



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ
ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ФИЗИКУ



Рендгенска анализа протеина: кристализација и анализа структуре лизозима

- дипломски рад -

Ментор: Анђелка Телић

Кандидат: Маја Мирковић

Нови Сад, 2024.

Садржај

Увод	2
Протеини	3
Аминокиселине	4
Рибонуклеинска киселина РНК	5
Процес транскрипције	7
Синтеза протеина	8
Пептидна веза	10
Структура протеина	11
Примарна структура	12
Секундарна структура	12
Терцијарна структура	14
Кватернарна структура	16
Ензими	17
Структура ензима	17
Лизозим	19
Кристали и кристализација протеина	21
Принцип рендгенске структурне анализе протеина	24
Опис експерименталног дела методе	25
Одабир кристала	25
Причвршћивање кристала	26
Уочавање рефлексација	26
Основни преглед постексперименталног дела методе	28
Структурни фактор и фазни проблем	28
Преглед диферентне Фуријеове анализе	34
Одређивање позиција водоника у елементарној ћелији	35
Фурије утачњавање	36
Фактор поузданости	36
Експериментални део: Експеримент кристализације лизозима	37
Материјал и методе	37
Поступак рада	37
Резултати	38
Анализа структуре лизозима	42
Закључак	45

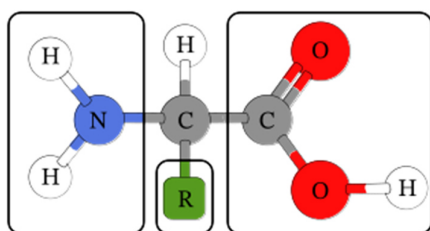
Увод

Метода рендгенске структурне анализе, која се користи управо како јој и само име каже за одређивање врсте атома и њихове међусобне удаљености у молекулу од интереса, заснива се на дифракцији којој подлежу рендгенски зраци када наиђу на препреку чије су димензије сразмерне њиховој таласној дужини. Ова метода се може примењивати на било који тип молекула који се може наћи или добити у кристалној форми. У овом раду акценат је на протеинима као групи органских молекула од којих су изграђене све живе ћелије. Да би се увидео значај познавања протеинске структуре, погодно је најпре упознати се са њиховим улогама и са њиховим значајем за живе организме. Стога ћемо се позабавити циклусом живота једнога протеина, од самог његовог настанка у процесу транслације, преко модификација кроз које пролази како би на крају могао да служи својој сврси. Представимо различите врсте молекула који су неопходни за сам процес транслације. Сада можемо прећи на следећи корак и повезати протеинску структуру са разлозима који доводе до протеинских модификација неопходних за обављање одређене улоге. Конкретно, задржаћемо се на ензимској улози протеина, још конкретније на улози лизозима у живим организмима. Затим, прелазимо на описивање основних претпоставки на којима се метода рендгенске структурне анализе заснива, као и на опис самог експеримента у којем желимо да добијемо дифракциону слику. Поједностављено говорећи, идеја методе је да се може повезати интензитет дифракционих максимума са врстом атома који су довели до дифракције Х-зрака, као и да положај тих максимума можемо повезати са положајем атома у кристалној решетки. Дифракција се дешава на електронским облацима атома, тако да би већи интензитет дифракције значио више електрона, или већу електронску густину. Повезујемо резултате експеримента, а то су интензитети дифракционих максимума са електронском густином путем Фурије трансформације. Дакле, дифракциона слика је Фурије трансформација електронске густине, а електронска густина је инверзна Фурије трансформација дифракционе слике. Овом методом добијамо положаје тежих атома, а за одређивање положаја атома водоника користе се друге методе како би се допунила мапа положаја тежих атома са водоником у кристалној решетки. На крају ћемо описати експеримент

кристализације протеина лизозима и покушаје трагања за рефлексима које настају при његовој интеракцији са рендгенским зрачењем.

Протеини

Протеини спадају у групу основних биолошких макромолекула, заједно са угљеним хидратима и мастима. Присутни су у свим биолошким организмима, а претежно их граде угљеник, кисеоник, водоник, азот и сумпор. Најмања градивна јединица једног протеина је аминокиселина, аминокиселине граде пептиде, односно полипептиде. У ланцима полипептида аминокиселине су међусобно повезане пептидном везом. Пептидна веза је посебан тип ковалентне везе између



амино
група
бoчни
низ
карбоксилна
група
преузето и измењено са www.nagwa.com

слика 1: аминокиселина

карбоксилне групе једне и амино групе друге киселине (слика 1). Секвенцу двадесет основних аминокиселина опште формуле $RHC(NH_2)COOH$, које ће бити повезане у одређени протеин диктира генетски код.

Протеини су веома разноврсни молекули од великог значаја за живе организме. Њихов значај огледа се у небројено много улога које

врше у различитим метаболичким и физиолошким процесима. Функције се грубо могу поделити у неколико категорија, неке од најважнијих су:

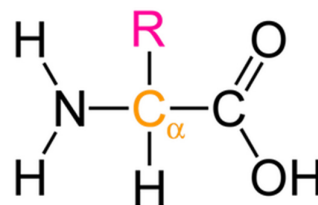
1. ензимска: омогућавају одређене хемијске реакције тако што обезбеђују место одвијања те реакције и повећавају њену ефикасност, можемо рећи да делују као катализатори (нпр. липаза, амилаза..)
2. хормонска: одговорни су за синтезу хормона, након чега хормони бивају транспортовани путем крви како би обављали своју функцију „преношења одређене поруке“, велики број хормона су по свом саставу протеини (инсулин, соматотропин..)
3. транспортна: кроз протеине уграђене у ћелијску мембрану пролазе нутријенти потребни ћелији, такође, хемоглобин преноси кисеоник кроз крвоток...
4. извор енергије (нпр. казеин...)

5. градивна: изграђују косу, нокте (нпр. кератин, еластин, колаген..)
6. протективна: имунски систем производи антитела када дође у контакт са страном супстанцом, антитела се везују за антиген и директно га неутралишу или служе као место препознавања другим компонентама имунског система које ће неутралисати страно тело
7. контрактилна: омогућавају контракције мишића (актин, миозин)
8. одржавање хомеостазе организма (балансирање рН вредности, течности и електролита)

С обзиром на то колико је разноврсна функција протеина и на специфичност реакција које ове функције подразумевају разноликост протеина је веома велика. Различити организми синтетишу велики број различитих протеина чији огроман распон физичко-хемијских особина потиче само од различитих особина двадесет основних аминокиселина и наравно њиховог редоследа у ланцу. Пре него што пређемо на структуру протеина, потребно је рећи пар речи о томе како протеини настају у нашем организму. За разумевање тог процеса потребно је кратко се упознати са молекулима аминокиселина и молекулима РНК. Након кратког описа транскрипције РНК и синтезе протеина, можемо прећи на упознавање њихове структуре.

Аминокиселине

Из опште формуле аминокиселина $RHC(NH_2)COOH$ видимо да су то органски молекули који садрже карбоксилну групу $-COOH$, амино групу $-NH_2$ и бочни остатак $-R$ (слика 2). Постоји око петсто различитих аминокиселина које се могу наћи у природи, али су сви протеини саграђени од њих двадесет које називамо есенцијалне. Карбоксилна и амино група учествују у повезивању киселина у пептидне ланце, а бочни остатак одређује карактеристичне особине једне аминокиселине, као што је киселост, базност, поларност, могућност грађења водоничне или ковалентне везе, конформација...

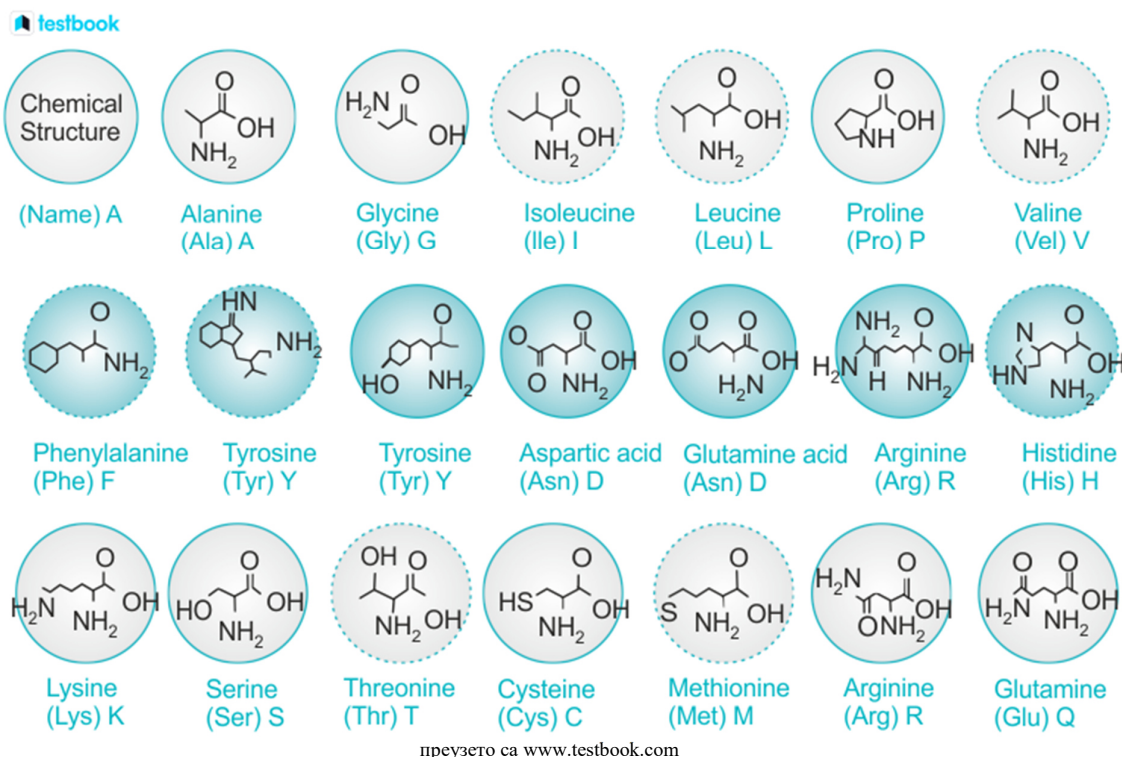


преузето са www.differencebetween.com

слика 2: општа структурна формула аминокиселине

Подела аминокиселина се управо врши према природи бочног ланаца (слика 3):

1. са неполарним бочним низом: аланин, леуцин, изолеуцин, пролин, глицин и валин
2. са хидроксилном групом: серин и треонин
3. са базним низом: лизин, аргинин и хистидин
4. са киселим остатком: аспарагинска и глутаминска киселина
5. са ароматичним низом: тирозин, триптофан и фенилаланин
6. са амидним остатком: глутамин и аспарагин
7. са сумпором: метионин и цистеин



слика 3: структурна формула двадесет аминокиселина

Рибонуклеинска киселина РНК

Рибонуклеинска киселина заједно са дезоксирибонуклеинском киселином, или ДНК, представља два типа нуклеинских киселина који играју важну улогу у кодирању, декодирању и експресији гена. Молекул РНК је једноланчани низ који се састоји од ковалентно везаних јединица које називамо нуклеотиди. Сваки појединачни нуклеотид се састоји од (слика 4):

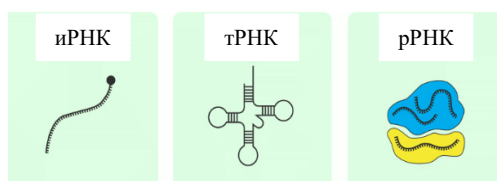
- хетероцикличне (азотне) базе – пуринске: аденин А и гуанин G, или пиримидинске: цитозин С и урацил U

- рибозе – петоугљеничног шећера, са присуством хидроксилне групе на другом угљениковом атому (ова група не постоји код ДНК, шећер који улази у састав ДНК је дезоксирибоза)

- фосфатне групе

У ћелијама постоји неколико врста РНК од којих су за наша тренутна разматрања најважније следеће (слика 5):

- информациона или иРНК: њена синтеза преписивањем са ДНК почиње онда када постоји потреба за неким протеином, њена улога је да упутство за синтезу протеина, генетску информацију, пренесе до рибозома



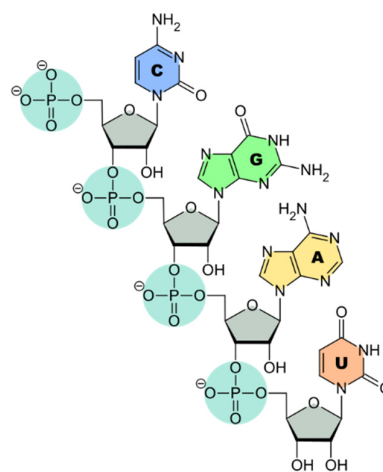
преузето и измењено са www.geeksforgEEKS.org

слика 5: врсте РНК

- транспортна или тРНК: настаје експресијом мале групе специфичних гена, њена улога је превођење упутства за синтезу протеина и транспорт аминокиселине до рибозома
- рибозомска или рРНК: настаје експресијом гена организатора једарцета, и заједно са одређеним протеинима чини структуру рибозома.

Рибоза је шећер који се састоји од пет угљеникових атома које означавамо бројевима од један до пет. Структура РНК је таква да су наведени елементи везани на следећи начин: хетероциклична база је везана за рибозу на позицији првог угљениковог атома, фосфатна група везана је за пети угљеников атом рибозе, док је за трећи угљеников атом везана фосфатна група наредног нуклеотида. Дакле, преко фосфатних група врши се повезивање суседних нуклеотида тзв.

фосфодиестраском везом. То се реализује на следећи начин: фосфатна група је на једном крају



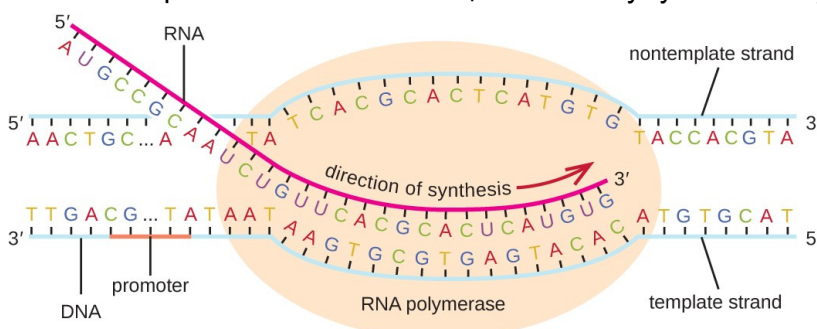
преузето са www.wikipedia.com

слика 6: фосфодиестарска веза између нуклеотида

везана за трећи С атом рибозе, а другим крајем за пети С атом суседног нуклеотида (слика 6). РНК је једноланчани молекул, али се може савијати у одређене тродимензионалне структуре, при чему се на кратким сегментима дешава и повезивање између аденина и урацила, као и између цитозина и гуанина водоничним везама при чему настају дволанчани региони.

Процес транскрипције

У ћелији РНК настаје у процесу транскрипције или преписивања ДНК помоћу ензима који се зове РНК полимераза. Тако настала РНК назива се информациона РНК. Даље у процесу транслације или преводјења са РНК синтетише се најчешће протеин, али исто тако може настати транспортна или рибозомска РНК. РНК полимераза одмотава дупли хеликс молекула ДНК, отприлике један октет од места на коме почиње преписивање. На тај начин се формира један кратак РНК-ДНК сегмент (слика 7). Ланац ДНК у себи садржи специфична места која означавају тачно место на ком треба да започне транскрипција ДНК у РНК, као и брзину којом то треба да се одвија. Специфични протеини који се зову транскрипциони фактори везују се за ова контролна места. Секвенца на молекулу РНК за који се везује овај протеин



преузето са www.pharmaguideline.com

слика 7: транскрипција

назива се промотор и налази се пре почетка гена. Истовремено са једног гена може да се преписује на десетине или чак стотине РНК копија.

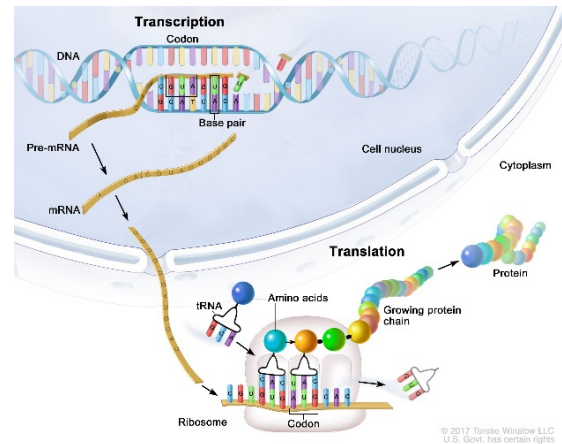
Синтеза протеина

Централна догма: ДНК управља својом сопственом репликацијом и својом транскрипцијом у РНК, док РНК управља својом транслацијом у протеине. Дакле у процесу транслације настају протеини уз помоћ података који су записани на РНК. Тај процес је назван транслација или превођење јер се ради о превођењу са језика нуклеинских киселина на језик протеина. Код еукариота транскрипција се одвија у ћелијском једру, тако настала

информациона РНК пролази кроз процес модификације пре изласка из једра, затим доспева у цитоплазму где одлази до рибозома на којима започиње процес синтезе протеина (слика 8). Сама транслација је прилично компликована и дешава се у неколико етапа. Веза између секвенце база у кодону и аминокиселине коју она представља назива се генетски код. Само четири базе треба да кодира двадесет аминокиселина, тако да је свака аминокиселина представљена трима базама, односно триплетом база. Од могућих шездесет и четири кодона, три кодона су СТОП кодони, а преосталих шездесет један кодира двадесет аминокиселина, тако да је генетски код дегенерисан.

Другим речима, има више кодона него аминокиселина (слика 9). Ако различити кодони кодирају исту аминокиселину, они се најчешће разликују за само једну базу (нпр. AUU, AUC и AUA сви кодирају изолеуцин). Исто тако по особинама сличне аминокиселине имају сличне кодоне (изолеуцин и леуцин имају кодоне AUU и CUU).

Да би се синтетисао жељени полипептид неопходно је да транслација крене од тачно одређене базе у кодону, да би се даље читање одвијало у исправним



преузето са www.cancer.gov

слика 8: синтеза протеина

Генетски код

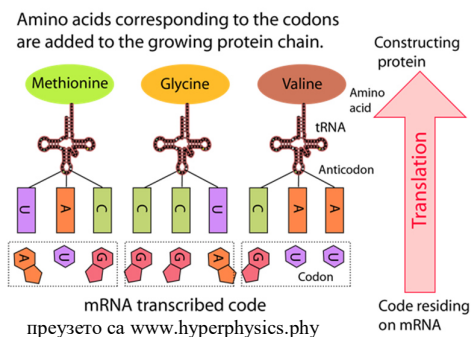
друго слово

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC UUA } UUG } Leu	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC UAA } UAG } Stop	UGU } Cys UGC UGA } Stop UGG } Trp	U C A G
C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ile AUC AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Asp GGA } GGG }	U C A G

преузето и измењено са www.geeksforgEEKS.org

слика 9: 64 кодона

секвенцама од по три базе. Знак за започињање транслације је AUG триплет. Дакле информациона РНК представља серију узастопних групација од по три нуклеотида који се зову кодони и сваки кодира једну аминокиселину. Транспортна РНК је тип рибонуклеинске киселине који се састоји од око 76 нуклеотида, међу којима је и секвенца од три нуклеотида која представља антикодон. Поменути антикодон је

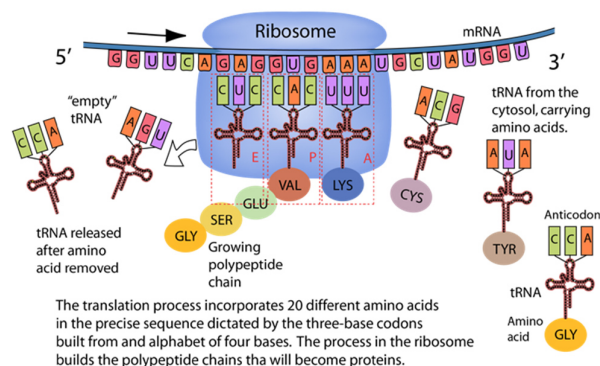


слика 10: кодон, антикодон и аминокиселина

комплементаран кодону на информационој РНК за одговарајућу аминокиселину која се везује ковалентно за транспортну РНК. Ако за пример узмемо AUU кодон за изолеуцин, одговарајући антикодон на транспортној РНК који ће везати ову аминокиселину је UAA, на описан начин може се закључити какав антикодон има било која од наведених

аминокиселина (слика 10). Комплекс транспортне РНК и ковалентно везане аминокиселине на 3' крају зове се аминоксил-РНК.

Рибозом везује информациону и три транспортне РНК и помаже њиховом кодон-антикодон повезивању (слика 11). За место везивања ближе 5' крају РНК везује се пептидил-тРНК, то место се назива П место. На место везивања ближе 3' крају везује се аминоксил-тРНК, то називамо А место. Рибозом катализује премештање тРНК са А места на П место, док две аминокиселине које се налазе на два тРНК формирају пептидну везу међу собом. Након тог процеса, формира се нова пептидил-тРНК чији је полипептидни ланац увећан за једну нову аминокиселину. Овај процес се понавља док се не дође до стоп кодона који сигнализира крај транслације, односно завршетак синтезе одређеног протеина. Као и код транскрипције овај процес се дешава истовремено на више места на молекулу РНК, тако да се симултано може синтетисати десетак протеина.



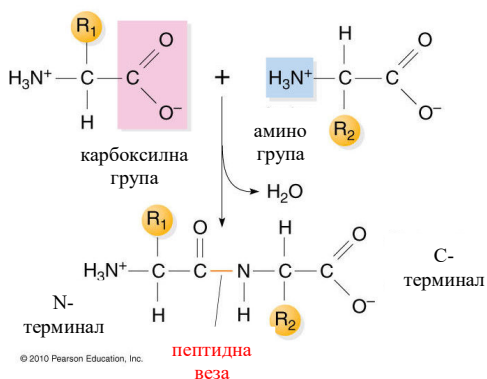
преузето са www.hyperphysics.phy

слика 11: процес транслације

Пептидна веза

Аминокиселине се једна за другу повезују линеарно, без гранања, карбоксилна група једне за амино групу друге аминокиселине и тако редом. Реакција формирања пептидне везе спада у хемијске реакције кондензације, дакле при формирању пептидне везе долази до ослобађања молекула воде (слика 12). Ова реакција се одвија у претходно описаном процесу транслације на рибозомима. Пептидна веза је чврста и планарна C-N веза која не допушта ротацију.

Флексибилност ланца потиче од две једноструке ковалентне везе које се налазе са



преузето и измењено са www.mun.ca

слика 12: реакција стварања пептидне везе

обе стране ригидне пептидне везе (лево и десно). Рендгенска структура је показала да је пептидна веза последица резонантних интеракција које овој вези дају око 40% двоструког карактера. Овај закључак поткрепљује чињеница да је пептидна C-N веза за 0.13 Å краћа него C-N једнострука веза и да је C=O веза код пептида за 0.02 Å дужа него иста та веза код алдехида и кетона.

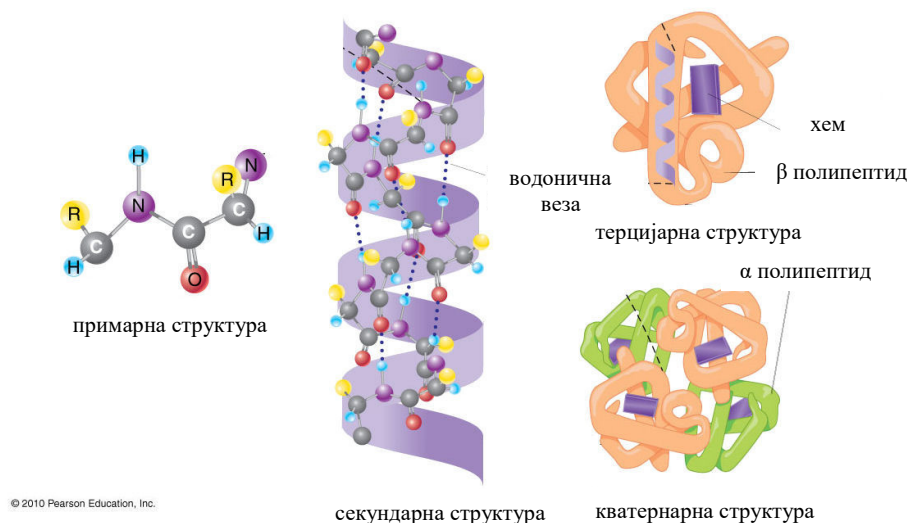
Постоје *cis* и *trans* типови пептидне везе, с тим да се *cis* веза појављује само када у вези учествује аминокиселина пролин. Већ смо поменули да флексибилност повезаних аминокиселина потиче од две једноструке ковалентне везе које се налазе са обе стране пептидне везе, тако да су бочне групе усмерене од кичме ка споља што омогућава њихово међусобно интераговање као и интераговање са раствором у којем се налазе. Из начина повезивања аминокиселина можемо закључити да ланац поседује дирекционалност и да ће се на једном крају ланца налазити амино, а на другом карбоксилна група. Почетком ланца се сматра амино група односно N-терминал, а крајем карбоксилна група или C-терминал. По конвенцији је N-терминал узет за почетак јер представља почетак и приликом синтезе протеина у ћелији.

Структура протеина

Да бисмо сазнали нешто више о функцији протеина, најбоље је да проучимо његову структуру, и везе између атома од којих је изграђен.

Структура протеина може бити (слика 13):

1. примарна: представља редослед одређених аминокиселина у пептидном ланцу
2. секундарна: представља локално просторно уређење полипептидног ланца без обзира на конформацију бочних остатака
3. терцијарна: односи се на тродимензионалну структуру целог полипептида заједно са бочним ланцима
4. кватернарна: односи се на просторну организацију два или више полипептида који су међусобно повезани нековалентним или дисулфидним везама, често се протеин састоји из више полипептида које се називају и субјединице



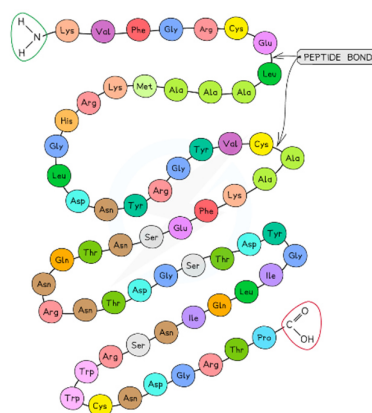
преузето и измењено са www.mun.ca

слика 13: четири структуре протеина

Примарна структура

Прва одређена секвенца неког протеина била је секвенца инсулина, од тада је одређено на десетине хиљада секвенци различитих протеина. Примарна секвенца аминокиселина одређује структуру и функцију датог протеина (*слика 14*). Ове секвенце или редоследи аминокиселина су од изузетног значаја из више разлога. Секвенца нам је неопходна за одређивање тродимензионалне структуре. Сазнање о секвенци има веома битну примену у клиничким истраживањима, јер су узроци многих наследних болести управо мутације које доводе до промене аминокиселина у протеину или непознавање примарне структуре нам омогућава да протерцијарну структуру неког протеина.

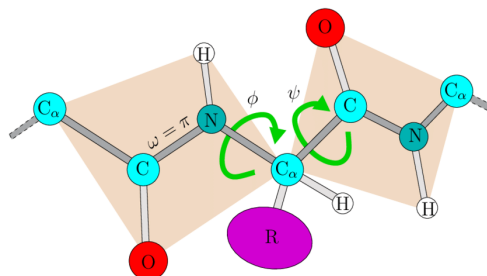
Учесталост појављивања одређене аминокиселине у протеинима је директно сразмерна броју кодона које производе поменути аминокиселину. Секвенце се чувају у протеинским базама података као што су GenBank, EMBL Nucleotide Sequence Database, Swiss-Prot Protein Knowledgebase...

www.savemyexams.com

слика 14: секвенца аминокиселина у примарној структури протеина

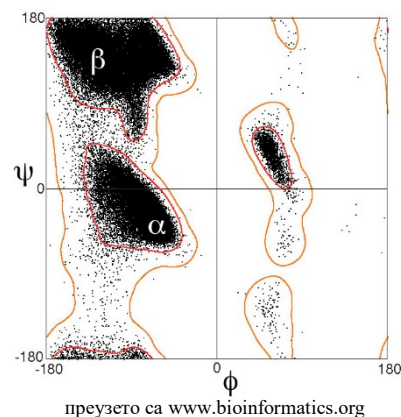
Секундарна структура

Већ смо напоменули како је сама пептидна веза ригидна и не дозвољава ротацију, што имплицира да ће свако даље просторно уређење полипептида потицати од веза угљеника и азота са C_α атомом. Дакле говоримо о два степена слободе: ротација око C_α -C везе за угао ψ , и ротацију око C_α -N везе за угао ϕ (слика 15). Ови углови се називају ротациони или торзиони углови. Стерно дозвољени парови углова ψ и ϕ одређују се израчунавањем растојања између атома



слика 15: торзциони углови

за све вредности углова. Забрањене конформације су оне у којима су растојања међу атомима мања од одговарајућих Ван дер Валсових растојања. Све ове информације сумиране су у Рамачандрановом дијаграму са којег се види да је око седамдесет седам посто комбинација забрањено. Све познате секундарне структуре се могу описати угловима који припадају трима дозвољеним областима (слика 16).

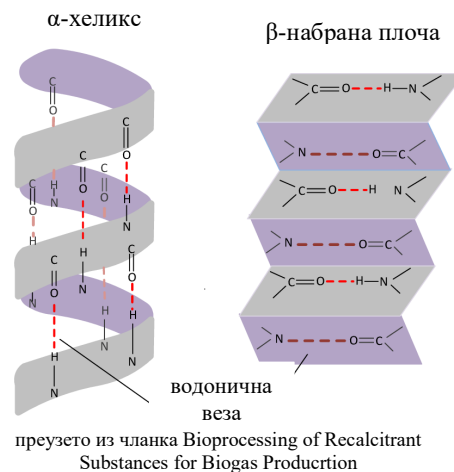


слика 16: Рамачандранов дијаграм

Захваљујући увртању око поменутих веза хидрофилни бочни ланци ће се окретати ка споља како би могли да граде водоничне везе међусобно или са молекулима раствора који их окружује, а хидрофобни ка унутра. Могу се формирати две водоничне везе по јединици, с обзиром на то да карбоксилна C=O група једне, и аминокиселине N-H групе друге могу да формирају водоничну везу. Спирални хеликс који се добија увртањем око сваког C_α атома може се охарактерисати бројем n који представља број пептидних јединица потребних да се формира један окрет и ходом хеликса p, тј. дистанцом за коју се хеликс помери дуж осе за један окрет. Експериментално је утврђено да само једна структура спирале задовољава све наведене услове а то је α-хеликс (слика 17). Торзиони углови износе φ = -57° и ψ = -47°, док је број n = 3,6 и корак p = 5,4 Å. Водоничне везе су тако усмерене да је N-H веза усмерена дуж хеликса према C=O вези.

Постоји још једна дозвољена структура која се зове β-набрана плоча, ова структура омогућава формирање водоничних веза и задовољава дозвољене торзионе углове. Међутим, овде се везе не формирају дуж једног ланца него између суседних ланаца. Могу бити паралелне када су ланци истог смера или антипаралелне кад су пептидни ланци супротног (N-C C-N) смера. Код ове структуре торзиони углови мало варирају од 180° (слика 17).

Полипептиди који имају више од двеста аминокиселина обично се састоје од више домена. Поменути домени су готово



слика 17: структуре α-хеликса и β-набране плочице

независне јединице са особинама појединачних глобуларних протеина. Протеини су изграђени од суперсекундарних структура, односно на једном протеину може постојати и део са структуром α -хеликса и структуром β -набране плоче. Неки од видова ових суперсекундарних структура су: $\beta\alpha\beta$, β -укосница, $\alpha\alpha$ -мотив, грчки мотив β -укоснице.

Терцијарна структура

Представља тродимензионално уређење протеина, па заједно са савијањем секундарних елемената односно кичме протеина у обзир морамо узети и просторни распоред бочних остатака и све интеракције које се јављају између остатака као и интеракције остатака са кичмом. Локација бочних остатака одређена је њиховом природом, неполарни остаци ће се најчешће налазити у унутрашњости савијеног протеина, док су поларни окренути ка спољашњости како би могли да буду у контакту са воденим раствором. Протеини се веома ефикасно пакују, тако да унутрашњост протеина подсећа на кристал по ефикасности паковања.

Терцијарна структура је резултат интеракција које појединачно могу бити слабе као нпр:

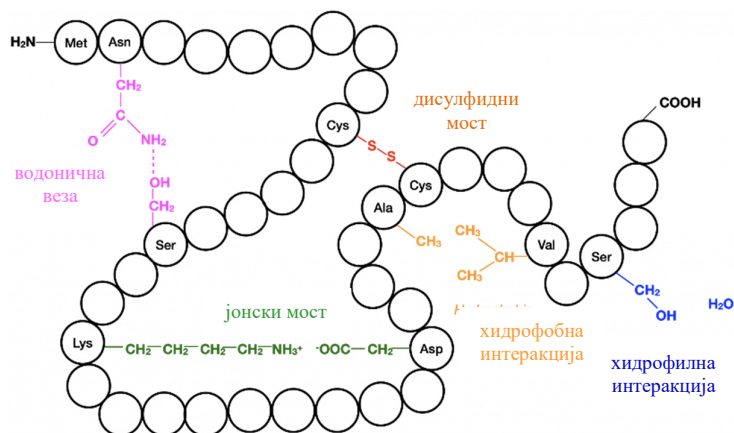
1. електростатичке интеракције-јонски мостови: долази до асоцијације јонизованих група супротних знакова наелектрисања, таква групација назива се јонски мости или пар, и његова интеракција се може описати Кулоновим законом
2. електростатичке дипол-дипол интеракције: велика већина ковалентних веза има асиметричну расподелу електрона, тј електрони више припадају једном атому, тако да у молекулу долази до раздвајања центара позитивног и негативног наелектрисања
3. Ван дер Валсов потенцијал: чини збир енергија одбијања електронских облака, дисперзионих сила и електростатичких интеракција
4. водоничне везе: посебан тип везе која се остварује између молекула донора који је изразито електронегативан који је везан за водоников атом и акцептора водоника, способност грађења ових веза имају карбоксилна и аминоксидна група, као и бочни остаци, растојање између атома који граде ову везу је мање од Ван дер Валсових пречника

5. гидрофобни ефекти: представља све утицаје који доводе до тога да неполарне супстанце што је више могуће смање свој контакт са водом, протеини формирају интрамолекуларне мицеле у којима су неполарни бочни остаци окренути ка унутрашњости такве мицеле

Могу бити и јаке ковалентне као што су нпр. дисулфидни мостови који могу настати између два бочна остатка цистеина.

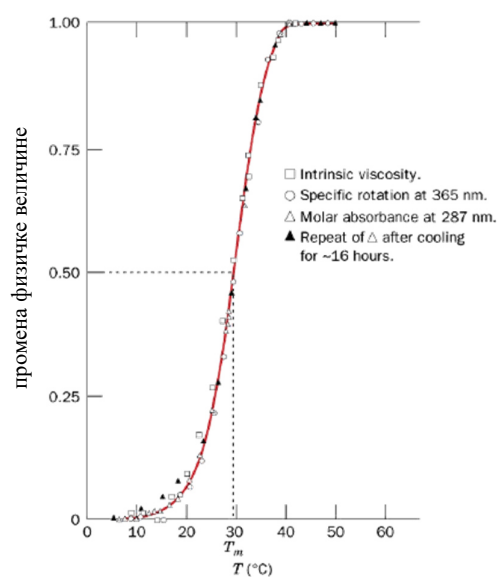
Све ове интрамолекуларске силе (слика 18) одређују нативно стање једног протеина и његову конформациону стабилност. Процес у коме долази до нарушавања или губљења ове стабилности назива се денатурација (слика 19). Ако посматрамо да ли се при процесу загревања мењају величине које зависе од конформације, као што су вискозност, УВ апсорпција, оптичка ротација, можемо приметити да долази до денатурације протеина. Још неки од фактора који могу довести до денатурације су: рН варијације раствора, неки детерџенти, различите соли или високе концентрације растворљивих органских једињења.

Познавање терцијарне структуре помаже нам у разумевању различитих особина протеина најбитнијих за разумевање њихове функције. Технике које се користе за одређивање ове структуре су рендгенска структурна анализа и нуклеарна магнетна резонанца.



преузето и измењено са www.slcc.pressbooks.pub

слика 18: слабе и јаке интеракције које доводе до терцијарне структуре протеина

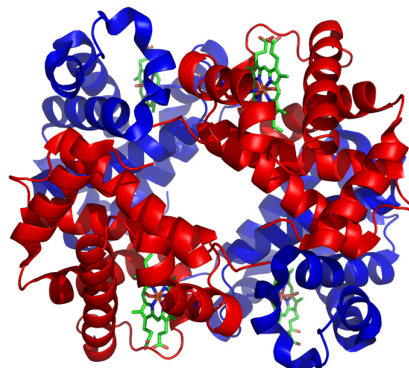


преузето и измењено са www3.nd.edu

слика 19: график денатурације протеина

Кватернарна структура

Представља удруживање више протеина, дакле то је распоред протеина који већ имају терцијарну структуру и тако формирају једну целину, често уз додатак неког непротеинског дела. Тек заједно са овим делом протеин је спреман за обављање функције за коју је предодређен. Ова структура подразумева просторно уређење субјединица (слика 20). Примери оваквих протеина су хемоглобин, ДНК полимераза, јонски канали... Такође, велика већина ензима поседује кватернарну структуру.



преузето са www.owlaction.com

слика 20: субјединице које чине кватернарну структуру протеина хемоглобина

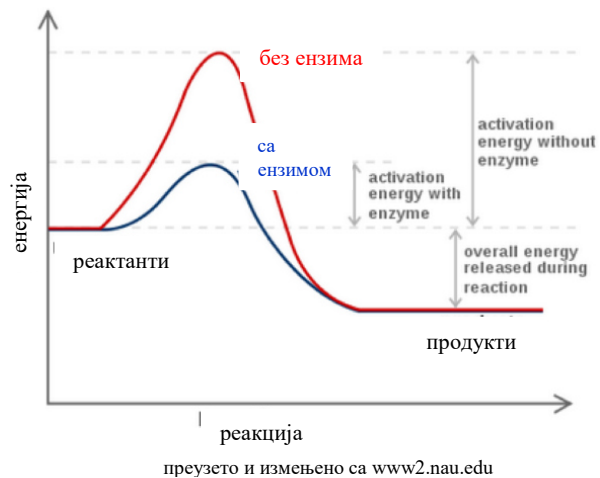
Сви протеини могу бити сврстани у три класе:

1. Глобуларни: подсећају на облик лопте, имају описану терцијарну структуру, поларни и неполарни делови се оријентишу на раније поменут начин. Већина ових протеина су ензими. У ову класу спадају инсулин, хемоглобин, антитела...
2. Фибриларни: подсећају на облик нити, веома су издужени. Углавном имају доминантно секундарну структуру. Претежно имају структурну или моторну функцију, ту спадају кератин, колаген, еластин...
3. Мембрански: деле се на интегралне и периферне. Интегрални се налазе унутар мембране и везани су хидрофобним везама, а периферни се лакше одвајају и везани су углавном водоничном везом.

Дакле ако бисмо хтели укратко да испричамо како ће живот једног протеина изгледати било би то овако: синтеза, савијање, пост-транслационе модификације, вршење одређење функције и на крају деградација. Већина протеина има ограничен животни век а до тада обавља функције као што су регулација метаболичких процеса, катализа, структурни интегритет, пренос сигнала, имунски одговор, транспорт, кретање...

Ензими

Ензими су биолошки катализатори, односно имају способност да утичу на брзину одвијања одређене хемијске реакције. Механизам деловања је такав да снижавају активациону енергију реакције, при чему могу убрзати ову реакцију и до неколико милиона пута (слика 21). Њихов значај за организме, укључујући и људски, је огроман и постоји читав низ обољења који је карактерисан мутацијом гена, што има за последицу недостатак ензима или постојање нефункционалног ензима. Ова обољења се заједнички називају ензимопатије. Данас је познато око пет хиљада ензима. Именовање ензима се врши тако што се на хемијску супстанцу која се трансформише дода суфикс -за, тако да је на пример ензим који учествује у полимеризацији ДНК током репликације назван ДНК полимераза.



слика 21: ензимско снижавање активационе енергије одређене реакције

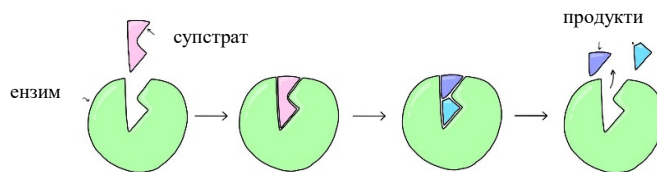
Ензими као и сви катализатори када заврше свој посао убрзавања одређене реакције, из исте излазе непромењени, што омогућава њихов прелазак на наредну реакцију. Сам механизам деловања ензима је следећи: на ензим се повезују молекули који треба да учествују у реакцији, тако створен комплекс од учесника хемијске реакције и ензима није дуготрајан, већ се брзо добија продукт те реакције и остаје непромењен ензим.

Структура ензима

Генерално говорећи ензими су протеини, мада постоји и неколико изузетака у виду РНК ензима. Функција протеина ензима је наравно одређена њиховом структуром. Овакви ензими могу бити мономерни, што значи да садрже један полипептидни ланац са стотинак аминокиселина, или олигомерни, што значи да садрже више истих или различитих ланаца који чине једну целину. Ензими су обично

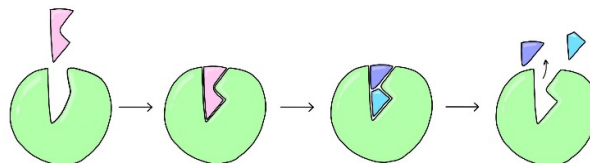
већи од молекула на које делују, тако да само један део ензима долази у контакт са супстанцом и тај део се назива активно место.

Такође, могу да постоје и места везивања кофактора који везивањем за ензим могу да убрзају или успоре његово деловање. Ензими су веома специфични кад је у питању деловање на одређени молекул у реакцијама. Ову специфичност одређују облик, форма, структура, наелектрисање, хидрофобни и хидрофилни карактер како самог ензима, тако и молекула на који делује.



преузето и измењено са www.thesciencehive.co.uk

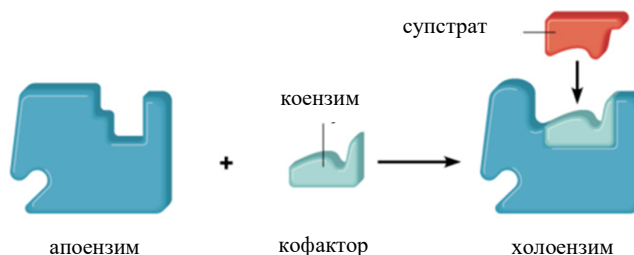
слика 22: механизам деловања ензима модел кључа и браве



преузето и измењено са www.thesciencehive.co.uk

слика 23: механизам деловања ензима модел индиковано прилагођавање

Начин на који се повезују ензим и молекул може се поистоветити са уклапањем кључа и браве. Наравно, ово је поједностављен опис и може се представити геометријским облицима (слика 22). Ако ензим на себи има део облика квадрата, он може да се повеже само са молекулом тог облика, а не на пример облика троугла, круга... Друго објашњење спајања молекула и ензима назива се хипотеза о индикованом прилагођавању или слагању, индиковане подразумева конформационе промене активног дела ензима како би могло доћи до реакције (слика 23). Неки ензими су увек у свом активном стању, док је осталима потребан кофактор да би постали активни. Кофактори могу бити неорганског порекла, обично јони метала, или могу бити коензими, који су органског порекла. Комплекс који настаје везивањем ензима и лиганда (који може бити и његов кофактор) назива се холоензим, док сам ензим без лиганда називамо апоензимом или апо формом ензима (слика 24). Кофактори углавном остају непромењени након реакција, а то могу бити деривати витамина који транспортују електроне, атоме или молекуле од ензима ка молекулу. На пример коензим А је транспортно тело за ацетилну групу, а NAD и NADP транспортују електроне.



преузето и измењено са www.toppor.com

слика 24: неактивни и активни ензим

Лизозим

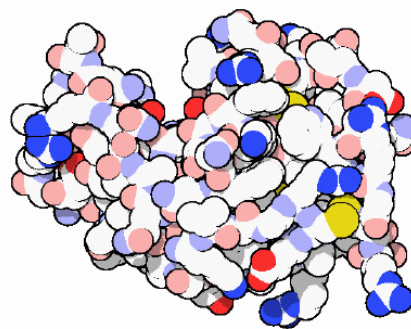
Мање је познато да је Александер Флеминг пре открића пеницилина, за које је добио Нобелову награду, открио и лизозим. Као и већина великих открића и ово се десило сасвим случајно. Док је радио у лабораторији Флеминг је случајно кинуо у једну од Петријевих шоља за култивисање микроорганизама, а пар дана касније открио је да се у једној од посудница нису развиле колоније бактерија. Касније је намерно мешао пљувачку са бактеријама и закључио да телесне течности, као што су пљувачка или сузе, садрже одређену супстанцу која има моћ да спречава раст неких бактерија, тако што их практично раствара. Ту супстанцу је назвао лизозим од грчких речи за растварање и ензим. У годинама које следе и сам Флеминг и други научници проучавали су лизозим и начине на које се тело бори против инфекција, потврђена су различита дејства и корисни ефекти овог ензима. Стога се лизозим често помиње и као природни антибиотик тела и као ензим будућности.

Лизозим је протеински, антимикуробни ензим

који се састоји од сто двадесет девет аминокиселина (слика 25). Производе га животиње и део је урођеног имунског система. Лизозим је гликозидна хидролаза, ензим пуног имена пептидогликан N-

ацетилмурамоилхидролаза. Он катализује реакцију хидролизе (1→4)- β -везе између N-ацетилмураминске киселине и N-ацетил-D-

глукозаминских остатака у пептогликанима и између N-ацетил-D-глукозаминских остатака хитодекстрина. Управо пептогликан је главна компонента ћелијских зидова грам-позитивних бактерија. Након реакције хидролизе коју лизозим индукује, угрожен је интегритет ћелијских зидова што изазива лизу самих бактерија. Овог протеина ензима има у изобиљу у излучевинама као што су сузе, пљувачка, слуз, људско млеко. Присутан је и у цитоплазми макрофага и неких неутрофила. Лизозим је један од најзаступљенијих антимикуробних протеина у дисајним путевима са концентрацијама процењеним на 0,1 до 1 mg /ml, што је довољно да убије важне плућне патогене. Велике количине лизозима се налазе и у беланцету. Лизозим из беланцета је релативно термички стабилан, са тачком топљења до 72°C при pH



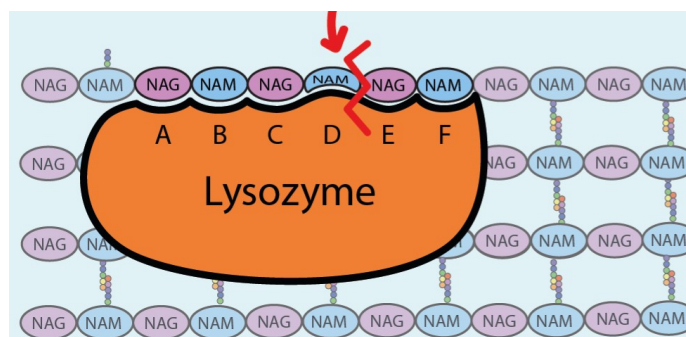
преузето са www.pdb101.rcsb.org

слика 25: модел лизозима

вредности око 5,0. Активност лизозима се одржава у великом опсегу pH вредности од 6 до 9. Његова изоелектрична тачка је pI 11,35. Изоелектрична тачка лизозима хуманог млека је 10,5-11.

Механизам деловања овог ензима је такав да он хидролизује гликозидне везе у пептидогликанима, такође, може да раскине гликозидне везе и у хитину, мада не толико ефикасно. За активно место лизозима везује се део пептидогликана између његова два домена. Напада пептидогликан између N-ацетилмурамске киселине (NAM) и четвртог атома угљеника N-ацетилглюкозамина (NAG) (слика 26). Филипов механизам нам сугерише да каталитичка моћ лизозима потиче од стерне деформације везаног супстрата. Лизозим искривљује четврту хексозу у конформацију полу столице. У овој конформацији, гликозидна веза се много лакше прекида.

С обзиром на то да је лизозим део имунског система, природно је очекивати да смањен ниво лизозима има за последицу одређене поремећаје или болести. Важно је рећи да пошто је лизозим облик заштите од грам-позитивних патогена, он игра битну улогу у имунологији беба храњених мајчиним млеком. Такође, мембрана која прекрива око заштићена је лизозимом. Због своје особине растварања ћелијског зида, користи се и у лабораторијским условима за ослобађање одређених протеина из бактерија. Овакав третман лизозимом је могућ при одређеним температурама, pH вредностима и концентрацијама соли. Његова активност се повећава са повећањем температуре до 60°C, у опсегу pH вредности 6-7. Уколико су присутне соли у раствору, оне могу имати како поспешујући, тако и инхибиторни ефекат на деловање лизозима. На пример натријум-хлорид по правилу индукује лизу, али не и у великим концентрацијама када је инхибира.



преузето са www.maxfacts.uk

слика 26: механизам деловања лизозима

Кристали и кристализација протеина

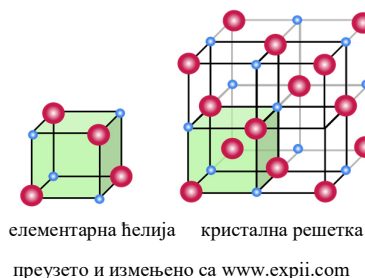
Кристализација је процес настајања кристала у којем су основне јединице, које могу бити атоми, јони или молекули, правилно слажу у простору формирајући кристалну структуру (слика 27). У природи кристали могу настајати на различите начине: из водених и других раствора, из раствора на високој температури, из гасовитог стања, из чврстог стања. Процес кристализације започиње када се достигне презасићеност раствора, паре или гаса. Сам процес зависи од много фактора: физичких и хемијских својстава супстанце, од средине у којој кристал расте, од евентуалних примеса у супстанци, температуре, рН вредности...

Основни, структурни мотив у кристалу је понављајућа асиметрична јединица, односно група атома која се периодично понавља. Транслацијом структурног мотива добија се низ, затим мрежа и на крају решетка. Вектор транслације је:

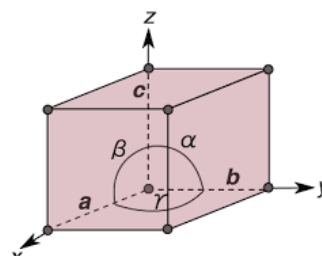
$$T = n_1 \vec{a} + n_2 \vec{b} + n_3 \vec{c} \quad (1)$$

Где су у релацији (1) n_1 , n_2 и n_3 бројеви, а **a**, **b** и **c** вектори елементарне ћелије. Углови између вектора елементарне ћелије су α , β , γ (слика 28). Према међусобном односу вектора и углова говоримо о једном од седам система: кубни, тетрагонални, орторомбични, моноклинични, триклинични, хексагонални и тригонални (слика 29).

Асиметричне јединице распоређене на одређени начин изграђују јединичну или елементарну ћелију (слика 27). Транслацијом јединичне ћелије у сва три правца настаје кристална решетка. Односи реципрочних вредности одсечака А, В и С које прави нека кристална раван на трима изабраним координатним осама једнаки су односима целих простих бројева, које називано Милеровим индексима (слика 30):

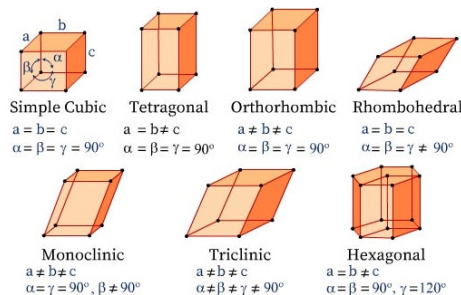


слика 27: елементарна ћелија и кристална решетка



преузето са www.eng.libretexts.org

слика 28: вектори елементарне ћелије и углови између њих



преузето са www.medium.com

слика 29: седам кристалних система

$$h \div k \div l = \left(\frac{1}{A}\right) \div \left(\frac{1}{B}\right) \div \left(\frac{1}{C}\right) \quad (2)$$

Паралелне равни имају исте Милерове индексе.

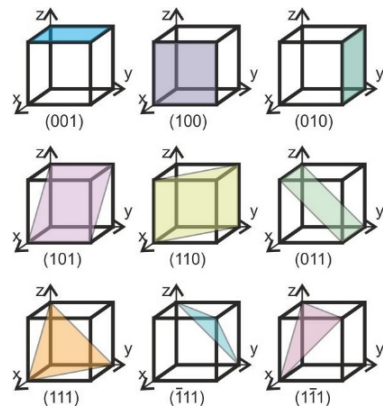
Кристализација протеина поред свега наведеног има и још једну отежавајућу околност, а то је да је потребно да обезбедимо и велике количине концентрованог и веома чистог протеина.

Постоји више начина који би могли да нам обезбеде такав чист протеин, један од њих је хетерологна експресија. За изоловање и пречишћавање протеина се може применити велики број метода које се заснивају на одређеним особинама протеина као што су растворљивост,

јонско наелектрисање, молекулска маса, поларност, специфични афинитет... За узорке протеина који су нама потребни обично је неопходно применити више узастопних метода. Сам протокол за пречишћавање није универзалан и зависи од особина протеина који покушавамо да изолујемо. Протокол је најчешће јединствен, јер сваки протеин има себи својствене проблеме као што су нерастворљивост при високим концентрацијама, преципитација или агрегација, оксидација, деградација, непожељне конформационе промене.

Када имамо обезбеђен кристал протеина, следећи корак је упознавање са структуром протеина на атомском нивоу. Идеју и информације о атомској структури кристала протеина можемо добити коришћењем рендгенске структурне анализе протеина. Молекули у кристалу протеина су распоређени у тродимензионалну кристалну решетку. Циљ рендгенске структурне анализе је одређивање положаја свих атома структурног мотива, као и тога како су они распоређени у елементарној ћелији. Такође, за ову методу потребно је да добијемо монокристал, који садржи хиљаде уређених молекула у истој оријентацији, односно мноштво елементарних ћелија које су правилно распоређене. Према општем рецепту за кристализацију протеина потребно је да обезбедимо:

- протеин који је више од 90% чист, што је најлакше утврдити поли-акрил амидном електрофорезом (SDS PAGE) и веома концентрован (више од 10 mg/ml)

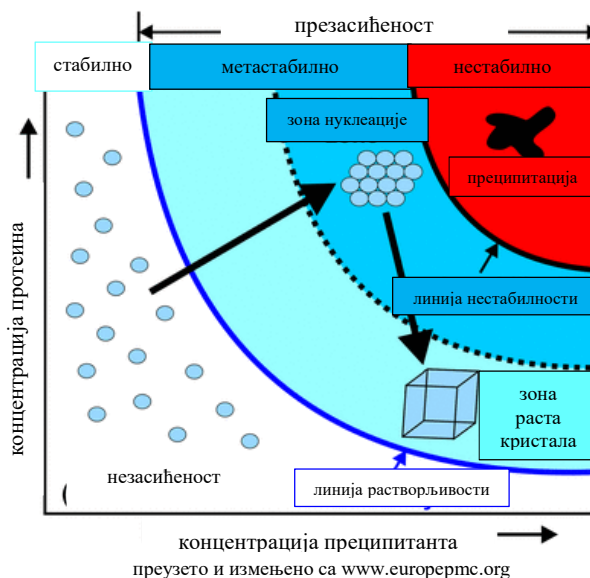


преузето из чланка *Structural transformations in complex perovskite-type relaxor and relaxor-based ferroelectrics at high pressures and temperatures*

слика 30: равни са Милеровим индексима

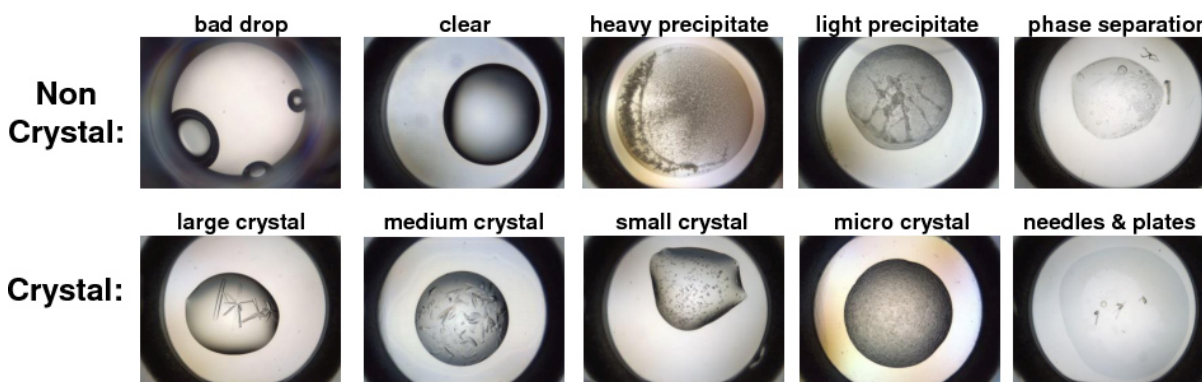
- пуфер који контролише pH вредности
- преципитациони агенс који изазива презасићеност, то могу бити полиетиленгликол, различите соли или органски алкохоли
- потенцијално још неки адитиви који могу бити друге соли, детерџенти, кофактори, алкохоли

Тачан однос протеина, преципитационог агенса и адитива утврђује се емпиријски. Мешамо раствор чистог протеина са различитим агенсима и у различитим концентрацијама раствора док не добијемо адекватне услове за кристализацију одређеног протеина, односно жељене кристале. Улога преципитаната је да за себе вежу воду и тако раствор протеина учине концентрованијим. Кристали који су



преузето и измењено са www.europepmc.org
слика 31: крива кристализације

оптимални за овај вид анализе X-зрацима су монокристали већи од 100 микрометара. Мењањем удела различитих супстанци уочава се да је опсег кристализације већи од опсега у ком се добијају кристали погодни за рендгенску анализу (слика 31). Наиме, могуће је да дође до појаве кристала који изгледају као иглице или дводимензионалне равни, јежеви, нити, друзе, разни поликристални облици, али такви облици нам нису погодни за анализу (слика 32).

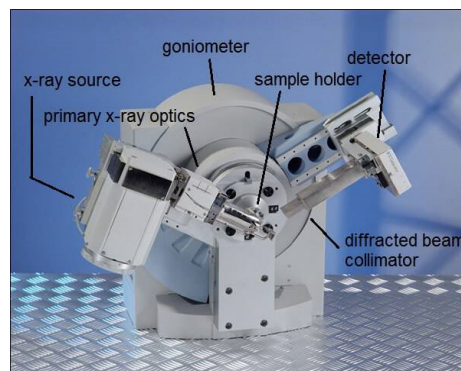


преузето из чланка *Classification of Protein Crystallization X-Ray Images Using Major Convolutional Neural Network Architectures*

слика 32: некрystalне фазе и облици кристала који се могу добити

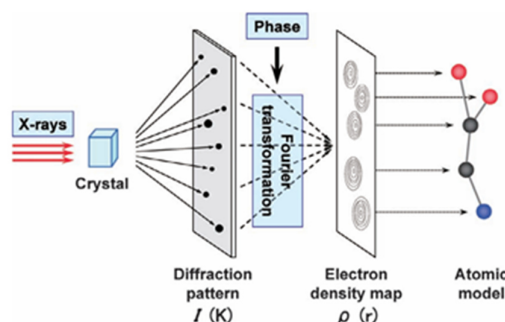
Принцип рендгенске структурне анализе протеина

Методом рендгенске структурне анализе могуће је утврдити апсолутни распоред атома у биомолекулу, њихову међусобну повезаност, међусобну удаљеност, углове између веза, као и торзионе углове. Основни принципи рада су следећи: након добијања кристала одређених особина таквих да је он уопште погодан за овај тип анализе, кристал стављамо у дифрактометар за монокристал на гониометарску главу која може да ротира кристал (слика 33). У дифрактометру се налази извор рендгенског зрачења као и детектор тог зрачења. Детектор бележи дифракциону слику, односно положаје и интензитете дифракционих максимума. Следећи корак је одређивање на ком сету равни је дошло до дифракције и под којим углом, те меримо положаје и интензитете дифракције. У наредном кораку могуће је одредити x , y , и z



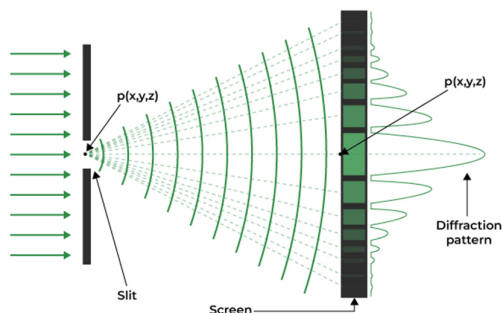
преузето са www.physicsfeed.com

слика 33: дифрактометар



преузето са www.fzu.cz

слика 34: једноставна шема методе рендгенске структурне анализе



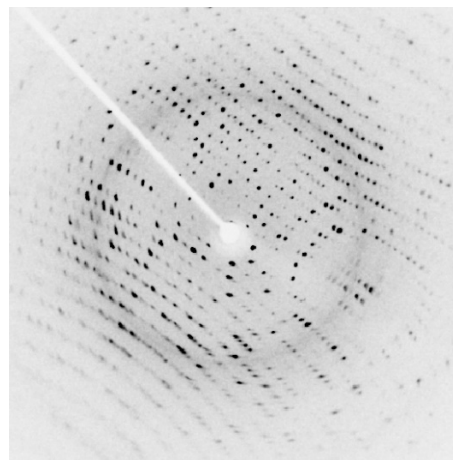
преузето са www.geeksforgoeks.org

слика 35: дифракција таласа

координате атома. Интензитет дифракције је повезан са структурним фактором, који је повезан са електронском густином, а на основу електронске густине одређујемо координате, као и врсту атома. Завршни корак је прављење тродимензионалног модела биомолекула ког смо подвргли анализи, што заправо ради рачунар из добијене електронске густине (слика 34).

У рендгенској анализи користи се својство таласа да уколико у свом простирању наиђе на препреку која по димензијама одговара његовој таласној дужини, долази до дифракције (слика 35). Када талас наиђе на овакву препреку, у сенци коју она прави настаће интерференција таласа који долазе с једног

и с другог руба препреке. На молекулима нашег кристала доћи ће до дифракције X-зрака чија таласна дужина одговара димензијама атома од којих се протеински кристал састоји. Када рендгенски зраци падну на кристал, погођени атоми постају секундарни извори таласа и долази до расејања таласа на електронским облацима атома. Амплитуда дифрактованог зрачења зависиће од броја електрона у атому, тј. од електронске густине. Код дифрактованих таласа долазиће до интерференције што резултује дифракционом сликом, интензитет таласа се повећава ако су дифрактовани таласи у фази и смањује ако нису. Тако дифракциона слика представља низ правилно распоређених тачака различитог интензитета (слика 36). На основу дифракционе слике Фуријеовом анализом може се израчунати дистрибуција електронске густине у кристалу. Сада ћемо изнети нешто више детаља о сваком кораку наведене анализе.



преузето са www.wikipedia.com

слика 36: пример дифракционе слике лизозима

Опис експерименталног дела методе

Одабир кристала

Сам одабир кристала је можда и најважнији део процедуре, без кристала немамо ни услова за даљу анализу. Већ смо напоменули да нам је потребан монокристал високог квалитета који има добро дефинисане пљосни. Идеалне димензије су од 0,1 mm до 0,3 mm, толерише се и до 0,5 mm. Сам сноп X-зрака је дефинисан колиматором, у нашем случају на пречник 0,8 mm, тако да кристал мора бити мањи од датог снопа, да би сноп долазио до свих делова кристала. Такође, ако би кристал био већи од поменутих димензија, долазило би до апсорпције зрачења унутар кристала што би даље довело до слабљења дифракционих максимума. Тражимо кристал који је транспарентан, без пукотина. За анализу нису погодни кристали који су умножени, друзе, који изгледају попут длака или нити, као ни танке плочице. Дакле, није погодно када је једна од димензија доминантна, идеално би било да су све три димензије сразмерне.

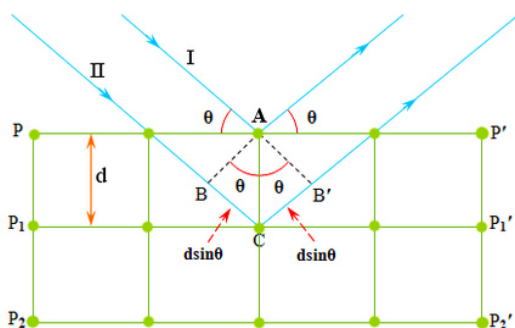
Причвршћивање кристала

Потребно је кристал причврстити за стаклену иглу која затим иде на гониометар. То се може урадити веома малом капљицом супер лепка или лака за нокте, која би требала да буде мања од самог кристала. Други начин је пецање кристала омчом у којој се већ налази одређени флуид и тако да би површински напон требао да ухвати кристал. Ако кристал није стабилан у ваздуху поставља се у стаклену капицу у коју се удувава одређени гас. Код протеинских кристала од 30% до 80% запремине чини вода, како би се спречило њихово исушивање на ваздуху, они се постављају у капиларе испуњене течномшћу. Такође, кристал се хлади течним азотом, како би термичко кретање атома свели на минимум и прецизније одредили њихов положај.

Уочавање рефлексија

Кристал смо већ дефинисали као чврсто стање материје у ком се периодично понавља структурни мотив кроз целу кристалну решетку. Према томе, кроз кристалну решетку је могуће повући низ еквидистантних равни на којима се налазе ови структурни мотиви. Ове равни су полупропусне за рендгенске зраке, један мањи део зрака се рефлектује са прве равни, док остатак пролази прву раван али се рефлектује са неке од следећих равни, ипак већи део пролази цео кристал без рефлексије. Растојање између замишљених повучених равни се обележава са d , и можемо повући више различитих еквидистантних равни са својственим различитим растојањем d_1 , d_2 итд... Брагова релација повезује међураванско растојање d са таласном дужином λ употребљеног рендгенског зрачења (слика 37).

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (3)$$



преузето са www.physical-optics.blogspot.com

слика 37: извођење Брагове релације

Ова Брагова једначина (3) је основна једначина рендгенске структурне анализе јер нам даје предикцију дифракционих максимума. Брагов закон се формулише на следећи начин: производ двоструког међураванског растојања и синуса упадног, односно рефлектованог угла X-зрака, једнак је

целобројном умношку таласне дужине X-зрака. Ако је задовољен Брагов закон рефлектовани снопови су у фази и јавља се конструктивна интерференција. Резолуција у нашем случају износи $0,8 \text{ \AA}$ и мања је од очекиваног растојања међу атомима које се јавља у биомолекулима (нпр. растојање између водоника и угљеника углавном износи око $1 \text{ \AA}$). Ми смо овде дифракцију свели на једноставну рефлексију. Поменуте равни су дефинисане Милеровим индексима h , k и l , потребно је сада да одредимо сетове равни које дају дифракционе максимуме или позитивну интерференцију. На основу тога како смо поставили кристал добијамо сетове еквидистантних равни и углове под којима се зрачење рефлектовало, које региструје детектор у дифрактометру. Након што смо установили поменуте величине, и с обзиром на то да унапред знамо таласну дужину зрачења које је употребљено, можемо одредити међураванско растојање. Треба напоменути да термин рефлексија није у потпуности физички исправан, већ нам служи као опис онога што се дешава када кристал бива изложен X-зрацима, али је наведени Брагов закон (3) и резултат који се добија тачан. Тако да се често уместо дифракционих максимума који настају конструктивном интерференцијом користи термин рефлексија 110 , односно рефлексија са равни која има Милерове индексе $h=1$, $k=1$, $l=0$. Оно што заиста доводи до расејања зрачења јесте његова интеракција са електронима атома од којих је кристал изграђен. У зависности од енергије, односно таласне дужине упадног зрачења може доћи до једног од три исхода:

1. еластично, Томсоново расејање при којем нема промене енергије упадног зрачења, већ само долази до промене правца његовог простирања
2. нееластично, Комптоново расејање, при којем долази до промене правца и енергије упадног зрачења
3. потпуна апсорпција зрачења, фотоефекат или стварање пара електрон-позитрон

Од набројаних исхода за нас је у овој методи погодан само први. Електрони у атомима који интерагују са X-зрацима постају нови извори тих зрака непромењене таласне дужине, енергије или фреквенције. На основу броја електрона који интерагују закључујемо о којој врсти атома је реч, а на основу положаја рефлексија изводимо закључке о самом положају ових атома.

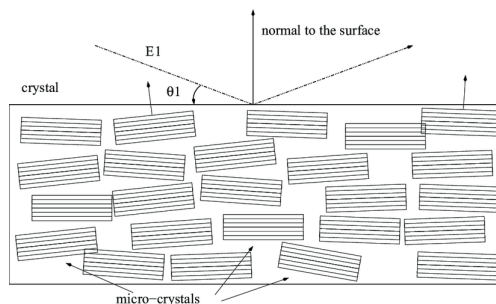
Основни преглед постексперименталног дела методе

Структурни фактор и фазни проблем

Када низ равни са Милеровим индексима h , k , и l заклопи угао θ са примарним снопом зрачења долази до горе описане рефлексије. У идеалном кристалу све елементарне ћелије су потпуно правилно распоређене у било ком његовом делу. При извођењу Брагове релације разматран је овакав кристал, и у случају таквог кристала рефлексиони максимум не би имао ширину.

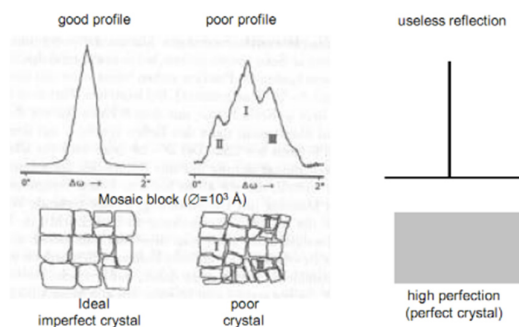
Међутим, реални кристали изгледају мало другачије, они су мозаичне структуре састављене од кристалита или мозаичних блокова (слика 38). Дакле рефлексија ће се дешавати на појединим кристалитима који су у таквом међусобном положају да заклапају мали угао од $0,1^\circ$ до $0,2^\circ$, тако да ће рефлектовани зраци бити у уском снопу око Браговог угла θ . Код идеалних кристала интензитет рефлексије би био линија, а код реалних кристала свака рефлексија има одређену површину испод криве, та површина представља интегрисани интензитет рефлексије (слика 39). Битно је рећи да уколико добијемо криву која има више локалних максимума, кристалити у таквом кристалу су под већим углом од поменутог $0,2^\circ$ и такав кристал није погодан за овакав тип анализе.

Наредни корак је да на основу од стране детектора измерених интензитета дифракционих максимума израчунамо амплитуду структурног фактора, ове две величине су директно пропорционалне. Код мозаичне структуре интензитет дифрактованог зрачења је пропорционалан амплитуди структурног фактора на m -ти степен:



преузето из чланка Crystal Characterization for a Gamma-ray Laue concentrator

слика 38: релани кристал састављен од кристалита



слика 39: интензитет рефлексије

$$I \sim |F|^m \quad (4)$$

У случају да су мозаични блокови довољно мали m има вредост два:

$$I \sim |F|^2 \quad (5)$$

Ова пропорционалност је представљена преко низа фактора на следећи начин:

$$I(hkl) = KAL_pT \left| \vec{F}(hkl) \right|^2 \quad (6)$$

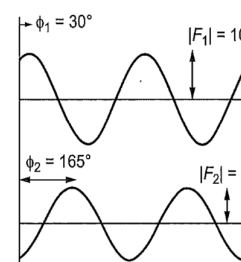
Где су у релацији (6) $I(hkl)$ – интензитети рефлексије са датог низа (hkl) равни, K – фактор скале, A – апсорпциони фактор, L_p – Лоренц-поларизациони фактор, T – температурни фактор. Наведени фактори зависе како од саме природе кристала, тако и од услова мерења. Ови параметри су уврштени у рачунарске програме који на основу измерених интензитета рефлексија рачунају структурни фактор.

Сада долазимо до основног полазишта рендгенске структурне анализе, а то је да су интензитети дифракционих максимума и распоред атома у решетки повезани Фурије трансформацијом. Дакле дифракциона слика је Фурије трансформација електронске густине, а електронска густина је инверзна Фурије трансформација дифракционе слике.

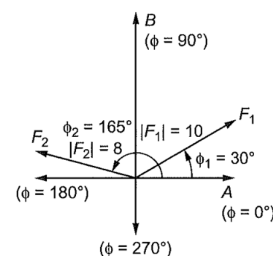
Математичка представа ове трансформације је веома компликована и превазилази садржај овога рада, али може бити објашњена у смислу физичких процеса који се дешавају.

Свака рефлексија може бити представљена као талас, а сваки талас може бити представљен уз помоћ две величине, а то су амплитуда F и фаза ϕ (слика 40). Амплитуда

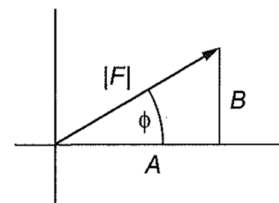
представља највећу висину таласа, а фаза хоризонтални померај у односу на одабрани почетак. Сажетији начин представљања таласа преко ове две величине је векторска репрезентација, где је дужина вектора амплитуда таласа, а фаза усмереност тог вектора (слика 41). Такође, вектор можемо представити и преко његових пројекција на x и y осу, односно преко две координате A на хоризонталној и B на вертикалној оси (слика 42). Веза између вектора и његове репрезентације координатама је:



слика 40: амплитуда и фаза два таласа



слика 41: векторска репрезентација таласа



слика 42: вектор представљен преко његових пројекција

$$|\vec{F}|^2 = A^2 + B^2 \quad \tan(\varphi) = \frac{B}{A} \quad (7) (8)$$

$$A = |\vec{F}| \cos(\varphi) \quad B = |\vec{F}| \sin(\varphi) \quad (9) (10)$$

Свака рефлексија је интерференциона сума више таласа.

Да би се формирала слика електронске густине из дифракционе слике потребно је сабрати те таласе са њиховим амплитудама и фазама. На слици је приказана најпростија ситуација сабирања два таласа (слика 43).

Координата вектора суме А је просто збир ове координате првог и другог вектора, овако идентично се добија и координата суме В. Тако да се коначна амплитуда и фаза вектора суме у векторској репрезентацији једноставно рачунају:

$$A_1 = A_2 + A_3 \quad B_1 = B_2 + B_3 \quad (11) (12)$$

Описани процес сабирања можемо применити на произвољан број таласа:

$$A = \sum_{i=1}^n A_i \quad B = \sum_{i=1}^n B_i \quad (13) (14)$$

При сабирању не треба мешати компоненте А и В, и рачунар их заиста третира као две одвојене једначине. Такође, амплитуду таласа можемо представити као комплексни број:

$$\vec{F} = A + iB \quad (15)$$

Где множење бројем i представља ротирање вектора за 90° у правцу супротном од казаљке на сату. Ако знамо да је:

$$A = |\vec{F}| \cos(\varphi) \quad B = |\vec{F}| \sin(\varphi) \quad (16) (17)$$

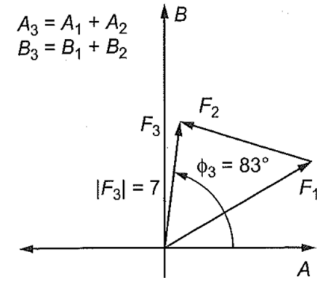
Можемо писати:

$$\vec{F} = |\vec{F}| \cos(\varphi) + i |\vec{F}| \sin(\varphi) = |\vec{F}| (\cos(\varphi) + i \sin(\varphi)) = |\vec{F}| e^{i\varphi} \quad (18)$$

Према томе векторска репрезентација дифрактованих таласа је:

$$\vec{F}(hkl) = |\vec{F}(hkl)| e^{i\varphi(hkl)} \quad (19)$$

Вектор $\mathbf{F}(hkl)$ се назива структурни фактор. Математички запис онога што смо већ напоменули, а то је да је дифракциона слика Фурије трансформација електронске густине, гласи:



преузето из рада Olivera Klisurić,
„Vodonične veze, struktura i biofizički aspekti
mehanizma aktivnosti steroidnih hormona –
androgena i antiandrogena“
као и слика 39, слика 40, слика 41, слика 42

слика 43: сабирање два таласа

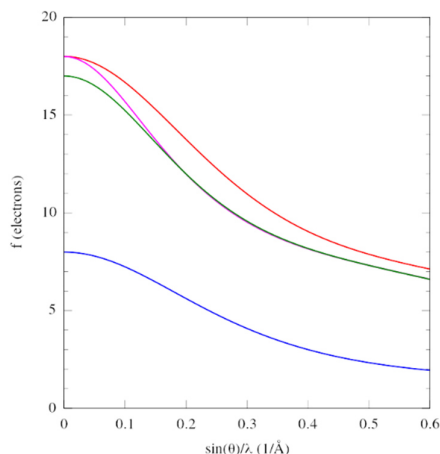
$$\vec{F}(hkl) = \int_{V_{el}} \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dV \quad (20)$$

У релацији (20) $\rho(xyz)$ представља електронску густину у свакој тачки простора, односно елементарне ћелије. Ову интеграцију потребно је урадити за сваку рефлексију и тако ћемо добити сет структурних фактора са равни h , k и l , сваки са амплитудом $|\mathbf{F}(hkl)|$ и фазом $\phi(hkl)$. Међутим, раније је поменуто да је у експерименту могуће измерити интензитета рефлексија, а тај интензитет је повезан само са амплитудом. Оно што би поједноставило компликовану интеграцију континуалне функције електронске густине, је да са интеграције некако пређемо на суму. Ово је могуће у случају да електронску густину можемо повезати са индивидуалним атомима.

Већ је речено да када посматрамо изоловане атоме, оно што се дешава је да атом дифрактује упадне зраке тако што његови електрони на путу упадних електромагнетних таласа постају нови извори тих таласа у свим правцима, и при томе се дешава еластично расејање. У правцу упадних рендгенских зрака за $\theta=0^\circ$ сви електрони расипају зраке у фази, али на осталим угловима θ постоје парцијални доприноси деструктивне интерференције, тако да интензитет дифракције опада са порастом угла.

Варијација интензитета дифрактованог зрачења са углом се назива атомски фактор расипања и означава се са f . Обично се уместо чисте зависности од угла користи $\sin\theta/\lambda$, да би била једнака за све таласне дужине. Атомски фактор расипања приказује се графички као на слици (слика 44). Јединица у којој се изражава ова величина је број електрона, а $f(0^\circ)$ је једнак управо атомском броју Z . Ове функције су познате за све атоме и њихове јоне и налазе се у кристалографским табелама и део су кристалографских компјутерских програма.

Познато је да атоми у чврстим телима не мирују већ вибрирају, у зависности од температуре, око равнотежних положаја. Овај ефекат дакле шири електронску густину, што наравно утиче на ефекат интерференције. Ова појава утиче на атомски фактор расипања као на слици, односно чини да он стрмије опада (слика 45).



преузето са www.wikipedia.com

слика 44: график зависности атомског фактора расипања од $\sin\theta/\lambda$, за различите атоме

Подразумевамо да атоми вибрирају изотропно, дакле једнако у свим правцима, и према тома коригован атомски фактор расипања добијамо тако што помножимо $f(\theta)$, који нам је познат, са изотропним или температурним параметром померања U . Овај фактор представља квадрат средње амплитуде померања и изражава се у $\text{\AA}^2$. Према томе корекција атомског фактора расипања због термалних померања ће изгледати овако:

$$f'(\theta) = f(\theta) \exp\left(\frac{-8\pi^2 U \sin^2(\theta)}{\lambda^2}\right) \quad (21)$$

Сада, након изложеног где смо у обзир узимали појединачне атоме уместо континуалне функције електронске густине, добијамо следећи облик структурног фактора, у ком можемо са интеграла прећи на суму:

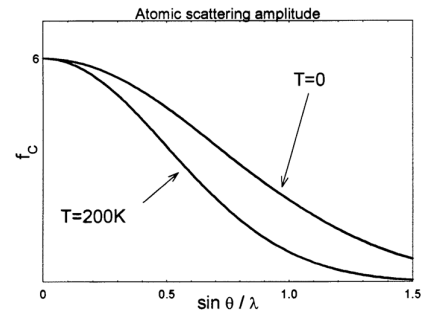
$$\vec{F}(hkl) = \sum_{j=1}^n f_j(\theta) \exp\left(\frac{-8\pi^2 U_j \sin^2(\theta)}{\lambda^2}\right) \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (22)$$

Где сумирање у релацији (22) вршимо по индексу јот, односно по броју атома у елементарној ћелији. Сваки од ових атома има свој фактор расипања, параметар померања и координате. Оваква сума се израчунава за сваки дифрактовани талас. Посматрањем наведене једначине (22) можемо да закључимо следеће: сваки атом расипа рендгенске зраке који падају на њега, а укупан дифрактовани талас у правцу (hkl) је сума свих тих дифрактованих таласа који потичу од сваког атома у елементарној ћелији, а који у датом правцу имају различите релативне фазе које зависе од релативне позиције атома.

Већ је речено да из самог експеримента добијамо структурни фактор, наравно посредно преко интензитета рефлексија. Међутим, из самог структурног фактора не можемо сазнати положаје и врсте атома, већ те информације добијамо из електронске густине. Из максимума расподеле електронске густине и њених интензитета добијају се подаци о положају и врсти атома у елементарној ћелији. Дакле потребно је да из претходне релације експлицитно изразимо електронску густину:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \vec{F}(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (23)$$

односно ако се разложи структурни фактор на амплитуду и фазу:



преузето са www.tutorials.crystalsolutions.eu

слика 45: утицај термичког кретања атома на атомски фактор расипања

$$\varrho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |\vec{F}(hkl)| \exp[i\varphi(hkl)] \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (24)$$

Где се сумирање у (23) и (24) врши по свим индексима h , k и l од минус бесконачно до бесконачно односно по свим рефлексијама присутним у одређеној дифракционој слици. Слика електронске густине се добија сумирањем свих дифрактованих снопова рендгенског зрачења са свим својим амплитудама и фазама. Овде фазе представљају фазе таласа релативне у односу на фазу упадног таласа где додатни фазни померај зависи од геометријског положаја у слици у односу на исходиште елементарне ћелије. Поменути додатни фазни померај се може израчунати, али оригинална фаза $\varphi(hkl)$ се не може добити из самог експеримента, као ни из таблица. Према томе није могуће на једноставан начин преко експерименталних резултата израчунати фазу, и овај проблем се назива фазни проблем. Информације о фазним угловима појединачних рефлексија изгубљене су при мерењу, али су садржане у комплету измерених структурних амплитуда датог кристала.

Фазни проблем, односно проблем налажења фазних углова представља основни проблем рендгенске структурне анализе. Одабир методе за решавање фазног проблема обично зависи од тога који су очекивани атоми који граде ту кристалну решетку. Ако се у структури налази неки тешки атом са великим бројем електрона, метода коју бирамо је Патерсонова метода. Патерсонова функција је у суштини Фурије трансформација интензитета, а не целог структурног фактора. Положај максимума у овој функцији су на међуатомској удаљености, а интензитети максимума су пропорционални броју електрона у одређеним атомима. Ако се пак кристал састоји од лакших атома са приближним бројем електрона, што је случај са биомолекулима, бирамо директне методе решавања, овим методама се тестира и бира низ почетних фаза. Када је фазни проблем решен, тада електронску густину добијамо сумирањем структурних фактора, односно поступком Фуријеове синтезе. Сматрајући да се атоми налазе у тачкама максимума електронске густине, могуће је одредити кристалну структуру.

Преглед диферентне Фуријеове анализе

Да бисмо одредили тачност решења структуре кристала, примењујемо диферентну Фуријеову анализу. Ова анализа се састоји од два корака. Први је да на основу већ познатих положаја атома у елементарној ћелији израчунамо структурни фактор и електронску густину:

$$\left| \vec{F} \right|_{cal} (hkl) = \left| \vec{F} (hkl) \right|_{cal} \exp[-i\varphi_{cal}(hkl)] \quad (25)$$

$$\varrho(xyz)_{cal} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \vec{F}_{cal} (hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (26)$$

Ако се сада израчунате фазе φ_{cal} припишу измереним модулима структурних фактора добиће се измерени структурни фактор:

$$\left| \vec{F} \right|_{obs} (hkl) = \left| \vec{F} (hkl) \right|_{obs} \exp[-i\varphi_{cal}(hkl)] \quad (27)$$

$$\varrho(xyz)_{obs} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \vec{F}_{obs} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (28)$$

Одузимањем израчунате електронске (26) густине од измерене (28) добијамо следећу функцију:

$$\begin{aligned} \Delta\varrho(xyz) &= \varrho_{obs}(xyz) - \varrho_{cal}(xyz) = \\ &= \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \left(\vec{F}_{obs} (hkl) - \vec{F}_{cal} (hkl) \right) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \end{aligned} \quad (29)$$

Ова функција (29) се назива диферентна мапа и у зависности од њене израчунате вредности може показати следеће:

- 1) уколико су положаји атома тачно одређени, функција $\Delta\rho(xyz)$ ће бити приближна нули
- 2) уколико у претпостављеној структури није предвиђен атом који постоји у реалној структури, на таквим местима ће се појавити изразити максимум функције $\Delta\rho(xyz)$
- 3) уколико је претпостављени атом у структури погрешно лоциран, на таквим местима ће се појавити негативна вредност функције $\Delta\rho(xyz)$
- 4) уколико постоји максимум у близини другог не-водониковог атома, то одређује положаје водоника у кристалној структури

Одређивање позиција водоника у елементарној ћелији

Из расподеле рачунате у диферентној Фуријеовој синтези могу се одредити веома мале разлике у електронској густини, па се због наведеног ова метода може користити и за одређивање положаја водоникових атома. Сами положаји се не могу одредити из дифракционе слике, с обзиром на то да водоник има један електрон и дифракција коју прави тај један електрон неће бити уочљива на слици. Већ је речено да ће се атом водоника показати као максимум из диферентне мапе у близини неког другог атома из структуре. Овако добијене позиције водоникових атома се затим обједињују у нови модел, али се у обзир узима и изотропни температурни фактор. Међутим, одређивање положаја водоника на овај начин из диферентне мапе има одређене недостатке. Често се дешава да је максимум електронске густине маскиран максимумом електронске густине тежих атома. Други недостатак који се јавља је грешка саме методе дифракције рендгенских зрака на кристалу. Овом методом се заправо одређује положај електронског облака, са којим зрачење долази у интеракцију. Наиме, код већине тежих атома овај електронски облак је углавном сферно симетричан, па се може сматрати да се центар оваквог електронског облака поклапа са самим центром атома, односно са језгром датог атома. Код водоника постоји само један електрон који је укључен у везу са неким другим тежим атомом и он пулсира око те везе. Према томе центар електронског облака водоника је померен ка тежем атому и његов центар се не поклапа са језгром водоника, тако да се сам положај водоника не може прецизно одредити.

Једноставнија метода која се често користи је метода генерисања. Проучавање великог броја молекула у гасовитом стању дало је бројне податке о везама између водоника и угљеника, азота, кисеоника. На основу тих података знају се прецизни подаци о дужини везе и валентним угловима. Кристално поље у принципу незнатно утиче на дужине веза и углове, односно неће битно променити положај водоника у кристалном стању у односи на гасовито. На описан начин могу се добити прецизни подаци о положају атома водоника у молекулу.

Фурије утачњавање

Оно што добијамо Фуријеовом синтезом је приближан модел молекуларне структуре кристала. Могуће је да још увек постоје приметне разлике између неке од измерених амплитуда структурних фактора и оних израчунатих на основу фаза структурних фактора. Након одређивања фаза структурних фактора оне се придружују експериментално измереним модулима свих структурних фактора, и на тај начин се добија скуп приближних вредности структурних фактора. Са овако добијеним приближним вредностима структурних фактора, у првој апроксимацији добијају се расподеле електронске густине. У тако израчунатој Фуријеовој синтези појавиће се максимуми електронске густине и на неким другим местима осим у близини оних на којима се налазе познати атоми. Те нове максимуме придружимо раније познатим у процесу који се назива Фурије утачњавање.

Фактор поузданости

На крају ове методе врши се процена степена слагања добијеног модела кристалне структуре са стварном структуром. Слагање се процењује на основу поређења измерених амплитуда структурних фактора и амплитуда структурних фактора израчунатих помоћу познатих атома и њихових положаја. Као мера слагања добијеног модела и стварне структуре дефинише се величина која се назива фактор поузданости:

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_0| - |F_c||}{\sum_{hkl} |F_0|} \quad (30)$$

где се сумирање у (30) врши по свим индексима измерених дифракционих максимума. Што је фактор поузданости мањи, то је претпостављени модел ближи стварној структури. Добрим решењем структуре се сматра оно чији је фактор поузданости мањи од 0,05, а некада се толерише и до 0,1. За протеинске кристале се добрим фактором поузданости може сматрати и фактор који је мањи од 0,3.

Експериментални део: Експеримент кристализације лизозима

Материјал и методе

За извођење експеримента потребно је обезбедити следећи прибор:

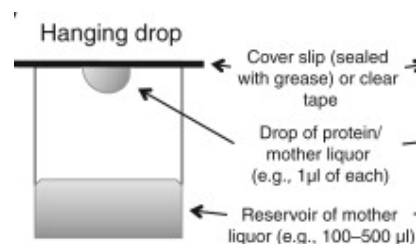
- плочу са 24 бунарчића (4x6)
- покривна стакла
- пипете
- вазелин

По општем рецепту за кристализацију протеина потребно је обезбедити следеће:

- пречишћени лизозим
- фосфатни 10 М пуфер који обезбеђује pH вредност од 7,4
- преципитациони агенс натријум-хлорид

Метода кристализације која се примењује је метода висеће капи (слика 46). Користи се плоча са двадесет четири бунарчића, који су распоређени у четири реда (A, B, C, D) и шест колона (1, 2, 3, 4, 5, 6), и у којима ће се дешавати кристализација (слика 47).

Запремине самих бунарчића су 1,5 ml.

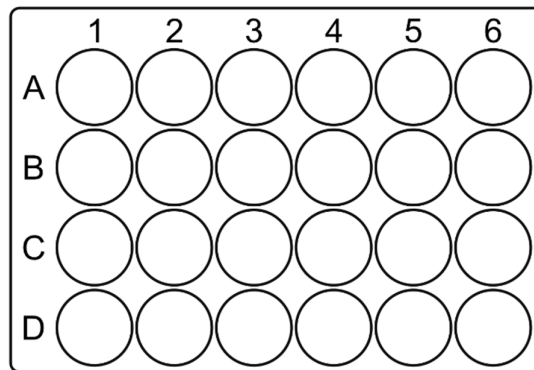


преузето са www.sciencedirect.com

слика 46: метода висеће капи

Поступак рада

На аналитичкој ваги измерено је 14,6 g NaCl и 0,1 g лизозима. Со је затим растворена у 100ml воде, а лизозим у 10 ml воде. Након растварања потребно је направити различите концентрације оба раствора. Што се тиче соли нема потребе правити шест различитих раствора, већ је довољно сипати различите запремине у различите колоне



преузето са www.wikipedia.com

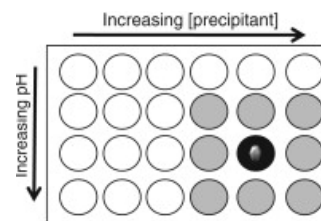
слика 47: плоча са 24 бунарчића

(1, 2, 3, 4, 5, 6 са *слике 47*) плоче са 24 поља, и на крају додати воду до финалне запремине. Лизозим је разблаживан серијски, дакле укупно имамо четири посуднице, прва са раствором лизозимом и три до 5 ml напуњене водом, одмерено је 5 ml из прве па пипетирано у другу, па из друге након пажљивог мешања одмерено 5 ml добијеног раствора и пипетирано у трећу, и на крају одмерено 5 ml из треће и пренето у четврту. На тај начин обезбеђени су раствори концентрација: 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml и 12,5 mg/ml редом. Сада је обезбеђено све што је потребно додати у плочу. У свако од 24 поља пипетирано је по 100 μ l пуфера. Редом од прве колоне до шесте пипетиране су следеће запремине раствора соли: 15,63 μ l, 31,25 μ l, 62,5 μ l, 125 μ l, 250 μ l и 400 μ l. Затим, такође, редом од прве до пете колоне пипетом су додате следеће запремине воде: 384,4 μ l, 368,8 μ l, 337,5 μ l, 275 μ l, 150 μ l, и у шесту није додата вода. На покривно стакло пипетом се мере капљице од по 2,5 μ l раствора који се налазе у бурнарчићима и претходно припремљених раствора лизозима. На стакалце које ће покривати А ред плоче ставља се капљица раствора лизозима концентрације 12,5 mg/ml, у ред В капљица раствора концентрације 25 mg/ml, и у редове С и D капљице раствора концентрације 50 mg/ml и 100 mg/ml редом. Стакалце се ставља изнад придруженог бунарчића из којег је узиман раствор и причвршћује се вазелином да не би дошло до испаравања капљице. Затим, плоча се одлаже како би у њој отпочео природни ток кристализације. Ако смо створили погодне услове за кристализацију лизозима, кристали ће се појавити у току истог дана.

Резултати

Добијени резултати су у оквиру очекиваних, у одређеним бунарчићима се могу видети преципитати и разни кристални облици попут поликристала, друза, нити, јежева, као и кристали одговарајућег хабитуса за методу рендгенске структурне анализе (*слика 48*).

Експериментално добијене кристале посматрамо под микроскопом. Може се уочити да у одређеним капима нема никаквих кристалних облика (*слика 49, слика 50*), док у другим капима имамо различите кристалне облике попут кристала које подсећају на длаку (*слика 52*), нит

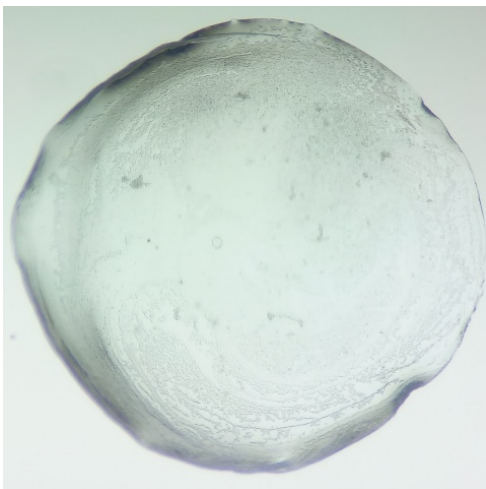


преузето са www.sciencedirect.com

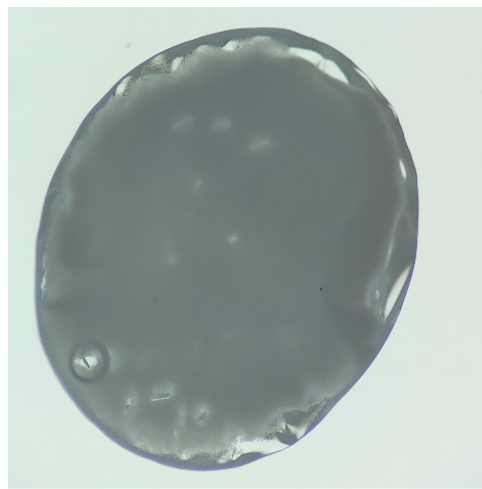
слика 48: приказ очекиваних резултата

(слика 52), штапиће (слика 53), као и срасле кристале (слика 53, слика 55), друзе (слика 53), јежеве (слика 51, слика 56). Добили смо и мноштво кристала који имају сразмерне све три димензије (од слике 54 до слике 60), међу њима и кристале који имају лепо дефинисане пљосни без неправилности.

Оно што је у протеинској кристализацији неопходно утврдити пре било каквих даљих експеримената је да ли се заиста ради о протеинском кристалу или је на пример кристалисала со из раствора сипаног у бунарчиће. Услови за кристализацију лизозима су веома једноставни, за кристализацију већине протеина неопходан је далеко већи број растворених соли, адитива и сл. због чега је велика вероватноћа да преципитат који се формира, или чак сами кристали, буду кристали соли и других у раствор додатих једињења, а не жељеног протеина. Прва провера се заснива на особини протеинских кристала да велики део њихове запремине чини вода, те посматрањем након сипања капљице боје у раствор око кристала често можемо утврдити о којој врсти кристала се ради. Уколико се кристал обоји реч је о протеинском кристалу (слика 58, слика 59, слика 60), уколико се не обоји реч је о неком другом неорганском кристалу. Друга провера се врши благим додиривањем кристала коњском длаком, уколико је кристал мекши, скоро желатинозне структуре реч је о протеинском кристалу, док су кристали соли далеко чвршћи на додир. Обе провере су показале да су кристали које смо добили у овом експерименту заиста кристали лизозима чиме је експеримент успешно завршен, с обзиром на то да међу њима има кристала раније описаних особина, погодних за рендгенску структурну анализу.



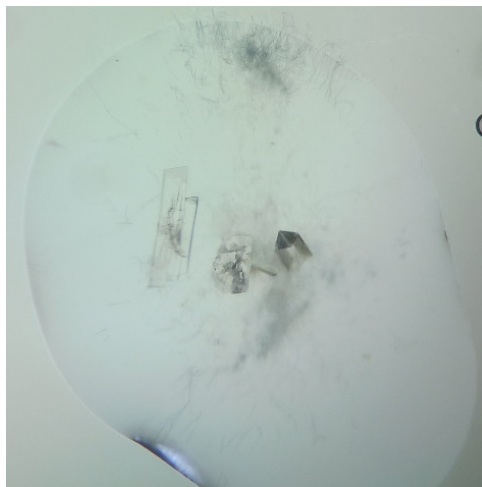
слика 49: нема видљивих кристалних облика



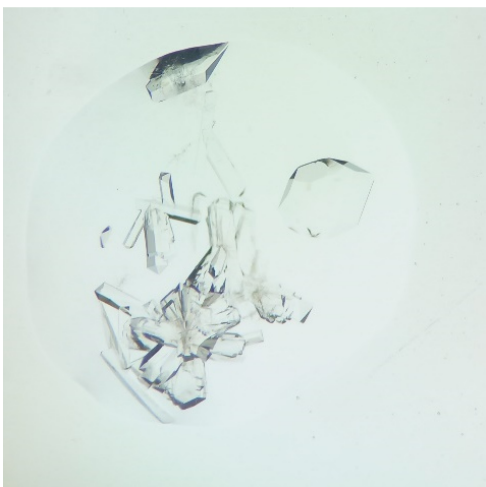
слика 50: преципитат



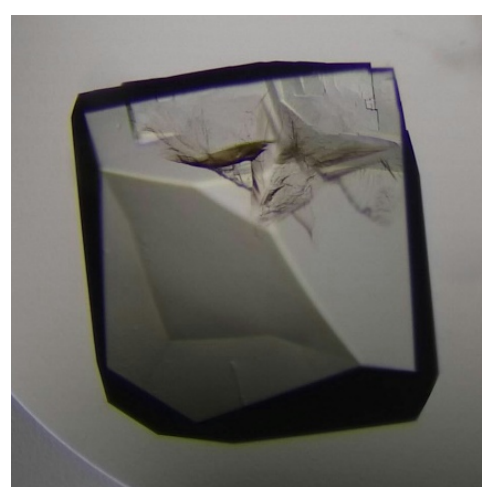
слика 51: кристални облици удружени у облике јежева



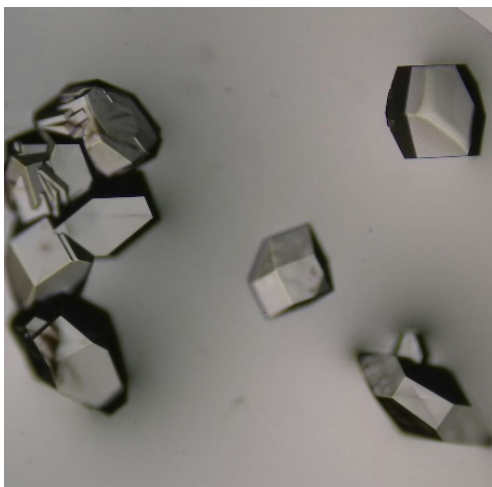
слика 52: кристали који подсећају на нити или длаке на ободу капи



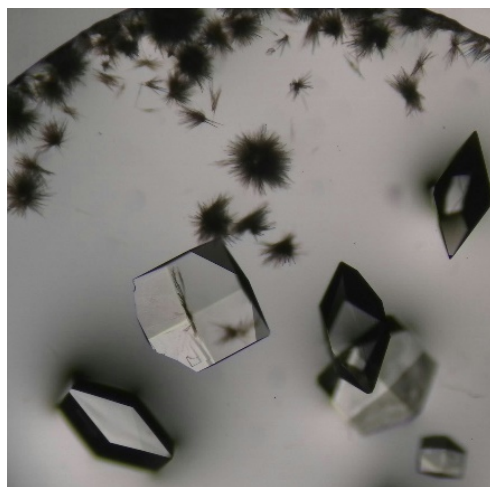
слика 53: кристали правилнијег хабитуса као и кристали друзе



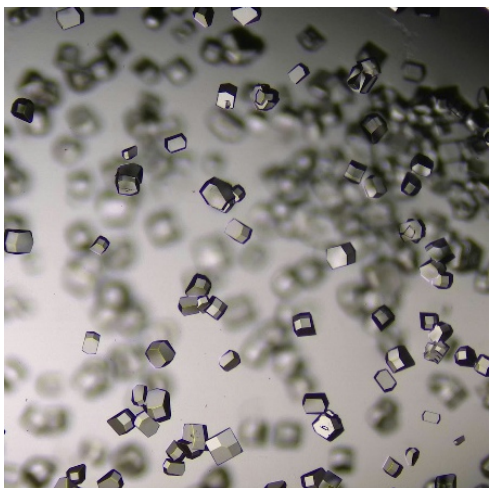
слика 54: први кристал са три сразмерне димензије



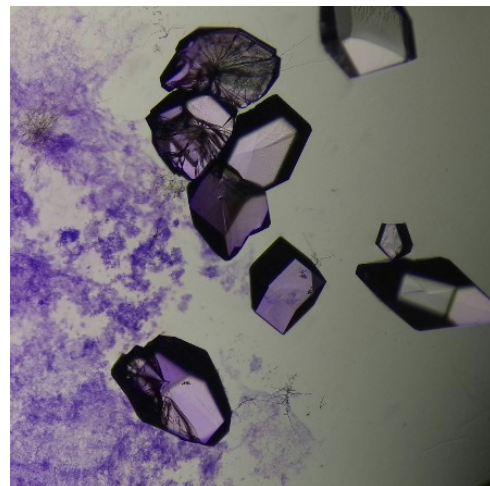
слика 55: кристали различитих
хабитуса



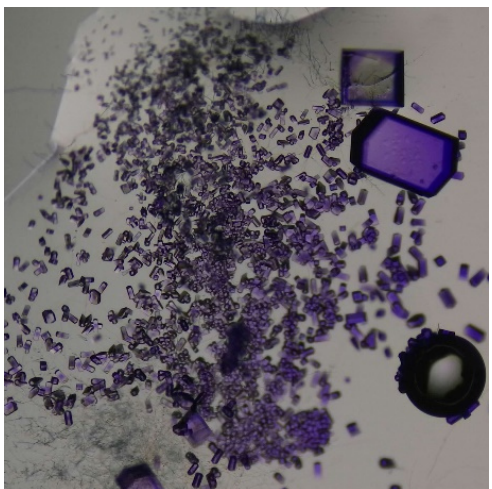
слика 56: кристали разних хабитуса
и на ободу јежеви



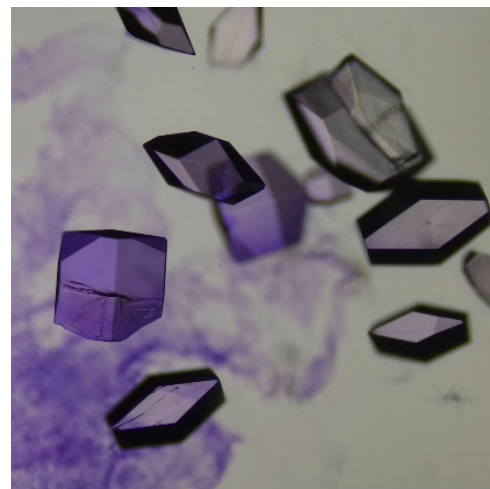
слика 57: кристали различитих
хабитуса мањих димензија



слика 58: обојени кристали са слике
55



слика 59: обојени кристали

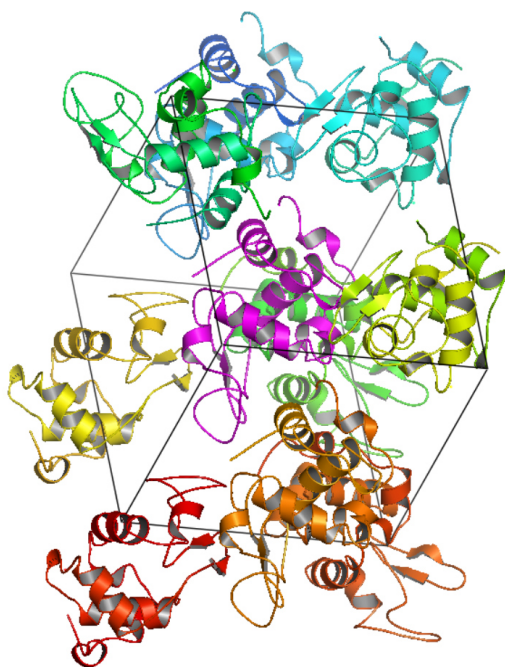


слика 60: обојени кристали

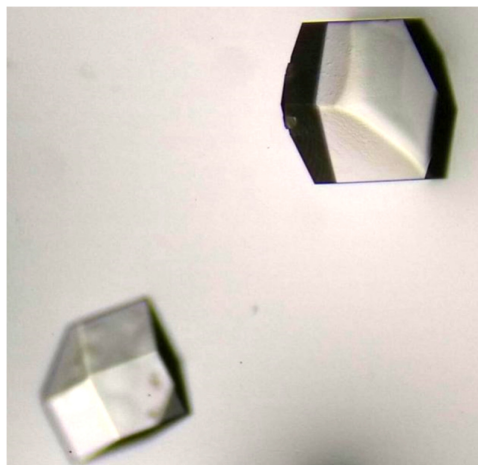
Анализа структуре лизозима

Након добијања дифракционе слике кристала лизозима рендгенском структурном анализом, следећи кораци укључују тумачење ових података да би се одредила структура протеина. О овом поступку било је речи у поглављу Основни преглед постексперименталног дела методе, међутим, остало је још да објаснимо како заиста изгледа модел протеина добијен уз помоћ рачунара.

Анализом морфологије кристала закључено је да кристали припадају углавном тетрагоналној класи (слика 62), чија је структура решена под PDB кодом 193L (www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_0000193l), са резолуцијом 1,33 Å. У Румолу смо анализирали решетку и показали смо асиметричну јединичну ћелију.

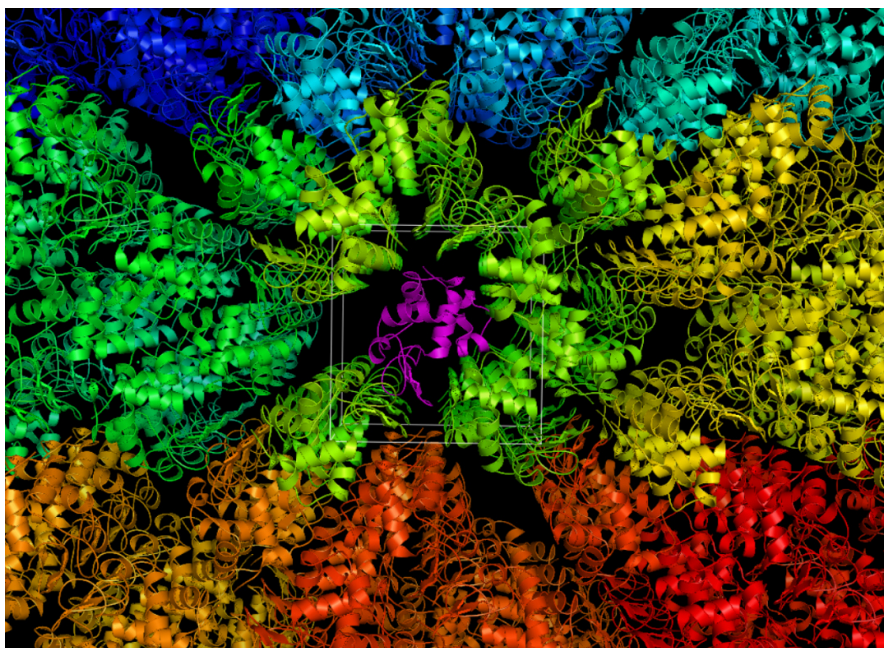


слика 61: PDB 193L: 1.33 Å тетрагонална структура лизозима кокошијег беланцета



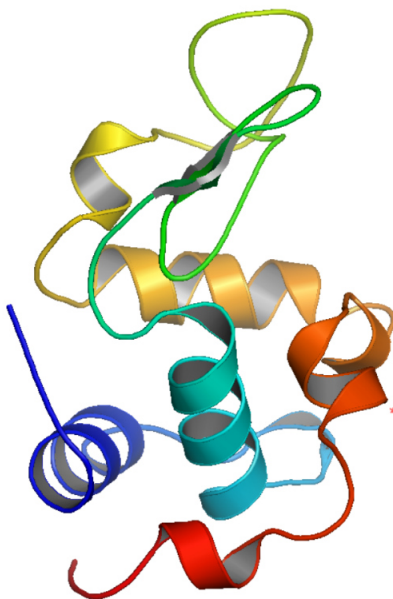
слика 62: кристали тетрагоналне морфологије, увећан део слике 55

Приказана је јединична ћелија (слика 61) и сви мономери лизозима, 5 Å од асиметричне јединице (розе боје), просторне групе $P4_32_12$. Такође приказана је једна јединична ћелија и сви мономери лизозима 100 Å од асиметричне јединице (розе боје) (слика 63). Дужине страница јединичне ћелије a , b и c су редом 78,54 Å, 78,54 Å и 37,77 Å, углови између ових страница су $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$ и $\gamma=90^\circ$. На слици 64 приказан је мономер, односно решена структура лизозима, где се могу видети сви елементи секундарне структуре. N-терминал је приказан плавом бојом, а C-

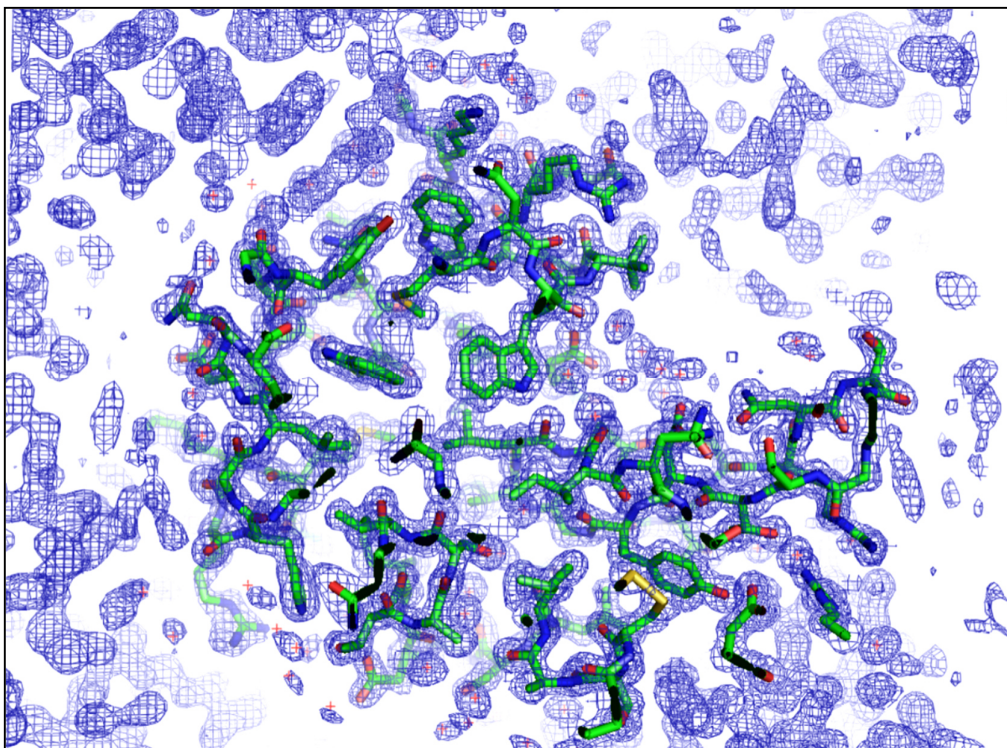


слика 63: PDB 193L: 1.33 Å тетрагонална структура лизозима кокошијег беланцета

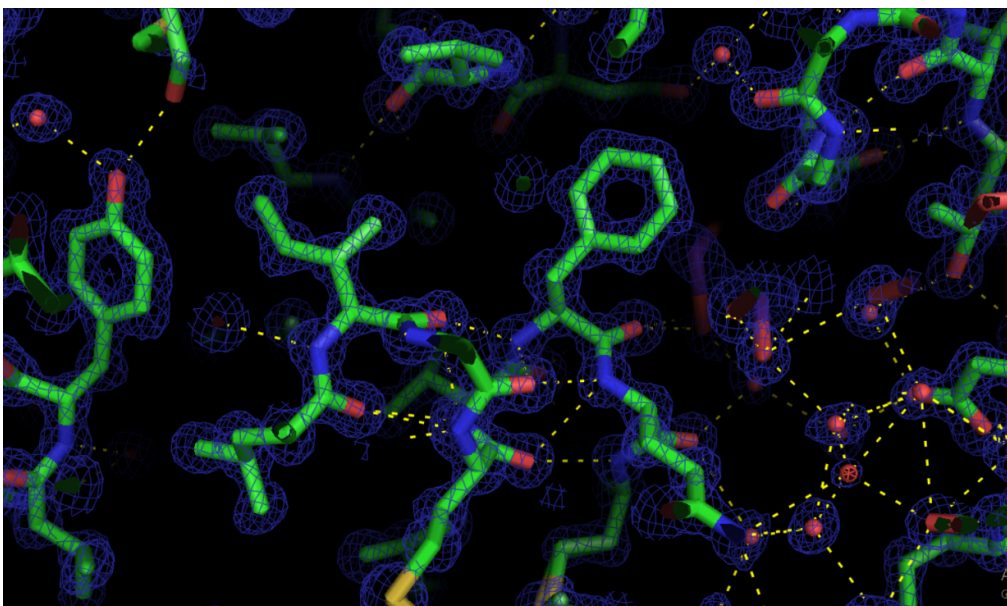
терминал црвеном. Можемо закључити да је протеин глобуларан, изграђен махом од α -хеликса (жута, наранџаста, светло плава, плава, црвена на слици 64) и флексибилних петљи, као и од једне β -набране плочице (зелена на слици 64). На слици 65 је мапа електронске густине за једну јединичну ћелију са контурама израчунатим на 1 сигма, модел је приказан штапићима. На слици 66 је увећан део структуре који приказује атомску резолуцију, водоничне везе и међумолекулске интеракције између воде и протеина.



слика 64: мономер лизозима са елементима секундарне структуре



слика 65: мапа електронске густине лизозима



слика 66: атомска резолуција структуре лизозима

Закључак

На самом крају, може се истаћи значај описане методе. Рендгенска структурна анализа протеинских кристала представља услов за напредак у нашем разумевању структуре протеина, а познавање структуре је од круцијалног значаја за различите области. Омогућавањем одређивања тродимензионалне структуре протеина, ова метода нам пружа увид у механизме функционисања протеина у метаболичким процесима. Познавање ових механизма је важно за напредак како у базичној науци тако и у областима као што су клиничка медицина и фармација.

Конкретно анализа лизозима, протеина са добро документованим антимикробним својствима, чија је улога, а самим тим и значај наведен у ранијим поглављима, наглашава значај ове методе. Детаљне информације о структури добијене рендгенском кристалографијом нису само продубиле наше разумевање каталитичких механизма лизозима, већ су такође показале шири потенцијал ове технике у истраживању других протеина са важном биолошком улогом.

Могућност истраживања протеина у њиховом кристалном облику повећава наш капацитет да се позабавимо сложеним биолошким питањима и развијемо нове терапијске стратегије. Ово истраживање наглашава незаменљиву улогу кристалографије у структурној биологији, и улогу структурне биологије у унапређењу здравља и медицине, показујући утицај који детаљна анализа структуре протеина може имати на научни напредак и практичне примене.

Литература:

1. *B. Alberts et al. Molecular Biology of the Cell 6th edition*
2. *Vesna Niketić, Principi strukture i aktivnosti proteina, Hemijski fakultet, Beograd 1995*
3. *Ljiljana Karanović, Dejan Poleti: Rendgenska strukturna analiza, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd 2003.*
4. *William Clegg, X-Ray Crystallography Made Crystal Clear, 3rd edition: A Guide for Users of Macromolecular Models*
5. *Olivera Klisurić, „Vodonične veze, struktura i biofizički aspekti mehanizma aktivnosti steroidnih hormona – androgena i antiandrogena“, doktorska disertacija, 2007.*
6. *M. C. Vaney, S. Maignan, M. Reis-Kautt and A. Ducruix: Tetragonal HEW Lysozyme*

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Diplomski rad

VR

Autor:

Maja Mirković

AU

Mentor:

Anđelka Ćelić

MN

Naslov rada:

Rendgenska analiza proteina: kristalizacija i analiza strukture lizozima

NR

Jezik publikacije:

srpski (ćirilica)

JP

Jezik izvoda:

srpski/engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2024

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad

MA

Fizički opis rada:

FO

Naučna oblast:

Fizika

NO

Naučna disciplina:

ND

Predmetna odrednica/ ključne reči:

PO

UDK

Čuva se:

Biblioteka departmana za fiziku, PMF-a u Novom Sadu

ČU

Važna napomena:

nema

VN

Izvod:

IZ

Datum prihvatanja teme od NN veća:

DP

Datum odbrane:

17.9.2024.

DO

Članovi komisije:

KO

Predsjednik:

Prof. dr Anđelka Čelić

član:

Prof. dr Olivera Klisurić

član:

Prof. dr Maja Stojanović

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph publication

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Content code:

Final paper

CC

Author:

Maja Mirković

AU

Mentor/comentor:

Anđelka Čelić

MN

Title:

X-ray analysis of protein: crystallization and structure analysis of lysozyme

TI

Language of text:

Serbian (Cyrillic)

LT

Language of abstract:

English

LA

Country of publication:

Serbia and Montenegro

CP

Locality of publication:

Vojvodina

LP

Publication year:

2024

PY

Publisher:

Author's reprint

PU

Publication place:

Faculty of Science and Mathematics, Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad

PP

Physical description:

5/182/32/0/71/0/3

PD

Scientific field:

physics

SF

Scientific discipline:

SD

Subject/ Key words:

SKW

UC

Holding data:

Library of Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4

HD

Note:

none

N

Abstract:

AB

Accepted by the Scientific Board:

ASB

Defended on:

17.9.2024.

DE

Thesis defend board:

DB

President:

Prof. dr Anđelka Čelić

Member:
Member:

Prof. dr Olivera Klisurić
Prof. dr Maja Stojanović