

بررسی نقش برخی از آمینواسیدهای حفره اتصال کلترازین در فتوپروتئین نمپوسین در مقایسه با فتوپروتئین‌های کیسه‌تان

زهره جهانی¹، مریم ملاکریمی²، رضا حسن ساجدی^{3*}، مجید تقدیر⁴، سامان حسینخانی⁵،
سید محسن اصغری⁶

- 1- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
- 2- دانشجوی دکترای بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 4- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 5- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس
- 6- استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

* تهران، صندوق پستی 154-14115
sajedi_r@modares.ac.ir

چکیده- نمپوسین از شانه‌دار نمپوسینس لیدی از فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم بوده که همچون فتوپروتئین‌های متعلق به خانواده کیسه‌تان در واکنش با کلترازین نور آبی را به صورت فلش ساطع می‌کند. تاکنون، بیشترین بررسی‌ها روی فتوپروتئین‌های خانواده کیسه‌تان انجام شده است و اطلاعات اندکی در مورد مکانیسم فتوپروتئین‌های شانه‌داران و جایگاه اتصال به کلترازین آنها وجود دارد. در این تحقیق، سه آمینواسید مهم درگیر در حفره اتصال به کلترازین نمپوسین توسط باقیمانده‌های متناظر با فتوپروتئین‌های بسیار شناخته شده از خانواده کیسه‌تان جایگزین گردید. بدین منظور جهش‌های W59K، N105W و L127W با در نظر گرفتن شبکه پیوند هیدروژنی در اطراف حلقه‌های مهم کلترازین انجام شد. جهش‌یافته‌ها هیچ‌گونه فعالیتی از خود نشان ندادند. اسپکتروسکوپی CD و فلورسانس و مدل‌سازی ملکولی نشان داد که تغییرات ساختاری در جهش‌یافته‌ها به ویژه N105W و L127W نسبت به فرم وحشی محسوس است. عدم فعالیت در این جهش‌یافته‌ها دلیلی بر وجود این آمینواسیدها در حفره اتصال یا نقش‌شان در مکانیسم عمل است. به نظر می‌رسد چینش آمینواسیدها در حفره اتصال به کلترازین مربوط به دو خانواده کیسه‌تان و شانه‌داران نسبت به هم متفاوت می‌باشد طوری که جایگزینی این آمینواسیدها با آمینواسیدهای متناظرشان از خانواده دیگر (مانند جهش‌های این تحقیق) یکپارچگی مورد نیاز جهت عملکرد بیولومینسانسی آن را از بین برده و چنان تغییرات ساختاری را منجر می‌شود که باعث غیرفعال شدن این پروتئین می‌شود.

کلیدواژگان: جهش‌زایی هدف‌دار، فتوپروتئین، نمپوسین، اکورین، کلترازین.

1- مقدمه

بیولومینسانس، یکی از مباحث جالب زیستی است که با توسعه تحقیقات و کاربردهای تجزیه‌ای آن در مطالعات داخل سلولی¹ و خارج سلولی² در زمینه فرایندهای زیستی مانند بیان ژن‌ها و میانکشی پروتئین-پروتئین و بالینی روز به روز بارزتر می‌شود. پروتئین‌های با فعالیت بیولومینسانسی ابزارهای ارزشمند با کاربردهای فراوان می‌باشند و تحقیقات مولکولی به منظور بهینه کردن خصوصیات نشر نوری همچون طول موج نشری، نیمه عمر و خصوصیات فیزیکی همچون فعالیت، پایداری، نفوذپذیری سلولی و تمایل به رسوب به طور متعدد انجام می‌شود [1]. از میان فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم، اکورین و اوبلین متعلق به خانواده کیسه‌تان³ بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند [2,3]. فرایند نشر نور در این پروتئین‌ها به این صورت است که با اتصال یون‌های کلسیم، به همراه تغییر کنفورماسیون پیوند محکم اکسیژن-کلترازین به صورت اکسیداتیو دکربوکسیله می‌شود و سپس کلترازین به فرم کلتراکید که محصول سطح برانگیخته‌است، تبدیل می‌شود. برگشت از این حالت برانگیخته برای اوبلین و اکورین همراه با نشر نور به ترتیب در طول موج‌های 491 و 469 نانومتر است [4,5]. این فتوپروتئین‌ها شامل سه جایگاه اتصال به کلسیم و یک پاکت آب‌گریز 600 انگسترومی می‌باشند که کروموفور کلترازین به طور محکم ولی نه به صورت کووالانسی به این پاکت متصل می‌شود [6,7]. علاوه بر پروتئین‌های خانواده کیسه‌تان، فتوپروتئین‌های گروه شانه‌داران⁴ نظیر برووین، بولینوپسین و نمیوپسین نیز در حال بررسی هستند [8,9]. از این خانواده ساختار کریستالوگرافی برووین مشخص شده و تا حدودی از نظر ساختاری مورد

مطالعه قرار گرفته است ولی مکانیسم آن تعیین نشده است [10]. فتوپروتئین نمیوپسین در سال 1974 توسط Ward و Seliger از شانه‌دار گونه نمیوپسین لیدی⁵ تخلیص شد [11] و با جهش‌هایی که تاکنون بر روی آن صورت گرفته‌است، برخی از آمینواسیدهای کلیدی درگیر در فعالیت بیولومینسانسی آن تعیین شده است [12]. با اینکه تشابه⁶ توالی این دو گروه از فتوپروتئین‌ها پایین است، ولی تشابه ساختاری بالایی را با هم نشان می‌دهند [13]. در خانواده کیسه‌تان، 21 آمینواسید درون پاکت آب‌گریزی قرار دارد که با کلترازین میانکشی دارند [6]. جهش‌هایی که بر روی این آمینواسیدها صورت گرفته‌است، منجر به تغییرات چشم گیر در خصوصیات نشر نوری شده است [14]. از این تعداد فقط 4 آمینواسید در جایگاه فعال خانواده شانه‌داران حفظ شده است [13]. هدف از این تحقیق بررسی نقش برخی از آمینواسیدهای کلیدی حفره اتصال به کلترازین در فتوپروتئین نمیوپسین در مقایسه با کیسه‌تان است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

مارکرهای وزن مولکولی DNA (#SM0313) و پروتئین (#SM0431) از شرکت Fermentas (لیتوانی)، کانامایسین، IPTG، نوکلئوتیدها و آگارز از شرکت Invitrogen (آمریکا)، نیکل آگارز (Ni-NTA) از شرکت Qiagen (Hilden, Germany)، HEPES از شرکت Sigma (آمریکا)، *cp-coelenterazine* از شرکت Resem (هلند)، آنزیم Taq DNA Polymerase از شرکت Roche (آلمان)، آنزیم‌های *Pfu*، *DpnI*، کیت استخراج پلاسمید و کیت تخلیص محصول PCR از شرکت Bioneer (انگلیس) خریداری شد. مواد استفاده

1. *In vivo*
2. *In vitro*
3. Coelentrates
4. Ctenophores

5. *Mnemiopsis leidyi*

6. homology

شده برای تهیه ژل پلی اکریل آمید و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد.

2-2- جهش‌زایی هدف‌دار

در این تحقیق، حامل pET28a حاوی ژن کد کننده نمیوپسین 1 که در تحقیق قبلی تهیه شده بود و *E. coli* سویه BL21(DE3) برای بیان پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت [13]. جهش‌زایی به روش Quick-change انجام شد به صورتی که غیرطبیعی شدن¹ اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، دوره‌های دمایی (22 دور) شامل: غیرطبیعی شدن در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، چسبیدن پرایمرها به تک رشته‌ها در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و طولیل شدن رشته‌ها در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 13 دقیقه و توسعه نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه انجام گرفت. سپس محصول تکثیر با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز خالص شد و با افزودن *DpnI* (5) واحد آنزیم به ازای 50 میکرولیتر محصول تکثیر) و تیمار به مدت 12 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد هضم آنزیمی پلاسمید حاوی ژن وحشی و انتقال پلاسمید به سلول *E. coli* سویه BL21(DE3) با استفاده از روش شیمیایی انجام شد [15].

2-3- بیان و تخلیص نمیوپسین‌های طبیعی و جهش‌یافته

باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب بیانی به 5 میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین 30 میکروگرم در میلی‌لیتر تلقیح و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و با هوادهی مطلوب به مدت 12-14 ساعت انکوبه شد. سپس 2 میلی‌لیتر باکتری رشد کرده به 200 میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین انتقال و تا افزایش

OD₆₀₀ به حدود 0/6 در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این مرحله با افزودن IPTG با غلظت نهایی 1 میلی‌مولار، محیط کشت 5 ساعت در دمای 26 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اتمام بیان، سوسپانسیون باکتری‌های القا شده به مدت 20 دقیقه در 5000 rpm و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن بافر لیز کننده به حالت سوسپانسیون درآمد و تحت سونیکاسیون قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ سلول‌های لیز شده مایع رویی جهت آنالیز بیان ژن بر روی ژل اکریلامید برده شد و کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز برای تخلیص پروتئین مورد استفاده قرار گرفت [16]. برای انجام آزمایش‌های بعدی، نمونه‌ها در بافر تریس 50 mM با 9/0 pH حاوی 10 میلی‌مولار EDTA، 150 mM NaCl، 150 میلی‌مولار آمونیوم سولفات 0/8 میلی‌مولار و گلیسرول 10% دیالیز شدند. همچنین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [17] و SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید 12% در شرایط احیایی و براساس روش لاملی انجام شد [18].

2-4- تهیه نمیوپسین سمی سنتتیک و تعیین فعالیت بیولوژیکی آن

بسته به غلظت نمیوپسین تخلیص شده، حجم مناسبی از آن به همراه 8 میکرولیتر کلنترازین 150 میکرومولار در بافر تریس 50 میلی‌مولار حاوی 10 میلی‌مولار EDTA با pH 9/0 به حجم نهایی 150 میکرولیتر رسانده شد و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت 16 ساعت انکوبه شد [19]. با افزودن 50 میکرولیتر کلرید کلسیم 40 میلی‌مولار در بافر تریس 50 میلی‌مولار با pH 9/0 به 10 میکرولیتر از مخلوط فوق که با بافر تریس به حجم 50 میکرولیتر رسیده است، شدت لومینسانس اولیه با دستگاه بیولومینومتر اندازه‌گیری شد.

1. Denaturate

2-5- دورنگ نمایی دورانی¹

طیف CD برای بررسی ساختارهای دوم نمپوسین طبیعی و سه جهش یافته W59K، N105W و L127W با غلظت 0/2 mg/ml در بافر تریس 50 میلی مولار حاوی 5 میلی-مولار NaCl، pH 9/0 توسط دستگاه اسپکتروپولاریومتر JASCO J-715 ثبت گردید و با نرم افزار مربوطه بدون تغییر در شکل کلی طیف صاف شد. نتایج به صورت بیضی واری مولی $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) و بر اساس میانگین وزنی آمینواسیدهای نمپوسین (MRW) تعیین شد. بیضی واری مولی به صورت $[\theta] = (\theta \times 100 \text{MRW}) / (cl)$ محاسبه گردید، به طوری که c غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، l طول مسیر نور و θ بیضی واری اندازه گیری شده در دامنه طول موجی UV دور می باشد. نرم افزار JASCO مدل 1.10.02 برای تخمین ساختار دوم برای محاسبه میزان درصد هلیکس به کار گرفته شد [20].

2-6- اسپکتروسکوپی فلورسانس

فلورسانس ذاتی نمپوسین در بافر تریس 50 میلی مولار حاوی 5 میلی مولار NaCl، pH 9/0 مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت نهایی پروتئین در این مطالعه 0/01 mg/ml بود. نمونه ها با طول موج 295 نانومتر برانگیخته شد و نشر آنها بین طول موج های 300-400 نانومتر ثبت شد. در ضمن پهنای باند نور جذبی و نشری 10 بود و آزمایش ها در دمای 25°C انجام شد.

برای بررسی فلورسانس خارجی، از فلوروفور 8-آنیلینو نفتالن-1-سولفونات² استفاده شد. فلورسانس خارجی نمپوسین طبیعی و جهش یافته ها نیز مشابه با شرایط بالا مورد بررسی قرار گرفت. غلظت نهایی ANS در محلول پروتئینی 30 میکرومولار بود و نمونه ها با طول موج 350

نانومتر برانگیخته و نشر آنها بین طول موج های 400-700 نانومتر ثبت شد.

2-7- روش های محاسباتی**2-7-1- مدل سازی مقایسه ای**

مدل ساختار سوم نمپوسین با استفاده از برنامه MODELLER.9V2 بر اساس ساختار x-ray برووین با PDB code: 2HPK، که 88/5% با نمپوسین در توالی همسان است، ساخته شد [21]. در فرایند مدل سازی، برووین به عنوان الگوی اصلی و اکورین PDB code: 1EJ3 برای جاگذاری کلترازین در ساختار استفاده شد. با استفاده از این برنامه ده مدل اولیه برای پروتئین طبیعی و جهش یافته ها ساخته شد [21]. از بین مدل های ساخته شده، بهترین مدل براساس فاکتورهای ProCheck، Errat، Verify 3D و PSQS برای مطالعه مقایسه ای با الگو مورد استفاده قرار گرفت. برنامه ProCheck کیفیت استروشیمی ساختار پروتئین را از طریق آنالیز ژئومتری باقیمانده-باقیمانده و ژئومتری کلی ساختار را نشان می دهد، برنامه Errat به آنالیز آماری میانکشی های بین انواع اتم های مختلف می پردازد، برنامه Verify 3D سازگاری مدل اتمی (3D) با توالی آمینواسیدی مربوطه (1D) را بر اساس موقعیت و محیط تعیین می کند و نتایج را با یک ساختار مناسب مقایسه می کند و برنامه PSQS محاسبه انرژی کیفی ساختار پروتئین می باشد. پارامترهای ساختاری نظیر تعداد پیوندهای هیدروژنی و پل نمکی به کمک وب سایت IF WHAT (<http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>) بررسی شدند [22]. از برنامه Chimera برای نمایش و مقایسه مدل های ساخته شده استفاده گردید [23]. برنامه BLAST P برای انجام مطالعات درصد تشابه به کار گرفته شد [24]. توالی های آمینواسیدی فتوپروتئین ها از پایگاه های اطلاعاتی EMBL/GenBank [25] و Swiss-Prot [26] گرفته شد. مقایسه توالی چندگانه فتوپروتئین ها

1. Circular Dichroism

2. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate

با استفاده برنامه CLUSTAL W انجام گرفت [27].

3- یافته‌ها

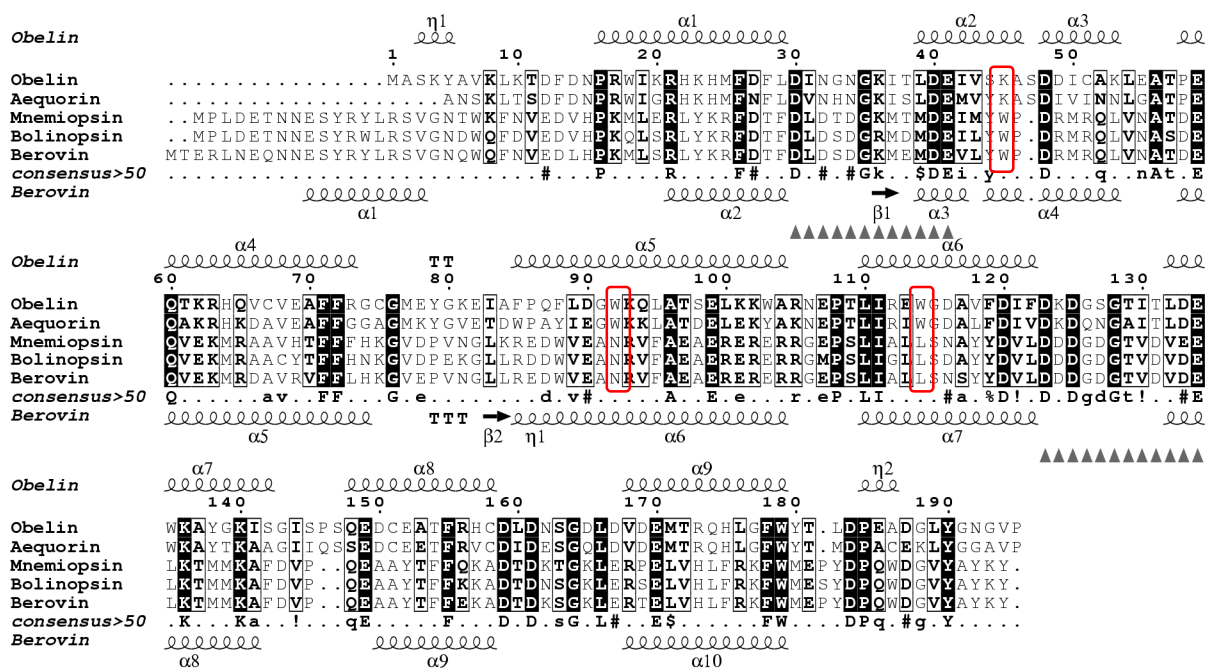
3-1- طراحی و ایجاد جهش، بیان و تخلیص پروتئین

در این مطالعه، پروتئین‌های جهش‌یافته نمپوسین با جهش در موقعیت‌های 59 (W59K)، 105 (N105W) و 127 (L127W) طراحی شدند. با توجه به کمبود اطلاعات ساختاری و جهش‌زایی در فتوپروتئین‌های شانه‌داران، انتخاب جایگاه‌های جهش بعد از بررسی دقیق جایگاه‌های اتصال به کلنترازین فتوپروتئین‌های کیسه‌تانه همانند اکورین و اولین و مطالعه جهش‌های قبلی در این خانواده و مقایسه توالی این دو گروه انجام گرفت (شکل 1). بعد از استخراج پلاسمید حاوی ژن نمپوسین 1 وحشی به منظور استفاده از این حامل به عنوان قطعه الگو،

جهش‌زایی هدف‌دار انجام و به منظور تایید جهش‌ها، توالی‌یابی انجام شد. نتایج توالی‌یابی تایید کننده جهش‌های مورد نظر بود. پروتئین‌ها به روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل با موفقیت و با خلوص بالا تخلیص شدند (شکل 2).

3-2- تعیین فعالیت پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته

به منظور سنجش فعالیت بیولومینسانسی، محلول کلرید کلسیم 40 میلی مولار به پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته انکوبه شده با کلنترازین اضافه و فعالیت اولیه آنها اندازه‌گیری شد (جدول 1). نتایج نشان داد که جهش‌های W59K، N105W و L127W پروتئین را تقریباً به طور کامل غیرفعال کرده‌اند.



شکل 1 تطبیق توالی‌های¹ فتوپروتئین‌های دو گروه شانه‌داران و کیسه‌تانه که با استفاده از برنامه ESPript2.2 نمایش داده شده‌است. در شکل لوپ‌های اتصال کلسیم با علامت مثلث توپر، هلیکس‌ها با α ، صفحات بتا با β ، مارپیچ با 3_{10} و η ، دورها با T و EF-hand های II.I و III نشان داده شده‌اند. محل جهش‌ها با کادر قرمز نمایان شده است. موقعیت ساختارهای دوم بر اساس اولین با PDB code: 2F8P و بروین با PDB code: 2HPK به عنوان الگوی ساختاری استفاده شده است و شماره آمینواسیدها بر اساس اولین می‌باشد.

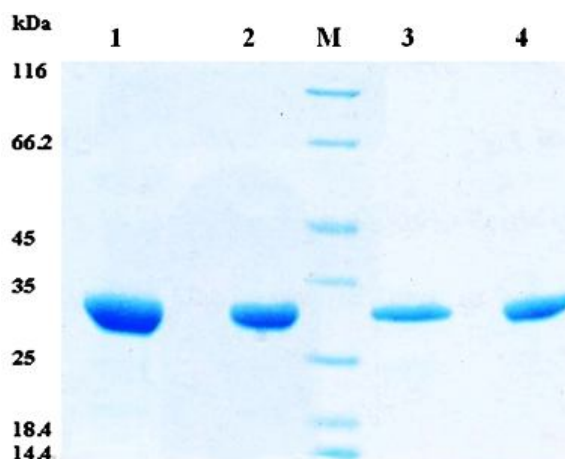
آلفا-هلیکس و فشردگی کمتر آن شده‌اند. کاهش شدت طیف‌های مربوطه برای جهش‌یافته‌های W59K نسبت به نمپوسین طبیعی نیز مشاهده شد، اما این کاهش نسبت به دو جهش دیگر کمتر بود.

4-3- فلورسانس ذاتی

برای بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئین‌ها از تکنیک فلورسانس استفاده شد. شکل 3- ب مربوط به طیف نثری فلورسانس ذاتی نمپوسین طبیعی و سه جهش‌یافته می‌باشد که با طول موج 295 nm برانگیخته شد. نتایج نشان داد که در جهش‌یافته‌های N105W و L127W خصوصاً N105W شدت فلورسانس ذاتی نسبت به نمپوسین طبیعی بسیار کاهش یافته است، که بیانگر تغییرات ساختاری شدید در آن‌ها است. اما در جهش‌یافته W59K، کاهش شدت فلورسانس و در نتیجه تغییرات در سطح ساختار سوم خیلی محسوس نیست.

5-3- بررسی طیف فلورسانس خارجی

برای بررسی دقیق‌تر تغییرات ساختاری، از فلورسانس خارجی با استفاده از فلوئوفور ANS استفاده شد. با توجه به شکل 3- ج، شدت فلورسانس خارجی جهش‌یافته‌های W59K، N105W و L127W نسبت به فتوپروتئین طبیعی کاهش یافته است. پس می‌توان نتیجه گرفت که ساختار این جهش‌یافته‌ها فشرده‌تر و نواحی هیدروفوب پوشیده‌تر شده‌اند.



شکل 2 SDS-PAGE مربوط به تخلیص فتوپروتئین نمپوسین وحشی و سه جهش‌یافته آن: مارکر وزن مولکولی پروتئین برحسب کیلودالتون (M)؛ نمپوسین وحشی (1)؛ Trp59Lys (2)؛ Leu127Trp (3) و Asn105Trp (4).

جدول 1 فعالیت ویژه نمپوسین طبیعی و جهش‌یافته‌های آن

Mnemiopsin	Specific activity (RLU/sec.mg protein)	Activity (%)
Wild type	23912118	100
W59K	54138	0/2
N105W	10000	0/04
L127W	28500	0/1

3-3- دو رنگ نمایی دورانی (CD)

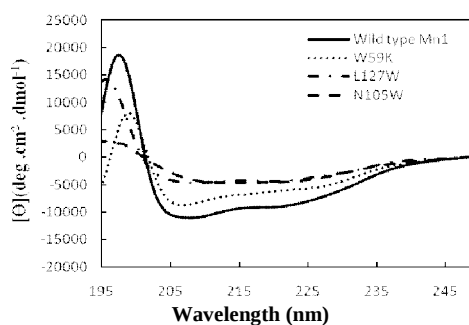
ساختار دوم نمپوسین وحشی و سه جهش‌یافته آن با استفاده از اسپکتروسکوپی CD در ناحیه دور UV ارزیابی شد که نتایج آن در شکل 3- الف آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود جهش‌یافته‌های L127W و N105W تغییرات ساختاری محسوسی را در ساختار دوم پروتئین ایجاد کرده‌اند و منجر به کاهش شدید ساختار

جدول 2 مقایسه تعداد پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی نمپوسین طبیعی و جهش‌یافته‌های آن

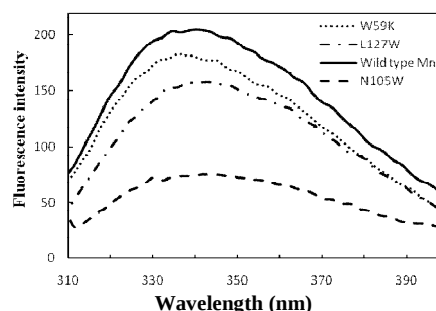
	Wilde type /W59K	Wilde type /L127W	Wilde type /N105W
Hydrogen Bonds			
Mutated Residue	2/3	3/3	5/2
Ligand-Protein	5/5	5/6	5/5
Total	221/237	221/242	221/235
Total Salt Bridges	143/147	143/142	143/152

4- بحث

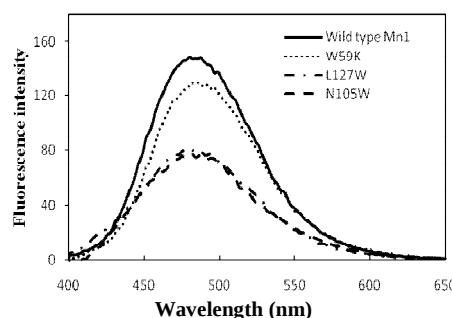
برای انتخاب جایگاه‌های جهش، ابتدا جهش‌هایی که روی فتوپروتئین‌های اکورین و اوپلین صورت گرفته بود، مطالعه گردید. در یک مطالعه، جهش‌یافته‌های اکورین با جهش در آمینواسیدهای Trp108، Phe113 و Tyr132 ایجاد شدند [14]. این آمینواسیدها بعد از بررسی دقیق جایگاه فعال ساختار کریستالی اکورین و مطالعه کارهای قبلی که توسط محققان دیگر انجام شده بود برای جهش انتخاب شده بودند [6]. نتایج نشانگر این بود که بیشتر جهش‌هایی که تغییرات چشم‌گیر را موجب شده‌اند، در اطراف حلقه 1 در موقعیت کربن 6 قرار دارند. این حلقه توسط پیوندهای هیدروژنی که تریاد کاتالیک His16، Tyr82 و Trp86 در این ناحیه ایجاد کرده است، پایدار می‌شود. هر جهشی که این آمینواسیدها را درگیر کند، تغییر در خصوصیات نشر نوری را موجب می‌شود و این‌گونه استنباط می‌شود که پیوندهای هیدروژنی این گروه یکی از مهم‌ترین میانکنش‌هایی است که حلقه 1 کلترازین را تثبیت و مسئول خصوصیات نشری است. این آمینواسیدها مسئول پایداری حلقه اول کلترازین هستند و می‌توان در نظر گرفت که آنها مسئول سرعت نشر بیولومینسانس هستند [14]. در فتوپروتئین اوپلین در موقعیت تریاد Trp92 قرار دارد که متناظر با Trp86 در اکورین است. جهش‌یافته اوپلین Trp92Phe علاوه بر باند معمول خود در 485 نانومتر باند دوم شدیدی در 410 نانومتر داراست. محققان دلیل این جابه‌جایی نوری را نتیجه برداشت پیوند هیدروژنی می‌دانند که بین ایندول Trp92 با گروه هیدروکسیل 6- فنیل کلترازین برقرار می‌شود. عدم تشکیل این پیوند از طریق سیستم پیوندی کوئزوگه در حالت برانگیخته کلترامید بر پیوند هیدروژنی بین موقعیت N1 و Tyr138 اثر می‌گذارد و گونه یونی II کلترامید ایجاد می‌شود. مطالعات فلورسانس کلترامید و آنالوگ‌های آن نشان داده



الف - طیف‌های CD ناحیه دور UV



ب - طیف‌های فلورسانس ذاتی



ج - طیف‌های فلورسانس ANS

شکل 3 مطالعات اسپکتروسکوپی نیوپسین وحشی و جهش‌یافته‌های Trp59Lys، Trp127Leu و Trp105Asn.

3-6- بررسی پیوند هیدروژنی و پل نمکی

برای بررسی تغییرات ساختاری علاوه بر موارد ذکر شده، تعداد پیوندهای هیدروژنی کل ساختار، تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با لیگاند و تعداد پل نمکی کل (جدول 2) با استفاده از وب سایت WHAT IF و برنامه Chimera محاسبه شد. نتایج نمایانگر افزایش تعداد پیوند هیدروژنی کل ساختار در هر سه جهش‌یافته و افزایش تعداد پل نمکی به جز جهش‌یافته L127W می‌باشد.

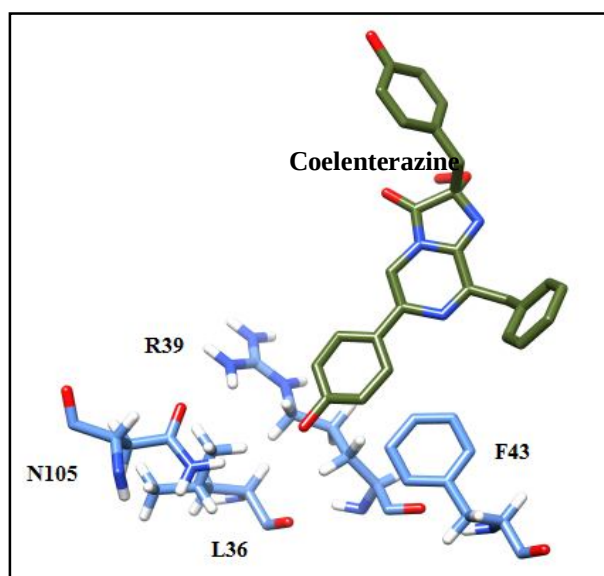
است که چندین گونه یونی وجود دارند: (II) گونه خنثی¹ با طول موج بیشینه در 400 نانومتر، (III) مونوآنیون آمیدی با طول موج حداکثر در محدوده 440-475 نانومتر، (IV) آنیون فنولات با طول موج حداکثر در حدود 490-480 نانومتر و گونه‌های آنیونی دیگری که طول موج‌های بالاتر نشر نور را دارند [28]. شواهد نشان می‌دهد که حالت برانگیخته III به عنوان اولین سطح برانگیخته در اکورین در نشر طیف بیولومینسانسی نقش دارد. البته در اوبلین یک باند کوچک در ناحیه 400 نانومتر مشاهده می‌شود که در جهش یافته W92F این باند قوی‌تر می‌شود که مربوط به حالت برانگیخته II است [28].

خصوصیات نشری تغییر یافته جهش‌هایی که در تریاد His16, Tyr82, Trp86 در اکورین (و معادل آن در اوبلین) صورت گرفته است از یک سو، و از سوی دیگر مشاهده عدم فعالیت آنالوگ‌های کلترازین که با تغییر در حلقه اول در موقعیت کربن 6 حاصل می‌شوند، بیانگر اهمیت این حلقه و آمینواسیدهای اطراف آن در فرایند بیولومینسانس است. بعد از آنکه توسط برنامه 9.9 Modeller مدل نمپوسین ساخته و بهترین مدل انتخاب شد، توسط برنامه Chimera حلقه 6 و آمینواسیدهای اطراف مدل انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفت (شکل 4).

در نهایت آمینواسید Asn105 در نمپوسین که متناظر آمینواسید Trp86 در اکورین (Trp92 در اوبلین) می‌باشد به عنوان یکی از جایگاه‌های جهش انتخاب شده علاوه بر میانکنش‌های نواحی تریاد، سه گروه میانکنش زنجیره جانبی در حفره اتصال قابل توجه است. این میانکنش‌ها کلترازین را در جایگاه اتصال قرار می‌دهند و به نظر می‌رسد که بعضی از آنها اهمیت عملکردی برای مکانیسم عمل اکورین داشته باشند، هر چند که این عملکردها

ناشناخته هستند. این سه گروه میانکنش‌ها عبارتند از: 1- گروه OH فنولی Tyr132 که هم سطح حلقه ایمیدازوپیرازینون لیگاند قرار گرفته، با N1 حلقه پیوند هیدروژنی می‌دهد و همچنین از طریق پیوند هیدروژنی با یک مولکول آب (W2)، به His58 متصل می‌شود. ایمیدازول این هیستیدین در نزدیکی حلقه ایندول Trp108 که سیستم حلقه ایمیدازوپیرازینون را پوشانده، قرار دارد. فعالیت لومینسانسی بسیار پایین جهش یافته-های W108F, H58F, W108M, W108Y و W108Y تایید کننده اهمیت این میانکنش‌ها است [29-31]. آمینواسید Leu127 در نمپوسین متناظر آمینواسید Trp108 در اکورین است (شکل 1) که جزو 21 آمینواسید جایگاه فعال محسوب شده و احتمالاً در پایداری حلقه 2 کلترازین نقش دارد. لذا این جایگاه به عنوان یکی از جایگاه‌های جهش انتخاب شد و به آمینواسید متناظرش در اوبلین و اکورین تبدیل شد. از دیگر جایگاه‌های جهش، Trp59 نمپوسین در هلیکس B در EF-hand I و در موقعیتی معادل با Lys39 در اکورین (یا Lys45 در اوبلین) می‌باشد که در مجاورت گروه هیدروکسی بنزیل در موقعیت کربن 8 (C8) کلترازین قرار دارد. این حلقه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به طوری که جهش-هایی که در اطراف این حلقه در اکورین و اوبلین صورت گرفته است، تقریباً باعث غیرفعال شدن پروتئین شده است [14]. اما با وجود این موضوع، در فتوپروتئین‌های شانه‌داران از جمله نمپوسین به جای لیزین، تریپتوفان قرار دارد (شکل 1). بنابراین در این مطالعه، آمینواسیدهای Trp59, Leu127 و N105 در نمپوسین به ترتیب به آمینواسیدهای متناظرشان (Trp, Lys, Trp) در اکورین و اوبلین جهش یافتند. جایگاه‌های جهش در نمپوسین طبیعی و جهش یافته‌ها در شکل 5 نشان داده شده است.

1. Neutral Species

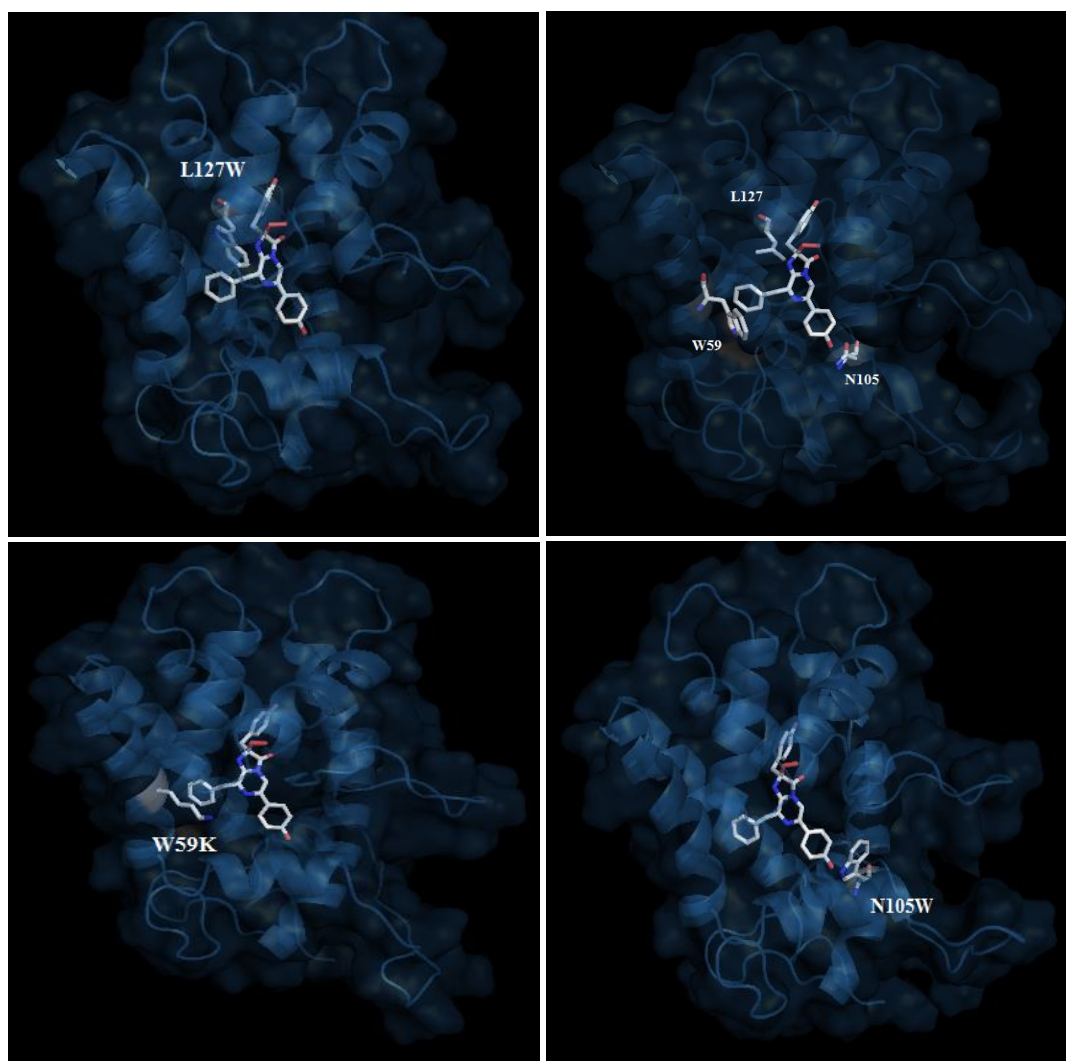


شکل 4 نمایی نزدیک از موقعیت ساختاری باقی مانده های اطراف حلقه 1 در موقعیت کربن 6 کروموفور کلنترازین در نمیوپسین طبیعی. مولکول کلنترازین که به رنگ سبز نمایش داده شده است، بر اساس اکورین در ساختار مدل جای داده شده است.

طولانی تر و برابر 16 ساعت بعد از انکوباسیون در تاریکی و دمای 4 درجه سانتی گراد می باشد [33,32]. سوبسترای مناسب برای نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته کلنترازین cp و غلظت کلنترازین به منظور باز تولید هر چهار پروتئین 150 میکرومولار بود. بررسی اولیه نتایج فعالیت بیولومینسانسی نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته نشانگر این بود که هر سه جهش باعث از بین رفتن فعالیت پروتئین می شود (جدول 1).

به منظور بررسی محتوای ساختارهای دوم نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته از طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه دور استفاده شد. طیف CD در ناحیه دور UV پروتئین های ماریپیچی دارای دو پیک منفی در طول موج های 208 و 222 نانومتر برای ساختار مارپیچ آلفا می باشد (شکل 3). پس از جهش، شدت طیف کاهش قابل توجهی داشته است که نشان دهنده کاهش ساختار دوم پروتئین در اثر جهش است. نتایج بدست آمده نشان می دهد که تغییرات مربوط به ساختار دوم جهش یافته W59K نسبت به دو جهش یافته دیگر کمتر است.

جهش زایی هدف دار ژن نمیوپسین برای هر سه جهش یافته به روش Quick-change انجام شد. برای بررسی فعالیت و تعیین ویژگی های پروتئین جهش یافته، بیان پروتئین انجام شد. بعد از بیان در زمان های مختلف، مشخص شد که پروتئین های طبیعی و سه جهش یافته L127W, W59K و N105W بهترین بیان را پس از 5 ساعت القا در دمای 26°C دارا می باشند. پس از بیان ژن های نمیوپسین جهش یافته، بواسطه وجود دنباله هیستیدینی در پروتئین های نوترکیب، پروتئین ها طی یک مرحله با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی با درصد خلوص بالا تخلیص گردیدند. بر اساس آنالیز SDS-PAGE، در نهایت یک باند پروتئینی در ناحیه حدود 27 کیلودالتون معادل وزن مولکولی پروتئین یعنی 24 کیلودالتون به همراه دنباله هیستیدینی 3 کیلودالتونی آن برای هر چهار پروتئین ظاهر شد (شکل 2). به منظور حذف ایمیدازول، نمونه ها دیالیز شدند. برای ایجاد فتوپروتئین های فعال، از غلظت های یکسان نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته استفاده شد. به دلیل عدم وجود آمینواسیدهای سیستئین در ساختار نمیوپسین زمان بازسازی نمیوپسین نسبت به اکورین



شکل 5 نمایی از جایگاه‌های جهش نسبت به کروموفور کلترازین در نیمیوسین طبیعی و جهش‌یافته‌ها

جایگزینی N105W و L127W تغییرات ساختاری محسوسی در سطح ساختار دوم جهش‌یافته‌ها نسبت به پروتئین وحشی ایجاد کرده به طوری که منجر به کاهش ساختار دوم و یا فشردگی کمتر آن شده است.

برای بررسی ساختار سوم پروتئین‌ها از تکنیک فلورسانس استفاده شد. ویژگی با ارزش فلورسانس ذاتی پروتئین‌ها در ارتباط با حساسیت بالای تریپتوفان موجود در آنها نسبت به محیط شان است. جذب پروتئین‌ها در طول موج 280 نانومتر به علت آمینواسیدهای تیروزین و تریپتوفان می‌باشد. اما جذب در طول موج 305-295 نانومتر اکثراً به علت تریپتوفان است. تغییر در طیف تریپتوفان حاصل

تغییرات ساختاری است که می‌تواند در اثر قرار گرفتن آمینواسیدهای تریپتوفان در محیط آب‌گریز یا آب‌دوست طی تغییر موقعیت آمینواسیدهای باردار با اثر خاموش کنندگی نسبت به آمینواسیدهای تریپتوفان باشد و نیز اتصال زیرواحد، اتصال لیگاند یا باز شدن ساختار، که همگی به طریقی بر روی محیط پیرامون ایندول تریپتوفان تاثیر می‌گذارند. بنابراین، در فلورسانس ذاتی علاوه بر تغییرات ساختاری، مسأله بار نیز حائز اهمیت است [34]. در این تحقیق تریپتوفان‌های پروتئین در ناحیه 295 نانومتر تحریک شد و نشر آنها مطالعه گردید. پروتئین نیمیوسین دارای پنج تریپتوفان در ساختار خود است. با توجه به

شکل 3، طیف فلورسانس ذاتی بدست آمده از نیمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته دارای یک پیک پهن با $\lambda_{\max}$ حدود 342 نانومتر می باشند، در حالی که کاهش نشری شدیدی برای جهش یافته N105W و بعد L127W و کاهش خفیفی برای جهش یافته W59K مشاهده می شود. این یافته ها بیانگر تغییرات ساختاری کمتر در جهش یافته W59K و تغییرات ساختاری بیشتری در جهش یافته های N105W و L127W نسبت به پروتئین وحشی می باشد و می توان عنوان کرد که در جهش یافته های N105W و L127W باقیمانده های تریپتوفان در محیط قطبی تر قرار گرفته اند. این تغییرات می تواند به صورت موضعی یا به صورت کلی یعنی باز شدن ساختار نسبت به ساختار طبیعی باشد و در برداشت اولیه بیانگر باز شدن ساختار جهش یافته های N105W و L127W نسبت به ساختار وحشی می باشد. به منظور بررسی دقیق تر تغییرات ساختاری جهش یافته ها از فلورسانس خارجی با استفاده از پروب ANS استفاده شد. این ترکیب با اتصال به پاکت های آب گریز در سطح پروتئین با میل ترکیبی بالا باعث جابجایی به سمت طول موج های کوتاه تر (محیط غیرقطبی) در طیف فلورسانس می شود. شدت فلورسانس خارجی برای هر سه جهش یافته نسبت به پروتئین وحشی کاهش یافته است و این کاهش برای جهش یافته های L127W و N105W بیشتر است. یک احتمال این است که ساختار جهش یافته های L127W و N105W فشرده تر از حالت طبیعی است که باعث شده نواحی آب گریز در این جهش یافته ها نسبت به نیمیوپسین طبیعی کمتر در معرض باشند. اما به دو علت این احتمال ضعیف است: 1- نتایج حاصل از طیف سنجی CD و فلورسانس ذاتی بیانگر فشرده تر بودن ساختار پروتئین طبیعی و جهش یافته W59K نسبت به این دو جهش یافته می باشد و 2- بررسی فعالیت بیولومینسانسی پروتئین های فوق بر خلاف این احتمال و نتیجه گیری است. به نظر می رسد

جهش ها، به ویژه L127W, N105W تغییرات کنفورماسیون موضعی را سبب شده است به طوری که ساختار آن ها فشرده نشده بلکه سطوح آب گریز کمتر در معرض قرار گرفته است.

آنچه که از جدول 2 بر می آید این است که در پروتئین های جهش یافته تعداد پیوندهای هیدروژنی بین لیگاند و پروتئین تغییر چندانی نشان نداده ولی تغییرات آن در کل ساختار چشم گیر بوده است. تغییرات پل نمکی نیز مشهود است که می تواند دلیلی دیگر جهت تغییرات ساختاری در پروتئین باشد.

غیرفعال شدن جهش یافته ها می تواند به دو علت باشد: 1- تغییرات ساختاری؛ که نتایج حاصل از دو رنگ نمایی دورانی، فلورسانس ذاتی و خارجی، پیوندهای هیدروژنی و پل نمکی این موضوع را تأیید می کند. 2- تغییر در یک یا چند میانکنش که در آغاز واکنش نشر نور ضروری اند، به عنوان مثال میانکنش هایی که در تشکیل پل پراکسیدی نقش دارند [32]. این تغییرات باعث می شود واکنش شروع نشود. عدم فعالیت در جهش یافته های موجود دلیلی بر وجود این آمینواسیدها در حفره اتصال یا نقش شان در مکانیسم عمل است.

آنچه که از مطالعات تئوری بر می آید این است که در هر سه جهش یافته تغییرات ساختاری رخ داده است که نتیجه آن در حذف فعالیت مشهود است. با توجه به مکانیسم نشر نور این گروه از فتوپروتئین ها لازم است ابتدا تخریب عامل پراکسیدی صورت پذیرد تا فرایند نشر نوری آغاز شود. به نظر می رسد تغییراتی که در ساختار ایجاد می شود، اگر مانع فرایند تخریب عامل پراکسیدی نشود، همچنان فرایند نشر نور صورت خواهد پذیرفت. اما اگر تغییرات ساختاری به گونه ای رخ دهد که مانع این فرایند تخریب شود، فعالیت را مهار خواهد کرد. نتیجه اینکه، این گونه به نظر می رسد که شروع مکانیسم خیلی وابسته به تغییرات ساختار کلی پروتئین نباشد، اما مسلم است که

6- منابع

- [1] Shimomura, O. (2006) *Bioluminescence: chemical principles and methods*. World Scientific Pub Co Inc.
- [2] Ashley, C. C. and Campbell, A. K. (1979) *Detection and Measurement of Free Ca ions in Cells*, Amsterdam and New York.
- [3] Blinks, J. R., Prendergast, F. G., and Allen, D. G. (1976) Photoproteins as biological calcium indicators. *Pharmacol. Rev.* 28, 1-93.
- [4] Shimomura, O. and Johnson, F. H. (1978) Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2611-2615.
- [5] Shimomura, O., Johnson, F. H., and Morise, H. (1974) Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry* 13, 3278-3286.
- [6] Head, J. F., et al. (2000) The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* 405, 372-376.
- [7] Liu, Z. J., et al. (2000) Structure of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure. *Protein Sci.* 9, 2085-2093.
- [8] Anctil, M. and Shimomura, O. (1984) Mechanism of photoinactivation and re-activation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis*. *Biochem. J.* 221, 72-269.
- [9] Hastings, J. W. and Morin, J. G. (1968) Calcium activated bioluminescent protein from ctenophores (*Mnemiopsis*) and colonial hydroids (*Obelia*). *Biol. Bull.* 135, 422.
- [10] Galina, A., et al. (2013) Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca^{2+} -loaded apoprotein conformation state. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2139-2146.
- [11] Ward, W. W. and Seliger, H. H. (1974) Properties of mnemiopsin and berovin, calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis* species and *Beroë ovata*. *Biochemistry* 13, 1500-1510.
- [12] Mahdavi, A., et al. (2013) Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: implication of some conserved residues in bioluminescence properties. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 467-478.
- [13] Aghamaali, M. R., et al. (2011) Cloning, Sequencing, Expression and Structural Investigation of Mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: An Attempt Toward Understanding Ca^{2+} -Regulated Photoproteins. *Protein J.* 30, 566-574.
- [14] Dikici, E., et al. (2009) Aequorin variants with

این تغییرات ساختاری می‌تواند روی خواص نشری نظیر طول موج نشری، مدت زمان نشر و ... که وابسته به چگونگی میانکنش لیگاند با پروتئین است، تأثیرگذار باشد.

در این تحقیق با آنکه آمینواسیدهای تغییر یافته با آمینواسیدهای متناظرشان در فتوپروتئین‌های کیسه‌تنان جایگزین شده‌اند (براساس تطبیق توالی‌ها)، اما تغییرات در ساختار و به ویژه عملکرد بواسطه این جایگزینی‌ها در نمیوپسین بسیار شدید بوده به طوری که هر سه جهش‌یافته غیرفعال شده‌اند. مطالعات ساختاری میان دو گروه فتوپروتئین‌های کیسه‌تنان و شانه‌داران دلالت بر این دارد که با وجود تفاوت‌های عمده در توالی، دارای ساختارهای بسیار مشابه هستند [13]. اما به نظر می‌رسد، با این همولوژی بالا در سطح ساختار سوم آمینواسیدهای درگیر در بیولومینسانس و احتمالاً مکانیسم این دو گروه نسبت به هم تفاوت‌های عمده‌ای داشته باشند. احتمال دیگر این است که تطبیق توالی‌های این دو گروه آن‌طور که از ابزارهای بیوانفورماتیکی استنتاج می‌شود، نیست و یا جایگیری کروموفور در جایگاه اتصالش به شکل دیگری غیر از آنچه که در فتوپروتئین‌های کیسه‌تنان مشاهده می‌شود، باشد. احتمالاً چینش آمینواسیدها در حفره اتصال به کلترازین مربوط به دو خانواده کیسه‌تنان و شانه‌داران نسبت به هم تفاوت دارند، اما با وجود توالی‌های متفاوت به ساختارهای مشابهی منجر می‌شوند. به همین دلیل جایگزینی این آمینواسیدها با آمینواسیدهای متناظرشان از خانواده دیگر (نظیر جهش‌های این تحقیق) تغییرات ساختاری عمده‌ای را به وجود می‌آورد.

5- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه گیلان بخاطر فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

- Nucleic Acid Res.* 32, 1-23.
- [26] Bairoch, A. and Apweiler, R. (1999) The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic Acid Res.* 27, 49-54.
- [27] Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22, 4673-4680.
- [28] Shimomura, O. and Teranishi, K. (2000) Light emitters involved in the luminescence of coelenterazine. *Luminescence* 15, 51-58.
- [29] Eriksson, A. E., Baase, W. A., and Matthews, B.W. (1993) Similar hydrophobic replacements of Leu99 and Phe153 within the core of T4 lysozyme have different structural and thermodynamic consequences. *J. Mol. Biol.* 229, 747-769.
- [30] Tsuji, F. I., et al. (1986) Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8107-8111.
- [31] Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 1-43.
- [32] Ohmiya, Y. and Tsuji, F. I. (1993) Bioluminescence of the Ca^{2+} -binding photoprotein, aequorin, after histidine modification. *FEBS Lett.* 320, 267-270.
- [33] Shimomura, O., et al. (1993) Light-emitting properties of recombinant semisynthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* 14, 373-378.
- [34] Gore, M. G. (2000) *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. Oxford University Press, USA.
- improved bioluminescence properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 243-248.
- [15] Sambrook, J. and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2001-2344.
- [16] Tafreshi, N. K., et al. (2007) The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. *J. Biol. Chem.* 282, 8641-8647.
- [17] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [18] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [19] Inouye, S. and Sahara, Y. (2007) Expression, purification and characterization of a photoprotein, clytin, from *Clytia gregarium*. *Protein Expr. Purif.* 53, 384-389.
- [20] Schippers, P. H. and Dekkers, H. P. J. M. (1981) Direct determination of absolute circular dichroism data and calibration of commercial instruments. *Anal. Chem.* 53, 778-782.
- [21] Marti-Renom, M. A., et al. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325.
- [22] Rodriguez, R., et al. (1998) Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics* 14, 523-528.
- [23] Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) Swiss model and the Swiss Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- [24] Altschul, S. F., et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25, 3389-3402.
- [25] Benson, D. A., et al. (2004) GenBank: update.