

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 هایمنن^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 سوبسترای به نام لوسیفیرین همراه با ATP و Mg^{2+} و اکسیژن مولکولی برای انتشار نورهایی با رنگهای متنوع استفاده می‌نمایند. بسته به فاکتورهای متفاوت - که یکی از مهم‌ترین آنها اسیدآمین‌های 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 تراگونالی با حد تفکیک ۲/۲ آنگستروم به دست آمد. تک واحدهای کریستال دارای ابعاد $a=85.01$ $b=85.01$ $c=97.09$ است.

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

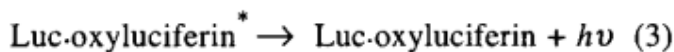
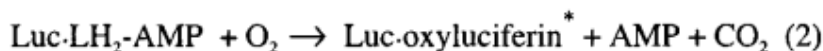
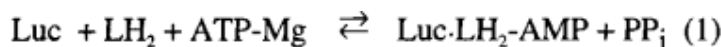
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۴۵۸، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

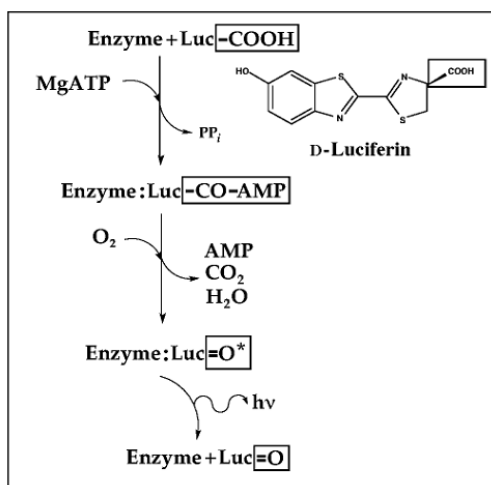
نور می‌باشد و همچنین بسته به گونه منتشر کننده نور، نورهایی با رنگهای متفاوت و متنوع از موجودات منتشر کننده ساطع می‌شود (۳۸). این خانواده پروتئینی لوسیفراز نامیده می‌شود. لوسیفرازها آنزیمهایی هستند که برای انتشار نور از سوبسترای به نام لوسیفیرین همراه با ATP و Mg^{2+} و اکسیژن مولکولی برای نشر نورهایی با رنگهای متنوع استفاده می‌کنند (شکل-۱).

آنزیم لوسیفراز، دو مرحله آنزیمی آدنیلایسیون D- لوسیفیرین و اکسیژناسیون لوسیفیریل - آدنیلات (Luciferyl-adenylate) را کاتالیز می‌کند (۳۴).

موجودات بیولومینسانت در سرتاسر محیطهای خشکی و آبی پراکنده‌اند و شامل باکتریها، حشرات، کیسه‌تان، 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 تکرار را به وحدت تبدیل می‌کند، وجود یک خانواده پروتئینی مشابه در تمامی آنهاست که مسئول انتشار



نکته قابل توجه اینکه، اغلب سنجش‌های بیان ژن نیازمند دو گزارش‌گر لوسیفرازی با دو رنگ متفاوت متشکرکننده با یک سوسترای 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 *Lamproidea maculata* و *Lampyris turkestanicus* مشاهده و گزارش شده است. گونه *Lampyris*

۱- لوسیفراز با آدنیلایسیون گروه کربوکسیل لوسیفیرین در حضور Mg^{2+} ATP باعث فعال شدن این سوسترای می‌شود.

۲- لوسیفراز همانند یک اکسیژناز (Oxygenase) عمل کرده و با اثر بر روی لوسیفیریل-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 (Photomultiplier 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 trafficking) (۸) ترشح پروتئین در جایگاههای ویژه، (Protein site-specific secretion) (۱۵) آنالیز بیماریهای عفونی، (۲۲) تعیین توالی DNA با استفاده از لوسیفراز حشره 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).

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 غلظت ۵۰ میلی گرم در هر میلی‌لیتر بود- به انجام رسید. به این منظور ابتدا باکتری برای مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰ "r.p.m" انکوبه شد و سپس بیان پروتئین با افزایش IPTG ۱ mM 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 اسیدپته ۷/۸) و مقدار PMSF ۱ mM 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، به دست 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 ۱۰ میلی مولار هپس، ۱۰ درصد گلیسرول، ۳۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۰ mM ایمیدازول در اسیدپته 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

turkestanicus 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 اسید آمینه‌های تشکیل دهنده لوسیفراز است- از لوسیفرازها نورهایی با طیف رنگی متفاوت منتشر می‌شود. حشره شب‌تاب گونه ایرانی با نام علمی *Lampyris turkestanicus* حاوی لوسیفراز 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 لوسیفیرین وابسته است.

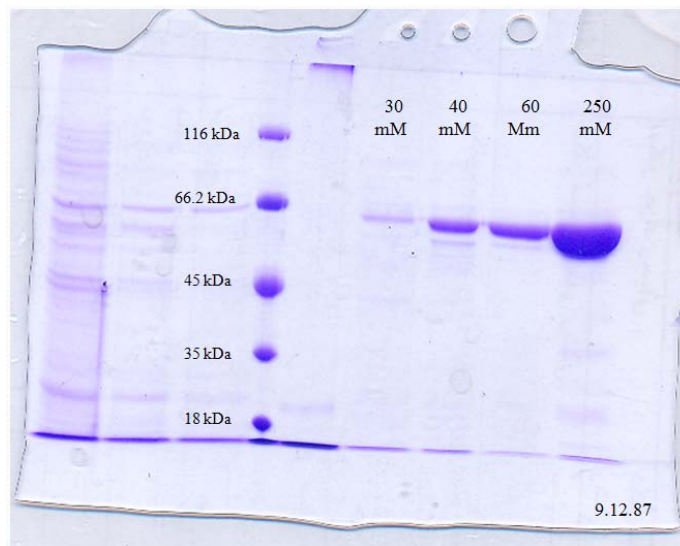
این دو فاکتور عبارتند از:

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

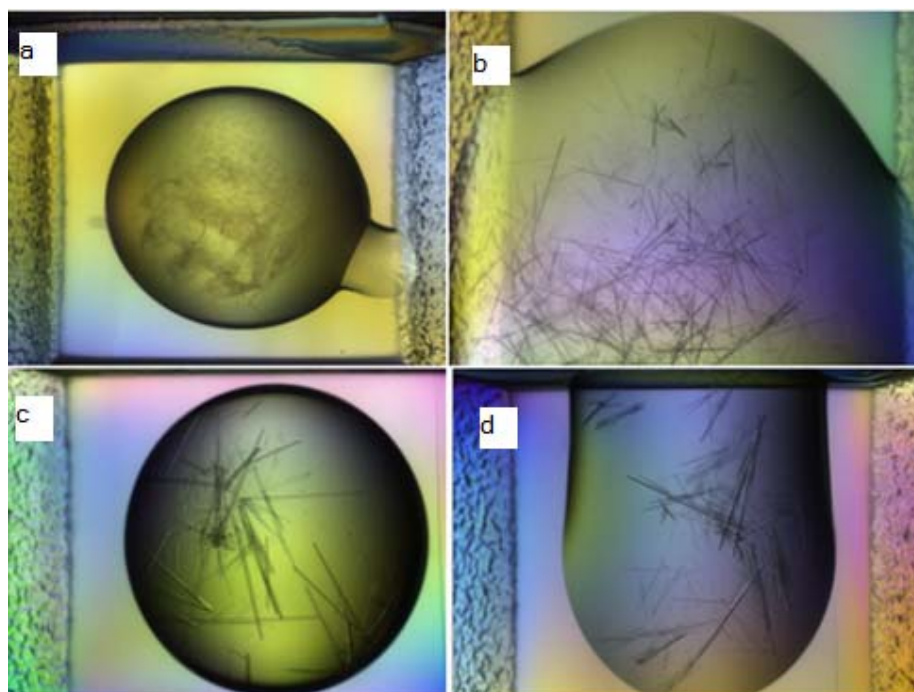
به منظور بررسی مکانیسم تغییر رنگ نور- که هنوز هم به صورت معمائی باقی مانده است- حاصل از لوسیفراز جهش یافته با سایر لوسیفرازهای تعیین ساختار شده در مراحل بعدی کار، ساختار سه بعدی لوسیفراز با آنالیز پراش حاصل از کریستال تعیین گردید. (تلاشهای اولیه برای تهیه کریستال لوسیفراز گونه طبیعی در شرایط یکسان با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

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).

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 میلی لیتر برای خالص سازی پروتئین



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



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

جدول ۱- بافرهای متفاوت امتحان شده به منظور تست میزان حلالیت و پایداری پروتئین

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

ایمیدازول حاصل از تخلیص، با استفاده از کیسه دیالیز شرکت سیگما در اتاق سرد و با غلظت پروتئینی حدود ۲ mg/ml به مدت ۱۲ 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" به دست آمد. خوشه‌ای از کریستال‌های سوزنی در شرایط متفاوتی رشد کردند (شکل ۳-۴)، اما ضخیم‌ترین و طویل‌ترین کریستالها بعد از حدود یک هفته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، در ۵۰۰ نانولیتربافر، حاوی ۴ mg/ml لوسیفراز، ۱۰ mM

۱۰ میکرولیتر محلول حاوی پروتئین را -که شامل بافر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر هپس ۱۰ mM همراه با ۱۵۰-۱۰۰ mM نمک کلرید سدیم و ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ درصد سوکروز در اسیدپت‌های متفاوت ۷/۸ و ۶/۸ و ۷ و ۱۰ میکرولیتر بود- را با محلول کمپلکس حاوی ۵ میلی مولار لوسیفراز، نمک کلرید منیزیم با غلظت ۵ mM و ATP با غلظت ۲ mM در بافر تریس با اسیدپت 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 خاموش‌سازی" لوسیفراز گونه ایرانی ۳۸ بود.

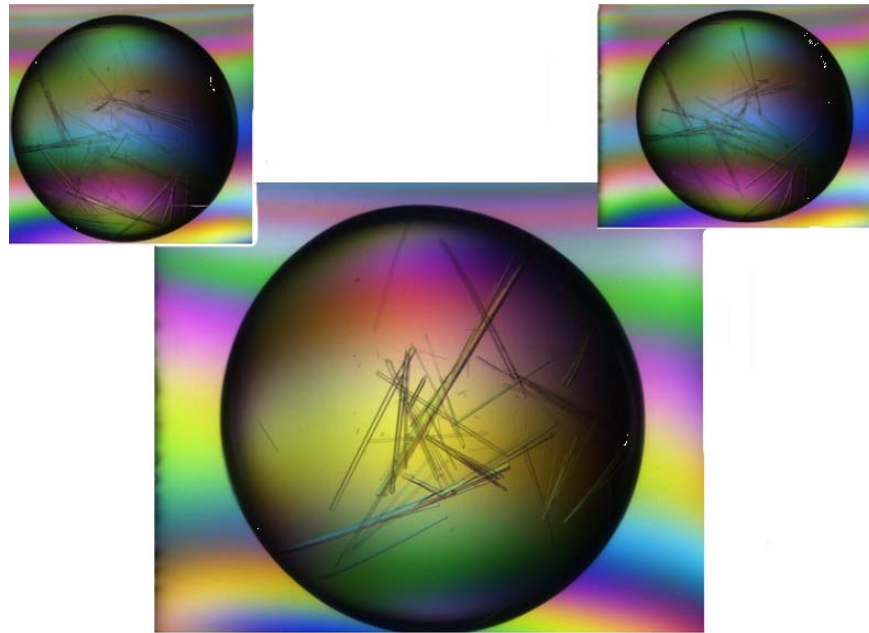
کریستالوگرافی اشعه X پروتئین: دیالیز و نگهداری پروتئین: دیالیز محلول پروتئینی حاوی ۲۵۰ mM

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 گلیکول ۸۰۰۰ با درصدهای متفاوت اتیلن گلیکول ۲۰ و ۲۵ درصد و گلیسرول ۲۵ درصد

سدیم-هیپس، ۱ mM EDTA، ۱۰ درصد (V/V) گلیسرول، ۱ در سوکروز، ۱۰۰ mM نمک کلرید سدیم و ۵ mM DTT در اسیدیته ۷ با ۵۰۰ نانولیتتر محلول رسوب دهنده، حاوی ۴ درصد PEG8000 (w/v)، ۱۴ درصد اتیلن گلیکول، ۱۰۰ mM سدیم-هیپس 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



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

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

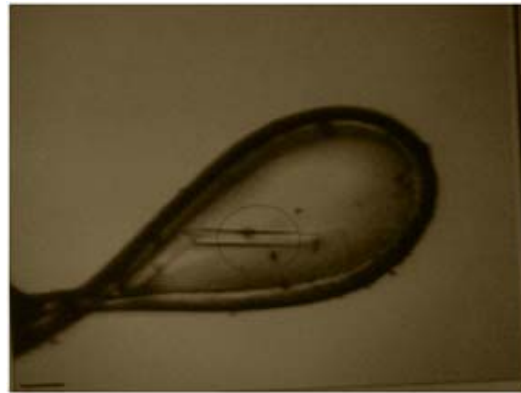
که در نهایت بعد از بررسی کیفیت آنها به لحاظ کمترین نویز آب در صفحه پراش ۲۵ درصد اتیلن گلیکول در ۱۶ درصد پلی اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ به عنوان محلول محافظ در برابر سرما انتخاب گردید.

منبع اشعه X مورد استفاده در تهیه عکس کریستال و ثبت انکسارات حاصل از اشعه X: سینکروترون BESSY

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.

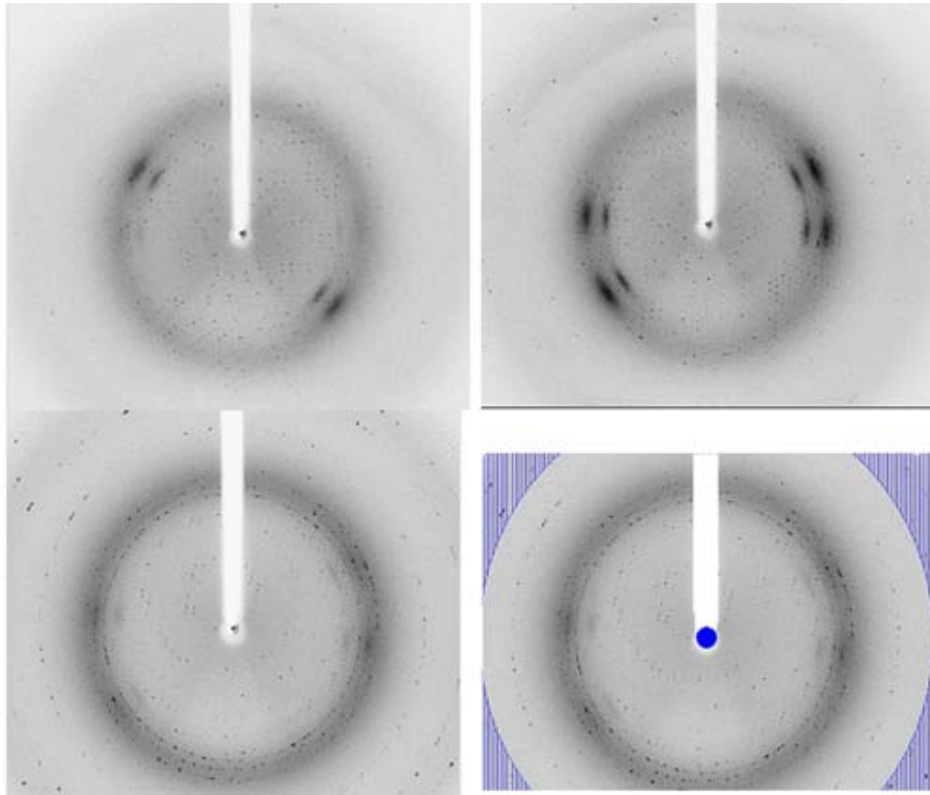
بعد از تهیه عکس کریستال با استفاده از اشعه X (شکل ۶)، اطلاعات حاصل از پراش بایستی تجزیه و تحلیل شده و تقارن کریستال محاسبه گردد. نرم افزار XDS برای محاسبه تقارن و گروه فضایی کریستال مورد استفاده واقع شد. اطلاعات حاصل از محاسبات صورت گرفته توسط این نرم‌افزار در مراحل بعدی تعیین ساختار، توسط نرم افزار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

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



شکل ۵ - کریستال به دام 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 به دست آورد که از جمله می‌توان به موزاسیتی (Mosacity) (۱۰) کریستال اشاره کرد. این



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).

جدول ۲ - پارامترهای کریستالوگرافی	
17.329Å	فاکتور B (B-factor)
0.175	موزاسیتی (Mosacity)
P ₄ 1	گروه فضایی (Space Group)
99.9	تمامیت ساختار (Completnece)
Multiplicity	5.1
Tetragonal	تقارن (Symmetry)
Rob	11.6(55.2)
R-factor	0.1762
R-free	0.2266
2.2Å	حد تفکیک (Resolution)
85.01 85.01 97.09	ابعاد تک واحد کریستال (Cell dimensions)
90 90 90	زوایای تک واحد کریستال (Cell angles)

نتایج

پایدار کننده را بر عهده دارد. گزارشات قبلی روی لوسیفراز پایدار کننده *Lampyrus turkestanicus* نشان داد که سوکروز نقش پایدار کننده بر روی 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 حاوی ۴ درصد (w/v) PEG8000، ۱۴ درصد اتیلن گلیکول، ۱۰۰ mM سدیم-هیپس در اسیدیته ۷/۵- با محلول محافظ که حاوی ۱۶ درصد PEG8000 و ۲۵ درصد اتیلن گلیکول 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 (شکل ۴-۳) و بهترین اطلاعات در شرایط ذکر شده در بالا به دست آمد. لازم به ذکر است که از میان ۲ دمای تست شده جهت

بافری که پروتئین در آن بالاترین پایداری را با حفظ فعالیت داشت، بافر شماره ۸ در جدول-۱ -۱۰ mM سدیم-هیپس، 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

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 به دست 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 متقارن 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 هم‌ارز 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 و رشد آنها بسیار کم می‌باشد. 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 در نتیجه 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* می‌باشد.

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 2D1S (PDB code: DLSA) و لوسیفراز گونه

فاکتور کمی 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.

آمریکایی P.pyralis در حالت بدون لیگاند (PDB code: 1LCI و همراه با مهارکننده‌های PTC124-AMP (PDB code: 3IER) 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 *Lampyrus 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 چپش صحیح و منظم تک واحدها کنار یکدیگر در کریستال است.

منابع

- 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.
- 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, *Lampyrus turkestanicus*. *BBRC*, 2004. 325: p. 215-222.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Contag. C.H, Bachmann. M.H, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression,. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002. 4: p. 235-260.
- 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.
- Diederichs. K. and Karplus. P. A., Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nature Structural Biology*, 1997. 4: p. 269-275.
- Frank. F, Aileen. P, Denise. G, and Keith. V, Using luciferase assays to study G-protein coupled receptor pathways and screen for GPCR modulators. progmea corporation.
- Garman Elspeth. E. And Mitchell Edward. P., Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein

- 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 luciferase as 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., progmege 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.

- 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: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008. 7: p. 448-452.
- 38- Viviani V. R., Bechara E.J. H. Bioluminescence of Brazilian Fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Spectral Distribution and pH Effect on Luciferase-Elicited Colors. Comparison 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 immunoassay 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

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

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

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

Abstract

Luciferase enzymes efficiently convert luciferin to oxyluciferin in the presence of ATP, Mg²⁺ 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 P4₁ and unit cell dimensions a=b=85.01 and c=97.09.

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