

حسگرهای محرک پروتئین های فلورئوسنت سبز پاسخ مبتنی بر ساختار FRET

۱- شهلا عالیپور

۱- کارشناس ارشد بیوفیزیک دانشگاه پیام نور تفت

Email: golsacmsec@gmail.com

چکیده

پروتئین های فلورئوسنت سبز، محققان را قادر به رنگ آمیزی طیف وسیعی از مولکول های زیستی کرده است. گرچه تاکنون تعدادی از تکنیک های کمی و تصویری گسترش یافته اند، کشف پروتئین های فلورئوسنت سبز (GFP)، انقلابی در زمینه متابولومیک ایجاد کرده است. حسگرهای کدگذاری شده ژنتیکی مبتنی بر انتقال انرژی رزونانسی فلورئوسنس، فناوری ای با افق های امید بخش است، که مانیتورینگ لحظه ای واکنش های سلولی در سلولهای زنده را انجام میدهد. این پژوهش، ساختار و عملکرد پروتئین فلورئوسنت سبز، مکانیسم انتشار و کاربرد آنان را در گسترش حسگرهای مبتنی بر FRET برای متابولیت ها مرور میکند.

کلمات کلیدی: FRET؛ پروتئین های فلورئوسنت سبز؛ متابولیت؛ حسگرهای محرک

۱. مقدمه

پروتئین فلورسنت سبز (GFP) پروتئینی است که به طور طبیعی در چتر دریایی *Aequorea victoria* رخ می دهد. پروتئین خالص در معرض روشنائی معمولی به نظر می رسد زرد است، اما در زیر نور خورشید یا نور ماوراء بنفش سبز روشن است. پروتئین نور آبی و نور ماوراء بنفش را جذب کرد و آن را به عنوان یک نور سبز نور پایین از طریق فلورسانس منتشر کرد. پروتئین به عنوان مارکر در زیست شناسی مولکولی و سلولی مورد استفاده قرار می گیرد. وقتی که آن را به کد ژنتیکی سلول ها و ارگانیسم ها معرفی می شود، آن قابل انتقال است. این پروتئین نه تنها برای علم مفید است، بلکه برای علاقه داشتن به ارگانیسم های تراریخته مانند ماهی های حیوانات خانگی نیز مفید است. این پژوهش، ساختار و عملکرد پروتئین فلورسنت سبز، مکانیسم انتشار و کاربرد آنان را در گسترش حسگرهای مبتنی بر FRET برای متابولیت ها مرور میکند.

پروتئین های فلورسنت بنا بر ویژگی های زیر به صورت گسترده ای در مطالعات تصویرسازی به کار رفته است:

۱) سلول های زنده را سمی نمیکنند و بنابراین، به صورت تاثیر گذاری نشاندار شده اند.

۲) زمانیکه پروتئین های فلورسنت نشان دار شدند، الیگومر نشدند.

۳) آنان برای مدت زمان زیادی در پارامترهای فیزیولوژی، پایدار نوری بودند.

این پژوهش، ساختار و عملکرد پروتئین فلورسنت سبز، مکانیسم انتشار و کاربرد آنان را در گسترش حسگرهای مبتنی بر FRET برای متابولیت ها مورد بررسی قرار داد.

۲. پیشینه پژوهش

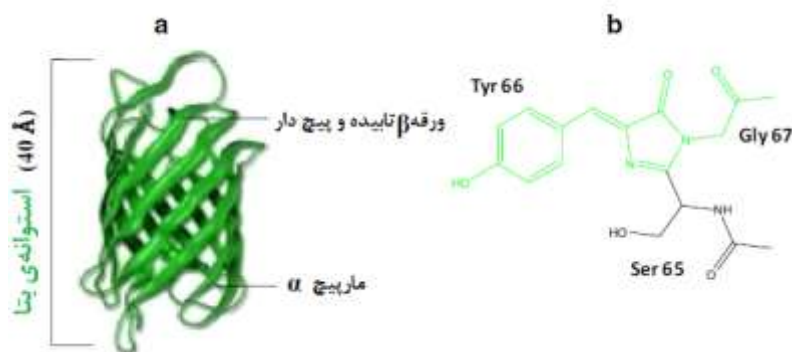
قاسمی و همکاران (۱۳۸۹)، به بررسی جای گیری درون هسته ای پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده متصل به $\text{PPAR}\gamma^1$ موشی در سلول های فیبروبلاست گاوی پرداختند. RNA تام سلولی از بافت چربی موش بالغ تخلیص و پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کل قطعه $\text{PPAR}\gamma^1$ ANDc تکثیر شد. محصول RCP و وکتور C-PFGpp با آنزیم های مناسب هضم شده و قطعه $\text{PPAR}\gamma^1$ cDNA پایین دست EGFP cDNA درون وکتور قرار گرفت. سلول های مستعد باکتریایی با مخلوط Ligation ترانسفورم شدند و از بین کلونی های به دست آمده کلونی های مثبت حاوی وکتور نو ترکیب انتخاب و از آنها پلاسمید تخلیص شد. پلاسمید خالص شده ترادف یابی گردید تا از صحت ورود $\text{PPAR}\gamma^1$ cDNA به وکتور مطمئن شوند.

سرانجام برای تایید محل قرارگیری درون سلولی EGFP-PPAR α ، سلولهای فیبروبلاست گاوی با پلاسمید نوترکیب ترانسفکت شدند. مطابق با انتظار بررسیهای هضم آنزیمی و تعیین توالی ثابت شد که EGFP-PPAR α cDNA به طور کامل صحیح تکثیر و کلون شده است. این ژن شامل ۱۴۲۸ جفت باز است و ترانسفکت cDNA آن به درون سلول منجر به تولید پروتئینی شده که به هسته سلولهای فیبروبلاست گاوی وارد گردیده EGFP-PPAR α cDNA به درستی کلون شده و پس از ترانسفکت به هسته سلولهای فیبروبلاست گاوی هدایت شده است. [۲]

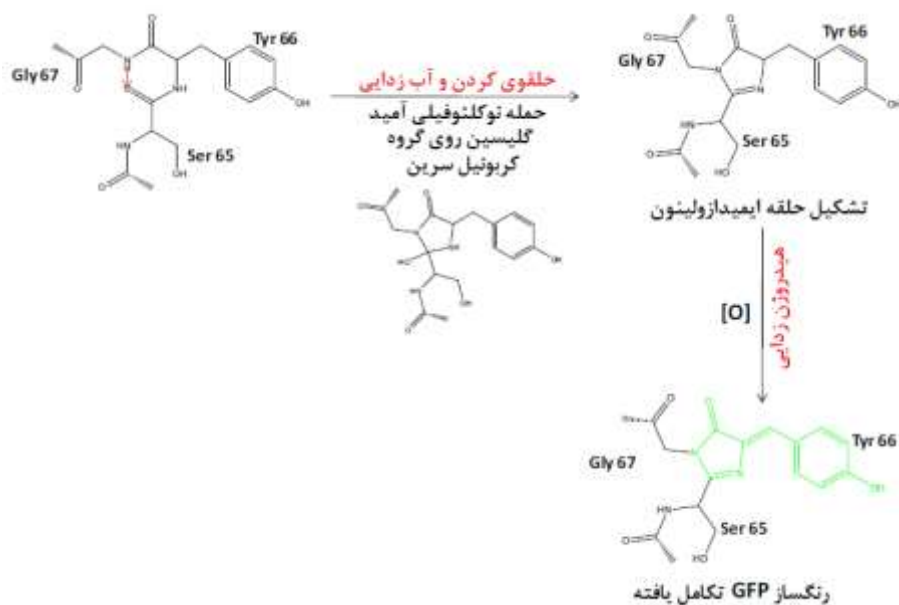
استاد شریف و همکاران (۱۳۸۸)، به بررسی جهت گیری سیتوزولی پراکسیزومال پروتئین موشی فاقد تری پپتید SKI متصل به پروتئین سبز فلورسنت در سلولهای CHO-K 1 و P 19 پرداختند. به منظور ایجاد سازه جهش یافته مورد نظر PCR با استفاده از پرایمرهای مناسب صورت گرفت. موتانت حاصل در فرودست ژن EGFP تحت کنترل پروموتور CMV قرار داشت. پس از تعیین توالی باکمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون سلولهای-CHO K 1 و P 19 ترانس فکت گردید. گرادیان دمایی PCR نشان داد که بهترین دمای اتصال، ۷۱/۶ درجه است. ترانس فکت نمودن EGFP-PeP الگوی سبز رنگ نقطه دار دارد، در حالی که سازه EGFP-PeP/DSKI پس از ترانس فکت نمودن الگوی یکنواخت سبز رنگ دارد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شده که SKI در انتهای کربوکسیل پروتئین برای ورود به پراکسیزوم لازم و ضروری است. [۱]

۳. پروتئین فلورسنت سبز به عنوان پروتئین رنگ

دهه آخر قرن بیستم، نشانگر آغاز انقلابی در زیست شناسی سلولی شد. در سال ۱۹۹۹، به کمک جهش زایی، پیشرفت های گوناگونی برای تغییر رنگ گونه ها از آبی به زرد صورت گرفت. لازم به ذکر است، برای انتشار فلورسنت سبز در راستای اثبات خاصیت اتوفلورسنت پروتئین فلورسنت سبز، نیازی به مولفه های اضافی دیگر به جزء اکسیژن نبود. که در شکل ۱ و ۲ قابل مشاهده است.



شکل ۱- موقعیت رنگساز در مارپیچ α موجود در استوانه بتای پروتئین فلئورسنت سبز. (b) رنگساز wt پروتئین فلئورسنت سبز متشکل از تری پپتید حلقوی ساخته شده از Ser⁶⁵، Tyr⁶⁶ و Gly⁶⁷.



شکل ۲- برهمکنش های متوالی که منجر به تشکیل یک رنگساز تکامل یافته شد.

۴. ویژگی‌های حسگرهای زیستی عناصر بیولوژیکی

همانطور که ذکر گردید حسگرهای زیستی سیستمهای اندازه گیری بسیار دقیق، حساس و اختصاصی هستند و وجود بیورسپتورهای خاص علت ویژگیهای منحصر به فرد این سیستمهای اندازه گیری هست. در حقیقت اساس شناسایی و سنجش ترکیبات در این سیستمها، اتصال ویژه آنالیت مورد اندازه گیری به حسگر توسط بیورسپتورها هست. اهمیت این اجزا در عملکرد بسیار اختصاصی آنها نسبت به آنالیت خاصی بود که بدین وسیله از مداخله مواد مزاحم که موجب عدم کارایی بسیاری از روشهای اندازه گیری شده، جلوگیری می کرد. جزء بیولوژیکی ممکن بود واکنش سوبسترا را کاتالیز کند(آنزیم) یا به طور انتخابی به سوبسترا متصل شود. آنزیمها یکی از متداولترین عناصر بیولوژیکی هستند که در این سیستمها مورد استفاده قرار گرفته اند. عناصر بیولوژیکی عامل اصلی گزینش در زیست حسگر محسوب شده اند که عمدتاً در سه گروه تقسیم بندی شده اند که به شرح زیر هستند:

پادتن

آنزیم

اسید نوکلئیک

۵. نوع وحشی GFP

در دهه ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰، GFP، همراه با پروتئین لومینسانس جداگانه اکورین (آنزیمی که تجزیه لوسیفیرین را تسهیل کرد و باعث آزاد شدن نور شد)، ابتدا از چتر دریایی *Aquorea victoria* و خواص آن توسط Osamu Shimomura بررسی شد [۸]. در *A. victoria*، فلورسانس GFP هنگامی رخ داد که اکورورین با یون های Ca^{2+} برهم کنش داشته و باعث درخشش آبی شود. مقداری از این انرژی درخشان به GFP منتقل شده و رنگ کلی را به سمت سبز تغییر داده است. [۵] با این حال، کاربرد آن به عنوان ابزاری برای زیست شناسان مولکولی محقق نشد تا اینکه در سال ۱۹۹۲ که داگلاس پرشر (Clouding) و توالی نوکلئوتیدی wtGFP در ژن را گزارش کرد. [۷] بودجه این پروژه تمام شده بود، بنابراین Prasher نمونه های cDNA را به چندین آزمایشگاه ارسال کرد. آزمایشگاه مارتین چالفیه بیان برنامه نویسی توالی از wtGFP، با چند اسید آمینه حذف شده، در سلولهای هترولوگ از باکتری *E. coli* و الگانس، انتشار نتایج در علوم در سال ۱۹۹۴ آزمایشگاه فردریک تسوجی بیان پروتئین فلورسنت سبز نو ترکیب را به طور مستقل یک ماه بعد گزارش داد. [۴] نکته قابل توجه اینکه، مولکول GFP بدون نیاز به کوفاکتورهای برون زای مخصوص شیرهای دریایی، در دمای اتاق فولد (خمش مخصوص رشته اسیدهای آمینه که ساختار دوم و سوم پروتئین را میساخت) و فلورسنت بود. اگرچه این پروتئین بسیار شبیه wtGFP فلورسنت بود، اما دارای اشکالات مختلفی

بود، از جمله طیف تحریک دوگانه اوج، حساسیت به pH، حساسیت به کلراید، عملکرد کوانتومی فلورسانس ضعیف، قابلیت پایداری نوری و تا شدن ضعیف در ۳۷ درجه سانتیگراد.

اولین ساختار کریستالی گزارش شده از GFP، جهش S^{۶۵}T توسط گروه رمینگتون در ساینس در سال ۱۹۹۶ منتشر شد. [۶] یک ماه بعد، گروه فیلیپس به طور مستقل ساختار GFP نوع وحشی را در بیوتکنولوژی طبیعت گزارش کردند. (یانگ و همکاران، ۱۹۹۶). این ساختارهای کریستالی زمینه حیاتی تشکیل کروموفور و فعل و انفعالات باقی مانده همسایه را فراهم کردند. محققان این جهش‌ها را با جهش زایی کارگردانی و تصادفی اصلاح کردند تا طیف گسترده‌ای از مشتقات GFP را که امروزه استفاده می‌شود، تولید کنند. تحقیقات بیشتر در مورد GFP نشان داده است که در برابر شوینده‌ها، پروتئازها، تیمارهای کلرید گوانیدینیم (GdmCl) و تغییرات شدید دما مقاوم است. [۳]

۶. روش اجرا

پروتئین فلئورسنت سبز به عنوان یک رنگساز از طریق جزئیات پراش نشان داده شده است.

مکانیسم فلئورسنس از طریق مدل ایزومراسیون نوری نشان داده شده است.

الگوی گوله و میله پروتئین فلئورسنت سبز نمایش داده شده است.

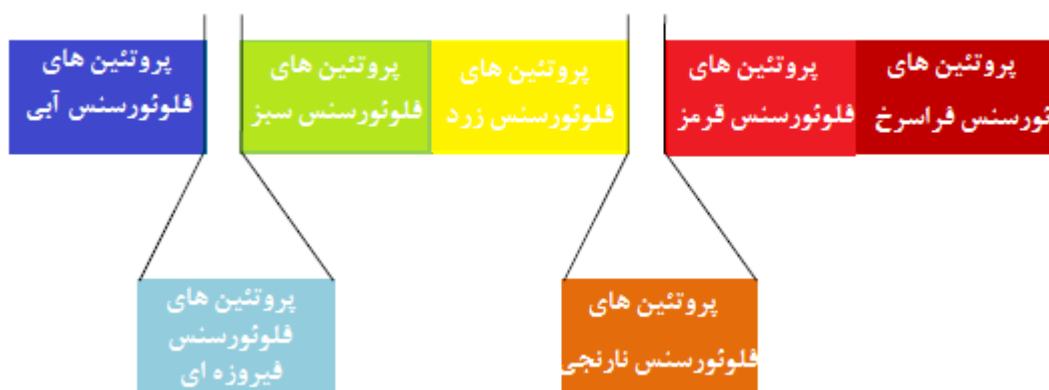
تحریک فلئورسنس (آبی) و طیف نشری پروتئین فلئورسنت سبز (سبز) عروس دریایی انجام گرفته شده است.

دو پیک منتشر شده‌ی حاصل از تحریک رنگساز در طول موج‌های ۳۹۵ nm و ۴۷۵ nm بررسی شده است.

۷. روش‌های آماری

تصویربرداری رنگین و بررسی‌های موضعی ECFP و EBFP مکانیسم هایلاپترهای نوری (a). فعالسازی نوری (b) تبدیل نوری (c) سوئیچ نوری

دو پیک منتشر شده‌ی حاصل از تحریک رنگساز در طول موج‌های ۳۹۵ nm و ۴۷۵ nm بسیار مشابه میباشند، چرا که در حالت برانگیخته، اکسیژن فنولی Tyr^{۶۶} نسبتا اسیدی تر از حالت پایه بود (شکل ۳). انتشار فلوئورسنس از رنگساز آنیونی، به واسطه سقوط یک الکترون از حالت برانگیخته به حالت پایه بود. پروتون دار کردن رنگساز منجر به خاموشی فلوئورسنس شد. زمانیکه رنگساز پروتئین فلوئورسنت سبز با دیگر ترکیبات مدل مقایسه شد، انتشار حالت برانگیخته‌ی رنگساز پروتون دار شده بیشتر از اینکه در ناحیه آبی دیده شود، در ناحیه سبز دیده شد. طیف نگاری بالا تبدیل، فلوئورسنس فراسریع را نشان میدهد. زمانیکه نور ۳۹۷ nm به منظور تحریک به کار رفته است، طبق انتظار، نور آبی در طول موج ۴۶۰ nm منتشر شده است، اما انتشار نور آبی، با ثابت‌های زمانی دو فازی از بین رفته است. زوال نور آبی، موجب افزایش انتشار نور سبز در طول موج ۵۱۰ nm شده است.



شکل ۳- مشتقات پروتئین فلوئورسنت سبز، تمام طیف الکترومغناطیسی را پوشش داده است.

نقش پروتئین فلئوئورسنت سبز در FRET: از مهمترین کاربردهای پروتئین‌های پروتئین فلئوئورسنت سبز ساخت حسگرهای فلئوئورسانت کد گذاری شده ژنتیکی، برای آنالیت‌های مختلف و بررسی فعالیت‌های پروتئین است. این پروتئین‌ها ابزاری برای پایش فعالیت‌های زیستی از طریق کاربرد نشر، در زمان و مکان است. چنین پروتئین‌هایی برای کنترل نوری پروسه‌های سلولی درون جانوری و برون جانوری به کار گرفته شدند. رنگ‌های فلئوئورسنت کدگذاری شده ژنتیکی نظیر پروتئین فلئوئورسنت سبز و دیگر مولکول‌های مرتبط آبی، فیروزه‌ای، زرد و قرمز، امکان انجام FRET برون تنی و به خصوص در سلول‌های زنده را فراهم کرده است.

۸. نتیجه گیری

کاربرد اخیر پروتئین فلئوئورسنت‌ها محرکی را در زمینه مطالعه زیست شناسی سلولی ایجاد کرده بود. تلاش‌ها برای شیفیت پالت رنگ به ناحیه قرمز در حال استفاده بود، تا به این ترتیب، بررسی و مشاهده رویدادهای زیست شیمی و مولکولی مختلف در سلول‌های زنده ارتقا یافت. محققان در تلاش برای رسیدن به ناحیه فراسرخ و مجاور فروسرخ در قسمت پایانی طیف جهت تولید پروتئین فلئوئورسنت‌ها بودند. کاربرد رنگ‌های فلئوئورسنت به خاطر سمی بودن آنان به حالت تعلیق درآمدند و پروتئین فلئوئورسنت‌های کدگذاری شده ژنتیکی کاربرد تکنولوژی فلئوئورسنت را به حداقل رساندند و تمرکز بر تکنولوژی پروتئین‌های فلئوئورسنت معطوف شده بود که ممکن بود یک تکنیک تصویربرداری مهم در آینده نزدیک باشد. از دهه گذشته، کاربرد پروتئین فلئوئورسنت‌ها در مهندسی حسگرها افزایش چشمگیری داشته، تعدادی از ابزارهای مبتنی بر FRET کد گذاری شده ژنتیکی سریع ایجاد شدند و این پژوهش تا آنجاییکه یکی از موضوعات در آینده باشد، ادامه یافت. موفقیت این پروب‌های فلئوئورسنت پیشنهاد دادند که هر یک از رویدادهای مولکولی، شیمیایی، زیست شناسی با استفاده از زیست حسگر مبتنی بر FRET مناسب قابل پایش هستند.

۹. مراجع

- [۱] استادشریف، م.، و قائدی، ک.، و نصراصفهانى، م.، و تنهایی، س.، و کربلایی، خ.، و پریور، ک.، و بهاروند، ح. (۱۳۸۸). جهت گیری سیتوزولی پراکسیزومال پروتئین موشی فاقد تری پپتید SKI متصل به پروتئین سبز فلورسنت در سلول های CHO-K^۱ و P^{۱۹} یاخته، ۱۱(۲) (۴۲)، ۱۵۴-۱۵۹.
- [۲] قاسمی، ث.، و قائدی، ک.، و نصراصفهانى، م.، و تنهایی، س.، و ربیعی، ف.، و کربلایی، خ.، و بهاروند، ح.، و اسماعیلی، ا. (۱۳۸۹). جای گیری درون هسته ای پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده متصل به PPAR γ موشی در سلول های فیبروبلاست گاوی. یاخته، ۱۲(۱) (۴۵)، ۹۷-۱۰۴.
- [۳] Brejc, K.; Sixma, T. K.; Kitts, P. A.; Kain, S. R.; Tsien, R. Y.; Ormö, M.; Remington, S. J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94 (6), 2306-2311.
- [۴] Inouye S, Tsuji FI (Mar 1994). "Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein". *FEBS Letters*. 341 (2-3): 277-80. doi:10.1016/0014-5793(94)80472-9. PMID 8137953.
- [۵] Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (Jun 1974). "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*". *Biochemistry*. 13 (12): 2656-62. doi:10.1021/bi00709a028. PMID 4151620.
- [۶] Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (September 1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein". *Science*. 273 (5280): 1392-
- [۷] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (Feb 1992). "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein". *Gene*. 111 (2): 229-33. doi:10.1016/0378-1119(92)90691-H. PMID 1347277.
- [۸] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (Jun 1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*". *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 59 (3): 223-39. doi:10.1002/jcp.1030590302. PMID 13911999.