



## Scientific Extension Paper

## Crystallography of Proteins in Weightlessness Conditions of Space

Maryam Salavatifar 

Faculty of Aerospace physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, research and Technology, Tehran, Iran

**ARTICLE INFO****Article History:**

Received 05 January 2025

Revised 05 February 2025

Accepted 09 February 2025

Available Online 21 April 2025

**Keywords:**

Crystallography

Weightlessness

Resolution


X-ray diffraction

**ABSTRACT**

Today, the unique environment of space-particularly microgravity-is employed in physics and materials science research and serves as a valuable platform for advancing various fields within the life sciences. The primary objective of weightlessness research is to elucidate the role of gravity in the origin, development, and future of life, as well as in the physiological adaptation of organisms ranging from unicellular species to humans. Additionally, microgravity conditions enable the investigation of biological phenomena, including bone and cartilage formation, vascular development, cancer progression, and other biomedical processes. In protein crystallography, X-ray diffraction patterns generated from crystals are analyzed to determine the three-dimensional molecular structure. This approach enables the reconstruction of the protein's precise architecture and reveals its biological functionality. Such structural insights are fundamental to research in biology, pharmacology, and medical sciences. A major challenge in this field is generating an adequate number of well-ordered crystals with minimal internal mosaicity and low impurity levels. Notably, most proteins do not readily form large, high-quality crystals, and successful crystallization depends heavily on both environmental parameters and the intrinsic properties of the molecule. Under terrestrial conditions, gravity imposes limitations on the crystallization process, often compromising crystal quality. In contrast, the microgravity environment of space partially mitigates these effects, frequently yielding crystals with superior structural integrity. Studies conducted in space have demonstrated that weightlessness can significantly influence crystal nucleation, growth dynamics, and final structural resolution. This research explores the impact of microgravity on protein crystallography, focusing on the advantages, limitations, and scientific opportunities it offers for advancing structural biology.


Corresponding Author's E-mail: [Salavati@ari.ac.ir](mailto:Salavati@ari.ac.ir)**How to Cite this Article:**M. Salavatifar, "Crystallography of proteins in weightlessness conditions of space," *Journal of Technology in Aerospace Engineering*, Vol. 9, No. 4, pp. 71-82, 2025, (in Persian), <https://doi.org/10.22034/jtae.2025.9.4.6>.**COPYRIGHTS**

Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by ARI. This article is an open access article licensed under the [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)  **ACCESS** Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).



## کریستالوگرافی پروتئین‌ها در شرایط بی‌وزنی فضا

مریم صلواتی فر 

استادیار، گروه فیزیولوژی هوافضا، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

### چکیده

امروزه شرایط خارق‌العاده فضا، به ویژه ریزجاذبه، نه تنها برای تحقیقات در علوم فیزیک و مواد مورد استفاده قرار می‌گیرد، بلکه ابزاری منحصر به فرد را برای تحقیق در زمینه‌های مختلف علوم زیستی فراهم می‌نماید. هدف اصلی مطالعات در شرایط بی‌وزنی، کشف نقش جاذبه بر تکامل و آینده حیات و توسعه و جهت‌گیری موجودات از تک سلولی تا انسان است. علاوه بر این، شرایط فضا می‌تواند برای مطالعات مهندسی بافت نظیر رشد استخوان، غضروف و عروق، تحقیقات سرطان و دارو نیز به کار رود. در کریستالوگرافی، الگوهای تابش اشعه ایکس بر روی کریستال‌ها برای تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها تجزیه و تحلیل می‌شود. از این طریق، ساختار دقیق مولکول پروتئینی بازسازی شده و عملکرد زیستی آن کشف می‌گردد. این مرحله برای فرایند تحقیق در زیست‌شناسی، داروسازی و پزشکی حیاتی می‌باشد. چالش برانگیزترین جنبه این فرایند، تولید میزان مناسبی از کریستال‌های مرتب و منظم با حداقل مقدار موزائیک داخلی و ترکیب کم ناخالصی است. لازم به ذکر است که اغلب پروتئین‌ها تمایل به تشکیل کریستال‌های بزرگ و با کیفیت ندارند که این امر هم به شرایط کریستالوگرافی و هم به خود مولکول بستگی دارد. در شرایط عادی، جاذبه بر روند تبلور و کیفیت پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد. در مقابل، شرایط بی‌وزنی فضا تا حدودی این معضل را حل نموده و می‌تواند منجر به تشکیل کریستال‌هایی با کیفیت بالاتر شود. بر اساس تحقیقات فضایی، بی‌وزنی می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر رشد کریستال و ساختار پروتئین تأثیر بگذارد. این پژوهش به بررسی تأثیرات بی‌وزنی فضا بر کریستالوگرافی پروتئین، مزایا، چالش‌ها و فرصت‌هایی می‌پردازد که این شرایط منحصر به فرد برای علم کریستالوگرافی ارائه می‌نماید.

### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت ۱۶ دی ۱۴۰۳

بازنگری ۱۷ بهمن ۱۴۰۳

پذیرش ۲۱ بهمن ۱۴۰۳

اولین انتشار ۰۱ اردیبهشت ۱۴۰۴

#### واژه‌های کلیدی

کریستالوگرافی

بی‌وزنی

وضوح

پراش اشعه ایکس

پست الکترونیکی نویسنده مسئول: [Salavati@ari.ac.ir](mailto:Salavati@ari.ac.ir)

#### How to Cite this Article:

M. Salavatifar, "Crystallography of proteins in weightlessness conditions of space," *Journal of Technology in Aerospace Engineering*, Vol. 9, No. 4, pp. 71-82, 2025, (in Persian), <https://doi.org/10.22034/jtae.2025.9.4.6>.

#### COPYRIGHTS

Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by ARI. This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## ۱ مقدمه

جاذبه با پیامدهای فیزیکی خود نه تنها در تمامیت جاندار بلکه در فرایندهای زیستی آن نیز نقش مهمی ایفا می‌نماید. ساده‌ترین نقش جاذبه این است که اجسام به زمین می‌افتند، آب به سمت پایین جریان می‌یابد و حباب‌های گاز در آب جوش بالا می‌آیند. با این حال، در سایر فرایندهای طبیعی و فنی، تأثیر جاذبه بلافاصله آشکار نمی‌شود و اهمیت آن تنها از طریق آزمایشات در غیاب جاذبه، یعنی در شرایط بی‌وزنی آشکار می‌گردد. به بیان دقیق‌تر، از نظر فیزیکی، یک جسم در زمان سقوط آزاد بی‌وزن است و به‌طور کلی، تمام حالت‌های بی‌وزنی، آشکال سقوط آزاد را نشان می‌دهند [۱]. با این حال، سقوط آزاد یک شرایط مطلوب است که تقریباً هرگز در واقعیت یافت نمی‌شود. تمام اجسام در حال سقوط، در معرض شتاب‌های کاذب با شدت‌های متفاوتی هستند که به عنوان مثال، به دلیل کشش هوا و ارتعاشات طبیعی ایجاد می‌شوند. به همین دلیل است که به جای بی‌وزنی، اصطلاح "ریزجاذبه" برای توصیف جاذبه بسیار کم، به عنوان مثال، روی فضاپیماها استفاده شده‌است. به منظور روشن نمودن نقش یک عامل فیزیکی معین، دانشمندان معمولاً مقدار یا جهت این عامل را تغییر داده یا آن را به‌طور کامل حذف می‌نمایند [۲].

جاذبه در همه جای زمین وجود دارد و از مجموعه‌های فیزیکی یا شیمیایی ساده گرفته تا سازمان‌های زیستی پیچیده، بر هر آن چه که روی کره زمین اتفاق می‌افتد تأثیر می‌گذارد. از زمان پیدایش زمین در حدود سه و نیم میلیارد سال پیش، جاذبه یک عامل فیزیکی ثابت بر روی آن است که بر منشاء، توزیع و تکامل حیات حاکم بوده و هست. به منظور درک کامل اهمیت جاذبه، آزمایش‌هایی در شرایط فضا، یعنی در غیاب جاذبه، انجام گردیده است [۱]. پژوهش‌ها ثابت نموده‌اند که در نبود جاذبه به دلیل فقدان رسوب گذاری<sup>۲</sup>، همرفت حرارتی<sup>۳</sup> و فشار هیدرواستاتیک<sup>۴</sup>، فرایندهایی نظیر الکتروفورز جریان آزاد و همجوشی الکتریکی سلول‌ها، به ترتیب با افزایش جداسازی و افزایش همجوشی همراه می‌شوند. علاوه بر این ثابت شده که تبلور درشت مولکول‌های زیستی در فقدان جاذبه تغییرات مثبتی داشته‌اند که این موضوع، باعث پیشرفت در تعیین ساختار و کشف و طراحی دارو گردیده است [۳، ۴].

## ۲ کریستالوگرافی پروتئین‌ها در فضا، فرصت‌ها و

### چالش‌ها

کریستالوگرافی پروتئین‌ها به مطالعه ساختار سه بعدی آن‌ها از طریق تحلیل الگوهای پراش اشعه ایکس روی کریستال‌هایشان اطلاق می‌شود. این روش به کمک الگوهای به‌دست آمده از تاباندن اشعه ایکس به کریستال، ساختار دقیق مولکول‌های پروتئین را بازسازی می‌کند. برای انجام این فرآیند، ابتدا

پروتئین‌ها باید به حالت کریستالی درآیند [۵]. برخی از عوامل موثر بر تبلور پروتئین شامل حلالیت، غلظت رسوب‌کننده، غلظت ماکرومولکول، قدرت یونی، pH، دما و منبع درشت مولکول، محیط احیا کننده یا اکسیدکننده، افزودنی‌ها، لیگاندها، سوبستراها، بازدارنده‌ها، کوآنزیم‌ها، یون‌های فلزی و سرعت تعادل می‌باشند [۶]. اما تبلور اصولاً چالش برانگیز است زیرا بسیاری از پروتئین‌ها تمایل به تشکیل کریستال‌های بزرگ و با کیفیت ندارند. از این رو بزرگترین چالش در این روش، دسترسی به کریستال‌های بزرگ و با کیفیت بالا است که برای تحلیل‌های دقیق لازم می‌باشد [۷].

ساختار سه بعدی یک پروتئین، اساس عملکرد آن است و فرآیندهای بیولوژیکی آن را منعکس می‌کند. بنابراین، تعیین ساختار پروتئین‌ها بسیار مهم می‌باشد [۸]. به‌دست آوردن کریستال‌های پروتئینی گلوگاه اصلی تعیین ساختار بوده و روش‌های متعددی برای بهبود کیفیت کریستال، مورد مطالعه قرار گرفته است [۹]. در این میان روش‌های شیمیایی مانند افزایش شرایط غربالگری کریستال و افزودن برخی مواد شیمیایی کوچک به منظور دستیابی به شرایط رشد کریستال مناسب‌تر، ارزیابی شده‌است [۱۰]. علاوه بر این، اثرات محیط فیزیکی مانند ریزگرانش [۱۱، ۱۲]، میدان مغناطیسی [۱۳]، دما [۱۴] و میدان‌های الکتریکی [۱۵] نیز بر تبلور پروتئین بررسی شده‌اند. علاوه بر این، روش‌های مهم دیگری مانند مهندسی پروتئین که از روش‌های نوترکیب یا جهش‌زایی برای اصلاح پروتئین و افزایش تبلور پذیری استفاده می‌کند، به منظور دست‌یابی به بلورهای با کیفیت، به‌طور گسترده در زیست‌شناسی ساختاری استفاده می‌شود [۱۶، ۱۷]. تمرکز مطالعه پیش‌رو بر تأثیر شرایط ریزجاذبه بر رشد کریستال پروتئین است.

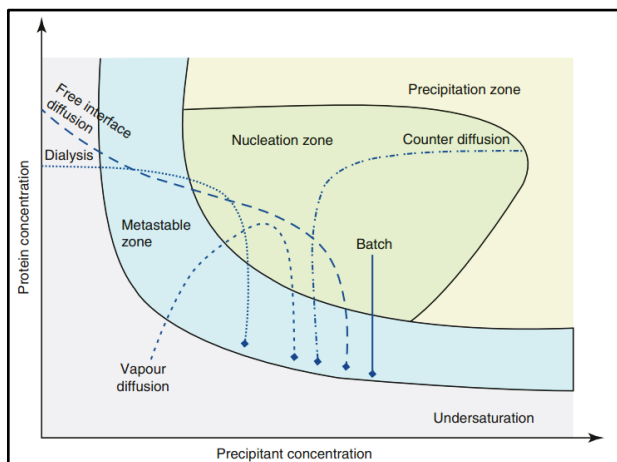
در شرایط عادی، پروتئین‌ها تحت تأثیر نیروی گرانش زمین قرار دارند که می‌تواند بر روند رشد کریستال‌ها و کیفیت آن‌ها تأثیر بگذارد. در مقابل، شرایط بی‌وزنی فضا تا حدودی این معضل را حل نموده و می‌تواند منجر به رشد کریستال‌هایی با کیفیت بالاتر شود [۱۸، ۱۹]. از دهه ۱۹۹۰، فضا به عنوان یک محیط منحصر به فرد برای مطالعه کریستالوگرافی پروتئین‌ها معرفی شده‌است. ایده استفاده از ریز جاذبه برای بهبود تبلور درشت مولکول‌های آلی، توسط پروفیسور Walter Littke ارائه شد که در سال ۱۹۸۱ اولین آزمایش خود را در طول پرواز موشک TEXUS-3 انجام داد. در واقع، وی در یک دوره ریز جاذبه کوتاه مدت که ۶ دقیقه به طول انجامید موفق شد بلورهایی به طول ۱۰۰ میکرومتر از آنزیم بتا گالاکتوزیداز<sup>۵</sup> را تولید کند [۲۰]. آزمایش‌های بیشتر در TEXUS و اندکی بعد در اولین مأموریت Spacelab در سال ۱۹۸۳، نتایج امیدبخشی را حاصل نمود که بلورهای بتا گالاکتوزیداز، ۲۷ برابر و بلورهای لیزوزیم که ۱۰۰۰ برابر بزرگ‌تر از آن‌چه روی زمین تولید می‌شد بودند [۲۱].

4. Hydrostatic Pressure  
5. Beta Galactosidase

1. Microgravity  
2. Sedimentation  
3. Thermal Convection

مجموعه وسیعی از روش‌ها، فرایندها، سخت‌افزارهای مختلف و همچنین روندهای روباتیک که تاکنون توسعه یافته و تحت بهینه سازی مستمر هستند، تا بحال تولید بلور، گلوگاه شناخته شده برای تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین می‌باشد. رشد بلور پروتئین همواره یک هنر در نظر گرفته می‌شود زیرا مسیرهای رشد بلور، تا حدودی غیرقابل پیش بینی باقی مانده است [۲۸-۳۰].

آخرین روش‌های بیوفیزیکی و ابزارهای تشخیصی پیشرفته، بینش‌هایی را در مورد مراحل اولیه تبلور ارائه کرده‌اند که به درک دقیق فرایند هسته‌زایی با جزئیات بیشتر کمک می‌کند. در تبلور پروتئین، یک محلول پروتئینی معمولاً با حضور یک رسوب دهنده، به حالت فوق اشباع در می‌آید، که به آرامی مولکول‌های حلال، آب را از سطح پروتئین دور نموده و باعث ایجاد فعل و انفعالات درون مولکولی پروتئین-پروتئین می‌شوند [۳۱]. در نتیجه باعث ایجاد هسته بلوری ترمودینامیکی و به دنبال آن رشد بیشتر بلور می‌گردد. علاوه بر خلوص و همگنی محلول پروتئین، شرایط محلولی که در آن فوق اشباع حاصل می‌شود، مهم‌ترین عوامل هستند زیرا آن‌ها یک مسیر زمانی بسیار خاص را با توجه به نمودار فاز تعیین می‌کنند (شکل ۱) [۲۸، ۳۲].



**شکل ۱** - نمودار فازی که اثرات غلظت پروتئین در برابر غلظت رسوب‌دهنده را نشان می‌دهد. منحنی حلالیت، دو ناحیه مربوط به حالت اشباع نشده و فوق اشباع یک محلول پروتئینی را جدا می‌کند. منطقه فوق اشباع در برگرنده مناطق ناپایدار، هسته زایی و رسوب است [۳۱].

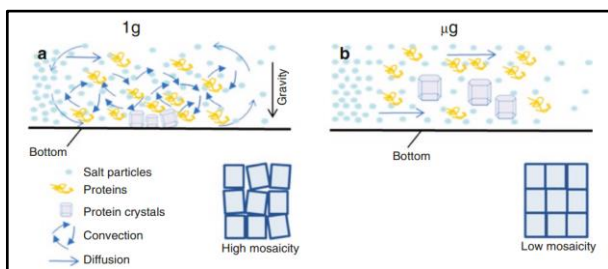
**Fig. 1.** Phase diagram showing the effects of protein concentration versus precipitant concentration. The solubility curve separates the two regions corresponding to the unsaturated and supersaturated states of a protein solution. The supersaturated region encompasses the metastable, nucleation, and precipitation zones [31].

نمودار فازی معمولاً برای توضیح فرایند تبلور بر اساس فرضیه Debye Hückel استفاده می‌شود [۳۳]. همان گونه که در شکل‌های ۱

جانداران با کمک ریبوزوم‌ها، مولکول‌های پروتئینی لازم خود را بر اساس اطلاعات DNA تولید می‌کنند. این امر، به تعبیری، ریبوزوم‌ها را به کارخانه‌های حیات تبدیل نموده است [۲۲]. برای درک عملکرد ریبوزوم‌ها باید ساختار سه بعدی آن‌ها را با وضوح بالا شناخت. علی‌رغم اینکه ساختارهای پروتئینی قبلاً در اواخر دهه ۱۹۷۰ منتشر شده بودند، شناسایی ساختار ریبوزوم‌ها تا سال ۲۰۰۰ به طول انجامید. اولین اکتشافات زمانی ظاهر شدند که Yonath اقدام به تولید بلورهای ریبوزوم و کشف ساختار آن‌ها به کمک اشعه ایکس نمود. در تلاش‌های اولیه، بلورهای ریبوزوم بسیار نازک و شکننده تولید شدند که برای تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس مناسب نبودند. در آن زمان گزینه تحقیق در شرایط ریزجاذبه در دسترس قرار گرفت [۲۳]. در اواخر دهه هفتاد فرضیه این بود که با توجه به عدم رسوب‌گذاری و جابه‌جایی ناشی از جاذبه در شرایط بی‌وزنی (انتقال انرژی حرارتی از طریق انتقال ذرات)، بلورهایی که تشکیل می‌شدند بزرگتر و خالص‌تر بودند. در بازه زمانی ۱۹۸۸ تا ۱۹۹۵، Yonath آزمایشات خود را در بیش از دوازده مأموریت فضایی ارسال نمود. با انجام این کار، او تلاش کرد تا در مأموریت‌های ماهواره‌ای COSIMA [۲۴] و چندین پرواز شاتل فضایی آمریکا، از جمله مأموریت D-2 آلمان در Spacelab در سال ۱۹۹۳ به همراه فضانوردان آلمانی، Ullrich Walter و Hans Schlegel، تبلور ریبوزوم را بهبود بخشد. در این زمان اولین نشانه‌های پیشرفت آشکار شد. بلورهایی که در طول مأموریت‌های شاتل / مأموریت Spacelab D2 (1993)، IML-2 (1994) و USML-2 (1995) رشد کردند، بزرگتر و گردتر بوده و اشکال یکنواخت‌تری داشتند. بنابراین راه را برای آزمایش‌های بیشتر روی زمین هموار نمودند. این تلاش‌ها سرانجام به روشنگری موفقیت آمیز ساختارهای ریبوزوم و در نهایت جایزه نوبل ختم شد [۲۵]. تبلور ریبوزوم‌ها توسط Yonath، برنده جایزه نوبل، تنها دستاوردی نیست که شایسته توجه باشد بلکه از آن زمان تاکنون این زمینه تحقیقاتی ادامه دارد.

با این حال، استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس برای تعیین ساختار پروتئین، مستلزم تولید مقدار کافی از بلورهای پروتئینی مرتب و منظم و با کیفیت است که بلورهای مناسب با اشعه ایکس نامگذاری شده‌اند. حتی امروزه، پس از راه اندازی نسل سوم و منابع تابش سنکروترون<sup>۱</sup> با درخشندگی بالا و لیزرهای الکترونی عاری از اشعه ایکس<sup>۲</sup> (XFELs)، که فقط به بلورهایی در اندازه‌های نانو یا میکرو نیاز دارند [۲۶]، تقاضای کلی برای تولید بلورهای با کیفیت بالا و مرتب (موزائیک داخلی اندک و ترکیب کم ناخالصی) وجود دارد. رشد چنین بلورهای با کیفیتی از مولکول‌های زیستی، اغلب دشوار بوده و به خود مولکول نیز بستگی دارد. برای مثال، انعطاف‌پذیری بالای یک پروتئین یا زیر دامنه‌های<sup>۳</sup> آن، که اغلب به عملکرد مولکول زیستی وابسته است، به عنوان عامل محدودکننده رشد بلور شناخته شده است [۲۷]. علی‌رغم

حرکت می‌کنند یا به گردش در می‌آیند، غیر قابل کنترل بوده و تا حدی رشد و تکامل بلور را برهم می‌زنند. بنابراین، رشد بلور در جاذبه صفر یا در یک محیط ریزجاذبه ( $10^{-3}$ – $10^{-7}$  g)، اجازه می‌دهد تا جریان همرفت و انتقال جرم مرتبط، به حداقل رسیده و در نتیجه همانطور که در شکل ۳.b نشان داده شده‌است محیطی با انتقال جرم تنها بر اساس انتشار ایجاد می‌گردد. بنابراین بلورها می‌توانند با ناخالصی‌های کمتر، موزاییک قابل توجه پایین‌تر و حجم افزایش یافته در مقایسه با کنترل‌های ۱g خود رشد کنند [۳۱].



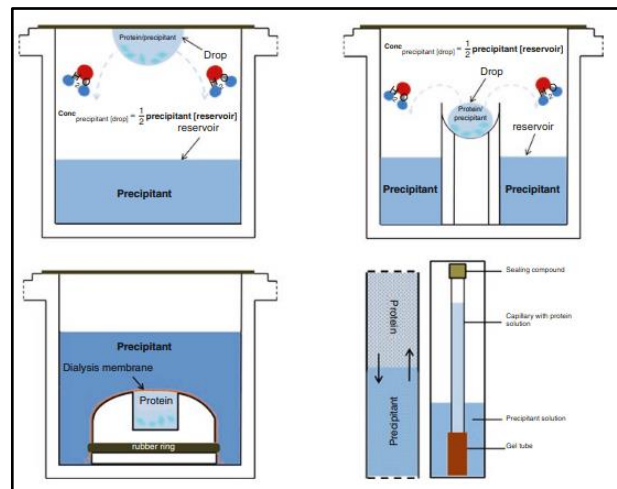
شکل ۳- طرح (a) انتقال جرم در شرایط زمین و طرح (b) ریزجاذبه را مقایسه نموده و کیفیت بلور حاصله با موزاییک بودن شبکه بلوری نمایش داده شده‌است [۳۱].

Fig. 3. Scheme (a) and (b) showing comparative mass transport under Earth and microgravity conditions and resulting crystal quality indicated by the mosaicity of the crystal lattice [31].

### ۳ ویژگی‌های رشد کریستال‌های پروتئین در شرایط بی‌وزنی

یکی از راه‌های بهبود کیفیت کریستال‌های پروتئین، رشد آن‌ها در شرایط بی‌وزنی است. جریان‌های همرفتی مرتبط با گرانش، در شرایط بی‌وزنی وجود ندارند و انتقال واحدهای سازنده به کریستال در حال رشد، عمدتاً از طریق انتشار انجام می‌شود [۳۷]. در شرایط ریزگرانش، منطقه خالی از پروتئین، که در اطراف کریستال تشکیل می‌شود، زمانی که مولکول‌ها در شبکه کریستالی قرار می‌گیرند، منبسط و تثبیت می‌گردد. در این منطقه، جایی که انتقال توسط انتشار انجام می‌شود، یک شیب پایدار غلظت پروتئین ایجاد می‌گردد [۳۸]. فقدان رسوب‌گذاری و شکل‌گیری میدان انتشار، به نفع رشد بلورهای هم‌اندازه<sup>۵</sup> است. به دلیل انتشار کم ماکرومولکول‌ها در طول انتقال جرم از طریق انتشار، رشد به کندی پیش رفته و سرعت توسط سینتیک سطحی کنترل می‌گردد. رشد آهسته در سطح فوق‌اشباع پایین، اتصال مولکول‌ها را در جهات بهینه تقویت نموده و نظم کریستال افزایش می‌یابد. در نهایت فرآیند اساساً کنترل نشده رشد در شرایط بی‌وزنی، تا حدی تنظیم می‌گردد [۷]. همراه با شیب

و ۲ نشان داده شده‌است، یک حالت فوق‌اشباع را می‌توان به‌طور نسبتاً مستقیم با استفاده از روش دسته‌ای و یا با اعمال ساده‌تر همچون دیالیز، انتشار بخار، یا انتشار متقابل<sup>۱</sup> (شکل ۲) به‌دست آورد [۳، ۲۹]. دو روش آخر امروزه بیشترین کاربرد را برای آزمایش‌های غربالگری استاندارد دارند. روش انتشار متقابل، که امکان کنترل و تنظیم دقیق و قابل تکرار انتقال جرم در رشد بلور پروتئین را فراهم می‌کند، در سال‌های اخیر برای آزمایش‌های فضایی، توسعه بیشتری یافته و بهینه شده‌است [۳۴، ۳۵].



شکل ۲- طرح‌های متداول‌تر مورد استفاده در تبلور. بالا: انتشار بخار، قطره آویزان و ساکن<sup>۲</sup>. پایین: سمت چپ، دیالیز و سمت راست، انتشار متقابل [۳۱].

Fig. 2. Schemes of the most commonly used crystallization methods. Top: vapor diffusion, hanging, and sitting drop. Below: left, dialysis and right, counter diffusion [31].

تفاوت چگالی در مجاورت بلورهای در حال رشد روی زمین، که با الحاق مولکول‌های پروتئین، املاح و یون‌ها به بلور در حال رشد ایجاد می‌شود، باعث ایجاد جریان‌های همرفت در مجاورت بلورهای در حال رشد می‌شود. این جریان‌های همرفت با انتقال بر اساس انتشار، همپوشانی دارند [۳۶]. بر روی زمین، برهمکنش و همپوشانی هر دو پدیده انتقال که در شکل ۳ نیز نشان داده شده‌است، سینتیک<sup>۳</sup> رشد بلور را تعیین می‌کند.

در این زمینه، به خوبی مشخص شده که سرعت و سینتیک انتقال کلی جرم، ترکیب ناخالصی‌هایی مانند توده‌های پروتئینی، پروتئین‌های نیمه تا خورده<sup>۴</sup> و غیره که می‌توانند تا حدودی در محلول‌های تبلور وجود داشته و بر کیفیت بلور، ابعاد نهایی و فرم بلور تأثیر بگذارند را تعیین می‌کند. از آنجایی که جریان‌های همرفت توسط سیالات سنگین‌تر یا سبک‌تر ایجاد می‌شوند که در جهت مخالف، تحت جاذبه طبیعی (۱ g)

4. Semi-Folded Proteins  
 5. Isometric

1. Counter Diffusion  
 2. Hanging and Sitting Drop  
 3. Kinetics

زمین نیز متبلور نمی‌شوند می‌توان به‌دست آورد. با این حال، در اواسط دهه ۱۹۸۰، همه آزمایش‌های تبلور در فضا از یک طرح آزمایشی مشابه پیروی می‌کردند. ابتدا روش تبلور وابسته به پروتئین با سخت‌افزار پرواز در آزمایشگاه‌های محققان تطبیق داده شد. دستورالعمل نهایی تبلور پروتئین برای آماده سازی سخت افزار پرواز در آزمایشگاه محقق اصلی یا در محل پرتاب استفاده گردید. به‌طور موازی، همان تعداد و یک تکرار ۱:۱ از آزمایش تبلور برای آزمون‌های کنترل زمینی تهیه شد. پس از بازگشت به زمین، تمام آزمایش‌ها و بلورهای به‌دست‌آمده ابتدا به صورت بصری بررسی و در مقایسه با آزمایش‌های کنترل زمینی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مرحله بعدی، نمونه‌ها برای پیگیری مجموعه داده‌های پراش مقایسه‌ای و تمام مراحل حل و اصلاح ساختار، به آزمایشگاه شخصی محقق منتقل شدند. تا آپریل سال ۲۰۲۴ آزمایش‌های تبلور پروتئین در شرایط ریزجاذبه، منجر به بررسی ۳۵۳ نمونه شده‌است. اغلب تغییراتی چون بهبود کیفیت بلور، کاهش میزان موزائیک داخلی و تصاویر حاصله واضح‌تری در تصویر برداری اشعه ایکس حاصل گردید [۱۹، ۲۳]. با این حال تعدادی از آزمایش‌ها شکست خوردند یا تفاوتی را در بلورهای رشد یافته در فضا نسبت به کنترل زمینی نشان ندادند. در جدول شماره ۱ به برخی از این پروتئین‌ها اشاره شده‌است.

**جدول ۱-** برخی پروتئین‌های منتخب متبلور شده در ایستگاه فضایی بین‌المللی.

**Table 1.** Some selected proteins crystallized on the International Space Station.

Protein	Function	Mission	References
Human triosephosphate isomerase	Glycolysis	ISS	[42]
Thermus flavus 5S rRNA helix B	Ribosomal RNA	ISS 6A, STS-100, STS-105	[43]
Mistletoe lectin I from Viscum album in complex with adenine monophosphate	Ribosome inactivator	ISS 6A, STS-113	[11, 44]
Apocrustacyanin C (1)	Biological pigment	US Space shuttle, ISS mission	[45]

غلظت پروتئین در اطراف کریستال، شیب غلظت ناخالصی‌ها نیز ایجاد می‌شود. از آنجایی که ناخالصی‌ها اغلب توده مانند هستند، انتشار کمتری نسبت به ماکرومولکول‌های اصلی داشته و ادغام آن‌ها در کریستال کاهش می‌یابد. بنابراین، گرادیان غلظت، یک فیلتر برای انتشار است که از کریستال در برابر ورود ناخالصی‌ها محافظت می‌کند [۳۹]. بنابراین، برای درشت مولکول‌هایی که دارای ضریب انتشار پایینی هستند، بی‌وزنی محیط مناسبی برای رشد کریستال‌های با کیفیت بالا است [۷]. نتایج آزمایش‌های متعدد، مزایای بی‌وزنی را به‌عنوان واسطه‌ای برای رشد کریستال‌های باکیفیت نشان داده و کمک قابل توجهی به درک قوانین حاکم بر رشد بلورهای ماکرومولکولی نموده است. در مقایسه با کریستال‌های کنترل زمینی، کریستال‌هایی که در جاذبه صفر رشد کرده‌اند، اندازه بزرگ‌تر، ساختار کامل‌تر و موزاییکی کم‌تری داشتند که برای کریستالوگرافی نوترونی نیز قابل توجه است [۱۱، ۴۰، ۴۱]. علاوه بر این، کریستال‌ها در سطوح چسبنده بین ویال و محلول پروتئین رشد نمی‌کردند و بنابراین مشکل برداشتن آن‌ها رفع می‌گردید [۷].

همان‌گونه که پیش‌تر نیز ذکر گردید، اولین آزمایش فضایی که توسط John و Littke در سال ۱۹۸۴ در چارچوب برنامه TEXUS آلمان انجام شد تأیید کرد که ریزجاذبه محیطی جذاب برای تولید بلورهای پروتئینی با کیفیت ارتقا یافته است [۲۱]. در نتیجه از همان ابتدای تحقیقات ریزجاذبه، رشد بلورهای پروتئین و سایر مولکول‌های زیستی، موضوعی متمایز در فعالیت‌های تحقیقاتی بین‌المللی در شرایط ریزجاذبه گردید. سخت‌افزارها و روش‌های مختلفی برای انجام آزمایش‌های تبلور بر روی ماهواره‌های بدون سرنشین، در مأموریت‌های شاتل فضایی و ایستگاه‌های فضایی مانند MIR و ISS ایجاد شد. از آزمایش‌های اولیه تاکنون پیشرفت قابل توجه و مستمری در ساخت و تطبیق سخت‌افزار تبلور برای آزمایش‌های ریزجاذبه با توجه به محیط ویژه فضایی انتخاب شده برای آزمایشات حاصل شده‌است. در اصل، تمام روش‌های تبلور ذکر شده قبلی که در شکل ۲ نشان داده شده‌است و برای آزمون‌های آزمایشگاهی رشد بلورهای پروتئینی به کار می‌روند، با آزمایش‌های فضایی منفرد مطابقت داده شده‌اند. گزارش John و Littke توسط دانشمندانی که در زمینه کریستالوگرافی اشعه ایکس کار می‌کردند به خوبی تصدیق شد و به دنبال آن مفاهیم جدید و بیشتری برای فرایند رشد بلور پروتئین در فضا پدیدار گردید. همه مفاهیم و آزمایش‌های بعدی با این انتظارات مرتبط بودند که رشد بلور پروتئین در فضا باعث بهبود کریستالوگرافی اشعه ایکس و زیست‌شناسی ساختاری می‌شود. در زمان‌های ابتدایی آزمایش‌های فضایی، به دلیل کاهش همرفت نامطلوب که پیش‌تر ذکر گردید و هسته سازی ملایم و رشد بیشتر بلورها، تصور می‌شد که حتی بلورهای پروتئین را از سوسپانسیون نمونه‌هایی که روی

Phosphopantetheine Adenylyltransferase from Mycobacterium tuberculosis in complex with Coenzyme A	Coenzyme A biosynthesis	ISS, Russian Module	[58, 59]
Human epidermal growth factor receptor	Signal transduction	ISS	[60]
Phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) from Mycobacterium tuberculosis in the apo form, Phosphopantetheine Adenylyltransferase in complex with dephosphocoenzyme A	Coenzyme A biosynthesis	ISS, Russian Module	[59]
Carboxypeptidase T from Thermoactinomyces vulgaris in Complex with N-BOC-L-leucine	Protease	ISS, Russian Module	[61]
Thermostable T1 Lipase	Fat hydrolyser	ISS, JAXA	[62]
Zn-insulin	Blood sugar regulation	ISS, Russian Module	[63]
Porcine carboxypeptidase B	Protease	ISS, Russian Module, JAXA	[64]
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from E. coli	Ribose sugar producer	ISS, Russian Module	[65]
D-tagatose 3-epimerase C66S from Pseudomonas cichorii in complex with 1-deoxy L-tagatose	Sugar epimerization catalyst	ISS, JAXA-PCG	[66]
Protein Crystal Growth-15	Tryptophan biosynthesis	ISS	[67]
Manganese superoxide dismutase	Antioxidant enzyme	ISS	[68]

Myoglobin triple mutant Mb-YQR [L(B10) Y, H(E7) Q and T(E10) R]	Muscle oxygen carrier	ISS 6A, ISS 8A	[46]
Manganese superoxide dismutase	Antioxidant enzyme	ISS	[47]
Hydrogenase maturation factor HypF N-terminal domain	Active hydrogenase constructor	ISS 8A/STS110	[48]
Liver Basic Fatty Acid-Binding Protein, Chicken liver basic Fatty Acid-binding protein complexed with cholic acid	Dissolution, storage and transport	STS-100, ISS-6A	[49]
Hematopoietic prostaglandin D synthase	Allergic inflammation mediator	ASDA-GCF#3, ISS	[50]
Hen egg lysozyme, Carboxypeptidase B	Enzyme role	ISS 11	[51]
Recombinant human insulin	Blood sugar regulation	ISS12-13	[51]
Thermotoga maritima triose phosphate isomerase	Increase the speed of glycolysis	ISS	[52]
Archaeal transcription termination factor NusA	Transcription termination factor	ISS, JAXA-GCF project	[53]
Mistletoe Lectin I (ML-I)	Protein synthesis inhibitor	ISS	[54]
Mistletoe Lectin I in complex with Zeatin	Lectin-bound cytokine	ISS	[55]
Uridine phosphorylase from Shewanella oneidensis MR-1	Pyrimidine recycling pathway enzyme	ISS, JAXA	[56]
Mouse Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase	Nervous system regulator	ISS, Russian Module-1, JAXA	[57]
Recombinant Formate Dehydrogenase from Arabidopsis thaliana	Conversion of formate to carbon dioxide	ISS, Russian Module	[58]

قابل مشاهده نیست. این امر می‌تواند اطلاعات جدیدی در مورد نحوه عملکرد پروتئین‌ها فراهم نماید [۲۳].

#### ۲.۴ چالش‌ها

- **هزینه‌های بالا:** ارسال تجهیزات و نمونه‌ها به فضا و انجام آزمایشات در ایستگاه فضایی نیازمند هزینه‌های بسیار گزاف است [۶۹].
- **محدودیت‌های فنی:** ابزارها و دستگاه‌های مورد استفاده در فضا ممکن است محدودیت‌هایی در مقایسه با دستگاه‌های موجود در زمین داشته باشند. این امر می‌تواند فرآیند تحقیقاتی را پیچیده‌تر نماید [۲۳].
- **ناپایداری شرایط محیطی:** نوسانات دما، پرتوهای کیهانی و سایر شرایط محیطی در فضا می‌تواند تأثیرات منفی بر روی رشد و کیفیت کریستال‌ها داشته باشد [۲۳].

#### ۵ نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده

کریستالوگرافی پروتئین‌ها در شرایط بی‌وزنی فضا به عنوان یک ابزار نوین در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و بیوشیمیایی به حساب می‌آید. این تکنیک می‌تواند به کشف‌های جدیدی در زمینه ساختارهای پروتئینی و عملکردهای آن‌ها منجر شود. با این حال، چالش‌هایی وجود دارند که برای بهره‌برداری حداکثری از این فرصت‌ها باید مورد توجه قرار گیرند. در آینده، با پیشرفت تکنولوژی‌های فضایی و کاهش هزینه‌های مرتبط، این روش‌ها می‌توانند به‌طور گسترده‌تری در تحقیقات پروتئینی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند. به علاوه، همکاری‌های بین‌المللی و استفاده از پایگاه‌های فضایی می‌تواند به تسریع در توسعه این حوزه کمک کند. البته استفاده از دستگاه‌های شبیه‌ساز بی‌وزنی نیز ممکن است گزینه جایگزین مناسبی باشد.

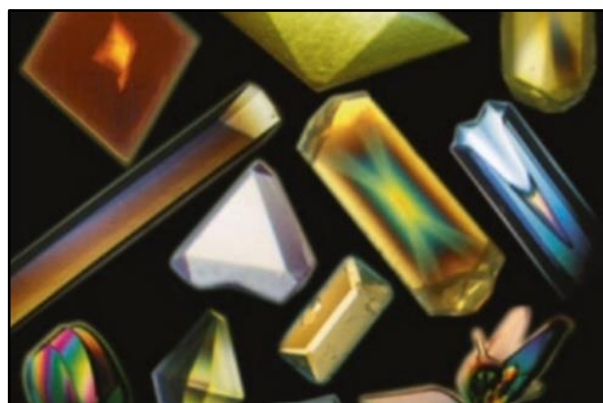
#### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسنده بیان نشده است.

#### مراجع

- [1] J. Balukovic, J. Slisko, and A. C. Cruz, "Thought experiments in teaching free-fall weightlessness: A critical review and an exploration of mercury's behavior in 'falling elevator'," *EURASIA Journal of Mathematics, Science and Technology Education*, vol. 13, no. 5, pp. 1283-1311, 2016, <https://doi.org/10.12973/eurasia.2017.00671a>.

همان‌طور که این مثال‌ها نشان می‌دهند، تبلور درشت مولکول‌های آلی در ریزجاذبه، نمونه دیگری از این حقیقت است که چگونه در تحقیقات، معمولاً صبر در پایان نتیجه می‌دهد. طبق مقاله مروری منتشر شده در سال ۲۰۲۴، به نظر می‌رسد اندازه کریستال، کمترین عامل تعیین‌کننده موفقیت برای تبلور در ریزگرانش باشد. ساختار، مورفولوژی، حد تفکیک و موزایک درونی، به وضوح برای اکثر کریستال‌های رشد یافته در شرایط ریزگرانش، تا نزدیک به ۹۰ درصد بهبود یافته بود [۱۹].



شکل ۴- نمای هنرمندانه یک مجموعه بلور پروتئینی رشد یافته در فضا [۲۳].

Fig. 4. Artist view of a collection of space-grown protein crystals [23].

#### ۴ فرصت‌ها و چالش‌های کریستالوگرافی در شرایط بی‌وزنی

در این بخش به شرح فرصت‌ها و چالش‌های کریستالوگرافی در شرایط بی‌وزنی می‌پردازیم.

##### ۱.۴ فرصت‌ها

- **رشد کریستال‌های بزرگتر و با کیفیت‌تر:** در بی‌وزنی فضا، نبود گرانش به پروتئین‌ها اجازه می‌دهد که به صورت منظم‌تری با یکدیگر ترکیب شوند، که این امر منجر به تولید کریستال‌هایی با ابعاد بزرگتر و کیفیت بالاتر می‌شود [۷].
- **مطالعه پروتئین‌های خاص:** برخی از پروتئین‌ها در زمین کریستالیزه نمی‌شوند یا کریستال‌های آن‌ها بسیار کوچک و بی‌کیفیت هستند. شرایط بی‌وزنی فضا ممکن است شرایطی را ایجاد نماید که این پروتئین‌ها به‌طور بهینه‌تری کریستالیزه شوند [۲۳].
- **درک بهتر ساختارهای پروتئینی:** شرایط بی‌وزنی فضا ممکن است به تغییرات ساختاری پروتئین‌ها منجر شود که در شرایط زمینی

- protein crystallization," *Journal of Crystal Growth*, vol. 262, no. 1-4, pp. 499-502, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2003.09.050>.
- [16] Z. S. Derewenda, "The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization," *Methods*, vol. 34, no. 3, pp. 354-363, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.024>.
- [17] K. L. Longenecker, S. M. Garrard, P. J. Sheffield, and Z. S. Derewenda, "Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 57, no. 5, pp. 679-688, 2001, <https://doi.org/10.1107/s0907444901003122>.
- [18] M. Braddock, "From target identification to drug development in space: Using the microgravity assist," *Current Drug Discovery Technologies*, vol. 17, no. 1, pp. 45-56, 2020, <https://doi.org/10.2174/1570163816666190112150014>.
- [19] K. Jackson *et al.*, "An analysis of protein crystals grown under microgravity conditions," *Crystals*, vol. 14, no. 7, 2024, Art. no. 652, <https://doi.org/10.3390/cryst14070652>.
- [20] G. Ruyters, C. Betzel, D. Grimm, G. Ruyters, C. Betzel, and D. Grimm, "Biotechnology, cell biology and microgravity," *Biotechnology in Space*, pp. 1-10, 2017, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64054-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64054-9_1).
- [21] W. Littke and C. John, "Protein single crystal growth under microgravity," *Science*, vol. 225, no. 4658, pp. 203-204, 1984, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(86\)90183-1](https://doi.org/10.1016/0022-0248(86)90183-1).
- [22] H. F. Noller, "Structure of ribosomal RNA," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 53, no. 1, pp. 119-162, 1984, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.53.1.119>.
- [23] G. Ruyters, C. Betzel, and D. Grimm, *Biotechnology in Space*, Springer, 2017, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64054-9>.
- [24] V. A. Erdmann *et al.*, "Crystallization of proteins under microgravity," *FEBS Letters*, vol. 259, no. 1, pp. 194-198, 1989, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81526-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81526-1).
- [25] R. Van Noorden, "Structural biology bags chemistry prize: Chemistry Nobel for trio who described the ribosome," *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 860-861, 2009, <https://doi.org/10.1038/461860a>.
- [26] J. M. Martin-Garcia, C. E. Conrad, J. Coe, S. Roy-Chowdhury, and P. Fromme, "Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 602, pp. 32-47, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.036>.
- [27] R. Giegé, "A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day," *The FEBS Journal*, vol. 280, no. 24, pp. 6456-6497, 2013, <https://doi.org/10.1111/febs.12580>.
- [2] U. Proske and B. M. Weber, "Proprioceptive disturbances in weightlessness revisited," *Npj Microgravity*, vol. 9, no. 1, 2023, Art. no. 64, <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00318-8>.
- [3] A. McPherson and L. J. DeLucas, "Microgravity protein crystallization," *Npj Microgravity*, vol. 1, no. 1, pp. 1-20, 2015, <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2015.10>.
- [4] D. R. Morrison, "Cell electrophoresis in microgravity: Past and future," *Cell Electrophoresis*, pp. 283-313, 2020, <https://doi.org/10.1201/9781003069188-20>.
- [5] A. McPherson, "Protein crystallization," *Protein Crystallography: Methods and Protocols*, pp. 17-50, 2017, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_2).
- [6] M. Abdalla, W. A. Eltayb, A. Samad, S. Elshareef, and T. Dafaalla, "Important factors influencing protein crystallization," *Global Journal of Biotechnology and Biomaterial Science*, vol. 2, no. 1, pp. 025-028, 2016, <https://doi.org/10.17352/gjbs.000008>.
- [7] V. Timofeev and V. Samygina, "Protein crystallography: Achievements and challenges," *Crystals*, vol. 13, no. 1, 2023, Art. no. 71, <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.
- [8] H. M. Berman *et al.*, "The protein data bank," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [9] J. R. Helliwell and N. E. Chayen, "A down-to-Earth approach," *Nature*, vol. 448, no. 7154, pp. 658-659, 2007, <https://doi.org/10.1038/448658a>.
- [10] N. E. Chayen, "Protein crystallization for genomics: throughput versus output," *Journal of Structural and Functional Genomics*, vol. 4, pp. 115-120, 2003, <https://doi.org/10.1023/a:1026174727482>.
- [11] E. H. Snell and J. R. Helliwell, "Macromolecular crystallization in microgravity," *Reports on Progress in Physics*, vol. 68, no. 4, 2005, Art. no. 799, <https://doi.org/10.1088/0034-4885/68/4/r02>.
- [12] N. E. Chayen and J. R. Helliwell, "Microgravity protein crystallization: Are we reaping the full benefit of outer space," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 974, no. 1, pp. 591-597, 2002, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb05933.x>.
- [13] N. Ramachandran and F. Leslie, "Using magnetic fields to control convection during protein crystallization-analysis and validation studies," *Journal of Crystal Growth*, vol. 274, no. 1-2, pp. 297-306, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.10.006>.
- [14] C. Y. Zhang *et al.*, "Cycling temperature strategy: A method to improve the efficiency of crystallization condition screening of proteins," *Crystal Growth and Design*, vol. 8, no. 12, pp. 4227-4232, 2008, <https://doi.org/10.1021/cg800689j>.
- [15] G. Sasaki, A. Moreno, and K. Nakajima, "Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on

- [40] P. Eistrikh-Heller *et al.*, "Crystallization in microgravity and the atomic-resolution structure of uridine phosphorylase from vibrio cholerae," *Crystallography Reports*, vol. 66, pp. 777-785, 2021, <https://doi.org/10.1134/s1063774521050059>.
- [41] K. Boyko, V. Timofeev, V. Samygina, I. Kuranova, V. Popov, and M. Koval'Chuk, "Protein crystallization under microgravity conditions: Analysis of the results of Russian experiments performed on the International Space Station in 2005-2015," *Crystallography Reports*, vol. 61, pp. 718-729, 2016, <https://doi.org/10.1134/s1063774516050059>.
- [42] T. Kinoshita, R. Maruki, M. Warizaya, H. Nakajima, and S. Nishimura, "Structure of a high-resolution crystal form of human triosephosphate isomerase: Improvement of crystals using the gel-tube method," *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 61, no. 4, pp. 346-349, 2005, <https://doi.org/10.1134/s1063774516050059>.
- [43] M. Vallazza *et al.*, "Crystallization and structure analysis of Thermus flavus 5S rRNA helix B," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 58, no. 10, pp. 1700-1703, 2002, <https://doi.org/10.1107/s090744490201421x>.
- [44] R. Krauspenhaar *et al.*, "Crystallisation under microgravity of mistletoe lectin I from Viscum album with adenine monophosphate and the crystal structure at 1.9 Å resolution," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 58, no. 10, pp. 1704-1707, 2002, <https://doi.org/10.1107/s0907444902014270>.
- [45] J. Habash, T. J. Boggon, J. Raftery, N. E. Chayen, P. F. Zagalsky, and J. R. Helliwell, "Apocrustacyanin C1 crystals grown in space and on Earth using vapour-diffusion geometry: Protein structure refinements and electron-density map comparisons," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 59, no. 7, pp. 1117-1123, 2003, <https://doi.org/10.2210/pdb1obu/pdb>.
- [46] A. E. Miele, L. Federici, G. Sciara, F. Draghi, M. Brunori, and B. Vallone, "Analysis of the effect of microgravity on protein crystal quality: The case of a myoglobin triple mutant," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 59, no. 6, pp. 982-988, 2003, <https://doi.org/10.1107/s0907444903005924>.
- [47] A. Vahedi-Faridi, J. Porta, and G. E. Borgstahl, "Improved three-dimensional growth of manganese superoxide dismutase crystals on the International Space Station," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 59, no. 2, pp. 385-388, 2003, <https://doi.org/10.1107/s0907444902020310>.
- [48] M. Ponassi, L. Felli, S. Parodi, U. Valbusa, and C. Rosano, "Crystals of the hydrogenase maturation
- [28] J. A. Gavira, "Current trends in protein crystallization," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 602, pp. 3-11, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010>.
- [29] A. McPherson, "Introduction to protein crystallization," *Methods*, vol. 34, no. 3, pp. 254-265, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.019>.
- [30] N. E. Chayen and E. Saridakis, "Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal," *Nature Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 147-153, 2008, <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>.
- [31] A. Martirosyan *et al.*, "Effect of macromolecular mass transport in microgravity protein crystallization," *Gravitational and Space Research*, vol. 7, no. 1, pp. 33-44, 2019, <https://doi.org/10.2478/gsr-2019-0005>.
- [32] R. Schubert, A. Meyer, D. Baitan, K. Dierks, M. Perbandt, and C. Betzel, "Real-time observation of protein dense liquid cluster evolution during nucleation in protein crystallization," *Crystal Growth and Design*, vol. 17, no. 3, pp. 954-958, 2017, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01826>.
- [33] P. Debye, "Lowering of freezing point and related phenomena," *Physikalische Zeitschrift*, vol. 24, pp. 185-206, 1923.
- [34] L. A. Gonzalez-Ramirez, J. Carrera, J. A. Gavira, E. Melero-Garcia, and J. M. Garcia-Ruiz, "Granada crystallization facility-2: A versatile platform for crystallization in space," *Crystal Growth and Design*, vol. 8, no. 12, pp. 4324-4329, 2008, <https://doi.org/10.1021/cg800788e>.
- [35] C. Sauter, B. Lorber, A. McPherson, and R. Giegé, "General methods," *International Tables for Crystallography*, pp. 99-121, 2012, <https://doi.org/10.1107/97809553602060000812>.
- [36] P. G. Vekilov and J. I. D. Alexander, "Dynamics of layer growth in protein crystallization," *Chemical Reviews*, vol. 100, no. 6, pp. 2061-2090, 2000, <https://doi.org/10.1021/cr9800558>.
- [37] N. Ramachandran, C. R. Baugher, and R. J. Naumann, "Modeling flows and transport in protein crystal growth," *Microgravity Science and Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 170-179, 1995.
- [38] F. Otálora, M. L. Novella, J. A. Gavira, B. R. Thomas, and J. M. García-Ruiz, "Experimental evidence for the stability of the depletion zone around a growing protein crystal under microgravity," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 57, no. 3, pp. 412-417, 2001, <https://doi.org/10.1107/s0907444901000555>.
- [39] A. Chernov, J. Garcia-Ruiz, and B. Thomas, "Visualization of the impurity depletion zone surrounding apoferritin crystals growing in gel with holoferritin dimer impurity," *Journal of Crystal Growth*, vol. 232, no. 1-4, pp. 184-187, 2001, [https://doi.org/10.1016/s0022-0248\(01\)01065-x](https://doi.org/10.1016/s0022-0248(01)01065-x).

- [57] K. Inaka *et al.*, "High-quality protein crystal growth of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase in microgravity," *Crystal Growth and Design*, vol. 11, no. 6, pp. 2107-2111, 2011, <https://doi.org/10.1021/cg101370v>.
- [58] V. Timofeev, E. Smirnova, L. Chupova, R. Esipov, and I. Kuranova, "Preparation of the crystal complex of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with coenzyme A and investigation of its three-dimensional structure at 2.1-Å resolution," *Crystallography Reports*, vol. 55, pp. 1050-1059, 2010, <https://doi.org/10.1134/s1063774510060234>.
- [59] V. Timofeev, E. Smirnova, L. Chupova, R. Esipov, and I. Kuranova, "Three-dimensional structure of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in the apo form and in complexes with coenzyme A and dephosphocoenzyme A," *Crystallography Reports*, vol. 57, pp. 96-104, 2012, <https://doi.org/10.1134/s1063774512010142>.
- [60] I. Yoshizaki *et al.*, "Growth rate measurements of lysozyme crystals under microgravity conditions by laser interferometry," *Review of Scientific Instruments*, vol. 84, no. 10, 2013, <https://doi.org/10.1063/1.4826090>.
- [61] V. Timofeev, S. Kuznetsov, V. K. Akparov, G. Chestukhina, and I. Kuranova, "Three-dimensional structure of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris* in complex with N-BOC-L-leucine," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 78, pp. 252-259, 2013, <https://doi.org/10.1134/s0006297913030061>.
- [62] S. N. A. Mohamad Aris, A. L. Thean Chor, M. S. Mohamad Ali, M. Basri, A. B. Salleh, and R. N. Z. Raja Abd. Rahman, "Crystallographic analysis of ground and space thermostable T1 lipase crystal obtained via counter diffusion method approach," *BioMed Research International*, vol. 2014, no. 1, 2014, Art. no. 904381, <https://doi.org/10.1155/2014/904381>.
- [63] V. Strellov, I. Kuranova, B. Zakharov, and A. Voloshin, "Crystallization in space: Results and prospects," *Crystallography Reports*, vol. 59, pp. 781-806, 2014, <https://doi.org/10.1134/s1063774514060285>.
- [64] V. K. Akparov, V. Timofeev, and I. Kuranova, "Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of porcine carboxypeptidase B," *Crystallography Reports*, vol. 60, pp. 367-369, 2015, <https://doi.org/10.1134/s1063774515030025>.
- [65] V. Timofeev, Y. A. Abramchik, N. Zhukhlistova, T. Muravieva, R. Esipov, and I. Kuranova, "Three-dimensional structure of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from *E. coli* at 2.71 Å resolution," *Crystallography Reports*, vol. 61, pp. 44- factor HypF N-terminal domain grown in microgravity, display improved internal order," *Journal of Crystal Growth*, vol. 314, no. 1, pp. 246-251, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2010.12.011>.
- [49] D. Nicesola, M. Perduca, S. Capaldi, M. E. Carrizo, P. G. Righetti, and H. L. Monaco, "Crystal structure of chicken liver basic fatty acid-binding protein complexed with cholic acid," *Biochemistry*, vol. 43, no. 44, pp. 14072-14079, 2004, <https://doi.org/10.1021/bi0489661>.
- [50] H. Tanaka *et al.*, "Improvement in the quality of hematopoietic prostaglandin D synthase crystals in a microgravity environment," *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 18, no. 1, pp. 88-91, 2011, <https://doi.org/10.1107/s0909049510037076>.
- [51] E. Smirnova *et al.*, "Protein crystal growth on the Russian segment of the International Space Station," *Crystallography Reports*, vol. 54, pp. 901-911, 2009, <https://doi.org/10.1134/s106377450905023x>.
- [52] C. Evrard *et al.*, "TIM crystals grown by capillary counterdiffusion: Statistical evidence of quality improvement in microgravity," *Crystal Growth and Design*, vol. 7, no. 11, pp. 2161-2166, 2007, <https://doi.org/10.1021/cg700687t>.
- [53] H. Tanaka *et al.*, "Crystallization of the archaeal transcription termination factor NusA: a significant decrease in twinning under microgravity conditions," *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 63, no. 2, pp. 69-73, 2007, <https://doi.org/10.1107/s1744309106054625>.
- [54] P. H. Małecki, W. Rypniewski, M. Szymański, J. Barciszewski, and A. Meyer, "Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1824, no. 2, pp. 334-338, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.013>.
- [55] A. Meyer, W. Rypniewski, M. Szymański, W. Voelter, J. Barciszewski, and C. Betzel, "Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1784, no. 11, pp. 1590-1595, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.07.010>.
- [56] T. N. Safonova, N. N. Mordkovich, K. M. Polyakov, V. A. Manuvera, V. P. Veiko, and V. O. Popov, "Crystallization of uridine phosphorylase from *Shewanella oneidensis* MR-1 in the laboratory and under microgravity and preliminary X-ray diffraction analysis," *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 68, no. 11, pp. 1387-1389, 2012, <https://doi.org/10.1107/s1744309112041784>.

- [68]W. E. Lutz *et al.*, "Perfect crystals: Microgravity capillary counterdiffusion crystallization of human manganese superoxide dismutase for neutron crystallography," *Npj Microgravity*, vol. 9, no. 1, 2023, Art. no. 39, <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00288-x>.
- [69]F. Ferranti, M. Del Bianco, and C. Pacelli, "Advantages and limitations of current microgravity platforms for space biology research," *Applied Sciences*, vol. 11, no. 1, 2020, Art. no. 68, <https://doi.org/10.3390/app11010068>.
- 54, 2016, <https://doi.org/10.1134/s1063774516010247>.
- [66]H. Yoshida, A. Yoshihara, T. Ishii, K. Izumori, and S. Kamitori, "X-ray structures of the *Pseudomonas cichorii* D-tagatose 3-epimerase mutant form C66S recognizing deoxy sugars as substrates," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 24, pp. 10403-10415, 2016, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7673-7>.
- [67]V. N. Drago *et al.*, "Microgravity crystallization of perdeuterated tryptophan synthase for neutron diffraction," *Npj Microgravity*, vol. 8, no. 1, 2022, Art. no. 13, <https://doi.org/10.1038/s41526-022-00199-3>.