بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی
(گرایش بیوشیمی)

مطالعه فتوپروتئین Mnemiopsin با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و کالریمتری

از :
شیما ترحمی

استاد راهنما :
دکتر رضا حسن ساجدی

اساتید مشاور :
دکتر بیژن رنجبر
دکتر مجید تقدیر

(اسفند ۱۳۹۰)

به احترام او که سرود:

نام تو نور

نام تو سوگند

نام تو شور

نام تو لبخند (قیصر امین‌پور)

با تمام احترام تقدیم به:

عموی بزرگوارم (دکتر سید مصطفی ترحمی) **که زمانی مثل همه‌ی ما میهمان این دیار بود و اینک؛**

در جایی دیگر به میهمانی خدا رفته است.

تقدیر و تشکر:

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

با تقدیر و تشکر شایسته از استادان فرهیخته و فرزانه جناب آقایان دکتر ساجدی و دکتر رنجبر که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نمودند و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام واکمال پایان نامه بوده اند. از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر تقدیر که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند و با مساعدت ایشان این پروژه به نتیجه‌ی مطلوب رسید؛ سپاسگذارم.

از استادان فرزانه و دلسوز؛ جناب آقایان دکتر حسینخانی و دکتر اصغری که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم؛ باشد که این خردترین بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید. از اساتید بزرگوار و مهربانم، جناب آقای دکتر صادق حسن نیا و سرکار خانم دکتر ریحانه سریری بخاطر راهنمایی ها و زحمات بی شائبه شان سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم در گروه زیست شناسی دانشگاه گیلان و گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس، کمال تشکر و سپاس-گذاری را دارم. و در پیشگاه خداوند متعال آرزوی تندرستی و موفقیت بسیار در تمام عرصه‌های زندگی را برای آن‌ها خواستارم. به ویژه از سرکار خانم ندافی،کارشناس محترم آزمایشگاه بیوفیزیک محاسباتی و بیوترمودینامیک، که با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند.

و در نهایت خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسبیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار ، مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند...

چکیده

مطالعه فتوپروتئین Mnemiopsin با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و کالریمتری

شیما ترحمی

نمیوپسین پروتئینی متعلق به خانواده‌ی بزرگ پروتئین‌های اتصالی به کلسیم از نوع EF-hand و از گروه فتوپروتئین های وابسته به Ca^{2+} می باشد که به‌طور گسترده‌ای به عنوان کاوشگر داخل سلولی کلسیم، بیوسنسور، نشانگر آنالیز زیستی برای مطالعات immunoassay و ... استفاده می‌شود. یکی از ویژگی‌های تمامی اعضای خانواده‌ی EF-hand وجود موتیف ساختمانی مارپیچ-لوپ-مارپیچ می‌باشد. در این تحقیق برای نخستین بار تغییرات کانفورماسیونی پروتئین نمیوپسین در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم مورد مطالعه قرار گرفت. پروتئین نمیوپسین در باکتری *E. coli* سویه BL21 بیان شد و به کمک ستون Ni-NTA Agarose تخلیص گردید. کلسیم توسط EDTA یا رسوب با تری‌کلرواستیک‌اسید از ساختار پروتئین حذف شد. مطالعات Far-UV CD، فلوئورسانس و کالریمتری توسط Jasco-715 spectropolarimeter، LS55 fluorescence spectrophotometer و Nano DSC-III انجام شد. طیف Far-UV CD تمامی اشکال دارای کلسیم با آپونمیوپسین تفاوت چندانی نشان نمی‌دهد، اما به نظر می‌رسد تاثیر غلظت‌های پایین و بالا بر ساختار کمی متفاوت است. فلوئورسانس ذاتی در حضور کلسیم کاهش می‌یابد، درحالیکه فلوئورسانس ANS افزایش می یابد. این نتایج نشان می‌دهد نمیوپسین در حالت آپو نسبت به ساختار دارای کلسیم کانفورماسیون بسته‌تری دارد. هم‌چنین شیب اشترن-ولمر (حاصل از خاموشی فلوئورسانس در حضور اکریل-امید) برای نمیوپسین دارای کلسیم نسبت به آپو بیشتر است، بنابراین انعطاف‌پذیری (در دسترس بودن آمینواسید تریپتوفان) در ساختار دارای کلسیم افزایش می‌یابد. هضم پروتئین در حضور ترمولیزین نشان داد پروتئین در حالت آپو نسبت به ترمولیزین مقاوم‌تر است و کمتر هیدرولیز می شود. نتایج دینامیک مولکولی نیز نشان می‌دهد در میان پنج باقیمانده تریپتوفان موجود در ساختار نمیوپسین، تغییرات ریزمحیط اطراف رزیدو ۲۱ از اهمیت بیشتری برخوردار است. مطالعات کالریمتری بیانگر افزایش پایداری حرارتی پروتئین در حضور کلسیم است. نتایج تجربی کسب شده در این تحقیق نشان از آن دارد که برخلاف اکثر پروتئین های متصل شونده به کلسیم، با اتصال کلسیم انعطاف‌پذیری ساختار نمیوپسین در کل افزایش می‌یابد که با عملکرد این پروتئین تطابق کامل دارد.

کلمات کلیدی: نمیوپسین، EF-hand، انعطاف‌پذیری، کلسیم، تغییرات کانفورماسیونی

عنوان صفحه

چکیده فارسی.....س

چکیده انگلیسی.....ش

فصل اول: مقدمه و تئوری.....۱

۱-۱- پروتئین های اتصالی به کلسیم.....۲

۱-۱-۱- کلسیم در فضای خارج سلولی.....۳

۱-۱-۲- کلسیم در فضای داخل سلولی.....۴

۱-۱-۳- پروتئین های اتصالی به کلسیم در میکروارگانیسم ها.....۷

۱-۲- EF-hand: واحد ساختمانی جهت اتصال به کلسیم.....۸

۱-۲-۱- لوپ EF-hand استاندارد.....۹

۱-۲-۲- لوپ EF-hand غیراستاندارد.....۱۰

۱-۳- جفت شدن موتیف های EF-hand.....۱۳

۱-۴- سازماندهی دمین EF-hand.....۱۵

۱-۵- پیامدهای اتصال کلسیم.....۱۸

۱-۵-۱- اتصال کلسیم و القای تشکیل ساختار.....۱۸

۱-۵-۲- اتصال کلسیم و تغییر کانفورماسیون.....۱۹

۱-۶- روش های تعیین غلظت و توزیع فضایی کلسیم.....۲۱

۱-۶-۱- اندازه گیری غلظت کلسیم آزاد.....۲۲

۱-۶-۱-۱- الکترود اختصاصی کلسیم.....۲۲

۱-۶-۱-۲-بیولومینسانس.....۲۳

۱-۶-۱-۳- عوامل ترکیبی با خاصیت فلوئورسانس یا جذب نور وابسته به کلسیم.....۲۴

۱-۶-۱-۳-۱- Ratiometric indicators.....۲۵

۱-۶-۱-۳-۲- Long-wavelength indicators.....۲۶

۱-۶-۱-۳-۳- Low-affinity indicators.....۲۷

۱-۶-۱-۳-۴- Indicator-dextran conjugates.....۲۷

۱-۶-۱-۴- عوامل ترکیبی وابسته به کلسیم با طیف NMR.....۲۸

۱-۶-۲- اندازه گیری غلظت کلسیم کل.....۲۹

۱-۶-۲-۱- کاوشگر الکترون و تکنیک های کاهش انرژی الکترون.....۳۰

۱-۶-۲-۲- نشر اشعه-X القا شده توسط پروتون(PIXE).....۳۱

۱-۶-۲-۳- میکروسکوپ یونی(IM).....۳۲

۱-۷- فتوپروتئین ها.....۳۲

۱-۷-۱- فتوپروتئین های شعاعیان.....۳۳

۱-۷-۲- فتوپروتئین های کیسه تنان.....۳۳

۱-۷-۳- فتوپروتئین های شانه داران.....۳۳

۱-۸- آنالیز توالی نمیوپسین ۳۴
۱-۹- ساختمان لوپ ها در فتوپروتئین نمیوپسین ۳۴
۱-۱۰- اهداف تحقیق ۳۷

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۸
۲-۱- مواد، میکروارگانیسم ها و تجهیزات ۳۹
۲-۱-۱- تجهیزات مورد استفاده ۳۹
۲-۱-۲- مواد شیمیایی ۳۹
۲-۱-۳- فیلترها ۳۹
۲-۱-۴- میکروارگانیسم ها ۴۰
۲-۲- بافرها، محیط ها و محلول های مورد استفاده ۴۰
۲-۲-۱- محیط های کشت باکتریایی ۴۰
۲-۲-۲- بافر لیز ۴۰
۲-۲-۳- بافر دیالیز ۴۱
۲-۲-۴- بافرهای تخلیص پروتئین نوترکیب ۴۱
۲-۲-۵- بافرهای الکتروفورز پروتئین ۴۱
۲-۲-۵-۱- سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۴۱
۲-۲-۵-۲- پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (Native-PAGE) ۴۲
۲-۲-۵-۳- محلول های رنگ آمیزی (کوماسی بلو) و رنگ بر ژل الکتروفورز ۴۳
۲-۲-۶- بافرها و محلول های مورد نیاز جهت تهیه نمیوپسین سمی سنتتیک و تعیین فعالیت ۴۳
۲-۳- بیان نمیوپسین ۴۳
۲-۴- تهیه عصاره سلولی از باکتری ها ۴۴
۲-۵- تخلیص پروتئین نوترکیب ۴۴
۲-۶- سنجش غلظت پروتئین ۴۴
۲-۷- روش های الکتروفورزی ۴۵
۲-۷-۱- SDS-PAGE ۴۵
۲-۷-۲- Native-PAGE ۴۵
۲-۸- آماده سازی نمیوپسین سمی سنتتیک ۴۶
۲-۹- تهیه آپونمیوپسین ۴۶
۲-۹-۱- روش تری کلرو استیک اسید (TCA) ۴۶
۲-۹-۲- روش اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) ۴۶
۲-۱۰- مطالعات طیف سنجی مرئی-ماورابنفش ۴۶
۲-۱۰-۱- محاسبه ممان دوقطبی (μ) ۴۷
۲-۱۱- مطالعات دورنگ نمایی دورانی(CD) ۴۸
۲-۱۱-۱- بررسی و تعیین درصد ساختار دوم پروتئین ۴۸
۲-۱۱-۲- محاسبه قدرت چرخشی (R) ۴۸
۲-۱۲- محاسبه آنیزوتروپی (A) ۴۹

۲-۱۳- مطالعات فلوئورسانس ۵۰
۲-۱۳-۱- مطالعات فلوئورسانس ذاتی ۵۰
۲-۱۳-۲- مطالعات فلوئورسانس خارجی ۵۰
۲-۱۳-۳- مطالعات خاموشی فلوئورسانس ۵۰
۲-۱۴- مطالعات پروتئولیز محدود ۵۱
۲-۱۵- مطالعات کالریمتری ۵۱
۲-۱۶- روش های محاسباتی ۵۲
۲-۱۶-۱- مدل سازی مقایسه ای ۵۲
۲-۱۶-۲- شبیه سازی دینامیک مولکولی ۵۲
۲-۱۶-۲-۱- ابزار محاسبه ۵۲
۲-۱۶-۲-۲- روش محاسبه ۵۳
۲-۱۶-۲-۳- شرایط محاسبه ۵۳
۲-۱۶-۲-۴- تحلیل اطلاعات ۵۴

فصل سوم: نتایج ۵۵
۳-۱- بیان پروتئین نوترکیب ۵۶
۳-۲- تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۷
۳-۳- تاثیر غلظت های مختلف کلسیم بر ساختار آپونمیوپسین ۵۹
۳-۳-۱- مطالعه ساختار دوم آپونمیوپسین تهیه شده به روش های مختلف در حضور غلظت های مختلف کلسیم توسط طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور ۵۹
۳-۳-۲- مطالعه ساختار سوم آپونمیوپسین تهیه شده به روش های مختلف در حضور غلظت های مختلف کلسیم توسط طیف سنجی فلوئورسانس ۷۲
۳-۳-۳- مطالعه تاثیر غلظت های مختلف کلسیم بر ساختار آپونمیوپسین توسط طیف سنجی جذبی ماورابنفش ۸۰
۳-۴- محاسبه ی پارامترهای قدرت چرخشی، ممان دوقطبی و آنیزوتروپی نمیوپسین در حضور غلظت های مختلف کلسیم ۸۱
۳-۴-۱- محاسبه قدرت چرخشی ۸۱
۳-۴-۲- محاسبه ممان دوقطبی ۸۲
۳-۴-۳- محاسبه آنیزوتروپی ۸۳
۳-۵- مقایسه تغییرات ساختاری، پایداری و انعطاف پذیری APO-MN با CA^{2+}-LOADED MN ۸۳
۳-۵-۱- اثر کلسیم بر روی تحرک الکتروفورتیکی ۸۳
۳-۵-۲- مطالعات طیف سنجی جذبی ۸۶
۳-۵-۳- مطالعات طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ۸۶
۳-۵-۴- محاسبه پارامترهای قدرت چرخشی، ممان دوقطبی و آنیزوتروپی برای Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۸۷
۳-۵-۵- مطالعات فلوئورسانس Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۸۸
۳-۵-۶- مطالعه پایداری ترمودینامیکی ساختارهای Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn توسط کالریمتری روبش تفاضلی(DSC) .. ۸۹
۳-۵-۷- مقایسه انعطاف پذیری ساختاری Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn توسط Dynamic quenching ۹۱
۳-۵-۸- مقایسه انعطاف پذیری ساختاری Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn توسط پروتئولیز محدود ۹۲
۳-۶- بررسی تئوری APO-MN و CA^{2+}-LOADED MN توسط شبیه سازی دینامیک مولکولی ۹۳

۳-۶-۱- مدل سازی مقایسه ای ۹۳
۳-۶-۲- تست صحت مدل ۹۴
۳-۶-۳- مقایسه تغییرات ساختاری Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۵
۳-۶-۴- انعطاف پذیری ساختاری ۹۵
۳-۶-۵- انعطاف پذیری ساختاری لوپ ها ۹۶

فصل چهارم: بحث ۹۹

فصل پنجم: منابع ۱۱۴

شکل ۱-۱- موتیف EF-hand مربو به پروتئین کالمودولین ۸
شکل ۱-۲- کوئوردیناسیون لوپ EF-hand استاندارد ۱۰
شکل ۱-۳- لوپ‌های EF-hand غیر استاندارد ۱۳
شکل ۱-۴- سازمان‌دهی دمین EF-hand ۱۶
شکل ۱-۵- سازمان‌دهی داخل مولکولی پروتئین‌های EF-hand ۱۷
شکل ۱-۶- تغییر کانفورماسیونی القا شده توسط کلسیم درکالمودولین ۲۰
شکل ۱-۷- اندازه‌گیری غلظت کلسیم توسط الکترود اختصاصی ۲۳
شکل ۱-۸- طیف جذبی Fura-2 ..... ۲۶
شکل ۱-۹- طیف نشری Fluo-3 و Red-Fura ۲۷
شکل ۱-۱۰- ساختمان مولکولی و طیف NMR مربوط به 5F-BAPTA ۲۹
شکل ۱-۱۱- کاوشگر الکترونی میکروآنالیز اشعه-X و طیف‌سنجی کاهش انرژی الکترون ۳۱
شکل ۱-۱۲- مقایسه توالی‌های فتوپروتئین‌های شانه‌داران و کیسه‌تنان ۳۴
شکل ۱-۱۳- کانفورماسیون‌های مختلف ابلین ۳۵
شکل ۱-۱۴- Super-imposition ساختمان لوپ‌ها در Berovin و Obelin ۳۶
شکل ۱-۱۵- مقایسه توالی لوپ های فتوپروتئین های کتنوفورها و کلنترات ها ۳۶
شکل ۲-۱- محلسبه‌ی ممان دوقطبی بر اساس طیف جذبی ۴۷
شکل ۲-۲- محاسبه‌ی قدرت چرخشی بر اساس طیف CD ۴۹
شکل ۳-۱ بررسی بیان ژن نمیوپسین ۵۷
شکل ۳-۲ آنالیز پروتئین نمیوپسین خالص شده ۵۸
شکل ۳-۳- طیف Far-UV CD، Apo-mn در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۱ mM ۶۰
شکل ۳-۴- طیف Far-UV CD، Apo-mn، ۴۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۶۲
شکل ۳-۵- طیف Far-UV CD، Apo-mn، ۷۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۶۴
شکل ۳-۶- طیف Far-UV CD، Apo-mn، ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۶۶
شکل ۳-۷- طیف Far-UV CD، Apo-mn در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۵ mM ۶۸
شکل ۳-۸- طیف Far-UV CD، Apo-mn در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، تهیه شده به روش TCA ۶۹
شکل ۳-۹- طیف Far-UV CD، Apo-mn، ۶۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف EDTA ۷۱
شکل ۳-۱۰- جایگاه باقیمانده‌های تریپتوفان در ساختار پیشگویی شده نمیوپسین ۷۳
شکل ۳-۱۱- طیف فلوئورسانس ذاتی(۲۹۵ nm) Apo-mn، ۳۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۴
شکل ۳-۱۲- طیف فلوئورسانس ذاتی(۲۹۵ nm) Apo-mn، ۶۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۴

شکل ۳-۱۳- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ nm) Apo-mn، ۳۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۵
شکل ۳-۱۴- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ NM) Apo-mn، ۶۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۵
شکل ۳-۱۵- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۹۵ nm) Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با mM EDTA ۵/۰،۰۵ ..... ۷۶
شکل ۳-۱۶- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ nm) Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، دیالیز شده با mM EDTA ۵/۰،۰۵ ..... ۷۶
شکل ۳-۱۷- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۹۵ nm) Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، تهیه شده به روش TCA ۷۷
شکل ۳-۱۸- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ nm) Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، تهیه شده به روش TCA ۷۷
شکل ۳-۱۹- طیف فلوئورسانس خارجی (ANS) Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، تهیه شده به روش TCA ۷۸
شکل ۳-۲۰- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۹۵ nm) Apo-mn، ۳۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف EDTA، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۸
شکل ۳-۲۱- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۹۵ nm) Apo-mn، ۶۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف EDTA، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۷۹
شکل ۳-۲۲- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ nm) Apo-mn، ۳۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف EDTA، دیالیز شده با EDTA۲ mM ۷۹
شکل ۳-۲۳- طیف فلوئورسانس ذاتی (۲۸۰ nm) Apo-mn، ۶۰ دقیقه پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف EDTA، دیالیز شده با EDTA ۲ mM ۸۰
شکل ۳-۲۴- طیف جذبی Apo-mn، در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، تهیه شده به روش TCA ۸۱
شکل ۳-۲۵- بررسی تحرک الکتروفورتیکی وابسته به کلسیم پروتئین نمیوپسین در ژل ۱۲,۵٪ SDS-PAGE ۸۴
شکل ۳-۲۶- بررسی تحرک الکتروفورتیکی وابسته به کلسیم پروتئین نمیوپسین در ژل ۱۵٪ SDS-PAGE ۸۵
شکل ۳-۲۷- بررسی تحرک الکتروفورتیکی وابسته به کلسیم پروتئین نمیوپسین در ژل ۱۲,۵٪ Native-PAGE ۸۵
شکل ۳-۲۸- طیف مرئی-ماورابنفش Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۸۶
شکل ۳-۲۹- طیف Apo-mn Far-UV CD و Ca^{2+}-loaded mn ۸۷
شکل ۳-۳۰- طیف فلوئورسانس ذاتی Apo-mn وCa^{2+}-loaded mn ۸۸
شکل ۳-۳۱- طیف فلوئورسانس خارجی Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۸۹
شکل ۳-۳۲- ترموگرام DSC برای دناتوراسیون حرارتی Ca^{2+}-loaded mn ۹۰
شکل ۳-۳۳- ترموگرام DSC برای دناتوراسیون حرارتی Apo-mn ۹۰
شکل ۳-۳۴- منحنی استرن-ولمر حاصل از خاموشی فلوئورسانس توسط اکریل‌امید برای Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۱
شکل ۳-۳۵- آنالیز لهرر حاصل از خاموشی فلوئورسانس توسط اکریل‌امید برای Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۲
شکل ۳-۳۶- SDS-PAGE مربوط به پروتئولیز محدود Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn توسط ترمولیزین ۹۳
شکل ۳-۳۷- alignment مورد استفاده جهت ساخت مدل برای نمیوپسین ۹۴
شکل ۳-۳۸- RMSD ساختار در دو حالت Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۵
شکل ۳-۳۹- RMSF ساختار در دو حالت Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۶
شکل ۳-۴۰- مقایسه RMSF ساختار لوپ اول در دو حالت Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۷

شکل ۳-۴۱- مقایسه RMSF ساختار لوپ دوم در دو حالت Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۷
شکل ۳-۴۲- مقایسه RMSF ساختار لوپ سوم در دو حالت Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۸

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی پروتئین‌های اتصالی به کلسیم..... ۳
جدول ۱-۲- طبقه‌بندی پروتئین‌های اتصالی به کلسیم داخل سلولی..... ۵
جدول ۱-۳- عملکرد پروتئین‌های اتصالی به کلسیم..... ۶
جدول ۱-۴- تطبیق توالی EF-hand مربوط به کالمودولین پروکاریوت و انسان..... ۷
جدول ۱-۵- روش‌های تعیین غلظت و توزیع فضایی کلسیم..... ۲۲
جدول ۱-۶- طبقه‌بندی شناساگرهای فلوئورسانس..... ۲۵
جدول ۲-۱- استانداردهای پروتئینی بردفورد..... ۴۵
جدول ۳-۱- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۳)..... ۶۱
جدول ۳-۲- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۳)..... ۶۱
جدول ۳-۳- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۴)..... ۶۳
جدول ۳-۴- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۴)..... ۶۳
جدول ۳-۵- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۵)..... ۶۵
جدول ۳-۶- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۵)..... ۶۵
جدول ۳-۷- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۶)..... ۶۷
جدول ۳-۸- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۶)..... ۶۷
جدول ۳-۹- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۷)..... ۶۸
جدول ۳-۱۰- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۷)..... ۶۹
جدول ۳-۱۱- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۸)..... ۷۰
جدول ۳-۱۲- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۸)..... ۷۱
جدول ۳-۱۳- محتوای ساختار دوم نمیوپسین براساس طیف CD (مربوط به شکل ۳-۹)..... ۷۲
جدول ۳-۱۴- محتوای ساختار دوم نمیوپسین محاسبه شده براساس معادله‌ی ۲-۲ (مربوط به شکل ۳-۹)..... ۷۲
جدول ۳-۱۵- قدرت چرخشی محاسبه شده براساس طیف CD مربوط به شکل ۳-۸..... ۸۲
جدول ۳-۱۶- ممان دوقطبی محاسبه شده براساس طیف جذبی مربوط به شکل ۳-۲۳ ..... ۸۲
جدول ۳-۱۷- آنیزوتروپی محاسبه شده براساس طیف CD مربوط به شکل ۳-۸ و طیف UV-Visible مربوط به شکل ۳-۲۳..... ۸۳
جدول ۳-۱۸- پارامترهای قدرت چرخشی، ممان دوقطبی و آنیزوتروپی محاسبه شده برای Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۸۷
جدول ۳-۱۹- پارامترهای ترمودینامیکی Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ۹۰
جدول ۳-۲۰- بررسی صحت مدل‌های Apo-mn و Ca^{2+}-loaded mn ساخته شده..... ۹۴

فصل اول

مقدمه و تئوری

کلسیم یکی از متداول‌ترین عناصر بر روی زمین و پنجمین عنصر فراوان در مهره‌داران است. کلسیم تنها یکی از اجزای اصلی استخوان نیست بلکه نقش مرکزی در فرآیندهای سلولی به عنوان یکی از پیامبرهای ثانویه ایفا می‌کند. شکل غالب کلسیم در حالت معدنی همانند حالت محلول ترکیب است که عمدتا به صورت کلسیم فسفات (یعنی هیدروکسی آپاتیت[1]) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ می‌باشد که بیش از ۶۰٪ وزن اسکلت بدن انسان، و ۹۹٪ کل کلسیم بدن انسان را تشکلیل می‌دهد. در مقایسه با این مقدار، کلسیم موجود در مایع خارج سلولی[2] (ECF) و داخل سلولی در سیتوزول یا اجزای داخل سلولی دیگر تقریبا قابل چشم‌پوشی است [۱].

در اواخر قرن نوزدهم Sidney Ringer کشف کرد کلسیم نقش ضروری در تنظیم انقباض قلب ایفا می‌کند. در دهه ۱۹۶۰ Ebashi و همکارانش نشان دادند توانایی تروپونین C به عنوان پروتئین تنظیم‌کننده انقباض ماهیچه، وابسته به اتصال به کلسیم با تمایل بالاست. بنابراین تروپونین C اولین پروتئینی بود که به عنوان سنسور کلسیم[3] شناخته شد. البته شناسایی کالمودولین توسط Cheung وKakiuchi در فهم نقش کلسیم به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی عمومی فعالیت‌های سلولی سودمند واقع شد. در یک سلول فعال‌شده به وسیله سیگنال خارجی، به علت ورود کلسیم از فضای خارج سلولی و یا آزاد شدن کلسیم از ذخایر داخل سلولی، اغلب غلظت کلسیم آزاد داخل سلولی تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد. چنین تغییراتی در غلظت کلسیم آزاد می‌تواند سبب نوسانات معنی‌دار کلسیم در سیتوزول شود که احتمالا انتقال سیگنال را برای تعدادی از فعالیت‌های سلولی مختلف از جمله متابولسیم، فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین، لقاح، تکثیر سلولی، بیان ژن و آپوپتوز، انقباضات تحریکی ماهیچه[4] و ... فراهم می‌کند [۱]. تعداد زیادی از این فرآیندها از طریق برهم‌کنش کلسیم با پروتئین‌های خاصی (CaBPs) صورت می‌گیرد که نتیجه آن برهم-کنش‌های پروتئین-پروتئین به علت تغییرات کانفورماسیونی گیرنده‌ی کلسیم است.

۱-۱- پروتئین‌های اتصالی به کلسیم

در سلول‌های یوکاریوتی غلظت کلسیم داخل سلولی به دقت تنظیم می‌شود، تا در سلول‌های در حال استراحت ۳×۱۰^{-۷} مولار نگه داشته شود؛ در حالی‌که در خارج سلول سطح کلسیم در حد $۱۰^{-۳}$ مولار است که منجربه یک شیب غلظتی شدید در سرتاسر غشای سلولی می‌گردد. سطح داخل سلولی کلسیم می‌تواند به علت پاسخ به سیگنال‌های خارج سلولی به‌صورت گذرا افزایش یابد،

1 - Hydroxyapatite
2 - Extracellular fluid
3 - Calcium sensor
4 - Muscle excitation-contraction

بنابراین به‌عنوان پیامبر ثانویه، سیگنال کلسیم به وسیله مجموعه‌ای از پروتئین‌های اتصالی کلسیم (جدول ۱-۱) [۱] انتقال داده می‌شود.

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی پروتئین‌های اتصالی به کلسیم [۱]

Extracellular Ca^{2+}-binding proteins			**Intracellular Ca^{2+}-binding proteins**	
The Ca^{2+}-binding EGF domain proteins	The extracellular calcium sensor	The luminal calcium sensor stromal interaction molecule	EF-hand Ca^{2+}-binding proteins	Non EF-hand Ca^{2+}-binding proteins

۱-۱-۱- کلسیم در فضای خارج سلولی

از مهم‌ترین عملکردهای کلسیم در مایع خارج سلولی پایدارسازی ساختمان پروتئین‌ها و میانجی‌گری در برهم‌کنش‌های سلول-سلول[۱] یا برهم‌کنش‌های ماتریکس-سلول[۲] است. به‌طور خلاصه بعضی از فرآیندهای خارج سلولی مهم که نیازمند کلسیم هستند عبارتند از: لخته شدن خون[۳]، فعال‌سازی برخی پروتئین‌های سیستم ایمنی، چسبندگی سلولی یا برهم‌کنش گیرنده‌های سطحی سلول از قبیل گیرنده‌های Notch یا گیرنده هایLDL با سایر گیرنده‌ها. گیرنده های Notch و LDL که به‌ترتیب در شکل-گیری صحیح سومیت[۴] و حذف استرهای کلسترول از گردش خون فعالیت می‌کنند؛ متعلق به خانواده‌ای هستند که دارای دمین-های مشابه فاکتور رشد اپیدرمی متصل‌شونده به کلسیم[۵] (cbEGF) می‌باشند [۱].

یک تفاوت مهم که در مقایسه جایگاه‌های اتصال کلسیم پروتئین‌های خارج سلولی و داخل سلولی (یعنی پروتئین های EF-hand) وجود دارد، آرایش فضایی گروه‌های لیگاندشونده است. پروتئین‌های اتصالی به کلسیم از نوع EF-hand، آرایش متوالی از باقیمانده‌های لیگاندشونده نشان می‌دهند، در مقابل معمولا در پروتئین‌های خارج سلولی لیگاندها در موقعیت‌های دوری در توالی آمینواسیدی قرار می‌گیرند (به عنوان مثال فسفولیپاز A_2)، بنابراین پروتئین‌های خارج سلولی دارای حفره‌های از پیش شکل‌گرفته جهت جایگاه‌های اتصال کلسیم می‌باشند، چنین جایگاه‌هایی با درجه سختی بالا منجربه سرعت اتصال[۶] نسبتا پایین و سرعت تفکیک[۷] نسبتا سریعی می‌گردند؛ که نتیجه‌ی آن تمایل پایین کلسیم برای پروتئین‌های خارج سلولی است. اما به علت غلظت نسبتا

1 - Cell-cell interaction
2 - Cell-matrix interaction
3 - Blood clotting
4 - Somite
5 - Calcium binding epidermal growth factor-like domains
6 - On-rate
7 - Off-rate

بالای کلسیم در مایع خارج سلولی تقریبا همیشه این پروتئین‌ها به شکل اتصال‌یافته به کلسیم قرار دارند و در مقابل شکافت‌های پروتئولیتیک[1] محافظت می‌شوند [۱].

سلول‌های شکل‌دهنده‌ی استخوان یعنی استئوبلاست‌ها[2]، تعدادی از پروتئین‌های اتصالی کلسیم غیرکلاژنی، از قبیل استئوکلیسن[3]، استئوپنتین[4] واستئونکتین[5] را سنتز و ترشح می‌کنند؛ این پروتئین‌ها در یک رفتار وابسته به کلسیم به مواد معدنی استخوانی از قبیل هیدروکسی‌آپاتیت متصل می‌شوند. استئوکلسین به رده‌ای از پروتئین‌های اتصالی کلسیم تعلق دارد که ناحیه اتصال به کلسیم آن‌ها غنی از باقیمانده‌های γ-کربوکسیل‌گلوتامیک‌اسید می‌باشد، در حالی‌که استئوپنتین، یک گلیکوپروتئین، دارای توالی غنی از باقیمانده‌های گلوتامیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید جهت اتصال به کلسیم می‌باشد. استئونکتین پروتئین اتصالی کلسیم خارج سلولی است که می‌تواند دارای حداقل یک نوع EF-hand با جایگاه اتصال کلسیم با تمایل بالا باشد، ویژگی که به‌طور معمول در پروتئین‌های اتصالی کلسیم داخل سلولی دیده می‌شود؛ یکی از ویژگی‌های غیرمعمول دیگر این پروتئین وجود پل دی‌سولفیدی پایدارکننده ساختار است که به‌طور معمول در پروتئین‌های نوع EF-hand وجود ندارد [۱].

۱-۱-۲- کلسیم در فضای داخل سلولی

درمقابل پروتئین‌های اتصالی کلسیم با تمایل پایین در فضای خارج سلولی، پروتئین‌های اتصالی کلسیم داخل سلولی به‌علت آرایش منظم آمینواسیدهای لیگاندشونده به کلسیم در لوپ، با تمایل بالا به کلسیم متصل می‌شوند. موتیف معمول مارپیچ-حلقه-مارپیچ متصل‌شونده به کلسیم[6] که به عنوان EF-hand نیز شناخته می‌شود، نخستین بار توسط Krestinger معرفی شد. نام این موتیف از پاروالبومین[7] (PV) (اولین پروتئین اتصال‌شونده به کلسیم دارای EF-hand که ساختمان آن شناخته شد) گرفته شده است. بعدا به این نتیجه رسیدند دمین EF-hand در پروتئین‌های گیرنده‌ی کلسیم داخل سلولی که نسبت به پاسخ‌های سلولی فعال می‌شوند، به‌صورت کاملا حفاظت‌شده وجود دارد. تعداد اعضای این خانواده‌ی پروتئینی که ممکن است دارای چندین کپی از موتیف EF-hand در یک پروتئین باشند به طور پیوسته در حال افزایش است؛ تا به امروز بیش‌از ۶۰۰ نوع از این پروتئین‌ها شناسایی شده‌اند (تنها در ژنوم انسانی به میزان ۱۰۰ پروتئین شامل EF-hand وجود دارد) اما برای بیشتر آن‌ها عملکرد دقیقی شناسایی نشده است. احتمالا این خانواده از پروتئین‌های همولوگ، از یک دمین اجدادی مشترک تکامل پیدا کرده و از طریق تکثیر و حذف

1 - Proteolytic cleavage
2 - Osteoblasts
3 - Osteocalcin
4 - Osteopontin
5 - Osteonectin
6 - Common helix-loop-helix Ca^{2+}-binding motif
7 - Parvalbumin

ژنی[1] به صورت یک درخت تکاملی از پروتئین‌های متفاوت درآمده است؛ امروزه این پروتئین‌ها عملکردهای بسیار متنوعی را برعهده دارند (جدول ۱-۳).

از لحاظ عملکردی پروتئین‌های EF-hand به دو کلاس عمومی تقسیم می‌شوند (جدول ۱-۲) [۱ و ۲]: سنسورهای کلیسم و بافر-های کلسیم. پروتئین‌های سنسور کلسیم به عنوان مثال کالمودولین[2] وریکاورین[3] سیگنال شیمیایی افزایش غلظت کلسیم را به پاسخ‌های بیوشیمیایی متنوعی تبدیل می‌کنند. این سیگنال به‌صورت غالب با یک تغییر کانفورماسیونی القاشده توسط کلسیم همراه است. اتصال کلسیم به سنسور معمول کالمودولین، یک تغییر ساختمانی (در بیشتر موارد حذف دمین خودبازدارنده‌ی آنزیمی[4]) را ایجاد می‌کند که در نتیجه این تغییر کالمودولین به پروتئین هدفش متصل می‌شود، بنابراین فعال‌سازی این آنزیم در یک رفتار وابسته به کلسیم صورت می‌گیرد. در مورد پروتئین بینایی، ریکاورین، اتصال کلسیم منجر به جداسازی یک گروه آبگریز میریستل[5] می‌شود که در نتیجه آن، ریکاورین به غشا متصل گشته و با اهداف پروتئینی اتصال‌یافته به غشا برهم‌کنش می‌کند. پروتئین‌های بافری کلسیم (به عنوان مثال کالبیندین D_{9k}[6] و پاروالبومین[7]) زیرمجموعه‌ی کوچکی از خانواده پروتئینی EF-hand هستند؛ این پروتئین‌ها به تنظیم سیگنال کلسیم از هر دو روش طولانی‌مدت و گذرا[8] کمک می‌کنند، بدین‌صورت که پروتئین به کلسیم آزاد متصل می‌شود تا سیگنال کلسیم را در سرتاسر سلول انتقال دهد یا به صورت بالقوه یون‌های مضر[9] را از سیتوپلاسم حذف می‌کنند.

جدول ۱-۲- طبقه‌بندی پروتئین‌های اتصالی به کلسیم داخل سلولی [۱]

EF-hand Ca^{2+}-binding proteins		**Non EF-hand Ca^{2+}-binding proteins**	
Calcium buffer proteins: 1- Parvalbumin 2- Calbindin 3- Calretinin	Calcium sensor proteins: 1- Calmodulin 2- Troponin C 3- Centrin 4- Neuronal Ca^{2+} sensor 5- S100 protein 6- The penta EF-hand subfamily	Annexin	C_2-domain proteins

1 - Gene duplication and deletion
2 - Calmodulin
3 - Recoverin
4 - Enzymatic autoinhibitory domain
5 - Hydrophobic myristol group
6 - Calbindin D_{9K}
7 - Parvalbumin
8 - Spatially and temporally
9 - Harmful ion

جدول ۱-۳- عملکرد پروتئین‌های اتصالی به کلسیم

Protein name	No. of EF-hand motifs	M.D.(kDa)	Proposed functions
Calmodulin	4	20	Multifunctional
Troponin C	4	18	Contraction of skeletal and heart muscle
Myosin light chains	4	16-20	Muscle contraction and cellular motile events, membrane ruffling
Calpain	4	110	Cytokin processing, formation of ischemic changes, cell differentiation, development, platelet activation
Caltractin	4	20	Chromosomal segregation
Calcineurin	4	19	Ctokine transcription, modulation of channel activity
Apoaequorin	3	20	Generation of fluorescence by Ca^{2+} -binding
Recoverin	3	23	Endogenous inhibitor of rhodopsin kinase/light adaptation
S. modulin	3	26	Endogenous inhibitor of rhodopsin kinase/light adaptation
Neurocalcin	3	22-24	Signal transduction in sensory cells
S100(A,B,C,P)	2	10-13	Cell growth, cell cycle, exocytotic events, neural extention, long term potentiation, cell proliferation
S100F(P,T)	2	248	Aggregation of keratin intermidiate filaments
Calbindin D_{9K}	2	9	Calcium transport

گروه دیگری از پروتئین‌های اتصالی کلسیم داخل سلولی وجود دارد که فاقد موتیف EF-hand می‌باشند. دو مثال معروف این گروه، آنکسین[1] و پروتئین‌های دارای دمین C_2 هستند. دمین متداول در ساختار آنکسین Endonexin fold می‌باشد؛ آنکسین در فعالیت‌هایی از جمله تکثیر و تمایز سلولی، ادغام غشاهای سلولی و مهار پروتئین کیناز C ایفای نقش می‌کند. فسفولیپاز C، فسفولیپاز سیتوزولیA_2، پروتئین‌کیناز C و سیناپتوتاگمین[2] مثال‌هایی از پروتئین‌های دارای دمین C_2 می‌باشند. این گروه از پروتئین‌ها در فرایندهای تکثیر وتمایز سلولی، اندوسیتوز و اگزوسیتوز، بیان ژن، انقباض ماهیچه، ایجاد سرطان، تولید پیامبرهای سلولی مشتق شده از فسفولیپیدها، تعدیل عملکردهای سلولی تنظیم‌شده با G-protein و ... فعالیت می‌کنند.

1 - Annexin
2 - Synaptotagmin

۱-۱-۳- پروتئین‌های اتصالی به کلسیم در میکروارگانیسم‌ها

جستجو برای پیدا کردن کالمودولین پروکاریوتی

از هنگامی‌که مشخص شد یون کلسیم نقش مهمی را در تنظیم گستره‌ای از فرایندهای سلولی در جانداران عالی ایفا می‌کند؛ این احتمال مطرح شد که ممکن است شناسایی کلسیم، نشان‌دهنده‌ی کشف جدیدی از طبیعت یا مرتبط با مراحلی از سیر تکامل باشد. امروزه مشخص شده کالمودولین به عنوان یک پروتئین گیرنده‌ی کلسیم داخل سلولی کلیدی در تمام سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد. حتی در یوکاریوت‌های تک-سلولی مانند مخمر تیپیک (*Saccharomyces cerevisiae*) کلسیم دارای یک نقش مهم تنظیم‌کننده می‌باشد و اخیرا کالمودولین مخمر شناسایی و خالص شده است. توالی آمینواسیدی کالمودولین مخمر با سایر توالی‌های کالمودولین ۶۰٪ همسانی[1] دارد. درحقیقت اگر جایگزینی آمینواسیدهای حفاظت شده مجاز باشد، همولوژی تا ۸۰٪ و بیشتر از آن افزایش می‌یابد (جدول ۱-۴). از آن‌جایی که کالمودولین یک پروتئین ضروری در تمام موجودات زنده است، ضرورت وجود کالمودولین برای رشد سلول‌های مخمر توسط حذف یا تخریب ژن آن نشان شده است.

با وجود پیچیدگی کمتر سلول‌های پروکاریوتی از لحاظ بیوشیمیایی (نسبت به یوکاریوت‌ها)، نقش تنظیمی کلسیم به خوبی شناخته نشده است. البته تجمع کلسیم در هنگام هاگ‌زایی[2] تعداد بسیاری از باکتری‌ها ازجمله جنس باسیلوس، استرپتومایسز و میکسوکوکوس[3] اثبات شده است. در *Myxococcus xanthus* یک پروتئین خاص نمو[4] به نام S (دارای همسانی توالی بالا با کالمودولین پستانداران و تشابه جایگاه‌های اتصال با کالمودولین باکتریایی) در حضور کلسیم در سطح میگزوسپور[5] انباشته می‌شود [۳].

جدول ۱-۴- تطبیق توالی EF-hand مربوط به کالمودولین پروکاریوت و انسان [۳]

Ligands		1	3	5	7	9	12
S. erythraeus protein	I	D F	D G	N G	A L	E R	A D
	II	G V	G S	D G	S L	T E	E Q
	III	D K	N A	D G	Q I	N A	D E
	IV	D T	N G	N G	E L	S L	D E
Human calmodulin	I	D K	D G	D G	T I	T T	K E
	II	D A	D G	N G	T I	D F	P E
	III	D K	D G	N G	Y I	S A	A E
	IV	D I	D G	D G	Q V	N Y	E E

1 - Identity
2 - Sporulation
3 - Myxococcus
4 - Development-specific protein
5 - Myxospore