بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه گیلان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش بیوشیمی)

مطالعه عملکرد فتوپروتئین Mnemiopsin با استفاده از جهش زایی هدفدار

از:

زهره جهانی

استاد راهنما:

دکتر رضا حسن ساجدی

اساتید مشاور:

دکتر سامان حسینخانی

دکتر سید محسن اصغری

(اسفند ۱۳۹۰)

چکیده

مطالعه عملکرد فتوپروتئین نمیوپسین با استفاده از جهش زایی هدفدار

زهره جهانی

فتوپروتئین ها، پروتئین های تنظیم شونده به کلسیم هستند که نور ساطع می کنند. تاکنون، بیشترین بررسی ها روی فتوپروتئین های کلنترات مثل اکورین و اوبلین انجام شده است و هیچ اطلاعی در مورد مکانیسم فتوپروتئین های کتنوفور از جمله نمیوپسین و معماری جایگاه اتصال آن به کلنترازین وجود ندارد. در این تحقیق بعضی از آمینواسیدهای مهم درگیر در حفره اتصال کلنترازین نمیوپسین توسط رزیدوهای متناظر با فتوپروتئین های بسیار شناخته شده فوق جایگزین گردید. بدین منظور جهش های W59K، L127W و V183T با در نظر گرفتن شبکه پیوند هیدروژنی در اطراف حلقه های مهم کلنترازین انجام شد. بر خلاف انتظار، غیر از جهش یافته V183T که ۷۵٪ فعالیت نمیوپسین وحشی را دارا بود، سایر جهش ها هیچ گونه فعالیتی از خود نشان ندادند. جهش یافته V183T در غلظت های بالاتری از کلسیم فعال می شد و طول موج حداکثر طیف بیولومینسانسی آن، حدود ۲۰ نانومتر نسبت به فرم وحشی جابجایی آبی داشت (٤٧٠ در مقابل ٤٩٠ نانومتر). احتمالا کاهش سطح در دسترس بعضی از آمینواسیدهای کوئوردینه شونده با کلسیم باعث کاهش حساسیت به کلسیم این جهش یافته شده است. این جهش یافته در سایر خصوصیات تفاوتی با نمیوپسین طبیعی نداشت. اسپکتروسکوپی CD و فلوئورسانس و مدلسازی ملکولی نشان داد که تغییرات ساختاری در جهش یافته ها به ویژه L127W نسبت به فرم وحشی محسوس است. عدم فعالیت در موتانت های W59K و L127W و کاهش فعالیت در موتانت V183T، دلیلی بر وجود این آمینواسیدها در حفره اتصال یا نقششان در مکانیسم عمل است. به نظر می رسد چینش آمینواسیدها در حفره اتصال به کلنترازین مربوط به دو خانواده کلنترات و کتنوفور نسبت به هم متفاوت هستند طوری که جایگزینی این آمینواسیدها با آمینواسیدهای متناظرشان از خانواده دیگر (نظیر جهش های این تحقیق) یکپارچگی مورد نیاز جهت عملکرد بیولومینسانسی آن را از بین برده و چنان تغییرات ساختاری را منجر می شود که باعث غیرفعال شدن یا کاهش فعالیت این پروتئین می گردد.

کلمات کلیدی: جهش زایی هدف دار، فتوپروتئین، نمیوپسین، کلنترازین، EF-hand.

بنام حضرت دوست

سپاس خداوندی را که در نهایت بزرگی به اندازه ادراک من کوچک شد، تا زمین کوچک من پایین آمد تا او را خوب ببینم و بیشتر بشناسم. او را شاکرم بر تک تک روزهایی که به من هدیه کرد تا فرصت زندگی کردن، آموختن و تجربه کردن داشته باشم و در این مسیر بزرگترین نعمتهایش را به من ارزانی داشت، عزیزانی که این تجربه در کنار ایشان امکانپذیر شد و دلپذیرتر.

از استاد راهنمای فرزانه ام، جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی بخاطر تمام محبت ها و راهنمایی های بیدریغ شان بی نهایت سپاسگزارم و خداوند را شاکرم که افتخار فراگیری علم و اخلاق را در محضر ایشان به من عطا نمود.

از استاتید مشاور گرانقدرم، جناب آقای دکتر سامان حسینخانی و جناب آقای دکتر محسن اصغری که در نهایت بزرگواری، صبر و حوصله در انجام رساله ام یاری ام رساندند صمیمانه تشکر می کنم.

از اساتید داور بزرگوار سرکار خانم دکتر ریحانه سریری و جناب آقای دکتر مجید تقدیر که زحمت داوری پایان نامه را تقبل کردند و همچنین جناب آقای دکتر محمودرضا آقامعالی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشکده کمال تشکر را دارم.

از استاد ارزشمندم سرکار خانم دکتر ریحانه سریری بخاطر راهنمایی ها و دلسوزی های مادرانه ش صمیمانه متشکرم.

از دوستان و همکاران عزیزم، خانم ها عطیه مهدوی و مریم ملاکریمی بخاطر همراهی صمیمانه شان قدردانی می کنم.

از دانشجویان بزرگوار دوره دکتری در دانشگاه گیلان و تربیت مدرس سرکار خانم شیرین شاهنگیان، سرکار خانم ملیحه محمدی، سرکار خانم فرنگیس عطایی، سرکار خانم شیرین جلیلی و سرکار خانم بهار منصف بخاطر کمک ها و راهنمایی های بی دریغشان در طول این دوره بی نهایت سپاس گزارم.

از دو دوست بسیار ارزشمند و مهربانم خانم ها شیما حاتم زاده و سید زهرا موسوی که از دوره کارشناسی تاکنون همدم و همراهم بوده اند متشکرم.

از همکلاسی های عزیز و مهربانم بخصوص آقای حسین رحمانی و خانم شیما ترحمی و خانم آذین غلامی بخاطر کمک هایشان سپاسگزارم.

از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی، سرکار خانم ها هادوی، شایگان و امیدی تشکر می کنم.

از دوستان عزیزم بخصوص خانم ها فهیمه قوامی، بیتا مصدق، پریچهر زمانی، سمیرا نصرالهی، سروناز شیرزاد، فاطمه شعبانی، افسانه گودرزی، مهدیه فرجی، لیلا گلعلی زاده، زهرا حیدری، سارا پورآقاجان و آقایان روح الله رزمگر، عمار محسنی، محمد طاهری، سایر دوستان خوبم در آزمایشگاه های تکوین، ژنتیک، زیست دریا، زیست جانوری، فیزیولوژی گیاهی و کشاورزی و نیز دوستان عزیزم در دانشگاه تربیت مدرس تشکر می کنم.

عنوان | صفحه

چکیده فارسی د
چکیده انگلیسی ذ
فصل اول : مقدمه و تئوری ۱
۱-۱- بیولومینسانس. (Bioluminescence)..... ۲
۱-۲- سیستم های بیولومینسانسی ۲
۱-۲-۱- سیستم بیولومینسانس در *Cypridina hilgendirfi* ۳
۱-۲-۲- سیستم بیولومینسانس در کرم شب تاب Firefly ۳
۱-۲-۳- سیستمهای بیولومینسانس با منشاء فتوپروتئینی ۳
۱-۳- فتوپروتئین های شناخته شده ۵
۱-۳-۱- فتوپروتئین های کلنترات ۷
۱-۳-۲- فتوپروتئین های کتنوفور ۸
۱-٤- بیولومینسانس در *Mnemiopsis leidyi* ۹
۱-۵– ساختار کلی فتوپروتئین ها ۹
۱-۵-۱- ساختار پاکت اتصال یافته به Coelenterazine-Oxygen ١٤
۱-۵-۲- آمینواسیدهایی که برای بیولومینسانس فتوپروتئین با اهمیت هستند ١٦
۱-۵-۳- واکنش لومینسانس در فتوپروتئینهای وابسته به کلسیم ١٨
۱-٦- کاربردهای بیولومینسانس ٢٠
۱-٦-۱- مزایای کاربردی فتوپروتئین ها ٢٠
۱-٦-۱-۱- کاربرد اکورین در فرایند های وابسته به کلسیم ٢١
۱-٦-۱-۲- رد یابی محل نهایی قرار گیری pacemaker در جنین ٢٢
۱-٦-۱-۳- به عنوان معرف شناساگر در سنجش های هیبریداسیون ٢٣
۱-٦-۱-٤- سیستم اکورین-آنتی بادی جهت شناسایی سریع ترکیبات زیستی ٢٤
۱-٦-۱-۵- اندازه گیری کمی محصول RT-PCR ٢٥
۱-٦-۱-٦- تشخیص پروتئاز HIV-1 ٢٥
۱-٦-۱-۷- تولید حسگرهای زیستی بر پایه سلول های پستانداران ٢٦
۱-٦-۱-۸- استفاده از فتوپروتئین ها در سنجش های دو رنگی ٢٨
۱-۷- انجام جهش های هدفمند ٢٩
۱-۷-۱- خصوصیت پرایمرها در روش site-directed mutagenesis ٢٩
۱-۱۱- اهداف تحقیق ٣٠
فصل دوم: مواد و روش ها ٣٢
۲-۱- مواد، میکروارگانیسم ها و دستگاه ها ٣٢
۲-۱-۱- دستگاه های مورد استفاده ٣٢
۲-۱-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده ٣٢
۲-۱-۳- آنزیم ها و پلاسمید های مورد استفاده ٣٢

۲-۱-٤- کیت ها و فیلتر های مورد استفاده ۳۳
۲-۱-٥- میکروارگانیسم ها ۳۳
۲-۲- بافرها و محلولهای مورد استفاده ۳۳
۲-۲-۱- بافرهای الکتروفورز DNA (آگارز) ۳۳
۲-۲-۲- بافرهای الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) ۳٤
۲-۲-۳- بافر دیالیز ۳٥
۲-۲-٤- بافر لیز ۳٥
۲-۲-٥- بافر تخلیص پروتئین نوترکیب ۳٥
۲-۲-٦- بافر ها و محلول های مورد نیاز جهت تهیه نمیوپسین semi-synthetic و تعیین فعالیت ۳٥
۲-۳- محیط های کشت باکتریایی ۳٦
۲-۳-۱- محیط کشت TB (Terrific Broth) ۳٦
۲-۳-۲- محیط کشت LB ۳٦
۲-۳-۳- محیط کشت LB-Agar ۳٦
۲-۳-٤- محیط کشت SOC ۳۷
۲-٤- روش های الکتروفورزی ۳۷
۲-٤-۱- SDS-PAGE ۳۷
۲-٤-۱-۱- تهیه محلول های رنگ آمیزی کوماسی بلو ۳۷
۲-٤-۱-۲- انجام رنگ آمیزی کوماسی بلو ۳۸
۲-٤-۲- الکتروفورز ژل آگارز ۳۸
۲-٥- جهش زایی هدف دار ۳۸
۲-٥-۱-انجام PCR به منظور ایجاد جهش ۳۸
۲-٥-۲- حذف DNAالگو حامل ژن وحشی ۳۹
۲-٥-۳- انتقال پلاسمید حامل ژن به *E. coli* سویه بیانی BL21 (DE3) ٤۰
۲-٥-۳-۱- آماده سازی سلولهای مستعد (competent cell)از باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) ٤۰
۲-٥-۳-۲- انتقال شیمیایی پلاسمیدها به باکتری ها ٤۰
۲-٥-٤- استخراج پلاسمید حامل ژن طبیعی و جهش یافته ٤۱
۲-٦- بیان و تخلیص نمیوپسین های طبیعی و جهش یافته ٤۱
۲-٦-۱- تهیه عصاره سلولی از باکتری ها ٤۲
۲-٦-۲- تخلیص پروتئین نوترکیب ٤۲
۲-٦-۳- دیالیز نمونه ها ٤۲
۲-۷- سنجش غلظت پروتئین ٤۳
۲-۸- تهیه نمیوپسینsemi-synthetic و تعیین فعالیت بیولومینسانسی آن ٤۳
۲-۹- اثر غلظت های مختلف کلسیم روی فعالیت بیولومینسانس ٤۳
۲-۱۰- تعیین ماکسیمم طیف نشر بیولومینسانسی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته(λMax) ٤٤
۲-۱۱- تعیین pH بهینه ٤٤
۲-۱۲- تعیین سرعت خاموشی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته ٤٤
۲-۱۳- مطالعات اسپکتروسکپی ٤٤

۲-۱۳-۱- دورنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism) ٤٤
۲-۱۳-۲- فلورسانس ذاتی ٤٥
۲-۱۳-۳- فلورسانس خارجی ٤٥
۲-۱٤- روشهای محاسباتی ٤٦
۲-۱٤-۱- مدل سازی مقایسه ای ٤٦
فصل سوم: نتایج ٤٧
۳-۱- طراحی پرایمر ٤٩
۳-۲- جهش زایی هدف دار ٥٠
۳-۳- بیان پروتئین نمیوپسین وحشی و موتانت ٥٣
۳-٤- تخلیص نمیوپسین وحشی و جهش یافته ها ٥٤
۳-٥- تعیین فعالیت پروتئین های وحشی و جهش یافته ٥٥
۳-٦- اثر pH ٥٦
۳-۷- تعیین حساسیت به Ca^{2+} ٥٧
۳-۸- طیف نشر بیولومینسانس ٥٧
۳-۹- سرعت خاموشی (Decay rate time) ٥٨
۳-۱۰- مطالعات ساختاری ٥٩
۳-۱۰-۱- دو رنگ نمایی دورانی (CD) ٥٩
۳-۱۰-۲- فلورسانس ذاتی ٥٩
۳-۱۰-۳- فلورسانس خارجی ٦٠
۳-۱۱- مدل سازی مقایسه ای ٦١
۳-۱۱-۱ بررسی صحت مدل ٦٢
۳-۱۱-۲ تعیین هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین به روش تئوری ٦٣
۳-۱۱-۳ مطالعه میانکنش های داخلی ٦٣
۳-۱۱-٤ بررسی تغییرات موضعی جهش یافته ها ٦٥
فصل چهارم : بحث ٦٧
پیشنهادات برای کارهای آینده ٨٠
منابع ٨١

٨٥

جدول۱-۱- فتوپروتئین هایی که تاکنون شناسایی، جداسازی و تخلیص شده اند ٦
جدول۳-۱- فعالیت ویژه نمیوپسین طبیعی و جهش یافته ها ٥٥
جدول ۳-۲- بررسی اعتبار مدل های نمیوپسین در مقایسه با الگوی اصلی ٦٣
جدول۳-۳: مقایسه سطح در دسترس نواحی مهم ساختاری در نمیوپسین طبیعی و جهش یافته ها ٦٣
جدول ۳-٤: مقایسه پیوندهای هیدروژنی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته ٦٤
جدول ۳-٥: مقایسه تعداد پل های نمکی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته ها ٦٤
جدول ۳-٦: مقایسه سطح در دسترس آمینواسیدهای کوئوردینه شده با کلسیم در لوپ های نمیوپسین طبیعی و جهش یافته V183 ٦٤

فهرست شکلها

شکل ۱-۱- سیستم Bioluminescence کرم شب تاب Fire fly ۳
شکل ۱-۲- نمیوپسیس لیدی، شانه های تولید نور کاملا واضح و مشخص هستند. ۹
شکل ۱-۳ ساختار سه بعدی فتوپروتئین هایی که ساختمان کریستالی آنها تاکنون شناخته شده اند. ۱۰
شکل ۱-٤ تطابق توالی های آمینواسیدی فتوپروتئین های $Ca2^{+}$-regulated ۱۱
شکل ۱-۵- کنفورماسیونهای مختلف اوبلین ۱۱
شکل.۱-٦- ساختمان پروتئین اوبلین و اسیدهای آمینه اطراف حفره جهت تثبیت هیدروپروکسی کلنترازین. ۱۲
شکل.۱-۷- A: ساختار کریستالی اوبلین، B: تطابق توالی میان فتوپروتئینهای وابسته به کلسیم ۱٤
شکل ۱-۸ ساختار مولکولی کلنترازین طبیعی و آنالوگ های کلنترازین ۱۵
شکل ۱-۹ ساختار اکسی- کلنترازین و رزیدو های اطراف آن در پاکت هیدروفوب. ۱٦
شکل ۱-۱۰ آمینواسیدهایی که تماس نزدیک با سوبسترای اکسی- کلنترازین دارند ۱۸
شکل ۱-۱۱ مکانیسم پیشنهاد شده برای شروع و ادامه واکنش بیولومینسانس در اوبلین ۲۰
شکل ۱-۱۲ سیانوباکتریوم آنابنای رشته ای. سلول های تمایز یافته ۲۲
شکل ۱-۱۳ محل نهایی قرار گیری pacemaker در جنین زبرا فیش ۲۲
شکل ۱-۱٤- شمایی از کاربرد فتوپروتئین اکورین در تست های تشخیصی هیبریداسیون. ۲۳
شکل ۱-۱۵- کاربرد اکورین در سنجش ایمنی. ۲٤
شکل ۱-۱٦- اندازه گیری کمی محصول RT-PCR ۲۵
شکل ۱-۱۷- شمایی ازکاربرد اکورین در شناسایی جایگاه های برش پروتئاز ویروس HIV. ۲٦
شکل۱-۱۸- حسگر زیستی بر پایه لنفوسیت های B. ۲۷
شکل ۱-۱۹ بیوسنسور های تجاری بر پایه سلول ۲۸
شکل۱-۲۰- سنجش همزمان و سریع دو هورمون FSH و LH با استفاده از دو فرم جهش یافته از فتوپروتئین اوبلین. ۲۸
شکل ۱-۲۱- مراحل کلی انجام جهش زایی هدف دار. ۳۰
شکل ۳-۱- تطبیق توالی های (multiple sequence alignment) فتوپروتئین های دو گروه کتنوفور و کلنترات. ٤۸
شکل ۳-۲- ساختمان سه بعدی نمیوپسین طبیعی. ٤۹
شکل ۳-۳- شمایی از شبکه پیوند هیدروژنی ایجاد شده توسط مولکول آب W1 و رزیدوهای اطراف حلقه پارا هیدروکسی فنیل در موقعیت C2 کلنترازین در اکورین. ۵۰
شکل ۳-٤- محصولات PCR پلاسمید به منظور ایجاد جهش. ۵۱
شکل ۳-۵- Colony-PCR مربوط به سلول های ترانسفورم شده. ۵۲
شکل ۳-٦- پلاسمید های استخراج شده از کلونی های مثبت. ۵۲
شکل ۳-۷- تطبیق توالی آمینواسیدی نمیوپسین ۱ وحشی و جهش یافته ها و تأیید جهش ها در هر موقعیت ۵۳
شکل ۳-۸- بیان ٦ ساعته ژن نمیوپسین وحشی و سه موتانت بعد از القاء توسط IPTG یک میلی مولار در *E. coli* ۵٤
شکل ۳-۹ SDS-PAGE مربوط به تخلیص فتوپروتئین نمیوپسین وحشی و سه موتانت آن ۵۵
شکل۳-۱۰- بررسی اثر pH بر فعالیت نمیوپسین طبیعی (▲) و نوترکیب (■) در محدوده ۷ الی ۱۱ ۵٦
شکل ۳-۱۱- اثر یون کلسیم بر فعالیت نسبی نمیوپسین طبیعی (■) و جهش یافته (▲). ۵۷

شکل ۳-۱۲ طیف نشر بیولومینسانسی نمیوپسین طبیعی (بنفش) و جهش یافته (آبی) ۵۸
شکل ۳-۱۳ منحنی سرعت کاهش لومینسانس نمیوپسین طبیعی (▲) و جهش یافته (■) ۵۸
شکل۳-۱٤- طیف CD ناحیه دور UV مربوط به نمیوپسین وحشی و موتانت ها ۵۹
شکل ۳-۱۵ طیف فلورسانس ذاتی نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته. ٦۰
شکل ۳-۱٦ طیف فلورسانس ANS نمیوپسین طبیعی و سه جهش یافته ٦۱
شکل ۳-۱۷- Alignment استفاده شده جهت ساختن مدل ها ٦۲
شکل ۳-۱۸ شبکه پیوند هیدروژنی ایجاد شده توسط آمینواسیدهای اطراف حلقه هیدروکسی بنزیل کلنترازین در نمیوپسین وحشی و موتانت W59K. ٦۵
شکل ۳-۱۹ شبکه پیوند هیدروژنی ایجاد شده توسط آمینواسیدهای اطراف حلقه هیدروکسی بنزیل کلنترازین در نمیوپسین وحشی و موتانت .L127W ٦٦
شکل ۳-۲۰ شمایی از شبکه پیوند هیدروژنی پایدار کننده اطراف حلقه پارا هیدروکسی فنیل در موقعیت C2 کلنترازین در نمیوپسین وحشی و موتانت V183T. ٦٦

فصل اول

مقدمه و تئوری

فصل اول: مقدمه و تئوری

۱-۱- بیولومینسانس (Bioluminescence)

به پدیده نشر نور مرئی توسط موجودات زنده بیولومینسانس گویند که در این فرآیند انرژی شیمیایی به انرژی نورانی تبدیل می شود. واکنش اصلی بیولومینسانس شامل یک واکنش آنزیمی بین لوسیفرین و لوسیفراز در حضور اکسیژن می باشد. لوسیفرین و لوسیفراز اسامی معمول برای سوبسترا و آنزیم مربوطه می باشند که یک واکنش تولید نور را کاتالیز می نمایند. تمام واکنشهای بیولومینسانس در اثر اکسیداسیون لوسیفرین رخ می دهند (لوسیفرین یک جزء آلی غیر پروتئینی می باشد). سپس لوسیفراز یا فتوپروتئین (پروتئینی که لوسیفرین کاملا به آن متصل می باشد.) واکنش را کاتالیز می کند. به هر ترتیب واکنش با حضور ۳ الی ٦ ترکیب پیش می رود که شامل لوسیفراز یا فتوپروتئین، لوسیفرین، اکسیدانتها، کوفاکتور، کاتیون و fluor (مولکولی که نور را در یک طول موج معین جذب کرده و در طول موج بالاتر تابش می نماید). با توجه به اینکه که فوتون ها از طریق بکار گیری تکنیکهای پیشرفته ای مثل لومینومتری قابل آشکار شدن هستند، بیولومینسانس به عنوان یک تکنولوژی دقیق، ارزان و حساس، در ابعاد مختلف فناوری های زیستی همچون علوم پزشکی، کشاورزی، صنایع دفاعی و معدن کاربرد داشته و متقاضیان زیادی در دو دهه اخیر پیدا کرده است [۱].

همچنان که نانوبیوتکنولوژی و آنالیز در مقیاس نانو (nanoscale analysis) مرسومتر می شوند، تقاضا برای توسعه تکنیک هایی با حساسیت بالا که می توانند بیومولکول ها را در نمونه های زیستی و محیطی شناسایی کنند افزایش یافته است. توان عملیاتی بالا و توانایی شناسایی هم زمان چند آنالیت نیز بسیار حائز اهمیت است. فتوپروتئین ها به دلیل ویژگی ها و مزایای متعدد پتانسیل زیادی جهت حل این چالش های جدید دارند [۱].

۱-۲- سیستم های بیولومینسانسی

در طبیعت دو سیستم بیولومینسانس لوسیفراز و فتوپروتئین شناخته شده است.

۱-۲-۱- سیستم بیولومینسانس در *Cypridina hilgendirfi*

Cypridina نوعی سخت پوست دریائی است که نور آبی روشنی از خود نشر می کند و در طی واکنش بیولومینسانس، از خود CO_2 آزاد می کند. این موجود در دریای ژاپن و جامائیکا زندگی می کند [۲]. سیستم کشف شده در بدن این موجود، لوسیفرین – لوسیفراز است.

۱-۲-۲- سیستم بیولومینسانس در کرم شب تاب Firefly

کرم شب تاب لفظی کلی است برای حشراتی که در شب می درخشند. این موجود برخلاف نامش حشره ای است که جزء راسته سخت بال پوشان Coleoptera می باشد (شکل ۱-۱). نور تولیدی از آن ها به خاطر جلب جنس مخالف و همچنین در مواردی شکار طعمه می باشد. در بعضی گونه ها در تمام مراحل دگردیسی حشره اعم از تخم، لارو، حشره بالغ نر و ماده نورافشانی دیده می شود [۳]. سیستم بیولومینسانس کشف شده در بدن کرم شب تاب سیستم لوسیفرین – لوسیفراز است.

شکل ۱-۱- سیستم Bioluminescence کرم شب تاب Firefly

۱-۲-۳- سیستمهای بیولومینسانس با منشاء فتوپروتئینی

در سال ۱۹٦۱، یک پروتئین بیولومینس غیر عادی در ستاره دریایی[1] Aequrea، بنام آکورین[2] (برگرفته از نام جنس آن) کشف شد [٤]. این فتوپروتئین توانایی نشر نور را در محیط های آبی به محض افزودن مقدار کمی Ca^{2+} داشت و به طور شگفت آوری حتی

[1] Aequrea
[2] Aequorin

در غیاب اکسیژن از خود نور ساطع می نمود. پس از بررسی های متعدد متوجه شدند که این نور توسط یک میانکنش درون مولکولی که داخل مولکول پروتئین رخ می دهد، ساطع می شود و مقدار کل نور منتشر شده متناسب با مقدار پروتئینی است که لومینس می شود. در آن زمان دریافتند که آکورین یک پروتئین استثنایی بود که به طور تصادفی در طبیعت ساخته شده است [٤]. عملکرد این پروتئین از واکنش معمول و شناخته شده لوسیفرین–لوسیفراز متفاوت می باشد.

در سال ١٩٦٦ یک پروتئین بیولومینسانسی غیر عادی دیگری در کرم لوله ای[1] کشف گردید [٥]. این پروتئین زمانی نور ساطع می کرد که یک پراکسید و مقدار کمی Fe^{2+}، در حضور اکسیژن بدون اینکه هیچ آنزیمی به آن اضافه شود قادر به نشر نور بود. در این کشف نیز مقدار کل نور نشر یافته متناسب با مقدار پروتئین مصرفی بود. این دو مثال بیانگر نوع دیگری از سیستمهای بیولومینسانسی، متفاوت از واکنش بیولومینسانس[2] لوسیفرین- لوسیفراز بود که در آن لوسیفرین معمولا یک سوبسترای آلی قابل انتشار و نسبتا مقاوم به گرماست و لوسیفراز آنزیمی است که اکسیداسیون نوردهنده (لومینس) یک لوسیفرین را کاتالیز می کند.

با در نظرگرفتن امکان وجود بسیاری از پروتئین های لومینس[3] (نوردهنده) مشابه دیگر در موجودات شب نما[4] یا درخشان، واژه جدید "فتوپروتئین" به عنوان یک اصطلاح مناسب عمومی برای مشخص کردن پروتئین های لومینس غیرعادی مانند آکورین و پروتئین بیولومینس chaetopterus، معرفی گردید [٥]. از اینرو، فتوپروتئین یک واژه عمومی برای پروتئین های بیولومینس می باشد که این پروتئین ها در اندام های روشن موجودات شب نما یا درخشان به عنوان ترکیب اصلی بیولومینس است و توانایی انتشار نور متناسب با مقدار پروتئین را دارند [٦]. نسبت انتشار نور باعث تمایز واضحی بین یک فتوپروتئین و یک لوسیفراز می شود. در یک واکنش لومینسانس لوسیفرین- لوسیفراز، مقدار کل نور منتشرشده با مقدار لوسیفرین متناسب است نه با مقدار لوسیفراز. در سیستم جدید در واقع پروتئین همان لوسیفرین سیستم لوسیفرین- لوسیفراز است که بعنوان فتوپروتئین شناخته شده است.

یک فتوپروتئین در حالت کمپلکس شده با سوبسترای خود پایدارتر از حالت جداگانه اش، یعنی یک پروتئین و یک سوبسترا می باشد. فتوپروتئین بخاطر پایداری بالایی که نسبت به فرم های جداگانه اش دارد، به عنوان نخستین ترکیب انتشار دهنده ی نور در

[1] chaetopterus
[2] bioluminescence
[3] luminescent
[4] luminous

اندام های تولید کننده نور می باشد. برای مثال، اندام های نورزای ستاره دریایی آکورآ دارای آکورین بوده، که در غیاب یون کلسیم بسیار پایدار است اما هر دو جزء آن یعنی کلنترازین[1] و آپوآکورین[2] ناپایدارند و به سختی در هر بخش از ستاره دریایی قابل تشخیص هستند. در سلول های باکتری های شب نما یا درخشان، لوسیفراز باکتریایی در واکنش با $FMNH_2$ و مولکول اکسیژن (O_2)، یک ترکیب حد واسط را تشکیل می دهد، هنگامی که به این حد واسط یک آلدئید غیر قطبی اضافه می شود، نور منتشر می کند [٦, ٧]. در هر حال، این حد واسط ناپایدار بوده و نیمه عمر کوتاهی داشته و از این جهت با تعریف فتوپروتئین هماهنگی ندارد.

در حال حاضر تقریبا ۳۰ نوع سیستم بیولومینس گوناگون شناخته شده اند که برای هر یک اطلاعات بیوشیمیایی بنیادی وجود دارد. حدود نیمی از این سیستم ها فتوپروتئین هستند (جدول ۱-۱). این فتوپروتئین ها شامل نوع حساس به یون کلسیم برگرفته شده از کلنترات ها (آکورین، اوبلین، کلایتین و میتروکامین) و کتنوفورها (نمیوپسین، برووین و بولینوپسین)، انواع فعال سوپراکسیدی از یک کرم فلسی (پولینویدین) و صدف فولاس (فولاسین)، نوع فعال سوپراکسید هیدروژن از یک Brittle star (اوفیوپسیلا) و نوع فعال ATP از هزارپای سکویا[3] می باشند.

فتوپروتئین های نوع حساس به یون کلسیم (Ca^{2+}) و نوع حساس به سوپراکسید (فولاسین) برای کاربردهای آنالیتیک به کاربرده شده اند و فتوپروتئین آکورین به طورگسترده برای مطالعات گوناگون زیست شناسی در طول ۳۵ سال گذشته مورد استفاده قرارگرفته است [۱].

۱-۳- فتوپروتئین های شناخته شده

فتوپروتئین هایی که تاکنون شناخته شده اند به همراه خصوصیات آنها در جدول ۱-۱ آمده است. در ادامه از میان این فتوپروتئین ها دو دسته کلنترات و کتنوفور مورد بررسی قرار می گیرد.

[1] coelenterazine
[2] apoaequorin
[3] luminodesmus (Sequoia millipede)

جدول ۱-۱- فتوپروتئین هایی که تاکنون شناسایی، جداسازی و تخلیص شده اند

Source	*Name*	M_r	*Requirements for luminescence*	*Luminescence maximum (nm)*
Protozoa				
Thalassicola sp.[a]	Thalassicolin		Ca^{2+}	440
Coelenterata				
Aequorea aequorea[b]	Aequorin	21 500	Ca^{2+}	465
Halistaura sp.[c]	Halistaurin		Ca^{2+}	470
Phialidium gregarium	Phialidin[d], clytin[e]	23 000 21 600	Ca^{2+} Ca^{2+}	474
Obelia geniculata *Obelia geniculata* *Obelia longissima*	Obelin Obelin Obelin	21 000[f] 21 000 22 200[g]	Ca^{2+}	475[h] 485[i] 495[i]
Ctenophora				
Mnemiopsis sp.[j]	Mnemiopsin-1 Mnemiopsin-2	24 000 27 500	Ca^{2+} Ca^{2+}	485 485
Beroe ovata[j]	Berovin	25 000	Ca^{2+}	485
Annelida				
Chaetopterus variopedatus[k]		120 000 184 000	Fe^{2+}, hydroperoxide, and O_2	455
Hamothoe lunulata[l]	Polynoidin	500 000	Fe^{2+}, H_2O_2, and O_2	510
Mollusca				
Pholas dactylus[m]	Pholasin	34 600	Peroxidase or Fe^{2+}, plus O_2	490
Symplectoteuthis oualaniensis[n]	Symplectin	60 000	Alkaline pH? and O_2	470[o]
Symplectoteuthis luminosa[p]		50 000	Catalase, H_2O_2, and O_2	
Diplopoda				
Luminodesmus sequoia[q]		60 000	ATP, Mg^{2+}, and O_2	496
Echinodermata				
Ophiopsila californica[r]		45 000	H_2O_2	482

a) Campbell et al. 1981
b) Shimomora 1986b
c) Shimomura et al. 1963
d) Levine and Ward 1982
e) Inouye and Tsuji 1993
f) Stephanson and Sutherland 1981
g) Illarionov et al. 1995
h) Morin and Hastings 1971
i) Markova et al. 2002
j) Ward and Seliger 1974
k) Shimomura and Johnson 1969
l) Nicolas et al. 1982
m) Michelson 1978
n) Fujii et al. 2002
o) Tsuji et al. 1981
p) Shimomura unpublished
q) Shimomura 1981, 1984
r) Shimomura 1986a

۱-۳-۱- فتوپروتئین های کلنترات

چندین نوع فتوپروتئین شامل Aequorin، Obelin، Clytin و Mitrocomin از انواع Hydrozoan و Hydroid جدا شده اند. زمانی که Ca^{2+} به آنها اضافه می شود در حضور اکسیژن نور آبی منتشر می نمایند. فتوپروتئین های Coelenterate در اندازه گیری مقدار اندک Ca^{2+} بسیار مناسب هستند و Aequorin به طور وسیعی در مطالعات مربوط به Ca^{2+} در سیستم های مختلف بیولوژیکی شامل سلول های منفرد استفاده شده است [۸, ۹].

بیشترین بررسی ها تنها روی سه نوع فتوپروتئین انجام گرفته است: Aequorin حاصل از Aequorea، obelin از obelia و phialidin (clytin) از phialidium. آکورین از Aequorea aequrea توسط Shimomura و همکاران جداسازی و خالص سازی گردیده است [۱۰, ۱۲]. این پروتئین به فرم نوترکیب[1] نیز تولید شده است [۱۳, ۱۶]. اوبلین از Obelioa geniculota ، O.australis و O.geniculata جداسازی شده و شکل نوترکیب آن توسط Illarionov و همکاران تولید شده است [۱۷, ۱۸].فیالیدین از Phialidium gregraium توسط Levine و Ward جداسازی (1982) و توسط Inouye و Tsuji (1993) کلون گردید و پروتئین نوترکیب آن کلایتین نام گرفت. تمام فتوپروتئین های coelenterate دارای وزن مولکولی حدود ۲۰ kDa بوده و محصول غلیظ فتوپروتئین استخراج شده زرد رنگ می باشد و دارای جذب ضعیف در حدود ٤٦٠ نانومتر هستند و به جز فلورسانس معمول پروتئین (آن هم به دلیل وجود اسیدآمینه آروماتیک)، بدون فلورسانت هستند.

بعد از فرایند لومینسانس آغاز شده با Ca^{2+}، محلول ها بی رنگ شده و در ناحیه آبی دارای فلورسانت می شوند (ماکسیمم نشر ٤٦٠ نانومتر). شدت فلورسانس آبی وابسته به غلظت های پروتئن مصرف شده و Ca^{2+} است. هر چند که شدت فلورسانس متناسب با غلظت پروتئین نیست [۱۹].

گونه های نورزای Coelenterate دارای یک لوسیفرین بنام Coelenterazine می باشند. گونه های نورزای Hydrozoan و Anthozoan از نظر تاکسونومی بهم نزدیک هستند ولی واکنش بیولومینسانس آنها با همدیگر تفاوت دارد.

آکورین به عنوان یک شاخصی برای کلسیم (نشانگر کلسیم) در دامنه غلظت Ca^{2+} بین $10^{-7/5}$ مولار و $10^{-4/5}$ مولار مفید است [۱۱]، در حالی که در شرایط یکسان اوبلین در دامنه غلظت Ca^{2+} بین $10^{-6/5}$ مولار و $10^{-3/5}$ مولار مورد استفاده است [۱۷].

[1] recombinant

حساسیت به کلسیم فیالیدین تقریبا برابر با اوبلین است [۲۰]. لازم به ذکر است که حساسیت و برخی ویژگی های دیگر در آکورین و احتمالا در همه فتوپروتئین های کلنترات، می توانند با جایگزین کردن بخش کلنترازین فتوپروتئین با آنالوگ هایش، تغییر بکنند. باور بر این است که مکانیسم های واکنش تمام فتوپروتئین های هیدروزوان مشابه اکورین باشد. هر چند که واکنش لومینسانسی در آنتوزوان های لومینوسی متفاوت باشد اما از نظر تاکسونومیکی ارتباط نزدیکی با هیدروزوان ها دارند. گونه های لومینوس آنتوزوان شامل یک لوسیفرین(کلنترازین) و یک لوسیفراز خاص گونه ای به جای فتوپروتئین هستند. اگرچه حضور میزان کمی فتوپروتئین حساس به Ca^{2+} در بعضی گونه ها گمان می شود [۲۱].

اپوآکورین مجددا با انکوباسیون با کلنترازین در حضور اکسیژن مولکولی و غلظت کم ۲- مرکاپتواتانول به شکل فعال اصلی آکورین قابل بازسازی[1] است [۲۲]. آکورین بازسازی شده از لحاظ تمام ویژگیها غیر قابل تشخیص از آکورین اولیه می باشد. عملا بازده بازسازی هنگامی که غلظت پروتئین بیش از ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر است، ۱۰۰٪ می باشد [۲۳]. بنابراین، یک نمونه از آکورین می تواند به طور مکرر لومینس و بازسازی شود. این نتایج در مورد اوبلین [۲٤]، هالیستاورین[2] و فیالیدین نیز صادق است.

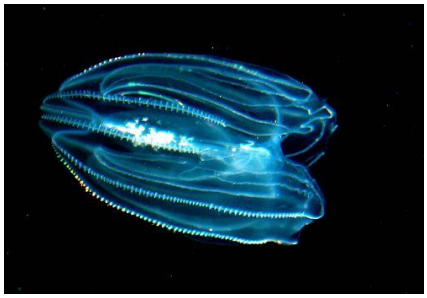
۱-۳-۲- فتوپروتئین های کتنوفور

فتوپروتئین های نیموپسین و برووین به ترتیب از *Mnemiopsis lieydi.* و *Beroe lovata* جداسازی و تخلیص شده اند [۲۵]. این فتوپروتئین ها مانند آکورین حساس به یون کلسیم بوده، با این تفاوت که این فتوپروتئین ها به نور حساس اند. بیشینه جذب نمیوپسین ۲، ٤۳۵ nm است که تقریبا ۲۰nm کوتاه تر از بیشینه جذب آکورین می باشد. حساسیت به نور در فتوپروتئین های کتونوفور به طور چشمگیری متفاوت با آکورین ها است. نمیوپسین و برووین فوق العاده به نور حساس هستند [۲٦]، که به آسانی توسط دامنه ی طیفی گسترده ای از نور (طول موج ۵۷۰nm-۲۳۰) غیر فعال می شوند [۲۷]. در حالی که آکورین و دیگر فتوپروتئین های هیدرزوان تحت تاثیر نور قرار نمی گیرند. نمیوپسین غیرفعال شده با نور و همچنین نمیوپسین مصرف شده پس از واکنش لومینسانسی آغاز شده توسط کلسیم، می تواند همانند آکورین به شکل فعال خود توسط انکوباسیون با کلنترازین در حضور اکسیژن بازسازی شود. با این حال، بازسازی تنها در یک دامنه ی کم pH حدود ۹ اتفاق می افتد [۲۸].

[1] regeneration
[2] halistaurin

۱-٤- بیولومینسانس در *Mnemiopsis leidyi*

این جانور به طور قابل توجهی توان زیست تابی دارد. نسبت به ضربه بسیار حساس است و همین امر باعث می شود که پس از برخورد به محیط اطراف، هشت ردیف شانه با نور فیروزه ای زیبایی به طور درخشان دیده شوند (شکل۱-۲) [۲۹].



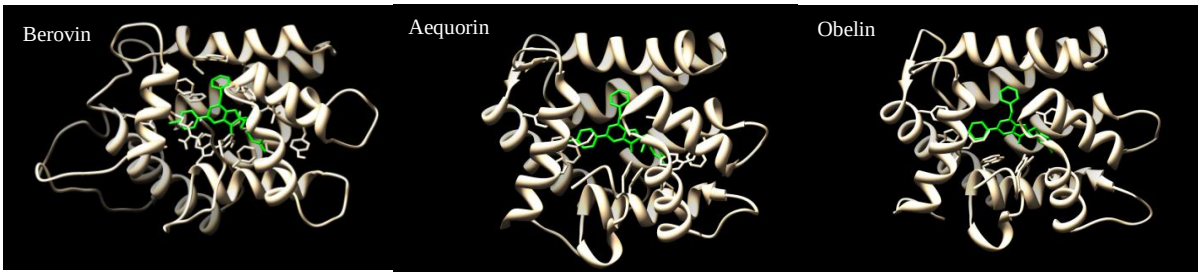
شکل ۱-۲- نمیوپسیس لیدی، شانه های تولید نور کاملا واضح و مشخص هستند.

عامل این خاصیت در زیر نوار شانه ها نهفته است. سلول های مولد نور (Photocytes) عمود بر راستای صفحهٔ شانه ای و در یک طرف مجرای آندودرمی واقع شده اند [۳۰].

۱-۵- ساختار کلی فتوپروتئین ها:

این پروتئین ها کروی بوده سه دومین EF-hand جهت اتصال Ca^{2+} دارند و دارای یک Coelenterazine پراکسیده در حفره مرکزی پروتئین می باشند [۳۱]. وجود گروه پراکسی متصل به موقعیت شماره ۲ coelenterazine نیز ثابت شده است [۳۲]. گروه عملکردی این پروتئین یعنی Coelenterazine از محلول خارجی محافظت می شود. بنابراین هیچ عاملی نمی تواند با این گروه واکنش بدهد مگر اینکه ابتدا با باقیمانده های پروتئین واکنش داده و این نیز خود باعث می شود که Coelenterazine پراکسیده شکسته شود.

Aequorin اولین فتوپروتئین Ca^{2+}-regulated است که کشف و جداسازی شد. تاکنون ساختار کریستالی سه پروتئین از این زیر خانواده تعیین شده است که عبارتند از: Aequorin و Obelin که جزء فتوپروتئین های کیسه تنان (coelenterate) می باشند و Berovin که عضوی از فتوپروتئین های شانه داران (cetenophore) است (شکل۱-۳). تمام فتوپروتئین های Ca^{2+}-regulated در یک خانواده همولوژی توالی بالایی نشان می دهند [۳۳] (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۳- ساختار سه بعدی فتوپروتئین هایی که ساختمان کریستالی آنها تاکنون شناخته شده اند.

همچنانکه از همولوژی توالی های اولیه انتظار می رود همه این پروتئین ها ساختار کروی فشرده یکسانی دارند و متشکل از یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد هستند [۳۳, ۳٤] . در مورد Obelin پنج شکل کنفورماسیونی متفاوت شناخته شده است که شامل: آپو اوبلین، اوبلین متصل به کلسیم، اوبلین متصل به کلنترازین، اوبلین متصل به کلسیم و کلنترازین و حالت قبل بدون کلسیم می باشد (شکل ۱-۵).