

Anleitung zum Versuch „Kristallwachstum“

Julian Wurz, Stefano da Vela, Michal Braun und Olga Matsarskaia

Überarbeitet von Nafisa Begam

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Frank Schreiber

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

22. Oktober 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	3
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Klassische Keimbildungstheorie	4
2.2	Zwei-Schritt-Keimbildungstheorie	7
2.3	Einfluss von Ionen: Die DLVO-Theorie	10
3	Experimentelles Vorgehen	13
3.1	Probenvorbereitung	13
3.2	Beobachtung	14
3.2.1	Zwei-Schritt-Kristallisation	14
3.2.2	Ein-Schritt-Kristallisation: Wachstumsprozess	15
3.2.3	Ein-Schritt-Kristallisation: Analyse der Kristallformen	15
4	Auswertung	16

1 Motivation

Proteine stellen in der Biochemie eine sehr wichtige Substanzklasse dar. Sowohl im menschlichen Körper als auch in der sonstigen belebten Natur nehmen sie eine Fülle von Funktionen ein. Insbesondere sind hier die Enzyme zu erwähnen. Sie dienen als Katalysatoren für chemische Reaktionen und spielen somit beispielsweise für die Verdauung eine essentielle Rolle. Das in den im Folgenden beschriebenen Experimenten verwendete Lysozym ist ein Enzym, das als Teil des menschlichen Immunsystems fungiert. Aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung ist es beispielsweise in Hühnereiern enthalten. Die Wirkung basiert darauf, dass Lysozym die Spaltung einer Bindung in Peptidoglycan katalysiert, welches in Zellwänden von Bakterien vorhanden ist [1]. Ein weiteres prominentes Beispiel für physiologisch bedeutsame Proteine ist das Hämoglobin, welches für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist. Auch in der Industrie werden mittlerweile synthetisch hergestellte Enzyme eingesetzt, etwa in Waschmitteln zur Zersetzung von Verschmutzungen [2] oder als Zusatzstoff in Lebensmitteln [3]. Die Funktion von Proteinen hängt eng mit ihrer Struktur zusammen. Die exakte Bestimmung einer Proteinstruktur stellt jedoch auch heutzutage noch eine Herausforderung dar. Für die Röntgenstrukturanalyse, die zu diesem Zweck hauptsächlich verwendet wird, ist es erforderlich, dass das Protein in kristalliner Form vorliegt. Viele Proteine kristallisieren jedoch gar nicht oder nur unter sehr speziellen Bedingungen, weswegen viele Bedingungen durchgetestet werden müssen, bevor überhaupt eine Strukturaufklärung möglich ist. Insofern ist die Proteinkristallisation ein Thema mit großer praktischer Relevanz für die Forschung.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Klassische Keimbildungstheorie

Die klassische Keimbildungstheorie wurde in den 1920er Jahren entwickelt und liefert eine verhältnismäßig einfache Beschreibung der Vorgänge bei der Kristallisation. Wir betrachten die homogene Keimbildung, das heißt Oberflächen (wie etwa die Gefäßwände) oder Verunreinigungen, die die Keimbildung beeinflussen könnten, werden vernachlässigt. Damit sich ein Keim bilden kann, ist es notwendig, dass bei den Kollisionen der in der übersättigten Lösung befindlichen Wachstumseinheiten Teilchen aneinander haften bleiben und sich kleine Cluster bilden. Es wird hier von Wachstumseinheiten gesprochen, da es sich hierbei sowohl um einzelne Moleküle als auch um Oligomere handeln kann.

Das Wachstum eines solchen Clusters wird durch das Verhältnis seiner Gibb'schen freien Energie G zur freien Energie der Lösung der Wachstumseinheiten beschrieben. Die freie Energie wird wiederum durch die (energetisch günstige und daher negative) Ausbildung von Bindungen zwischen den Wachstumseinheiten innerhalb der Clusters – also einen Term, der proportional zum Volumen des Clusters ist (G_V) — und durch (ungünstige) ungesättigte Bindungen auf der Clusteroberfläche — einen Term, der proportional zu dieser Oberfläche ist (G_S mit $S = \text{surface}$) — beschrieben.

Die freie Energie des Clusters kann demnach als Summe dieser beiden Beiträge beschrieben werden:

$$G = G_V + G_S \quad (2.1)$$

Der Oberflächenterm kann als

$$G_S = A \cdot \gamma \quad (2.2)$$

A ist hierbei die Clusteroberfläche, γ die spezifische Oberflächenspannung.

Der Volumenterm, der die Energie des Prozesses der Anlagerung eines Teilchens aus der Lösung an den Cluster beschreibt, kann als Differenz der chemischen Potentiale μ_α und μ_β des Clusters und der Lösung, multipliziert mit der Anzahl von Wachstumsein-

2 Theoretische Grundlagen

heiten, aus denen der Cluster besteht:

$$G_V = n \cdot (\mu_\alpha - \mu_\beta) = n \cdot \Delta\mu \quad (2.3)$$

Das chemische Potential kann durch die Aktivität einer Substanz in ihrer Phase ausgedrückt werden:

$$\mu_i = kT \cdot \ln a_i \quad (2.4)$$

Der Volumenterm lautet daher:

$$G_V = nkT \cdot \ln \left(\frac{a_\alpha}{a_\beta} \right) \equiv nkT \cdot \ln S \quad (2.5)$$

S ist hierbei das Übersättigungsverhältnis, also das Verhältnis zwischen der echten Konzentration der Lösung und der einer gesättigten Lösung. Die Aktivitäten können näherungsweise durch die Konzentrationen ausgedrückt werden. Insgesamt ergibt sich somit für die Energie G :

$$G = -nkT \cdot \ln S + A \cdot \gamma \quad (2.6)$$

Die Energie kann nun als Funktion der Anzahl von Wachstumseinheiten (n) oder des Clusterradius (d) geschrieben werden:

$$G_n = -nkT \cdot \ln S + \sqrt[3]{36\pi\nu^2 n^2} \cdot \gamma \quad (2.7)$$

$$G_d = -\frac{4\pi d^3}{3\nu} \cdot kT \cdot \ln S + 4\pi d^2 \cdot \gamma \quad (2.8)$$

ν beschreibt hierbei das Volumen eines Teilchens.

Im Folgenden werden wir uns auf den zweiten Ausdruck konzentrieren. Wenn wir sein Maximum bestimmen, erhalten wir den sogenannten kritischen Clusterradius:

$$d^* = \frac{2\gamma}{kT\nu \cdot \ln S} \quad (2.9)$$

Im Fall von kleinen Clustern unterhalb von d^* können die wenigen Bindungen im Inneren des Clusters nicht die vielen ungesättigten Bindungen an der Clusteroberfläche kompensieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Cluster zerfallen, ist daher recht hoch. Der (ziemlich unwahrscheinliche) Fall ihres Wachstums ist lediglich auf stochastische Dichtefluktuationen der Lösung zurückzuführen. Sobald sich aber ein Cluster mit $d = d^*$

2 Theoretische Grundlagen

gebildet hat, kompensiert der günstige Volumenterm den ungünstigen Oberflächenterm beim Maximum der freien Clusterenergie (s. Abbildung. 2.1). Ab diesem Punkt dominiert der Volumenterm den Energieausdruck des Clusters. Thermodynamisch gesprochen ist die Differenz der freien Energien eines Clusters mit dem Radius $d^* + \delta d$ und der eines Clusters mit dem Radius d^* negativ ($\Delta G < 0$). Ein Schrumpfen des Clusters wäre nun energetisch ungünstig, da hierzu eine Energiebarriere (in Abb. 2.1) überwunden werden müsste. Wachstum des Clusters ist demnach günstiger als seine Auflösung.

Sobald G negativ wird (unterhalb der x-Achse) wird die Bildung des Kristalls energetisch günstiger gegenüber der Lösung der Wachstumseinheiten. Nach diesem Punkt ist das Kristallwachstum kinetisch ungehindert.

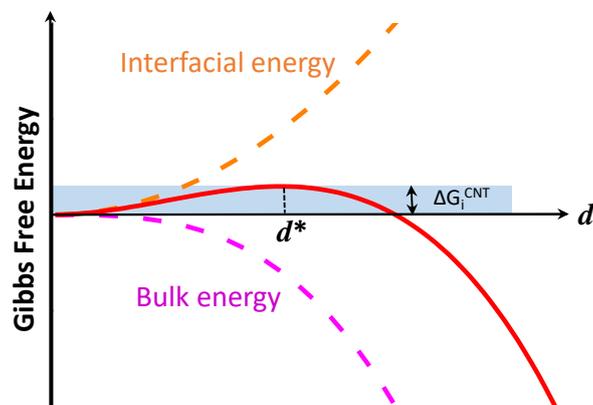


Abbildung 2.1: Freie Gibbs-Energie eines Clusters als Funktion seines Radius. Das Wachstum des Clusters ist nach dem kritischen Radius d^* nicht mehr inhibiert. Bei G -Werten mit $G < 0$ ist die Ausbildung eines Kristalls thermodynamisch günstiger als die übersättigte Clusterlösung. Mit freundlicher Genehmigung von Andrea Sauter.

Bei der Beschreibung realer Kristallisationsvorgänge macht die klassische Keimbildungstheorie einige vereinfachende Annahmen [5]:

- Die Cluster sind kugelförmig und klar von der Umgebung abgegrenzt, wobei die Dichte innerhalb des Clusters homogen und unabhängig von der Größe ist. Daraus folgt, dass die molekulare Struktur ebenfalls größenunabhängig ist.
- Die spezifische Oberflächenspannung γ (siehe Gleichung 2.2) ist größenunabhängig und wird auch nicht von der Kugelform des Clusters beeinflusst, das heißt, man

geht davon aus, dass die Oberflächenspannung einer Clusteroberfläche der Oberflächenspannung einer ebenen Fläche mit demselben Flächeninhalt entspricht.

- Ein Cluster wächst nur dadurch, dass einzelne Wachstumseinheiten hinzugefügt werden. Zusammenstöße zwischen Clustern, bei denen Cluster zusammengefügt werden oder auseinander brechen können, sind nicht vorgesehen.
- Die Cluster werden als inkompressibel angesehen, die Teilchen (Wachstumseinheiten) in der Umgebung als ideales Gas. Dieses „Gas“ besitzt einen konstanten Druck, das heißt, es verändert sich durch den Keimbildungsprozess nicht.
- Die Keimbildungsrate wird als zeitunabhängig angenommen, wobei der stationäre Zustand bereits unmittelbar nachdem eine übersättigte Lösung vorhanden ist vorliegt.

2.2 Zwei-Schritt-Keimbildungstheorie

Die klassische Keimbildungstheorie beruht — wie bereits erwähnt — auf vielen vereinfachenden Annahmen und bildet deswegen nicht immer ein gutes Abbild der Realität. Dies wird unter anderem daran deutlich, dass man bei einigen Proteinen — darunter auch bei dem hier verwendeten Lysozym — das Phänomen der „Liquid-Liquid Phase Separation“ (LLPS; zu deutsch flüssig-flüssig-Phasentrennung) beobachten kann. Hierbei bilden sich vor der Kristallisation Tröpfchen mit höherer Proteinkonzentration, aus denen dann die Kristalle hervorgehen. Die Kristallisation findet sozusagen in zwei Schritten statt. Man kann sich dies anhand eines Diagramms veranschaulichen, in dem die Struktur gegen die Konzentration aufgetragen wird (siehe Abbildung 2.2; der Begriff „Konzentration“ wird hier auch für die feste Phase synonym für „Teilchendichte“ verwendet). Bei einem klassischen Kristallisationsvorgang erfolgt die Änderung von Konzentration und Struktur gleichzeitig, während nach der Zwei-Schritt-Keimbildungstheorie zunächst eine Erhöhung der Konzentration — also die Bildung der höher konzentrierten Tröpfchen — vor der Ausbildung der Struktur, also der Kristallisation erfolgt.

Eine LLPS kann durch das Zugeben bestimmter Komponenten, wie z.B. *depleting agents* wie Polyethylenglykole (PEG) oder Salze induziert werden. Ein weiterer Parameter, der die LLPS beeinflussen kann, ist die Temperatur. LLPS kann entweder ober- oder unterhalb einer bestimmten (sog. kritischen) Temperatur eintreten. Die Temperatur, unterhalb oder überhalb derer bei einer bestimmten Konzentration in einer übersättigten Lösung die LLPS einsetzt, wird manchmal auch als „cloud point“ temperature T_{cloud} bezeichnet. Der Hintergrund für diese Bezeichnung ist die Tatsache, dass durch die

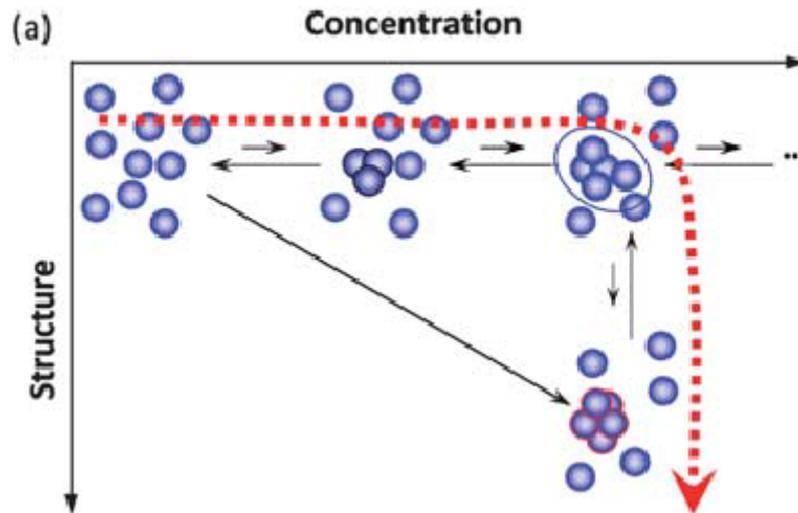


Abbildung 2.2: Klassische (diagonal) und Zwei-Schritt-Kristallisation (roter Pfeil) im Struktur-Konzentration-Diagramm [8].

Tröpfchenbildung die Lösung sehr trüb und milchig wird. Die konzentrierte Flüssigkeit bildet eine bezüglich der kristallinen Phase metastabile Phase. Bezüglich der ursprünglichen, weniger konzentrierten Lösung kann die konzentrierte Phase entweder energetisch höher oder tiefer liegen, also metastabil oder stabil sein. Dies wird durch das Schaubild (Abbildung 2.3) verdeutlicht. In der Regel liegt der erste Fall vor, die konzentrierte Phase ist also sowohl gegenüber der homogenen Lösung als auch gegenüber der kristallinen Phase metastabil [8]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung der Kristalle aus den Tröpfchen von konzentrierter Flüssigkeit. Dies wird daran deutlich, dass nach Erreichen von T_{cloud} unmittelbar die LLPS zu beobachten ist, während die Bildung von Kristallen auf einer Zeitskala von Stunden erfolgt. Ob die Kristallisation gemäß der klassischen Theorie oder über die LLPS verläuft, hat Konsequenzen für die Morphologie der Kristalle. Typisch für die Zwei-Schritt-Kristallisation sind die in Abbildung 2.4 gezeigten Kristalle. Sie werden in der Literatur passenderweise auch als „Seeigel“-Kristalle bezeichnet. Diese spezielle Form entsteht folgendermaßen: Aufgrund der hohen Proteinkonzentration vollzieht sich die Kristallisation innerhalb eines LLPS-Tröpfchens relativ schnell. Wenn das enthaltene Protein komplett kristallisiert ist, setzt sich die Kristallisation außerhalb fort, da ja auch dort eine übersättigte Lösung vorliegt. Diejenigen Kristalle, die so orientiert sind, dass sie radial aus dem ursprünglichen Kristall herauswachsen, sind bevorzugt, da dies für den Zufluss an weiterem Protein günstiger

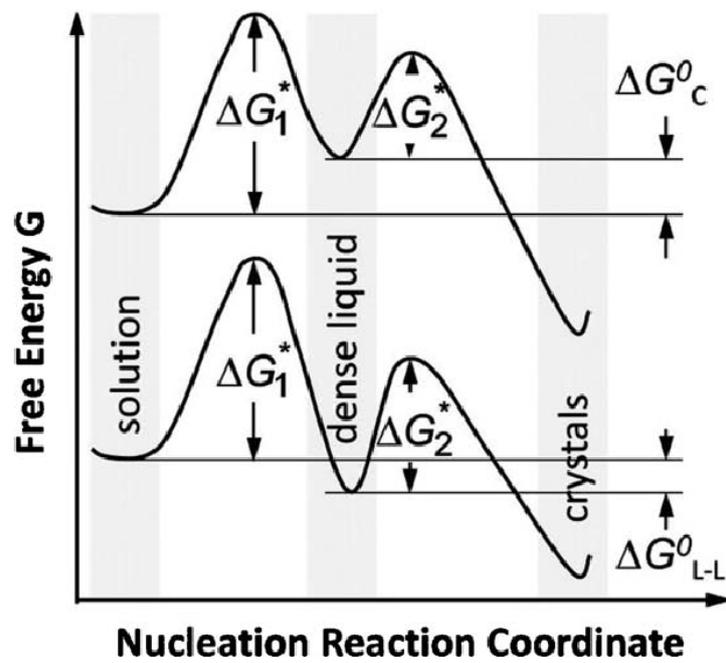


Abbildung 2.3: Freie Enthalpie mit Clusterformation (oben) und mit Tröpfchen höherer Proteinkonzentration im Verlauf der Keimbildung [9].

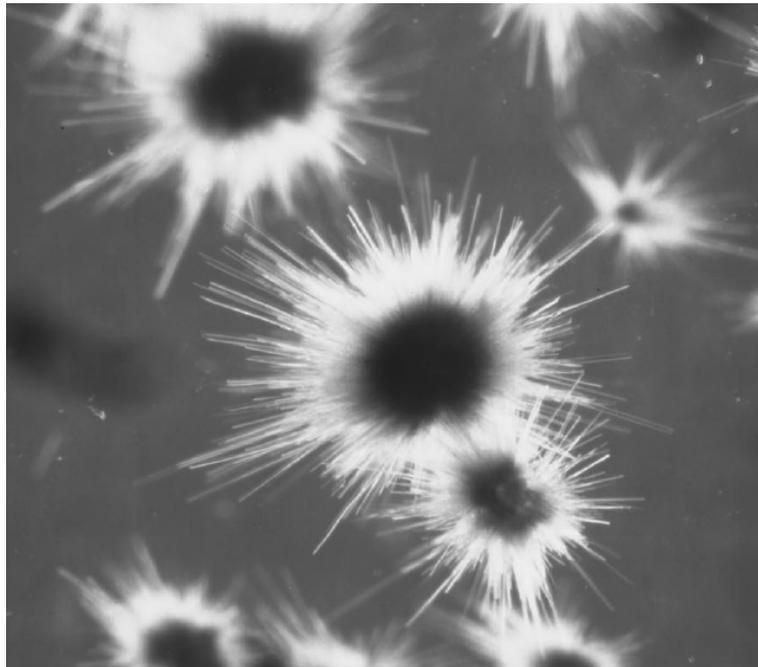


Abbildung 2.4: „Seigel“-Kristall [10].

ist [10].

2.3 Einfluss von Ionen: Die DLVO-Theorie

Die DLVO-Theorie wurde in den 1940er Jahren von den Wissenschaftlern Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek entwickelt und beschreibt die Kräfte, die die Stabilität von kolloidalen Teilchen (also beispielsweise Cluster, die bei der beginnenden Proteinkristallisation auftreten) beeinflussen. Das Potential, das die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinmolekülen beschreibt, besteht aus drei Beiträgen:

- Einer Wechselwirkung, die im Englischen unter dem Begriff „Hard Sphere“ („harte Kugel“) bekannt ist. Wie der Name schon sagt, kann man die Proteinmoleküle in grober Näherung als harte Kugeln auffassen. Wenn sich diese „Kugeln“ berühren, ist eine starke repulsive Wechselwirkung festzustellen. Auf molekularer Ebene ist dies dadurch zu erklären, dass sich die Elektronenwolken der beiden Moleküle bei sehr geringem Abstand überlappen würden. Ohne Berührung findet keine Wechselwirkung statt.
- Der attraktiven van-der-Waals-Wechselwirkung. Diese Wechselwirkung ist in der Chemie allgegenwärtig und spielt nicht nur bei Proteinen, sondern bei allen organischen Molekülen eine zentrale Rolle. Es handelt sich dabei um eine attraktive Wechselwirkung zwischen Molekülen, die über ein elektrisches Dipolmoment verfügen. Es gibt die Möglichkeit, dass beide beteiligte Moleküle aufgrund ihrer Konstitution über ein permanentes Dipolmoment verfügen und sich bei antiparalleler Ausrichtung gegenseitig anziehen. Es kann auch sein, dass nur eines der Moleküle über ein permanentes Dipolmoment verfügt, das andere jedoch polarisierbar ist und somit ein Dipolmoment induziert wird. Darüber hinaus können selbst zwei unpolare Moleküle miteinander wechselwirken, wenn in einem Molekül durch zufällige Fluktuationen ein Dipol entsteht, der wiederum im anderen Molekül einen Dipol induziert. Das Potenzial der van-der-Waals-Wechselwirkung ist normalerweise kurzreichweitig und folgt dem Gesetz:

$$V = -\frac{C}{r^6} \quad (2.10)$$

r steht in dieser Gleichung für den Abstand der Moleküle und C für eine Konstante. Allerdings verhält es sich bei einem sehr großen Makromolekül wie einem Protein aufgrund der großen Zahl beteiligter Moleküle wesentlich komplizierter, sodass

2 Theoretische Grundlagen

dieses einfache Abstandsgesetz nicht mehr gültig ist. Man findet für kugelförmige Proteine mit dem Durchmesser λ folgende Gleichung [6]:

$$V(r) = -\frac{A_H}{12} \left(\frac{\lambda^2}{r^2} + \frac{\lambda^2}{r^2 - \lambda^2} - 2 \ln \left(\frac{r^2 - \lambda^2}{r^2} \right) \right) \quad (2.11)$$

- Der repulsiven Coulomb-Wechselwirkung. Auf der Oberfläche eines Proteins bildet sich die so genannte elektrische Doppelschicht. Sie besteht zum einen aus den Ladungen, die direkt auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind, also etwa geladenen funktionellen Gruppen oder Ionen, die durch andere Effekte fest an die Proteinoberfläche adsorbiert sind. Zum anderen gibt es Ionen, die nicht fest gebunden, sondern in der umgebenden Lösung gelöst sind. Sie sind zweierlei Einflüssen ausgesetzt: Der Coulomb-Kraft durch die Ladungen an der Oberfläche sowie der thermischen Bewegung, die zur Diffusion führt. Die ortsfesten Ladungen werden durch die Ionen in der Diffusionsschicht teilweise abgeschirmt. Mithilfe diverser Überlegungen aus Thermodynamik und Elektrostatik kann das - zu einer repulsiven Wechselwirkung führende - Potential hergeleitet werden, das bei Annäherung zweier Proteine mitsamt ihrer elektrischen Doppelschichten relevant ist [6]:

$$V(r) = \frac{Z^2 e^2}{\epsilon \cdot (1 + \kappa d) r} \cdot e^{-\kappa \cdot (r - \lambda)} \quad (2.12)$$

Z steht hierbei für die Gesamtladung des Proteins, ϵ für die Dielektrizitätskonstante der Lösung, d für den Radius und $\lambda = 2d$ für den Durchmesser des Proteinmoleküls. κ ist eine Konstante, deren Kehrwert als Debye-Abschirmlänge bezeichnet wird. Sie wird durch folgende Formel beschrieben [6]:

$$\kappa = \sqrt{\frac{1}{k_B T \epsilon_0 \epsilon} \cdot \sum_{j=1}^M e^2 z_j n_j^0} \quad (2.13)$$

T ist die absolute Temperatur und ϵ_0 die Permittivität/Dielektrizitätskonstante in Vakuum. Der Index j bezieht sich auf die verschiedenen Ionensorten in der Lösung. z_j ist die Ladung eines Ions der Sorte j , n_j^0 die Konzentration der Ionen dieser Sorte in der Lösung außerhalb der Doppelschicht.

Das resultierende Potenzial aus den beiden letzten Beiträgen ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt (Die „Hard Sphere“-Wechselwirkung wird hier vernachlässigt, da sie nur zum Tragen kommt, wenn die Moleküle zusammenstoßen). Da die attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkung kurzreichweitiger ist als die repulsive Coulomb-Wechselwirkung,

2 Theoretische Grundlagen

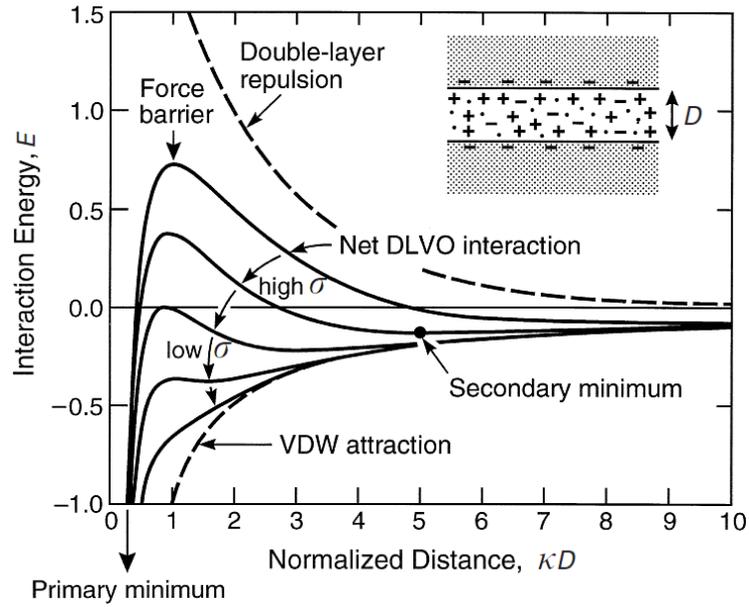


Abbildung 2.5: Potenzialkurven nach der DLVO-Theorie; σ steht für die Oberflächenladungsdichte der Protein-Makromoleküle [11].

muss bei der Annäherung zweier Proteinmoleküle zunächst ein (unterschiedlich ausgeprägter) Potenzialberg überwunden werden, um das Potentialminimum zu erreichen.

3 Experimentelles Vorgehen

3.1 Probenvorbereitung

Der Praktikumsversuch beginnt mit der Vorbereitung der Proben. Hierzu werden die Pufferlösung, die Protein-Stammlösung und die Natriumchlorid-Stammlösung (in dieser Reihenfolge) in Eppendorf-Röhrchen pipettiert und anschließend mithilfe eines Vortexmischers gemischt. Die genaue Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3.1 aufgelistet. x steht hierbei für die Konzentration der Protein-Stammlösung. Da diese variiert, können die Volumina von Protein-Stammlösung und Pufferlösung nur in Abhängigkeit von x angegeben werden. Im Anschluss an den Mischvorgang werden die Proben 30 Minuten lang in einem auf 21°C temperierten Wasserbad gelagert. In der Zwischenzeit werden die Objektträger vorbereitet.

Aus jedem Eppendorf-Röhrchen werden später zwei oder drei Tröpfchen auf den Objektträger gegeben. Pro Probe werden mehrere Tröpfchen vorbereitet für den Fall, dass die Kristallisation in einem Tröpfchen misslingt oder ein Glasplättchen versehentlich zerstört wird. Dazu werden nun pro Eppendorf-Röhrchen zwei oder drei (mit dem Betreuer absprechen, wie viele genau) Glasplättchen und Klebebandringe benötigt. Die Glasplättchen werden für später auf einem sauberen, staubfreien Tuch abgelegt. Für jedes Tröpfchen wird auf einem Objektträger ein Klebebandring angebracht (je drei Stück pro Objektträger). Jeweils unter dem Klebebandring wird die Nummer des zugehörigen Eppendorf-Röhrchens notiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wird jeweils ein 6 μ l großer Tropfen in der Mitte eines Klebebandrings platziert und die Glasplättchen werden daraufgeklebt (dabei ist der Sauggreifer hilfreich).

3 Experimentelles Vorgehen

Probennummer	Salzkonzentration (% w/v)	Proteinkonzentration ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)	Volumen Protein-stamm-lösung (μl)	Volumen Natriumchlorid-stamm-lösung (μl)	Volumen Pufferlösung (μl)
1	3,4	40	$\frac{8000}{x}$	58,3	$141,7 - \frac{8000}{x}$
2	3,9	40	$\frac{8000}{x}$	66,7	$133,3 - \frac{8000}{x}$
3	4,4	40	$\frac{8000}{x}$	75	$125 - \frac{8000}{x}$
4	4,9	25	$\frac{5000}{x}$	83,3	$116,7 - \frac{5000}{x}$
5	4,9	70	$\frac{14000}{x}$	83,3	$116,7 - \frac{14000}{x}$
6	5,4	70	$\frac{14000}{x}$	91,7	$108,3 - \frac{14000}{x}$
7	5,8	70	$\frac{14000}{x}$	100	$100 - \frac{14000}{x}$

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Proben.

3.2 Beobachtung

Die geeignetste Vergrößerung für die Versuche, die hier durchgeführt werden, ist 20x.

3.2.1 Zwei-Schritt-Kristallisation

Um die Zwei-Schritt-Kristallisation zu untersuchen, wurden die Proben 5 bis 7 vorbereitet. Es sind mehrere Proben mit leicht unterschiedlicher Salzkonzentration vonnöten, da sich das Einsetzen des zweiten Kristallisationsschrittes — also das Verschwinden der LLPS-bedingten Trübung und das Wachstum der „Seeigel“-Kristalle — zeitlich nicht genau voraussagen lässt. Unter Umständen kann nach den ersten beiden Beobachtungsphasen, die insgesamt eine gute Stunde in Anspruch nehmen, bei Probe Nr. 7 mit der höchsten Salzkonzentration die Kristallisation schon beendet sein. Andererseits kann die Kristallisation von Probe Nr. 5 über fünf Stunden dauern. Daher ist es sinnvoll, diejenige Probe weiter zu beobachten, die eine möglichst hohe Salzkonzentration aufweist, bei der aber immer noch die LLPS vorliegt, das heißt, die Probe ist noch sehr trüb und milchig und man kann kaum einzelne Kristalle erkennen. Es wird eine Aufnahme der Probe gemacht, bevor mit dem zweiten Versuch (der Ein-Schritt-Kristallisation) begonnen wird;

3 Experimentelles Vorgehen

eine weitere Aufnahme wird nach den Experimenten zur Ein-Schritt-Kristallisation gemacht. Idealerweise sollten beide Bilder von derselben Probe gemacht werden.

3.2.2 Ein-Schritt-Kristallisation: Wachstumsprozess

Falls die Temperaturkontrolleinheit verwendet wird, wird diese nun auf 21°C eingestellt und das Mikroskop sowie die Kamerasoftware „ZEN 2010“ gestartet. Eine Probe aus den Proben 1-4 wird nach Begutachtung derselben mit dem Betreuer ausgewählt und unters Mikroskop gelegt. Sobald Kristalle sichtbar werden (dies kann bereits zu Beginn der Beobachtung der Fall sein), wird die automatische Aufnahme einer Bilderreihe gestartet.

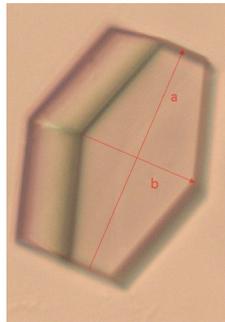


Abbildung 3.1: Ein tetragonaler Lysozymkristall mit seinen Achsen a und b .

Es wird 30 Minuten lang alle 5 Minuten ein Bild aufgenommen. Sobald die Bilderreihe für die erste Probe aufgenommen wurde, wird das gleiche Experiment für eine andere Probe aus Proben 1-4 durchgeführt. **Wichtig: Für die Bilderreihen müssen die Zeitpunkte der Probenvorbereitung sowie Anfangs- und Endzeitpunkt der Aufnahmereihen notiert werden.**

3.2.3 Ein-Schritt-Kristallisation: Analyse der Kristallformen

Insgesamt drei Stunden nach dem Mischen der Proben werden die Proben Nr. 1, 2 und 3 verglichen. Pro Probe werden gut geformte Kristalle ausgewählt und fotografiert. Es werden dabei jeweils alle drei Glasplättchen untersucht, das heißt, es entstehen insgesamt neun Aufnahmen.

4 Auswertung

1. Die **Zwei-Schritt-Kristallisation** ist langsamer als die klassische Kristallisation. Wählen Sie für Ihr Protokoll Aufnahmen aus, die vor und nach der Kristallisation gemacht wurden, um dieses Phänomen zu illustrieren. Beschreiben und erklären Sie Ihre Beobachtungen kurz.
2. **Ein-Schritt-Kristallisation und Wachstumsprozess:** Wählen Sie aus beiden Bilderreihen jeweils einen passenden Kristall aus und messen Sie seine Achsenlängen a und b (siehe Abbildung 3.1). Sie können hierfür die Software ZEN 2010 verwenden, die auf dem Praktikumscomputer installiert ist. Die Software ist außerdem frei erhältlich, falls Sie Ihre Analyse zu Hause verfeinern wollen. Stellen Sie a und b als Funktion der Zeit für beide Kristalle, die sie ausgewählt haben, graphisch dar und legen Sie eine Regressionsgerade durch den Graphen. Berechnen Sie die Wachstumsraten $\frac{da}{dt}$ und $\frac{db}{dt}$ in $\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$. Berechnen Sie die Induktionszeit des Kristallwachstums, t_0 , aus der linearen Regression.
3. **Analyse der Kristallproportionen:** Die Bilder der Proben 1-3, die drei Stunden nach der Probenvorbereitung gemacht wurden, werden ebenfalls ausgewertet. Messen Sie die Längen a und b einiger Kristalle aus jeder Probe und berechnen Sie die jeweiligen $\frac{a}{b}$ -Verhältnisse. Berechnen Sie für jede Probe die Durchschnittswerte für $\frac{a}{b}$ sowie die Standardabweichung. Stellen Sie den Durchschnittswert von $\frac{a}{b}$ inkl. Fehlerbalken als Funktion der Salzkonzentration der jeweiligen Proben graphisch dar. Welchen Trend können Sie beobachten? Erklären Sie Ihre Beobachtung.

Literaturverzeichnis

- [1] David Nelson, Michael Cox: Lehninger Biochemie, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin 2009
- [2] Wilfried Rähse: Enzyme für Waschmittel, Chemie Ingenieur Technik 84, 12 (2012), 2152-2163
- [3] Robert J. Whitehurst: Enzymes in food technology, Sheffield Academic Press, 2002
- [4] Juan Manuel Garcia-Ruiz: Nucleation of protein crystals, Journal of structural Biology 142 (2003), 22-31
- [5] Deniz Erdemir, Alfred Y. Lee, Allan S. Myerson: Nucleation of Crystals from Solution: Classical and Two-Step Models, Accounts of Chemical Research, Vol. 42, No.5 (Mai 2009), 621-629
- [6] J.D. Gunton, A. Shiryayev, D.L.Pagan: Protein Condensation - Kinetic Pathways to Crystallization and Disease, Cambridge University Press 2007
- [7] David W. Oxtoby: Homogenous nucleation: theory and experiment, Journal of Physics: Condensed Matter 4 (1992), 7627-7650
- [8] Peter G. Vekilov: The two-step mechanism of proteins in solution, Nanoscale 2 (2010), 2346-2357
- [9] Dennis Gebauer, Helmut Cölfen: Prenucleation clusters and non-classical nucleation, Nano Today 6 (2011), 564-584
- [10] Martin Muschol, Franz Rosenberger: Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization, Journal of Chemical Physics 107 (1997), 1953-1962
- [11] Deborah Leckband, Jacob Israelachvili: Intermolecular forces in biology, Quarterly Reviews of Biophysics 34, 2 (2001), 105-267