تهیه کریستال لوسیفراز جهش یافته گونه Lampyris turkestanicus و بررسی اولیه پراشهای حاصل از آن

میترا خیرآبادی[۱]، اولریچ گوهلکه[۳]، سامان حسین‌خانی[۲]، اودو هاینمن[۳] و حسین نادری‌منش[۲،*]

[۱] سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

[۳] برلین، بوخ، مرکز ماکس دلبروک، بخش پزشکی مولکولی

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۸

چکیده

لوسیفرازها آنزیمهایی هستند که از سوبسترایی به نام لوسیفرین همراه با ATP و Mg^{2+} و اکسیژن مولکولی برای انتشار نورهایی با رنگهای متنوع استفاده می‌نمایند. بسته به فاکتورهای متفاوت – که یکی از مهم ترین آنها اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده لوسیفراز است– نورهایی با طیف رنگی متفاوت از لوسیفرازها منتشر می‌شود. لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی با نام علمی *Lampyris turkestanicus* نور سبز منتشر می‌کند. در این کار برای اولین بار کریستال لوسیفراز جهش یافته *Lampyris turkestanicus* (E354R/R356/H432Y) – که نور قرمز ساطع می‌کند– به منظور مطالعه و تعیین ساختار سه بعدی و در نهایت مطالعه مکانیسم تغییر رنگ در مقایسه با لوسیفرازهای تعیین ساختار شده دیگر با روش کریستالوگرافی اشعه X تهیه شد. تهیه کریستال با استفاده از روش کریستالوگرافی قطره نشسته انجام شد و کریستال تتراگونالی با حد تفکیک ۲/۲ آنگستروم به‌دست آمد. تک واحدهای کریستال دارای ابعاد a=85.01 b=85.01 c=97.09 است.

واژه های کلیدی: لوسیفراز جهش یافته (E354R/R356/H432Y)، کریستالوگرافی اشعه X ، *Lampyris turkestanicus*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۵۸-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

موجودات بیولومینسانت در سرتاسر محیطهای خشکی و آبی پراکنده‌اند و شامل باکتریها، حشرات، کیسه‌تنان، مرجان‌های آبی و غیره می‌شوند (۱۹). حشره‌های شب‌تاب یکی از صدها گونه جانوری می‌باشند که در دل تاریکی جنگلها می‌درخشند. آنها از پرتوهای نور ساطع شده به منظور فرستادن علائم تولید مثلی، دفاع و... به یکدیگر استفاده می‌کنند. گونه‌های متنوعی از حشره‌های شب‌تاب و کلاً موجودات تولید کننده نور در طبیعت وجود دارند، اما آنچه این تکثر را به وحدت تبدیل می‌کند، وجود یک خانواده پروتئینی مشابه در تمامی آنهاست که مسئول انتشار نور می‌باشد و همچنین بسته به گونه منتشر کننده نور، نورهایی با رنگهای متفاوت و متنوع از موجودات منتشر کننده ساطع می‌شود (۳۸). این خانواده پروتئینی لوسیفراز نامیده می‌شود. لوسیفرازها آنزیمهایی هستند که برای انتشار نور از سوبسترایی به نام لوسیفرین همراه با ATP و Mg^{2+} و اکسیژن مولکولی برای نشر نورهایی با رنگهای متنوع استفاده می‌کنند (شکل-۱).

آنزیم لوسیفراز، دومرحله آنزیمی آدنیلاسیون D– لوسیفرین و اکسیژناسیون لوسیفریل- آدنیلات (Luciferyl- adenylate) را کاتالیز می‌کند (۳۴).

Archive of SID

www.SID.ir

$$Luc + LH_2 + ATP\text{-}Mg \rightleftarrows Luc{\cdot}LH_2\text{-}AMP + PP_i \quad (1)$$

$$Luc{\cdot}LH_2\text{-}AMP + O_2 \rightarrow Luc{\cdot}oxyluciferin^* + AMP + CO_2 \quad (2)$$

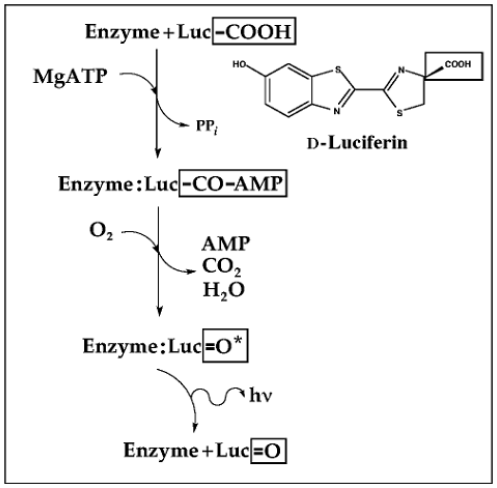
$$Luc{\cdot}oxyluciferin^* \rightarrow Luc{\cdot}oxyluciferin + h\upsilon \quad (3)$$

۱- لوسیفراز با آدنیلاسیون گروه کربوکسیل لوسیفرین در حضور Mg^{2+} ATP باعث فعال شدن این سوبسترا می‌شود.

۲ - لوسیفراز همانند یک اکسیژناز (Oxygenase) عمل کرده و با اثر بر روی لوسیفریل- آدنیلات، ضمن تولید محصولات، ایجاد پرتو نوری می‌کند.

میزان آنزیمهای لوسیفراز مولد نورهای غیر اختصاصی در محیط سلولی، به مقدار نانومولار با استفاده از لوله‌های تقویت کننده نوری (Photomutiplier tubes (PMTs) یا وسایل همراه با بار (Charge- coupled devices) تخمین زده می‌شوند(۵ و ۳۷). این حساسیت بالای اندازه‌گیری سطح آنزیم، لوسیفرازها را به نمایندگانی شایسته برای کاربردهای گوناگون تبدیل کرده است که از جمله آنها عبارتند از: ردیابی مراحل رشد باکتریها در محیط، (۱۵) برای ردیابی باکتریها و سمهای محیطی، (۶، ۳۲ و ۳۵) سنجش میان‌کنشهای بیومولکولی بر پایه انتقال انرژی رزونانس بیولومینسانس، (۳، ۲۸، ۴۰ و ۴۱) حس‌گرهای زیستی بر پایه- کل- سلول،(Whole-cell-based) biosensors (۱۶، ۱۷ و ۳۶) سنجشهای بیان ژن، (۱۴، ۲۴ و ۲۷) ردیابی رشد تومورهای سرطانی و متاستاز، (۷، ۲۹ و ۴۲) مطالعه جزئیات حمل و نقل سلولی، (۳۴-۱۸) مطالعه جزئیات تنظیمات ژنتیکی،(Cell traficking) (۸) ترشح پروتئین درجایگاههای ویژه، (Protein site-specific) secretion (۱۵) آنالیز بیماریهای عفونی، (۲۲) تعیین توالی DNA با استفاده از لوسیفراز حشره‌ی شب‌تاب به روش Pyrosequencing ، (۳۱) کاربرد بیولومینسانس در غربالگری داروها (Bioluminescence in drug) screening (۳۳-۱۱) و کاربرد لوسیفراز در آزمونهای ایمنی(Immuno assay) (۲۳).

نکته قابل توجه اینکه، اغلب سنجشهای بیان ژن نیازمند دو گزارش‌گر لوسیفرازی با دو رنگ متفاوت منتشرکننده با یک سوبسترای مشترک می‌باشند(۵).



شکل ۱- واکنش کاتالیز شده توسط لوسیفراز حشره شب‌تاب

به‌دست آوردن تک‌کریستال، اولین مرحله در آنالیز ساختاری یک پروتئین به کمک اشعه x می‌باشد. کریستال کردن پروتئینها اساساً روشی مبتنی بر سعی و خطا بوده که در آن پروتئین از حالت محلول به آهستگی رسوب می‌کند. حضور ناخالصیها، هسته‌های کریستاله کننده و دیگر فاکتورهای ناشناخته، نقش مهمی در این فرایند بر عهده دارند.

طی چند دهه گذشته، لوسیفرازهای حشرات متفاوت شب‌تاب به طور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند که در این میان بیشترین تحقیقات روی لوسیفراز نوع آمریکای شمالی با نام علمی *Photinus pyralis* انجام گرفته است. در شمال ایران (جنگلهای آمل(۲)) دو گونه حشره شب‌تاب با نام *Lampyris turkestanicus* و *Lamproidea maculata* مشاهده و گزارش شده است. گونه *Lampyris*

Archive of SID
www.SID.ir

turkestancus به فراوانی یافت می‌شود در حالی که گونه *L. maculata* گونه‌ای نادر با ویژگیهای ریخت‌شناختی منحصر به فرد می‌باشد (۱۳).

بسته به فاکتورهای متفاوت –که یکی از مهم ترین آنها اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده لوسیفراز است– از لوسیفرازها نورهایی با طیف رنگی متفاوت منتشر می‌شود. حشره شب‌تاب گونه ایرانی با نام علمی *Lampyris turkestanicus* حاوی لوسیفرازی است که پرتویی به رنگ سبز منتشر می‌کند(۲). این گونه در جنگلهای شمال ایران (آمل) زندگی می‌کند. در این کار برای اولین بار کریستال لوسیفراز جهش یافته گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* –که نور قرمز ساطع می‌کند– تهیه شد(۱). مکانیسمهای متفاوتی جهت توجیه تغییر رنگ نور انتشار یافته از لوسیفرازها بیان شده‌اند که براساس جدیدترین و آخرین نظریه این تغییر، در نتیجه دو فاکتور اصلی است و تنها به تک حالت تهییج شده شکل کتویی آنیون فنولات اکسی لوسیفرین وابسته است.

این دو فاکتور عبارتند از:

۱- قطبیت محیط جایگاه فعال لوسیفراز حول آنیون اکسی لوسیفرین
۲- میان‌کنش میان اتم 'O8 آنیون اکسی لوسیفرین حالت تهییج شده و اتم هیدروژن جفت‌کاتیون آن– شکل پروتونه ناحیه بازی آمینواسیدی در جایگاه فعال است– (۲۱).

به منظور بررسی مکانیسم تغییر رنگ نور–که هنوز هم به صورت معمائی باقی‌مانده است– حاصل از لوسیفراز جهش افته با سایر لوسیفرازهای تعیین ساختار شده در مراحل بعدی کار، ساختار سه‌بعدی لوسیفراز با آنالیز پراش حاصل از کریستال تعیین گردید. (تلاشهای اولیه برای تهیه کریستال لوسیفراز گونه طبیعی در شرایط یکسان با لوسیفراز جهش یافته بدون نتیجه ماند.)

مواد و روشها

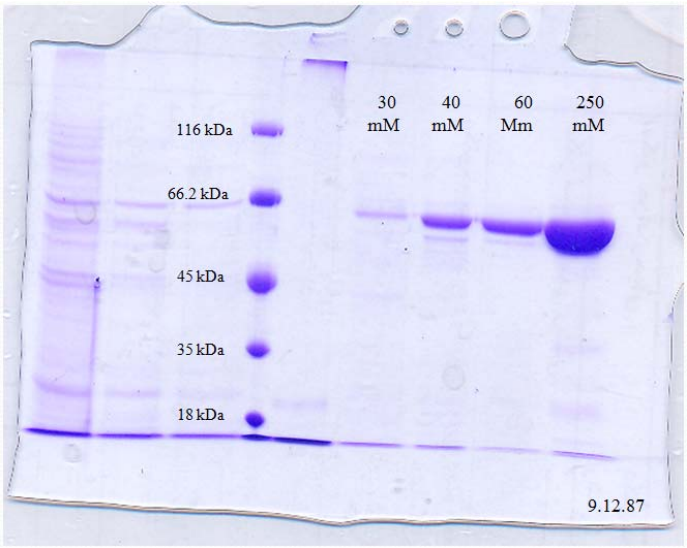
بیان، تخلیص و تعیین فعالیت و غلظت پروتئین: بیان پروتئین "جهش یافته" در باکتری اشرشیاکلی گونه BL21 حاوی پلاسمید بیانی pET28a در محیط کشت TB –که حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت۵۰ میلی گرم در هر میلی‌لیتر بود– به انجام رسید. به این منظور ابتدا باکتری برای مدت۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰ "r.p.m" انکوبه شد و سپس بیان پروتئین با افزایش mM۱ IPTG و ۴ میلی مولار لاکتوز القاء شد و باکتریها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ "r.p.m" انکوبه شدند.

بعد از هر بار کشت و تست بیان پروتئین به وسیله دستگاه فلوری‌متر، دیواره باکتریها پس از معلق‌سازی در بافر لیزکننده غشاء (شامل ۱۰ mM هپس ، ۳۰۰ mM نمک کلرید سدیم، ۱۰ mM ایمیدازول، ۱۰ درصد گلیسرول در اسیدیته ۷/۸) و مقدار mM۱ PMSF در سرما با استفاده از دستگاه FRENCH-PRESS در ۲ تکرار متوالی شکسته شد. بقایای باکتریها و اجزای نامحلول آنها با استفاده از سانتریفیوژ با دور"r.p.m" ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد و به این ترتیب عصاره‌ای که حاوی کل پروتئینها بود، به‌دست آمد.

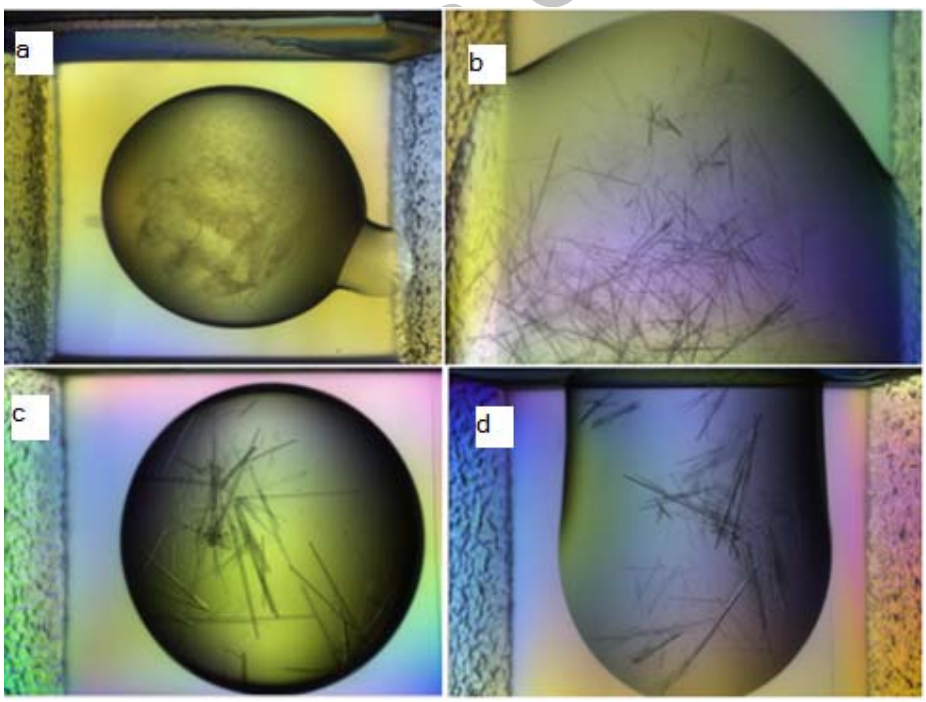
از آنجا که پروتئین دارای دم–هیستیدینی است تخلیص پروتئین "جهش یافته" تنها با یک مرحله به وسیله ستون نیکل سفارز ۵ میلی‌لیتری محصول شرکت کیاژن صورت گرفت. به منظور متعادل سازی ستون با بافر، شست‌وشوی ستون با ۵۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به ازای هر یک لیتر محیط کشت –که حاوی ۱۰میلی مولار هپس، ۱۰ درصد گلیسرول، ۳۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۰ mM ایمیدازول در اسیدیته ۷/۸ در اتاق سرد است– با سرعت ۵ صورت گرفت. عصاره باکتری حاوی پروتئین –که باز هم فعالیت آن قبل از تخلیص آزمایش شد– با سرعت ۱–۲ از ستون عبور داده شد. در مرحله بعدی از شیب متفاوتی از

Archive of SID
www.SID.ir

محلولهای شستشو با غلظتهای متفاوت ایمیدازول به ترتیب از ۳۰-۴۰-۶۰ mM در اسیدیته ۸ با سرعت ۳-۴ و به میزان حدود ۳۵-۴۰ میلی‌لیتر برای خالص‌سازی پروتئین استفاده گردید و در مرحله آخر محلول جداکننده پروتئین از ستون با غلظت ۲۵۰ mM ایمیدازول با اسیدیته ۸ و سرعت ۳ از ستون عبور داده شد (شکل ۲).



شکل ۲ - ژل SDS-PAGE حاصل از تخلیص پروتئین لوسیفراز جهش یافته



شکل ۳ - مراحل رشد کریستال لوسیفراز که شامل (a) رسوب پروتئین، (b) تشکیل کریستالهای سوزنی و (c and d) در نهایت رشد کریستالها تا اندازه دلخواه می‌باشد.

www.SID.ir

جدول۱- بافرهای متفاوت امتحان شده به منظور تست میزان حلالیت و پایداری پروتئین

	بافر	نمک کلرید سدیم	سوکروز	گلیسرول	پلی اتیلن گلیکول	pH
۱	تریس ۱۰ mM	۵۰ mM	٪۱	٪۱۰		۷/۸
۲	تریس ۱۰ mM	۵۰ mM		٪۱۰		۷/۸
۳	هپس ۱۰mM	۵۰ mM	٪۱	٪۱۰		۷/۸
۴	هپس ۱۰mM	۵۰ mM		٪۱۰		۷/۸
۵	هپس ۱۰mM	۱۰۰ mM	٪۱	٪۱۰		۶/۸
۶	هپس ۱۰mM	۱۰۰ mM		٪۱۰		۶/۸
۷	هپس ۱۰mM	۱۰۰ mM	٪۱	٪۱۰	٪۲۵	۶/۸
۸	هپس ۱۰mM	۱۰۰ mM	٪۱	٪۱۰		۷

۱۰ میکرولیتر محلول حاوی پروتئین را -که شامل بافر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر هپس۱۰ mM همراه با ۱۰۰-۱۵۰ mM نمک کلرید سدیم و ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ درصد سوکروز در اسیدیته‌های متفاوت ۷/۸ و ۶/۸ و ۷ و ۱۰ میکرولیتر بود- را با محلول کمپلکس حاوی ۵ میلی مولار لوسیفرین، نمک کلرید منیزیم با غلظت ۵ mM و ATP با غلظت ۲mM در بافر تریس با اسیدیته ۷/۸ مخلوط کرده، بعد از گذشت حدود یک دقیقه برای تطابق محلولها با دمای محیط، فعالیت پروتئین با دستگاه Infinite M200 (TECAN) ثبت گردید(۱).

تعیین غلظت پروتئین: جذب نوری محلولهای متفاوت حاوی پروتئین را با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی اشعه ماوراءبنفش در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن مولکولی پروتئین، نیاز به "ضریب خاموش‌سازی" پروتئین است که این ضریب به صورت تئوری با استفاده از جعبه Pro Param در سایت Expasy و تنها با وارد نمودن توالی پروتئین محاسبه گردید. "ضریب خاموش سازی" لوسیفراز گونه ایرانی ۳۸ بود.

کریستالوگرافی اشعه X پروتئین: دیالیز و نگهداری پروتئین: دیالیز محلول پروتئینیِ حاوی ۲۵۰ mM ایمیدازول حاصل از تخلیص، با استفاده از کیسه دیالیز شرکت سیگما در اتاق سرد و با غلظت پروتئینی حدود ۲ mg/ml به مدت۱۲ ساعت انجام گرفت. به ازای هر ۱ ml محلول پروتئین، یک لیتر محلول بافر دیالیز (بافرهای متفاوت ذکر شده در جدول ۱) استفاده شد.

تست بافرهای متفاوت که غلظتهای بالای پروتئینی در آنها دارای بالاترین پایداری باشد: یکی از مهم‌ترین مراحل انجام کریستالوگرافی، تهیه بافری است که پروتئین در آن بافر، بالاترین پایداری را (به لحاظ عدم رسوب و محلول ماندن پروتئین فعال در مدت طولانی) در غلظتهای بالای مورد نیاز برای تشکیل کریستال داشته باشد. این نکته نیز قابل توجه می‌باشد که این افزایش پایداری باید با حفظ فعالیت آنزیم در طولانی مدت همراه باشد. برای تحقق این امر پروتئین در بافرهای متفاوتی حل گردید (جدول ۱).

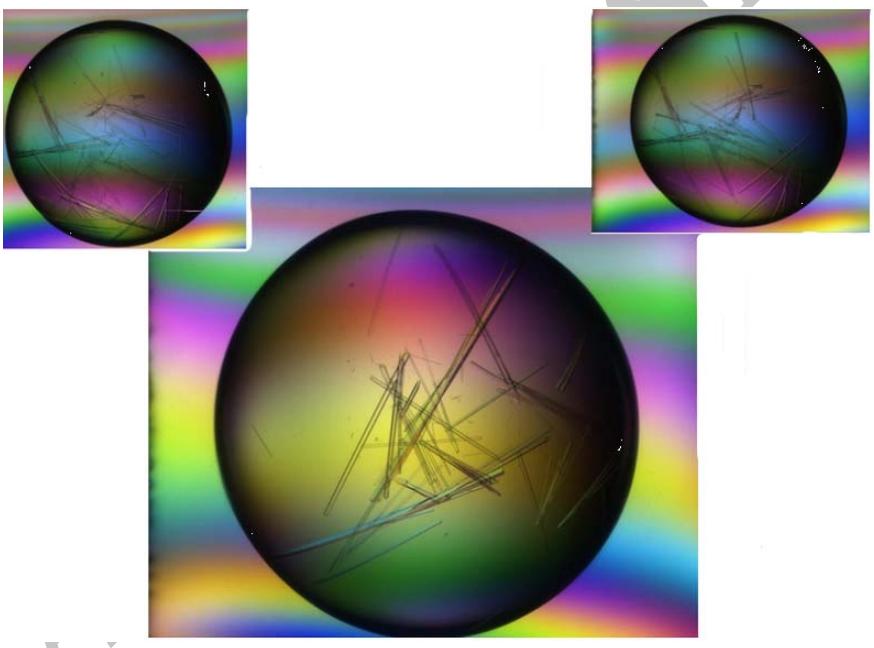
کریستال کردن پروتئین: کریستالهای لوسیفراز جهش یافته با استفاده از روش "قطره نشسته" به‌دست آمد. خوشه‌ای از کریستالهای سوزنی در شرایط متفاوتی رشد کردند (شکل ۴-۳)، اما ضخیم‌ترین و طویل‌ترین کریستالها بعد از حدود یک هفته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، در ۵۰۰ نانولیتر بافر، حاوی ۴ mg/ml لوسیفراز، ۱۰ mM

Archive of SID
www.SID.ir

سدیم- هپس، ۱ mM EDTA ، ۱۰ درصد (V/V) گلیسرول، ۱ در سوکروز، ۱۰۰ mM نمک کلرید سدیم و ۵ DTT mM در اسیدیته ۷ با ۵۰۰ نانولیتر محلول رسوب دهنده، حاوی۴ درصد PEG8000 (w/v)، ۱۴ درصد اتیلن گلیکول، ۱۰۰ mM سدیم- هپس در اسیدیته ۷/۵ تشکیل شد (شکل ۴).

آماده سازی محلولهای "محافظ در برابر سرما" (Cryoprotectant) برای حفظ کریستال در برابر صدمات ناشی از اشعه X : یکی از مهم‌ترین مراحل در کریستالوگرافی، تهیه و استفاده از محلول محافظت‌کننده کریستال در برابر آسیب ناشی از تابش اشعه X به منظور افزایش طول عمر کریستال در حین تابش اشعه X می‌باشد. معمولاً محلولهایی با تشابه بالا به شرایط محلول رسوب دهنده‌ای که کریستال در اثر آن رشد کرده است، بهترین محلولها برای حفاظت پروتئین در برابر اشعه X و حفظ پایداری کریستال هستند. در این آزمایش محلولهای زیر تهیه شده و به منظور اطمینان از مفید بودن آنها، کیفیت محلول‌ها با استفاده از تولید کننده اشعه X آزمایشگاهی بررسی شد.

- محلول محافظ در برابر سرما: ۱۶ درصد پلی اتیلن گلیکول۸۰۰۰ با درصدهای متفاوت اتیلن گلیکول۲۰ و ۲۵ درصد و گلیسرول ۲۵ درصد



شکل ۴ – کریستالهای لوسیفراز با حد تفکیک ۲/۲ آنگستروم (هر سه تصویر کریستال های رشد یافته در شرایط یکسان را نشان می‌دهند.)

که در نهایت بعد از بررسی کیفیت آنها به لحاظ کمترین نویز آب در صفحه پراش ۲۵ درصد اتیلن گلیکول در ۱۶ درصد پلی اتیلن گلیکول۸۰۰۰ به عنوان محلول محافظ در برابر سرما انتخاب گردید.

منبع اشعه X مورد استفاده در تهیه عکس کریستال و ثبت انکسارات حاصل از اشعه X : **سینکروترون BESSY در برلین (۲۰) حلقه ذخیره الکترون از نسل سوم می‌باشد که الکترون با انرژی ۱/۷ گیگا- الکترون- ولت در آن در حرکت بوده و در نتیجه این حرکت، سه اشعه X با انرژیها و در نتیجه طول موجهای متفاوت ایجاد می‌کند که در این آزمایش از BL14.1 استفاده شد. لازم به**

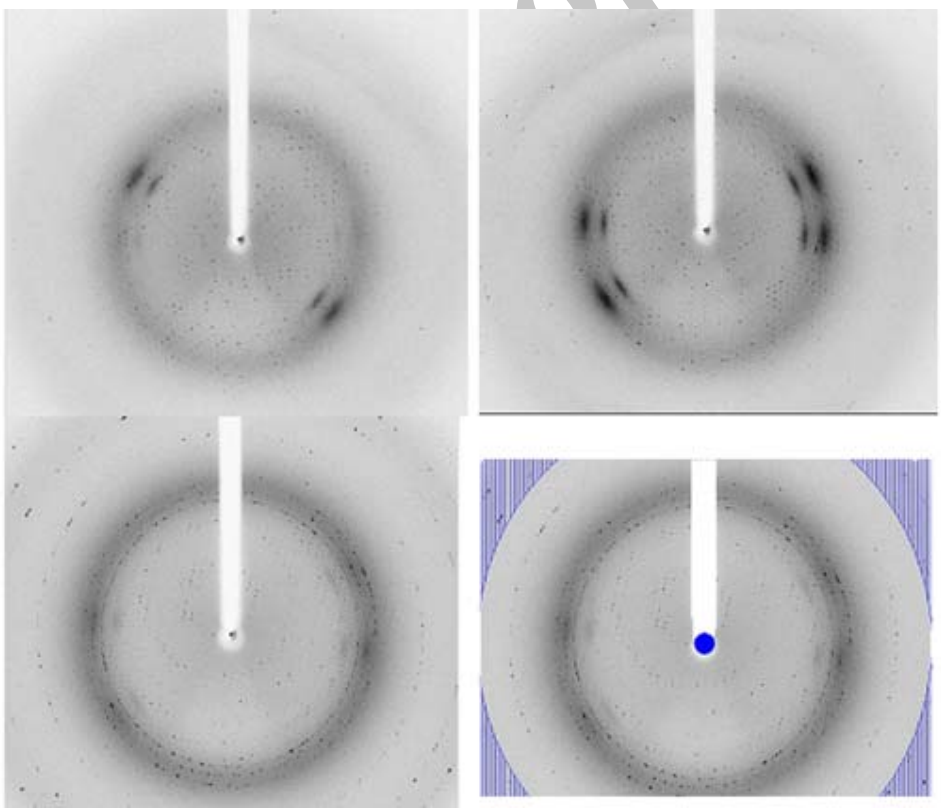
www.SID.ir

ذکر است که این عمل در دمای ۱۰۰ درجه کلوین انجام شد.

شکل ۵ – کریستال به‌دام انداخته شده توسط حلقه (تصویر بعد از اتمام عکسبرداری با اشعه X از کریستال گرفته شد).

در این مرحله و با ثبت پراشهای اولیه می‌توان اطلاعات اولیه‌ای از کریستال به‌دست آورد که از جمله می‌توان به موزاسیتی(Mosacity) (۱۰) کریستال اشاره کرد. این فاکتور نشان دهنده چگونگی چینش تک واحدها در کریستال نسبت به یکدیگر می‌باشد که هر چه مقدار آن پایین تر باشد معرف شباهت بالاتر تک واحدها به همدیگر بوده و در نتیجه اطلاعات حاصل از آنها قابل اعتمادتر می‌باشد.

بعد از تهیه عکس کریستال با استفاده از اشعه X (شکل ۶)، اطلاعات حاصل از پراش بایستی تجزیه و تحلیل شده و تقارن کریستال محاسبه گردد. نرم افزار XDS برای محاسبه تقارن و گروه فضایی کریستال مورد استفاده واقع شد. اطلاعات حاصل از محاسبات صورت گرفته توسط این نرم‌افزار در مراحل بعدی تعیین ساختار، توسط نرم افزار CCP4 مورد استفاده قرار گرفت که در نهایت تمامی اطلاعات مربوط به ساختار در جدول ۲ آمده است.



شکل-۶ تصاویر پراش اشعه X از کریستال لوسیفراز جهش یافته گونه ایرانی. (خطوط آبی رنگ محدوده حد تفکیک نقاط پراش یافته را نشان می‌دهد که از ۲/۱۳ تا ۳۱/۹۸ را شامل می‌شود.)

www.SID.ir

جدول ۲ - پارامترهای کریستالوگرافی

فاکتور B (B-factor)	17.329Å
موزاسیتی (Mosacity)	0.175
گروه فضایی (Space Group)	P_41
تمامیت ساختار (Completnece)	99.9
Multiplicity	5.1
تقارن (Symmetry)	Tetragonal
Rob	11.6(55.2)
R-factor	0.1762
R-free	0.2266
حد تفکیک (Resolution)	2.2Å
ابعاد تک واحد کریستال (Cell dimensions)	85.01 85.01 97.09
زوایای تک واحد کریستال (Cell angles)	90 90 90

نتایج

بافری که پروتئین در آن بالاترین پایداری را با حفظ فعالیت داشت، بافر شماره ۸ در جدول-۱ -۱۰ mM سدیم- هپس، ۱ mM EDTA ، ۱۰ درصد (v/v) گلیسرول، ۱ درصد سوکروز، ۱۰۰ mM نمک کلرید سدیم و ۵ mM DTT در اسیدیته ۷ -بود. گلیسرول با درصد بالا معمولاً به عنوان پایدار کننده پروتئین در آزمایشات کریستالوگرافی استفاده می شود و با توجه به گزارشات ارائه شده مبنی بر عدم تغییر ساختار اغلب پروتئینها در حضور گلیسرول از این افزودنی به منظور پایدارسازی پروتئین استفاده شد(۱۲). سوکروز با غلظتهای بالا نقش دوگانه‌ای در آزمایشات کریستالوگرافی بر عهده دارد در غلظتهای بالا نقش رسوب دهنده و در غلظتهای پایین نقش پایدار کننده را بر عهده دارد. گزارشات قبلی روی لوسیفراز *Lampyris turkestanicus* نشان داد که سوکروز نقش پایدار کنندگی برروی این آنزیم دارد (۲۵). با توجه به توضیحات داده شده و با آزمایش شرایط بافری مختلف بهترین محلول رسوب دهنده، محلول شماره ۳ از جدول- ۲- حاوی۴ درصد PEG8000 (w/v)، ۱۴ درصد اتیلن گلیکول، ۱۰۰ mM سدیم- هپس در اسیدیته ۷/۵- با محلول محافظ که حاوی۱۶ درصد PEG8000 و ۲۵ درصد اتیلن‌گلیکول بود که به عنوان محافظ در برابر سرمای کریستال جهت کریستالوگرافی استفاده شد و در نهایت از میان کریستالهای متعددی که در شرایط متعدد رشد کردند، بهترین کریستال با حد تفکیک ۲/۲ آنگستروم (شکل۴-۳) و بهترین اطلاعات در شرایط ذکر شده در بالا به‌دست آمد. لازم به ذکر است که از میان ۲ دمای تست شده جهت

www.SID.ir

انجام کریستالوگرافی، دمای ۲۰ درجه، نتایج بهتری را به لحاظ رشد کریستالها نشان داده و در نتیجه، این دما برای ادامه آزمایشها انتخاب گردید. (همچنین تمامی مراحل کریستاله نمودن پروتئین تکرار گردیده و تکرارپذیری آن نیز به اثبات رسید.)

عکسبرداری در سینکروترون برلین انجام گردیده و نتایج حاصل از آن در شکل ۵ قابل مشاهده است. این تصاویر بیان‌گر کیفیت بالای عکسها به لحاظ تقارن موجود در نقاط روی عکس و همچنین شدت خوب نقاط در کریستال است که مؤید کریستالهایی با کیفیت بالا جهت کسب اطلاعات مطلوب می‌باشد.

مجموعه کاملی از اطلاعات، شامل صدها تصویر مجزا می‌شود که در موقعیتهای قرارگیری فضایی متفاوتی از کریستال گرفته شده است. اولین مرحله این است که این تصاویر مختلف را با یکدیگر الحاق کرده و آنها نسبت به یکدیگر سنجیده شود، به این صورت که برای انجام آن در ابتدا بایستی پیکهایی را که در دو یا چند تصویر ظاهر می‌شوند شناسایی (الحاق) نموده و این تصاویر نسبی، نسبت به یکدیگر سنجش گردد، تا آنهایی که میزان چگالی ثابتی دارند به‌دست آید. بهینه‌سازی سنجش چگالی بسیار مهم است. زیرا چگالی نسبی پیکها حاوی اطلاعات کلیدی است که از طریق آنها ساختار ماکرومولکول تعیین می‌گردد. روش تکرار شونده جمع‌آوری اطلاعات کریستالوگرافیک سبب می‌شود یادداشت‌گر اطلاعات، تعداد زیادی پراشهای متقارنِ هم‌ارز را چندین مرتبه ثبت نماید. این به محاسبه R-factor مرتبط با تقارن می‌انجامد که از طریق آن میزان تشابه میان شدتهای اندازه‌گیری شده پراشهای هم‌ارزِ متقارن، اندازه‌گیری شده و در نتیجه کیفیت اطلاعات تشخیص داده می‌شود.

نرم افزار XDS برای محاسبه تقارن و گروه فضایی کریستال مورد استفاده واقع شد. اطلاعات حاصل از محاسبات صورت گرفته توسط این نرم‌افزار در مراحل بعدی تعیین ساختار توسط نرم افزار CCP4 مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت تمامی اطلاعات مربوط به ساختار در جدول ۲ آمده است.

بحث

کریستالهای لوسیفراز بسیار شکننده ورشد آنها بسیار کم می باشد. در آزمایشات کریستالوگرافی معمولاً در ابتدا از شرایط بافری استفاده شده جهت کریستال نمودن پروتئینهای مشابه و هم خانواده استفاده می‌شود چرا که احتمال کریستال شدن پروتئین در چنین شرایطی بسیار بالاست. بافر پروتئینی کریستال گونه P.pyralis که تشابه بالایی (۸۶ درصد همسانی) با لوسیفراز *Lampyris turkestanicus* دارد حاوی ۲۵ درصد اتیلن گلیکول همراه با ۱۰ درصد گلیسرول به منظور افزایش پایداری پروتئین است (۹). در شرایط بافری مشابه با شرایط لوسیفراز *P.pyralis*، رنگ نور نشر یافته از پروتئین جهش یافته *Lampyris turkestanicus* از قرمز به سبز تغییر کرد و درنتیجه این شرایط برای تهیه کریستال پروتئین نامطلوب بود. بنا بر آنچه توضیح داده شد و به منظور رشد کریستالهای بزرگتر و محکم‌تر شرایط بافری متفاوتی تست شد که شرایط محلول رسوب دهنده و بافر پروتئینی در این آزمایش، در میان لوسیفرازهای تعیین ساختار شده تاکنون، برای اولین بار مورد استفاده قرار گرفته و مخصوص لوسیفراز جهش یافته*Lampyris turkestanicus* می باشد.

در این مطالعه کریستال لوسیفراز جهش یافته *Lampyris turkestanicus* تهیه شد و بعد از تابش اشعه X و عکس پراش حاصل از آن، تقارن و مشخصات ابعاد و زوایای تک واحد آن مشخص گردید. این لوسیفراز برای اولین بار کریستال شده است. تقارن آن تتراگونال با فضای گروهی $P4_1$ است که برای اولین بار در لوسیفرازها در حالت بدون لیگاند دیده شد. تاکنون ساختار پیچیده لوسیفراز گونه ژاپنی *L.cruciata* با اکسی لوسیفرین–AMP (PDB code: 2D1R) و DLSA (PDB code:2D1S) و لوسیفراز گونه

Archive of SID

www.SID.ir

آمریکایی P.pyralis در حالت بدون لیگاند (PDB code: 1LCI) و همراه با مهارکننده‌هایPTC124-AMP (PDB code:3IER) (۴) و بروموفورم (PDB code:1BA3) تعیین ساختار گردیده است (۲۶). نتایج آزمایشگاهی، تنها در کمپلکس لوسیفراز گونه آمریکایی *P.pyralis* با PTC124-AMP تقارن مشابهی را با کریستال لوسیفراز جهشافته *Lampyris turkestanicus* نشان می‌دهند. شکل کریستال در لوسیفرازهای تعیین ساختار شده یکسان است اما تقارن آنها با یکدیگر متفاوت است.

مقدار موزاسیتی کریستال (۰/۱۷۵) نشان‌دهنده چینش صحیح و منظم تک واحدها کنار یکدیگر درکریستال است.

فاکتور کمّی مشابهی که R-free نام دارد از مجموعه ۱۰ درصد پراشهایی که در پالایش ساختار دخالت دارند محاسبه می‌شود. هر دو فاکتورهای "R" به میزان حد تفکیک اطلاعات وابسته است. میزان R-free بایستی تقریباً ۱/۱۰ مقدار حد تفکیک به آنگستروم باشد که در کریستال تهیه شده در این تحقیق (۰/۲۲۶۶) است که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب اطلاعات حاصل از کریستال است. در نهایت اینکه اطلاعات حاصل از کریستال شرایط مطلوبی را برای تعیین ساختار و آنالیز بعدی اطلاعات نشان می‌دهد.

منابع

1- Alipour. B. S, et al., The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermo stability of firefly luciferase. Photochem. Photobiol. Sci., 2009. 8: p. 847-855.

2- Alipour. B. S, Hosseinkhani. S, Nikkhah. M, and Naderi-Manesh. H, Kazempour Osaloo. S, Molecular cloning, sequence analysis,and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, Lampyris turkestanicus. BBRC, 2004. 325: p. 215-222.

3- Arai R., Nakagawa H., Kitayama A., Ueda H., Nagamune T., , Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. J. Biosci. Bioeng., 2002. 94: p. 362-364.

4- Auld. D.S., Lovell S., Thorne N., Lea W. A., Maloney D. J., Shen M., Rai G., Battaile K. P., Thomas C. J. , Simeonov A., Hanzlik R.P., and Inglese J., Molecular basis for the high-affinity binding and stabilization of firefly luciferase by PTC124. PNAS, 2010. 107, No. 11: p. 4878-4883.

5- Branchini B. R., Ablamsky D. M., Davis A. L., Southworth T. L., Butler B., Fan. F., Jathoul. A. P., Pule. M. A., Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. Anal. Biochem., 2010. 396: p. 290-297.

6- Campbell A.K., Sala-Newby G.B, Bioluminescent and chemiluminescent indicators for molecular signaling and function in living cells. In:W.T.Mason (Ed.), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, 1993. Academic Press(London): p. 58-82.

7- Chandrana. S.S., Williamsb. S. A. and Denmeade. S. R, Extended-release PEG-luciferin allows for long-term imaging of firefly luciferase activity in vivo. Luminescence, 2009. 24: p. 35-38.

8- Contag. C.H, Bachmann. M.H, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression,. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2002. 4: p. 235-260.

9- Conti. E., Lloyd. L. F, Akins. J, Franks N. P, and Brick P, Crystallization and preliminary diffraction studies of firefly luciferase from Photinus pyralis. Biological Crystallography D52, 1996. Volume 52(Part 4 (July 1996)): p. 876-878.

10- Diederichs. K. and Karplus. P. A., Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. Nature Structral Biology, 1997. 4: p. 269-275.

11- Frank. F, Aileen. P, Denise. G, and Keith. V, Using luciferase assays to study G-protein coupled receptor pathways and screen for GPCR modulators. progmega corporation.

12- Garman Elspeth. E. And Mitchell Edward. P., Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein

Archive of SID
www.SID.ir

crystallization solutions. J Appl. Cryst., 1996. 29: p. 584-587

13- Gesthardt. M, and Day. J.C, Lampyroidea maculata (Coeoptera: lampyridae): A new species of lampyrid from iran. Zootaxa, 2004. 427: p. 1-6.

14- Gould. S.J, Subramani. S, Firefly luciferaseas a tool in molecular and cell biology. Anal. Biochem., 1988. 175: p. 5-13.

15- Greer Lee. F. and Szalay. Aladar A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. Luminescence, 2002. 17: p. 43-74.

16- Gu. M, Mitchell. R, Kim. B, Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2004. 87: p. 269-305.

17- Hakkila. K, Maksimow. M, Karp. M, Virta. M, Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors,. Anal. Biochem., 2002. 301: p. 235-242.

18- Hardy. J, Edinger. M, Bachmann. M.H., Negrin. R.S, Fathman. C.G, Contag. C.H, Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. Exp. Hematol., 2001. 29: p. 1353-1360.

19- Hastings J.W., Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. J. Mol. Evol., (1983). 19: p. 309-321.

20- Heinemann. U, Bussow. K, Muller. U, And Umbach. P, Facilities and Methods for the High-Throughput Crystal Structural Analysis of Human Proteins. Acc. Chem. Res., 2003. 36: p. 157-163.

21- Hirano. T, Hasumi. Y, Ohtsuka. K, Maki. S, Niwa. H, Yamaji. M, and Hashizume. D, Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. JACS, 2009. 131: p. 2385-2396.

22- Hutchens. Martha and Luker. Gary. D, Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. Cellular Microbiology, 2007. 9(10): p. 2315-2322.

23- Kricka. L.J, Strategies for immunoassay. Pure & Appl. Chem., 1996. 68, No. 10: p. 1825-1830.

24- Leclerc. G.M, Boockfor. F.R, Faught. W.J, Frawley. L.S, Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. Bio Techniques, 2000. 29: p. 590-598.

25- Mehrabi. M, Hosseinkhani. S, Ghobadi. S, Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. 43: p. 187-191.

26- Nakatsu .T, Ichiyama. S, Hiratake .J, Saldanha .A, Kobashi .N, Sakata .K & Kato .H, Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. Nature, 2006. 440: p. 372-376.

27- Paddison. P.J, Caudy. A.A, Hannon. G.J, Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. 99: p. 1443-1448.

28- Prinz A., M. Diskar, F.W. Herberg, , Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. Chem Bio Chem 2006. 7: p. 1007-1012.

29- Rehemtulla. A, Stegman. L.D, Cardozo. S.J, Gupta. S, Hall. D.E, Contag. C.H, Ross. B.D, Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. Neoplasia, 2000. 2: p. 491-495.

30- Roda. A, Pasini. P, Mirasoli. M, Michelini. E, Guardigli. M, Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol., 2004. 22: p. 295-303.

31- Ronaghi, Karamohamed, Pettersson, Uhlen and Nyren., Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Anal Biochem. , 1996. 242: p. 84-89.

32- Squirrel D.J., Price R.L., Murphy M.J., Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. Anal. Chim. Acta, 2002. 457: p. 109-114.

33- Terry, R., progmega corporation. Selecting cell-based assays for drug discovery screening. CELL NOTES 2005. 13: p.16-21.

34- Toegel. F, Yang. Y, Zhang. P, Hu. Z, Westenfelder. C, Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2008. 295: p. F315-F321.

Archive of SID
www.SID.ir

35- Urata M., Iwata R., Noda K., Murakami Y., Kuroda A., Detection of living Salmonella cells using bioluminescence. Biotechnol. Lett. , 2009. 31: p. 737-741.

36- Urban. A, Eckermann. S, Fast. B, Metzger. S, Gehling. M, Ziegelbauer. K, Rubsamen-Waigmann. H, Freiberg. C, Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery. Appl. Environ. Microbiol., 2007. 73: p. 6436-6443.

37- Viviani. V.R., Okawachi. F.M., Scorsatoa. V. and Abdallaa. F.C. CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: cluesonthe anatomicoriginand evolution of bioluminescence. Photochem. Photobiol. Sci., 2008. 7: p. 448-452.

38- Viviani V. R.,. Bechara E.J. H. Bioluminescence of Brazilian Fireflies (Coleoptra: Lampyridae): Spectral DistributionI and pH Effect on Luciferase-Elicited Colors. Comparision With Elaterid and Phengodid Luciferases. Photochemistry and Photobiology, 2008. 62(3): p. 490 - 495.

39- Wilson Therese and Hastings J.Woodland, Bioluminescence., 1998. 14: p. 197-230.

40- Xia Z.Y., Rao J.H., Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. Curr. Opin. Biotechnol., 2009. 20: p. 37-44.

41- Yamakawa. Y, Veda. H, Kitayama. A, Nagamune. T, , Rapid homogeneous mmunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase. J. Biosci. Bioeng. , 2002. 93: p. 537-542.

42- Yu. Y.A, Timiryasova. T, Zhang. Q, Beltz. R, Szalay. A.A, Optical imaging: bacteria, viruses, and mammalian cells encoding light-emitting proteins reveal the locations of primary tumors and metastases in animals. Anal. Bioanal. Chem., 2003. 377: p. 964-972.

Crystallization and preliminary diffraction studies of mutated firefly luciferase from *Lampyris turkestanicus*

Kheirabadi M.[1], Gohlke U.[3], Hosseinkhani S.[2], Heinemann U.[3] and Naderi-Manesh H.[2]

[1]Faculty of Basic Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of IRAN

[2] Biophysics Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

[3]MDC Max-Delbrück-Centrum, Postfach 74 02 38, 13092 Berlin, Germany

Abstract

Luciferase enzymes efficiently convert luciferin to oxyluciferin in the presence of ATP, Mg^{2+} and molecular oxygen. Luciferase reaction produces a spectrum with different color under various conditions. One of the most important factors is residues of structure. *Lampyris turkestanicus*, Iranian firefly, luciferase emits green light. In order to study, 3D-structure determination and red-shift mechanism analysis in comparison to other determined structure luciferase, Mutated (E354R/R356/H432Y) (emits red light) luciferase from *Lampyris turkestanicus* has been crystallized. The crystals with 2.2Å resolution of mutated firefly luciferase were obtained by the sitting drop method. The diffraction pattern from E354R/356R/H432Y luciferase belongs tetragonal system with space group $P4_1$ and unit cell dimensions a=b=85.01 and c=97.09.

Keywords: mutated (E354R/R356/H432Y) luciferase, X-ray crystallography, *Lampyris turkestanicus*

Archive of SID

www.SID.ir