

Struktur studier av vatten kanalen SoPIP2;1 från Spinach.

Introduktion

Syfte för studier av denna jon kanal i detta master projek var att studera kristaller från så kallade membran protein aquaporin SoPIP2;1 och sedan bestämma dess molekylära struktur till en hög upplösning. Detta kan sedan utnyttjas i vidare forskning för just detta proteinet.

Metoder och Resultat

Protein som studerades kommer från Spinach. Detta protein överproducerades i jäst celler av *Pichia Pastoris*. Fermentering är namn på metoden som används för att överproducera det sökta proteinet i jäst celler. Efter fermenterings processen en del av celler lyserades eller bröts upp med hjälp av så kallad Bead Beating metoden. Detta handlar om att celler med den sökta proteinet skakas drastisk i en buffert lösning som så kallade glass beads tillsätts till. Dessa glass beads slår sönder cellerna. När cellerna slås sönder eller lyseras så använder man en metod att spinna ner det lyserade cell innehållet. Cell membraner flyter runt i lösning vid låg centrifugerings hastighet och det som är på botten är cell organeller och allt annat cell innehåll. Nästa steg i denna framreningen av detta membran protein var att tvätta bort detta cell membran lösning med UREA samt NaOH lösningar. Detta metoden gjordes i hög hastighets centrifugering och det nämns till ultracentrifugering.

För att sedan få det sökta proteinet i ren form så gjordes två framrenings steg. Dessa heter Jon bytes kromatografi samt gel filtrerings kromatografi. Det första metoden separerar proteiner med hjälp av dess laddnings skillnad och den andra metoden hjälper och separera proteiner med hjälp av dess storlek skillnad.

Det rena proteinet användes sedan till en så kallad Lipidic cubic phase (LCP) krystaliserings experiment. Detta experimentet teoretisk skulle ge möjlighet till protein kristaller. Den metoden baseras på att cell membranet som saknas när proteinet framrenas på ett sätt återskapas i denna LCP metoden. Detta återskapande görs med hjälp av en typ av lipid moleky. När kristaller har producerats så studeras dessa med hjälp av så kallade X-ray diffraktion experiment som utförs i en så kallad synchrotron. En ny synchrotron laboratorie byggdes nyligen i lund och heter Max IV.

Resultatet av denna master projekt visade tyvärr att dessa var inga protein kristaller utan salt kristaller när dessa har testats i en synchrotron i Hamburg. I slutet av denna master arbete Calcium bindning till ovan nämnda proteinet gjordes.

Diskussion

LCP metoden är i utvecklingsstadiet och mängder av lösningar som används för denna metoden är mycket små. Fel källor är många i denna metoden och kräver till exempel en krystaliserings robot för att sätta upp själva krystaliserings experimentet på en specifik platta. Vid brist av tid kunde inte denna metoden studeras utförligt men i framtiden kan LCP vara en metod som kommer hjälpa att producera kristaller för respektive membran protein; om metoden utvecklas utförligt av forskare.

Student: Adam Kranas

Examinator: Susanna Törnroth-Horsenfield

Universitet och Avdelning: Lunds Universitet, Centrum för Molekylär Protein Vetenskap. Januari 2017.

