

České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra inženýrství pevných látek

Obor: Inženýrství pevných látek



Parametry krystalizace proteinů,  
aplikace na mikrokrystaly

Parameters of protein crystallization,  
application to microcrystals

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Aleš Kravíc

Vedoucí práce: Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.

Rok: 2019



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  
**FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ**  
*Katedra inženýrství pevných látek*

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

*Student:* **Aleš Kravíc**

*Studijní program:* **Aplikace přírodních věd**

*Obor:* **Inženýrství pevných látek**

*Akademický rok:* **2018/2019**

*Název práce:* **Parametry krystalizace proteinů, aplikace na mikrokrystaly**  
*(česky)*

*Název práce:* **Parameters of protein crystallization, application to microcrystals**  
*(anglicky)*

*Pokyny pro vypracování:*

Bakalářská práce je zaměřena na výzkum metodiky růstu proteinových krystalů se speciálním zaměřením na parametry a kvalitu pěstování proteinových nano- a mikrokrystalů. Experimenty budou realizovány Laboratoří Struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR, Centru molekulární struktury Biocev, případně na spolupracujících pracovištích.

Při řešení postupujte podle následujících bodů.

I. Rešeršní/teoretická část

- 1) Základní vlastnosti proteinů z hlediska krystalizace
- 2) Teorie a experimentální metody krystalizace proteinů.
- 3) Metodika zpracování dat

II. Experimentální část

- 1) Popis použitých experimentálních postupů
- 2) Příprava a vlastnosti použitých vzorků
- 3) Realizace experimentů, optimalizace parametrů, ověřování kvality získaných krystalických a nano- nebo mikrokrystalických vzorků
- 4) Výsledky a jejich diskuze

*Doporučená literatura:*

- [1] A. Ducruix, R. Giegil: Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. Oxford University Press, Oxford, 1992.
- [2] T. M. Bergfors: Protein Crystallization, Techniques, Strategies, and Tips. Int. Univ. Line, 1999.
- [3] N. Coquelle, et al.: Nat. Chem. **10** (2018) 31-37.
- [4] S. Boutet, et al.: Science **337** (2012) 362-364.

*Jméno a pracoviště vedoucího práce:*

Ing. Jan Dohnálek, Ph.D, Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocey, Vestec

*Jméno a pracoviště konzultanta:*

Doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D, Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

*Datum zadání bakalářské práce:* 20. 10. 2018

*Termín odevzdání bakalářské práce:* 8. 7. 2019


Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.



.....  
garant



.....  
vedoucí katedry



.....  
děkan

V Praze dne 20. 10. 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne .....

.....

Aleš Kravíc

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval Ing. Janu Dohnálkovi, Ph.D. a Doc. Ing. Petru Kolenkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a skvělý přístup při vedení mé práce a také všem kolegům z Laboratoře struktury a funkce biomolekul Biotechnologického ústavu AV ČR a z Centra molekulární struktury Biocev za technickou podporu, obětavost a užitečné připomínky.

Aleš Kravíc

*Název práce:*

## **Parametry krystalizace proteinů, aplikace na mikrokrystaly**

*Autor:* Aleš Kravíc

*Studijní program:* Aplikace přírodních věd

*Obor:* Inženýrství pevných látek

*Druh práce:* Bakalářská práce

*Vedoucí práce:* Ing. Jan Dohnálek, Ph.D.

Laboratoř Struktury a funkce biomolekul, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Biocev, Vestec

*Konzultant:* Doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.

Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

*Abstrakt:* Makromolekulární krystalografie je v současné době silně ovlivňována používáním krystalografie na mikrokrystalech. Krystalografie na mikrokrystalech je nástroj, který byl vyvinut k analýze krystalů menších, než několik desítek mikrometrů. Umožňuje nám realizovat některé experimenty, které nebyly proveditelné před desítkami let. Vysoce intenzivní rentgenové paprsky, které se generují na synchrotronech, jsou optimální k měření difrakčních dat na mikrokrystalech. Tato práce je zaměřena na výzkum metodiky růstu krystalů lysozymu a thaumatinu se zaměřením na parametry a kvalitu pěstování mikrokrystalů. Parametry krystalizace a metodiky růstu byly zkoumány na lysozymu. Růst mikrokrystalů thaumatinu byl pozorován metodou dynamického rozptylu světla během prvních sedmi hodin od nasazení experimentu. Schopnost mikrokrystalů difraktovat rentgenové záření byla testována metodou práškové difrakce. Aplikovaný postup práškové difrakce se ukázal jako vhodný k prokázání růstu mikrokrystalů. Byla nalezena a ověřena metoda reprodukovatelného pěstování mikrokrystalů v malých objemech.

*Klíčová slova:* mikrokrystaly, metodika růstu krystalů, rentgenová strukturní analýza, dynamický rozptyl světla

*Title:*

## **Parameters of protein crystallization, application to microcrystals**

*Author:* Aleš Kravíc

*Abstract:* Macromolecular crystallography is currently strongly influenced by the use of crystallography on microcrystals. Crystallography on microcrystals is a tool that has been developed to analyze crystals smaller than a few tens of micrometers. It allows us to perform experiments, that have not been feasible for decades. Highly brilliant X-ray beams generated on the synchrotrons are optimal for measuring diffraction data on microcrystals. This thesis is focused on the research of lysozyme and thaumatin crystal growth methodology with focus on parameters and quality of microcrystals growth. Crystallization parameters and growth methodologies were studied on lysozyme. The growth of thaumatin microcrystals was observed by the dynamic light scattering method during the first seven hours from the start of the experiment. The ability of microcrystals to diffract X-rays beams was tested by powder diffraction method. The applied procedure of powder diffraction proved to be suitable for proving the growth of microcrystals. The method of reproducible microcrystals growth in small volumes was found and verified.

*Key words:* microcrystals, crystal growth methodology, X-ray structure analysis, dynamic light scattering

# Obsah

<b>Úvod</b>	<b>9</b>
<b>1 Teoretická část</b>	<b>11</b>
1.1 Stavba a vlastnosti proteinů . . . . .	11
1.1.1 Lysozym . . . . .	12
1.1.2 Thaumatin . . . . .	12
1.2 Krystalizační metody . . . . .	13
1.2.1 Difúze par . . . . .	14
1.2.2 Očkování . . . . .	15
1.2.3 Krystalizace pod olejem (“Microbatch”) . . . . .	16
1.3 Strukturní rentgenografie . . . . .	16
1.3.1 Amplituda rozptylu . . . . .	16
1.3.2 Difrakce na krystalové mřížce . . . . .	18
1.4 Experimentální metody . . . . .	19
1.4.1 Zdroje rentgenového záření . . . . .	19
1.4.2 Detekce rentgenového záření . . . . .	19
1.4.3 Rotační metoda . . . . .	20
1.4.4 Dynamický rozptyl světla . . . . .	21
1.4.5 Prášková difrakce na makromolekulárních krystalech . . . . .	21
<b>2 Cíle</b>	<b>22</b>
<b>3 Materiál a metody</b>	<b>23</b>
3.1 Materiál . . . . .	23
3.1.1 Použité chemikálie . . . . .	23
3.1.2 Vybavení . . . . .	23
3.2 Krystalizační metody . . . . .	24
3.2.1 Difúze par . . . . .	24
3.2.2 Mikrokrystalizace pod olejem . . . . .	24
3.2.3 Očkování . . . . .	24
3.2.4 Růst mikrokrystalů . . . . .	25
<b>4 Výsledky</b>	<b>26</b>
4.1 Lysozym . . . . .	26
4.1.1 Hledání optimálních krystalizačních podmínek . . . . .	26
4.1.2 Vliv jednotlivých parametrů . . . . .	27
4.1.3 Očkování . . . . .	28

4.2	Thaumatococcus	29
4.2.1	Hledání optimálních krystalizačních podmínek	29
4.2.2	Očkování	29
4.3	Růst mikrokrytalů	30
4.4	Verifikace krystalů	31
4.4.1	Rotační metoda	31
4.4.2	Metoda dynamického rozptylu světla	32
4.4.3	Prášková metoda	33
	<b>Diskuze</b>	<b>34</b>
	<b>Závěr</b>	<b>36</b>
	<b>Literatura</b>	<b>37</b>
	<b>Přílohy</b>	<b>39</b>
	<b>A Hledání optimální krystalizační podmínky</b>	<b>39</b>
	<b>B Vliv pH</b>	<b>40</b>
	<b>C Nepřítomnost srážedla</b>	<b>42</b>
	<b>D Vliv teploty</b>	<b>43</b>
	<b>E Vliv experimentálního uspořádání</b>	<b>44</b>



# Úvod

Proteiny jsou makromolekulární látky skládající se z aminokyselin. Organizují chod života kontrolováním různých biochemických procesů jako např. růst buněk, přenos molekul z místa na místo, nebo replikace DNA. Pro to, abychom pochopili tyto procesy, potřebujeme znát proteinovou strukturu. Tu lze určit různými způsoby, z nichž nejvíce využívaný je difrakce rentgenového záření na krystalu proteinu.

Rentgenové paprsky byly objeveny v roce 1895, jejichž vlastnosti popsal W. C. Röntgen, jenž byl oceněn v roce 1901 Nobelovou cenou. V roce 1912 M. T. von Laue uskutečnil experiment s rentgenovými paprsky procházející krystalem. Tímto experimentem potvrdil mřížkovou stavbu krystalů i vlnovou povahu záření. Následující rok ukázali W. L. Bragg a W. H. Bragg, jak z difrakčních snímků získat vzájemnou polohu stavebních částic a souměrnost krystalu. Tím započala éra nového vědního oboru – rentgenové krystalografie.

Po úspěších určování struktur jednoduchých krystalů, například diamantu nebo kuchyňské soli, bylo zřejmé, že se lze zabývat strukturou krystalů složitějších molekul. Významnou osobou se v tomto období stala D. M. Hodgkinová, která vyřešila strukturu penicilinu, cholesterolu a vitamínu B12, za kterou v roce 1964 dostala Nobelovu cenu. V 50. letech 20. století se začaly popisovat struktury proteinů, počínaje strukturou vorvaního myoglobinu. Od té doby bylo určeno více než 130 000 proteinových struktur pomocí rentgenové krystalografie.

Aplikace rentgenové krystalografie je absolutně závislá na krystalu, jeho čistotě, velikosti a difrakční kvalitě. Krystalizace je tedy klíčový proces v průběhu řešení struktury krystalů. Většina krystalů makromolekul nemá farmaceutický ani lékařský význam, ale lze díky nim získat difrakční obrazec, ze kterého lze určit strukturu krystalu.

Vypěstování krystalů vhodných pro účely rentgenové krystalografie je komplexní úloha zahrnující mnoho parametrů jako je teplota, pH, koncentrace srážecích činidel a mnoho dalších. Předpovědět vliv těchto parametrů je velmi obtížné a jakákoliv předpověď vyžaduje experimentální potvrzení očekávaných změn.

Cílem této práce je seznámení se s přípravou krystalů vhodné kvality, zkoumání pa-

rametrů krystalizace a optimalizace metodiky pěstování mikro- a nanokrystalů. Získané zkušenosti by mohly pomoci při přípravě mikrokystalů vhodných pro moderní metody určování krystalové struktury např. sériová femtosekundová krystalografie.

# Kapitola 1

## Teoretická část

### 1.1 Stavba a vlastnosti proteinů

Základním stavebním prvkem proteinů jsou aminokyseliny. Ačkoliv se v přírodě vyskytuje přes 300 aminokyselin, pouze 20 z nich se účastní stavby proteinů. Všechny aminokyseliny mají podobnou strukturu: Skládají se z aminové ( $-\text{NH}_2$ ) a karboxylové skupiny ( $-\text{COOH}$ ), vodíku a postranní skupiny navázané na jednom C' atomu. Kromě glycinu jsou všechny aminokyseliny tvořící proteiny chirální, což jim dává vlastnost stáčení roviny polarizovaného světla.

Aminokyseliny se podle vlastnosti postranní skupiny dělí na nepolární, polární bez náboje a polární s nábojem. Nepolární aminokyseliny jsou hydrofobní a jsou lokalizovány obvykle v jádře proteinu. Polární aminokyseliny bez náboje se účastní vytváření vodíkových vazeb ve struktuře proteinu. Postranní řetězce polárních aminokyselin s nábojem se mohou účastnit iontových vazeb [9].

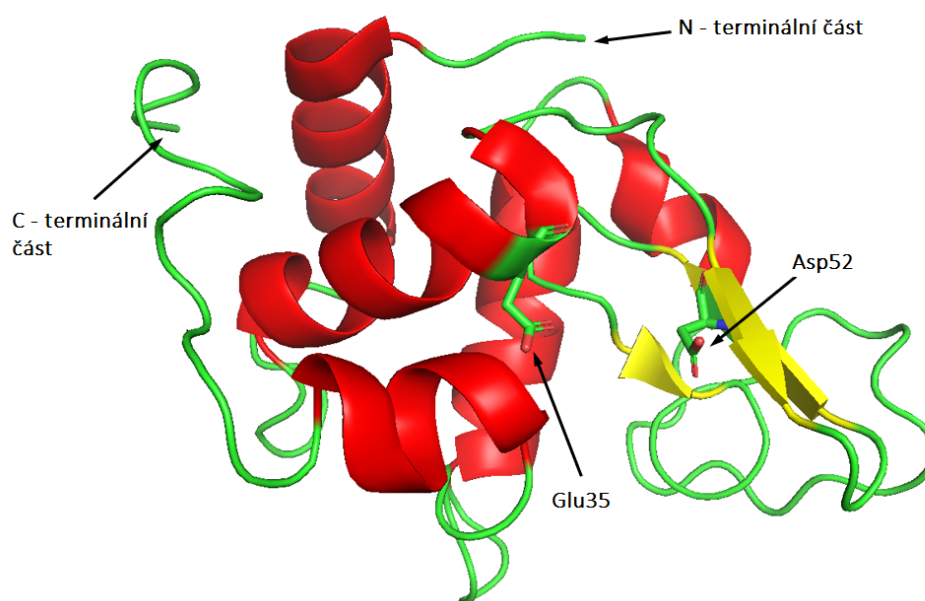
Proteiny jsou biopolymery s velkou relativní molekulovou hmotností složené z aminokyselin, které se vzájemně vážou peptidovou vazbou. Tato vazba vzniká z aminoskupiny ( $-\text{NH}_2$ ) a karboxylové skupiny ( $-\text{COOH}$ ) za vzniku peptidové vazby ( $-\text{NH}-\text{CO}-$ ). Proteiny jsou základem všech živých organismů a jednotlivě plní mnoho různých funkcí. Slouží například jako stavební jednotky, transportní látky nebo katalyzátory (např. enzymy urychlují rychlost chemických reakcí). Biologické vlastnosti proteinů jsou dány pořadím aminokyselin a jejich modifikacemi, dále kofaktory a koenzymy, což jsou nebičkovinné součásti makromolekul.

Strukturou a funkcí proteinů se zabývá obor strukturní biologie. Ta se snaží popsat všechny živé systémy na makromolekulární až atomové úrovni. Struktura proteinů podmiňuje jejich funkci. Strukturní znalost proteinů je tedy využívána například při výrobě nových léků nebo v genetickém inženýrství.

### 1.1.1 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je hydroláza, která katalyzuje hydrolýzu vazeb mezi aminosacharidy v peptidoglykanu nacházejícím se v buněčné stěně bakterií. Lysozym se extrahuje z vaječných bílků. Je tvořen jedním řetězcem obsahujícím 129 aminokyselin, propojeným čtyřmi disulfidovými můstky. Molekulová hmotnost lysozymu je 14,4 kDa. Lysozym nachází uplatnění jako antimikrobiální složka v sýru [8].

Díky dobře definované krystalizační podmínce a schopnosti snadno tvořit krystalickou formu se lysozym stal oblíbeným proteinem pro vývoj metodologie rentgenové difrakce v oblasti proteinové krystalografie.

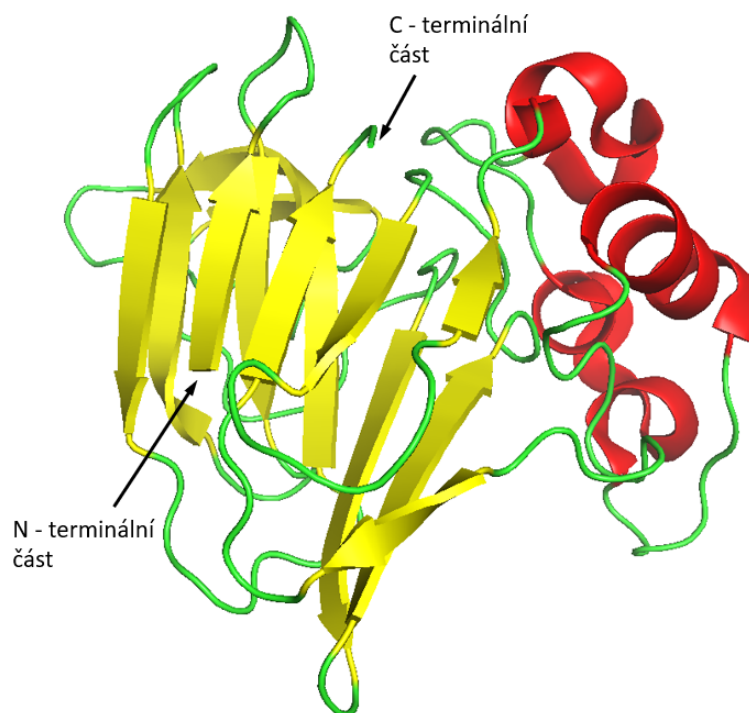


Obrázek 1.1: Struktura molekuly lysozymu (PDB ID: 1GXV). Červeně jsou znázorněny  $\alpha$ -šroubovice, žlutě  $\beta$ -skládané listy. Aminokyseliny Glu35 a Asp52 v aktivním místě jsou vyznačený tyčinkovým zobrazením

### 1.1.2 Thaumatin

Thaumatín je protein extrahovaný ze slupek obalující semena ovoce katemfe. Produkce thaumatínu v ovoci je odezvou na útok viroidních patogenů. Je tvořen jedním řetězcem 207 aminokyselin s osmi disulfidovými můstky. Molekulární hmotnost thaumatínu je 22 kDa. Thaumatín je 1600-krát sladší než sacharóza, proto se v potravinářském průmyslu (pod značkou E 957) používá jako sladidlo.

Oblíbenost thaumatínu jako modelového proteinu způsobilo zjištění, že přidání L-vinné kyseliny do roztoku thaumatínu vede k rapidnímu růstu krystalů [10].



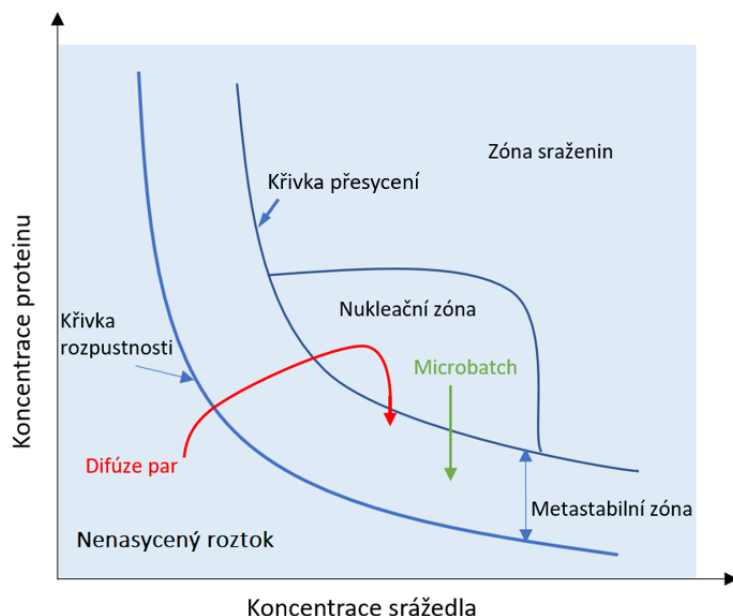
Obrázek 1.2: Struktura molekuly thaumatinu (PDB ID: 2G4Y). Červeně jsou znázorněny  $\alpha$ -šroubovice, žlutě  $\beta$ -skládané listy

## 1.2 Krystalizační metody

Krystalizace nových bílkovin je obecně náročný problém založený na hledání vhodných fyzikálních a chemických podmínek. Neexistuje ustálená teorie, která by předpověděla, za jakých podmínek se budou krystaly proteinů tvořit. Krystalizační proces komplikuje strukturní komplexnost a velké množství chemicko-fyzikálních parametrů, které jsou potřeba ke krystalizaci jednotlivých makromolekul.

Ke krystalizaci dochází díky vytvoření přesyceného stavu. Přesycení je nerovnovážený stav, ve kterém je část proteinu v roztoku nad hranicí rozpustnosti. Přesycení se dosáhne změnou určitých parametrů roztoku, např. změnou koncentrace proteinu nebo srážecího činidla, pH a dalších. Rovnovážený stav je pak nastolen vytvořením krystalů, zatímco se systém vrací do nasyceného stavu.

Vytváření krystalů probíhá ve třech fázích – nukleace, růst a ukončení růstu. Během nukleace se sdruží přiměřené množství molekul proteinu za vzniku stabilního zárodku, nazývaného kritické jádro. Fáze růstu probíhá difúzí molekul proteinu na povrch kritického jádra a jejich strukturovaným uspořádáním. Tento proces je popisovaný dvěma základními mechanismy – dislokačním růstem a růstem dvoudimenzionální nukleací [18]. K ukončení růstu zpravidla dochází, pokud nastane rovnováha mezi volnými molekulami proteinu v roztoku a nově vytvořenými krystaly proteinu.

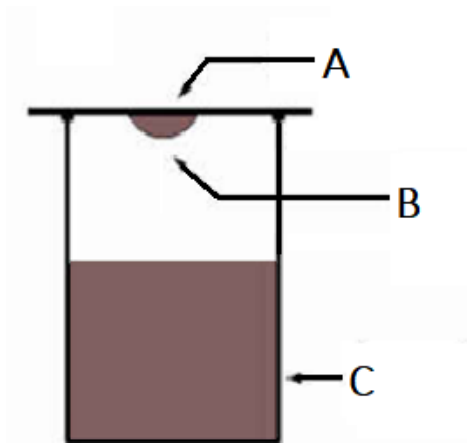


Obrázek 1.3: Fázový diagram krystalizace proteinů se zobrazením průběhu různých metod krystalizace

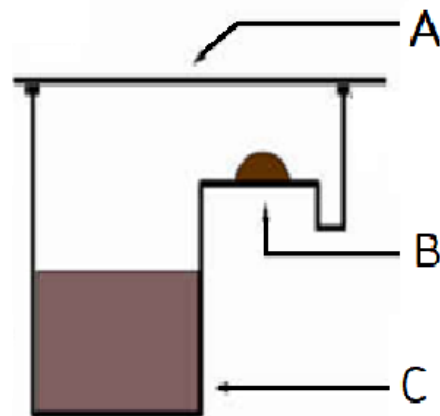
### 1.2.1 Difúze par

Tato metoda využívá vypařování a difúzi vody (a dalších složek) mezi kapkou, která je směsí proteinu, pufru a srážedla, a rezervoárem, který obsahuje stejný pufr a srážedlo, ale ve větší koncentraci vzhledem ke kapce. Lze připravit v různých konfiguracích, ale v praxi se používají dvě nejznámější – visící kapka nebo sedící kapka. Při konfiguraci experimentu v podobě visící kapky je kapka o objemu 1 - 10  $\mu\text{l}$  nanášena na krycí sklíčko, které pak překryje jamku obsahující rezervoár o objemu nejčastěji 0,5 - 1,0 ml. Krycí sklíčko je k jamce pevně přilepeno pomocí vakuového tuku, čímž je systém nepropustně uzavřen. Z důvodu zachování termodynamické rovnováhy difunduje voda z kapky do rezervoáru. Tento proces uvede kapku do přesyceného stavu a ustane, jakmile jsou koncentrace složek v kapce i rezervoáru vyrovnány [2].

Proces krystalizace metodou visící kapky je náročný na přípravu, ale zpravidla poskytuje velmi kvalitní krystaly pro difrakční analýzu. Metoda sedící kapky je jednodušší na přípravu a kapky lze připravit ve větších objemech, ale krystaly připravené touto metodou se mohou přichytit na povrch, na kterém leží kapka a je pak obtížné je využít [13].



Obrázek 1.4: Uspořádání metody visící kapky. A - Sklíčko přilepené k jamce vakovým tukem; B - kapka obsahující roztok proteinu a rezervoáru; C - Rezervoár se srážedlem



Obrázek 1.5: Uspořádání metody sedící kapky. A - Sklíčko přilepené k jamce vakovým tukem; B - kapka obsahující roztok proteinu a rezervoáru; C - Rezervoár se srážedlem

### 1.2.2 Očkování

Často se stává, že nelze dosáhnout úrovně přesycení roztoku potřebné k nukleaci proteinů. Tento problém se dá vyřešit vložením již získaných krystalů proteinu do metastabilní fáze roztoku obsahující daný protein a přeskočit tak proces nukleace. Krystaly pak poslouží jako nukleační zárodky pro fázi růstu krystalu [16].

Očkovací metody jsou rozděleny na dvě kategorie v závislosti na velikosti krystalů vložených do metastabilního roztoku. Při makroskopickém očkování se přenáší jeden krystal proteinu, typicky o velikosti 5 – 50  $\mu\text{m}$ , z roztoku, kde proběhlo vytvoření krystalu, do méně přesyceného roztoku, aby mohl pokračovat v růstu. Před vložením je vhodné očistit povrch krystalu vložením do nenasyceného roztoku [5].

Mikroskopické očkování je přenos velmi malých krystalů do metastabilního roztoku. Aby se zabránilo přenosu velkého množství krystalů, připraví se řada ředěných očkovacích roztoků. Očkovací roztok je připraven rozdrčením krystalů daného proteinu, eliminací velkých zárodků odstředěním a postupným ředěním. Malý objem očkovacího roztoku je pak pipetován do méně nasyceného roztoku.

V praxi se často místo pipetování malých krystalů používá vlákno, nejčastěji koňská žíně nebo lidský vlas. Tato metoda je velmi rychlá a jednoduchá. Vlákno použité k transportu je vloženo do očkovacího roztoku, ve kterém se malé krystaly uchytí na jeho povrch a poté je vloženo do připraveného metastabilního roztoku, kde se část krystalů z vlákna uvolní a poslouží jako zárodky pro další růst krystalů.

### 1.2.3 Krystalizace pod olejem (“Microbatch”)

V této metodě jsou protein a precipitační roztok s různými aditivami smíchány v takovém poměru, aby došlo přímo k přesycení roztoku. Do jamky je připravena kapka parafínového oleje o objemu  $5 \mu\text{l}$ , do které je následně pipetován krystalizační roztok o objemu  $0,5 - 1 \mu\text{l}$ . Parafínový olej částečně zabrání vypařování roztoku. Tato metoda je vhodná pro počáteční screening a optimalizaci. Hlavní nevýhoda spočívá ve velmi rychlé ekvilibraci roztoku, což ovlivňuje rychlost a tedy výslednou kvalitu krystalu [2].

## 1.3 Strukturní rentgenografie

Rentgenová strukturní analýza je založená v principu na difrakci, tedy interakci rentgenového záření s hmotou. Kromě rentgenového záření lze použít záření elektronové nebo neutronové. Výhoda rentgenového záření spočívá v tom, že je jeho vlnová délka srovnatelná s meziatomovými vzdálenostmi v krystalu, které jsou řádově  $10^{-1}$  nm.

Při dopadu rentgenového záření na částici (elektron nebo proton) dochází k rozptylu, tzn. odchýlení některých fotonů ze směru dopadajícího svazku. K rozptylu dochází buď s energetickými ztrátami – Comptonův rozptyl nebo beze ztrát energie – Thomsonův rozptyl. Comptonův rozptyl probíhá vždy, jeho důsledek je pozadí difrakčního snímku [12].

Pro difrakci je mnohem důležitější Thomsonův rozptyl, při němž proběhne rozptyl fotonu beze změny jeho vlnové délky, a tedy i energie. Dopadající rentgenové záření způsobí rozkmitání elektronů, které se pak stanou zdrojem nových elektromagnetických vln. Není-li primární svazek  $I_0$  polarizován, pak intenzita  $I_e$  záření kmitající elektronu ve vzdálenosti  $R$  je dána Thomsonovým vztahem:

$$I_e = I_0 \left( \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \frac{1}{R^2} \frac{1 + \cos^2(2\Theta)}{2}, \quad (1.1)$$

kde  $\frac{1 + \cos^2(2\Theta)}{2}$  je polarizační faktor a  $2\Theta$  je úhel, který svírá dopadající a rozptýlené záření. Člen  $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2}$  se nazývá Thomsonův poloměr elektronu. Dopadající rentgenové záření dále způsobí rozkmitání atomových jader, ale vzhledem k hmotnosti protonů (proton je 1836-krát těžší než elektron) můžeme rozptyl na jádrech zanedbat.

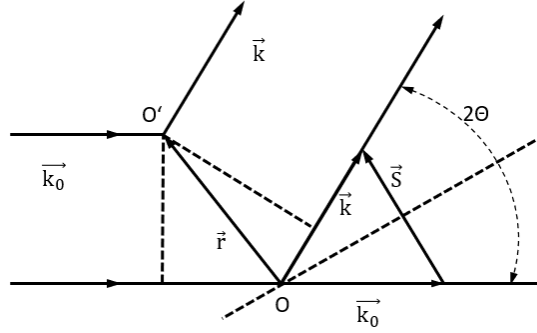
### 1.3.1 Amplituda rozptylu

Rovinnou monochromatickou vlnu o amplitudě  $A$  a vlnové délce  $\lambda$  můžeme zapsat jako



$$u(\mathbf{r}) = Ae^{i(\mathbf{k}_0\mathbf{r}+\alpha)},$$

kde  $\mathbf{r}$  je polohový vektor,  $\mathbf{k}_0 = (2\pi/\lambda)\mathbf{n}_0$  vlnový vektor ve směru šíření vlny a  $\alpha$  je počáteční fáze. Pro analýzu difrakčních jevů není důležitý časový průběh šíření vlny, ale difrakční obrazec v daném okamžiku.



Obrázek 1.6: Fázový rozdíl vln rozptýlených na dvou centrech

Nechť  $O$  a  $O'$  jsou dvě rozptylová centra. Bod  $O$  označíme jako počátek soustavy a bod  $O'$  je určen vektorem  $\mathbf{r}$ . Při dopadu rovinné vlny se obě centra stanou zdrojem sekundárních vln.

Protože primární vlna má obecně v bodu  $O$  i v bodu  $O'$  různé fáze, budou se lišit fáze vln v těchto bodech rozptýlených. Jsou-li  $\mathbf{k}$  a  $\mathbf{k}_0$  vlnové vektory dopadající a rozptýlené vlny, má fázový rozdíl velikost

$$\mathbf{r}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) = 2\pi\mathbf{r}\mathbf{S}, \quad (1.2)$$

kde  $\mathbf{S}$  se nazývá vektor rozptylu.

V případě pružného rozptylu  $|\mathbf{k}|=|\mathbf{k}_0|$  přejde vztah (1.2) na:

$$|\mathbf{S}| = \frac{|\mathbf{k}||\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{|\mathbf{n} - \mathbf{n}_0|}{2\pi} = \frac{2\sin\Theta}{\lambda}, \quad (1.3)$$

kde  $2\Theta$  je úhel mezi směrem dopadajícího záření a směrem, do něhož dopadá záření pozorované. Prostor vektorů  $\mathbf{S}$  se nazývá reciprokový prostor.

Pokud objekt, na který dopadá vlna, tvoří  $n$  rozptylových center určených polohovými vektory  $\mathbf{r}_j$  s rozptylující schopností  $f_j$ , pak vztah

$$\sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(\mathbf{S}\mathbf{r}_j)} = F(\mathbf{S}) \quad (1.4)$$

vyjadřuje celkovou amplitudu rozptylu daného objektu. Rozptylové centrum může být elektron, atom, molekula apod.

Pokud je prostředí rozptylových center spojitě, zavedeme elektronovou hustotu  $\rho(\mathbf{r})$ , která vyjadřuje počet elektronů v rozptylujícím objemu  $dV$  a vztah (1.4) přejde do tvaru

$$F(\mathbf{S}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i(\mathbf{S}\mathbf{r})} dV = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})],$$

kde  $\mathcal{F}[\cdot]$  je operátor Fourierovy transformace. Jestliže  $\rho(\mathbf{r})$  budeme brát jako pravděpodobnost výskytu elektronu v objemu  $dV$ , pak funkci  $F(\mathbf{S})$  nazýváme strukturní faktor.

### 1.3.2 Difrakce na krystalové mřížce

Nechť je krystalová mřížka popsána vektory  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{c}$ . Tyto vektory pak udávají vzájemnou polohu rozptylových center. Ke konstruktivní interferenci vln rozptýlených na sousedních centrech dochází při současném splnění tří rovnic nazývaných Laueovy:

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi h \\ \mathbf{b} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi k \\ \mathbf{c} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) &= 2\pi l \end{aligned}$$

Tuto soustavu rovnic splňuje vektor reciproké mřížky

$$\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*, \quad (1.5)$$

kde  $\mathbf{a}^*$ ,  $\mathbf{b}^*$ ,  $\mathbf{c}^*$  jsou mřížkové vektory reciproké mřížky. Pojem reciproký prostor tímto dostává fyzikální význam: vektory  $\mathbf{H}_{hkl}$  určují směry svazků rozptýlených krystalem. Velikost vektoru  $\mathbf{H}_{hkl}$  je převrácenou hodnotou mezivířkové vzdálenosti  $d_{hkl}$  systému  $(hkl)$ . Pak ze vztahů (1.3) a (1.5) vyplývá:

$$|\mathbf{H}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}} = |\mathbf{S}| = \frac{2\sin(\theta)}{\lambda}.$$

Tato rovnice se nazývá Braggova rovnice:

$$2d_{hkl}\sin(\theta) = \lambda$$

## 1.4 Experimentální metody

### 1.4.1 Zdroje rentgenového záření

Nejrozšířenější zdroje rentgenového záření jsou vakuové trubice se zatavenými elektrodami – katodou a anodou, na něž je vložen rozdíl potenciálů řádově  $10^4$  V. Tento rozdíl způsobí urychlení elektronů, které následně dopadají na anodu – terč. Rentgenové paprsky vznikají při dopadu rychle se pohybujících elektronů na atomy terče.

Podnětem k uvolnění záření je buď zabrzdění elektronů v elektrickém poli atomů terče, nebo ionizace atomů. Při zabrzdění elektronů se energie neztrácí najednou při jedné srážce, ale po částech při více srážkách, což způsobí vznik spojitého spektra záření. Mají-li elektrony dostatečnou energii, mohou uvolnit elektrony z vnitřních energetických hladin. Jejich místo pak obsadí elektrony z vyšších hladin. Tento přechod pak doprovází vyzáření přebytečné energie v podobě fotonu. Toto záření je čárové vlivem diskretních energetických hladin v atomech.

Problém této metody tkví v množství přeměněné energie dopadajících elektronů na rentgenové záření. Zlomek energie, přibližně 0,1%, je přeměněn na rentgenové záření, zbytek se přetváří na teplo. Toto teplo je třeba odvádět, aby nedošlo k roztavení terče. Tento problém částečně řeší rotační anoda, kdy anoda je ve tvaru válce a rotuje velkou rychlostí a tím teplo rozprostře na větší plochu, což usnadní jeho odvod a je možné přivádět větší proud na katodu [15].

Kromě rotační anody, která je náročná na údržbu a provoz, lze použít tekutou anodu. Tekutá anoda je nová technologie, jejíž princip je stejný, jako u rentgenek, avšak jako terč je použitý tekutý kov – ten je slitinou např. galia, india a dalších příměsí. Tekutý kov cirkuluje v uzavřeném okruhu rychlostí až 75 m/s, což umožňuje chladit anodu účinněji než u rotační rentgenky, a tím dosáhnout vyšších hustot intenzity záření [6]. Hlavní výhodou je, že fokusační plocha na anodě je malá a soustředí se na ní vysoký tok elektronů. Vyprodukovaný svazek se pak lépe zpracovává do intenzivních tenkých svazků.

### 1.4.2 Detekce rentgenového záření

V proteinové krystalografii je třeba zaznamenat velké množství difrakčních dat v průběhu co nejkratšího času, jelikož jsou proteinové krystaly náchylné na radiací poškození.

Jedním z prvních typů používaných detektorů jsou obrazové desky, které fungují podobně jako fotografické filmy. Jedná se o desky s vrstvou obsahující BaFBr, které se aktivují ionty  $\text{Eu}^{2+}$ . Zpracování difrakčního obrazce je založeno na jevu fotostimulované luminescence. Obrazové desky jsou mnohem citlivější než fotografické filmy.

Polovodičové detektory jsou pevnolátkové ionizační komory. Absorbovaný foton rentgenového záření vytvoří pár elektron-díra, který je vlivem elektrického pole přenesen na elektrody, kde poslouží k vzniku elektrického pulsu, který může být měřen. Energie potřebná k produkci párů elektron-díra je velmi malá. Důsledkem toho je, že v polovodičových detektorech je statistická změna výšky pulsů menší a tím je větší energetické rozlišení [11].

### 1.4.3 Rotační metoda

Krystaly makromolekul jsou oproti krystalům nízkomolekulárních látek mnohem problematičtější z hlediska měření difrakčních dat. Krystaly makromolekul mají podstatně větší bázi a tedy i jejich mřížkové parametry musí být větší. Reciproká mřížka krystalů makromolekul, která je závislá na parametrech mřížky přímé, je velmi hustě obsazena. Při záření rentgenovým zářením na stacionární krystal makromolekuly by průměrné naměřené intenzity reflexí byly menší a jejich počet by byl větší než při ozařování krystalů nízkomolekulárních látek. Další problémy při měření reflexí spočívají v tom, že část objemu krystalu tvoří kanály vyplněné neuspořádaným rozpouštědlem, takže se dále sníží intenzita reflexí a příspěvek rozptylu od neuspořádané hmoty k difúznímu rozptylu, který vede ke zvýšení pozadí záření.

Pro měření reflexí proteinových krystalů se používají rotační nebo oscilační metody. Na krystal dopadá vymezený paprsek monochromatického záření. Pokud krystal osciluje ve vymezeném úhlovém oboru kolem osy procházejícím krystalem, jde o metodu oscilační. Pokud se otáčí kolem této osy, jde o metodu rotační. Difraktované záření je následně detekováno plošným detektorem, nejčastěji na bázi polovodičů.

Při použití Ewaldovy konstrukce, která je geometrickou interpretací Braggova zákona, je záření reprezentováno povrchem koule o poloměru  $1/\lambda$  a krystal reciprokou mřížkou. Reciproká mřížka je složena z bodů na konci vektorů, které jsou kolmé k difrakčním rovinám a jejich délka je rovná převrácené hodnotě mezivěkové vzdálenosti  $1/d_{hkl}$ . Díky hustě obsazené reciproké mřížce proteinových krystalů je velká šance, že se v jedné poloze krystalu nalézá na Ewaldově sféře několik uzlových bodů reciproké mřížky. Na plošném detektoru je pak možné zachytit difrakční obrazec, který je zobrazením uzlových bodů reciproké mřížky v Ewaldově konstrukci.

#### 1.4.4 Dynamický rozptyl světla

Pro měření distribuce velikosti malých částic v roztoku se používá metoda dynamického rozptylu světla (DLS). Tato metoda je založena na měření Brownova pohybu částic a uvádí jej do vztahu s velikostí částic. To se provádí osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuace rozptýleného světla. Fluktuace intenzity rozptylu je po změření použita jako parametr autokorelační funkce. Ta měří podobnost mezi dvěma signály po určité době. Velké částice se budou pohybovat pomalu a rychlost rozkladu korelační funkce tedy bude menší než u menších částic [1].

#### 1.4.5 Prášková difrakce na makromolekulárních krystalech

Podmínka pro difrakci rentgenového záření na osnově rovin je Braggova rovnice. Při měření monokrystalů lze Braggovu podmínku splnit vhodnou orientací krystalu vzhledem ke směru záření. V případě práškového vzorku s náhodnou orientací krystalků je pravděpodobné, že některé krystalky budou orientovány tak, že budou splňovat Braggovu podmínku. V praxi je často důležité pootáčet se vzorkem, aby se dosáhlo co největší náhodnosti.

Difraktometry používané pro metodu práškové difrakce (XRD) se skládají ze podobných částí, jako difraktometry používané pro monokrystalovou difrakci – zdroje rentgenového záření, držáku vzorku a detektoru difraktovaného záření. Hlavní rozdíl mezi těmito difraktometry je v držáku vzorku. U monokrystalového difraktometru je to smyčka, ve které je krystal pevně upevněn a následně otáčen do požadovaných pozic pomocí goniometru. V případě práškového difraktometru je práškový vzorek buď nanesen na tyčinku, nebo je napěchován do kapiláry.

V důsledku rotace a polykrystalické vlastnosti vzorku jsou po zachycení difraktovaného záření na detektor pozorovány hladké difrakční kružnice kolem osy paprsku na rozdíl od diskrétních bodů, které vznikají u monokrystalického krystalu. V souladu s Braggovým zákonem odpovídá každá kružnice příslušnému vektoru reciproké mřížky vzorku.

# Kapitola 2

## Cíle

1. Analýza vlivu teploty, pH a experimentálního uspořádání na kvalitu krystalizace.
2. Nalezení optimálních podmínek pro očkování a přípravu mikrokrystalů v malých objemech.
3. Biofyzikální charakterizace růstu makro- a mikrokrystalů modelových proteinů.
4. Potvrzení přítomnosti proteinových mikrokrystalů.

# Kapitola 3

## Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použité chemikálie

Pro experimenty s lysozymem byly namíchaný 4,0 M roztok chloridu sodného (dále NaCl), 50% $\frac{w}{v}$  roztok PEG 5000<sup>1</sup>, 1,0 M roztok octanu sodného (dále NaAc) s hodnotou pH 4,6 a 50 mg/ml roztoku lysozymu. Pro experimenty s thaumatinem byly namíchaný 50% $\frac{w}{v}$  roztok tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného (dále NaK tartrát), 100% $\frac{v}{v}$  roztok ethylenglykolu<sup>2</sup>, 1,0 M BIS-TRIS s hodnotou pH 6,6, 50 mg/ml a 100 mg/ml roztoky thaumatinu. Chemikálie použité k namíchání uvedených roztoků byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich.

#### 3.1.2 Vybavení

Pro experimenty s konfigurací visící kapky byly použity desky (VDX Plate with sealant) s 24 jamkami, kapky se nanášely na sklíčka (Siliconized Glass Cover Slides), které následně zakryly dané jamky. Experimenty s konfigurací mikrokrystalizace pod olejem byly nasazeny na desku často používanou pro tuto krystalizaci (Greiner Terasaki Plate), krystalizační roztok byl nanesen do parafínového oleje. Zmíněné vybavení bylo pořízeno od firmy Hampton Research.

Pro pěstování mikrokrystalů byla použita deska (Bio-One UV-Star<sup>TM</sup> 96-Well UV Spectroscopy Microplate, Greiner Bio-One), která byla zakrytá fólií (ClearSeal Film<sup>TM</sup>, Hampton Research).

Pro pořizování mikrofotografií byl použit mikroskop Olympus SZX9 (Olympus corp.) s fotoaparátem Infinity 1-3C (Lumenera corp.). K verifikaci krystalů byl pou-

---

<sup>1</sup>hodnota X% w/v je hmotnost v gramech látky na 100 ml roztoku

<sup>2</sup>hodnota X% v/v je objem v mikrolitrech rozpouštěné látky na 100 ml roztoku

žit difraktometr D8 VENTURE (Bruker) se zdrojem rentgenového záření MetalJet Excillum D2 (Excillum) a detektorem Photon II 14 (Bruker). Na ověření růstu mikrokrytalů byla použita metoda DLS, u které byla  $2\mu\text{l}$  kapka roztoku s mikrokrytaly napipetována na desku (Sitting Drop Crystallization Plate, Hampton Research) s 96 jamkami. Deska byla vložena do přístroje, který využíval metodu DLS (DLS Spectrolight 600, Molecular Dimensions), ve kterém se měřil průměr krystalů v kapce na základě dynamického rozptylu světla v kapce. Pro verifikaci mikrokrytalů ve vzorku metodou práškové difrakce byl použit přístroj SAXSpoint 2.0 (Anton Paar) osazený zdrojem MetalJet Excillum C2+ (Excillum).

## 3.2 Krystalizační metody

### 3.2.1 Difúze par

Na deskách v konfiguraci visící kapky byla každá kapka připravena z roztoku proteinu a z jednoho z krystalizačních roztoků v poměru 1:1. Výsledný objem kapek byl  $2\mu\text{l}$  a objem rezervoáru  $500\mu\text{l}$ . Dvě desky z experimentů pro lysozym byly vloženy do inkubátorů o teplotách  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ostatní desky byly vloženy do inkubátoru o teplotě  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Desky z experimentů pro thaumatin byly vloženy do inkubátoru o teplotě  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Mikrokrystalizace pod olejem

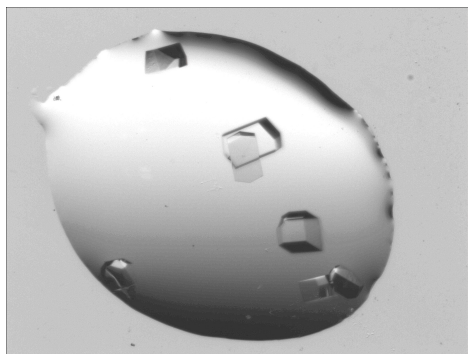
Na desku s konfigurací mikrokrystalizace pod olejem bylo do jamek napipetováno  $5\mu\text{l}$  parafínového oleje. Následně byl do oleje napipetován roztok proteinu a do vzniklé kapky byl napipetován krystalizační roztok. Objem obou roztoků byl  $1\mu\text{l}$ . Deska pak byla vložena do inkubátoru o teplotě  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Očkování

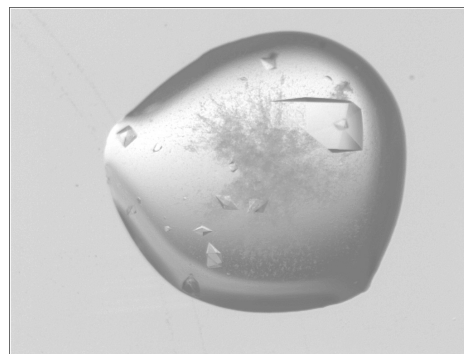
Pro vytvoření očkovacího roztoku na krystalizaci lysozymu byly použity krystaly, které vyrostly v kapce na desce s konfigurací visící kapky s krystalizační podmínkou  $0,8\text{ M NaCl}$ ,  $10\% \frac{w}{v}$  PEG 5000 a  $0,05\text{ M NaAc}$  s  $\text{pH } 4,6$ , lysozym  $50\text{ mg/ml}$ . Krystaly byly rozdrceny v kapce pomocí drtiče krystalů, skleněné tyčinky speciálně určené na rozbíjení krystalů, a následně napipetovány do zkumavky s připraveným objemem  $28\mu\text{l}$  krystalizační podmínky. Zkumavka byla dále centrifugována při  $10\,000\times g$  po dobu jedné minuty. Vznikl tak očkovací roztok, který se dále zředil 10-krát, 100-krát a 1000-krát. Obdobným způsobem byl vytvořen očkovací roztok pro thaumatin, kde byly použity krystaly z krystalizační podmínky  $28\% \frac{w}{v}$  NaK tartrátu,  $15\% \frac{v}{v}$  ethylen-glykolu a  $0,1\text{ M BIS-TRIS}$  s  $\text{pH } 6,6$ , thaumatin  $50\text{ mg/ml}$ .



V případě lysozymu byly krystaly z očkovacího roztoku nanесeny do kapek pomocí koňské žíně. Vlákno bylo vloženo do očkovacího roztoku a následně protáhnuto rovnou čarou kapkou na desce s konfigurací visící kapky. Deska byla předem připravena a kapka byla v metastabilním stavu. V případě thaumatinu byl postup obdobný, ale pro nanášení krystalů se mimo jiné používal i lidský vlas. Desky následně byly vloženy do inkubátoru o teplotě 18 °C.



Obrázek 3.1: Krystaly lysozymu použité k vytvoření očkovacího roztoku pro očkovací metodu



Obrázek 3.2: Krystaly thaumatinu použité k vytvoření očkovacího roztoku pro očkovací metodu a mikrokrystalizaci

### 3.2.4 Růst mikrokrystalů

U krystalizačních experimentů pro růst mikrokrystalů byl krystalizační roztok a roztok proteinu napipetován přímo do jamek. Celkový objem složek v jamkách byl 100  $\mu\text{l}$ . Tento roztok byl promíchán opětovným pipetováním a následně bylo do každé z jamek napipetováno 5  $\mu\text{l}$  nezředěného očkovacího roztoku. Celá deska pak byla zakrytá fólií, aby se vytvořilo uzavřené prostředí. Deska byla následně vložena do inkubátoru s teplotou 20 °C.

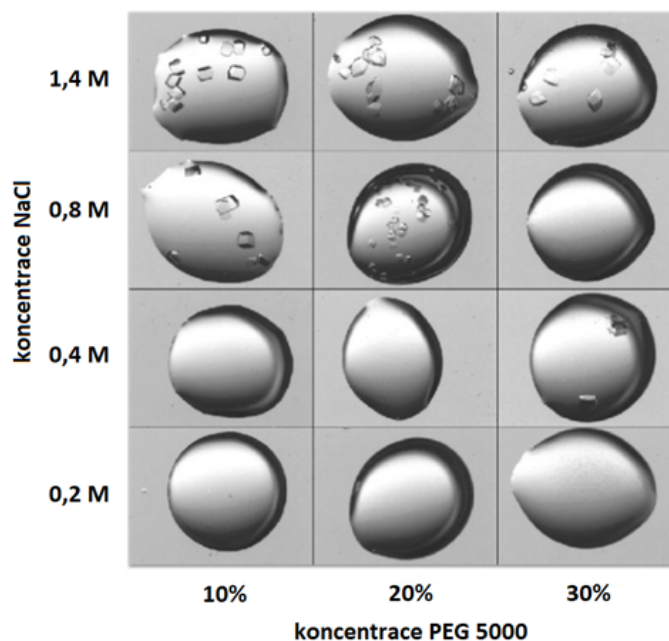
# Kapitola 4

## Výsledky

### 4.1 Lysozym

#### 4.1.1 Hledání optimálních krystalizačních podmínek

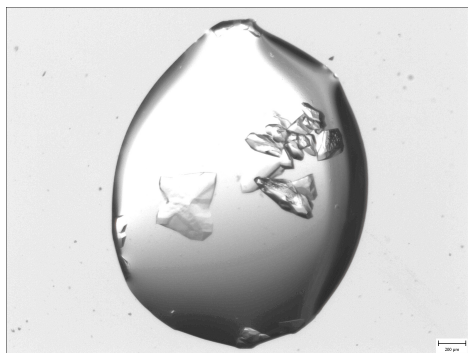
Pro hledání optimálních podmínek krystalizace lysozymu byla použita deska s 24 jamkami s konfigurací visící kapky. Deska byla rozdělena na dvě oblasti o dvanácti jamkách. První oblast byla připravena s koncentrací proteinu 10 mg/ml, druhá s koncentrací 50 mg/ml. Nejlepší krystaly rostly při podmínce 0,8 M NaCl, 10%  $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml (Obr. 4.1) která byla následně optimalizována a použita k hledání správné krystalizační podmínky pro očkování. V kapkách s koncentrací lysozymu 10 mg/ml nevyrostl žádný krystal (viz. Příloha A).



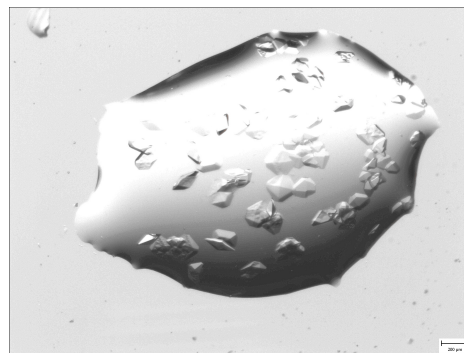
Obrázek 4.1: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínkách s koncentrací proteinu 50 mg/ml. Pro všechny podmínky byl použit pufr 0,05 M NaAc pH 4,6

## 4.1.2 Vliv jednotlivých parametrů

První ze zkoumaných parametrů je hodnota pH použitého pufru. Experiment byl proveden s konfigurací visící kapky. Bylo nasazeno 12 jamek s krystalizační podmínkou 1,4 M NaCl, 20% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, lysozym 50 mg/ml a různými pufrů. Tato analýza ukázala, že krystaly lysozymu rostou pro rozmezí pH 3,0 – 8,5 (Obr. 4.2 a 4.3). Hodnoty pH, použité pufrů a obrázky kapek jsou uvedené v Příloze B.

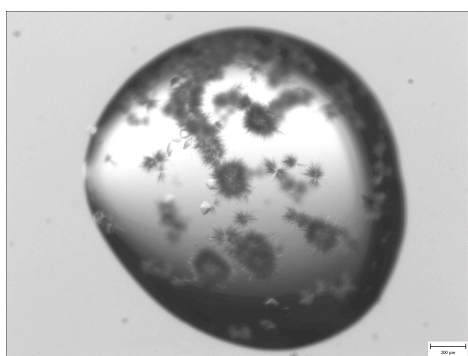


Obrázek 4.2: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínce 0,8 M NaCl, 10% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M kyselina citrónová pH 3,5 a lysozym 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$

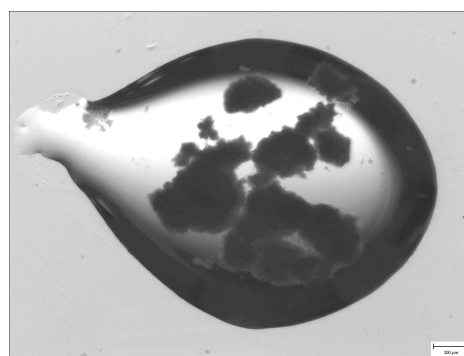


Obrázek 4.3: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínce 0,8 M NaCl, 10% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M TRIS pH 8,5 a lysozym 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$

Pro ukázání vlivu srážecího činidla bylo připraveno 24 kapek s konfigurací visící kapky s podmínkami, ve kterých nebylo přítomno srážedlo. Přehled krystalizačních podmínek je uveden v Příloze C. Místo krystalů v kapkách vyrostly pravděpodobně polykrystalické objekty nevykazující známky krystalů vhodných pro difrakci (Obr. 4.4 a 4.5).



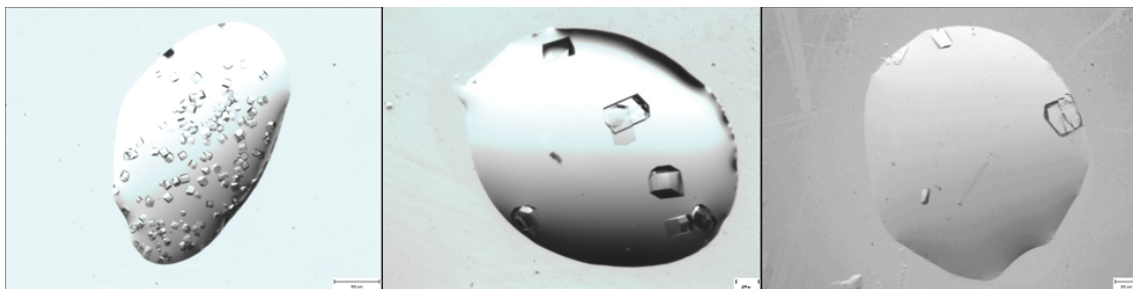
Obrázek 4.4: Polykrystalické objekty vypěstované v podmínce 2,0 M NaCl, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$



Obrázek 4.5: Polykrystalické objekty vypěstované v podmínce 3,0 M NaCl, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$

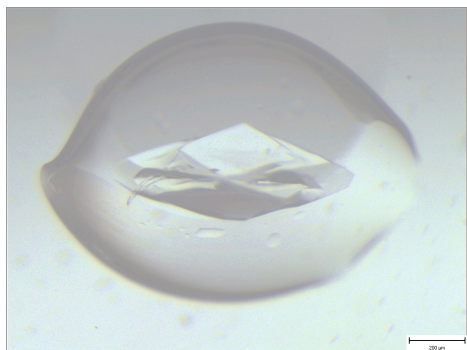
Pro ukázání vlivu teploty byly nasazeny dvě desky s konfigurací visící kapky, z nichž jedna byla uložena do inkubátoru o konstantní teplotě 10 °C, druhá do inkubátoru o konstantní teplotě 25 °C. Obě desky obsahovaly krystalizační podmínky, které byly

vybrány z desky pro hledání optimální krystalizační podmínky (viz. Příloha D). Se zvyšující se teplotou se zvětšovaly i krystaly, ale snižoval se jejich počet (Obr. 4.6).

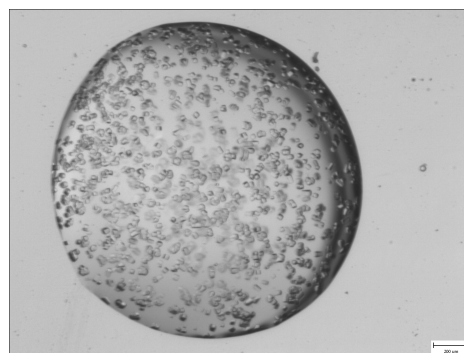


Obrázek 4.6: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínce 0,4 M NaCl, 10% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc s pH 4,6, lysozym 50 mg/ml. Na levé mikrofotografii jsou krystaly vypěstované v teplotě 10 °C, uprostřed v 18 °C a napravo v 25 °C. Úsečky odpovídají rozměru 200  $\mu$ m

Zkoumání vlivu experimentálního uspořádání bylo provedeno na desce v konfiguraci visící kapky a na desce v konfiguraci krystalizace pod olejem. Krystalizační podmínka pro obě uspořádání byla zvolena 0,8 M NaCl, 10% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml. Tato podmínka byla následně 6-krát zředěna a nasazena pro obě uspořádání (viz. Příloha E). V případě metody krystalizace pod olejem vyrostl v kapce pozorované podmínky jeden velký nekvalitní krystal, u metody visící kapky ve stejné podmínce vyrostlo mnoho malých kvalitnějších krystalů (Obr. 4.7 a 4.8).



Obrázek 4.7: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínce 0,32 M NaCl, 4% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml v konfiguraci mikrokrystalizace pod olejem. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu$ m



Obrázek 4.8: Krystaly lysozymu vypěstované v podmínce 0,32 M NaCl, 4% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml v konfiguraci visící kapky. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu$ m

### 4.1.3 Očkování

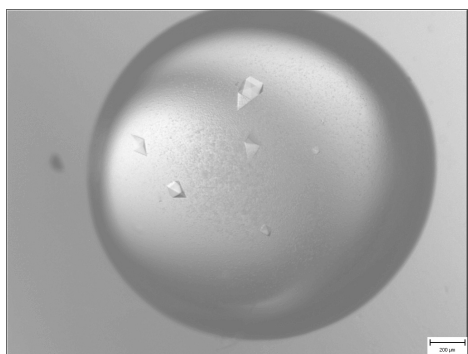
Po vytvoření očkovacího roztoku byla nasazena deska s konfigurací visící kapky, která obsahovala podmínky 0,16 M NaCl, 2% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6,

lysozym 50 mg/ml v šesti jamkách a 0,2 M NaCl, 2,5% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml v dalších šesti jamkách. Nad každým rezervoárem byly nasazeny 4 kapky. Do každé kapky nad danými jamkami byly pomocí koňské žíně nanášeny zárodky z různých očkovacích roztoků. Použitím této metody nevyrostl žádný krystal.

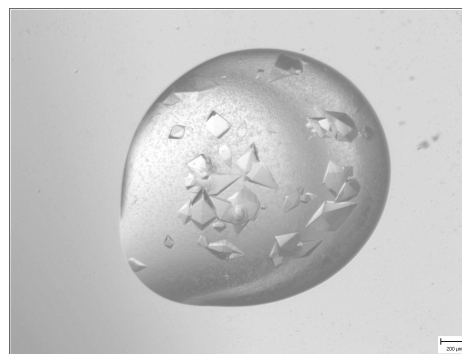
## 4.2 Thaumatin

### 4.2.1 Hledání optimálních krystalizačních podmínek

Pro hledání optimálních podmínek krystalizace thaumatinu byla použita deska s 24 jamkami s konfigurací visící kapky. Nad každou jamkou byly nasazeny dvě kapky s koncentracemi proteinu 25 mg/ml a 50 mg/ml. V podmínce, která obsahovala 20% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol, 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml vyrostly nejkvalitnější krystaly a proto byla použita jako základ pro hledání vhodné podmínky očkování (Obr. 4.9). Dále byla nasazena krystalizační podmínka neobsahující ethylenglykol. V této podmínce vyrostly méně kvalitnější krystaly, ale zato ve větším množství (Obr. 4.10).



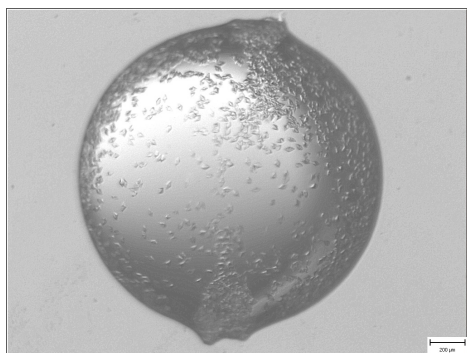
Obrázek 4.9: Krystaly thaumatinu vy-pěstované v podmínce 20% $\frac{w}{v}$  NaK tartrátu, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykolu, 0,1 M BIS-TRIS s pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$



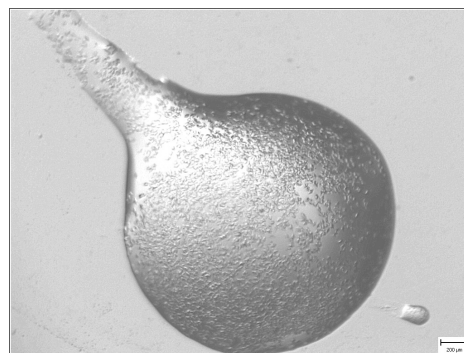
Obrázek 4.10: Krystaly thaumatinu vy-pěstované v podmínce 25% $\frac{w}{v}$  NaK tartrátu, 0,1 M BIS-TRIS s pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$

### 4.2.2 Očkování

Po vytvoření očkovacího roztoku byla nasazena deska s 12 jamkami s konfigurací visící kapky. Prvních šest podmínek obsahovalo 6% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 4,5% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol, 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml, dalších šest podmínek obsahovalo 8% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 6% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol, 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Poté byly do každé kapky nad danými jamkami nanášeny pomocí koňské žíně a lidského vlasu zárodky očkovacího roztoku. Z obrázků lze odhadnout, že koňskou žíní bylo přeneseno více zárodků (Obr. 4.11 a 4.12).



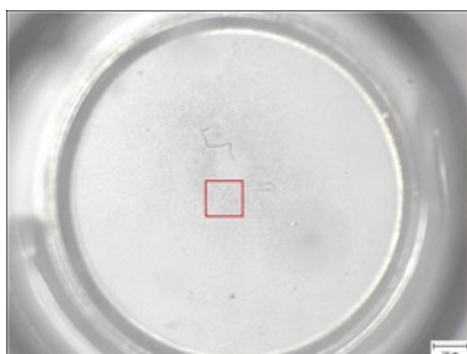
Obrázek 4.11: Krystaly thaumatinu vypěstované očkovací metodou, kde krystaly z očkovacího roztoku byly v přeneseny pomocí lidského vlasu. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$



Obrázek 4.12: Krystaly thaumatinu vypěstované očkovací metodou, kde krystaly z očkovacího roztoku byly v přeneseny pomocí koňské žíně. Úsečka odpovídá rozměru 200  $\mu\text{m}$

### 4.3 Růst mikrokrytalů

Protože při očkovací metodě u lysozymu nevyrostl žádný krystal, byl pro metodu mikrokrytalizace použit pouze thaumatin. Byl použit krystalizační roztok obsahující 6% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 4,5% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol a 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6 a roztok proteinu o koncentraci 100 mg/ml. Očkovací roztok pro tuto metodu byl vytvořen z krystalů, které vyrostly v podmínce 28% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol, 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Mikrokrystaly se podařilo vypěstovat při poměrech 40  $\mu\text{l}$  krystalizačního roztoku a 60  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu a při 30  $\mu\text{l}$  krystalizačního roztoku a 70  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu (Obr. 4.13 a 4.14). V obou případech bylo použito 5  $\mu\text{l}$  stejného očkovacího roztoku, jako pro očkovací metodu (viz. Kapitola 3.2.3).



Obrázek 4.13: Mikrokrystaly vypěstované při 40  $\mu\text{l}$  krystalizační podmínky a 60  $\mu\text{l}$  thaumatinu 100 mg/ml. Úsečka odpovídá rozměru 400  $\mu\text{m}$ . Označená oblast je ve větším rozlišení na Obr. 4.14



Obrázek 4.14: Přiblížený pohled na mikrokrystaly vypěstované při 40  $\mu\text{l}$  krystalizační podmínky a 60  $\mu\text{l}$  thaumatinu 100 mg/ml (oblast z Obr. 4.13). Úsečka odpovídá rozměru 100  $\mu\text{m}$

## 4.4 Verifikace krystalů

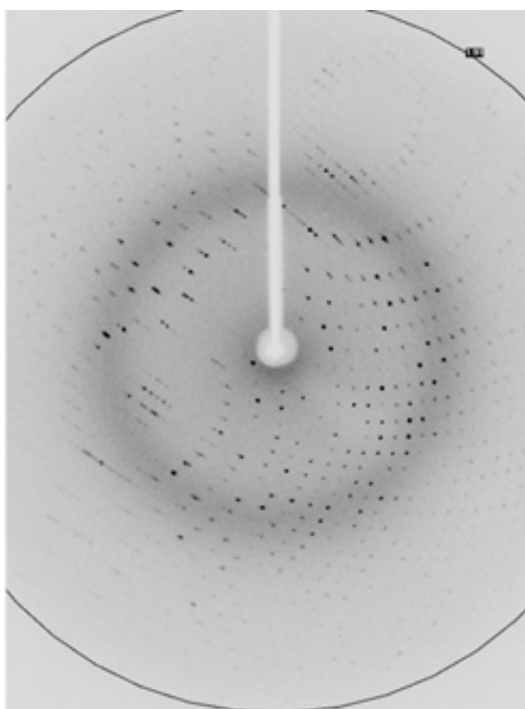
### 4.4.1 Rotační metoda

Měření difrakčních dat proběhlo na difraktometru v Centru molekulární struktury (CMS), které je součástí Biotechnologického ústavu AV ČR ve Vestci. K difrakci byl použit krystal thaumatinu z podmínky 20% $\frac{w}{v}$  NaK tartrátu, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykolu, 0,1 M BIS-TRIS s pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Sběr dat proběhl při vlnové délce  $\lambda = 0,13418$  nm, vzdálenost vzorku od detektoru byla 159,1 mm. Vzorek byl chlazen proudem par tekutého dusíku o teplotě 100 K, expoziční doba snímků byla 20 s.

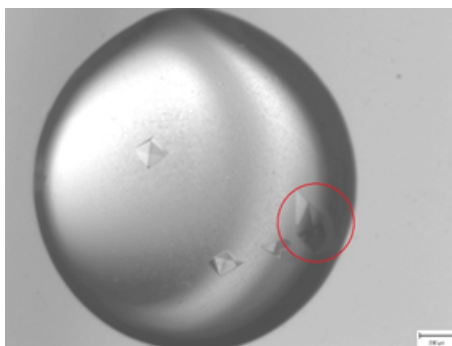
Difrakční snímky (Obr. 4.15) byly zpracovány programem PROTEUM3. Testovaný krystal (Obr. 4.16) difraktoval do vysokého rozlišení (difrakční limit dosahoval 1,6 Å). Získané reflexe byly indexovány a byla určena elementární buňka. Jednotlivé hodnoty parametrů buňky jsou uvedeny v Tabulce 4.1. Tímto experimentem byl potvrzen krystalický charakter a typ zkoumaného materiálu.

Parametr	$a$ [nm]	$b$ [nm]	$c$ [nm]	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	Prostorová grupa
Hodnota	5,782	5,782	15,003	90,000	90,000	90,000	$P4_32_12$

Tabulka 4.1: Parametry elementární buňky krystalu thaumatinu zjištěné zpracováním snímků z měření rotační metodou



Obrázek 4.15: Difrakční snímek krystalu thaumatinu vypěstovaného v krystalizační podmínce 20% $\frac{w}{v}$  NaK tartrátu, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykolu, 0,1 M BIS-TRIS s pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml (Obr. 4.16). Kružnice znázorňuje rozlišení 1,91 Å

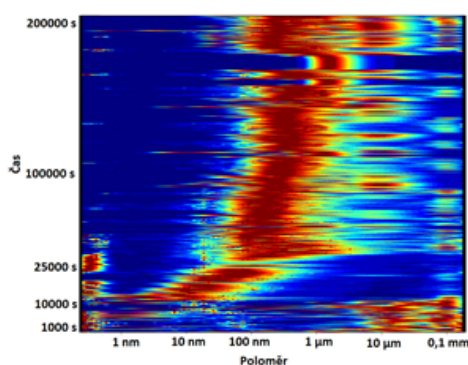


Obrázek 4.16: Krystal thaumatinu použitý jako vzorek pro rotační metodu

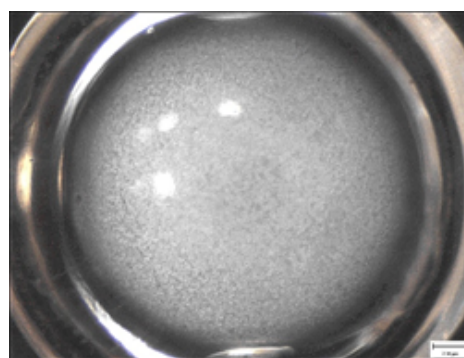
#### 4.4.2 Metoda dynamického rozptylu světla

Růst mikrokystalů byl měřen metodou dynamického rozptylu světla. Měření dat proběhlo na přístroji DLS Spectrolight 600 v Centru molekulární struktury (CMS), které je součástí Biotechnologického ústavu AV ČR ve Vestci. Pro podmínku pro růst mikrokystalů byl zvolen krystalizační roztok, který obsahoval 6% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 4,5% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol a 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6. Poměr roztoků byl zvolen 40  $\mu$ l krystalizačního roztoku a 60  $\mu$ l roztoku proteinu o koncentraci 100 mg/ml. Do výsledného roztoku se přidalo 5  $\mu$ l nezředěného očkovacího roztoku. Po promíchání byla odebrána 2  $\mu$ l kapka na destičku a vložena do přístroje. Signál DLS byl měřen opakovaně po dobu 56 hodin, expoziční doba snímků byla 60 s (Obr. 4.17).

Měření potvrdilo, že od počátečního nasazení podmínky se během času zvětšuje poloměr mikrokystalů v roztoku. V čase od 0 do 10000 s byly ve vzorku naměřeny částice o poloměru 10 až 100  $\mu$ m, pravděpodobně se jedná o zárodky dodané z očkovacího roztoku. V čase od 10000 do 25000 s bylo možné ve vzorku naměřit růst mikrokystalů. Od 25000 s dál byl poloměr mikrokystalů ustálen na 200 až 500 nm.



Obrázek 4.17: Výsledek měření DLS. Graf znázorňuje časový průběh poloměru mikrokystalů v roztoku. Barevná škála zobrazuje relativní zastoupení dané velikosti částic (modrá - nula, červená - maximální hodnota)



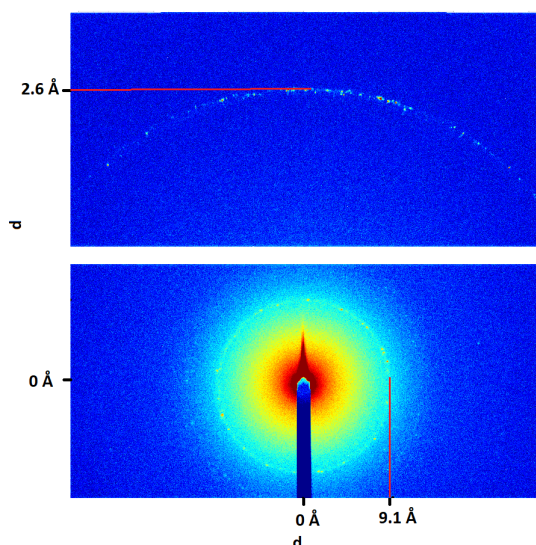
Obrázek 4.18: Mikrokristaly pozorované po 56 hodinách měření na DLS. Úsečka odpovídá délce 200  $\mu$ m



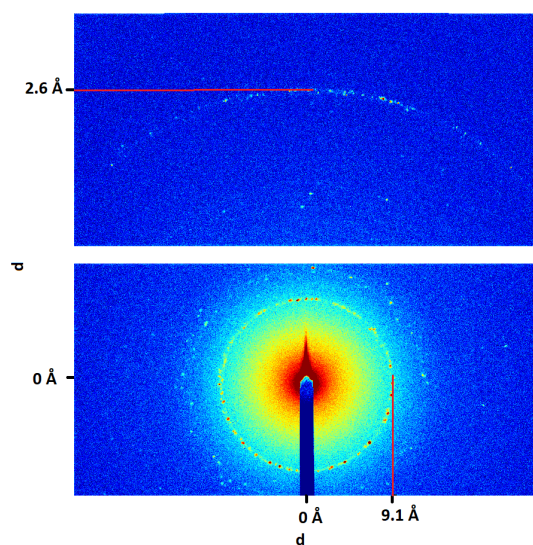
### 4.4.3 Prášková metoda

Mikrokrystaly vypěstované metodou růstu mikrokrystalů (Kapitola 4.3) jsou tak malé, že se dají považovat jako „zrna“ polykrystalického materiálu. Existence mikrokrystalů v roztoku tedy byla měřena práškovou metodou. Měření proběhlo na přístroji SAXSpoint 2.0 v Centru molekulární struktury (CMS), které je součástí Biotechnologického ústavu AV ČR ve Vestci. Vzorky mikrokrystalů (z Kapitoly 4.3) byly měřeny ve speciální kapiláře o objemu 10  $\mu\text{l}$  určené pro přístroj SAXSpoint 2.0.

Nejprve byl naměřen samotný krystalizační roztok, který se použil k odečtení pozadí na snímcích. Následně byly změřeny roztoky s mikrokrystaly, které byly odstředěny na  $1000\times g$  po dobu patnácti minut a na  $7500\times g$  po dobu třiceti minut. Vzorky byly exponovány paralelním svazkem rentgenového záření o vlnové délce  $\lambda = 0,134 \text{ nm}$ . Vzdálenost vzorku od detektoru byla 575,5 mm. Bylo naměřeno 120 snímků při fixované pozici kapiláry, expozice snímků byla 60 s. Mikrokrystaly odstředěné na více otáček (Obr. 4.19 a 4.20) vykazovaly dobrou difrakci (jsou jasně vidět difrakční maxima).



Obrázek 4.19: Výsledek měření práškovou metodou. Difrakční snímek znázorňuje práškovou difrakci na vzorku mikrokrystalů thaumatinu odstředěných na  $1000\times g$  po dobu patnácti minut. Menší kružnice znázorňuje rozlišení 9.1 Å, větší 2.6 Å



Obrázek 4.20: Výsledek měření práškovou metodou. Difrakční snímek znázorňuje práškovou difrakci na vzorku mikrokrystalů thaumatinu odstředěných na  $7500\times g$  po dobu třiceti minut. Menší kružnice znázorňuje rozlišení 9.1 Å, větší 2.6 Å

# Diskuze

Z procesu hledání optimální krystalizační podmínky pro lysozym byla vybrána podmínka 0,8 M NaCl, 10% $\frac{w}{v}$  PEG 5000, 0,05 M NaAc pH 4,6, lysozym 50 mg/ml. Tato podmínka poskytuje použitelné a reprodukovatelné krystaly lysozymu o velikosti 100 až 450  $\mu\text{m}$ . Krystaly vypěstované v této podmínce byly následně použity pro vytvoření očkovacího roztoku.

Analýza vlivu teploty na průběh krystalizace lysozymu ukázala, že při nižší teplotě roste mnoho krystalů o menší velikosti než při vyšších teplotách. Analýza vlivu pH ukázala, že lysozym krystaluje ve velkém rozmezí pH, od 3,0 do 8,5. Nejvhodnější krystaly pro difrakci rostly v rozmezí pH od 5,0 do 6,5.

Při nasazení krystalizačních podmínek v dvou různých konfiguracích se projevila různá dynamika růstu krystalů. V konfiguraci mikrokrytalizace pod olejem vyrostly v kapce maximálně dva krystaly o velikostech mezi 200 až 300  $\mu\text{m}$ . Příprava této konfigurace byla rychlá a krystaly vyrostly v krátkém čase. Je tedy možné použít tuto metodu k pěstování krystalů, které by posloužily jako základ pro očkovací roztok. V konfiguraci visící kapka vyrostlo mnoho malých krystalů o velikostech 20 až 50  $\mu\text{m}$ .

Z procesu hledání optimální krystalizační podmínky pro thaumatin byla vybrána podmínka 20% $\frac{w}{v}$  NaK tartrát, 15% $\frac{v}{v}$  ethylenglykol, 0,1 M BIS-TRIS pH 6,6, thaumatin 50 mg/ml. Tato podmínka poskytuje krystaly thaumatinu o velikosti 100 až 200  $\mu\text{m}$ . Krystaly vypěstované v této podmínce byly následně použity pro vytvoření očkovacího roztoku. Na rozdíl od lysozymu, kde byly vybrány největší a nejkvalitnější krystaly, zde byly vybrány krystaly ne tak velké, ale s nejvyšší kvalitou oproti ostatním podmínkám.

Při použití očkovací metody nevyrostl v případě proteinu lysozymu žádný krystal. Použití očkovací metody v případě thaumatinu ukázalo, že počet krystalů v kapce ovlivňuje i vlákno, kterým se zárodky přenášejí z očkovacího roztoku do kapky. Při přenosu zárodků koňskou žíní vyrostlo v kapce více krystalů než při přenosu zárodků lidským vlasem.

Pro růst mikrokrytalů byl použit protein thaumatin. Analýza této metody ukázala, že mikrokrystaly rostou při větším objemovém poměru roztoku proteinu vůči

krystalizačnímu roztoku. Růst mikrokystalů byl následně pozorován metodou dynamického rozptylu světla. Při ní byl sledován časový průběh poloměru mikrokystalů ve vzorku. Tato metoda ukázala, že mikrokristaly se v roztoku zformují během sedmi hodin.

Verifikace přítomnosti mikrokystalů thaumatinu v roztoku proběhlo metodou práškové difrakce. Kvůli velikostem mikrokystalů zjištěných metodou dynamického rozptylu světla nelze použít k verifikaci metod monokrystalové difrakce na domácím zdroji záření. Nejlepší difraktogram vykazoval roztok mikrokystalů, který byl odstředěn na  $7500 \times g$ . Na tomto difraktogramu lze vidět difrakční kroužek o rozlišení odpovídající  $d = 11 \text{ \AA}$ .

Postup přípravy metody růstu mikrokystalů byl inspirovaný přípravou mikrokystalů v článku [4]. Metoda použitá v této práci je modifikována pro menší objemy. Motivace pro pěstování mikrokystalů v menších objemech je cenová dostupnost vzorku a snadnější optimalizace parametrů růstu mikrokystalů. Alternativní přístup pěstování mikrokystalů v malých objemech může být třepání výsledného roztoku proteinu a krystalizačního roztoku místo přidání očkovacího roztoku [14].

# Závěr

Modelové proteiny lysozym a thaumatin byly úspěšně zkrystalizovány a byly nalezeny krystalizační podmínky, za kterých rostou krystaly dobré kvality pro rentgenovou difrakci. Inspekce mikrofotografií krystalů lysozymu vypěstovaných při různých krystalizačních podmínkách odhalila, že při nízké teplotě roste mnoho malých krystalů a že optimální pH pro krystalizaci lysozymu je v rozmezí pH od 5,0 do 6,5.

Podle předchozích výsledků pro pěstování krystalů lysozymu byly určeny krystalizační podmínky pro očkování. V těchto podmínkách nevyrostl žádný krystal. Podobně byly určeny krystalizační podmínky pro očkování krystalů thaumatinu. Při tomto experimentu se ukázalo, že koňská žíně je vhodnější pro přenos zárodků než lidský vlas.

Nalezená optimální podmínka pro očkování krystalů thaumatinu byla použita pro růst mikrokrystalů. Experimenty ukázaly, že mikrokrystaly rostly lépe ve větším objemovém poměru roztoku proteinu vůči roztoku krystalizační podmínky.

Růst mikrokrystalů byl zkoumán metodou dynamického rozptylu světla. Tato metoda ukázala, že mikrokrystaly vyrostou v prvních několika hodinách po nasazení experimentu. V dalších hodinách se již nezvětšoval jejich průměr.

Potvrzení přítomnosti mikrokrystalů proběhlo metodou práškové difrakce. Analýza difrakčních snímků ukázala, že mikrokrystaly difraktují velmi slabě, ale byla potvrzena jejich přítomnost v roztoku. Metoda růstu mikrokrystalů použitá v této práci je tedy vhodnou metodou pro pěstování mikrokrystalů v malých objemech.

Výhodou této metody je pěstování mikrokrystalů v malých objemech za použití malého množství proteinu, a proto je možné tuto metodu snadno optimalizovat. Výsledný objem je přitom dostatečný pro testování výsledků. Tato metoda se dá použít v experimentech, kde nejsou potřeba velké objemy, např. pro elektronovou difrakci na proteinových krystalech.

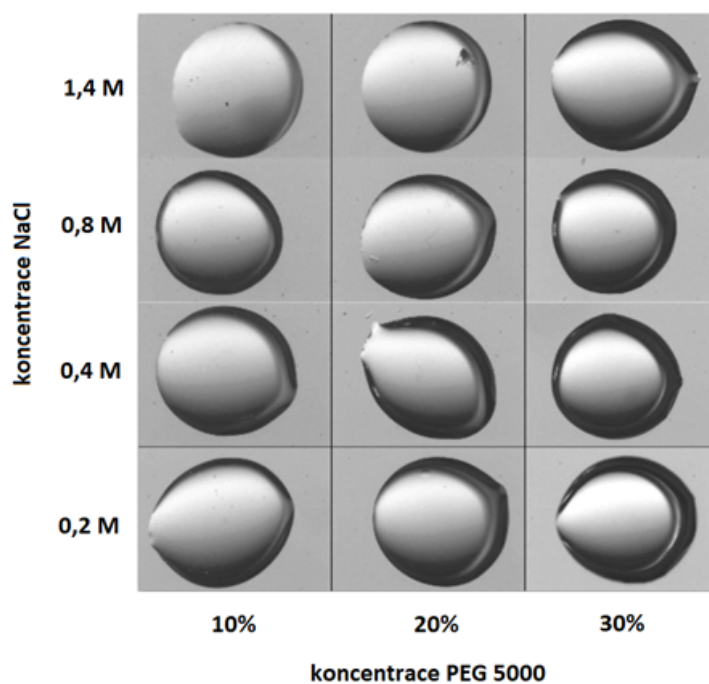
# Literatura

- [1] Berne B.J.; Pecora R.: *Dynamic Light Scattering*. Courier Dover Publications, 2000, ISBN 0-486-41155-9.
- [2] Bergfors T. M.: *Protein Crystallization, Techniques, Strategies, and Tips*. Int. Univ. Line, 1999, ISBN 0-9636817-5-3.
- [3] Boutet S.; et al.: *High-Resolution Protein Structure Determination by Serial Femtosecond Crystallography*. *Science* 337, 2012, s. 362-364.
- [4] Coquelle N.; et al.: *Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography*. *Nat. Chem.* 10, 2018, s. 31-37.
- [5] Ducruix A.; Giegé R.: *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1992, ISBN: 9780199636785.
- [6] Espes E. et al.: *Liquid-Metal-Jet X-Ray Tube Technology Applications and Tomography*. Excillum AB, 2014.
- [7] Grünbein M. L.; Kovacs G. N.: *Sample delivery for serial crystallography at free-electron lasers and synchrotrons*. *Acta Cryst.*, 2019, D75, s. 178–191.
- [8] Held J.; van Smaalen S.: *The active site of hen egg-white lysozyme: flexibility and chemical bonding*. *Acta Cryst.*, 2004, D70, s. 1136-1146.
- [9] Jolles, P.: *Lysozymes: A Chapter of Molecular Biology*. *Angewandte Chemie, International Edition*, 8. 1969, s. 227-239.
- [10] Ko, T.-P.; Day, J.; Greenwood, A.; McPherson, A.: *Structures of three crystal forms of the sweet protein thaumatin*. *Acta Cryst.*, 1994, D50, s. 813–825.
- [11] Knoll G.F.: *Physics for Radiation Protection*. Wiley, 1999. ISBN 978-0-471-07338-3.
- [12] Kraus I.: *Úvod do strukturní rentgenografie*. 1. Vydání. Praha: Academia, 1985. ISBN 21-014-85.
- [13] Krauss I. R.; Merlino A.; Vergara A.; Sica F.: *An overview of biological macromolecule crystallization*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, D14, s. 11643-11691.

- [14] Mahon B. P.; et al.: *Mixing: "Shaken not Stirred", a Method for Macromolecular Microcrystal Production for Serial Crystallography*. *Crystal Growth & Design*, 2016, s. 6214-6221.
- [15] Marek J.; Trávníček Z.: *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. 1. Vydání. Olomouc: univerzita Palackého v Olomouci, 2002, ISBN 80-224-0551-2.
- [16] Stura E. A.; Wilson I. A.: *Analytical and Product Seeding Techniques*. *Methods*, 1990, D1, s. 38-49.
- [17] webové stránky firmy Hampton Research: [cit. 22.4.2019].  
< <https://hamptonresearch.com/> >
- [18] Wlodawer A.; Dauter Z.; Jaskolski M.: *Protein Crystallography, Methods and Protocols*. Springer Nature, 2017. ISBN 978-1-4939-6998-2.

# Příloha A

## Hledání optimální krystalizační podmínky



Obrázek A.1: Krystalizační experimenty v podmínkách s koncentrací proteinu 10 mg/ml. Pro všechny podmínky byl použit pufr 0,05 M NaAc pH 4,6

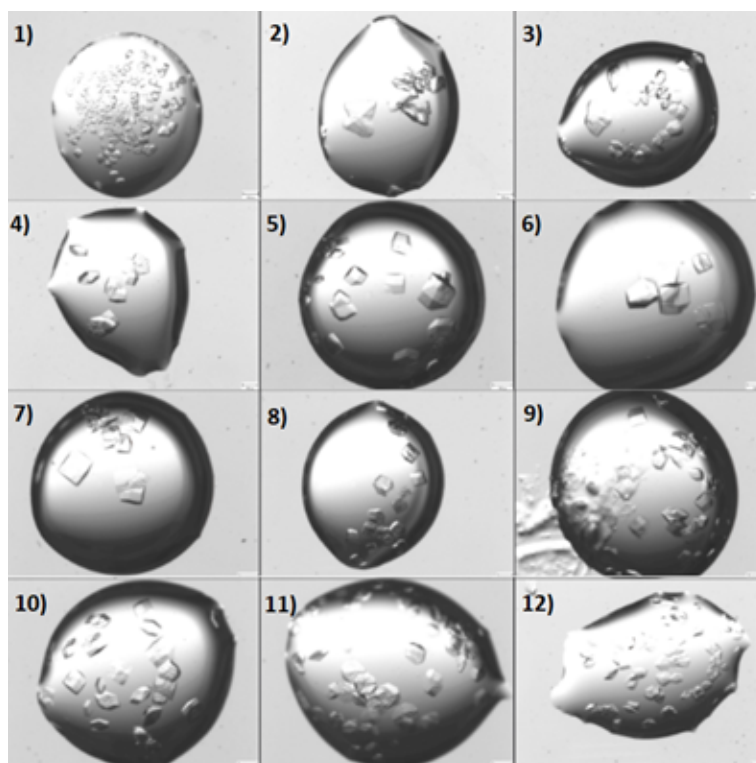
# Příloha B

## Vliv pH

č.	pufř	hodnota pH
1	Kyselina citřonov	3,0
2	Kyselina citřonov	3,5
3	Octan sodný	4,0
4	Octan sodný	4,5
5	Octan sodný trihydrát	5,0
6	Octan sodný	5,5
7	BIS-TRIS	6,0
8	BIS-TRIS	6,5
9	HEPES	7,0
10	HEPES	7,5
11	TRIS	8,0
12	TRIS	8,5

Tabulka B.1: Pufřy pouřit pro analýzu vlivu pH na kvalitu krystalizace

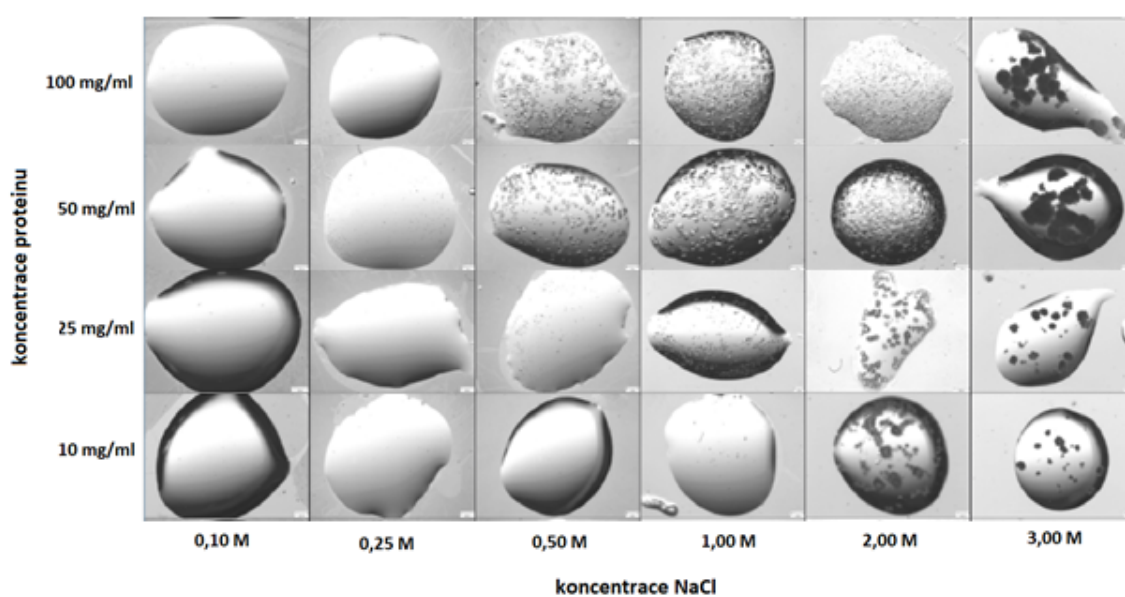




Obrázek B.1: Krystaly lysozymu vypěstované v krystalizačních podmínkách s různými pufrými s rozdílnými hodnotami pH uvedených v Tabulce B.1

# Příloha C

## Nepřítomnost srážedla



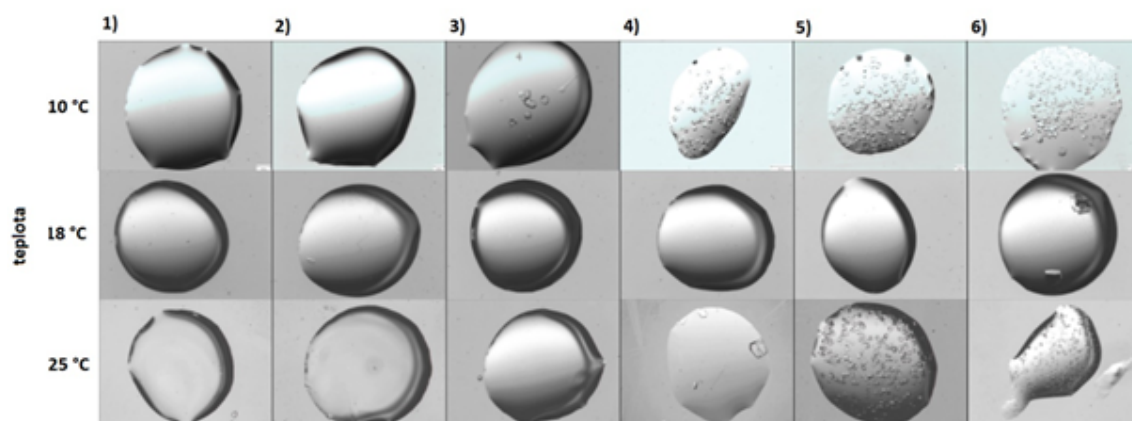
Obrázek C.1: Krystaly lysozymu vypěstované bez přítomnosti srážedla PEG 5000. Pro všechny podmínky byl použit pufr 0,05 M NaAc pH 4,6 a lysozym 50 mg/ml. Obrázek znázorňuje kapky z celé desky

# Příloha D

## Vliv teploty

č.	sůl	pufr	srážedlo	protein
1	0,4 M NaCl	0,05 M NaAc pH 4,6	10% PEG 5000	lysozym 10 mg/ml
2			20% PEG 5000	
3			30% PEG 5000	
4			10% PEG 5000	lysozym 50 mg/ml
5			20% PEG 5000	
6			30% PEG 5000	

Tabulka D.1: Krystalizační podmínky použité pro analýzu vlivu teploty na kvalitu krystalizace



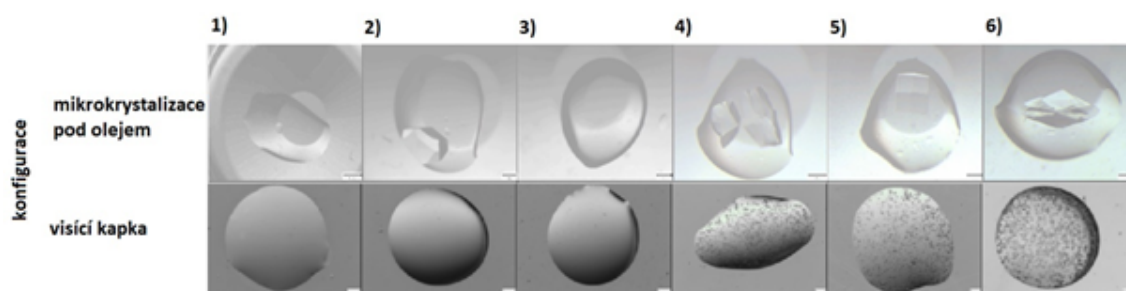
Obrázek D.1: Krystaly lysozymu vypěstované v různých teplotách. Čísla na horizontální ose odkazují na Tabulku D.1 krystalizačních podmínek, které byly použity pro kapky v daném sloupci

# Příloha E

## Vliv experimentálního uspořádání

č.	sůl	pufr	srážedlo	protein
1	0,06 M NaCl	0,05 M NaAc pH 4,6	1,5% PEG 5000	lysozym 50 mg/ml
2	0,08 M NaCl		2,0% PEG 5000	
3	0,10 M NaCl		2,5% PEG 5000	
4	0,12 M NaCl		3,0% PEG 5000	
5	0,14 M NaCl		3,5% PEG 5000	
6	0,16 M NaCl		4,0% PEG 5000	

Tabulka E.1: Krystalizační podmínky použité pro analýzu vlivu experimentálního uspořádání na kvalitu krystalizace



Obrázek E.1: Krystaly lysozymu vypěstované v různých experimentálních uspořádáních. Číslo na horizontální ose odkazuje na Tabulku E.1 krystalizačních podmínek, které byly použity pro kapky v daném sloupci