

Samenvatting

Eiwitmoleculen spelen een belangrijke rol in de mechanismen van het leven, en nemen deel aan elk proces in levende cellen. Kennis van hun drie-dimensionale structuur kan inzicht verschaffen in de manier waarop ze functioneren en dus in de manier waarop het leven functioneert. Röntgendiffractie (XRD) is de belangrijkste methode om de drie-dimensionale moleculaire structuur van eiwitten te bepalen. Het slagen van deze methode hangt af van de beschikbaarheid van hoge kwaliteit eiwit éénkristallen. Vanwege de brede variëteit aan eiwitmoleculen bestaat er geen alom geldend recept voor het groeien van kristallen die goed genoeg zijn voor röntgendiffractie. Om de juiste kristallisatiecondities voor een gegeven eiwit te vinden moet men vele mogelijke oplossingsstellingen uitproberen. Aan de ene kant heeft de technologie het proces om de juiste condities te vinden versneld door het op grote schaal (geautomatiseerd) aftasten van de parameter ruimte met behulp van “trial-and-error”. Aan de andere kant kan door begrip van de fundamentele processen van de eiwitkristalgroei de parameter ruimte verkleind worden.

Kristalgroei vanuit de oplossing, zoals eiwitkristalgroei, kan beschouwd worden als een combinatie van twee opeenvolgende processen; massatransport van groei-eenheden naar het kristaloppervlak, en de inbouw van die groei-eenheden in het kristal, oftewel de oppervlaktekinetiek. De groeisnelheid van het kristal wordt bepaald door de langzaamste van deze twee processen. In dit proefschrift wordt de balans tussen het massatransport en de oppervlaktekinetiek voor eiwitkristalgroei onderzocht met als doel bij te dragen aan het begrip van deze processen. Kippenei eiwit lysozyme (HEWL, naar het Engelse Hen Egg-White Lysozyme) is een vaak gebruikte modelstof voor ei-

witkristalgroei experimenten, waardoor er veel literatuur over beschikbaar is. Om dit tot voordeel te gebruiken, wordt lysozyme in dit proefschrift gebruikt als studieobject voor eiwitkristalgroei.

In hoofdstuk 2 en 3 wordt gebruik gemaakt van atomaire-kracht microscopie (AFM) en optische microscopie om de oppervlaktekinetiek gedurende de groei van lysozyme kristallen te onderzoeken. Met behulp van AFM worden op het (001) vlak van trikliene lysozyme kristallen afgeronde, zeer anisotrope groeispiralen zichtbaar gemaakt. Uit deze AFM metingen blijkt de fractie van HEWL moleculen die blijft plakken aan een kink-positie in een trede op dit oppervlak significant te verschillen van die voor de orthorombische lysozyme polymorf. In hoofdstuk 3 wordt vervolgens optische microscopie gebruikt voor verder onderzoek naar de verschillen tussen de diverse lysozyme polymorfen. Afhankelijk van de symmetrie van de desbetreffende polymorf is de groei van één van een paar tegenoverliggende kristalvlakken geblokkeerd. Dit effect kan toegeschreven worden aan zelfvergiftiging; dat wil zeggen dat de lysozyme moleculen zich in meerdere, metastabiele, oriëntaties aan het oppervlak kunnen hechten. Een dergelijk verkeerd georiënteerd molecuul kan het verdere groeiproces blokkeren. Dit effect zou kunnen verklaren waarom eiwitten vaak lastig te kristalliseren zijn.

In hoofdstuk 4 verschuiven we de aandacht naar massatransport. In dit hoofdstuk wordt de sferulitische groei van lysozyme kristallen onderzocht. Sferulieten zijn bundels kristallijne naaldjes die vaak worden aangetroffen in eiwitkristallisatie experimenten. Omdat ze niet nuttig zijn voor 3D structuurbepalingen met behulp van XRD, worden ze normaal gesproken als ongewenst resultaat beschouwd. De oppervlaktekinetiek speelt een belangrijke rol in de vorming van de typische korenschoofachtige vorm van de lysozyme sferulieten; een model waarin de naaldjes herhaaldelijk aan de punt opsplitsen verklaart de vorm. Wat betreft het massatransport laat de groeikinetiek zien dat voor één enkel naaldje de oppervlaktekinetiek de groeisnelheid domineert, maar dat de hele bundel naaldjes bij elkaar de oplossing sneller uitput dan massadiffusie weer kan aanvullen.

Naast de scheiding in een vaste fase en een verdunde oplossingsfase, kan

lysozyme in oplossing ook een derde fase tonen. Deze fase is een oplossingsfase van hoge dichtheid, en het vormen van deze fase wordt vloeistof-vloeistof fase-scheiding genoemd. De hoge-dichtheidsfase heeft een dusdanig hoge dichtheid dat deze een gel vormt, zodat nieuwe kristalletjes niet in deze fase kunnen gevormd worden, en dus alleen in de verdunde fase nucleëren. De druppels van de hoge-dichtheidsfase om deze kristalletjes heen geven de mogelijkheid massatransport te onderzoeken, zoals uitgelegd in hoofdstuk 5. Optische microscopie en vergelijking met computersimulaties geven aan dat de aanwezigheid van een derde fase de kinetiek van het groeiproces beïnvloedt door verandering in de aanvoer van groei-eenheden.

Men beschouwt convectie als een voor eiwitkristallisatie belangrijk massatransport proces, omdat het een efficiënt proces is voor de aanvoer van onzuiverheden naar het kristaloppervlak. Deze onzuiverheden kunnen, wanneer ze het kristaloppervlak hebben bereikt, ingebouwd worden en op die manier de kwaliteit van het kristal verslechteren. Natuurlijke convectie ontstaat door dichtheidsverschillen in de oplossing en de aanwezigheid van de zwaartekracht. Deze dichtheidsverschillen zijn het gevolg van het groeiende kristal dat de oplossing om zich heen verdunt. Schakelt men de zwaartekracht uit, dan zullen de dichtheidsverschillen niet meer leiden tot convectie. Diffusie is dan het enige massatransport proces. Om de convectie te dempen, zijn er worden er verscheidene methodes ontwikkeld, onder andere experimenten in microgravitatie. Normaal gesproken kan men slechts in de ruimte microgravitatie-experimenten gedurende langere tijd doen, zoals nodig voor eiwitkristalgroei. Een alternatieve manier om de zwaartekracht tegen te gaan is het gebruik van een magnetische kracht. Hoofdstuk 6 laat zien hoe deze techniek gebruikt wordt voor kristalgroei van het paramagnetische zout nikkelsulfaat hexahydraat, waarvoor een inhomogeen veld van 1.6 Tesla voldoende is om de convectie te dempen. In deze experimenten worden de concentratieprofielen zichtbaar gemaakt met behulp van schlieren microscopie. Eiwitten zijn vaak diamagnetisch en hebben daarom een sterker inhomogeen magneetveld nodig om convectie te dempen. Voor lysozyme is dit 27 Tesla, een dusdanig sterk veld dat het technisch nog niet mogelijk is om dit in stand te houden

voor de langere tijdsduur die nodig is om een eiwitkristal te groeien. Dat de methode in principe werkt, wordt in hoofdstuk 7 aangetoond met behulp van schaduwgrafie.

De sterkte van de convectie is niet alleen afhankelijk van de zwaartekracht, maar ook van de viscositeit van de oplossing en de (verticale) afmetingen van het systeem. In hoofdstuk 8 wordt de invloed van polyethyleen-glycol op de morfologische instabiliteit van tetragonale lysozyme kristallen onderzocht. In het bijna twee-dimensionale systeem van een druppeltje groei-oplossing tussen twee microscoopglasjes bepaalt de viscositeit de snelheid van het massatransport. Als massatransport de groeisnelheid bepalende stap is in het kristallisatieproces, kan een kristal zijn gefacetteerde vorm verliezen. Dit fenomeen, morfologische instabiliteit, is het gevolg van het “uitsteken” van de hoeken van het kristal in een bolvormig concentratieprofiel waardoor voor de hoekpunten lokaal meer groei-eenheden voorhanden zijn. Tijdens de experimenten beschreven in dit hoofdstuk wordt de groei van lysozyme kristallen van begin tot eind met de microscoop gevolgd, waarbij het hele spectrum van verschillende verhoudingen tussen massatransport en oppervlaktekinetiek de revue passeert.

Uit de experimenten beschreven in dit proefschrift blijkt dat het verloop van het eiwitkristalgroei afhankelijk is van de balans tussen massatransport en oppervlaktekinetiek. Het eiwitkristallisatie-proces kan verbeterd worden door in-situ de groei van een kristal te volgen. Op basis van deze observaties kan men onverwachte eindresultaten verklaren door wat er in het beginstadium van de groei gebeurt is, en zelfs gedurende het groeiproces de omstandigheden optimaliseren, bijvoorbeeld door de balans tussen massatransport en oppervlaktekinetiek te beïnvloeden.