بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه نامه **خانم فاطمه احمدی بیداخویدی** رشته **بیوشیمی** به شماره دانشجویی **۹۰۵۱۰۱۱۰۰۱** با عنوان : **«کلون سازی، بیان و تعیین خصوصیات فتوپروتئین Photina و تغییر طیف بیولومینسانسی آن با استفاده از جهش زایی هدفدار»** از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر رضا حسن ساجدی	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر مهدی زین الدینی	استادیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر خسرو خواجه	استاد	
۴- استاد ناظر خارجی	دکتر سیدمحسن اصغری	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر خسرو خواجه	استاد	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فاطمه احمدی بیدا خویدی** دانشجوی رشته **بیوشیمی** ورودی سال تحصیلی ۱۳۹۰ مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۲/۱۱/۱۵

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ ~~رساله~~ دکتری نگارنده در رشته بیوشیمی است که در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار ~~خانم~~/جناب آقای دکتر ضیاحسن ساعدی ، مشاوره سرکار ~~خانم~~/جناب آقای دکتر مهدی زین الدینی و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر ——— از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب فاطمه احمدی بیداخویدی دانشجوی رشته بیوشیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فاطمه احمدی بیداخویدی

تاریخ و امضا:

۹۲/۱۱/۱۵

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

عنوان:

کلون‌سازی، بیان و تعیین خصوصیات فتوپروتئین Photina و تغییر طیف بیولومینسانسی آن با استفاده از جهش‌زایی هدفدار

نگارش: فاطمه احمدی

استاد راهنما: دکتر رضا حسن ساجدی

استاد مشاور: دکتر مهدی زین الدینی

بهمن ماه ۱۳۹۲

تقدیم

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به محضر ارزشمند پدر، مادر و خانواده عزیزم به خاطر همه ی تلاش‌های محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی-ام انجام داده‌اند و بامهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند. به استادان فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند. به آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه‌ی راهم بود.

پروردگارا حسن عاقبت، سلامت و سعادت را برای آنان مقدر نما.

تقدیر وتشکر

سپاس و ستایش خدای جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن تابان است و انوار حکت او در دل شب تار درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

شایسته است از کلیه کسانی که در تحقیق و تدوین این پایان نامه راهنمای بنده بوده اند، تشکر به عمل آورم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی سپاسگذارم که عالمانه و دلسوزانه در تمامی مراحل از انتخاب موضوع تا تدوین نهایی، مرا راهنمایی کردند.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر مهدی زین الدینی که مشاور بنده در این پایان نامه بودند، قدردانی می نمایم.

همچنین از هیأت محترم داوران، جناب آقای دکتر اصغری و جناب آقای دکتر خواجه که داوری این پایان نامه را پذیرفتند، تشکر می‌نمایم.

در نهایت از پدر، مادر و خانواده عزیز، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا مراتب تحصیلی را به نحو احسن به اتمام برسانم، سپاسگزاری می‌نمایم.

چکیده

امروزه استفاده از فتوپروتئین‌ها به واسطه سیگنال کم پس زمینه‌ای جایگاهی ویژه یافته‌است. در بین فتوپروتئین‌های رایج، اکثر مطالعات روی فتوپروتئین اکورین متمرکز شده است. در سال‌های اخیر محققین شرکت Axxam سه فتوپروتئین ارتقاء یافته به نام‌های Photina، i-Photina و c-Photina تولید کردند. این فتوپروتئین‌ها به واسطه سیگنال‌دهی قوی و نیز بادوام‌تر خود نسبت به اکورین، دریچه‌ی نوینی را به روی کاربرد بیولومینسانس در سنجش‌های HTS[1] گشوده‌اند و درحال حاضر فرم تجاری این سه فتوپروتئین توسط شرکت‌های مختلفی عرضه می‌گردد. در این تحقیق فتوپروتئین i-Photina به دلیل شدت سیگنال بالاتر و همچنین پایداری نسبتاً مناسب آن نسبت به دو فتوپروتئین دیگر جهت مطالعه و نیز تولید واریانت‌هایی از آن با خصوصیات بهبودیافته از جمله تغییر در طول موج نشری انتخاب گردید. این مهم تا حدودی با ایجاد موتانت‌هایی از i-Photina (F91Y و W95F) محقق شد. ابتدا ترجیح کدونی ژن i-Photina براساس سلول‌های پستانداران و *E. coli* تنظیم گردید. سپس توالی مربوطه سنتز و در باکتری *E. coli* بیان شد. در مرحله بعد جهش زایی به روش QuikChange انجام شد. در نهایت خصوصیات بیولومینسانسی فتوپروتئین‌های اکورین، i-Photina و جهش یافته‌ها و نیز ساختار آن‌ها با روش‌های مختلف تجربی و تئوری مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. شدت سیگنال i-Photina نسبت به اکورین نزدیک به ۱۴ برابر به دست آمد. تغییر خصوصیات بیولومینسانسی در جهش یافته‌های F91Y و W95F به ترتیب شامل ۲۰ و ۱۰ نانومتر جابه‌جایی طیف نشری به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر، ۳۰٪ افزایش و ۸۰٪ کاهش در شدت سیگنال نشری و نیز افزایش میزان حساسیت به کلسیم و مدت زمان نوردهی در هر دو جهش یافته نسبت به i-Photina بود. با توجه به بهبود بسیاری از خصوصیات بیولومینسانسی جهش یافته F91Y، می‌توان آن را به عنوان یک گزارشگر بیولومینسانسی بسیار کارآمد در سنجش‌های HTS و نیز سنجش‌های همزمان نسبت به سایر فتوپروتئین‌های رایج از جمله اکورین و نیز i-Photina مطرح نمود.

واژگان کلیدی: فتوپروتئین، i-Photina، طیف نشری بیولومینسانس، HTS (High-Throughput Screening)

[1] High-Throughput Screening

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و تئوری ۱
۱-۱ فتوپروتئین ها ۲
۱-۲ انواع فتوپروتئین ها ۲
۱-۳ ساختار فتوپروتئین ها ۴
۱-۳-۱ حفره اتصال به کلنترازین ۴
۱-۳-۲ جایگاه های اتصال به کلسیم ۷
۱-۴ مکانیسم نشر نور در فتوپروتئین های وابسته به کلسیم ۹
۱-۵ حساسیت به یون های کلسیم ۱۰
۱-۶ مطالعات جهش زایی انجام گرفته بر روی فتوپروتئین ها با رویکرد تغییر طیف نشری ۱۱
۱-۷ کاربرد فتوپروتئین ها ۱۵
۱-۸ تولید فتوپروتئین هایی کار آمد در سنجش های HTS ۲۵
۱-۸-۱ کاربرد و مزایای فتوپروتئین های Photina، i-Photina و c-Photina ۲۷
۱-۹ اهدف تحقیق ۳۰
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۲
۲-۱ تجهیزات، مواد و میکروارگانیسم ها ۳۳
۲-۱-۱ دستگاه‌ها ۳۳
۲-۱-۲ مواد شیمیایی ۳۳
۲-۱-۳ آنزیم ها، پلاسمیدها، کیت ها و آنتی بیوتیک های مورد استفاده ۳۴
۲-۱-۴ بافر، محیط و محلول‌های مورد استفاده ۳۴
۲-۱-۴-۱ بافرهای الکتروفورز DNA (آگارز) و پروتئین (SDS-PAGE) ۳۴
۲-۱-۴-۲ بافر لیز ۳۴
۲-۱-۴-۳ بافرهای تخلیص پروتئین نوترکیب برای ستون نیکل آگاروز ۳۵
۲-۱-۴-۴ بافر دیالیز ۳۵
۲-۱-۴-۵ بافرها و محلول های مورد نیاز جهت تهیه فتوپروتئین نیمه سنتزی و تعیین فعالیت ۳۵
۲-۱-۴-۶ محلول برادفورد ۳۶
۲-۱-۴-۷ محیط‌های کشت باکتریایی ۳۶
۲-۲ انتخاب فتوپروتئین I-PHOTINA و تولید آن ۳۷

۲-۲-۱ طراحی و سنتز ژن ۳۷
۲-۲-۲ انتقال وکتور حاوی ژن i-Photina به میزبان بیانی ۳۸
۲-۲-۲-۱ تهیه باکتری مستعد ۳۸
۲-۲-۲-۲ انتقال شیمیایی پلاسمید به باکتری ۳۹
۲-۲-۳ تولید پروتئین نوترکیب ۳۹
۲-۲-۳-۱ بیان پروتئین در باکتری ۳۹
۲-۲-۳-۲ تهیه محتوای سلولی از باکتری ها ۴۰
۲-۲-۳-۳ تخلیص و دیالیز پروتئین نوترکیب ۴۰
۲-۲-۴تهیهi-Photina نیمه سنتزی و تعیین فعالیت بیولومینسانسی آن ۴۱
۲-۳ جهش زایی هدفمند ۴۲
۲-۳-۱ انتخاب جهش ها ۴۲
۲-۳-۲ روش های ملکولی ۴۲
۲-۳-۲-۱ طراحی و سنتز پرایمرهای جهش زایی ۴۲
۲-۳-۲-۲ جهش زایی به روش QuikChange ۴۳
۲-۳-۳ انتقال محصولات واکنش تکثیر پلاسمید به میزبان کلونینگ DH5α ۴۴
۲-۳-۴ استخراج پلاسمید و تعیین توالی ۴۴
۲-۳-۵ به دست آوردن میزان ثبات فعالیت i-Photina ها در طول زمان ۴۵
۲-۳-۶ بررسی میزان حساسیت به کلسیم ۴۵
۲-۳-۷تعیین حداکثر طول موج نشر بیولومینسانسی i-Photina و جهش یافته های آن (λ_{max}) ... ۴۵
۲-۳-۸ اندازه گیری فعالیت لومینسانسی علیه زمان ۴۵
۲-۳-۹ مطالعات ساختاری با استفاده از تکنیک‌های طیف سنجی ۴۶
۲-۳-۹-۱ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی ۴۶
۲-۳-۹-۲ مطالعات فلوئورسانس ذاتی و خارجی (ANS) ۴۶
۲-۳-۹-۳ مطالعات خاموشی فلورسانس ۴۷
۲-۳-۱۰ مطالعات تئوری: مدلسازی مقایسهای ۴۷
فصل سوم: نتایج ۴۹
۳-۱ طراحی و سنتز ژن ۵۰
۳-۲ بیان و تخلیص فتوپروتئین ۵۱
۳-۳ تعیین خصوصیات فتوپروتئین I-PHOTINA ۵۲

۳-۳-۱ تهیه i-Photina نیمه سنتزی و تعیین فعالیت بیولومینسانسی آن ۵۲
۳-۳-۲ بررسی میزان پایداری i-Photina در طول زمان ۵۳
۳-۳-۳ بررسی میزان حساسیت به کلسیم ۵۴
۳-۳-۴ تعیین حداکثر طیف نشر بیولومینسانسی i-Photina (λ_{max}) ۵۴
۳-۳-۵ اندازه گیری فعالیت بیولومینسانسی علیه زمان ۵۵
۳-۴ انجام جهش های هدفمند به منظور افزایش کارایی فتوپروتئین انتخاب شده ۵۶
۳-۴-۱ انتخاب جهش ها ۵۶
۳-۴-۲ جهش زایی هدفدار ۵۷
۳-۴-۳ تکثیر جهش یافته های i-Photina در میزبان $DH_5\alpha$ ۵۸
۳-۴-۴ بیان و تخلیص i-Photina و جهش یافته های آن در میزبان *E. coli* ۵۹
۳-۵ تعیین خصوصیات فتوپروتئین های جهش یافته در مقایسه با I-PHOTINA ۶۰
۳-۵-۱ سنجش فعالیت ویژه i-Photina های نیمه سنتزی ۶۰
۳-۵-۲ بررسی میزان پایداری i-Photina ها در طول زمان ۶۱
۳-۵-۳ بررسی میزان حساسیت به کلسیم ۶۱
۳-۵-۴ تعیین λ_{max} برای i-Photina ها ۶۲
۳-۵-۵ اندازه گیری فعالیت لومینسانسی علیه زمان ۶۲
۳-۵-۶ بررسی خصوصیات ساختاری فتوپروتئین ها با استفاده از روش های طیف سنجی ۶۳
۳-۵-۶-۱ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی ۶۳
۳-۵-۶-۲ بررسی ساختاری فتوپروتئین ها با استفاده از فلورسانس ذاتی و خارجی ۶۴
۳-۵-۶-۳ بررسی خاموش شدن فلورسانس به وسیله اکریل آمید ۶۶
۳-۶ مطالعات تئوری: مدلسازی مقایسه ای ۶۷
۳-۶-۱ بررسی اعتبار مدل ها ۶۷
۳-۶-۲ بررسی برخی ویژگی های ساختاری i-Photina و جهش یافته های آن براساس مدل های ساخته شده ۶۹
۳-۶-۲-۱ هیدروفوبیسیته سطحی ۶۹
۳-۶-۲-۲ میانکنش های داخلی ۷۲
۳-۶-۲-۳ بررسی تغییرات موضعی جهش یافته ها ۷۳
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۷۵
۴-۱ انتخاب فتوپروتئین I-PHOTINA ۷۶

۴-۲ جهش زایی هدفدار ۷۸
۴-۳ ویژگی های ساختاری I-PHOTINA و جهش یافته های آن ۸۰
۴-۴ تاثیر جهش ها بر خصوصیات بیولومینسانسی I-PHOTINA ۸۲
۴-۵ نتیجه گیری ۸۸
۴-۶ پیشنهاد برای کارهای آینده ۸۹
منابع ۹۰

فصل اول

مقدمه و تئوری

۱-۱ فتوپروتئین‌ها[1]

فتوپروتئین‌ها اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط Shimomura و همکارانش از یک چتر دریایی به نام *Aequorea Victoria* جداسازی و تعیین خصوصیت شدند. فتوپروتئین حاصله اکورین[2] نام گرفت که در محلول‌های آبی تنها با افزودن مقدار کمی از یون‌های کلسیم قادر به نشر نور بود (۱). فتوپروتئین‌ها انواع مختلفی دارند. به طور کلی بعضی از آن‌ها برای تولید نور وابسته به کلسیم می‌باشند، نظیر فتوپروتئین‌های کیسه تنان[3]، شانه داران[4] و شعاعیان[5] و فتوپروتئین‌هایی مثل فتوپروتئین‌های صدف‌ها[6] که از رادیکال‌های سوپراکسید و اکسیژن جهت نشر نور استفاده می‌کنند. فتوپروتئین میگوهای Euphausiid تنها در حضور ترکیبات فلوئورسانت نور منتشر می‌کند و فتوپروتئین هزارپای درخشان[7] به ATP و Mg^{2+} برای تولید نور نیاز دارد. هر چند بیولومینسانس در طبیعت رایج است، تنها تعداد کمی از فتوپروتئین‌ها جداسازی و تعیین خصوصیت شده اند.

۱-۲ انواع فتوپروتئین‌ها

انواع مختلف فتوپروتئین‌هایی که تاکنون شناسایی شده اند را می‌توان به صورت زیر طبقه بندی کرد:

۱- فتوپروتئین‌های شعاعیان[8]: فتوپروتئین‌های حساس به کلسیم که از انواع گونه‌های تالاسیکالا[9] جداسازی شده و از این نظر که غیر از فتوپروتئین‌های کلنترات و کتنوفورها تنها مثال شناخته شده از فتوپروتئین‌های حساس به کلسیم هستند، مورد توجهند (۲).

---

[1] Photoproteins
[2] Aequorin
[3] Coelenterates
[4] Ctenophores
[5] Radiolarians
[6] Bivalves
[7] Millipede luminodesmus
[8] Radiolarian (protozoa)
[9] Thalassicala

۲- فتوپروتئین‌های کلنترات[1] (کیسه‌تنان): انواع متعددی از این پروتئین‌ها از هیدروئیدها و ژله ماهیان جداسازی شده اند (به عنوان مثال اکورین، ابلین[2]). تمام این فتوپروتئین‌ها وزن مولکولی در حدود ۲۴ کیلودالتون دارند و زمانی که Ca^{2+} اضافه می‌شود، بدون توجه به حضور یا عدم حضور اکسیژن، نور آبی نشر می‌کنند (λ_{max}=۴۶۰ nm). در این گروه، مطالعات جزئی و دقیق تنها بر روی سه نوع صورت گرفته است: اکورین، ابلین و فیالیدین (کلایتین)[3] که به ترتیب از گونه‌های *Aequorea Victoria*، *Obelia geniculata* و *Clytia gregaria* به دست آمده اند. اکورین متشکل از ۱۸۹ باقیمانده آمینواسیدی می‌باشد (۳). ابلین نیز یک فتوپروتئین ۲۲/۲ کیلودالتونی است و دارای ۱۹۵ باقیمانده آمینواسیدی می‌باشد (۴). cDNA فتوپروتئین کلایتین در سال ۱۹۹۳ کلون شد و ساختار اولیه آن از روی توالی نوکلئوتیدی تعیین شد. این پروتئین نیز متشکل از ۱۸۹ باقیمانده آمینواسیدی می‌باشد (۵). لازم به ذکر است که حساسیت و برخی ویژگی‌های دیگر در اکورین و احتمالاً در همه فتوپروتئین‌های کلنترات می‌توانند با جایگزین کردن بخش کلنترازین فتوپروتئین با آنالوگ‌هایش تغییر نماید (۶).

۳- فتوپروتئین‌های شانه داران[4] (کتنوفورها): فتوپروتئین‌های نمیوپسین[5] و بروین[6] و BfosPP به ترتیب از گونه‌های *Mnemiopsis leidyi*، *Beroe abyssicola* و *Bathocyroe fosteri* از شانه داران جداسازی شده اند (۷)، (۸) و (۹). اعضای این خانواده فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیمی هستند که بر خلاف فتوپروتئین‌های خانواده کیسه تنان حساس به نور[7] بوده و به آسانی توسط طیف وسیعی از نور (طول موج‌های ۵۷۰-۲۳۰ نانومتر) غیرفعال می‌شوند (۱۰).

[1] Coelenterates
[2] Obelin
[3] Phialidin (Clytin)
[4] Ctenophores
[5] Mnemiopsin
[6] Berovin
[7] Photosensitive

۱-۳ ساختار فتوپروتئین‌ها

تاکنون ساختار کریستالی چهار فتوپروتئین تعیین شده است که عبارتند از: اکورین (۱۱) و (۱۲)، ابلین (۴)، (۱۳) و (۱۴) و کلایتین (۱۵) که جزء فتوپروتئین‌های کیسه تنان می‌باشند و بروین (۱۶) و (۱۷) که عضوی از فتوپروتئین‌های شانه داران است. تمام فتوپروتئین‌های تنظیم شونده توسط کلسیم همولوژی توالی بالایی نشان می‌دهند (۳). تطابق[1] توالی‌های آمینواسیدی فتوپروتئین‌ها نشان دهنده حدود ٪۷۵-۶۵ همسانی توالی بین فتوپروتئین‌های کیسه تنان و حدود ٪۸۰ برای فتوپروتئین‌های شانه داران می‌باشد؛ درحالی‌که همسانی توالی بین فتوپروتئین‌های این دو گروه با یکدیگر پایین و حدود ٪۲۵ است. همچنان‌که از همولوژی توالی‌های اولیه انتظار می‌رود همه این پروتئین‌ها ساختار کروی فشرده یکسانی دارند و متشکل از یک زنجیره پلی پپتیدی حدوداً ۲۲kDa هستند (۱۸). در مورد ابلین، ساختار سوم شامل دو مجموعه از چهار هلیکس (هلیکس‌های A-H) متشکل از موتیف‌های هلیکس-ترن-هلیکس[2] I و II در انتهای N-ترمینال و موتیف‌های هلیکس-ترن-هلیکس III و IV در انتهای C-ترمینال می‌باشد. دومین‌های N و C ترمینال می‌توانند به صورت دو فنجان (جام) تصور شوند که درونشان با باقیمانده‌های آبگریز پوشیده می‌شود و از دیواره‌ها به هم متصل می‌شوند (۱۹) و (۴).

۱-۳-۱ حفره اتصال به کلنترازین[3]

در فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم سوبسترای کلنترازین در حفره‌ای شدیداً آبگریز[4] و دور از دسترس حلال در مرکز پروتئین قرار گرفته است. کلنترازین یک ترکیب حلقوی است و دو گروه پاراهیدروکسی فنیل در موقعیت کربن‌های ۲ و ۶ و گروه هیدروکسی بنزیل در موقعیت کربن ۸ مشاهده می‌شود. تحقیقات نشان داده است که کلنترازین فعال به‌صورت هیدروپراکسید کلنترازین می‌باشد که گروه

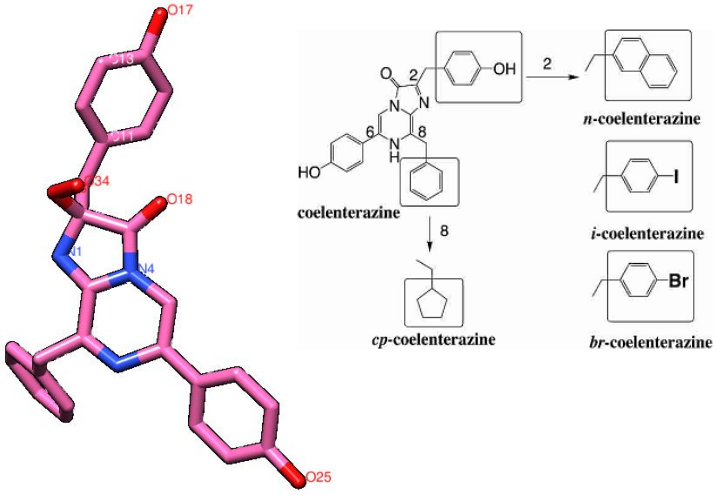
[1] Alignment

[2] Helix-Turn-Helix

[3] Coelenterazine

[4] Hydrophobic

پراکسید در موقعیت کربن ۲ قرار گرفته است. ساختار مولکولی کلنترازین طبیعی و آنالوگ‌های آن در شکل ۱-۱ نشان داده شده است (۲۰). حفره اتصال به کلنترازین توسط باقیمانده‌های شدیداً حفظ شده‌ای که از هلیکس‌ها منشاء می‌گیرند تشکیل می‌شود. علاوه بر باقیمانده‌های آبگریز، برخی زنجیره‌های جانبی آبدوست نیز به سمت داخل حفره جهت گیری کرده‌اند. این زنجیره‌های جانبی شبکه‌ای از پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند که کلنترازین شدیداً ناپایدار را پایدار می‌کند (۲۱) و (۵).



شکل ۱-۱. ساختار مولکولی کلنترازین طبیعی که با برنامه کایمرا نمایش داده شده و آنالوگ‌های کلنترازین (۲۰).

به‌طور کلی سه گروه میانکنش‌های زنجیره‌های جانبی در حفره اتصال به کلنترازین فتوپروتئین‌های کلنترات قابل توجه است. این میانکنش‌ها کلنترازین را در جایگاه اتصال قرار می‌دهند و به نظر می‌رسد که بعضی از آن‌ها اهمیت عملکردی برای مکانیسم عمل اکورین و ابلین داشته باشند، هر چند که این عملکردها هنوز ناشناخته هستند. این سه گروه میانکنش‌ها عبارتند از (شکل۱-۲):

۱- گروه OH فنلی Tyr138 ابلین (Tyr132 در اکورین)، که هم سطح حلقه ایمیدازوپیرازینون لیگاند قرار گرفته، با N_1 پراکسی کلنترازین پیوند رذهیدروژنی می‌دهد. لازم به یادآوری است که این باقیمانده از

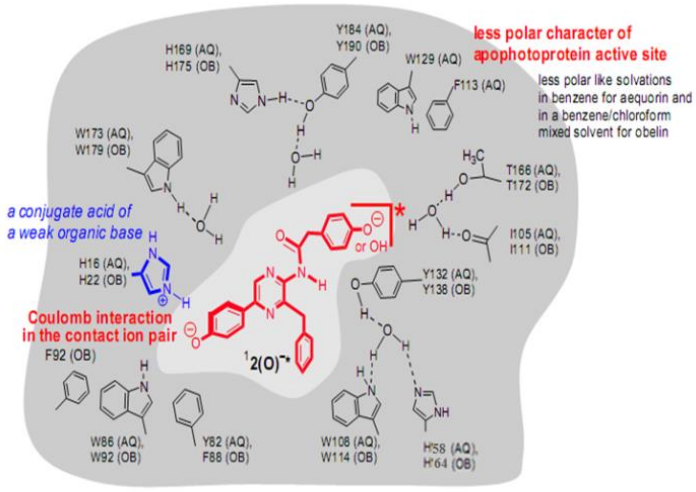
جمله باقیمانده‌های آبدوست[1] موجود در حفره آبگریز اتصال به کلنترازین است که زنجیره جانبی آبدوست آن به سمت داخل حفره جهت گیری می‌کند و در کنار زنجیره‌های جانبی مربوط به باقیمانده‌های His22، His175 و Tyr190 شبکه‌ای از پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهد که کلنترازین ناپایدار را درون حفره پایدار می‌کند. این باقیمانده همچنین از طریق پیوند هیدروژنی با یک مولکول آب (W2)، به His64 متصل می‌شود. گروه ایمیدازول این هیستیدین در نزدیکی حلقه ایندول Trp114، که حلقه ایمیدازوپیرازینون را پوشانده، قرار دارد (۴)، (۱۴)، (۲۲)، (۲۳)، (۲۴) و (۲۵).

۲- گروه OH فنلی در موقعیت C_6 کلنترازین در مرکز یک سه گوش که توسط ترياد Tyr-His-Trp، شامل اکسیژن فنلی Tyr82، اتم $N\delta_1$ His16 و اتم $N\varepsilon_1$ Trp86 ایجاد شده است، قرار دارد. اتم اکسیژن در این موقعیت روی لیگاند (مثلا یک OH یا -O) برای نشر نور ضروری نیست، زیرا جایگزینی OH با NH_2 فعالیت لومینسانسی را از بین نمی‌برد (۱۴).

۳- گروه ρ-OH گروه فنیل در موقعیت C_2 لیگاند، با یک مولکول آب (W1) پیوند هیدروژنی می‌دهد. خود مولکول آب نیز با اکسیژن کربونیل Ile105 و اکسیژن زنجیره جانبی Thr166 میانکنش می‌دهد. هنوز ضرورت این گروه OH برای عملکرد اکورین به اثبات نرسیده است. مثلا جایگزینی آن با هیدروژن یا هالوژن‌ها تاثیر مهمی در توانایی نشر نوری نداشته است. جهش یافته‌هایی از اکورین که دارای چنین فرم-های تغییر یافته لیگاندی باشند تفاوت‌هایی در حساسیت به کلسیم، سرعت لومینسانس و بازتولید[2] نشان می‌دهند (۱۲).

[1] Hydrophil

[2] Regeneration time



شکل ۱-۲. شمایی از موقعیت ساختاری آمینواسیدهای دخیل در میانکنش با کلنترازین در اکورین (AQ) و ابلین (OB) (۲۲).

۱-۳-۲ جایگاه‌های اتصال به کلسیم

فتوپروتئین‌ها زیرخانواده ای از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم می‌باشند. اعضای خانواده پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم ضرورتاً تشابه عملکرد ندارند اما اکثر آن‌ها از طریق یک واحد ساختاری هومولوگ به نام EF-hand به طور انتخابی به کلسیم متصل می‌شوند. ترکیب آمینواسیدی جایگاه‌های اتصال به کلسیم در پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم مشابه است (۲۶). البته Ca^{2+} برای بیولومینسانس فتوپروتئین‌ها ضروری نمی‌باشد زیرا خود این پروتئین‌ها به‌تنهایی سطح بسیار پایینی از نشر نور را انجام می‌دهند، که به عنوان لومینسانس مستقل از Ca^{2+} شناخته می‌شود، لیکن به محض افزایش کلسیم شدت نور تا یک میلیون بار یا بیشتر افزایش می‌یابد (۲۳). تمام فتوپروتئین‌های متصل شونده به کلسیم که تا به امروز تعیین خصوصیت شده اند دارای چهار موتیف EF-Hand (با ساختار هلیکس-لوپ-هلیکس(HLH)) می‌باشند که سه تای آن قابلیت اتصال به کلسیم را دارند (لوپ‌های I، III و IV که به ترتیب به نام لوپ-های I،II و III نامیده می‌شوند) (شکل۱-۳). برای اتصال کلسیم به داخل هر EF-hand، ۱۲ باقیمانده از

لوپ موقعیتشان را تغییر می‌دهند تا کلسیم در کانفیگوراسیون[1] ترجیحی اش آرایش یابد. آرایش ژئومتریک معمول اتم‌های اکسیژن مربوط به آمینواسیدهای موجود در موقعیت‌های ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۲ لوپ، در یک دو هرمی پنج وجهی مشاهده می‌شوند که Ca^{2+} در مرکز هرم قرار می‌گیرد. در مورد ابلین، آمینواسید موقعیت‌های ۱، ۳ و ۵ هرکدام توسط اتم اکسیژن زنجیره جانبی خود، آمینواسید موقعیت ۷ توسط اکسیژن زنجیره اصلی و باقیمانده موقعیت ۱۲، که معمولاً گلوتامات می‌باشد، با هر دو اتم اکسیژن موجود در زنجیره جانبی خود به طور مستقیم تامین کننده ۶ اتم اکسیژن لیگاند برای یون کلسیم می-باشند. هفتمین لیگاند نیز، اکسیژن یک مولکول آب می‌باشد که با آمینواسید موقعیت ۹ لوپ تشکیل پیوند هیدروژنی داده است (۲۷). مطالعات انجام شده توسط Liu و همکارانش (۲۰۰۳) در ابلین نشان دهنده بالاتر بودن تمایل لوپ I به کلسیم در مقایسه با دو لوپ دیگر است که این نشان می‌دهد که نحوه قرارگیری آمینواسیدهای لوپ I طوری است که برای اتصال به کلسیم تنها تغییر کوچکی را انجام می-دهند تا در جایگاه مناسب قرار گیرند (۲۸). از طرف دیگر Tricoire و همکارانش نشان دادند که در اکورین تمایل لوپ I در اتصال به کلسیم کمتر از دو لوپ دیگر است به‌طوری‌که تمایل لوپ‌های II و III به کلسیم ۲۲ بار بیشتر از لوپ I است (۲۶).

شکل ۱-۳. ساختار سه بعدی فتوپروتئین ابلین (PDB code: 1JF0)، هلیکس‌های دمین-های N و C ترمینال به‌ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز نشان داده شده است و اعداد رومی I تا IV نیز لوپ‌های EF-hand متصل شونده به کلسیم را نشان می‌دهند (۲۹).

[1] Configuration