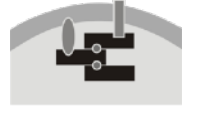


Laborversuch: Lysozym-Kristallisation (Laboratuvar deneyi: Lizozim kristalizasyonu)



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Araştırma konusu: Protein kristalizasyonu

Sevgili öğrenciler,

Benim adım Oliver Daumke, Max Delbrück Merkezi'nde yapısal biyoloji üzerine bir araştırma grubu yönetiyorum.

Merhaba, ben Tobi ve beş yıldır Oli'nin araştırma grubundayım.

... ve ben de Katja, Tobi gibi Oli'nin grubunda Postdoc olarak bulunuyorum.

Biz yapısal biyologlar sinir sistemimizin çeşitli görevlerini nasıl yerine getirdiğini anlamak için sinir hücrelerinin proteinlerini inceliyoruz.

Ve bunu atom seviyesinde çok yakından yapıyoruz.

Karmaşık proteinlerin yapılarını ortaya çıkarmak aylar hatta yıllar alabilir

Bu nedenle, bugün yapısal biyolojinin model proteinlerinden biri olan lizozimin yapısal açıklamasıyla ilgileneceğiz.

Lizozim, gözyaşımızda bulunan ve gözlerimizi bakteriyel enfeksiyonlardan koruyan bir proteindir. Şimdi Katja ile ben sizlere yapısal biyolog olarak ustalaşmamız gereken farklı çalışma yöntemlerini göstereceğiz.

Soru / Araştırma

İlk olarak hangi soruya cevap aradığımıza karar vermeliyiz.

Yapısal biyolog olduğumuz için burada proteinlerin üç boyutlu yapısıyla ilgileniyoruz!

Ama aynı zamanda enerji moleküllerinin proteinimize nerede bağlandığı da önemlidir!

Proteinimiz çalıştığında üç boyutlu yapısı nasıl değişir?

Bu soruların her biri için bir yapı oluşturabiliriz.

Ama ilk olarak diğer araştırmacıların bugüne kadar neler bulduklarını inceleyelim.

Bunun için veri bankalarını araştırır veya bu protein üzerine araştırma yapmış meslektaşlarımıza sorarız.

Hangi proteini yakından incelememiz gerektiğini öğrenince laboratuvara geçeriz.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation (Laboratuvar deneyi: Lizozim kristalizasyonu)



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Araştırma konusu: Protein kristalizasyonu

Protein üretimi

Proteinimizi satın alamayacağımız için kendimiz üretmeliyiz.

Neyse ki araştırmalarımız sayesinde hedef proteinimizin yapı planını içeren DNA dizisini biliyoruz ve bunu bakterilere aktarıyoruz.

Bakterilerle çalışmak gerçekten çok kolay, 37 derecede olan amino asitlerden oluşan bir besin ortamına koyun ve ardından biraz sallayın.

Bakterilerin kuluçka makinesinde yaptıkları da tam olarak bu. 37 derecede hafifçe sallanmak.

Proteinimize ulaşabilmemiz için besin çözeltisi ile bakteriler birbirinden ayrılmalıdır.

Bu işlem için hızlıca dönen bir santrifüj makinemiz var, 20 dakika boyunca dakikada 4500 devir.

Bu sıkma programındaki bir çamaşır makinesinden daha hızlı.

Ağır bakteriler dibe çöker ve bu sayede besin çözeltisi kolayca dökülebilir.

Saflaştırma

Ancak bakterilerimizin içinde artık hem kendi proteinleri hem de DNA'sını aktardığımız hedef proteinlerimiz var.

Bu proteinlere ulaşmak için ilk olarak bakterilerin zarlarını yok etmemiz ve bakterileri açmamız gerekir.

Ne yazık ki bu sefer de bakterilerin kendi proteinlerinin ve hedef proteinimizin olduğu bir karışıma sahibiz.

Bu bir sorun değil çünkü proteinleri birbirlerinden ayırabiliriz.

Bunu bir kromatografi sistemi kullanarak yapıyoruz.

Protein kokteylini içine enjekte ediyoruz ve sonra küçük elekler gibi çalışan sütunlara pompalıyoruz.

En son proteinler sütunların arkasından boyutlarına göre sıralanmış olarak çıkar ve otomatik numune toplayıcıda toplanır. Her tüpte sadece tek bir büyüklükte olan proteinler bulunur ve en küçük proteinler son tüptedir.

Bilgisayar hedef proteinimizin hangi tüpte bulunduğunu bize göstermek için ultraviyole ışık kullanır.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation (Laboratuvar deneyi: Lizozim kristalizasyonu)



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Araştırma konusu: Protein kristalizasyonu

Kristalizasyon

Sonunda hedef proteinimizi saf bir şekilde elde edebildik.

Yapısını belirlemek için onu ölçmeliyiz.

Ancak tek proteinden gelen sinyal ölçülemeyecek kadar küçük olacaktır.

Sinyali güçlendirmek için bir numara kullanıyoruz:

Kristalleşmesine izin veriyoruz, çünkü bir kristalde birçok protein molekülünün düzenli bir sıralamada olduğunu biliyoruz. Ne yazık ki genellikle bir kristalin nasıl şartlar altında oluştuğu net değildir. Bu yüzden mümkün olduğunca çok koşul belirliyoruz ve test ediyoruz.

Kristalizasyon robotu sayesinde birçok farklı solüsyon otomatik olarak hazırlanmaktadır.

Bunun için 96 delikli bu plakalara ihtiyacımız var.

Protein başına 10-15 plaka hazırlıyoruz, bu sayede yaklaşık 3 saatte 1000'den fazla farklı koşul üretebiliyoruz.

Ancak bir kristalin oluşması uzun zaman alabilir. Nadiren bu birkaç saat içinde gerçekleşebilir, fakat genelde günler, haftalar hatta yıllar alabilir. Bu örnekleri elle mikroskopta takip etmek çok zor olduğu için kristalizasyon otelleri adını verdiğimiz sistemlerimiz var.

Burada örnekler 4 veya 20°C'de saklanır ve belli aralıklarla otomatik olarak "odalarından" çıkarılarak bir kamera ile fotoğraflanır.

Evet, bazen yıllarca orada kalırlar ve bizler de bilgisayarımızdan bir şeyler olup olmadığını takip ederiz. Kulağa heyecan verici geliyor ve gerçekten de öyle.

Ne yazık ki birçok örneğimizin sadece birkaçı kristalleşiyor.

Birçok plaka uzun bir süre sonra bile hiçbir kristal içermiyor.

Burada belirli bir anda bir plakada çekilmiş 96 fotoğrafı görüyoruz.

İstersek belli bir zaman dilimindeki başka bir örneğin de fotoğraflarına bakabiliriz:

Bir gün sonra, iki gün sonra, bir hafta sonra, iki hafta sonra...

Kristalleri ortaya çıkardığımızda ve büyümelerini izleyebildiğimizde hissettiklerimiz çok güzel, adeta bir başarı hissi.

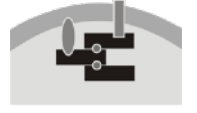
Şimdi sizden model proteinimiz lizozimin hangi koşullar altında en büyük kristalleri oluşturduğunu bulmanızı istiyoruz.

Lizozimin en iyi yanı birkaç dakika içinde kristalleşmeleridir.

Bu da oluşumu canlı olarak izleyebileceğiniz anlamına geliyor.

Hepinize kolay gelsin.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation (Laboratuvar deneyi: Lizozim kristalizasyonu)



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Araştırma konusu: Protein kristalizasyonu

2. Kısım:

Hedef proteinimizi bakterilerle ürettikten sonra kromatograf makinesi ile temizledik.

Daha sonra hedef proteini birçok farklı solüsyona koyarak kristalleştirmeye çalıştık.

Haftalar veya aylar sonunda nihayet kristallerimizi oluşturmayı başardık.

Kristallere ihtiyacımız var çünkü proteinlerimiz kristallerin içinde düzenli bir kafeste bulunurlar ve bu da bir tür sinyal yükseltici görevi görür.

Röntgen yapı analizi

Protein kristallerimiz insan saçının çapı kadar küçüktür.

Buna rağmen mikroskop ve naylon halka yardımıyla, proteinlerimizi balık tutar gibi çözültiden çıkarabiliriz.

Daha sonra kristallerimizi -197°C 'de sıvı nitrojen içerisinde dondururuz.

Bunu yapmamızın nedeni kristallerimizi röntgen ışınlarıyla incelemek istememiz ve yüksek enerjiye sahip olan röntgen ışınlarının kristallerimizi yok etmesini istemememiz.

Röntgen ışınları bir demet halinde kristalimize çarpar ve ışınlarda sapmalar olur.

Kristalin her bir atomu ışını farklı bir şekilde saptırır ve bu güzel kırılım görüntüleri bu şekilde ortaya çıkar. Üç boyutlu net bir görüntü elde edebilmemiz için kristali röntgen ışınları içerisinde döndürerek birçok resim çekmemiz gerekiyor.

Bu ölçümler beş dakika ila iki saat arasında sürebilir.

Çeşitli bilgisayar programlarının yardımlarıyla bu model üzerinden elektron yoğunluğu bulutunu hesaplayabilirsiniz.

Bunlar proteinimizi çevreleyen bir kabuk gibiler.

Elimizdeki setin ilk kristaliyle yapının başarılı bir şekilde belirlenebilmesi oldukça nadir görülür.

Genellikle yüzlerce kristali test eder ve yapıyı çözmek için gereken veriye sahip olana kadar ölçüm yaparız.

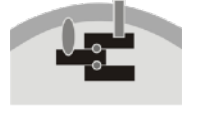
Amino asitlerin nereye uyduğunu iyi görebilmek, kristalimizin ne kadar iyi olduğuna,

ölçümlerimizin netliğine ve elektron yoğunluğu bulutumuzun ne kadar iyi tanımlandığına bağlıdır.

Ölçümlerimiz net ise bilgisayarlar modellememize yardımcı olabilir.

Ama eğer net değilse, programlar yapabileceklerinin sınırına hızlıca ulaşır ve bilgisayarın başına geçip amino asitleri teker teker buluta inşa ederek protein boyunca yolumuza devam etmemiz gerekir.

Laborversuch: Lysozym-Kristallisation (Laboratuvar deneyi: Lizozim kristalizasyonu)



Prof. Dr. Oliver Daumke // MDC Berlin-Buch

Dr. Katja Fälber

Dr. Tobias Bock-Birnbaum

Araştırma konusu: Protein kristalizasyonu

Burada projenin başına geri dönüyoruz. Proteinimizin planını içeren bir DNA yerleştirmiştik.

Bu amino asit dizisini bir kez daha burada ve elektron yoğunluğu bulutunda görüyoruz.

Bu bilgiyi modelleri oluşturmak için kullanabiliriz çünkü amino asitlerin oluşturduğu diziyi baştan sona biliyoruz.

Bu şekilde diziyi gözden geçirebilir ve elektron yoğunluğu bulutunda amino asitlerin dahil edilmesi gereken karakteristik yerleri arayabiliriz.

Amino asit dizisine dayanarak modeli buradan oluşturmaya başlayabiliriz.

Şimdi tam olarak bunu yapacaksınız:

Lizozim modelimizde bazı amino asitler kayboldu.

Modelde hangi amino asitlerin eksik olduğunu bulmak ve bunların elektron yoğunluğu bulutuyla eşleşip eşleşmediğini görmek için diziyi kullanın.

Bugün biz yapısal biyologların çalışmaları hakkında bir fikir edindiniz ve bir proteinin yapısını belirlemek için bazı adımlar attınız.

Bu yapıları kullanarak küçük moleküllerin motorlarının nasıl çalıştığını, nörodejeneratif hastalıkların nasıl ortaya çıktığını ve bunlar için üretilen ilaçların nasıl geliştirildiğini anlayabiliriz.

Umarız bugünkü çalışmalarımızla sizleri heyecanlandırabilmişizdir.

Belki de bir gün MDC'de tekrar görüşmek dileğiyle.

En iyi dileklerle, hoşça kalın.

Proje için web sitesi: bcp.fu-berlin.de/nos

© Freie Universität Berlin, 2023