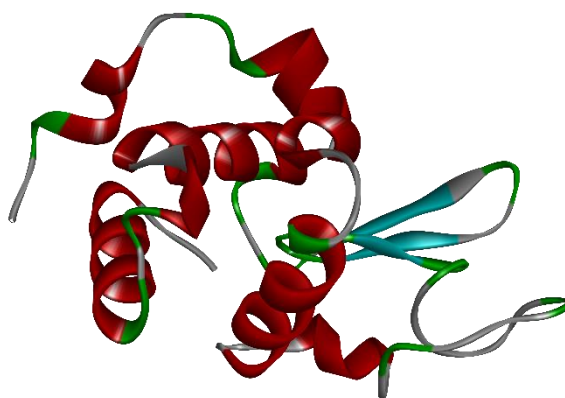
Tabuľka 2. Zoznam použitých chemikálií pre proteínovú kryštalizáciu

chemická látka	zdroj	čistota
NaCl	Sigma-Aldrich	≥98%
CaCl ₂ · 6H ₂ O	Sigma-Aldrich	≥99%
KCl	Sigma-Aldrich	≥99%
KI	Penta	≥99%
NaI	Sigma-Aldrich	≥99%
NaNO ₃	Penta	≥99%
KNO ₃	Sigma-Aldrich	≥99%
Polyetylén glykol 4000	Sigma-Aldrich	≥99%
Polyetylén glykol 2000	Sigma-Aldrich	≥99%
kyselina octová	Penta	≥99%
octan sodný	Sigma-Aldrich	≥99%
voda pre HPLC	Lach-Ner	
lyzozým	Sigma-Aldrich	≥90%

8. Použité systémy proteínu a komplexných zlúčenín pre prípravu monokryštálov systému komplexná zlúčenina-proteín.

8.1 Lyzozým z vaječného bielka (hen egg-white lysozyme)

Bol objavený Alexandrom Flemingom už v roku 1921, ktorý si ako prvý všimol jeho antibakteriálne účinky. Takmer o storočie neskôr vaječný lyzozým slúži ako základný model v proteínovej chémii, enzymológii, kryštalografii i v molekulárnej biológii. Vaječný lyzozým patrí do skupiny lyzozýmov označovaných ako typ c. Je hydrolytickým enzýmom schopným štiepiť $\beta(1,4)$ -glykozidovú väzbu medzi kyselinou *N*-acetylmuramovou a *N*-acetylglukozamínom v peptidoglykáne, z čoho vyplýva jeho antibakteriálna funkcia v biologickom systéme. [Callewaert-Michiels, 2010]. Vaječný lyzozým je malý globulárny proteín dobre rozpustný vo vode a v tlmivých roztokoch.



Obr. 11: 3D model vaječného lyzozýmu získaný z PDB s označením 2A6U (Protein data bank).

Tabuľka 3. Základné vlastnosti vaječného lyzozýmu.

vaječný lyzozým	molekulová hmotnosť (Da)	izoelektrický bod	parametre základnej bunky (Å, °)		priestorová grupa
identifikácia štruktúry PDB kód 2A6U	14331,16	9,32	a = 78,83 b = 78,83 c = 38,16	$\alpha = 90$ $\beta = 90$ $\gamma = 90$	$P4_32_12$

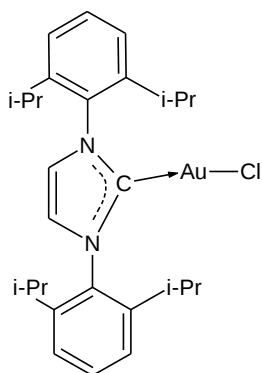
8.2 Použité komplexné zlúčeniny

Koordinačné zlúčeniny použité na kokryštalizačné experimenty boli poskytnuté zo zbierok Oddelení biologicky aktívnych komplexů RCPTM, konkrétne Dr. Pawlom Jewulom (komplexy Au) a doc. Pavlom Štarhom (komplex Ta). Všetky použité komplexné zlúčeniny vykazujú zaujímavé biologické vlastnosti a reprezentujú dve modelové skupiny komplexov, ktorých syntéza v súčasnosti prebieha na uvedenom pracovisku.

Uvedené látky boli vybrané s cieľom (v prípade úspešného vyriešenia problému kokryštalizácie a úspešného stanovenia štruktúry interagujúceho systému) bližšie poznať mechanizmus biologickej aktivity týchto potenciálnych liečiv a popísať ich správanie v biologických systémoch.

Komplex PJ00

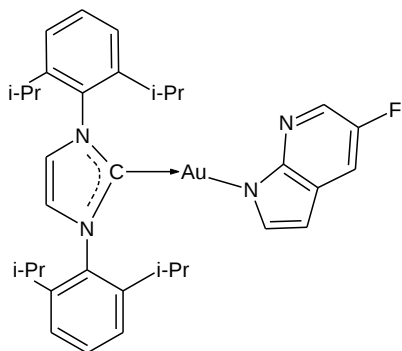
Biela kryštalická látka. Sumárny vzorec: $C_{27}H_{36}AuClN_2$



Obr. 12: Štruktúrny vzorec komplexnej zlúčeniny s označením PJ00.

Komplex PJ02

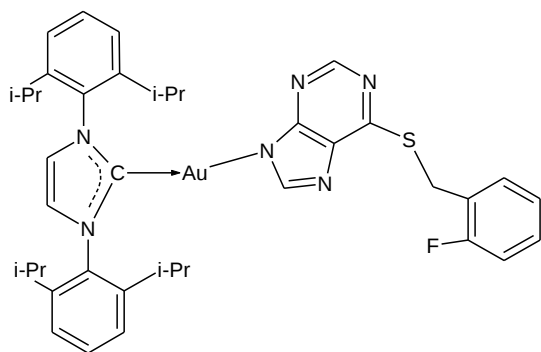
Biela kryštalická látka. Sumárny vzorec: $C_{35}H_{42}AuFN_4$



Obr. 13: Štruktúrny vzorec komplexnej zlúčeniny s označením PJ02.

Komplex PJ03

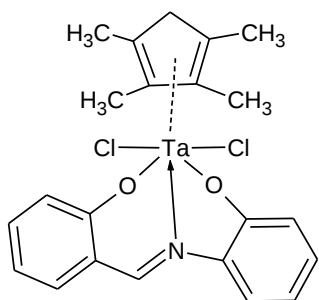
Biela kryštalická látka. Sumárny vzorec: $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{AuFN}_6\text{S}$



Obr. 14: Štruktúrny vzorec komplexnej zličeniny s označením PJ03.

Komplex Ta

Oranžová kryštalická látka. Sumárny vzorec: $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Ta}$



Obr. 15: Štruktúrny vzorec komplexnej zlúčeniny s označením Ta.

8.3. Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria je jednou z nenahraditeľných techník pre štúdium celých molekúl proteínu, ale možno ju tiež využiť pre štúdium interakcii nízkomolekulárnych látok s proteínmi. Pri štúdiu proteínov sa najčastejšie používajú najšetrnejšie ionizačné techniky a to ionizácie elektrosprejom a matricou- asistovaná ionizácia laserom. Hmotnostná spektrometria nám tiež môže poskytnúť informácie o čistote vzorku a o počte disulfidových mostíkov [Trávníček, 2014].

Pred samotným začiatkom kryštalizácie proteínov s komplexnými zlúčeninami bol vykonaný experiment na prístroji LCQ Fleet Ion Mass Trap MS od firmy Thermo Scientific s 3D iónovou pascou a ionizáciou elektrosprejom, na základe, ktorého bola dokázaná interakcia komplexných zlúčenín PJ00 a PJ02, s lyzozýmom. Vzorky pre analýzu hmotnostnou spektrometriou obsahovali proteín o koncentrácii 6 mg/ml a vyššie spomenuté komplexné zlúčeniny o koncentrácii 3 mg/ml v celkovom objeme 200µl zmesi acetonitril/voda 1:1 (v/v). Namerané ESI-MS spektrá interagujúcich systémov po 24 hodinovej inkubácii pri laboratórnej teplote boli podrobené dekonvolúcii pomocou programu ProMass 3.0 for Xcalibur, rev. 10.

9. Postup kokryštalizácie lyzozýmu s komplexnými zlúčeninami PJ00, PJ02, PJ03 a Ta

Pre kokryštalizáciu lyzozýmu, rozpusteného vo vode 25mg/ml, s komplexnými zlúčeninami PJ00, rozpusteného vo vode 1mg/160 µl, PJ02, rozpusteného vo vode 1mg/140, PJ03, rozpusteného vo vode 1mg/120 µl a Ta, rozpusteného vo vode 1mg/170 µl, bola zvolená metóda visiacej kvapky. Matečný roztok obsahoval zrážadlo 25% roztok PEG, vybranú soľ a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou pH=4,8. Do jamiek bol napipetovaný výsledný objem 1ml všetkých vyššie uvedených zložiek matečného roztoku, a to v pomere 1:1:1. Výsledná kryštalizačná kvapka mala objem približne 20µl, pričom pozostávala z 10µl roztoku proteínu a 10 µl matečného roztoku s roztokom komplexnej zlúčeniny, a to v presne v stanovenom objemovom pomere. Roztoky použitých komplexov boli riedené matečným roztokom, a to v objemovom pomere 1:1 , 1:2 , 1:3 a 1:4. Koncentrácia komplexnej zlúčeniny v kryštalizačnej kvapke klesala vo všetkých radoch zľava doprava. Pre elimináciu chyby boli nasadené dva identické rady na kryštalizačnej platni. Kryštalizácia prebiehala pri 4°C a za atmosférického tlaku. Prvé dva rady kryštalizačnej platne obsahovali vždy v kryštalizačnej kvapke komplexnú zlúčeninu PJ00. Druhé dva rady obsahovali komplexnú zlúčeninu PJ02,

tretie dva rady obsahovali komplexnú zlúčeninu PJ03 a štvrté dva rady obsahovali komplexnú zlúčeninu Ta. Už pri nasadení kryštalizačných kvapiek sa všetky použité komplexné zlúčeniny menej či viac zrážali s použitým matečným roztokom. Za rovnakých podmienok bol nasadený tiež čistý lyzozým, ktorý slúžil ako referenčný štandard k výslednému pozorovaniu makroskopických odchýlok kryštálov lyzozýmu kryštalizujúcich s komplexnými zlúčeninami s rôznym pomerom [Dessau, 2011].

Optimalizácia kryštalizačných podmienok lyzozýmu kryštalizujúceho s komplexnými zlúčeninami PJ00, PJ02, PJ03 a Ta, pozostávala zo zmeny ako používanej soli, tak používaného zrážadla, na základe čoho bolo vykonaných desať kryštalizačných experimentov, ktoré sa odlišovali zložením matečného roztoku. Konkrétne zloženie matečného roztoku zobrazuje tabuľka 4.

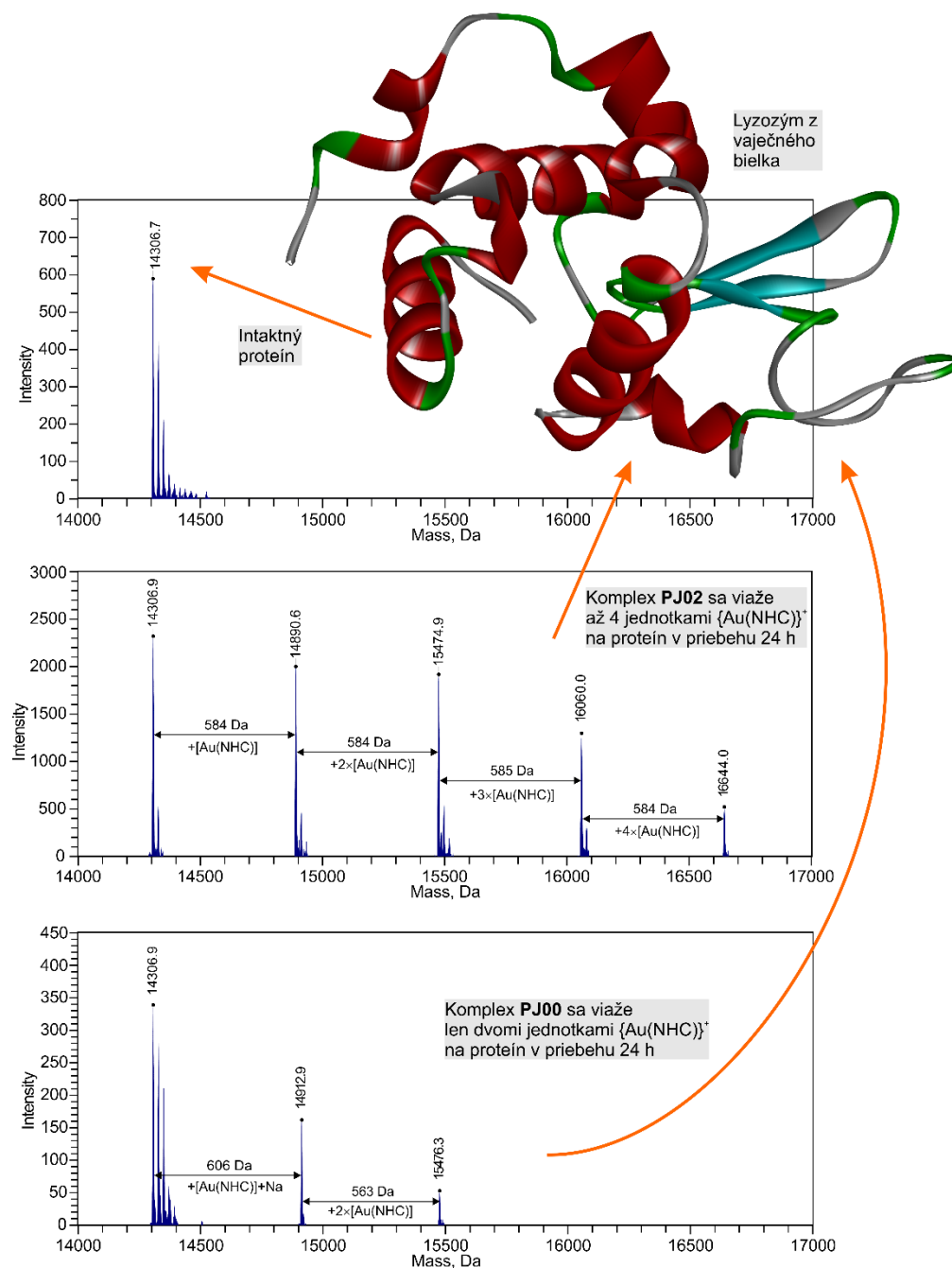
Tabuľka 4. *Prehľad obsahu všetkých nami použitých kryštalizačných experimentov pre optimalizáciu kryštalizácie lyzozýmu..*

	zrážadlo	soli	tlmivý roztok
Experiment 1	PEG 2000	10% roztok NaCl	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 2	PEG 4000	10% roztok NaCl	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 3	PEG 4000	5% roztok NaCl	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 4	PEG 4000	10% roztok KCl	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 5	PEG 2000	10% roztok KI	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 6	PEG 4000	10% roztok NaI	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 7	PEG 2000	10% roztok NaI	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 8	PEG 4000	10% roztok CaCl ₂	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 9	PEG 4000	10% roztok NaNO ₃	0,1M octanový tlmivý roztok
Experiment 10	PEG 4000	10% roztok KNO ₃	0,1M octanový tlmivý roztok

V. Výsledky a diskusia

10. Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria bola použitá k potvrdeniu interakcie vybraných komplexných zlúčenín s modelovým proteínom lyzozýmom.



Obr. 16: Porovnanie dekonvoluovaných spektier systémov obsahujúcich intaktný lyzozým (*horný panel*), interakčný systém obsahujúci komplex PJ02 a lyzozým (*stredný panel*) a interakčný systém obsahujúci komplex PJ00 a lyzozým (*dolný panel*).

Namerané ESI-MS spektrá interagujúcich systémov po 24 hodinovej inkubácii pri laboratórnej teplote boli podrobené dekonvolúcii pomocou programu ProMass 3.0 for Xcalibur, rev. 10. Porovnanie schopnosti interakcie zlatných karbénových komplexov PJ00 a PJ02 odhalilo významne vyššiu afinitu komplexu PJ02 k molekule lyzozýmu, čo potvrdila vyššia miera väzby podjednotiek $\{\text{Au}(\text{NHC})\}^+$ na molekulu proteínu. V prípade chlorido-komplexu PJ00 sa naviazali na molekulu lyzozýmu len 2 podjednotky zloženia $\{\text{Au}(\text{NHC})\}^+$, zatiaľ čo pri interakcii komplexu PJ02 s lyzozýmom sa ich za 24 hodín inkubácie naviazali na molekulu proteínu až 4 podjednotky zloženia $\{\text{Au}(\text{NHC})\}^+$. Získané výsledky jednoznačne potvrdili schopnosť priamej kovalentnej interakcie uvedených komplexov na modelový proteín.

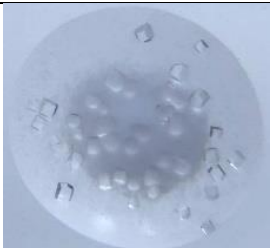
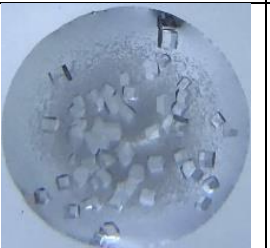
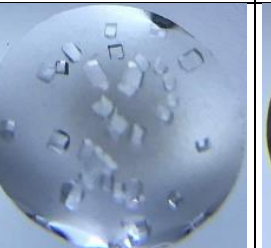
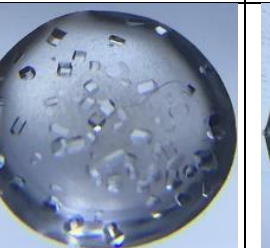
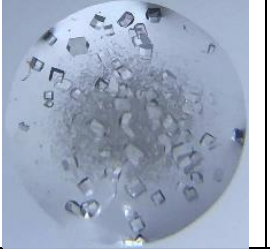
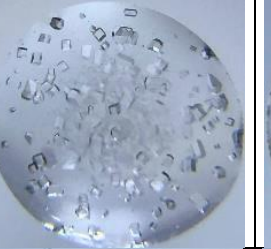
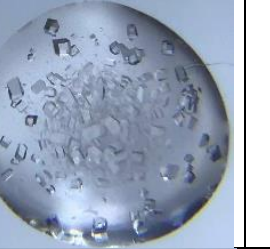
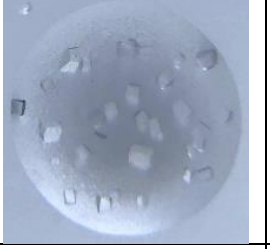
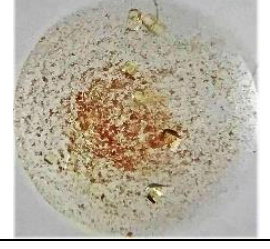
Ďalšie merania naopak nepotvrdili kovalentnú interakciu komplexu Ta s lyzozýmom, ale žlté sfarbenie získaných kryštálov lyzozýmu kokryštalizovaného s komplexom Ta, naznačuje, že tento komplex interaguje s molekulou lyzozýmu pravdepodobne prostredníctvom neväzbových interakcií.

11. Výsledky kryštalizačných experimentov

11.1. Experiment 1

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 1, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 2000, soľ 10% roztok NaCl a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou pH=4,8. Prvé kryštály sa objavili približne dva dni od nasadenia kryštalizačných kvapiek, a to v sériách komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Po siedmich dňoch od nasadenia kryštalizačných kvapiek sa kryštály nachádzali vo všetkých kryštalizačných kvapkách série komplexov PJ00, PJ02 a PJ03. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 mali vzájomne veľmi podobnú veľkosť, sfarbenie i tvar. Išlo prevažne o kryštály bez zafarbenia s približne rovnakým tvarom a veľkosťou v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 v kryštalizačnej kvapke pri vhodnej koncentrácii mierne urýchlila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne tri dni. V sérii komplexnej zlúčeniny Ta sa prvé kryštály objavili až po šesťdesiatich dňoch od nasadenia, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 , 1:3 a 1:4. Vylúčené kryštály mali žlté sfarbenie, s mierne odlišným tvarom a veľkosťou v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Pri pôsobení svetla na kryštalizačné kvapky pri ich pozorovaní došlo k zmene sfarbenia oranžových kryštalizačných kvapiek na číre, čo mohlo pozmeniť rýchlosť kryštalizácie, kedy sa výrazne predĺžila doba kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok.

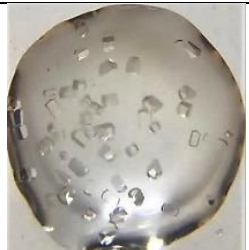
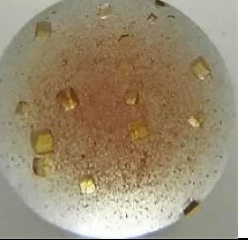
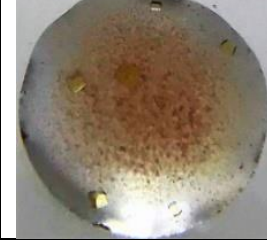
Tabuľka 5. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 1. Použité zrážadlo PEG 2000 a 10% roztok NaCl.

Pomer roztoku komplexnej zložieniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta		bez kryštálov			

11.2. Experiment 2

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 2, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok NaCl a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou pH=4,8. Prvé kryštály sa objavili približne tri dni od nasadenia vo všetkých sériách komplexov v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Po desiatich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili vo všetkých kryštalizačných kvapkách série komplexov PJ00, PJ02, PJ03 a Ta. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 mali vzájomne veľmi podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo prevažne o kryštály bez zafarbenia s približne rovnakým tvarom a veľkosťou v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali výrazne žlté sfarbenie s mierne odlišným tvarom a veľkosťou v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Tvarovo aj veľkosťou sa kryštály najviac odlišovali od kryštálov čistého lyzozýmu v kryštalizačnej kvapke s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4 a 1:1. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02, PJ03 a Ta pri vhodnej koncentrácii v kryštalizačných kvapkách, veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá sa pohybovala približne okolo troch dní.

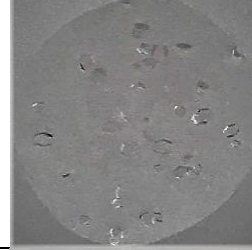
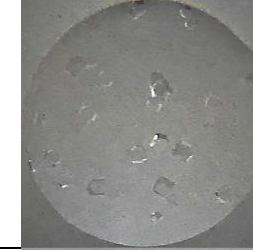
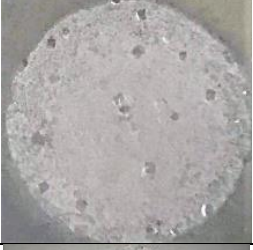
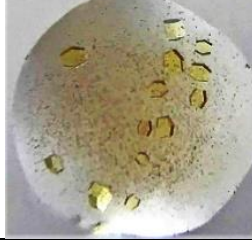
Tabuľka 6. *Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 2. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok NaCl.*

Pomer objemu roztoku komplexnej zlučiny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.3. Experiment 3

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 3, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 5% roztok NaCl a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne šesť dní od nasadenia, a to v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, vo všetkých kryštalizačných kvapkách a v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Približne tridsať dní od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexných zlúčenín PJ00 a PJ03 vo všetkých kryštalizačných kvapkách. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali malú veľkosť, výrazne žlté sfarbenie a mierne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Tvarovo sa kryštály najviac odlišovali od kryštálov čistého lyzozýmu v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4 a 1:1. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 mali vzájomne veľmi podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo prevažne o kryštály bez zafarbenia s približne rovnakým tvarom a veľkosťou v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčeniny PJ00, PJ02, PJ03 a Ta v kryštalizačnej kvapke predĺžila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne tri dni od nasadenia.

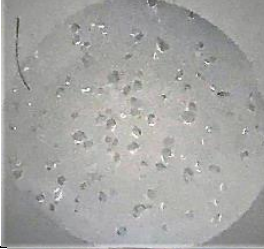
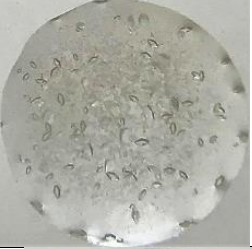
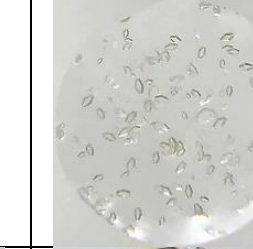
Tabuľka 7. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 3. Použité zrážadlo PEG 4000 a 5% roztok NaCl.

Pomer objemu roztoku komplexnej zložieniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02	bez kryštálov				
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.4. Experiment 4

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 4, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok KCl a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne po dvoch dňoch od nasadenia, a to v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00 vo všetkých kryštalizačných kvapkách, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02 v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3, 1:4. Po štyroch dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Približne sedem dní od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4. Približne po dvadsiatich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Po tridsiatich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, 1:2 a 1:3. V sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 mali kryštály lyzozýmu vzájomne veľmi podobnú sfarbenie, tvar a veľkosť. Išlo o kryštály bez zafarbenia, malej veľkosti, s výrazne odlišným tvarom od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. V sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali kryštály lyzozýmu žlté sfarbenie, malú veľkosť a výrazne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 pri vhodnej koncentrácii v kryštalizačných kvapkách veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá sa pohybovala približne okolo troch dní. Prítomnosť komplexnej zlúčeniny Ta v kryštalizačných kvapkách naopak predĺžila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu.

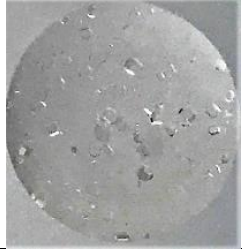
Tabuľka 8. *Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 4. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok KCl.*

Pomer objemu roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02	bez kryštálov				
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.5. Experiment 5

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 5, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 2000, soľ 10% roztok KI a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne dva dni od nasadenia, a to v sérii komplexov PJ02 v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4, ďalej v sérii komplexu Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Po približne piatich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili v sérii komplexu PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Približne po siedmich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili v sérii komplexu PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Približne po dvadsiatich dvoch dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Po približne tridsiatich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Kryštály v sérii komplexov PJ00, PJ02 a PJ03 mali vzájomne veľmi podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo prevažne o malé kryštály bez zafarbenia, s mierne odlišným tvarom od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexu Ta mali slabo žlté sfarbenie, malú veľkosť a mierne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ02 a Ta pri vhodnej koncentrácii v kryštalizačných kvapkách urýchlila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie čistého lyzozýmu, ktorá sa pohybovala približne okolo štyroch dní. Naopak prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00 a PJ03 v kryštalizačných kvapkách predĺžila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu.

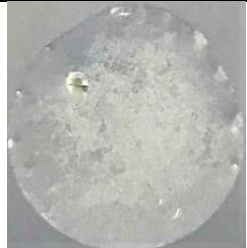
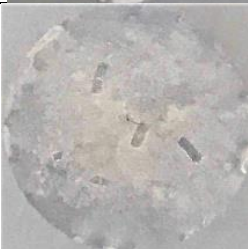
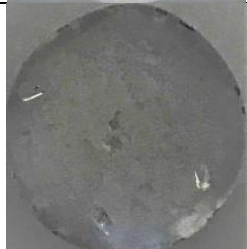
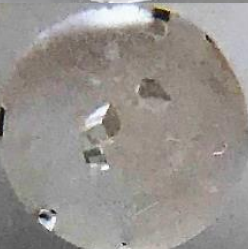
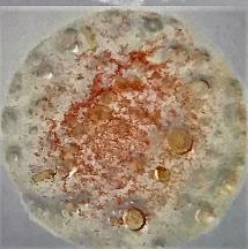
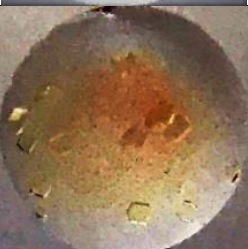
Tabuľka 9. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 5. Použité zrážadlo PEG 2000 a 10% roztok KI.

Pomer objemu roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03	bez kryštálov	bez kryštálov			
Séria komplexu Ta					

11.6. Experiment 6

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 6, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok NaI a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne po štyroch dňoch od nasadenia v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Po siedmich dňoch od nasadenia kryštály sa objavili v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02 v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4 a v sérii komplexnej zlúčeniny Ta v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Po dvanástich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, 1:2 a 1:3. Po približne pätnástich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, 1:2 a 1:3, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Po tridsiatich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Kryštály v sérii komplexu PJ00 mali malú veľkosť, bez zafarbenie a veľmi podobný tvar ako kryštály čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexu PJ02 mali značnú veľkosť, číre sfarbenie a mierne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexu PJ03 mali číre zafarbenie približne rovnakú veľkosť a tvar ako kryštály čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexu Ta mali žlté sfarbenie, približne rovnakú veľkosť a tvar ako kryštály čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexnej zlúčeniny PJ03 pri vhodnej koncentrácii veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne štyri dni. Naopak prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a Ta v kryštalizačných kvapkách predĺžila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu.

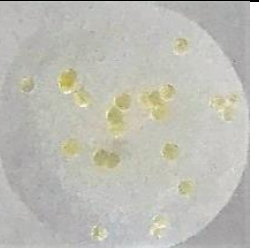
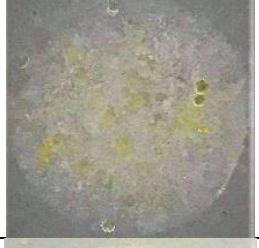
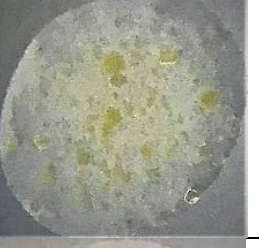
Tabuľka 10. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 6. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok NaI.

Pomer objemu roztoku komplexnej zlučieniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.7. Experiment 7

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 7, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 2000, soľ 10% roztok NaI a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne po dvoch dňoch od nasadenia v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4 a v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Po približne štyroch dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, 1:3 a 1:4. Po dvanástich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Približne trinásť dní od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1. Kryštály v sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02, PJ03 pri rovnakých koncentráciách v kryštalizačných kvapkách mali podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo o kryštály žltého sfarbenia, s veľmi podobným tvarom a veľkosťou kryštálom čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta boli prevažne zrastlice, tvorené z malých oranžovo žltých kryštálov s výrazne odlišným tvarom od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02, PJ03 a Ta vhodnej koncentrácie veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá trvala približne tri dni.

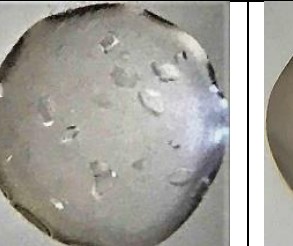
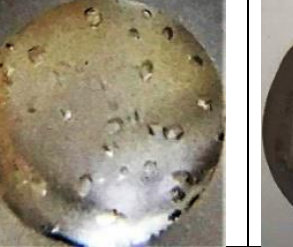
Tabuľka 11. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 7. Použité zrážadlo PEG 2000 a 10% roztok NaI..

Pomer objemu roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02	bez kryštálov				
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.8. Experiment 8

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 8, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok CaCl_2 a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne po dvoch dňoch od nasadenia v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00 v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4, ďalej sa kryštály objavili v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4 a v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Po približne piatich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:4. Po približne trinástich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a 1:2, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a 1:2. Po približne dvadsiatich dňoch od nasadenia sa kryštály objavili v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a 1:2, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1, 1:2 a 1:3. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 pri rovnakých koncentráciách v kryštalizačných kvapkách mali vzájomne veľmi podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo o kryštály bez zafarbenia, s približne rovnakou veľkosťou a tvarom v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali mierne žlté sfarbenie, približne rovnakú veľkosť a tvar ako kryštály čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 vhodnej koncentrácie veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne dva dni. Prítomnosť komplexnej zlúčeniny Ta v kryštalizačnej kvapke predĺžila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu.

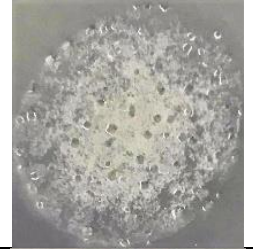
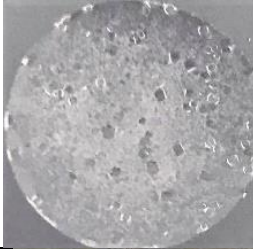
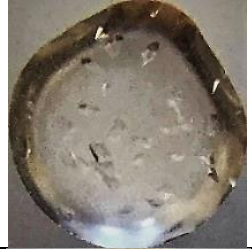
Tabuľka 12. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 8. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok CaCl_2 .

Pomer objemu roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

11.9. Experiment 9

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu 9, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok NaNO_3 a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne tri dni od nasadenia v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00 vo všetkých kryštalizačných kvapkách, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Po troch dňoch kryštály sa objavili v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4 a v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4. Po približne pätnástich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a 1:2, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:1 a 1:2. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00 mali číre sfarbenie, malú veľkosť a výrazne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúcich za rovnakých podmienok. Výnimkou boli kryštály v kryštalizačnej kvapke s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:2, ktoré mali väčšiu veľkosť a výrazne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, tak od kryštálov v celej sérii komplexu PJ00. Kryštály lyzozýmu v sérii komplexov zlúčenín PJ02, PJ03 v kryštalizačných kvapkách mali podobnú veľkosť, sfarbenie a tvar. Išlo o kryštály malej veľkosti, bez zafarbenia, s výrazne odlišným tvarom od čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. V sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali kryštály malú veľkosť, žlte sfarbenie a výrazne odlišný tvar od kryštálov čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00, PJ02, PJ03 a Ta vhodnej koncentrácie veľmi málo ovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne tri dni.

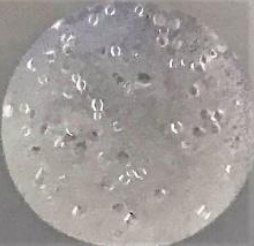
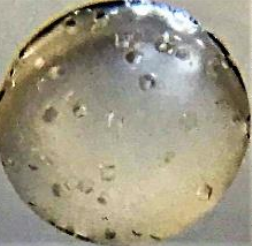
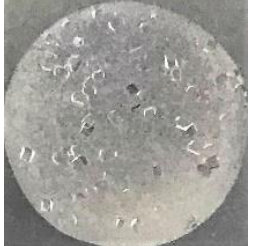
Tabuľka 13. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 9. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok NaNO₃.

Pomer objemu roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta	bez kryštálov	bez kryštálov			

11.10. Experiment 10

Popis kryštálov z kryštalizačnej platne experimentu: 10, ktorej matečný roztok obsahoval zrážadlo PEG 4000, soľ 10% roztok KNO_3 a 0,1M octanový tlmivý roztok s hodnotou $\text{pH}=4,8$. Prvé kryštály sa objavili približne tri dni od nasadenia v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému roztoku 1:3 a 1:4, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:3 a 1:4 a v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:2, 1:3 a 1:4. Po približne siedmich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:3 a 1:4. Po pätnástich dňoch od nasadenia sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ00, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:1 a 1:2, ďalej v sérii komplexnej zlúčeniny Ta, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:1. Po približne dvadsiatich dňoch sa objavili kryštály v sérii komplexnej zlúčeniny PJ02, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:1 a 1:2 a v sérii komplexnej zlúčeniny PJ03, a to v kryštalizačných kvapkách s pomerom roztoku komplexnej zlúčeniny k matečnému 1:1 a 1:2. V sérii komplexných zlúčenín PJ00, PJ02 a PJ03 mali kryštály lyzozýmu vzájomne veľmi podobnú farbu, tvar a veľkosť. Išlo o kryštály bez zafarbenia, malej veľkosti, s mierne odlišným tvarom s kryštálmi čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. V sérii komplexnej zlúčeniny Ta mali kryštály mierne žlté sfarbenie, veľmi podobný tvar a veľkosť ako kryštály čistého lyzozýmu, kryštalizujúceho za rovnakých podmienok. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ00 a PJ02 v kryštalizačných kvapkách pri vhodnej koncentrácii mierne urýchlila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu, ktorá bola približne sedem dní. Prítomnosť komplexných zlúčenín PJ03 a Ta v kryštalizačných kvapkách pri vhodnej koncentrácii nijako výrazne neovplyvnila dobu kryštalizácie v porovnaní s dobou kryštalizácie kryštálov čistého lyzozýmu.

Tabuľka 14. Kryštály lyzozýmu v jednotlivých sériách komplexov v experimente 10. Použité zrážadlo PEG 4000 a 10% roztok KNO_3 .

Pomer objemu roztoku komplexnej zlučiny k matečnému roztoku	1:1	1:2	1:3	1:4	čistý lyzozým
Séria komplexu PJ00					
Séria komplexu PJ02					
Séria komplexu PJ03					
Séria komplexu Ta					

Na základe celkového zhodnotenia optimálnych podmienok kokryštalizácie komplexov PJ00, PJ02, PJ03 a Ta s lyzozýmom (na základe kvalitatívneho zhodnotenia získaných kryštálov) je možné pre uvedené dve skupiny koordinačných zlúčenín odporučiť nasledovné kokryštalizačné podmienky:

1. Skupina karbénových komplexov zlata (komplexy s označením PJ00, PJ02 a PJ03):
Matečný roztok s obsahom zrážadla PEG 2000, solí 10% roztoku NaCl a 0,1M octanového tlmivého roztoku s hodnotou pH=4,8, s výsledným objemom 1ml všetkých vyššie uvedených zložiek matečného roztoku, a to v pomere 1:1:1. O objeme kryštalizačnej kvapky 20 μ l, pozostávajúcej z 10 μ l roztoku proteínu a 10 μ l roztoku komplexnej zlúčeniny s matečného roztokom, v objemovom pomere 1:2, 1:3 a 1:4.
2. Komplex s označením Ta:
Matečný roztok obsahom zrážadla PEG 4000, solí 10% roztoku KNO₃ a 0,1M octanového tlmivého roztoku s hodnotou pH=4,8, s výsledným objemom 1ml všetkých vyššie uvedených zložiek matečného roztoku, a to v pomere 1:1:1. O objeme kryštalizačnej kvapky 20 μ l, pozostávajúcej z 10 μ l roztoku proteínu a 10 μ l roztoku komplexnej zlúčeniny s matečného roztokom, v objemovom pomere 1:3 a 1:4.

Celková experimentálna práca na riešení zadanej témy bakalárskej práce zahŕňala zároveň kokryštalizáciu uvedených komplexných zlúčenín s hovädzím cytochrómom c, avšak celý proces optimalizácie týchto kryštalizačných experimentov bol natoľko časovo náročný, že stále pokračuje. Aj preto sa zatiaľ nepodarilo optimalizovať proces kryštalizácie hovädzieho cytochrómu c k získaniu kvalitných monokryštálov. Nedávno bol zaradený k vyššie zmieneným proteínom tiež ľudský sérový albumín, kde sa podarilo po početných optimalizáciách pripraviť kryštály čistého proteínu, ktoré sa začali vylučovať približne po tridsiatich dňoch od nasadenia kryštalizačných kvapiek. Na tomto modelovom proteíne, interakcia s ktorým môže naznačiť správanie sa komplexov pri intravenóznom podaní, budú prebiehať aj do budúcnosti ďalšie kryštalizačné experimenty.

VI. Záver

Hlavným experimentálnym cieľom bakalárskej práce bola optimalizácia kokryštalizácie vybraných biologicky aktívnych koordinačných zlúčenín s modelovými proteínmi a následné kvalitatívne zhodnotenie výsledkov na základe mikroskopickej analýzy vylúčených monokryštálov systému komplexná zlúčenina-proteín. Veľkým počtom optimalizácií kokryštalizačných podmienok, boli nájdené vhodné podmienky pre prípravu monokryštálov systémov vyššie zmienených komplexných zlúčenín s modelovým proteínom lyzozýmom. Mnohé z proteínových kryštálov, kokryštalizovaných za prítomnosti komplexných zlúčenín, vykazovali aspoň mierne makroskopické odchýlky morfológie od kryštálov čistého lyzozýmu. Najväčšie zmeny v porovnaní s kryštálmi čistého lyzozýmu možno pozorovať v prípade organokovového dichlorido-komplexu tantalu s trojdonorovou Schiffovou zásadou vzorca $[\text{Ta}(\text{Cp}^*)(\text{L})\text{Cl}_2]$, kde $\text{H}_2\text{L} = N$ -salicylidén-2-aminofenol. Logickým vyústením práce, nadväzujúcim na výsledky tejto bakalárskej práce, by mala byť analýza štruktúr pripravených systémov komplexná zlúčenina-proteín pomocou röntgenovej difrakčnej analýzy, ktorá by mala poskytnúť informácie o schopnosti a miestach interakcie použitých biologicky aktívnych koordinačných zlúčenín na molekulu použitého proteínu.

Zoznam použitej literatúry

1. ABDALLA, M., et al. Important Factors Influencing Protein Crystallization. *Glob J Biotechnol Biomater Sci* 2 (1): 025, 2016, 28: 025.
2. ASHERIE, Neer. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 2004, 34.3: 266-272.
3. BERNAL, John D.; CROWFOOT, Dorothy. X-ray photographs of crystalline pepsin. *Nature*, 1934, 133.3369: 794.
4. CALERO, Guillermo, et al. Identifying, studying and making good use of macromolecular crystals. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2014, 70.8: 993-1008.
5. CALLEWAERT, Lien; MICHIELS, Chris W. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences*, 2010, 35.1: 127-160.
6. CLEGG, William. Synchrotron chemical crystallography. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2000, 19: 3223-3232.
7. DEMO, Gabriel. *Crystallography of proteins and their complexes with ligands*. 2014. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
8. DESSAU, Moshe A.; MODIS, Yorgo. Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2011, 47.
9. DUMETZ, André C., et al. Effects of pH on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2008, 1784.4: 600-610.
10. DURBIN, S. D.; FEHER, G. Protein crystallization. *Annual review of physical chemistry*, 1996, 47.1: 171-204.
11. GARCIA-RUIZ, Juan Manuel. Nucleation of protein crystals. *Journal of structural biology*, 2003, 142.1: 22-31.
12. GIEGÉ, Richard. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS journal*, 2013, 280.24: 6456-6497.
13. Hampton Research (2017) Crystal Growth [pdf]. Dostupné z < https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/39.pdf > [citovane dňa 2. 8. 2017].
14. HARTIG, Theodor. *Ueber das Verhältniss des Brennwerthes verschiedener Holz-und Torf-Arten für Zimmerheizung und auf dem Kochheerde, etc.* 1855. HE, Baoping Bob; PRECKWINKEL, Uwe; SMITH, Kingsley L. Fundamentals of two-dimensional X-ray diffraction (XRD2). *Advances in X-ray Analysis*, 2000, 43: 273-280.

15. HENDRICKSON, Wayne A. Anomalous diffraction in crystallographic phase evaluation. *Quarterly reviews of biophysics*, 2014, 47.1: 49-93.
16. HOFMEISTER, F. About the science of the effects of salts: About the water withdrawing effect of the salts. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1888, 24: 247-260.
17. HÜNEFELD, Friedrich Ludwig. *Der Chemismus in der thierischen Organisation: Physiologisch-chemische Untersuchungen der materiellen Veränderungen, oder des Bildungslebens im thierischen Organismus; insbesondere des Blutbildungsprocesses, der Natur der Blut körperchen und ihrer Kernchen. Ein Beitrag zur Physiologie und Heilmittellehre.* Brockhaus, 1840.
18. CHAYEN, Naomi E. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, 14.5: 577-583.
19. CHAYEN, Naomi E.; SARIDAKIS, Emmanuel. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature methods*, 2008, 5.2: 147-153.
20. CHIRGADZE, Dima. Protein crystallisation in action. *University of Cambridge*, 2001.
21. JEFFREY, Phil. X-ray Data Collection Course [online]. Dostupné z<
<http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/Guides/XrayDataCollection.html>> , 2006,[citované
dňa 17. 08. 2017].
22. MAREK, Jaromír; TRÁVNÍČEK, Zdeněk. *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza.* Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2002.
23. MCPHERSON, Alexander. Current approaches to macromolecular crystallization. *The FEBS Journal*, 1990, 189.1: 1-23.
24. MCPHERSON, Alexander; CUDNEY, Bob. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2014, 70.11: 1445-1467.
25. MCPHERSON, Alexander; GAVIRA, Jose A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2014, 70.1: 2-20.
26. MCREE, Duncan E. *Practical protein crystallography.* Academic press, 1999.
27. MURRAY, Robert Kincaid. *Harperova biochemie.* H+ H, 2002.
28. NORTHROP, John Howard, et al. Crystalline Enzymes. The Chemistry of Pepsin, Trypsin, and Bacteriophage. *Crystalline Enzymes. The Chemistry of Pepsin, Trypsin, and Bacteriophage.*, 1939.
29. PREYER, William T. *Die Blutkrystalle: Untersuchungen.* Mauke, 1871.
30. RUSSO KRAUSS, Irene, et al. An overview of biological macromolecule crystallization. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.6: 11643-11691.

31. SALEMME, F. R. A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1972, 151.2: 533-539.
32. SHIEH, H.-S., et al. Using sampling techniques in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1995, 51.3: 305-310.
33. SMATANOVÁ, Ivana Kutá. Krystalizace biologických makromolekul [online]. Dostupné z<<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm#ref>> [citované dňa 29. 07. 2017].
34. STEVENS, Raymond C. High-throughput protein crystallization. *Current opinion in structural biology*, 2000, 10.5: 558-563.
35. SUMNER, James B. The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry*, 1926, 69.2: 435-441.
36. TRÁVNÍČEK, Zdeněk; VANČO, Ján; KŘIKALOVÁ, Radka. *Vybrane kapitoly z bioanorganické chemie*. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2014.
37. WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442.7101: 368.
38. ZHENG, Bo, et al. A Droplet-Based, Composite PDMS/Glass Capillary Microfluidic System for Evaluating Protein Crystallization Conditions by Microbatch and Vapor-Diffusion Methods with On-Chip X-Ray Diffraction. *Angewandte chemie international edition*, 2004, 43.19: 2508-2511.
39. ZHENG, Bo; ROACH, L. Spencer; ISMAGILOV, Rustem F. Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *Journal of the American chemical society*, 2003, 125.37: 11170-11171.