



Effect of Replacement of Arginine 39 Amino Acid with Lysine on the Heat Denaturation of Mnemiopsis Photoprotein 1

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hakimi Nia F.¹ PhD,
Khalifeh Kh.² PhD,
Hasan sajadi R.³ PhD,
Ranjbar B.^{*1} PhD

How to cite this article

Hakimi Nia F, Khalifeh Kh, Hasan sajadi R, Ranjbar B. Effect of Replacement of Arginine 39 Amino Acid with Lysine on the Heat Denaturation of Mnemiopsis Photoprotein 1. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):451-457.

ABSTRACT

Aims Studies based on thermal stability are considered as one of the methods for investigating the physicochemical properties of proteins in biotechnology. The aim of this study was to evaluate the effect of replacement of Arginine 39 amino acid with lysine on the heat denaturation of mnemiopsis photoprotein 1.

Materials & Methods In the current experimental study, R39K mutated mnemiopsis was compared with wild protein (in which arginine 39 amino acid was converted to the lysine amino acid). In order to investigate the effect of mutation on the content of the secondary structure, a rotation interpolation method was used. To investigate the possible changes in the rate of thermal stability of mutated and wild proteins, heat denaturation measurements were performed by differential scanning calorimeter. Bioinformatics software were used to compare the structure of two types of proteins.

Findings The mutated R39K compression decreased in comparison with wild protein. No significant change was observed in the values of thermodynamic parameters, especially T_m. The upward movement of arginine 187 amino acid in the mutated protein decreased the thermal stability of this protein. Increasing the accessible surface of lysine 188 in the mutated protein increased its stability.

Conclusion In thermal stability of the R39K mutated protein, various factors are effective, including the molecular movements of amino acids, their accessible surface, and the content of the secondary structure of protein stabilizing. This mutation reduces the mutated R39K compression rather than the wild protein; increasing ASA related to Lys188 amino acid in the mutated R39K compared with wild protein increases protein stability, but reducing the amount of secondary structure in this mutated, accompanied by an increase in the molecular upward movement in the Arg187 amino acid serves to reduce the stability of this mutated.

Keywords Thermal Stability; Mnemiopsis; Molecular Movements; Accessible Surface; Differential Scaling Calorimetry

CITATION LINKS

[1] Factors enhancing protein ... [2] Advances in engineering of proteins for ... [3] Differential scanning calorimetry techniques: Applications ... [4] DSC Study of the thermal stability of S-protein ... [5] Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin ... [6] Molecular evolution of the Ca²⁺-binding photoproteins ... [7] Cloning, sequencing, expression and structural ... [8] Evolution of EF-hand calcium-modulated ... [9] Improved indicators of cell membrane potential ... [10] Use of photoproteins as intracellular calcium ... [11] Photoproteins as luminescent labels ... [12] Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein ... [13] Properties of mnemiopsis and berovin ... [14] Extraction and purification of calcium-activated ... [15] Evolution of bioluminescence in marine ... [16] Crystal structure of obelin after Ca²⁺-triggered ... [17] All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins ... [18] The crystal structure of the photoprotein ... [19] Aequorin variants with improved ... [20] Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsis ... [21] A unique EF-hand motif in mnemiopsis ... [22] Hyperactive Arg39Lys mutated mnemiopsis: Implication of positively ... [23] Circular dichroism techniques: Biomolecular ... [24] Two-stage PCR protocol allowing introduction ... [25] Determination of the secondary structures ... [26] Relationship between stability and bioluminescence ... [27] Kinetic and thermodynamic properties of ... [28] Statistical mechanical deconvolution of thermal ... [29] Current protocols in ... [30] Backrub-like Backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant ... [31] Marinobacter persicus sp. noacterium from a saline ... [32] PIC: Protein interactions ... [33] Predicting protein flexibility through ... [34] PredyFlexy: flexibility and local structure ... [35] Methods in molecular biophysics: Structure, dynamics ... [36] A simple method for displaying the hydropathic character of ...

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

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

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

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-e-Al-e-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883418
Fax: -
ranjbarb@modares.ac.ir

Article History

Received: April 28, 2015

Accepted: March 06, 2018

ePublished: September 22, 2018

تاثیر جایگزینی اسیدآمینه آرژینین ۳۹ با لیزین روی واسرشتگی گرمایی فتوپروتئین نمپوسین ۱

فروغ حکیمی‌نیا PhD

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

خسرو خلیفه PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان

رضا حسن ساجدی PhD

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

بیژن رنجبر PhD*

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

چکیده

اهداف: مطالعات مبتنی بر پایداری گرمایی به‌عنوان یکی از روش‌های بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها در زیست‌فناوری مطرح هستند. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر جایگزینی اسیدآمینه آرژینین (Arg) شماره ۳۹ با لیزین (Lys) روی واسرشتگی گرمایی فتوپروتئین نمپوسین بود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق تجربی حاضر، جهش‌یافته R39K با پروتئین وحشی مقایسه شد (در آن اسیدآمینه آرژینین ۳۹ به اسیدآمینه لیزین تبدیل شده است). برای بررسی اثر جهش روی محتوای ساختار دوم، تکنیک دورنگ‌نمایی دورانی به کار رفت. به‌منظور بررسی تغییرات احتمالی در میزان پایداری حرارتی پروتئین جهش‌یافته و وحشی، اندازه‌گیری‌های واسرشتگی دمایی توسط دستگاه کالری‌متری روبشی تفاضلی صورت گرفت. از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک برای مقایسه ساختاری دو نوع پروتئین استفاده شد.

یافته‌ها: فشردگی جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی کاهش یافت. تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقادیر پارامترهای ترمودینامیک به‌ویژه T_m مشاهده نشد. بالاتر بودن جنبش‌های مولکولی اسیدآمینه آرژینین شماره ۱۸۷ در پروتئین جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی پایداری این پروتئین را کاهش داد. افزایش سطح در دسترس لیزین شماره ۱۸۸ در پروتئین جهش‌یافته موجب افزایش پایداری آن شد.

نتیجه‌گیری: در پایداری حرارتی پروتئین جهش‌یافته R39K عوامل مختلفی شامل جنبش‌های مولکولی اسیدآمین‌ها، سطح در دسترس آنها و محتوای ساختارهای دوم پایداری‌کننده پروتئین تاثیرگذار هستند. این جهش فشردگی جهش‌یافته R39K را نسبت به پروتئین وحشی کاهش می‌دهد، افزایش ASA مربوط به اسیدآمین Lys188 در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی موجب افزایش پایداری پروتئین می‌شود ولی کاهش میزان ساختار دوم در این جهش‌یافته همراه با بالاتر بودن جنبش‌های مولکولی در اسیدآمین Arg187 در جهت کاهش پایداری این جهش‌یافته عمل می‌کند.

کلیدواژه‌ها: پایداری گرمایی، نمپوسین، جنبش‌های مولکولی، سطح در دسترس، کالری‌متری روبشی تفاضلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵

*نویسنده مسئول: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

مطالعات مبتنی بر پایداری گرمایی به‌عنوان یکی از روش‌های بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها، در زیست‌فناوری مطرح است که مهم‌ترین علت اهمیت این نوع مطالعات، تعیین پارامترهای مورد نیاز برای افزایش پایداری گرمایی در بسیاری از پروتئین‌های تغییر یافته است. انرژی پایدارسازی یک پروتئین در حالت تعادل (ΔG) اختلاف انرژی آزاد بین فرم تاخورده و واسرشته آن است که شامل دو فاکتور عمده اختلاف آنتالپی (ΔH) و اختلاف آنتروپی (ΔS) است که البته این عوامل تحت تاثیر دما تغییر می‌کنند. بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که انرژی آزاد پایدارسازی یک پروتئین به میزان زیادی به دما وابسته است. در دماهای بالاتر مقدار انرژی آزاد پایدارسازی به میزانی تغییر می‌کند که پروتئین به‌صورت خودبه‌خود ناپایدار شده و به حالت واسرشته

درآید. واسرشتگی دایمی یک پروتئین معمولاً همراه با تشکیل رسوبات مولکولی است که ایجاد این رسوبات نیز به‌دلیل بازشدن هسته هیدروفوب داخل پروتئین است [1].

عوامل تاثیرگذار دیگر در تعیین پایداری گرمایی یک پروتئین انواع برهم‌کنش‌های ضعیف نظیر هیدروژنی، واندروالس، یونی و غیره هستند. هنگام واسرشتگی یک پروتئین به میزان مشخصی از انرژی برای شکستن این پیوندها نیاز است. از طرفی انرژی مورد نیاز برای شکستن یک میان‌کنش آب‌گریز با شکستن صدها پیوند یونی دوربرد برابر است. مقدار انرژی موردنیاز برای شکستن یک برهم‌کنش باردار با دما افزایش می‌یابد و این به‌دلیل کاهش ثابت دی‌الکتریک آب در دماهای بالاتر است، بنابراین میان‌کنش‌های بین اسیدآمین‌های باردار موجود در سطح پروتئین با مولکول‌های آب می‌تواند تاثیر بسزایی در پایداری گرمایی پروتئین داشته باشد. نکته قابل توجه دیگر این است که میان‌کنش آب‌گریز برخلاف میان‌کنش‌های ضعیف دیگر با افزایش دما تقویت می‌شود زیرا به برخورد‌های مولکولی و آنتروپی وابسته است [2].

از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که واسرشتگی دمایی پروتئین‌ها معمولاً از مدلی تبعیت می‌کند که در آن ابتدا تغییرات ساختاری به‌صورت برگشت‌پذیر و به فرم دوحالته انجام می‌شود و در مرحله دوم تغییرات ساختاری بیشتری رخ داده و پروتئین به‌صورت کامل و برگشت‌ناپذیر به حالت واسرشته در می‌آید. برای بررسی واسرشتگی گرمایی روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از بهترین روش‌های موجود روش کالری‌متری روبشی تفاضلی (DSC) است [3]. کالری‌متری یک روش مناسب برای اندازه‌گیری خصوصیات گرمایی مولکول‌ها است و بدین طریق ارتباط بین دما و ویژگی‌های فیزیکی مواد مشخص می‌شود. روش کالری‌متری روبشی تفاضلی روش مناسبی برای تعیین چگونگی تغییر خصوصیات شیمی- فیزیکی یک نمونه مولکولی در طول زمان با افزایش دما است. در آزمایش‌های DSC ابتدا به هر دو سل نمونه و کنترل (پرسده با بافر) حرارت داده و ترموگرام پایه ثبت می‌شود، سپس سل نمونه با پروتئین مورد مطالعه پر و ترموگرام آن به‌صورت ظرفیت گرمایی در فشار ثابت علیه دما اندازه‌گیری و گزارش می‌شود. سرانجام حاصل تفاضل این ترموگرام و ترموگرام پایه اطلاعات مستقیمی در مورد فرآیندهای وابسته به دما از جمله واسرشتگی گرمایی در اختیار محقق قرار می‌دهد [4, 5].

امروزه فتوپروتئین‌هایی شناخته شده‌اند که توانایی نشر نور در محیط‌های آبی به محض افزودن مقدار کمی یون کلسیم (Ca^{2+}) را داشته و به طرز جالبی حتی در غیاب اکسیژن نیز از خود نور ساطع می‌کنند. فتوپروتئین‌های نمپوسین و بروین به‌ترتیب از نمپوسینس لیدی (*Mnemiopsis leidyi*) و برئو اوتا (*Beroe*) از شاخه شانه‌داران (Ctenophora) جداسازی و تخلیص شده‌اند. این فتوپروتئین‌ها به کلسیم وابسته و به نور حساس هستند، به‌طوری که توسط طیف گسترده‌ای از نور (طول موج ۲۳۰ تا ۵۷۰ نانومتر) غیرفعال می‌شوند [6-8].

آکورین و اوبلین به‌عنوان دو فتوپروتئین شناخته‌شده به‌ترتیب از آکورا (Aequorea) و اوبلیا (Obelia) از شاخه مرجانیان (Cnidarian) استخراج شده‌اند ولی از طرف دیگر تحقیقات اندکی روی فتوپروتئین‌های شانه‌داران انجام شده است. تحقیقات ارایه‌شده روی فتوپروتئین‌ها، به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد این پروتئین‌ها در نشر نور است. علاوه بر آن حساسیت تشخیصی بالای این پروتئین‌ها و همچنین نويز زمینه‌ای اندک ایجادشده توسط آنها موجب استفاده از آنها به‌عنوان یک نشانگر مناسب در مطالعه

مواد و روش‌ها

در تحقیق تجربی حاضر از جهش‌یافته R39K فتوپروتئین نمپوسین ۱ استفاده شد (این جهش‌یافته توسط روش Quik change در مطالعات قبلی ایجاد شده بود)^[24].

با استفاده از سازه‌های ژنی حاوی ژن کدکننده نمپوسین وحشی و جهش‌یافته، آپروتن‌های مربوطه همراه با دنباله هیستیدینی در باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) بیان و سپس توسط ستون نیکل- آگارز تخلیص شد. پس از تخلیص پروتئین‌ها شرایط دناتوراسیون حرارتی برای انجام الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید- سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) انجام شد که باندهای پروتئینی مورد نظر در محدوده ۲۷ کیلودالتون با خلوص بالا برای پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته مشاهده شدند.

پس از به‌دست‌آوردن پروتئین‌های خالص مورد نظر فعالیت آنها تعیین شد^[20]. برای انجام این کار ابتدا با توجه به غلظت پروتئین به‌دست‌آمده، حجم مناسبی از آن به همراه ۸ میکرولیتر محلول کلنترازین ۵۰ میکرومولار، توسط بافر مونوفسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (NaH₂PO₄ 50mM)، سدیم‌کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار (NaCl 300 mM) و pH برابر ۸، به حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر رسانده و در دمای ۴۰°C به مدت ۱۵ ساعت انکوبه شد، سپس با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلریدکلسیم ۴۰ میلی‌مولار در بافر ذکرشده در تاریکی، شدت بیولومینسانس اولیه اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری‌های دورنگ‌نمایی دورانی: برای اندازه‌گیری‌های دورنگ‌نمایی دورانی، دستگاه اسپکتروپلاری‌متر مدل J-715 (جاسکو؛ ژاپن) به کار رفت و نتایج حاصل از این مطالعات به‌صورت بیضی‌واری مولی $[\Theta]$ با واحد $\text{degree cm}^2\text{dmol}^{-1}$ گزارش شد که این پارامتر توسط رابطه $[\Theta]\lambda = (\Theta \times \text{path length})$ (100MRW/cl) و نرم‌افزار جاسکو قابل محاسبه است. در این رابطه، MRW وزن متوسط هر اسیدآمینه و c غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. فاکتورهای L و Θ نیز به‌ترتیب بیانگر طول مسیر نور برحسب سانتی‌متر و بیضی‌واری برحسب درجه است.

سپس براساس نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از روش یانگ (YANG) محتوای ساختارهای دوم به دست آمد^[24-27]. برای این اندازه‌گیری‌ها غلظت پروتئین را به حدود ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسانده و سپس با استفاده از بافر مونوفسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار، سدیم‌کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار و pH برابر ۸، تغییرات ساختار دوم محاسبه شد.

آزمایش‌های کالری‌متری روبشی تفاضلی: آزمایش‌های کالری‌متری به‌وسیله کالری‌متر روبشی تفاضلی Nano-DSCIII در بازه دمایی ۸۰-۱۰°C با سرعت اسکن دمایی ۱°C/min در فشار ثابت ۲ اتمسفر انجام شد.

در این مطالعه پروتئین با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مونوفسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار، سدیم‌کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار و pH برابر ۸/۰ استفاده شد و تمام محلول‌های پروتئینی قبل از تزریق در کووت دستگاه به‌مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط خلا قرار گرفتند. ترموگرام‌های DSC توسط نرم‌افزار Nano Analyze آنالیز شدند. با استفاده از این نرم‌افزار می‌توان خط پایه‌های حالت تاخورد و واسرشته پروتئینی را به دست آورد که این خط‌ها بر پایه C_p پروتئین به دست می‌آیند^[3, 28].

مطالعات بیوانفورماتیک: با توجه به اینکه ساختار پروتئین نمپوسین با روش‌های مرسوم بیوفیزیکی تعیین نشده است،

وقایع داخل سلولی وابسته به کلسیم و همچنین در سنجش اتصالات اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها شده است^[9-12].

کلونینگ و بیان cDNA کدکننده دو ایزوفرم نمپوسین اخیراً انجام شده است^[13, 14]. نمپوسین ۱ همسانی بالایی (در حدود ۹۰٪ توالی) با برووین به‌عنوان یک فتوپروتئین دیگر از شانه‌داران (PDB ID: 4MNO) از خود نشان می‌دهد^[7, 12]. این پروتئین‌های کروی سه دومین EF-hand برای اتصال به کلسیم و یک کلنترازین پراکسیده در حفره مرکزی پروتئین دارند، اما پس از اتصال یون‌های کلسیم تغییرات ساختاری در پروتئین رخ می‌دهد که نتیجه آن آزادسازی Ca^{+2} همراه با تشعشع نور است^[15-17].

براساس ساختار کریستالی موجود از فتوپروتئین‌های متصل به کلسیم مانند آکورین و اوبلین از کیسه‌تنان (Coelenterate) و برووین از شانه‌داران، محل اتصال کلنترازین یک حفره آب‌گریز در مرکز فتوپروتئین‌ها با ۲۱ اسیدآمینه محافظت‌شده تشخیص داده شده است^[18] و میان‌کنش‌های آب‌گریز به‌عنوان یک فاکتور مهم در قرارگیری سوپسترا در حفره اتصال پروتئین هستند. در حفره اتصال کروموفور در فتوپروتئین‌های آکورین و اوبلین علاوه بر اسیدآمینه‌های آب‌گریز تعدادی زنجیره آب‌دوست مانند هیستیدین و تیروزین نیز وجود دارد. این زنجیره‌های جانبی یک شبکه هیدروژنی ایجاد می‌کنند که باعث پایداری هیدروپراکسی کلنترازین می‌شوند ولی در فتوپروتئین‌های تنوفورا یعنی نمپوسین و برووین این اسیدآمینه‌ها توسط اسیدآمینه‌های آب‌گریزی مانند لوسین، فیل‌آلانین و متیونین جایگزین می‌شوند^[17, 19]. ساختار کریستالی آکورین و اوبلین در درک ساختار جایگاه‌های اتصال بسیار مهم هستند. اخیراً برای تعیین ارتباط بین خاصیت بیولومینسانس و ویژگی‌های ساختاری نمپوسین ۱ در فتوپروتئین‌های شانه‌داران، از روش جهش‌زایی هدفمند برای مشخص کردن تأثیرات یک‌سری از اسیدآمینه‌های حیاتی روی ساختار و فعالیت این فتوپروتئین‌ها استفاده شده است^[20]. همان‌طور که ذکر شد در جایگاه اتصال کلنترازین در فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم، اسیدآمینه‌های آب‌گریزی مانند لوسین، ایزولوسین و تربیتوفان وجود دارند. سپس مشخص شد که جایگاه اتصال کلنترازین در تنوفورا مانند نمپوسین، برووین و بولینوسین، اسیدآمینه‌های با بار مثبت مانند آرژینین در پکت اتصال دارد. البته در همین موقعیت در فتوپروتئین‌های کلنترات اسیدآمینه متیونین قرار دارد^[7, 21]. در مطالعات قبلی در جایگاه اسیدآمینه آرژینین شماره ۳۹ (Arg39) در نمپوسین ۱ جهشی ایجاد شد و در پی آن، یک جهش‌یافته با بار مشابه (R39K) به دست آمد، در مقایسه با پروتئین وحشی، این جهش‌یافته فعالیت بالایی در حدود ۹ برابر را نشان می‌دهد^[22].

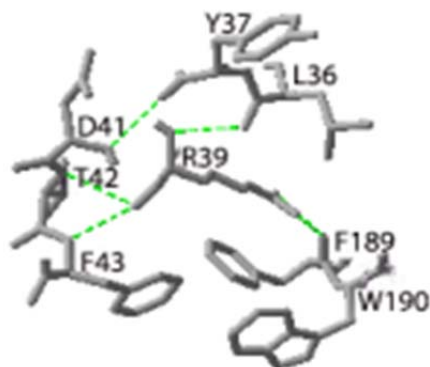
در تحقیق حاضر برای بررسی اثر این جهش‌یافته روی محتوای ساختار دوم، از تکنیک دورنگ‌نمایی دورانی (Far UV-CD) استفاده شد^[23]. از طرف دیگر برای بررسی تغییرات احتمالی در میزان پایداری حرارتی پروتئین جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی، اندازه‌گیری‌های واسرشتگی دمایی توسط دستگاه کالری‌متری روبشی تفاضلی (DSC) انجام شد^[3, 4]. علاوه بر آن از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی برای مقایسه ساختاری جهش‌یافته R39K و پروتئین وحشی استفاده شد.

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر جایگزینی اسیدآمینه آرژینین شماره ۳۹ با لیزین روی واسرشتگی گرمایی فتوپروتئین نمپوسین با استفاده از روش‌های تجربی و تئوری انجام شد.

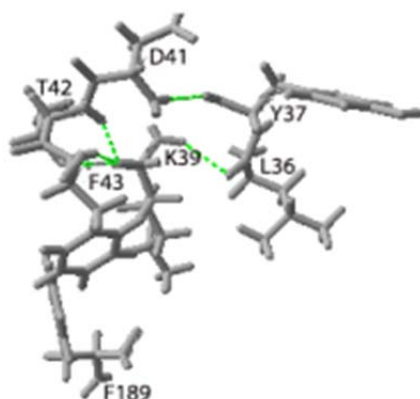
یافت و این کاهش به‌وسیله افزایش ساختار نامنظم جبران شد (داده‌ها نشان داده نشده است)، این موضوع نشان‌دهنده کاهش فشردگی ساختاری در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی بود (نمودار ۱).

نمودار ۲ ترموگرام‌های دو پروتئین مورد نظر را در محدوده دمایی ۲۵-۵۵°C نشان داده است.

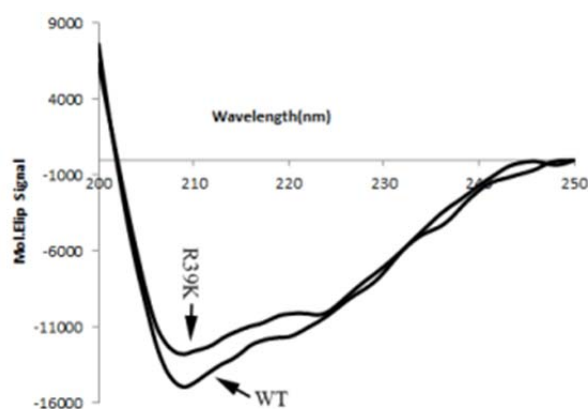
A



B



شکل ۲) میان‌کنش‌های غیرکووالان ایجادشده بین اسیدآمینه‌های R39 و K39 با اسیدآمینه‌های مجاور: A) R39، B) K39



نمودار ۱) طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور مربوط به پروتئین نمپوسین و جهش‌یافته R39K در بافر فسفات

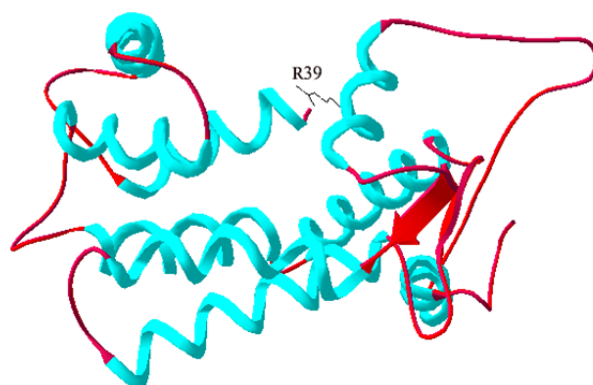
بنابراین ساختار این پروتئین با استفاده از نرم‌افزار MODELLER شبیه‌سازی شد [29]. سپس سرور RosettaBackrub [آدرس: [http://kortemmelab.ucsf.edu\(backrub\)](http://kortemmelab.ucsf.edu(backrub))] برای مدل‌سازی ساختار جهش‌یافته به کار رفت [30]. برای استفاده از این سرور، ابتدا باید ساختار پروتئین به فرمت PDB وارد شود که در نهایت سرور مجموعه‌های ساختاری نزدیک به ساختار پروتئین وحشی را ایجاد می‌کند.

از طرفی هر کدام از اسیدآمینه‌های موجود در پروتئین با اسیدآمینه‌های دیگر موجود در ساختار، انواعی از میان‌کنش‌های ضعیف مانند پیوندهای هیدروژنی، آب‌گریز، الکترواستاتیک و غیره نیز تشکیل می‌دهند که در اینجا از سرور دیگری به نام PIC Server [آدرس: <http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>] برای مقایسه این برهم‌کنش‌ها در پروتئین وحشی و جهش‌یافته استفاده شد که برهم‌کنش‌های محاسبه‌شده توسط swiss-pdb با جزئیات بیشتر بررسی شدند [31]. برای تعیین سطح در دسترس هر کدام از اسیدآمینه‌ها از سرور VADAR استفاده شد. این سرور به‌صورت مجزا سطح در دسترس اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین وحشی و جهش‌یافته را در اختیار کاربر قرار می‌دهد. این سرور از طریق آدرس <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar> در دسترس است [32].

در نهایت از سرور PredyFlexy [آدرس: <http://www.dsimb.inserm.fr/dsimb-tools/predyflexy>] برای بررسی نوسانات و جنبش‌های هر کدام از اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین استفاده شد. در این سرور ابتدا توالی پروتئین وحشی و جهش‌یافته به فرم FastA به‌عنوان ورودی در اختیار سرور قرار گرفت و در نهایت دو پارامتر B-factor و RMSF به‌عنوان دو فاکتور مهم در تعیین جنبش‌های مولکولی به‌ترتیب در حالت کریستال و حلال پروتئین به دست آمد [33, 34].

یافته‌ها

دیاگرام نواری پروتئین نمپوسین ۱ پیشگویی شد. در شکل ۱ جایگاه جهش ایجادشده نشان داده شده است. میان‌کنش‌های غیرکووالان ایجادشده بین اسیدآمینه‌های R39 و K39 با اسیدآمینه‌های مجاور در شکل ۲ مشخص شده‌اند.



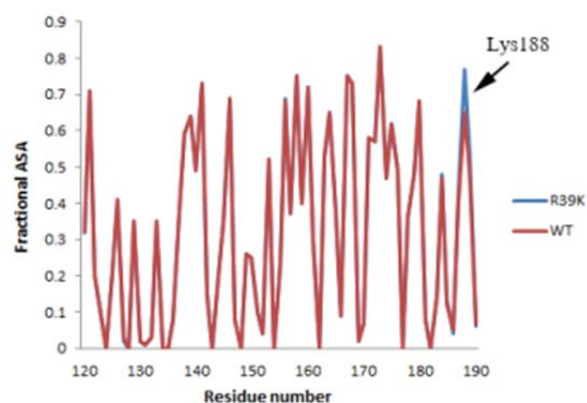
شکل ۱) دیاگرام نواری پروتئین نمپوسین ۱ (جایگاه جهش ایجادشده)

طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور نشان داد که محتوای ساختار دوم در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی کاهش

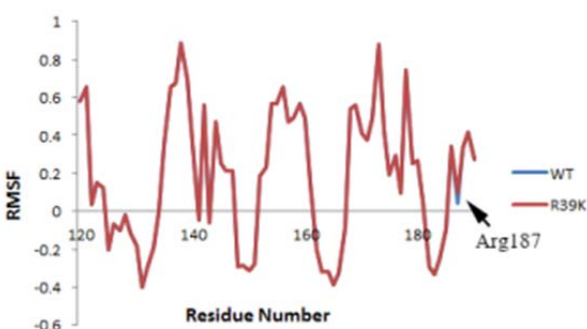
دسترس این اسیدآمینه در جهش‌یافته مورد نظر نسبت به پروتئین وحشی افزایش یافت (نمودار ۳).

افزایش ASA اسیدآمینه لیزین از نظر فیزیکی مطلوب بود و گروه جانبی آب‌دوست این اسیدآمینه با نمره آب‌گریزی ۳/۵- باعث شد که این اسیدآمینه در سطح پروتئین قرار گیرد و در نتیجه برهم‌کنش لیزین با بخش قطبی مولکول‌های آب ایجاد شد.

در جنبش‌های مولکولی زنجیره اصلی اسیدآمینه آرژینین شماره ۱۸۷ (Arg187) تفاوت مشاهده شد و انعطاف‌پذیری در زنجیره اصلی پروتئین جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی در اسیدآمینه Arg187 بیشتر بود (نمودار ۴).



نمودار ۳ سطح در دسترس مربوط به اسیدآمینه‌های شماره ۱۲۰ تا ۱۹۰ در پروتئین وحشی و جهش‌یافته R39K (در این نمودار تفاوت سطح در دسترس مربوط به اسیدآمینه لیزین شماره ۱۸۸ (Lys188) مشخص شده است)

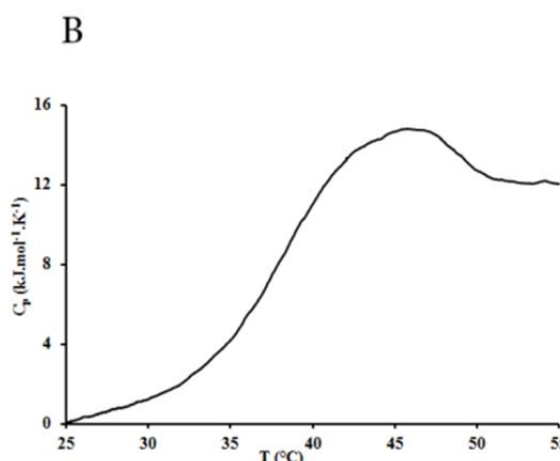
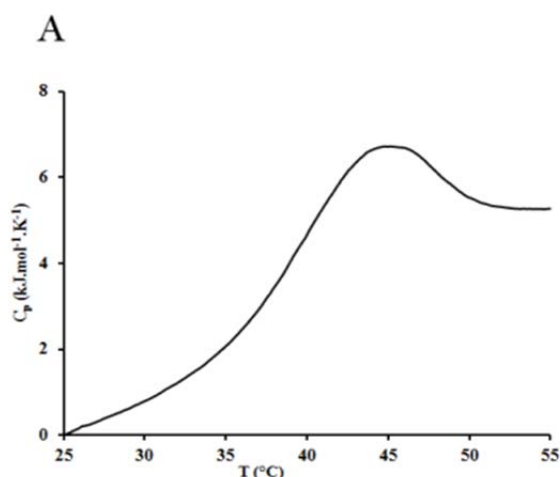


نمودار ۴ پروفایل RMSF جنبش‌های مولکولی به‌دست‌آمده برای پروتئین وحشی و جهش‌یافته R39K بین اسیدآمینه‌های شماره ۱۲۰ تا ۱۹۰ (در این نمودار تفاوت RMSF مربوط به اسیدآمینه Arg187 بین دو پروتئین نشان داده شده است)

بحث

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر جایگزینی اسیدآمینه آرژینین شماره ۳۹ با لیزین روی واسرشتگی گرمایی فتوپروتئین نمپوسین با استفاده از روش‌های تجربی و تئوری انجام شد.

در واسرشتگی دمایی با افزایش آنتروپی در اثر افزایش دما، حالت‌های مختلف ساختاری در پروتئین‌ها ایجاد می‌شود که البته تشکیل این حالت‌های مختلف بر حسب خصوصیات شیمی-فیزیکی اسیدآمینه‌های متفاوت احتمالات مختلفی را ایجاد می‌کند. برای مثال اسیدآمینه گلیسین بالاترین احتمال برای تشکیل حالات مختلف پروتئینی را به وجود می‌آورد و این عامل به‌دلیل افزایش بالای آنتروپی در دماهای بالاتر تحت تأثیر گلیسین است ولی از جهت دیگر پرولین به‌عنوان یک اسیدآمینه سخت عکس حالت گلیسین را از خود نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان



نمودار ۲ پروفایل‌های DSC مربوط به پروتئین نمپوسین؛ الف) وحشی، ب) R39K (برای نمایش بهتر پیک‌ها میزان ظرفیت گرمایی این پروتئین‌ها در جهت محور y جابه‌جا شد)

تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقادیر پارامترهای ترمودینامیک به ویژه T_m مشاهده نشد. طبق میزان پایداری جهش‌یافته R39K بر اثر دنا‌توراسیون گرمایی به میزان زیادی نسبت به پروتئین وحشی تغییر نکرد و فاکتور R برای پروتئین وحشی و جهش‌یافته به‌ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۴۲ به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱ پارامترهای ترمودینامیک فرآیندهای دنا‌توراسیون گرمایی پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته نمپوسین

متغیرها	نوع وحشی (WT)	جهش‌یافته (R39K)
$\Delta H_{cal}^\ddagger$	۱۰۳/۰	۱۲۸/۳
$\Delta H_{v,H}^\ddagger$	۳۸۳/۵±۰/۵	۳۰۶/۳±۰/۳
فاکتور R	۰/۲۷	۰/۴۲
$T_m^\ddagger$	۴۳/۵	۴۴/۸

‡ دیمانسین ΔH_{cal} و ΔH بر حسب کیلوژول بر مول (KJ/mol) و T_m بر حسب $^\circ C$

در هر دو پروتئین دو اسیدآمینه پرولین شماره ۱۲۱ (Pro121) و گلیسین شماره ۱۱۹ (Gly119) با داشتن خصوصیات آب‌گریزی، در سطح پروتئین قرار گرفتند، از طرف دیگر این دو اسیدآمینه همچنان انعطاف‌پذیری بالایی نیز از خود نشان دادند (نمودار ۳).

سطح در دسترس اسیدآمینه‌ها (ASA) مربوط به اسیدآمینه لیزین شماره ۱۸۸ (Lys188) در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی افزایش نشان داد. از طرف دیگر مقایسه ASA در اسیدآمینه Lys188 پروتئین وحشی و جهش‌یافته نشان داد که سطح در

نتیجه گرفت توالی اسیدآمینه‌ای در یک پروتئین به میزان زیادی بر پایداری گرمایی پروتئین‌ها تأثیرگذار است [1, 2].

فاکتور R با تقسیم ΔH_{cal} بر $\Delta H_{v.H}$ به دست می‌آید. با توجه به این نکته که در نمونه‌هایی با آنتالپی‌های کالری‌متری و وانت‌هوفی نامساوی، تبدیل پروتئین طبیعی تاخورد به واسرشته از طریق یک حدواسط انجام می‌شود، بزرگ‌تر بودن آنتالپی وانت‌هوفی نسبت به آنتالپی کالری‌متری نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی است [3, 35]. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که واسرشتگی این پروتئین از طریق ایجاد میان‌کنش‌های بین‌مولکولی شروع شده و با توجه به اینکه با افزایش دما جنبش‌های مولکولی بیشتر می‌شود، بنابراین باید عامل اصلی ایجاد تجمع‌های مولکولی میان‌کنشی باشد که با افزایش دما تقویت می‌شود و با توجه به اینکه میان‌کنش آب‌گریز تنها میان‌کنشی است که با افزایش دما تقویت می‌شود بنابراین می‌توان گفت در فرآیند واسرشتگی دمایی ابتدا با افزایش دما برخورد‌های مولکولی بیشتر شده و پروتئین‌ها از طریق سطوح آب‌گریز در دسترس خود می‌توانند میان‌کنش‌های بین‌مولکولی برقرار کنند و در ادامه با افزایش بیشتر دما واسرشتگی کامل این گونه‌های مولکولی رخ می‌دهد.

برای تعیین احتمال وجود این برهم‌کنش‌ها، سطح در دسترس اسیدآمینه‌ها و RMSF برای پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته به ترتیب به وسیله سرورهای VADAR و PredyFlexy محاسبه شد. بعد از انجام این محاسبات مشخص شد که در هر دو پروتئین دو اسیدآمینه Pro121 و Gly119 با داشتن خصوصیات آب‌گریزی، در سطح پروتئین قرار گرفته‌اند. از طرف دیگر این دو اسیدآمینه همچنان انعطاف‌پذیری بالایی نیز از خود نشان می‌دهند. از آنجا که تشکیل میان‌کنش‌های آب‌گریز به علت وجود زنجیره‌های جانبی با خاصیت آب‌گریزی است و از طرف دیگر تشکیل این برهم‌کنش‌ها یک فرآیند وابسته به آنتروپی نیز است، بنابراین با افزایش دما برخورد‌های مولکولی افزایش یافته و در نتیجه موجب ایجاد این برهم‌کنش‌ها شد. بنابراین به نظر می‌رسد حضور اسیدآمینه‌های آب‌گریز در سطح پروتئین با خاصیت انعطاف‌پذیری بالا همراه با افزایش دما منجر به تجمع مولکول‌های پروتئینی به وسیله برهم‌کنش‌های آب‌گریز در سطح پروتئین‌ها و تشکیل حدواسط‌های مولکولی می‌شود.

در تحقیق حاضر سطح در دسترس اسیدآمینه‌ها مربوط به اسیدآمینه Lys188 در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی افزایش نشان داد.

براساس نتایج محاسبات حاصل از تحقیق حاضر جنبش‌های زنجیره اصلی در پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته در محدوده آمینواسیدهای ۱۲۰ تا ۱۹۰ بیانگر وجود تفاوت در جنبش‌های مولکولی زنجیره اصلی اسیدآمینه Arg187 بود.

طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور نشان داد که محتوای ساختار دوم در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی کاهش یافت و این کاهش با افزایش ساختار نامنظم جبران می‌شود، این موضوع نشان‌دهنده کاهش فشردگی ساختاری در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی بود.

طبق نتایج تحقیق حاضر، مقایسه ASA در اسیدآمینه Lys188 پروتئین وحشی و جهش‌یافته نشان داد که سطح در دسترس این اسیدآمینه در جهش‌یافته مورد نظر نسبت به پروتئین وحشی افزایش یافت.

براساس نمره آب‌گریزی موجود در جدول کیت و دولیتل [36] افزایش ASA اسیدآمینه لیزین از نظر فیزیکی مطلوب است و گروه جانبی

آب‌دوست این اسیدآمینه با نمره آب‌گریزی ۳/۵- باعث شد که این اسیدآمینه در سطح پروتئین قرار گرفته و در نتیجه برهم‌کنش Lys با بخش قطبی مولکول‌های آب ایجاد شد.

از طرف دیگر میزان T_m به دست آمده از اندازه‌گیری‌های DSC نشان داد که پایداری جهش‌یافته R39K بر اثر دناتوراسیون گرمایی به میزان زیادی نسبت به پروتئین وحشی تغییر نکرد. این نتایج نشان می‌دهد که فاکتورهای دیگری غیر از میزان آب‌گریزی اسیدآمینه Lys188 در پایداری ساختاری پروتئین تأثیرگذار بوده است.

طبق نتایج مطالعه حاضر انعطاف‌پذیری در زنجیره اصلی پروتئین جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی در اسیدآمینه Arg187 بیشتر بود. در مجموع افزایش ASA مربوط به اسیدآمینه Lys188 در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی نشان‌دهنده افزایش پایداری پروتئین بر اثر تغییر یک اسیدآمینه بود ولی از طرف دیگر کاهش میزان ساختار دوم در این جهش‌یافته همراه با بالاتر بودن میزان جنبش‌های مولکولی در اسیدآمینه Arg187 در جهت کاهش پایداری این جهش‌یافته عمل کرد، بنابراین در مجموع می‌توان گفت یک تعادل نسبی بین تغییرات این پارامترهای مطلوب و نامطلوب در پایداری باعث بروز تفاوت اندک در T_m پروتئین جهش‌یافته نسبت به وحشی شد و برای پایداری پروتئین مورد نظر باید برآیند تمامی این عوامل را مورد توجه قرار داد.

نتیجه‌گیری

در پایداری حرارتی پروتئین جهش‌یافته R39K عوامل مختلفی شامل جنبش‌های مولکولی اسیدآمینه‌ها، سطح در دسترس هر کدام و محتوای ساختارهای دوم پایداری‌کننده پروتئین تأثیرگذار هستند. این جهش، فشردگی جهش‌یافته R39K را نسبت به پروتئین وحشی کاهش می‌دهد، افزایش ASA مربوط به اسیدآمینه Lys188 در جهش‌یافته R39K نسبت به پروتئین وحشی موجب افزایش پایداری پروتئین می‌شود ولی کاهش میزان ساختار دوم در این جهش‌یافته همراه با بالاتر بودن میزان جنبش‌های مولکولی در اسیدآمینه Arg187 در جهت کاهش پایداری این جهش‌یافته عمل می‌کند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

سهم نویسندگان: فروغ حکیمی‌نیا (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ خسرو خلیفه (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ رضا حسن ساجدی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ بیژن رنجبر (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: تمام منابع مالی انجام این تحقیق توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

منابع

- 1- Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* 2000;13(3):179-91.
- 2- Talluri S. Advances in engineering of proteins for thermal stability. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2011;2(1):190-200.
- 3- Gill P, Tohidi Moghadam T, Ranjbar B. Differential

- properties. *Protein Eng Des Sel*. 2009;22(4):243-8.
- 20- Mahdavi A, Sajedi RH, Hosseinkhani S, Taghdir M, Sariri R. Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: Implication of some conserved residues in bioluminescence properties. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(3):467-78.
- 21- Jafarian V, Sariri R, Hosseinkhani S, Aghamaali MR, Sajedi RH, Taghdir M, et al. A unique EF-hand motif in mnemiopsin photoprotein from *Mnemiopsis leidyi*: Implication for its low calcium sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(2):164-70.
- 22- Mahdavi A, Sajedi RH, Hosseinkhani S, Taghdir M. Hyperactive Arg39Lys mutated mnemiopsin: Implication of positively charged residue in chromophore binding cavity. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14(4):792-800.
- 23- Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des*. 2009;74(2):101-20.
- 24- Wang W, Malcolm BA. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*. 1999;26(4):680-2.
- 25- Chen YH, Yang JT, Martinez HM. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*. 1972;11(22):4120-31.
- 26- 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.
- 27- Hakiminia F, Rnjbar B, Khalifeh Kh, Khajeh Kh. Kinetic and thermodynamic properties of *Pseudomonas* fluorescence lipase upon addition of Proline. *Int J Biolo Macromol*. 2013;55:123-6.
- 28- Freire E, Biltonen RL. Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems. *biopolymers*. 1978;17(2):463-79.
- 29- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2006;15(1):5.6.1-5.6.30.
- 30- Smith CA, Kortemme T. Backrub-like Backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J Mol Biol*. 2008;380(4):742-56.
- 31- Tina KG, Bhadra R, Srinivasan N. PIC: Protein interactions calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:473-6.
- 32- Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD, et al. VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3316-9.
- 33- Bornot A, Etchebest C, De Brevern AG. Predicting protein flexibility through the prediction of local structures. *Proteins*. 2011;79(3):839-52.
- 34- de Brevern AG, Bornot A, Craveur P, Etchebest C, Gelly JC. PredyFlexy: Flexibility and local structure prediction from sequenc. 2012;40: 317-22.
- 35- Serdyuk IN, Zaccai NR, Zaccai J. Methods in molecular biophysics: Structure, dynamics, function. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- 36- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1957(1):105-32.
- scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech*. 2010;21(4):167-93.
- 4- Graziano G, Catanzano F, Giancola C, Barone G. DSC Study of the thermal stability of S-protein and S-peptide/S-protein complexes. *Biochemistry*. 1996;35(41):13386-92.
- 5- 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.
- 6- Tsuji FI, Ohmiya Y, Fagan TF, Toh H, Inouye S. Molecular evolution of the Ca²⁺-binding photoproteins of the Hydrozoa. *Photochem Photobiol*. 1995;62(4):657-61.
- 7- Aghamaali MR, Jafarian V, Sariri R, Molakarimi M, Rasti B, Taghdir M, et al. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: An attempt toward understanding ca²⁺-regulated photoproteins. *Protein J*. 2011;30(8):566-74.
- 8- Moncrief ND, Kretsinger RH, Goodman M. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins: I. relationships based on amino acid sequences. *J Mol Evol*. 1990;30(6):522-62.
- 9- Gonzalez JE, Tsien RY. Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer. *Chem Biol*. 1997;4(4):269-77.
- 10- Blinks JR. Use of photoproteins as intracellular calcium indicators. *Environ Health Perspect*. 1990;84:75-81.
- 11- Lewis CJ, Daunert S. Photoproteins as luminescent labels in binding assays. *Fresenius J Anal Chem*. 2000;366(6-7):760-8.
- 12- Stepanyuk GA, Liu ZJ, Burakova LP, Lee J, Rose J, Vysotski ES, et al. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca²⁺-loaded apoprotein conformation state. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(10):2139-46.
- 13- Ward WW, Seliger HH. Properties of mnemiopsin and berovin, calcium-activated photoproteins from the Ctenophores *Mnemiopsis* species and *Beroë ovata*. *Biochemistry*. 1974;13(7):1500-10.
- 14- Ward WW, Seliger HH. Extraction and purification of calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis* species and *Beroë ovata*. *Biochemistry*. 1974;13(7):1491-9.
- 15- Takenaka Y, Yamaguchi A, Tsuruoka N, Torimura M, Gojobori T, Shigeri Y. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods. *Mol Biol Evol*. 2006;29(6):1669-81.
- 16- Liu ZJ, Stepanyuk GA, Vysotski ES, Lee J, Markova SV, Malikova NP, et al. Crystal structure of obelin after Ca²⁺-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(8):2570-5.
- 17- Deng L, Vysotski ES, Markova SV, Liu ZJ, Lee J, Rose, et al. All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obeli. *Protein Sci*. 2005;14(2):663-75.
- 18- Head JF, Inouye S, Teranishi K, Shimomura O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature*. 2000;405(6784):372-76.
- 19- Dikici E, Qu X, Rowe L, Millner L, Logue C, Deo SK, et al. Aequorin variants with improved bioluminescence