

Comparison of Thermodynamic Stability and Kinetic Refolding of *Lampyrus turkestanicus* and Some of Its Mutants

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Solgi Z.¹ PhD,
Khalifeh Kh.² PhD,
Hosseinkhani S.³ PhD,
Ranjbar B.^{*1} PhD

How to cite this article

Solgi Z, Khalifeh Kh, Hosseinkhani S, Ranjbar B. Comparison of Thermodynamic Stability and Kinetic Refolding of *Lampyrus turkestanicus* and Some of Its Mutants Journal of Biotechnology. 2018;9(3):417-425.

¹Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Biology Department, Sciences Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

³Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran

Phone: +98 (21) 82883418

Fax: -

ranjbarb@modares.ac.ir

Article History

Received: October 23, 2016

Accepted: September 27, 2017

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims The probability of establishing electrostatic interactions due to the abundance of charged hydrophilic residues and especially arginine is considered the most important thermal stabilizing factor of thermophilic enzymes. The current study was conducted with the aim of comparing thermodynamic stability and kinetic refolding of *Lampyrus turkestanicus* and some of its mutants.

Materials & Methods In the present experimental thermal stability and the way of refolding *Lampyrus turkestanicus* and 3 mutations, including ERR, ERR/I232R, ERR/Q35R/I182R/I232R were investigated by various spectroscopic techniques. In order to high expression of proteins, a single clone of each sample was selected and inoculated into 10ml of LB culture medium, containing Kanamycin at a concentration of 50µg/mg and incubated at 37°C with an ideal aeration for 12-15 hours. The culture medium was centrifuged for 5 minutes at 5000g at 4°C to provide the cellular contents of the bacteria. The results were obtained through spectroscopic methods of remote and near circular dichroism, intrinsic fluorescence, differential scanning calorimetry, and kinetics experiments, using fluorescence-stopped flow technique.

Findings Along with the increase in the number of arginine residues at the protein level, the stability and structural compression of the mutated enzymes in comparison with the wild enzyme were increased and the thermograms obtained from differential scanning calorimetry showed a slight increase in T_m and calorimetric enthalpy of mutated proteins in comparison with wild protein.

carotenoids (11.65 and 2.67 mg/g, respectively).

Conclusion The rate constant of refolding mutated enzymes has increased compared with the wild type. The improvement of thermodynamic and kinetic parameters results from the improvement of electrostatic interactions, which results in a higher degree of compression and structural density.

Keywords Luciferase; Differential Scanning Calorimetry; Circular Dichroism; Stopped-flow Fluorescence; Thermodynamics; Kinetics

CITATION LINKS

[1] Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic ... [2] Factors enhancing protein ... [3] Ion pairs and their stabilities ... [4] Metrics for sustainability analysis of post-combustion ... [5] Protein folding and stability: The pathway of folding of ... [6] Characterizing transition states in ... [7] Structure of the transition state for folding of the 129 aa protein CheY resembles that of a ... [8] Design of thermostable luciferases through arginine ... [9] Spectroscopic and functional characterization of *Lampyrus turkestanicus* luciferase ... [10] Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase ... [11] Molecular enigma of multicolor ... [12] Development of a thermostable firefly ... [13] Improved practical usefulness of firefly luciferase by ... [14] Mutagenesis of solvent-exposed amino acids in *Photinus pyralis* luciferase ... [15] The effect of surface charge balance on thermodynamic stability and kinetics of ... [16] Stabilization of firefly luciferase ... [17] The stabilization of proteins by ... [18] Improved thermostability of the North American firefly luciferase: Saturation ... [19] The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and ... [20] Relationship between stability and bioluminescence color of firefly ... [21] Quantification of protein concentration using UV ... [22] Circular dichroism techniques: Biomolecular and ... [23] Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation ... [24] A stopped-flow fluorescence study of the native and ... [25] Differential scanning calorimetry techniques ... [26] The SWISS-MODEL workspace: A web-based ... [27] Kinetics of the firefly luciferase catalyzed ... [28] Differences in amino acids ... [29] Elucidation of determinants of protein ... [30] Charge-charge interactions influence the ... [31] Conformation and thermal denaturation of ...

مقایسه پایداری ترمودینامیک و بازتاخوردگی سینتیک آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی و برخی جهش یافته‌های آن

زهرا سلگی PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

خسرو خلیفه PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

سامان حسین‌خانی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

بیژن رنجبر PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

اهداف: احتمال برقراری میان‌کنش‌های الکترواستاتیک به‌علت فراوانی رزیدوهای باردار آب‌دوست به‌ویژه آرژنین به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور پایداریکننده دمایی آنزیم‌های گرمادوست مطرح شده است. هدف این مطالعه، مقایسه پایداری ترمودینامیک و بازتاخوردگی سینتیک آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی و برخی جهش یافته‌های آن بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، پایداری گرمایی و نحوه بازتاخوردگی آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس (*Lampyris turkestanicus*) و ۳ جهش یافته ERR/1232R، ERR/Q35R/1182R/1232R توسط تکنیک‌های مختلف اسپکتروسکوپی بررسی شد. به‌منظور بیان بالای پروتئین‌ها یک تک‌کلونی از هر یک از نمونه‌ها انتخاب و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم تلقیح و در دمای ۳۷°C و با هوادهی مطلوب به‌مدت ۱۵-۱۲ ساعت انکوبه شد. به‌منظور تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها، محیط کشت القاشده به‌مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ گرم و دمای ۴°C سانتریفوژ شد. نتایج از طریق مطالعات با روش‌های طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور، نزدیک و فلورسانس ذاتی، مطالعات کالریمتری روبشی تفاضلی (DSC) و آزمایش‌های سینتیکی با استفاده از تکنیک جریان متوقف مبتنی بر فلورسانس به دست آمد.

یافته‌ها: همراه با افزایش تعداد رزیدوی آرژنین در سطح پروتئین، پایداری و فشردگی ساختاری آنزیم‌های جهش یافته در مقایسه با آنزیم وحشی افزایش یافته و ترموگرام‌های حاصل از مطالعات کالریمتری روبشی تفاضلی نیز بیانگر افزایش اندکی در T_m و آنتالپی کالریمتری پروتئین‌های جهش یافته نسبت به پروتئین وحشی بودند.

نتیجه‌گیری: ثابت سرعت بازتاخوردگی آنزیم‌های جهش یافته نسبت به نوع وحشی افزایش پیدا کرده است. بهبود پارامترهای ترمودینامیک و سینتیک ناشی از بهبود میان‌کنش‌های الکترواستاتیک است که منجر به درجه بالاتری از فشردگی و تراکم ساختاری می‌شود.

کلیدواژه‌ها: لوسیفراز، کالریمتری روبشی تفاضلی، دورنگ‌نمایی دورانی، فلورسانس جریان متوقف، ترمودینامیک، سینتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۰۵

* نویسنده مسئول: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

میان‌کنش‌های غیرکووالان، مشخص‌کننده مکانیزم و مسیر تاخوردگی پروتئین از حالت غیرطبیعی به حالت طبیعی و همچنین تعیین‌کننده میزان پایداری یک پروتئین در حالت تاخورده هستند. معمولاً ساختار پروتئین‌ها به‌وسیله میان‌کنش‌های ضعیف نظیر واندروالس، الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی و نیروهای هیدروفوب بین اسیدهای آمینه با یکدیگر، بین آنها و مولکول‌های آب پایدار می‌شود [1].

مطالعات انجام‌شده روی پروتئین‌های گرمادوست نشان‌دهنده فراوانی بالای رزیدوهای باردار به‌ویژه آرژنین است [2]. زنجیره جانبی اسیدهای آمینه قطبی دارای بار مثبت، بسیار آب‌دوست بوده و در

میان‌کنش‌های الکترواستاتیک از جمله پل‌های نمکی وارد می‌شوند که نقش مهمی در ساختار، عملکرد و تاخوردگی پروتئین دارند [3, 4].

فراوانی پل‌های نمکی در پروتئین‌های هائپرترموفیل در حالت تاخورده می‌تواند سدهای سینتیک را در برابر واسرشتگی پروتئین ایجاد کند. به عبارت دیگر، اساس پایداری پروتئین‌های ترموفیل را می‌توان در فراوانی بارهای مثبت سطحی و میان‌کنش‌های مربوطه توجیه کرد [2]. از طرف دیگر تعیین پایداری پروتئین‌های جدید مستلزم پیش‌بینی هر چه دقیق‌تر انرژی‌های موثر در تاخوردگی و تشخیص مسیر صحیح آن (مطالعات سینتیک) است [5]. منظور از آزمایش‌های سینتیک، بررسی لحظات اولیه واکنش‌های تاخوردگی یا واسرشتگی قبل از به‌تعادل‌رسیدن این واکنش‌ها است و پارامترهای به‌دست‌آمده از این مطالعات شامل ثابت سرعت واکنش، تغییرات انرژی آزاد حالت گذار واکنش و در صورت وجود حد واسطه‌های سینتیک و مشخصات انرژی این حد واسطه‌ها هستند. بنابراین مشخص‌کردن حالت گذار، ردیابی ساختار و اطلاعات مربوط به حالت گذار در یک واکنش تاخوردگی، در فهم مکانیزم تاخوردگی پروتئین بسیار مهم است که با کمک تکنیک‌های مهندسی پروتئین، روش‌های بیوفیزیک و به‌ویژه از طریق ثابت سرعت واکنش، قابل دست‌یابی است [6, 7].

آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس (*Lampyris turkestanicus*) یک آنزیم مونواسیوناز بوده و نشر نور سبز را از لوسیفیرین، در حضور اکسیژن، یون منیزیم و آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) کاتالیز می‌کند [8, 9]. این پروتئین، پلی‌پپتیدی با ۵۴۷ اسید آمینه با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون است که دارای یک دمین N-ترمینال بزرگ (۴۳۵-۱) و یک دمین C-ترمینال کوچک است (۵۵۰-۴۴۱) و توسط یک لوپ انعطاف‌پذیر (۴۳۶-۴۴۰) به یکدیگر متصل می‌شوند [10].

در چند دهه گذشته استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر بیولومینسانس در تحقیقات بیولوژیک و بیوتکنولوژی گسترش یافته و کاربردهای جدیدی از آنزیم لوسیفراز به‌سرعت در حال شکل‌گیری و رشد است. از جمله این کاربردها می‌توان به حساسیت بالای آنزیم در تشخیص ATP، استفاده از آن در آنالیز آلودگی‌های میکروبی سیستم‌های زیستی، فرآیند انتقال ژن، بیان ژن، ژن‌درمانی و بررسی رشد تومورها و تصویربرداری درون‌جانداری اشاره نمود [11]. با این وجود کاربرد و گسترش تکنولوژی بیولومینسانس به‌خصوص در مطالعات درون‌جانداری به‌وسیله چند فاکتور محدود می‌شود. از مهم‌ترین این محدودیت‌ها، ناپایداری لوسیفراز در دمای محیط است، به‌طوری که آنزیم به‌سرعت و به‌صورت برگشت‌ناپذیر در دمای اتاق فعالیت خود را از دست می‌دهد که این ویژگی تقریباً بر تمامی کاربردهای آنزیم اثرات نامطلوبی دارد [12].

تاکنون مطالعات و تحقیقات زیادی برای حل ناپایداری لوسیفراز نسبت به حرارت انجام شده است [13-15]. در هنگام استفاده از لوسیفراز در محیط درون‌جانداری می‌توان با اضافه‌نمودن پایدارکننده‌های آنزیمی از قبیل گلیسرول، سولفات آمونیوم و اسمولیت‌های دیگر تا حدی بر مشکلات ناپایداری این آنزیم غلبه کرد [16, 17]. اما استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین و ایجاد لوسیفراز جهش‌یافته با ویژگی‌های مطلوب، تنها راه حل مفید و اساسی برای غلبه بر این مشکل به‌منظور کاربرد آن در محیط‌های درون‌جانداری به شمار می‌آید [18-20].

بر همین اساس در سال ۲۰۱۱، مرتضوی و همکاران با استفاده از تکنیک جهش‌زایی هدفمند نشان دادند که در لوسیفراز گونه ایرانی

فاصله زمانی ۴۰ ثانیه بین هر مرحله روی یخ قرار گرفت. سپس سلول‌های لیز شده، در ۱۲۰۰ گرم و در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند.

تخلیص پروتئین: به منظور تخلیص آنزیم‌های نوترکیب، از روش کروماتوگرافی تمایلی و ستون نیکل سفارز استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ستون توسط بافر تعادلی شامل ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول با pH برابر ۷/۸ به تعادل رسید. سپس نمونه حاصله به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصل نشده به ستون به وسیله بافر شست‌وشو حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول با pH برابر ۷/۸ انجام شد و در آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جداکننده شامل ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول و ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید با pH برابر ۷/۸ استفاده شد. برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین، تخلیص در یخ و با استفاده از بافرهای سرد انجام گرفت. در نهایت پروتئین تخلیص شده در حضور گلیسرول ۱۰٪ جمع‌آوری و در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

محاسبه فعالیت ویژه آنزیم: بلافاصله بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها (یک میلی‌لیتر) از ستون، فعالیت هر آنزیم با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از آنزیم رقیق شده به نسبت ۱ در ۱۰۰۰، به ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا شامل ۲۵ میکرولیتر کوکتل حاوی یک میلی‌مولار لوسیففرین، ۲ میلی‌مولار ATP، ۵ میلی‌مولار منیزیم سولفات و ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید و ۲۵ میکرولیتر از بافر تریس (pH برابر ۷/۸) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر اندازه‌گیری شد. غلظت هر یک از نمونه‌ها با استفاده از آزمون بردفورد تعیین شد و فعالیت مخصوص هر آنزیم ($1 \text{ mg}^{-1} \text{ RLU Sec}^{-1}$) به دست آمد.

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): برای حصول اطمینان از خلوص نمونه‌ها از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE احیایی استفاده شد. ژل بالا با غلظت ۵٪ و ژل پائین با غلظت ۱۲٪ مورد استفاده قرار گرفت.

دیالیز نمونه‌ها: به دلیل وجود ترکیب حلقوی ایمیدازول در محیط آنزیمی، استفاده از آن در تکنیک‌های اسپکتروسکوپی مانند دورنگ‌نمایی دورانی و فلورسانس مشکلاتی را ایجاد می‌نماید که حذف آن از محلول الزامی است. بدین منظور از بافر تریس با pH برابر ۷/۸ به عنوان بافر دیالیز برای خروج ایمیدازول استفاده شد. دیالیز در دمای ۴°C در بافر با حجم یک لیتری طی دو مرحله ۱۰ ساعته به همراه چرخش مگنت با دور ۱۵۰ در دور دقیقه انجام گرفت.

سنجش غلظت پروتئین‌ها: برای سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش بردفورد استفاده شد [21].

مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی: مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی برای ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌ها در نواحی فرابنفش دور و نزدیک توسط دستگاه اسپکتروپلاریومتر مدل J-715 (جاسکو؛ ایالات متحده) انجام شد. آنالیز و پردازش طیف‌ها توسط نرم‌افزار اختصاصی J-715 که با استفاده از روش فوریه ترانسفورم آشفتگی‌های موجود در طیف را با کمترین تغییر شکل در پیک حذف می‌نماید، انجام شد [22, 23].

نتایج به صورت بیضی‌واری مولی $1 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ [θ] و براساس میانگین وزن اسیدهای آمینه و میانگین وزن باقی‌مانده (MRW) محاسبه شد. میانگین وزن اسیدآمینه‌ها برای لوسیفراز ۱۱۳ به دست آمد. بیضی‌واری مولی از فرمول زیر به دست می‌آید: $[\theta] = (\theta \times 100 \text{ MRW}) / \text{CL}$

با جایگزینی تکی یا همزمان چندین رزیدوی آب‌گریز سطحی به رزیدوی آرژنین با بار مثبت در موقعیت‌های ۳۵، ۱۸۲ و ۲۳۲ پایداری دمایی لوسیفرازهای جهش‌یافته افزایش یافته است [8].

با توجه به اهمیت پایداری آنزیم لوسیفراز و در نتیجه اهمیت بررسی مسیر تآخوردگی آنزیم و نوع میان‌کنش‌های درگیر در حفظ ساختار پروتئین و اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی پایداری ترمودینامیک و سینتیک بازتآخوردگی لوسیفراز با چند آرژنین در لوپ سطحی انجام نشده است، تحقیق حاضر با هدف مقایسه پایداری ترمودینامیک و بازتآخوردگی سینتیک آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی و برخی جهش‌یافته‌های آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، مواد محیط کشت ایزوپروپیل بتا‌گالاکتوپیرانوزید (IPTG؛ سیگما؛ ایالات متحده)، لاکتوز و کانامایسین (سیگما؛ ایالات متحده)، ATP (Roche؛ سوییس)، دی‌لوسیففرین، نمک پتاسیم و اوره (مرک؛ ایالات متحده)، Ni-NTA Sepharose (Novagene؛ چین)، لومینومتر (Berthold؛ انگلستان)، UV-Visible Spectrophotometer (PerkinElme؛ ایالات متحده) و Stopped-Flow (Varian؛ ایالات متحده) مورد استفاده قرار گرفت.

ساختار پروتئین لوسیفراز و جهش‌های اعمال شده روی آن: با مطالعه پروتئین‌های ترموفیل و شناخت این مطلب که فراوانی بالای اسیدهای آمینه باردار به ویژه آرژنین در سطح پروتئین می‌تواند از طریق افزایش میان‌کنش‌های یونی و احتمال تشکیل پل‌های نمکی باعث ایجاد پایداری در پروتئین‌های گرمادوست شود، مرتضوی و همکاران در سال ۲۰۱۱ به منظور افزایش پایداری از طریق جهش‌زایی هدف‌دار اسیدهای آمینه آب‌گریز به آرژنین، روی آنزیم لوسیفراز گونه *لامفیریس ترکستانیکوس* ابتدا جهش‌یافته- $E^{354R/356R}$ pET-28a-*L.tu* (ERR) 28a-*L.tu* را تهیه نمودند که منجر به تغییر نشر نور از سبز به قرمز شد. سپس به صورت هدفمند از این جهش‌یافته به عنوان الگو برای ساخت دو گونه جهش‌یافته با نشر نور قرمز و با پایداری مناسب‌تر نسبت به گونه وحشی به صورت pET-28a-*L.tu* ERR/182R/I232R، pET-28a-*L.tu* ERR/182R/I232R استفاده شد. همه مطالعات در شرایط یکسان روی این پروتئین وحشی و ۳ جهش‌یافته آن صورت گرفت.

بیان پروتئین: به منظور بیان بالای پروتئین‌ها یک تک‌کلونی از هر یک از نمونه‌ها انتخاب و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB) دارای کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم تلقیح و در دمای ۳۷°C و با هوادهی مطلوب به مدت ۱۵-۱۲ ساعت انکوبه شد. سپس از این کشت‌ها حدود ۲ میلی‌لیتر به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتوفان برات (TB) دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷°C منتقل شد. بعد از این که جذب OD600 محیط باکتری‌ها به حدود ۰/۵-۰/۶ رسید، به میزان یک میلی‌مولار IPTG و ۴ میلی‌مولار لاکتوز به محیط کشت اضافه و دما تا ۲۳°C پایین آورده شد و به مدت ۱۵ ساعت محیط کشت باکتری در حالت شیکینگ در این دما باقی ماند.

تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها: به منظور تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها، محیط کشت القا شده به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ گرم و دمای ۴°C سانتریفوژ شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به حالت سوسپانسیون درآمد. بعد از آن سوسپانسیون باکتری تحت ۱۵ مرحله ۲۰ ثانیه‌ای سونیکاسیون با

$$Y = at + b \sum_i^N C_i \exp(-k_i t) \quad (1)$$

k_i و C_i به ترتیب نشان‌دهنده جمعیت مولکولی و ثابت سرعت هستند. واکنش‌های بازتاخوردگی با یک معادله دوفازی تطبیق داده شده و از آنالیز آنها دو ثابت سرعت به دست می‌آید که یکی از ثابت سرعت‌ها فاز عمده واکنش بوده و بخش عمده جمعیت مولکولی از این فاز تبعیت می‌کند و ثابت سرعت دیگر جمعیت محدودی از مولکول را در بر می‌گیرد. در انتها برای به‌دست‌آوردن سطح انرژی حالت گذار، براساس تئوری فازهای انتقالی و با استفاده از معادله ۲، انرژی آزاد فعال‌سازی ($\Delta G^\ddagger$) فازهای انتقالی یا اختلاف انرژی بین فاز انتقالی و حالت پایه به دست آمد:

$$k = (K_B T/h) \cdot \exp(-\Delta G^\ddagger/RT) \quad (2)$$

K_B ثابت بولتزمن، h ثابت پلانک و $\Delta G^\ddagger$ اختلاف انرژی بین حالت گذار و پایه هستند.

نانوکالریمتری روبشی تفاضلی: پایداری حرارتی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها با استفاده از کالریمتر روبشی تفاضلی Nano-DSC III (TA instrument؛ ایالات متحده) انجام شد. پروتئین‌ها پس از تخلیص و دیالیز در غلظت ۰/۷ میلی‌گرم در بافر تریس، ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط خلا قرار گرفتند، سپس بلافاصله پس از تزریق در کووت با سرعت روبشی ۱°C بر دقیقه از ۱۵ تا ۱۱۰°C در فشار ثابت ۳ اتمسفر آنالیز شدند. برای بررسی برگشت‌پذیری دمایی پروتئین، محلول پروتئینی موجود در کووت کالریمتری پس از اولین بار پروسه ذوب‌شدن، سرد شده و دوباره در بازه ۱۵-۶۰°C حرارت داده شد که در این حالت ترموگرام به‌دست‌آمده در مرحله اول حرارت‌دادن، تکرار نشد. با نرم‌افزار TM Nano Analyze می‌توان پارامترهای ترمودینامیک را به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نمود^[23-25] که در تحقیق حاضر به‌علت برگشت‌ناپذیری پروسه فقط پارامترهای ΔH و T_m کالریمتریک لوسیفرافز و جهش‌یافته‌های آن اندازه‌گیری شدند.

با توجه به این که ساختار پروتئین لوسیفرافز گونه ایرانی به‌روش کریستالوگرافی تعیین شده است، از ساختار تعیین‌شده این پروتئین به فرم بانک اطلاعاتی پروتئین با کد 4M46 با استفاده از سرور Rosetta Backrub برای مدل‌سازی ساختار جهش‌یافته‌ها استفاده شد.

هر کدام از اسیدآمینه‌های موجود در پروتئین با اسیدآمینه‌های دیگر موجود در ساختار علاوه بر پیوندهای کووالانی، پیوندهای غیرکووالانسی نظیر هیدروژنی و میان‌کنش‌های هیدروفوبی و غیره نیز ایجاد می‌کنند که در این مطالعه از سرور دیگری به نام PIC server برای مقایسه این برهم‌کنش‌ها در پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته استفاده شد، سپس با کمک نرم‌افزار SPDB-Viewer برهم‌کنش‌های محاسبه‌شده و موقعیت قرارگیری اسیدهای آمینه آرژنین و زنجیره‌های جانبی آن در لوپ‌های مربوطه مشاهده شد^[26].

یافته‌ها

آزمایش‌های جهش‌یافته از فعالیت مخصوص بالاتری نسبت به آزمون وحشی برخوردار بودند (جدول ۱). پارامترهای ترمودینامیک فرآیندهای واسرشتگی گرمایی پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته‌های لوسیفرافز ارائه شدند (جدول ۲). نتایج آزمایش‌های سینتیک تاخوردگی هر چهار پروتئین نشان داده شد (جدول ۳).

که C غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، L طول مسیر بر حسب سانتی‌متر از کووت حاوی نمونه و θ پارامتر بیضی‌واری اندازه‌گیری‌شده بر حسب درجه در طول موج λ است. مطالعات ساختاری دورنگ‌نمایی دورانی در نواحی دور و نزدیک فرابنفش به ترتیب با غلظت آنزیمی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در کووت ۰/۱ سانتی‌متر در دمای ۲۵°C و pH برابر ۷/۸ انجام شد.

مطالعات فلورسانس ذاتی: فلورسانس ذاتی با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر مدل Cary-Eclipse (Varian؛ کانادا) و با استفاده از آنزیم‌های دیالیز‌شده با خلوص بیش از ۹۵٪ علیه بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید با pH برابر ۷/۸ و غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌مولار با طول موج تهییجی ۲۹۵ نانومتر انجام گرفت. طول موج نشری در محدوده ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. اطلاعات، توسط نرم‌افزار دستگاه پردازش و آنالیز شد^[20]. یکی از روش‌های مطالعه ساختار پروتئین‌ها، استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس است که برای مطالعه ساختار سوم پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجا که اسیدآمینه‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین موجود در پروتئین‌ها به قطبیت محیط حساس بوده، پس هر گونه تغییر در ساختار پروتئین منجر به تغییر محیط اطراف این اسیدآمینه‌ها شده و در نتیجه طیف نشری آنها تغییر می‌کند. به‌منظور حذف اثرات اسیدآمینه‌های تیروزین و فنیل‌آلانین، تهییج در ناحیه ۲۹۵ نانومتر انجام شد، بنابراین طیف‌های به‌دست‌آمده تنها مربوط به اسیدآمینه تریپتوفان موجود در پروتئین هستند. در آنزیم لوسیفرافز گونه لامفیویریس ترکستانیکوس تنها یک رزیدوی W417 دارد که در دمین بزرگ N-ترمینال قرار گرفته است.

آزمایش‌های سینتیک بازتاخوردگی: آنالیزهای سینتیک واکنش‌های بازتاخوردگی با استفاده از دستگاه فلورسانس جریان متوقف (Stopped-Flow Fluorescence؛ شرکت Biologic؛ ایالات متحده) و کووت ۰/۸ میلی‌متر (FC-08) انجام شد و پردازش اطلاعات توسط نرم‌افزار Biokine انجام گرفت^[15, 24]. در ابتدا آنزیم لوسیفرافز وحشی و جهش‌یافته‌ها به‌طور جداگانه در بافر تریس حاوی اوره با غلظت ۶ مولار به‌مدت ۱۲ ساعت انکوبه شده و پس از به‌تعادل‌رسیدن واکنش‌های واسرشتگی و ثابت‌شدن تعداد پروتئین‌های واسرشته نسبت به تاخوردگی برای هر یک از نمونه‌ها، آزمایش بازتاخوردگی به‌صورت ثبت تغییرات طول موج نشری مورد نظر در فلورسانس بر حسب زمان انجام شد. واکنش بازتاخوردگی با رقیق‌شدن ناگهانی پروتئین به نسبت ۶ به ۱ توسط بافر بازتاخوردگی شامل ۵۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید و ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید انجام شد. فلورسانس ناشی از تهییج در ۲۹۵ نانومتر در طول موج ۳۲۰ نانومتر بلافاصله پس از شروع واکنش ثبت شده و یک منحنی نمایی که بازتابی از کاهش تدریجی تعداد مولکول‌های واسرشته و افزایش تدریجی تعداد مولکول‌های بازتاخوردگی است به دست می‌آید.

به‌منظور رسیدن به دقت بالا، هر کدام از آزمایش‌های سینتیک بازتاخوردگی چندین بار تکرار شده و طیف نهایی مورد استفاده در آنالیزهای بعدی میانگین چندین طیف در شرایط مشابه است. در آنالیز طیف‌های سینتیک، منحنی‌های مربوطه با معادله نمایی ۱ و با کمک نرم‌افزار Biokine مطابقت داده شده و پارامتر مجهول موجود در منحنی که همان ثابت سرعت واکنش (k_i) است، استخراج شد:

جدول ۲) پارامترهای ترمودینامیک فرآیندهای واسرشتگی گرمایی پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته‌های لوسیفراز

متغیرها	$\Delta H^\ddagger$	$T_m^\ddagger$
WT	۴۸/۹۹	۴۴/۸۰
ERR	۹۳/۳۸	۴۶/۲۱
ERR/I ²³² R	۱۹۱/۸۸	۴۷/۱۱
ERR/Q ³⁵ R/I ¹⁸² R/I ²³² R	۱۸۵/۵۸	۴۶/۷۶

$\ddagger$ دیمانسینون $\Delta H^\ddagger$ کالریمتری کیلوژول بر مول، $T_m^\ddagger$ برحسب درجه سانتی‌گراد است

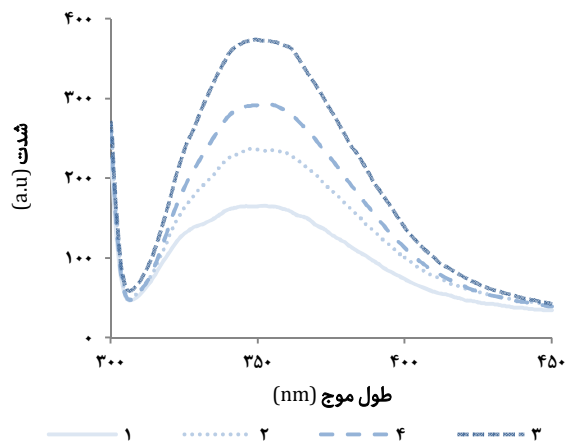
جدول ۱) فعالیت ویژه آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته‌ها

متغیرها	فعالیت ویژه (RLU S ⁻¹ mg ⁻¹)	دما (°C)
WT	۲/۸	۲۵
ERR	۲/۱۱	۲۵
ERR/I ²³² R	۲/۲۱	۲۵
ERR/Q ³⁵ R/I ¹⁸² R/I ²³² R	۲/۱۶	۲۵

جدول ۳) نتیجه آنالیز داده‌های آزمایش‌های سینتیک بازتآخوردگی پروتئین‌ها

متغیرها	ثابت سرعت (k_1 , S ⁻¹)	حالت گذار $\Delta G^\ddagger_1$ (کیلوژول بر مول)	دامنه (A_1 , %)	ثابت سرعت (k_2 , S ⁻¹)	حالت گذار $\Delta G^\ddagger_2$ (کیلوژول بر مول)	حالت گذار (A_2 , %)	دامنه
WT	۵/۱۵±۰/۳۴	۶۳/۱۸±۰/۱۶	۸۴/۰۶	۰/۵۱±۰/۰۰۱	۷۳/۹۱±۰/۰۰۴	۷۳/۹۱	۱۵/۹۴
ERR	۹/۳۹±۰/۰۲	۶۶/۶۹±۰/۰۰۵	۶۹/۸۹	۰/۹۸±۰/۰۰۳۶	۷۲/۲۹±۰/۰۰۱	۷۲/۲۹	۳۰/۱۱
ERR/I ²³² R	۱۴/۳۳±۰/۰۶	۶۵/۶۴±۰/۰۱۰	۷۵	۰/۷۴±۰/۰۰۲	۷۲/۹۹±۰/۰۰۷	۷۲/۹۹	۲۵
ERR/Q ³⁵ R/I ¹⁸² R/I ²³² R	۱۴/۳۸±۰/۰۲۰	۶۵/۶۳±۰/۰۰۳۴	۶۷/۰۵	۰/۲۲±۰/۰۰۱	۷۵/۱۰±۰/۰۱۱	۷۵/۱۰	۳۲/۹۵

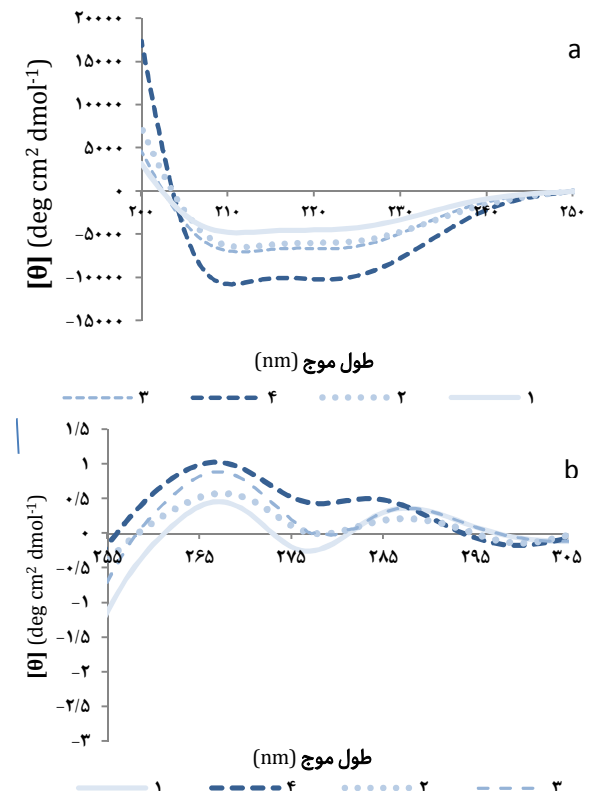
فلورسانس ذاتی: طیف‌های فلورسانس به‌دست‌آمده از آنزیم لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌ها نشان داده شد (نمودار ۲). میزان شدت فلورسانس ذاتی در هر سه آنزیم جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم وحشی افزایش یافته است که نشان‌دهنده این است که اسیدآمینه تریپتوفان ۴۱۷ در هر سه آنزیم جهش‌یافته بر اثر تغییرات ساختاری بیشتر در محیط آب‌گریز قرار گرفته است. این تغییرات می‌تواند به‌صورت منطقه‌ای یا به‌صورت کلی نسبت به ساختار آنزیم وحشی باشد. میزان فلورسانس ذاتی نمونه‌های ERR/I²³²R و ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R افزایش چشمگیری نسبت به نمونه وحشی نشان داد که به‌دلیل قرارگرفتن رزیدی تریپتوفان در محیطی آب‌گریزتر و در نتیجه نشان‌دهنده افزایش فشردگی ساختار این آنزیم‌ها بود.



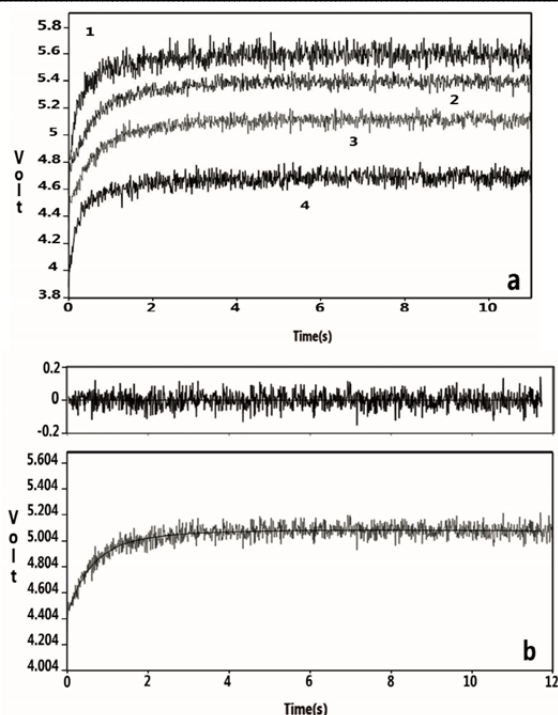
نمودار ۲) طیف فلورسانس ذاتی لوسیفرازهای وحشی و جهش‌یافته‌ها (۱: آنزیم وحشی، ۲: ERR، ۳: ERR/I²³²R، ۴: ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R) تحت شرایط بافر (pH برابر ۷/۸)، ۵۰ میلی‌مولار تریس، دمای ۲۵°C با غلظت پروتئین ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر

بررسی پایداری ترمودینامیک آنزیم لوسیفراز با استفاده از روش کالریمتری روبشی تفاضلی: با استفاده از روش کالریمتری روبشی تفاضلی واسرشتگی دمایی پروتئین لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌ها (ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R, ERR/I²³²R, ERR) بررسی شد. فرآیند واسرشتگی لوسیفراز، غیرتعادلی و برگشت‌ناپذیر بود. بنابراین نمی‌توان در خصوص تعداد دمین‌های انرژی‌تیک و سایر پارامترهای ترمودینامیک از جمله انرژی آزاد واسرشتگی به‌طور کامل بحث کرد.

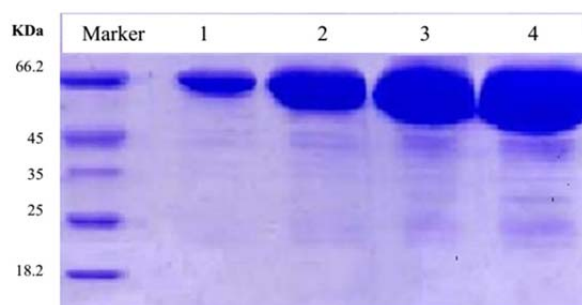
مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی: طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌های آن در نواحی دور و نزدیک فرابنفش نشان داده شدند (نمودار ۱). طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی نمونه پروتئین‌های حاوی ساختارهای دوم مارپیچ آلفا و صفحات بتا بود. این طیف‌ها حاکی از افزایش فشردگی ساختار دوم در جهش‌یافته‌ها نسبت به پروتئین وحشی بودند. تغییرات ساختار سوم پروتئین‌ها به‌ویژه در اطراف فنیل‌آلانیین حاکی از افزایش سختی ساختار در اطراف اسیدهای آمینه تیروزین (اطراف ۲۸۰ نانومتر) و به‌ویژه فنیل‌آلانیین (اطراف ۲۷۰ نانومتر) بودند.



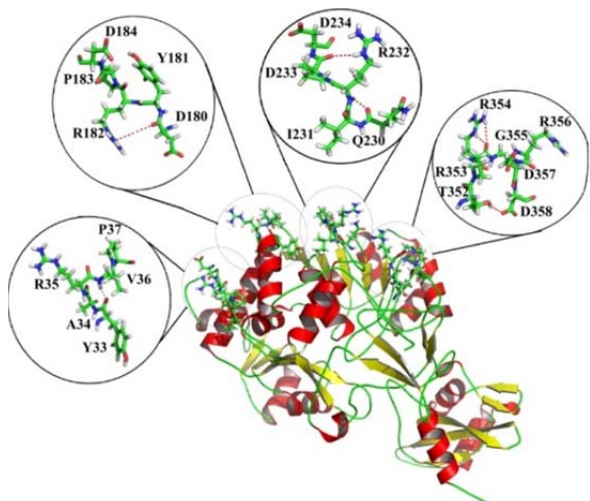
نمودار ۱) (a): طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور فرابنفش برای بررسی ساختار دوم پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته (۱: آنزیم وحشی، ۲: ERR، ۳: ERR/I²³²R، ۴: ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R)، (b): طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه نزدیک فرابنفش برای بررسی تغییرات موضعی ساختار سوم پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته (۱: آنزیم وحشی، ۲: ERR، ۳: ERR/I²³²R، ۴: ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R)



نمودار ۴ (a): طیف‌های سینتیک بازتاخوردگی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها (۱): آنزیم وحشی، ۲: ERR، ۳: ERR/I²³²R، ۴: جهش‌یافته ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R، (b): نمونه‌ای از طیف سینتیک بازتاخوردگی جهش‌یافته ERR/I²³²R

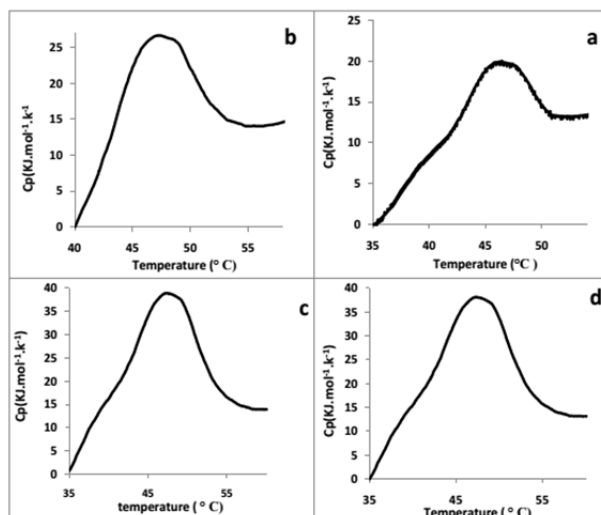


شکل ۱ (a): آنالیز تخلیص پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته (۱: وحشی، ۲: ERR، ۳: ERR/I²³²R، ۴: ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R) بعد از تخلیص با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی (Affinity Chromatography)



شکل ۲ (a): مدل‌سازی جایگاه‌های جهش. ساختار آنزیم لوسیفراز و جایگاه‌های اسیدآمینه‌های جهش‌داده‌شده با استفاده از Swiss Model Server

ترموگرام هر یک از پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته براساس تغییرات C_p علیه درجه حرارت نشان داده شد (نمودار ۳). هر دو پارامتر T_m و آنتالپی نمونه‌های جهش‌یافته در مقایسه با لوسیفراز وحشی افزایش یافت، در حالی که برگشت‌پذیری در واسرشتگی دمایی این جهش‌یافته‌ها تغییر نیافت.



نمودار ۳ (a): ترموگرام‌های به‌دست‌آمده از مطالعه کالریمتری روبشی تفاضلی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها: a: آنزیم وحشی، b: ERR، c: ERR/I²³²R، d: ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R (میزان ظرفیت گرمایی این پروتئین‌ها در جهت محور Y جابه‌جا شده است تا بدین ترتیب این ترموگرام‌ها بهتر نشان داده شوند)

نتایج فلورسانس جریان متوقف: نمونه‌ای از طیف‌های سینتیک بازتاخوردگی پروتئین وحشی و هر یک از جهش‌یافته‌ها در بافر بازتاخوردگی آورده شده است. این فرآیند بر حسب غلظت نهایی اوره در بافر تاخوردگی، در زمان‌های مختلفی انجام شد و با توجه به غلظت نهایی اوره بازتاخوردگی در محدوده زمانی چندین ثانیه به انجام رسید (نمودار ۴-a). سینتیک تاخوردگی در مورد هر چهار پروتئین مشابه است. در هر چهار مورد منحنی‌های بازتاخوردگی به‌خوبی با معادله نمایی از نوع درجه دوم مطابقت داده شدند (نمودار ۴-b). در هر مورد، فاز اول (k_1) سریع‌ترین فاز بود که بیشترین جمعیت را داشت و بیان‌کننده فاز اصلی انتقالی تاخوردگی بود که حدود ۷۰-۸۵٪ کل تغییر سیگنال را دارا بود. دومین فاز تقریباً ۱۵-۳۰٪ کل تغییر سیگنال را داشت که نشان‌دهنده جمعیتی از مولکول‌ها بود که از این ثابت سرعت تبعیت می‌کنند. به نظر می‌رسد تغییرات اساسی ساختاری به سمت حالت تاخوردگی مثل تشکیل هسته آب‌گریز، تشکیل پیوندهای هیدروژنی، بسته‌بندی عناصر ساختار دوم و غیره از دو مسیر مختلف به انجام می‌رسد که بیشتر جمعیت مولکول‌های پروتئین مسیر سریع‌تر را انتخاب می‌کنند.

استخراج و تخلیص: پروتئین‌ها از درجه خلوص بالایی برخوردار بودند (شکل ۱).

ساختار سه‌بعدی لوسیفراز گونه ایرانی در حالی که تمامی جایگاه‌های جهش‌یافته نیز در آن مشخص است، ارایه شد (شکل ۲) و از سرور دیگری به نام PIC server برای مقایسه این برهم‌کنش‌ها در پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته استفاده شد (شکل ۳).

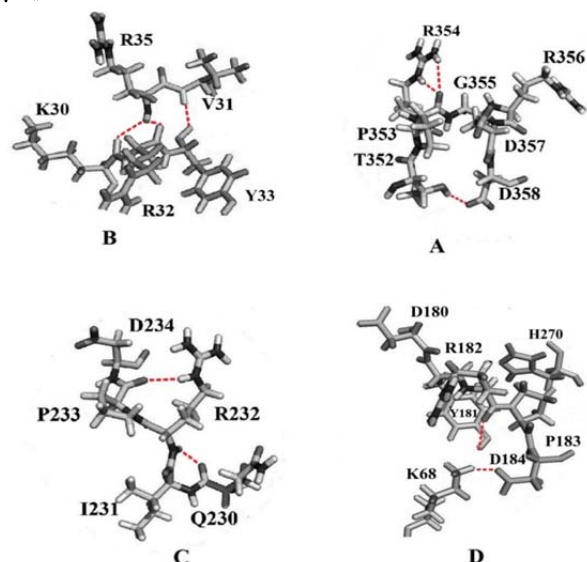
لامفیریس ترکستانیکوس و سپس تغییر در پایداری پروتئین و همچنین انرژی فعال‌سازی واکنش‌های بازتاخوردگی، از پروتئین وحشی و هر کدام از جهش‌یافته‌های آن به‌منظور مطالعات ترمودینامیک و سینتیک با استفاده از تکنیک‌های دورنگ‌نمایی دورانی، کالریمتری روبشی تفاضلی و فلورسانس جریان متوقف استفاده شد. از ساختار کریستالی لوسیفراز وحشی با کد بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB code) 4M46 به‌عنوان الگو برای مدل‌سازی هر یک از جهش‌یافته‌ها استفاده شد. براساس نرم‌افزار PIC و Rosetta به‌دلیل فضای سطحی بیشتر زنجیره جانبی آرژنین در مقایسه با رزیدوهای آب‌گریز سطحی، در میان‌کنش‌های رزیدوهای باردار بیشتری مشارکت کرده و امکان ایجاد پل‌های نمکی و جفت‌یونی به‌جای میان‌کنش‌های نامطلوب موضعی را فراهم می‌سازد.

در بخش مطالعات مربوط به پایداری ساختاری، مطابق با طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی دور، فشردگی ساختار دوم تمامی جهش‌یافته‌ها در مقایسه با پروتئین وحشی افزایش یافته است. با توجه به طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی نزدیک، تمامی جهش‌یافته‌ها در مقایسه با پروتئین وحشی، سختی موضعی ساختار سوم را افزایش داده‌اند که این افزایش سختی می‌تواند در اثر ایجاد میان‌کنش‌های جدید در جهش‌یافته‌ها نسبت به پروتئین وحشی باشد. با توجه به افزایش سیگنال فلورسانس ذاتی پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به نمونه وحشی این نتایج تایید شده است که می‌تواند بیانگر افزایش پایداری ساختاری آنها نسبت به پروتئین وحشی باشد.

بنابراین به نظر می‌رسد که جهش رزیدوهای آب‌گریز سطحی به آرژنین به‌عنوان اسیدآمینه با بار مثبت در محتوای ساختار دوم و ایجاد میان‌کنش‌های موثر در تغییر سختی ساختار سوم نقش دارد. مقادیر هر دو پارامتر ترمودینامیک دمای انتقال (T_m) و آنتالپی نمونه‌های جهش‌یافته در مقایسه با لوسیفراز وحشی افزایش یافته است، در حالی که برگشت‌پذیری در واسرشتگی دمایی این جهش‌یافته‌ها تغییر نیافته است. به نظر می‌رسد میان‌کنش‌های الکترواستاتیک اضافی، سدهای سینتیک را در برابر واسرشتگی پروتئین ایجاد کرده و اختلاف آنتالپیک بین حالت‌های تاخوردگی و واسرشته، جهش‌یافته‌ها را در T_m بالاتری قرار می‌دهند.

در بخش مطالعات سینتیک، بازتاخوردگی آنزیم لوسیفراز وحشی و ۳ جهش‌یافته ERR/Q³⁵R/I¹⁸²R/I²³²R, ERR/I²³²R, ERR با استفاده از تکنیک فلورسانس جریان متوقف بررسی شد. این تکنیک، بررسی مسیرهای موازی تاخوردگی و تعیین ثابت سرعت جمعیت‌های هر مسیر و وجود مرحله گذار و حد واسطه‌هایی که به اندازه کافی پایدار نیستند را ممکن می‌سازد. این ثابت‌های سرعت توسط ثبت فلورسانس ذاتی تریپتوفان برحسب زمان قابل محاسبه هستند. نمودار ۴ منحنی سینتیک بازتاخوردگی پروتئین لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌ها را برحسب زمان به‌دست‌آمده توسط اسپکتروسکوپی فلورسانس جریان متوقف نشان می‌دهد. این منحنی با اضافه‌کردن یک حجم از پروتئین موجود در بافر تریس با ۶ حجم از بافر اوره ۶ مولار به دست آمده است. طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر در نظر گرفته و تغییرات نثری فلورسانس در طول موج ۳۲۰ نانومتر ثبت شد. براساس نتایج آزمایشات سینتیک، بازتاخوردگی پروتئین لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌ها به‌طور مشابه در مسیرهای موازی در دو فاز سریع و آهسته با جمعیت‌های مشخص انجام می‌گیرد.

جمعیت عمده مولکول‌های لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته‌ها



شکل ۳) انواع جهش‌های ایجادشده در محل‌های: (A) ERR, (B) Q³⁵R, (C) I²³²R, (D) I¹⁸²R و پیوندهای ایجادشده با اسیدآمینه‌های مجاورشان که با استفاده از PIC-Server به دست آمده است

بحث

بیولومینسانس کاربردهای فراوانی در دامنه وسیعی از مطالعات بیولوژی مولکولی، پزشکی و طراحی سنسورهای بیولوژیک دارد. هزینه کم، حساسیت زیاد، ساده‌بودن و غیرتهاجمی‌بودن از جمله مزایای بیولومینسانس نسبت به تکنیک‌های دیگر مثل فلورسانس است.

با توجه به پایداری اندک آنزیم لوسیفراز در دمای فیزیولوژیک بدن، و اینکه هیچ نمونه گرمادوستی از آنزیم لوسیفراز وجود ندارد، تنها راه حل مفید و اساسی برای افزایش پایداری لوسیفراز به‌منظور کاربرد آن در محیط‌های "درون موجود زنده"، طراحی لوسیفرازهای جهش‌یافته با ویژگی‌های مطلوب با استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین است [27, 28].

پایداری دمایی لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس به‌وسیله جایگزینی همزمان چندین رزیدوی آب‌گریز سطحی به رزیدوی آرژنین با بار مثبت در موقعیت‌های ۳۵، ۱۸۲ و ۲۳۲ قبلاً بررسی شده و نشان داده شده که منجر به پایداری دمایی لوسیفرازهای جهش‌یافته می‌شود. افزایش میان‌کنش‌های یونی بین مولکول‌های پروتئین و حلال قطبی به‌عنوان تفسیر و توضیحی برای این نتایج ارائه شده است [8].

میان‌کنش‌های غیرکووالان نظیر میان‌کنش‌های واندروالس، هیدروژنی، آب‌گریز و الکترواستاتیک علاوه بر اینکه در پایداری یک پروتئین در حالت تاخوردگی بسیار تاثیرگذار هستند، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین انواع میان‌کنش‌ها در تعیین مکانیزم و مسیر تاخوردگی پروتئین از حالت واسرشته به حالت تاخوردگی شناخته می‌شوند [29, 30]. البته اهمیت میان‌کنش‌های الکترواستاتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است [20, 31]، که تضعیف هر کدام از این نیروها باعث ازبین‌رفتن بخشی یا کل ساختار پروتئین می‌شود [20].

در این تحقیق، با توجه به اهمیت پایداری آنزیم لوسیفراز و اهمیت بررسی مسیر تاخوردگی آنزیم لوسیفراز و نوع میان‌کنش‌های درگیر در حفظ ساختار پروتئین، پس از مشخص‌کردن اثر جهش‌ها در فشردگی ساختارهای دوم و سوم لوسیفرازهای جهش‌یافته، برای بررسی و تعیین نقش برخی از میان‌کنش‌های مورد نظر در تاخوردگی پروتئین لوسیفراز گونه

سینتیک ناشی از بهبود میان‌کنش‌های الکترواستاتیک است که منجر به درجه بالاتری از فشردگی و تراکم ساختاری می‌شود.

تشکر و قدردانی: این تحقیق با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه در آزمایشگاه‌های بیوفیزیک و بیوشیمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تضاد منافع: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

سهم نویسندگان: زهرا سلگی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ خسرو خلیفه (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ سامان حسینخانی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ بیژن رنجبر (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

منابع

- 1- Xiao L, Honig B. Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins. *J Mol Biol.* 1999;289(5):1435-44.
- 2- Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* 2000;13(3):179-91.
- 3- Kawashima T, Amano N, Koike H, Makino S, Higuchi S, Kawashima-Ohya Y, et al. Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14257-62.
- 4- Kumar S, Nussinov R. Ion pairs and their stabilities fluctuate in NMR the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J Mol Biol.* 2001;297:975-88.
- 5- Fersht AR. Protein folding and stability: The pathway of folding of barnase. *FEBS Lett.* 1993;325(1-2):5-16.
- 6- Fersht AR. Characterizing transition states in protein folding: An essential step in the puzzle. *Curr Opin Struct Biol.* 1995;5(1):79-84.
- 7- López-Hernández E, Serrano L. Structure of the transition state for folding of the 129 aa protein CheY resembles that of a smaller protein, CI-2. *Fold Des.* 1996;1(1):43-55.
- 8- Mortezaei M, Hosseinkhani S. Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops. *Protein Eng Des Sel.* 2011;24(12):893-903.
- 9- Mortazavi M, Hosseinkhani S, Khajeh K, Ranjbar B, Emamzadeh AR. Spectroscopic and functional characterization of *Lampyris turkestanicus* luciferase: A comparative study. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(5):365-74.
- 10- Ganjalikhany MR, Ranjbar B, Hosseinkhani S, Khalifeh K, Hassani L. Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase. *J Mol Catal B Enzym.* 2010;62(2):127-32.
- 11- Hosseinkhani S. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(7):1167-82.
- 12- Tisi LC, White PJ, Squirrell DJ, Murphy MJ, Lowe CR, Murray JAH. Development of a thermostable firefly luciferase. *Anal Chim Acta.* 2002;457(1):115-23.
- 13- Hirokawa K, Kajiyama N, Murakami S. Improved practical usefulness of firefly luciferase by gene chimerization and random mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1597(2):271-9.

براساس یک مسیر سینتیک سریع فولد می‌شوند که در هر مورد اولین فاز، فاز عمده و سریع‌ترین فاز با بیشترین جمعیت ۷۰-۸۵٪ است، در حالی که بقیه مولکول‌ها با وجود حد واسطه‌ای تجمع‌یافته در یک مسیر آهسته فولد می‌شوند که فاز دوم و فاز آهسته با جمعیت کم است (۳۰-۱۵٪).

مقایسه فاز عمده بازتآخوردگی نشان‌دهنده بیشتر بودن ثابت سرعت برای جهش‌یافته‌های $ERR/I^{232}R$ ، $ERR/Q^{35}R/I^{182}R/I^{232}R$ نسبت به نمونه وحشی است، در حالی که بقیه مولکول‌ها در یک مسیر آهسته‌تر به دام افتاده و به اجبار با یک سرعت آهسته‌تر فولد می‌شوند. در مسیر آهسته مولکول‌های نیمه‌فولده (حد واسطه) می‌توانند تجمع یابند. براساس ثابت سرعت، سریع‌ترین فاز مربوط به جهش‌یافته‌های $ERR/I^{232}R$ ، $ERR/Q^{35}R/I^{182}R/I^{232}R$ به ترتیب با مقدار ثابت سرعت $14/39$ و $14/33$ هستند.

با توجه به این که هر تفاوتی که در ساختار حالت گذار و مسیر واکنش بازتآخوردگی پروتئین جهش‌یافته و پروتئین وحشی مشاهده شود مربوط به شکست و بست میان‌کنش یا میان‌کنش‌های مرتبط به اسید آمینه‌ای است که در جهش‌یافته‌ها تغییر یافته است، می‌توان گفت که بیشتر بودن ثابت سرعت تآخوردگی در فاز سریع برای پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی احتمالاً بیانگر نقش موثر رزیدوی آرژنین و میان‌کنش‌های مربوط به آن در مسیر تآخوردگی پروتئین از حالت واسرشته است و به نظر می‌رسد که حضور آرژنین از طریق افزایش میان‌کنش‌های هیدروژنی و یونی به عنوان نیروهای پیش‌برنده آنتالپیک بر پایداری ساختاری و سرعت تآخوردگی موثر باشند. بنابراین می‌توان گفت که افزایش رزیدوی آرژنین با بار مثبت در سطح در معرض حلال پروتئین با ایجاد میان‌کنش‌های موضعی و افزایش سرعت تآخوردگی و انتقال رزیدوهای هیدروفوب به نواحی داخلی‌تر پروتئین باعث فشردگی بیشتر ساختار پروتئین می‌شود. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد در پروتئین‌های جهش‌یافته، وجود بارهای مثبت و در نتیجه میان‌کنش‌های الکترواستاتیک کسب سختی و استحکام ساختار سوم پروتئین را سریع‌تر فراهم می‌سازد.

برای تقسیم‌بندی سینتیک بازتآخوردگی در دو مسیر سریع و آهسته دو مدل امکان‌پذیر است. در اولین مدل یک مخلوط ناهمگن از دو نوع مولکول واسرشته سریع و آهسته (U_1, U_2) در حال تآخوردن وجود دارد و تا زمانی که سرعت بازتآخوردگی مولکول‌های سریع در مقایسه با واکنش تبدیل دو گونه مولکولی به هم بیشتر و سریع‌تر است تآخوردگی در مسیرهای موازی رخ می‌دهد. دومین مکانیزم احتمالی که به کانال‌های موازی بازتآخوردگی منجر می‌شود، تقسیم‌بندی سینتیک در طول بازتآخوردگی است. در این مورد بازتآخوردگی از یک نوع همگن شروع می‌شود اما بخشی از مولکول‌ها می‌تواند مستقیماً به حالت نیترو فولد شود، در حالی که در یک واکنش رقابتی بقیه مولکول‌ها در حالت نیمه‌تآخورده به دام افتاده که سرعت تبدیل به حالت طبیعی را کاهش می‌دهند. بنابراین این فاز ممکن است به عنوان مرحله محدودکننده در تآخوردگی پروتئین بررسی شود. مرحله محدودکننده در تمامی جهش‌یافته‌ها نسبت به پروتئین وحشی سریع‌تر شده است.

نتیجه‌گیری

ثابت سرعت بازتآخوردگی آنزیم‌های جهش‌یافته نسبت به نوع وحشی افزایش پیدا کرده است. بهبود پارامترهای ترمودینامیک و

- serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39(5):530-6.
- 24- Khalifeh K, Ranjbar B, Khajeh K, Naderi Manesh H, Sadeghi M, Gharavi S. A stopped-flow fluorescence study of the native and modified lysozyme. *Biologia.* 2007;62(3):258-64.
- 25- Gill P, Tohidi Moghadam T, Ranjbar B. Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech.* 2010;21(4):167-93.
- 26- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201.
- 27- DeLuca M, McElroy WD. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry.* 1974;13(5):921-5.
- 28- Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids.* 2008;34(1):25-33.
- 29- Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.* 2000;470(1):65-9.
- 30- Pace CN, Alston RW, Shaw KL. Charge-charge interactions influence the denatured state ensemble and contribute to protein stability. *Protein Sci.* 2000;9(7):1395-8.
- 31- Protasevich I, Ranjbar B, Lobachov V, Makarov A, Gilli R, Briand C, et al. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: Role of electrostatic mutations. *Biochemistry.* 1997;36(8):2017-24.
- 14- Law GH, Gandelman OA, Tisi LC, Lowe CR, Murray JA. Mutagenesis of solvent-exposed amino acids in *Photinus pyralis* luciferase improves thermostability and pH-tolerance. *Biochem J.* 2006;397(2):305-12.
- 15- Khalifeh K, Ranjbar B, Alipour BS, Hosseinkhani S. The effect of surface charge balance on thermodynamic stability and kinetics of refolding of firefly luciferase. *BMB Rep.* 2011;44(2):102-6.
- 16- Mehrabi M, Hosseinkhani S, Ghobadi S. Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes. *Int J Biol Macromol.* 2008;43(2):187-91.
- 17- Arakawa T, Timasheff SN. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J.* 1985;47(3):411-4.
- 18- White PJ, Squirrell DJ, Arnaud P, Lowe CR, Murray JA. Improved thermostability of the North American firefly luciferase: Saturation mutagenesis at position 354. *Biochem J.* 1996;319(Pt 2):343-50.
- 19- Said Alipour B, Hosseinkhani S, Ardestani SK, Moradi A. The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(6):847-55.
- 20- Maghami P, Ranjbar B, Hosseinkhani S, Ghasemi A, Moradi A, Gill P. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. *Photochem Photobiol Sci.* 2010;9(3):376-83.
- 21- Noble JE. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes. *Methods Enzymol.* 2014;536:17-26.
- 22- Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses - a review. *Chem Biol Drug Des.* 2009;74(2):101-20.
- 23- Rezaei Tavirani M, Moghaddamnia SH, Ranjbar B, Amani M, Marashi SA. Conformational study of human