

بررسی اثر دوقطبی الکتریکی مارپیچ‌های آلفای موازی ناهمسو بر

ساختار و عملکرد فوتوپروتئین نمیوپسین ۲

فاطمه نوروزی^۱، سیده اکرم شیردل^۲، زهرا نوروزی^۱، وهب جعفریان^{۳*}، خسرو خلیفه^{۴،۵*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۴- دانشیار، ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، گروه بیوتکنولوژی

۵- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

* صندوق پستی ۳۸۷۹۱-۴۵۳۷۱، زنجان، ایران

v.jafarian@guilan.ac.ir, khalifeh@znu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۸

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹

چکیده

در این پژوهش، میانکشی الکترواستاتیک بین سومین و چهارمین مارپیچ‌های موازی ناهمسو در نمیوپسین ۲ مطالعه شد. بر حسب شیوه توزیع آمینواسیدهای باردار مثبت و منفی در انتهای آمینی و کربوکسیلی مارپیچ‌ها، آنها را به‌عنوان دو نانسیم با ماهیت دوقطبی الکتریکی فرض کردیم. از طریق جهش دادن فیل‌آلانین به آرژنین در موقعیت ۸۷ از مارپیچ چهارم، هدف ما تقویت دوقطبی الکتریکی این مارپیچ بوده است. برای ایجاد مدل از ساختار سه‌بعدی از فوتوپروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته از برنامه MODELLER استفاده شد و از تکنیک جهش‌زایی هدفمند برای تهیه سیستم بیان استفاده شد. بر اساس نتایج اندازه‌گیری فعالیت، در حالی که فوتوپروتئین وحشی در شروع واکنش سرعت عمل بیشتر داشته و ثابت سرعت بالاتری دارد، فوتوپروتئین جهش‌یافته به‌طور معناداری بازدهی بالاتری به اندازه تقریباً دو برابر در فوتون‌های نشری نشان داد. اندازه‌گیری فلوروسانس ذاتی نشان داد که محیط اطراف کروموفورها در فوتوپروتئین جهش‌یافته دچار تغییراتی شده و منجر به فاصله گرفتن عوامل فرو نشان از آنها شده است.

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

با این حال، بر اساس طیف‌های فلوئورسانس مبتنی بر ANS، ساختار کلی پروتئین جهش‌یافته از فشردگی بیشتری برخوردار است. بر اساس آزمایش‌های واسرشتگی حرارتی، اگرچه دمای ذوب (T_m) بی‌تغییر باقی مانده است، با این وجود، تغییر آنتالپی فرایند واسرشتگی در فوتوپروتئین جهش‌یافته به طور معناداری افزایش یافته است که نشان‌دهنده افزایش پدیده متعادل بودن در میانکنش‌های پایدارکننده است. سرانجام، چنین نتیجه‌گیری شد که افزایش متعادل‌شدگی بین میانکنش‌های پایدارکننده در فوتوپروتئین جهش‌یافته، ساختار طبیعی پروتئین را پایدارتر کرده و منجر به افزایش جمعیت کمپلکس‌های عملکردی و در نتیجه افزایش بازدهی در فوتون‌های نشری می‌شود.

کلید واژگان: نمیوپسین ۲، فوتوپروتئین، جهش‌یافته، فلوئورسانس، واسرشتگی حرارتی، ترمودینامیک

۱- مقدمه

نورتابی زیستی^۱ به پدیده‌ای گفته می‌شود که در آن از طریق یک واکنش بیوشیمیایی در موجودات زنده نشر نور اتفاق می‌افتد. نمونه‌های متنوعی از نورتابی زیستی در طبیعت به چشم می‌خورد؛ به عنوان مثال، کرم شب‌تاب در شب‌های تابستان به صورت نور چشمک‌زن رویت می‌شود و یا در پیاده‌روی شب‌هنگام در سواحل خلیج فارس نورهای رنگی و درخشان به چشم می‌خورند. این نشر نور که از زیباترین عناصر خلقت به شمار می‌آید، توسط انواعی از جانداران در یایی و خشکی در اعماق اقیانوس‌ها و دریاها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها دیده شده است و همواره توجه زیست‌شناسان، فیزیولوژیست‌ها و فیزیک‌دانان را به خود جلب کرده است [۱ و ۲].

به طور کلی، دو مکانیسم نورتابی زیستی در طبیعت وجود دارد که شامل سیستم آنزیمی لوسیفیرین-لوسیفراز^۲ و سیستم مبتنی بر فوتوپروتئین^۳ است [۳-۶]. در سیستم آنزیمی، در حضور آنزیم لوسیفراز، ATP، اکسیژن مولکولی و سوبسترای واکنش که در حالت کلی لوسیفیرین نامیده می‌شود، واکنش اکسیداسیون لوسیفیرین با کاتالیز آنزیمی صورت گرفته و اکسی لوسیفیرین در حالت برانگیخته الکترونی تولید می‌شود که در ادامه و در کسری

از ثانیه، اکسی لوسیفیرین برانگیخته به دلیل ناپایداری ناشی از برانگیختگی الکترونی به سطح انرژی پایه برگشته و بخشی از انرژی حالت برانگیخته را به صورت نوری در محدوده طول‌موج‌های مرئی گسیل می‌کند. انرژی مورد نیاز برای ایجاد حالت برانگیختگی در این واکنش از مولکول ATP تامین می‌شود [۳].

فوتوپروتئین‌ها نوعی از سیستم‌های زیست‌تابی هستند که دارای یک حفره اتصالی به سوبسترا بوده و پس از تشکیل کمپلکس با سوبسترای اختصاصی، آماده نشر نور می‌شوند [۷ و ۸]. انرژی مورد نیاز برای اکسیداسیون و برانگیختگی سوبسترا در این فرایند، از شکست و بست میانکنش‌های درون مولکولی ناشی از تغییر پیکربندی کمپلکس فوتوپروتئین-سوبسترا تامین می‌شود. نکته مهم در این فرایند لزوم حضور یون‌های کلسیم جهت شروع تغییرات ساختاری در فوتوپروتئین است. فوتوپروتئین‌ها دارای سه لوپ فعال اختصاصی جهت احاطه کردن یون‌های کلسیم^۴ هستند [۹] و در صورت حضور کلسیم در محیط و احاطه شدن یون‌های کلسیم توسط لوپ‌های مربوطه، فرایند تغییر پیکربندی و واکنش نورتابی شروع شده و نور حاصل از واکنش در محدوده طول‌موج‌های مرئی گسیل می‌شود [۱۰]. به دلیل لزوم ایجاد کمپلکس‌های عملکردی در این فرایند،

³ Photoprotein

⁴ Calcium Coordination

¹ Bioluminescence

² Luciferin-Luciferase

شدت نور تولید شده با غلظت پروتئین استفاده شده متناسب است.

نور گسیل شده ناشی از فعالیت نورتایی مبتنی بر سیستم فوتوپروتئین‌ها، دارای چندین ویژگی فیزیکی بوده و مقایسه فوتوپروتئین‌های مختلف بر اساس این معیارهای فیزیکی است. اولین مورد طول موج مشخصه فعالیت هر فوتوپروتئین است، به طوری که فوتوپروتئین‌های مختلف هر کدام طول موج نشری اختصاصی خود را دارند. دومین ویژگی، شدت تابش اولیه است که بازتابی از تعداد فوتون‌های گسیل شده در لحظه اول شروع واکنش است. تعداد فوتون‌های اولیه گسیل شده بلافاصله پس از تابش دچار واپاشی شده و نور گسیلی به سرعت محو می‌شود. سرعت واپاشی نور تابیده شده از نظر کمی به صورت ثابت سرعت واپاشی گزارش می‌شود که سومین ویژگی فیزیکی یک سیستم نورتایی زیستی است. میزان حساسیت به غلظت کلسیم نیز از پارامترهای مهم در بررسی عملکرد فوتوپروتئین‌ها است [۹ و ۱۱].

امروزه از پروتئین‌های زیست‌تاب به طور گسترده در زمینه‌های مختلف استفاده می‌شود و از آنجایی که بسیار دقیق، بی‌خطر، ارزان و حساس هستند، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند و امروزه محققین با انجام استراتژی‌های مختلف مهندسی پروتئین مانند جهش‌زایی هدفمند گام‌های مهمی را در جهت دستیابی به نسخه‌های جدید فوتوپروتئین‌ها برداشته‌اند. پارامترهای مورد نظر در این مطالعات شامل تغییر طول موج مشخصه، افزایش بازدهی نشر نور، تغییر در ثابت واپاشی متناسب با کاربرد مورد نظر و تغییر در حساسیت به کلسیم می‌باشند [۱۵-۱۲].

در یک تقسیم‌بندی، فوتوپروتئین‌ها را در دودسته متعلق به گروه کیسه‌تنان^۱ و گروه شانه‌داران دریایی^۲ تقسیم می‌کنند [۲]. نمپوسین متعلق به شاخه‌ای از موجودات دریایی به نام Mnemopsin leidyi از گروه شانه‌داران است

که به صورت طبیعی در سلول‌های فتو سیت این شانه‌دار تولید می‌شود. این موجود از نظر ساختار ظاهری دارای بدنی شفاف و ژلاتینی است که به صورت صفحات شانه‌ای شکل مژه‌دار دیده می‌شوند. زیستگاه این شانه‌دار آب‌های ساحلی غرب اقیانوس اطلس بوده و به تازگی در آب‌های دریای سیاه و دریاهای شمالی آن نیز راه پیدا کردند. در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار در دریای خزر مشاهده شد که باعث مطرح شدن احتمالاتی از نحوه‌ی راه پیدا کردن این جانوان به دریای خزر شد. امروزه حدس زده می‌شود که از طریق رسوبات چسبیده به کشتی‌ها وارد این آب‌ها شده و شروع به رشد و تکثیر کرده است. وجود این شانه‌داران باعث بروز خساراتی به اکوسیستم گونه‌های بومی شده است [۱۶].

در این پژوهش، بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و اصول بنیادی فیزیک، دو مارپیچ موازی ناهمسو در ساختار فوتوپروتئین نمپوسین^۲ را به دلیل حضور هماهنگ بارهای مثبت و منفی در دو انتهای آنها، همانند دوقطبی های الکتریکی فرض کرده و با اعمال جهش، دوقطبی الکتریکی یکی از مارپیچ‌ها تقویت شد. در این طراحی، فرض بر این است که بر اساس شیوه توزیع بارهای مثبت و منفی و همچنین مجاورت بارهای ناهمنام در دو انتهای مارپیچ‌ها با یکدیگر، نیروی جاذبه الکترواستاتیک بین آنها باعث استحکام جهت‌گیری دو مارپیچ نسبت به یکدیگر شده و در صورت افزایش نیروی جاذبه الکترواستاتیک از طریق دست‌ورزی بارها، می‌توان پایداری این میانکنش را افزایش داده و پایداری کل پروتئین را تحت تاثیر قرار داد. در ادامه پژوهش، پس از تولید پروتئین جهش‌یافته و بیان هر دو پروتئین وحشی و جهش‌یافته با استفاده از انواع روش‌های مولکولی، ویژگی‌های عملکردی و ساختاری آنها با انواعی از روش‌های طیف‌سنجی مطالعه شد.

۲- مواد و روش‌ها

² Ctenophores

¹ Cnidarians

۲-۱ بیوانفورماتیک

۲-۱-۱ آنالیز توالی

توالی پروتئین موردنظر و اطلاعات مرتبط با آن از پایگاه اطلاعاتی UniProt به دست آمدند. مشابهت سنجی و یافتن پروتئین‌های مشابه از طریق اجرای برنامه BLAST انجام شد [۱۷]. انجام هم‌ترازی چندگانه بین نمپوسین ۲ و توالی‌های مشابه با استفاده از برنامه Clustal Omega انجام شد [۱۸] و خروجی این برنامه در قالب ClustalW ذخیره شد و به عنوان ورودی در برنامه ESript به کار گرفته شد تا تصویری گرافیکی از مقایسه توالی‌ها ایجاد شود [۱۹].

۲-۱-۲ آنالیز ساختار

باتوجه به اینکه ساختار آزمایشگاهی مشخصی از نمپوسین ۲ گزارش نشده است. در این مطالعه ساختار پروتئین با استفاده از برنامه MODELLER ساخته شد [۲۰ و ۲۱]. از بین تعدادی ساختار ایجاد شده توسط برنامه MODELLER بهترین ساختار از طریق محاسبه و مقایسه نمره Z-Dope انتخاب شد [۲۲] در مدل سازی ساختار از ساختار بلوری آکوئورین [۲۳] با کد دسترسی ej3۱، ساختار بلوری برووین [۲۴] با کد دسترسی mn0۴ و ساختار بلوری برووین [۲۵] با کد دسترسی bpj۵ به عنوان الگو استفاده شد. همچنین، برای داکینگ لیگاند و یون به ترتیب از ساختارهای ej3۱ و mn0۴ استفاده شد.

در این پژوهش از برنامه Chimera علاوه بر ترسیم ساختار پروتئین‌ها، برای برخی آنالیزهای ساختاری نیز استفاده شد [۲۶ و ۲۷].

۲-۲ تولید پروتئین نوترکیب

پس از طراحی، سفارش و در اختیار گرفتن پرایمرها، واکنش PCR به منظور ایجاد جهش‌زایی بر روی پلاسمید حاوی ژن نوترکیب نمپوسین ۲ انجام شد. وا سرتگی

اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه انجام شد و به دنبال آن برای ۲۳ چرخه یک دقیقه‌ای تکرار شد. دمای اتصال پرایمرها در ۵۴ درجه و در بازه زمانی یک دقیقه و فرایند گسترش رشته DNA به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۶۸ درجه انجام شد و برای ۲۳ چرخه متوالی تکرار شد. در نهایت دمای گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۸ درجه انجام شد. برای خارج کردن پرایمرهای اضافی و قطعات حاصل از عملکرد آنزیم DpnI، محصولات PCR با استفاده از کیت تخلیص خالص شدند. سپس، وکتور حاوی ژن جهش‌یافته نمپوسین ۲ از طریق روش شیمیایی (CaCl₂) به سلول مستعد ایشیریشیا کولی BL21 (DE3) انتقال داده شد. پس از تعیین توالی پلاسمیدها حضور جهش موردنظر تایید شد. پلاسمیدهای بیانی pET28a حاوی ژن‌های وحشی و جهش‌یافته فوتوپروتئین در محیط کشت TB^۱ حاوی مقدار ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین و یک میلی‌مولار IPTG رشد داده شدند. تخلیص فوتوپروتئین‌های نوترکیب با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مبتنی بر نیکل^۲ سفارش انجام شد و نمونه‌های تخلیص شده برای مطالعات عملکردی و ساختاری استفاده شدند.

۲-۳ سنجش فعالیت

فوتوپروتئین‌های تخلیص شده در حالت آپونمپوسین بوده و در عدم حضور نور و دمای ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ ساعت در معرض کلترازین^۳ قرار داده شدند. غلظت سوبسترا در حجم نهایی بر روی ۸ میکرومولار تنظیم شد. بافر مورد استفاده تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۱۰ میلی‌مولار EDTA (بافر اول) بر روی pH برابر با ۹ تنظیم شد. برای سنجش فعالیت، مقدار ۵ میکرولیتر از محلول فوتوپروتئین انکوبه شده با کلترازین به لوله اختصاصی دستگاه لومینومتر که حاوی ۴۵ میکرولیتر از

^۳ Cp-coelenterazine^۱ Terrific broth^۲ Ni-NTA

بافر شماره ۲ (تریس ۵۰ میلی مولار در pH برابر با ۹) انتقال داده شد. فعالیت نشر نور از طریق تزریق خوکار و برنامه ریزی شده از بافر شماره ۳ (تریس ۵۰ میلی مولار در pH برابر با ۹، حاوی ۴۰ میلی مولار کلرید کلسیم) داخل لوله حاوی کمپلکس فوتوپروتئین-کلترازین ثبت شد. دستگاه مورد استفاده لومینومتر ساخت شرکت Berthold آلمان بود.

۲-۴ طیف سنجی فلوئورسانس

اندازه گیری فلوئورسانس ذاتی^۱ و فلوئورسانس مبتنی بر کروموفور خارجی ANS با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر Cary Eclipse و با انتقال نمونه ها به کووت ۱ سانتی متری در دمای اتاق انجام شد. برای اندازه گیری فلوئورسانس ذاتی پروتئین ها، غلظت هر دو پروتئین وحشی و جهش یافته بر روی ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در بافر ۵۰ میلی مولار تریس و با pH برابر با ۹ تنظیم شد. پس از گسیل طول موج تحریک در ۲۹۵ نانومتر، طول موج های نشری فلوئورسانس ذاتی در محدوده ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت شدند. شکاف های نوری نور برانگیختگی و نشری بر روی ۵ نانومتر قرار داده شدند.

در اندازه گیری فلوئورسانس خارجی از ANS به عنوان کرومور استفاده شد. غلظت پروتئین و ANS مورد استفاده در اندازه گیری فلوئورسانس خارجی به ترتیب ۱ و ۲۰ میکرومولار در نظر گرفته شد. تحریک مولکول های ANS در ۳۵۰ نانومتر انجام شد و طول موج های نشری در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت شدند.

۲-۵ آزمایش های واسرشتگی دمایی

برای ثبت تغییرات ساختاری ناشی از افزایش تدریجی دما از دستگاه طیف سنج جذبی شرکت Jasco مدل V-730 که مجهز به Peltier قابل برنامه ریزی بود، استفاده شد.

اسکن دمایی نمونه ها از طریق اندازه گیری هم زمان جذب در دو طول موج های ۲۸۰ و ۲۹۵ نانومتر و با غلظت پروتئین که جذبی معادل ۰٫۵ در ۲۸۰ نانومتر داشت، انجام شد. در این آزمایش نمونه های پروتئین از دمای ۲۵ تا ۷۰ درجه سلیسیوس و با سرعت یک درجه سلیسیوس در هر دقیقه در معرض حرارت قرار گرفتند و سیگنال های متوالی تغییرات ساختار بر حسب دما ثبت شدند. در مورد هر نمونه، محدوده ای از تغییرات ساختار که رفتار سیگموئیدی از خود نشان می داد برای مدل سازی انتخاب شده و پس از نرمالایز کردن بین صفر و یک جهت مدل سازی به نرم افزار کالیداکراف منتقل شدند [۲۸].

۳- نتایج و بحث

۳-۱ بیان فوئورماتیک و طراحی جهش

اطلاعات مربوط به توالی فوتوپروتئین نمپوسین ۲ از شانه دار دریایی Mnemiopsis leidyi در پایگاه اطلاعاتی UniProt با کد شناسایی E0X987 در دسترس محققان قرار گرفته است. این پروتئین با ۲۰۷ باقیمانده آمینواسیدی دارای قابلیت اتصال به لیگاند و همچنین تعداد سه یون کلسیم است.

البته توجه داشته باشیم که تاکنون ساختار مبتنی بر روش های آزمایشگاهی از این پروتئین در پایگاه اطلاعاتی ساختار پروتئین^۲ گزارش نشده است. در اولین مرحله از این پژوهش، با استفاده از برنامه BLAST جستجوی شباهت سنجی بین توالی این پروتئین و پروتئین های موجود در پایگاه های اطلاعاتی انجام شد. با اجرای برنامه، تعدادی فوتوپروتئین با درصد تشابه بالا یافت می شود که همگی از Mnemiopsis leidyi می باشند.

فوتوپروتئین های انتخاب شده برای ادامه مطالعه در جدول ۱ آورده شده اند.

^۲ Protein data bank (PDB)

^۱ Intrinsic Fluorescence

جدول ۱ فوتوپروتئین‌های انتخاب شده از خروجی برنامه BLAST. درصد یکسانی و همسانی با استفاده از برنامه Emboss-Matcher و استفاده از توالی نمپوسین ۲ به عنوان توالی مرجع محاسبه شده است.

	Accession Number	Protein Name	Length	source	Identity (%)	Similarity (%)
1	E0WVU4	Mnemiopsin 1	206	Mnemiopsis leidyi	90.7	96.1
2	E0X987	Mnemiopsin 2	207	Mnemiopsis leidyi	100	100
3	K9LLE9	Photoprotein 2	207	Mnemiopsis leidyi	98.1	99.5
4	K9LKS2	Photoprotein 3	207	Mnemiopsis leidyi	96.1	99.0
5	K9LM53	Photoprotein 4	206	Mnemiopsis leidyi	92.6	97.1
6	K9LK28	Photoprotein 5	207	Mnemiopsis leidyi	98.1	99.5
7	K9LK81	Photoprotein 6	206	Mnemiopsis leidyi	91.2	96.1
8	K9LLF1	Photoprotein 7	207	Mnemiopsis leidyi	96.6	99.0
9	K9LKS4	Photoprotein 8	207	Mnemiopsis leidyi	88.9	94.2
10	K9LM56	Photoprotein 9	207	Mnemiopsis leidyi	88.4	93.7
11	K9LK32	Photoprotein 10	207	Mnemiopsis leidyi	88.4	93.7

توالی‌های^۳ مربوط به فوتوپروتئین‌های جدول ۱ با استفاده از برنامه‌های Clustal Omega و EsPript انجام شد. نتیجه این آنالیز به صورت گرافیکی در شکل ۱ آورده شده است. شمارش نواحی کاملاً حفاظت شده نسبت به کل طول توالی نشان می‌دهد که فوتوپروتئین‌های این آبرخانه در تعداد ۱۷۱ موقعیت از مجموع ۲۰۷ موقعیت کاملاً حفاظت شده هستند که تقریباً معادل ۸۳ درصد کل موقعیت‌ها را شامل می‌شود. به عبارت دیگر تقریباً ۱۷ درصد از موقعیت‌ها دارای تحمل‌پذیری بالا نسبت به انواع مختلف جهش‌ها از نوع جایگزینی، جاگذاری و یا حذف بوده‌اند. بنابراین می‌توان گفت که در بیشتر موقعیت‌ها به دلیل اهمیت ساختاری و یا عملکردی جهشی اعمال نشده و یا اینکه به دلیل اخلاص در ساختار، عملکرد و یا عدم سازگاری با شرایط زیست موجود، جهش تصادفی ایجاد

شباهت بالای توالی این فوتوپروتئین‌ها به صورت درصد تشابه^۱ و درصد یکسانی^۲ هر کدام از توالی‌ها با توالی نمپوسین ۲ در دو ستون آخر جدول ۱ با استفاده از برنامه Emboss-Matcher محاسبه شده است.

باتوجه به گستره پراکنش جغرافیایی این موجود، به نظر می‌رسد که انتخاب جهش‌های تصادفی مختلف در فوتوپروتئین‌های این موجود در طی تکامل، جهت سازگاری با شرایط زیست محیطی بوده است. به عبارت دیگر می‌توان انتظار داشت که تغییرات جزئی در توالی‌های مختلف پروتئین‌های این آبرخانه، موجب القای تغییراتی در ساختار و فعالیت فوتوپروتئین‌ها شده است.

برای بررسی دقیق‌تر تفاوت‌ها و شباهت‌های فوتوپروتئین‌ها در امتداد توالی، هم‌ترازی چندگانه

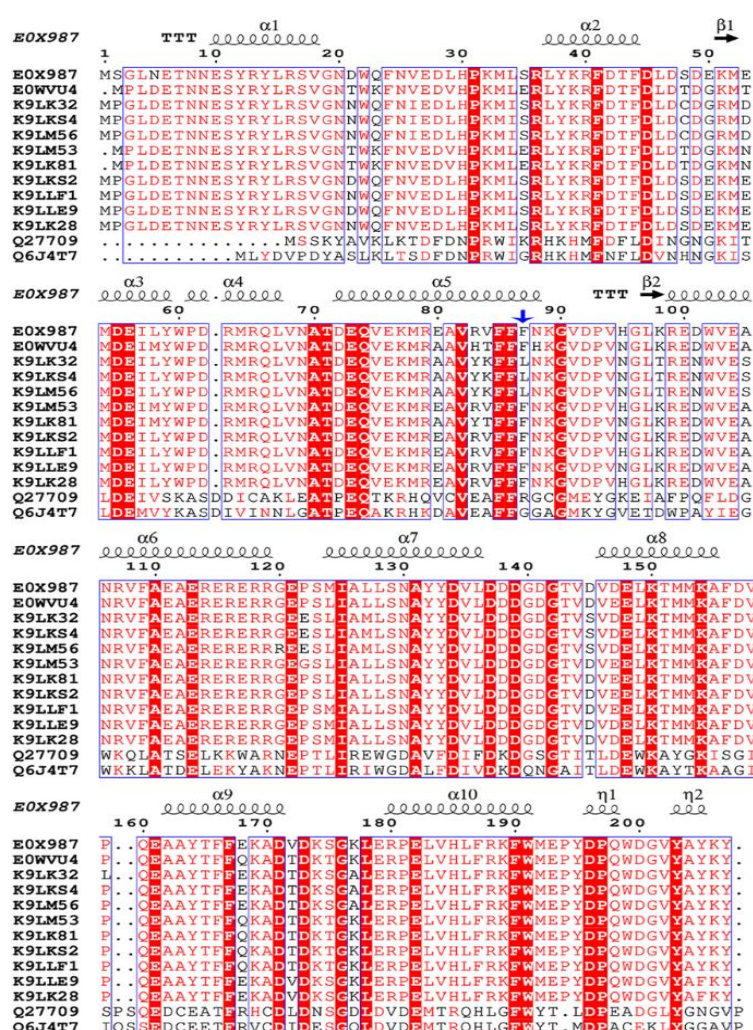
³ Multiple Sequence Alignment (MSA)

¹ Similarity

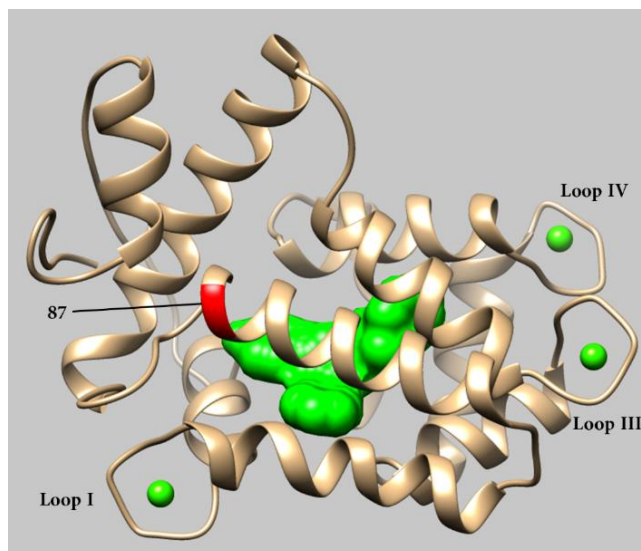
² Identity

در شکل ۲ ساختار فوتوپروتئین نمیوپسین ۲ همراه با موقعیت مورد نظر برای اعمال جهش آورده شده است. باتوجه به تغییر پذیری مشاهده شده در موقعیت ۸۷ نمیوپسین ۲ (شکل ۱)، این موقعیت که توسط فنیل آلانین اشغال شده است، برای تغییر و اعمال جهش انتخاب شد.

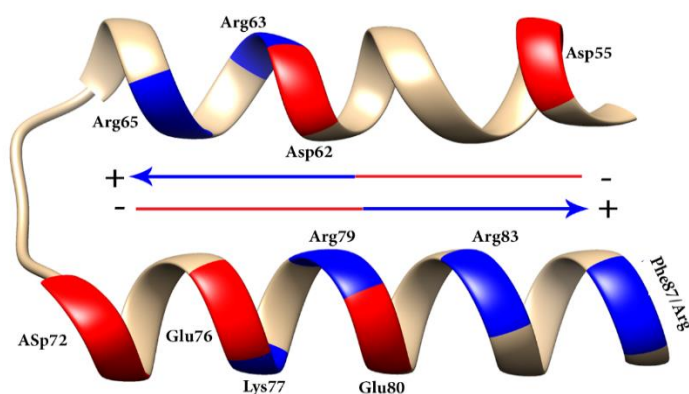
شده موجب حذف فوتوپروتئین و موجود حامل جهش شده‌اند. از آنجاکه ساختار آزمایشگاهی مشخصی از پروتئین نمیوپسین ۲ گزارش نشده است، ساختار این پروتئین توسط برنامه MODELLER پیش‌بینی شد و از بین ۵ ساختار به دست آمده، با محاسبه و مقایسه نمره Z-Dope ساختار مناسب انتخاب و برای ادامه پژوهش استفاده شد.



شکل ۱ هم‌ترازی چندگانه توالی‌ها. توالی‌های انتخاب شده در خروجی برنامه BLAST با استفاده از برنامه Clustal Omega مورد آنالیز قرار گرفته و نتیجه این آنالیز در برنامه EsPript به‌عنوان ورودی به کار گرفته شد و فایل نهایی به‌دست آمد. ساختار مدل سازی شده نمیوپسین ۲ به‌عنوان الگو برای پیش‌بینی ساختار در امتداد توالی استفاده شد. موقعیت موردنظر برای جهش با علامت فلش آبی مشخص شده است.



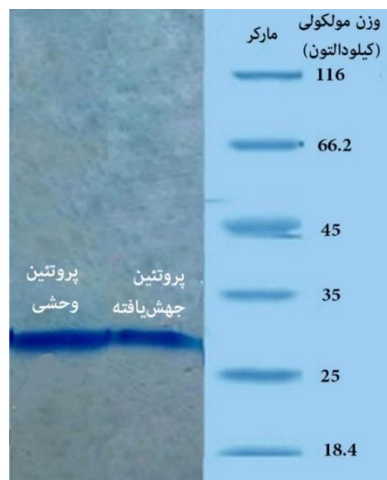
شکل ۲ مدل ساختاری نیمیوپسین ۲. در مدل سازی ساختار به طور هم زمان لیگاند و یونها نیز در موقعیت های خود قرار داده شدند. موقعیت ساختاری جایگاه ۸۷ برای اعمال جهش در ساختار به رنگ قرمز مشخص شده است. مدل سازی ساختار با استفاده از برنامه MODELLER انجام شد.



شکل ۳ منطق طراحی جهش. دو مارپیچ موازی ناهمسو به دلیل توزیع آمینواسیدهای باردار مثبت و منفی در امتداد محور مارپیچ دارای جهت گیری الکتریکی شده و بنابراین، میانکشی الکترواستاتیک برقرار کرده اند. با تغییر موقعیت ۸۷ دوقطبی الکتریکی در یکی از این مارپیچ ها تقویت می شود. آمینو اسیدهای باردار منفی با رنگ قرمز و انواع مثبت با رنگ آبی نشان داده شده اند. تصویر سازی با استفاده از برنامه Chimera انجام شده است.

دقت در شکل ۲ نشان می دهد که اولاً این پروتئین از ساختارهای منظم آلفا تشکیل شده است که به واسطه لوپ ها با یکدیگر در ارتباط هستند. علاوه بر این، دارای یک حفره مرکزی برای اتصال با لیگاند بوده و تعداد سه لوپ متمایز با عنوان لوپ های EF-Hand است که برای

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، این موقعیت در قسمت انتهایی یک قطعه ساختار دوم آلفا قرار گرفته است. برای انتخاب آمینواسید مناسب، بررسی دقیق تر جایگاه این آمینواسید در ساختار سه بعدی پروتئین ضروری است.



شکل ۴: تخلیص پروتئین. نمونه‌های فوتوپروتئین بر روی ژل الکتروفورز در موقعیت وزنی ۲۷ کیلوالتون قرار گرفته و باند متمایزی را نشان می‌دهند.

علاوه بر این، مشاهده باند متمایز برای هر کدام نشان می‌دهد که فوتوپروتئین‌ها از در صد خلوص مناسبی برای ادامه مطالعات با انواع روش‌های طیف‌سنجی مناسب هستند.

۳-۳- سنجش فعالیت ویژه پروتئین‌ها

بر اساس نتایج اندازه‌گیری لومینسانس، در حالی که میانگین شدت نور اولیه در پروتئین وحشی ۱۰ میلیون واحد ثبت شد، در مورد پروتئین جهش‌یافته این عدد به مقدار ۱۹ میلیون واحد افزایش پیدا کرده است.

با این حال، برای مقایسه پارامتر ثابت سرعت خاموشی همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود، داده‌های هر دو اندازه‌گیری بین صفر تا صد نرمالایز شده و روند کاهش شدت نور مقایسه شدند. دقت در شیب نمودارهای خطی شده منطقه گذار خاموشی نشان می‌دهد که ثابت سرعت خاموشی شدت نور اولیه در پروتئین وحشی بیشتر بوده و در نتیجه با اعمال جهش، ثابت سرعت خاموشی کاهش پیدا کرده است. نکته دیگر در نمودارهای شکل زیر این است که شروع واکنش بیولومینسانس در پروتئین جهش یافته با یک ثانیه تاخیر نسبت به پروتئین وحشی ثبت شده

احاطه کردن یون‌های کلسیم ضروری هستند. جایگاه موردنظر برای طراحی جهش دارای پیکربندی آلفا بوده و در سطح پروتئین در تماس با مولکول‌های قطبی آب است. برای تعیین آمینواسید جدید برای جایگزینی با فنیل‌آلانین در موقعیت ۸۷ موقعیت مارپیچ آلفا را از نمای نزدیک و در ارتباط با مارپیچ مجاور با جزئیات بیشتر بررسی می‌کنیم (شکل ۳).

دقت در شکل ۳ نشان می‌دهد که دو مارپیچ الفای موازی ناهم‌سو به دلیل شیوه توزیع آمینواسیدهای باردار مثبت و منفی در طرفین خود دارای ماهیت دوقطبی هستند. نکته جالب این است که پیوندهای پپتیدی و هیدروژنی که در امتداد محور مارپیچ به صورت متوالی قرار گرفته‌اند، نیز دارای یک سر مثبت و یک سر منفی هستند و این جهت‌گیری دوقطبی‌های پیوندهای هیدروژنی و پپتیدی از سمت انتهای آمینی به سمت انتهای کربوکسیلی نیز با این شیوه استقرار آمینواسیدهای باردار مثبت و منفی هماهنگ بوده و دوقطبی الکتریکی مارپیچ را بیشتر تشدید می‌کنند. بنابراین، بین دو مارپیچ همانند دو نانوسیم نیروی جاذبه برقرار شده است. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است با تبدیل فنیل‌آلانین در موقعیت ۸۷ به آرژنین دوقطبی الکتریکی این مارپیچ تقویت شده و بنابراین انتظار می‌رود که نیروی جاذبه قوی‌تری ناشی از این جهش، بین دو مارپیچ برقرار شود. بنابراین، جهش F87R پیشنهاد شد.

۳-۲- تخلیص و بیان پروتئین

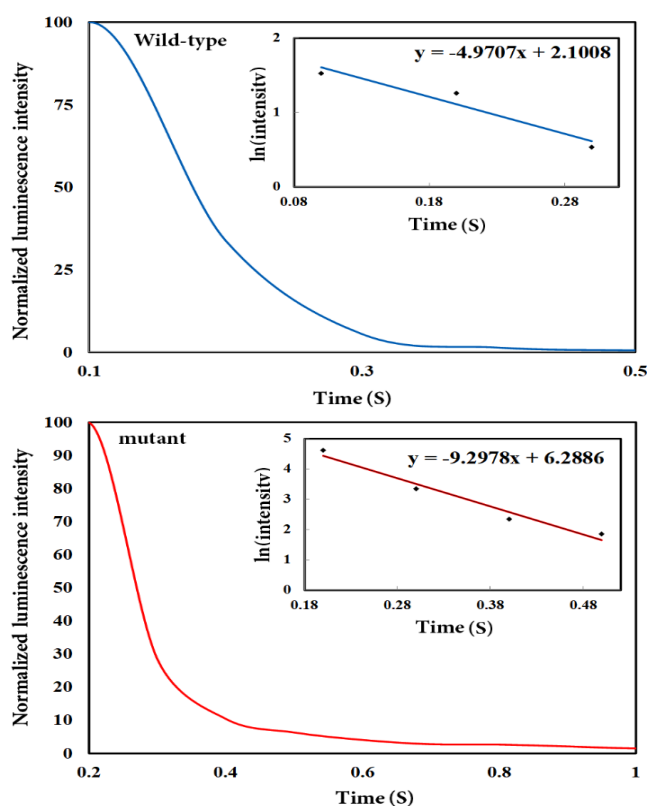
با توجه به اینکه وزن مولکولی نمیوپسین ۲ همراه با دنباله هیستیدینی تقریباً ۲۷ کیلوالتون است، انتظار می‌رود که پس از بیان و تخلیص فوتوپروتئین‌ها، باند اختصاصی هر کدام از نمونه‌ها را در موقعیت وزنی صحیح بر روی ژل مشاهده کنیم. شکل ۴ ژل الکتروفورزی مربوط به فوتوپروتئین‌های تخلیص شده را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود. هر کدام از نمونه‌ها در موقعیت خود بر روی ژل دیده می‌شوند.

۴-۳ بررسی ساختار

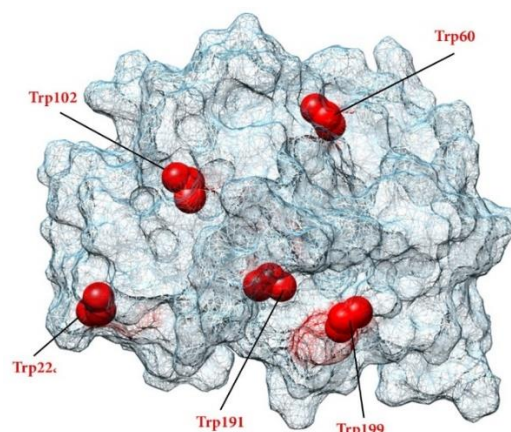
۴-۳-۱ طیف‌سنجی فلوئورسانس

برای بررسی اثرات جهش بر ساختار سوم فوتوپروتئین، از تکنیک طیف‌سنجی نشری فلوئورسانس به دو صورت ذاتی و خارجی استفاده شد. در روش طیف‌سنجی فلوئورسانس ذاتی از طول‌موج تهییج ۲۹۵ نانومتر استفاده شد، بنابراین، کروموفورهای درگیر در این طیف‌سنجی آمینو اسیدهای تریپتوفان بوده و اطلاعات به دست آمده در این روش، وضعیت ساختار سوم در اطراف باقیمانده‌های تریپتوفان را به صورت موضعی نشان می‌دهد، در شکل ۶ موقعیت و شیوه توزیع این کروموفورها در ساختار سه‌بعدی پروتئین به نمایش درآمده است.

است. با توجه به اینکه شروع واکنش وابسته به سرعت احاطه کردن یون‌های کلسیم توسط لوپ‌های EF-hand است، می‌توان گفت که در اثر اعمال جهش، تمایل لوپ‌ها به کلسیم کاهش پیدا کرده است. این میزان کاهش تمایل به یون‌های کلسیم با مشاهدات مربوط به ثابت سرعت خاموشی نیز مطابقت دارد. بنابراین، بر اساس نتایج اندازه‌گیری فعالیت می‌توان چنین نتیجه گرفت که در طی انکوباسیون فوتوپروتئین‌ها با کلسیم، تعداد کمپلکس‌های فعال تشکیل شده در پروتئین جهش‌یافته افزایش پیدا کرده است که این موضوع ناشی از افزایش تمایل فوتوپروتئین جهش‌یافته به سوبسترا است و همین افزایش جمعیت کمپلکس‌های فعال در شدت نور اولیه بازتاب پیدا کرده است. در حالی که، به دلیل کاهش تمایل لوپ‌ها به کلسیم، شاهد تاخیر در شروع واپاشی هستیم.



شکل ۵ فعالیت نموپسین وحشی و جهش‌یافته. نمودار کادر اصلی حاصل اندازه‌گیری فعالیت با دستگاه لومینومتر بوده و نمودار داخل کادر، نتیجه مدل‌سازی داده‌های آزمایشگاهی برای استخراج ثابت سرعت می‌باشد.



شکل ۶ موقعیت کروموفورهای درگیر در طیف‌سنجی فلئوئورسانس ذاتی. ترسیم شکل با استفاده از برنامه Chimera انجام شد.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود تریپتوفان‌های واقع در موقعیت‌های ۲۲ و ۱۹۹ تقریباً سطحی بوده و به دلیل ارتباط با محیط قطبی دچار پدیده فرونشانی^۱ بوده و احتمالاً نقش کمتری در نشر فلئوئورسانس دارند و بنابراین، بیشترین اطلاعات به دست آمده از موقعیت‌های ۱۰۲، ۶۰ و ۱۹۱ خواهد بود. از طرف دیگر بر اساس، مطالعات پیشین انجام شده، مشخص شده است که طیف نشری فلئوئورسانس ذاتی نمیوپسین ۲ در پدیده فرونشانی داخلی درگیر است که علت آن نزدیکی عوامل فرو نشان داخلی به تریپتوفان‌ها و جذب بخشی از فوتون‌های نشری توسط این عوامل است. به‌طوری که، با باز شدن تدریجی ساختار فوتوپروتئین در اثر وا سرتگی شیمیایی^۲ به جای کاهش نشر فلئوئورسانس با افزایش نشر روبرو هستیم [۲۹ و ۳۰]. البته در هر صورت، پارامتر کلیدی که نشان‌دهنده تماس تریپتوفان‌ها با مولکول‌های آب و نامطلوب شدن محیط اطراف آنها است، تغییر طول موج مشخصه به سمت قرمز است. نتیجه طیف‌سنجی فلئوئورسانس ذاتی و فلئوئورسانس مبتنی بر ANS در شکل ۷ آورده شده است. بر اساس نتایج طیف‌سنجی فلئوئورسانس ذاتی (شکل ۷، الف) و با در نظر داشتن فرونشانی داخلی در نشر ذاتی نمیوپسین ۲

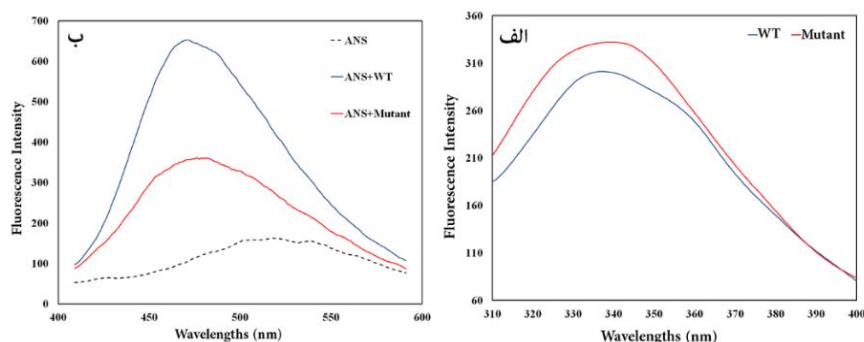
می‌توان گفت که افزایش شدت نشر در فلئوئورسانس فوتوپروتئین جهش‌یافته نشان‌دهنده فاصله گرفتن عوامل فرو نشان از تریپتوفان‌ها و از بین رفتن اثر فرونشانی است و از آنجا که هیچ‌گونه تغییر در طول موج مشخصه به سمت قرمز یا آبی دیده نمی‌شود، بنابراین داده‌ها فقط نشان‌دهنده نوآرایی ساختاری به صورت موضعی بوده و محیط اطراف آنها از نظر ترمودینامیکی تغییری نداشته است. با این حال طیف‌های فلئوئورسانس خارجی (شکل ۷، ب) نشان می‌دهند که در اثر اعمال جهش تعداد حفره‌های آبگریز دسترس‌پذیر کاهش پیدا کرده و تعداد کمتری مولکول ANS به سطح فوتوپروتئین جهش‌یافته در مقایسه با فوتوپروتئین وحشی متصل شده‌اند. این یافته از نظر زیستی به مفهوم فشردگی بیشتر ساختار فوتوپروتئین جهش‌یافته بوده و برقراری میانکشی جاذبه قوی‌تر بین دو ماریچ آلفا که قبلاً بحث شده بود را تایید می‌کند.

۳-۴-۲ واسرشتگی حرارتی

آزمایش‌های واسرشتگی پروتئین در اثر حرارت برای بررسی پایداری پروتئین وحشی و جهش‌یافته در برابر دما انجام شد.

² Chemical denaturation

¹ Quenching



شکل ۷ نمودارهای طیف فلورسانس ذاتی (الف) و فلورسانس خارجی مبتنی بر ANS (ب)

در این آزمایش‌ها، جذب هر یک از نمونه‌ها شامل پروتئین وحشی و جهش یافته در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به طور جداگانه توسط دستگاه طیف سنجی جذبی متصل به قطعه کنترل کننده حرارت به نام پلتیر^۱ بر حسب دما اندازه گیری شد. با افزایش تدریجی دما و باز شدن ساختار پروتئین، میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر به تدریج افزایش پیدا کرده و منحنی‌های سیگموئیدمانندی به نام منحنی‌های واسرشتگی حرارتی^۲ به دست آمد. نتایج آزمایشگاهی به دست آمده در این آزمایش‌ها (نقاط ناپیوسته در شکل ۸) با معادله ۱ تطبیق داده شده (خطوط آبی رنگ پیوسته در شکل ۸) و پارامترهای ترمودینامیکی مرتبط با فرایند واسرشتگی دمایی پروتئین وحشی و جهش یافته نیوپوسین ۲ به دست آمدند [۲۸].

معادله ۱

$$S = \frac{\{(\alpha_N + \beta_N T) + (\alpha_D + \beta_D T) \times \exp\left(\left(\frac{\Delta H}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)\}}{(1 + \exp\left(\left(\frac{\Delta H}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right))}$$

در این رابطه α_N و β_N به ترتیب خط مبنای ناحیه قبل از منطقه گذار و شیب این خط (مربوط به پروتئین طبیعی)، α_D و β_D به ترتیب خط مبنای ناحیه بعد از منطقه گذار و شیب این خط (مربوط به پروتئین واسرشته)، S سیگنال طیف سنجی و ΔH تغییرات آنتالپی واکنش واسرشتگی دمایی است. T_m هم نقطه میانی گذار است و دمایی را

$$\Delta H - T_m \Delta S = 0$$

$$\Delta H = T_m \Delta S$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$$

نتایج حاصل از این آزمایش و مدل سازی نتایج آن، در جدول ۲ آورده شده است.

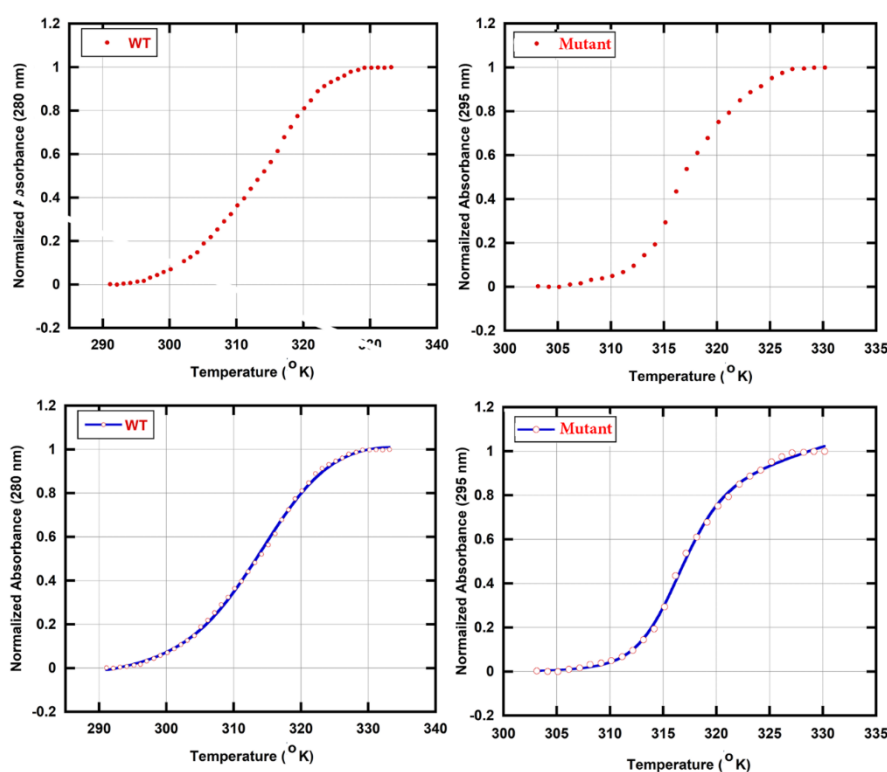
بر اساس داده‌های جدول ۲ در اثر اعمال جهش، در مقدار T_m تغییری ایجاد نشده است. با این حال، اختلاف معناداری در مقدار تغییرات آنتالپی مرتبط با واکنش واسرشتگی فوتوپروتئین دیده می‌شود، به طوری که مقدار تغییرات آنتالپی در پروتئین جهش یافته مقدار ۶۰ کیلوکالری افزایش را نشان می‌دهد. دقت در ظاهر منحنی‌های واسرشتگی حرارتی نیز نشان می‌دهد که دمای شروع تغییرات ساختاری در فوتوپروتئین جهش یافته، بالاتر بوده و این پروتئین در دماهای معمولی در برابر تغییرات ساختاری

^۱ thermal denaturation curves

^۱ Peltier device

که تفسیر بیولوژیکی آن، ناظر بر پایداری پروتئین در دماهای معمولی به صورتی است که در ادامه بیان می شود. افزایش معنادار مقدار تغییرات آنتالپی را می توان به افزایش قابل توجه در میزان متعادل بودن میانکنش های پایدارکننده پروتئین در نظر گرفت. به این معنا که از هم گسیختگی هر میانکنش کمک می کند که میانکنش های مجاور نیز دچار از هم گسیختگی شوند. تفسیر بالا بودن مقدار آنتالپی واسرشتگی و متعادل بودن میانکنش ها با در نظر گرفتن ساختار ساختار تاخورد و طبیعی پروتئین این است که میانکنش ها در کنار یکدیگر باعث تقویت بیشتر ساختار طبیعی پروتئین می شوند و بنابراین پایداری پروتئین جهش یافته در حالت تاخورد و طبیعی بیشتر است.

مقاومت بیشتری از خود نشان می دهد، از طرف دیگر، نه تنها تغییرات ساختاری در فوتوپروتئین جهش یافته از دماهای بالاتر شروع می شود، بلکه گذار ساختاری در این فوتوپروتئین پس از شروع، نسبت به نوع وحشی با روند سریع تری به انجام می رسد. به بیان دیگر گذار ساختاری در نوع وحشی (در مقایسه با نوع جهش یافته) از یک روند تدریجی تبعیت می کند. بنابراین، اگر مشتق این دو منحنی سیگموییدی را محاسبه کنیم، برای هر کدام یک منحنی به شکل عدد ۸ به دست می آید که سطح زیر این منحنی ها به مفهوم میزان انرژی ورودی به سیستم برای ایجاد تغییرات ساختاری و انجام واکنش واسرشتگی بوده و در نوع جهش یافته بیشتر خواهد بود. این پارامتر در معادله ۱ در قالب تغییرات آنتالپی واکنش واسرشتگی محاسبه می شود

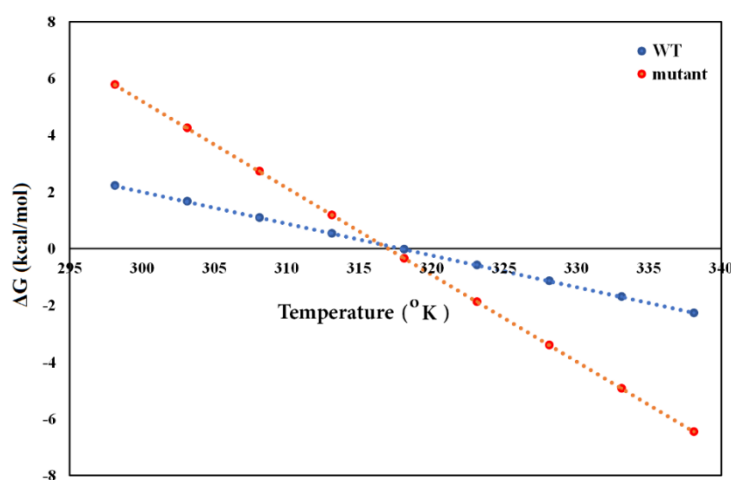


شکل ۸ ثبت و مدل سازی منحنی های واسرشتگی حرارتی (الف) داده های خام آزمایشگاهی که با استفاده از ثبت جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر بر حسب تغییرات دما به دست آمده اند. (ب) مدل سازی منحنی های واسرشتگی حرارتی با استفاده از نرم افزار کالیداگراف و تطبیق نتایج آزمایشگاهی. نقاط تشکیل دهنده منحنی داده های آزمایشگاهی و خط پیوسته آبی منحنی مدل سازی شده است.

جدول ۲ داده‌های ترمودینامیکی فرایند واسرشتگی.

	$\Delta H \left(\frac{\text{Kcal}}{\text{mole}} \right)$	$T_m \left(^\circ\text{K} \right)$	$\Delta S \left(\frac{\text{KCal}}{\text{mole} \cdot \text{K}} \right)$
پروتئین وحشی	35.6 ± 2	316 ± 0.8	0.112 ± 0.006
پروتئین جهش‌یافته	97 ± 6	316 ± 0.2	0.306 ± 0.018

مقادیر ΔH و T_m از طریق مدل‌سازی منحنی‌های واسرشتگی حرارتی به‌دست آمده‌اند و مقادیر ΔS با استفاده از معادله ۲ محاسبه شده است.



شکل ۹ تغییرات انرژی آزاد گیبس پروتئین وحشی و جهش‌یافته در دماهای مختلف

آنجا که محاسبات در مورد فرایند واسرشتگی انجام شده است، بدیهی است که مثبت‌تر بودن تغییرات انرژی آزاد گیبس نشان دهنده بالاتر بودن جمعیت مولکول‌های تاخوردۀ طبیعی به جمعیت مولکول‌های واسرشته در آن دما است. همانطور که در نمودار شکل ۹ دیده می‌شود، هر دو پروتئین نوعی رفتار خطی در برابر دما از خود نشان می‌هند، با این حال پروتئین جهش‌یافته در دماهای معمولی دارای مقادیر تغییرات انرژی آزاد گیبس بالاتری بوده و بنابراین جمعیت مولکول‌های طبیعی به مولکول‌های واسرشته در پروتئین جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی بیشتر است. تفسیر آزمایشگاهی این مدل این است که اگر غلظت برابری از دو فوتوپروتئین را در دماهای معمولی

برای بررسی بیشتر این موضوع، در نظر داشته باشیم که هر قسمت از منطقه گذار منحنی‌های واسرشتگی پروتئین در نمودار ۸ نشان‌دهندۀ نسبت جمعیت مولکولی پروتئین‌های واسرشته به تاخوردۀ بوده و عدد ثابتی برای هر فوتوپروتئین است (ثابت تعادل فرایند در هر دما). در ترمودینامیک این پارامتر طبق رابطه $\Delta G = -RT \ln K$ در مقدار تغییرات انرژی آزاد گیبس بازتاب پیدا می‌کند. بنابراین، بر اساس رابطه $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ می‌توان داده‌های آنتروپی و آنتالپی جدول ۲ را در دماهای مختلف محاسبه کرده و تغییرات انرژی آزاد گیبس در دماهای مورد نظر را به‌دست آورد. نتایج حاصل از این محاسبات در شکل ۹ آورده شده است. طبق تعریف ثابت تعادل و از

فوتون‌های حاصل از نشر نوری فوتوپروتئین جهش‌یافته تقریباً دو برابر فوتون‌های نشری پروتئین وحشی اندازه‌گیری شد. ایجاد جهش اگرچه باعث ایجاد کمپلکس پایدارتر با سوبسترا و افزایش جمعیت مولکول‌های دارای عملکرد شده است، با این حال کاهش تمایل به یون‌های کلسیم در فوتوپروتئین جهش‌یافته، باعث تاخیر در شروع واکنش لومینسانس شده است.

قدردانی و تشکر

نویسندگان مقاله بابت امکان دسترسی به دستگاه طیف‌سنجی فلئوئورسانس، از دانشگاه علوم پایه و تحصیلات تکمیلی زنجان کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

۵- منابع

- [1] Wilson, T., and Hastings, J. W. (1998) Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 197–230
- [2] Haddock, S. H. D., Moline, M. A., and Case, J. F. (2010) Bioluminescence in the sea. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2, 443–93
- [3] Hosseinkhani, S. (2011) Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1167–1182
- [4] Khalifeh, K., Ranjbar, B., Alipour, B. S. B. S., and Hosseinkhani, S. (2011) The effect of surface charge balance on thermodynamic stability and kinetics of refolding of firefly luciferase. *BMB Rep.* 44, 102–106
- [5] Hakiminia, F., Molakarimi, M., Khalifeh, K., Jahani, Z., Sajedi, R. H., and Ranjbar, B. (2016) Adjustment of local conformational flexibility and accessible surface area alterations of Serine128 and Valine183 in mnemiopsin. *J. Mol. Struct.* 1117, 287–292
- [6] Hakiminia, F., Khalifeh, K., Sajedi, R. H., and Ranjbar, B. (2016) Determination of structural elements on the folding reaction of mnemiopsin by spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 158, 49–55
- [۷] رنجبر، حکیمی‌نیا، ف.، خلیفه، خ.، حسن‌ساجدی، ر.، ب. (۱۳۹۷) تأثیر جایگزینی اسیدآمینه آرژینین ۳۹ با لیزین روی واسرشتگی گرمایی فوتوپروتئین نمپوسین ۱. *مجله زیست‌فناوری مدرس*. ۹، ۷–۱
- [۸] جهانی، ز.، ملاکریمی، م.، حسن‌ساجدی، ر.، تقدیر، م.،

داشته باشیم، غلظت موثر فوتوپروتئین جهش‌یافته یعنی تعداد مولکول‌های با ساختار طبیعی و عملکرد در نوع جهش‌یافته بیشتر بوده و انتظار داریم فعالیت بیشتری را از این پروتئین در دماهای معمولی اندازه‌گیری کنیم. این تحلیل با نتایج فعالیت دوفوتوپروتئین مبنی بر نشر دوبرابری فوتوپروتئین جهش‌یافته نسبت به نوع وحشی سازگار است.

۴- نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن قانون توزیع بولتسمن، در مورد محلول حاوی پروتئین‌ها می‌توان گفت که در شرایط محیطی مختلف، تعادل‌های جمعیتی متفاوتی بین ساختارهای طبیعی و غیرطبیعی وجود دارد و در شرایط بهینه برای هر پروتئین، بیشترین جمعیت مولکولی را ساختارهای تاخوردۀ طبیعی تشکیل می‌دهند. بنابراین، فارغ از غلظت اندازه‌گیری شده برای هر پروتئین، فعالیت و عملکرد آن وابسته به تعداد مولکول‌های دارای ساختار طبیعی است که می‌توانیم از آن با عنوان غلظت موثر نام ببریم. بدیهی است که با تغییر شرایط محیطی نسبت جمعیتی بین ساختارهای طبیعی و غیرطبیعی تغییر کرده و به تعادل جمعیتی جدیدی خواهیم رسید. مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که نوع جایگزینی آمینواسیدها در پروتئین جهش‌یافته می‌تواند باعث تقویت نیروی جاذبه الکتروستاتیک بین دو مارپیچ آلفای سطحی در نمپوسین ۲ شود. بر اساس مطالعات ساختاری و ترمودینامیکی، نتیجه این تغییر آمینواسیدی، فشرده‌تر شدن ساختار کلی پروتئین و متعادل‌تر شدن میانکنش‌های پایدارکننده بوده است، به‌طوری که بر اساس مدل‌سازی داده‌های ترمودینامیکی مشخص شد که در دماهای معمولی و در مقایسه با فوتوپروتئین وحشی، در نوع جهش‌یافته جمعیت فوتوپروتئین‌های با ساختار طبیعی بالاتر است. افزایش جمعیت مولکول‌ها در میزان بازدهی فعالیت لومینسانسی فوتوپروتئین‌ها قابل مشاهده است، به‌طوری که تعداد

- framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–W584
- [19] Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Métoz, F. (1999) ESPript: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics.* 15, 305–308
- [20] Webb, B., and Sali, A. (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 10.1002/cpbi.3
- [21] Fiser, A., and Šali, A. (2003) MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods Enzymol.* 374, 461–491
- [22] Shen, M.-Y., and Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 15, 2507–24
- [23] Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K., and Shimomura, O. (2000) The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature.* 405, 372–376
- [24] Stepanyuk, G. A., Liu, Z. J., Burakova, L. P., Lee, J., Rose, J., Vysotski, E. S., and Wang, B. C. (2013) Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca²⁺-loaded apoprotein conformation state. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1834, 2139–2146
- [25] Burakova, L. P., Natashin, P. V., Malikova, N. P., Niu, F., Pu, M., Vysotski, E. S., and Liu, Z. J. (2016) All Ca²⁺-binding loops of light-sensitive ctenophore photoprotein berovin bind magnesium ions: The spatial structure of Mg²⁺-loaded apo-berovin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 154, 57–66
- [26] Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C., and Ferrin, T. E. (2006) Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics.* 7, 339
- [27] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612
- [28] Shirdel, S. A., and Khalifeh, K. (2019) Thermodynamics of protein folding: methodology, data analysis and interpretation of data. *Eur. Biophys. J.* 48, 305–316
- [29] Mohammadi Ghanbarlou, R., Shirdel, S. A., Jafarian, V., and Khalifeh, K. (2018) Molecular mechanisms governing the حسینخانی، س.، اصغری، س. م. (۱۳۹۳) بررسی نقش برخی از آمینواسیدهای حفره اتصال کلنترازین در فوتوپروتئین نمپوسین در مقایسه با فوتوپروتئین‌های کیسه‌متان. *مجله زیست‌فناوری مدرس.* ۵، ۱–۱۳
- [9] Ereemeeva, E. V., and Vysotski, E. S. (2019) Exploring Bioluminescence Function of the Ca²⁺-regulated Photoproteins with Site-directed Mutagenesis. *Photochem. Photobiol.* 10.1111/php.12945
- [10] Ohmiya, Y., and Hirano, T. (1996) Shining the light: The mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. *Chem. Biol.* 10.1016/S1074-5521(96)90116-7
- [11] HASTINGS, J. W., Mitchell, G., Mattingly, P. H., Blinks, J. R., and Leeuwen, M. Van (1969) Response of Aequorin Bioluminescence To Rapid Changes in Calcium Concentration. *Nature.* 222, 1047–1050
- [12] Daunert, S., and Deo, S. K. (2006) Photoproteins in Bioanalysis. *Photoproteins Bioanal.* 10.1002/3527609148
- [13] Roda, A., Guardigli, M., Michelini, E., and Mirasoli, M. (2009) Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 307–322
- [14] Frank, L. A., Borisova, V. V., Markova, S. V., Malikova, N. P., Stepanyuk, G. A., and Vysotski, E. S. (2008) Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2223–2225
- [15] Hematyar, M., Jafarian, V., and Shirdel, A. (2022) Longer characteristic wavelength in a novel engineered photoprotein Mnemiopsin 2. *Photochem. Photobiol. Sci.* 21, 1031–1040
- [16] Jafarian, V., Sariri, R., Hosseinkhani, S., Aghamaali, M. R., Sajedi, R. H., Taghdir, M., and Hassannia, S. (2011) A unique EF-hand motif in mnemiopsin photoprotein from *Mnemiopsis leidyi*: Implication for its low calcium sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 164–170
- [17] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410
- [18] Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., and Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools

(2018) Negative net charge of EF-hand loop I can affect both calcium sensitivity and substrate binding pattern in mnemiopsin 2. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 807–814

evolutionary conservation of Glycine in the 6th position of loops III and IV in photoprotein mnemiopsin 2. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 10.1016/j.jphotobiol.2018.08.002
[30] Vafa, M., Khalifeh, K., and Jafarian, V.

Investigating the effect of electric dipole of antiparallel alpha helices on the structure and function of photoprotein Mnemiopsin 2

Fatemeh Norouzi¹, Seyedeh Akram Shirdel², Zahra Norouzi¹, Vahab Jafarian^{*3}, Khosrow Khalifeh^{*4, 5}

1. M.Sc. student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3. Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran
5. Associate Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

v.jafarian@guilan.ac.ir, khalifeh@znu.ac.ir

Receipt: 2024/12/18

Accepted: 2025/05/19

Abstract

In this study, the electrostatic interactions between the third and fourth antiparallel helices of Mnemiopsin 2 have studied. Due to the distribution of the positive and negatively charged residues at the C- and N-terminals of helices, we treated them as two antiparallel nanowires with electric dipole character. By mutating Phe87 to Arg, we aimed to enhance the electric dipole of the fourth helix. The MODELLER program was employed to generate the tertiary structure of the wild-type and mutant proteins. The expression system was prepared using the site-directed mutagenesis procedure. Activity measurements revealed that while the wild-type protein exhibited faster reaction initiation and a higher decay rate. However, the mutant displayed a significantly higher photon yield, approximately double that of the wild-type. Intrinsic fluorescence measurements indicated that the microenvironment around the chromophores in the mutant photoprotein had altered, leading to increased distance of chromophores from internal quenchers. However, the overall structure of the mutant protein became more compact, as confirmed by the ANS-based fluorescence. Heat-induced denaturation experiments showed that while the melting temperature (T_m) remained unaffected, the enthalpy change of denaturation increased significantly in the mutant, suggesting enhanced cooperativity in the intramolecular stabilizing interactions. Finally, it was concluded that increasing the cooperativity between the stabilizing interactions in the mutant protein, stabilize the native structure, leading to a higher population of functional complexes and, consequently, a higher photon yield.

Keywords: Mnemiopsin 2, Photoprotein, Mutant, Fluorescence, Heat-induced unfolding, Thermodynamics.