



مطالعه مقایسه‌ای نوع وحشی و جهش یافته آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

مریم ماپارا^۱، مجید تقدیر^{۱*} و بیژن رنجبر^{۲،۱*}

۱. گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده: آنزیم کربنیک انیدراز II پروتئینی سیتوزولی واقع در غشای گلوبول‌های قرمز است که در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلفی شرکت دارد. این آنزیم به‌طور مؤثر آبپوشی برگشت‌پذیر دی‌اکسید کربن را نیز کاتالیست می‌کند. با توجه به نقش مهم آنزیم مذکور، در این مطالعه از روش محاسباتی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) برای مطالعه ساختار و دینامیک آنزیم وحشی و چند آنزیم جهش یافته استفاده شد. بر اساس مطالعات تجربی گذشته، آنزیم‌های جهش یافته این مطالعه، در جهت افزایش فعالیت سینتیکی و یا تغییر در پایداری آنزیم اثرگذار هستند. در ابتدا مطالعات مکانیک کوانتومی و سپس MD انجام شد. طبق نتایج، مشاهده شد که آنزیم طبیعی از نظر انرژی پتانسیل و انرژی آزاد گیبس در وضعیت مطلوب و پایداری قرار دارد، همچنین با توجه به RMSF، RMSD و Rg مشخص شد آنزیم جهش یافته‌ای که بر فعالیت آنزیم تأثیرگذار است نسبت به سایر آنزیم‌ها دارای پایداری بیشتر، نوسانات و شعاع ژیراسیون کمتری است. در دو جهش یافته دیگر که بر پایداری آنزیم نیز اثرگذار بودند، نسبت به دو آنزیم قبل، پایداری کمتر و نوسانات و سطح انرژی پتانسیل بالاتری مشاهده شد، که باعث ناپایداری این آنزیم‌ها در طول شبیه‌سازی می‌شد. این نتایج می‌توانند در مهندسی و طراحی واریانت‌های جدیدی از آنزیم کربنیک انیدراز کمک‌کننده باشند.

واژگان کلیدی: کربنیک انیدراز II، دینامیک مولکولی، جهش، فعالیت، پایداری.

*ranjbarb@modares.ac.ir and taghdir@modares.ac.ir

بعضی خصوصیات از جمله حساسیت به مهارکننده‌ها، توزیع بافتی و مکان سلولی متفاوت هستند؛ ولی درعین حال باوجود تنوع در ساختار، در جایگاه فعال همه آن‌ها عنصر روی وجود دارد [۲]. روی در طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها وجود دارد و در متابولیسم بیشتر موجودات مهم است [۳]. آنزیم کربنیک انیدراز II نیز پروتئینی سیتوزولی و نمونه بارزی از متالوآنزیم‌های کاملاً کارآمد است [۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸

سال یازدهم | شماره ۱ | بهار ۱۴۰۳

۱- مقدمه

آنزیم کربنیک انیدراز در پستانداران، گیاهان و باکتری‌ها یافت می‌شود [۱]. این آنزیم محصول خانواده ژنی است که ایزو آنزیم‌های مختلفی را تولید می‌کنند که با داشتن توالی مشابه، در

که با حضور در بافت‌ها و گلبول‌های قرمز، با توجه به شرایط بدن، آبیوشی برگشت‌پذیر دی‌اکسید کربن (CO_2) و آب (H_2O) را به اسیدکربنیک (H_2CO_3) با سرعت گردش بالا، یعنی 10^6 مولکول در ثانیه (s^{-1}) کاتالیست می‌کند [۴، ۵] و بدین‌صورت در حمل مقدار عمده‌ای از CO_2 در خون نقش دارد. آنزیم کربنیک انیدراز II در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مهمی از جمله تنفس، گلوکونئوز، لیپوئنز و سنتز اسیدهای آمینه نقش دارد [۶]. این آنزیم با حضور در بافت‌های مختلف در تنظیم هموستاز اسید و باز در گلبول‌های قرمز، کلیه‌ها و چشم‌ها عملکرد دارد و با بسیاری از بیماری‌ها مانند گلوکوم، تومورها، دیابت و بیماری‌های مربوط به استخوان مرتبط است. به‌عنوان نمونه، کمبود این آنزیم می‌تواند عامل پوکی استخوان [۴] باشد و از سوی دیگر، افزایش بیان آن نیز گلوکوم چشمی را بهبود بخشد [۷].

ساختار آنزیم کربنیک انیدراز با پرتو ایکس با قدرت و تفکیک بالا در سال ۱۹۷۲ مشخص شد [۸]. کربنیک انیدراز، متالوآنزیمی با وزن ۳۰ کیلو دالتون و دارای یک زنجیر پلی پپتیدی حاوی ۲۶۰ باقیمانده‌ی اسیدآمینه است. این آنزیم کروی شکل با ابعاد $55 \times 44 \times 39$ آنگستروم است [۶]. جایگاه فعال آنزیم کربنیک انیدراز، از مخروطی با عمق ۱۵ آنگستروم تشکیل شده است؛ که عمدتاً با صفحات بتای ۱۰ رشته‌ای شکل گرفته‌اند که از یک طرف با بقایای آبگریز و از یک سو با بقایای آبدوست، در یک خط قرار دارند [۷]. ساختار آنزیم مانند همه پروتئین‌های دیگر، به‌گونه‌ای است که باقیمانده‌های آب‌گریز در درون مولکول و باقیمانده‌های آبدوست در سطح خارجی آن قرار دارند [۹، ۱۰]. ساختمان دوم آنزیم کربنیک انیدراز II از ۹ قطعه مارپیچ، ۱۵ صفحه بتای موازی ناهمسو و ۲۴ حلقه تشکیل شده است [۴]. یون روی در انتهای شکاف جایگاه فعال و نزدیک به رأس مخروط [۱۱] به فرم تتراهیدرال قرار گرفته و به حلقه ایمیدازول باقیمانده‌های هیستیدین ۹۴، ۹۶ و ۱۱۹ و همچنین، یک مولکول آب که آن را آب متصل به یون می‌نامند، متصل شده است. این لیگاندها که لیگاندهای مستقیم نامیده می‌شوند، با سایر باقیمانده‌های اسیدآمینه‌ها، شبکه‌ای از پیوندهای هیدروژنی را نیز در جایگاه فعال تشکیل می‌دهند [۱۲]. بخش آبدوست جایگاه فعال شامل تره‌اوانین ۱۹۹، گلوتامین ۱۰۶ و هیستیدین ۶۴ است که مولکول‌های آب در این قسمت دیده می‌شوند. ناحیه آب‌گریز

جایگاه فعال شامل والین ۱۴۳ و تربیتوفان ۲۰۹ و سایر باقیمانده‌های آب‌گریز است. در آبیوشی CO_2 کاتالیست شده با این آنزیم، اعتقاد بر این است که ناحیه آب‌گریز برای اتصال به بستر بسیار مهم است و بخش آبدوست در مرحله آزاد شدن پروتون شرکت می‌کند [۱۱]. همچنین، به نظر می‌رسد چندین اسیدآمینه (تیروزین ۷، آسپارژین ۶۲، هیستیدین ۶۴، آسپارژین ۶۷، تره‌اوانین ۱۹۹ و تره‌اوانین ۲۰۰) در پایداری شبکه‌ای از مولکول‌های آب سازمان‌یافته در جایگاه فعال دخیل هستند [۱۳].

در این پژوهش با تجزیه و تحلیل نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با توجه به جهش‌های ایجاد شده و مقایسه آن‌ها با آنزیم وحشی و همچنین، بررسی نقش آن‌ها در پایداری و فعالیت آنزیم به مقایسه جامعی خواهیم پرداخت.

۲- بخش تجربی

۲-۱- ساختارها

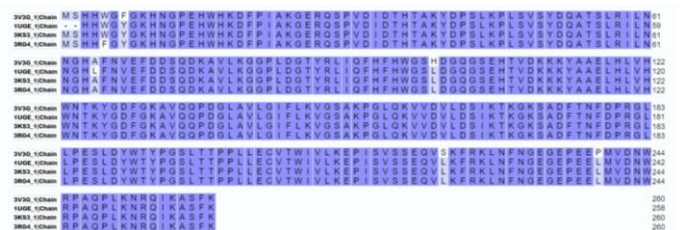
با توجه به اهمیت و نقش کلیدی آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در موارد مذکور، در این پژوهش به بررسی و مقایسه ساختار طبیعی این آنزیم با کد بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) به نام 3KS3 و آنزیم‌های جهش‌یافته با کد 1UGE، 3RG4 و 3V3G استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پرداخته شده است. در آنزیم جهش‌یافته 1UGE با ۲۵۸ اسیدآمینه، آلانین در جایگاه ۶۵ با لوسین جایگزین شده و موجب تغییر و افزایش فعالیت آنزیم کربنیک II انیدراز گشته است [۱۴]. همچنین در آنزیم جهش‌یافته 3RG4 با ۲۶۰ اسیدآمینه، در جایگاه ۵، فنیل آلانین از سمت انتهای آمینی، به‌جای تربیتوفان قرار گرفته است که این جهش موجب ناپایداری آنزیم کربنیک انیدراز II شده است [۱۵]. آنزیم 3V3G نیز با ۲۵۸ اسیدآمینه در جایگاه فعال خود در محل باقیمانده‌های لوسین جهت ایجاد پایداری جهش پیدا کرده است؛ بدین‌صورت که در جایگاه ۱۰۰ و جایگاه ۲۲۳، به ترتیب هیستیدین و سرین به‌جای باقیمانده‌های لوسین قرار گرفته‌اند. این آنزیم دارای یک جهش دیگر است که فنیل آلانین جایگزین تیروزین در جایگاه ۷ شده است [۵]. آنزیم طبیعی موردبررسی با کد 3KS3، دارای ۲۶۰ اسیدآمینه است که دارای دو کوفاکتور گلیسرول و یون روی است. تمامی آنزیم‌های

مذکور عضو خانواده لیاها بوده و دارای یک زنجیره A هستند [۱۶].

برای انجام این پژوهش، در ابتدا ساختار کریستال پروتئین‌های کربنیک انیدراز انسانی II طبیعی و سه جهش‌یافته به ترتیب با کدهای 3KS3، 1UGE، 3RG4 و 3V3G از PDB به دست آمد (www.rcsb.org). نواحی از این پروتئین‌ها که در ساختار کریستال نبودند شامل باقیمانده‌های اسیدآمین ۱ تا ۳ با استفاده از نرم‌افزار MODELLER موجود در نرم‌افزار Chimera مدل‌سازی همسانی شدند. همچنین، مطالعات ساختار با استفاده از نرم‌افزارهای Swiss-PDB viewer 4.10 و ChimeraX انجام گرفت [۱۷].

۲-۲- هم‌ترازی آنزیم‌های جهش‌یافته و طبیعی

در شکل ۱، هم‌ترازی ۴ آنزیم موردنظر با استفاده از سایت UNIPROT آورده شده و جهش‌های موردنظر در آنزیم‌های جهش‌یافته با مرجع قرار دادن آنزیم طبیعی مشاهده می‌شوند. باقیمانده‌های یکسان با آنزیم طبیعی 3KS3، در جعبه‌های آبی پررنگ قرار دارند و باقیمانده‌های متفاوت بین این ۴ آنزیم در جعبه‌های آبی کمرنگ قرار گرفته‌اند.



شکل ۱: هم‌ترازی آنزیم طبیعی 3KS3 و آنزیم‌های جهش‌یافته 1UGE، 3RG4، 3V3G با استفاده از سایت UNIPROT

۲-۳- پارامتریزاسیون اسیدآمین‌های متصل به فلز روی

باتوجه به اینکه آنزیم‌های موردپژوهش، متالوآنزیم و دارای کوفاکتور روی هستند، اسیدآمین‌ها و مولکول‌هایی که با فلز روی میانکنش دارند انرژی کل پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۸]؛ به همین دلیل، جهت به دست آوردن پارامترهای این اسیدآمین‌ها و مولکول‌های آبی که به فلز روی متصل شده‌اند، از محاسبات کوانتوم مکانیک با نرم‌افزار Gaussian 09 استفاده

شد. در این روش ثابت نیرو برای پیوندها و زوایای مربوط به دست آمد و برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورداستفاده قرار گرفت. در این قسمت در ابتدا اسیدآمین‌ها و مولکول‌های اطراف یون فلزی که دارای پیوند کوالان هستند با استفاده از روش b3lyp و سیستم پایه *6-31G در بهینه شدند و مقدار ثابت نیرو محاسبه شد؛ سپس، برای استخراج ثابت‌های نیرو از نرم‌افزار VFFDT استفاده شد. همچنین برای به دست آوردن بار جزئی اتم‌های اسیدآمین‌ها و مولکول‌های آب ذکرشده از روش RESP و سیستم پایه *6-31G استفاده شد.

۲-۴- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای هر چهار آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی با کدهای PDB شامل 3KS3، 1UGE، 3RG4، 3V3G به‌طور جداگانه انجام گرفت. ساختارهای حاصل از مدل‌سازی مولکولی به‌عنوان ورودی برای شبیه‌سازی مورداستفاده قرار گرفتند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار Gromacs 2019.6 و با میدان نیروی ff99SB+ILDN انجام گرفت. سپس، برای خنثی کردن بار سطحی ساختار، چند یون سدیم و کلر افزوده شد. درنهایت، پروتئین در لایه‌ای از مولکول‌های آب TIP3P در جعبه ۸ وجهی (octahedron) با ضخامت ۸ آنگستروم قرار داده شد.

برای حذف اندرکنش‌های واندروالسی و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب و کمپلکس، کاهش انرژی (Energy Minimization) با روش تندترین شیب (steepest descent) با ۱۰۰۰ گام انجام شد [۴]. در مرحله بعد، دمای سیستم به تدریج از ۰ تا ۳۱۰ درجه کلون به مدت ۲۰۰ پیکو ثانیه در حجم ثابت افزایش یافت و سپس در فشار ثابت به مدت ۱۰۰۰ پیکو ثانیه سیستم به حالت تعادل رسانده شد. برای محاسبه میانکنش‌های غیر پیوندی از روش Particle Mesh (PME) (Ewald) بافاصله ۱۰ آنگستروم استفاده گردید [۱۹] و برای محدود کردن پیوندهای درگیر در اتم هیدروژن و همچنین افزایش سرعت محاسبات، الگوریتم SHAKE به کار گرفته شد [۲۰]. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای هر ۴ آنزیم به‌صورت جداگانه به مدت ۱۰۰ نانوثانیه در دمای ۳۱۰ درجه کلون انجام شد و در آخر اطلاعات شبیه‌سازی در فواصل ۰/۴ پیکو ثانیه برای

انجام آنالیز ذخیره شدند [۲۱].

۲-۵- آنالیز نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

انحراف ریشه میانگین مربعات (RMSD: Root Mean Square Deviation) بین ساختارهای ایجادشده در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در بعد زمان معیاری مناسب جهت مشخص کردن پایداری ساختاری پروتئین‌های طبیعی و جهش‌یافته است؛ بنابراین تغییرات RMSD مربوط به اتم‌های کربن آلفای پروتئین در تمامی شبیه‌سازی‌ها (طبیعی و جهش‌یافته) در طی زمان شبیه‌سازی (۱۰۰ نانوثانیه) نسبت به ساختار اولیه محاسبه و استخراج شد [۲۲، ۴]. در ادامه جذر میانگین انعطاف پذیری ساختار (RMSF: Root Mean Square Fluctuation) جهت تعیین انعطاف‌پذیری ساختارها محاسبه گردید. با رفتار دینامیکی اتم‌های کربن آلفا در ساختار می‌توانیم اطلاعات کافی جهت بررسی حرکت‌های مهم در پروتئین‌ها را به دست آوریم که منعکس‌کننده حرکت‌های کلی ساختار هستند. بنابراین، RMSF اتم‌های کربن آلفا جهت بررسی حرکت‌ها و انعطاف‌پذیری ساختاری در نظر گرفته شد. همچنین، شعاع ژیراسیون (Rg: Radius of gyration) به‌عنوان یکی از پارامترهای اساسی جهت تعیین تراکم ساختار نیز محاسبه گردید. در ادامه سایر آنالیزها از جمله انرژی پتانسیل، انرژی آزاد گیبس و آنالیز حرکت‌های اصلی درون مولکولی (PCA: Principal Component Analysis) جهت تجزیه و تحلیل دقیق‌تر محاسبه شدند [۲۳].

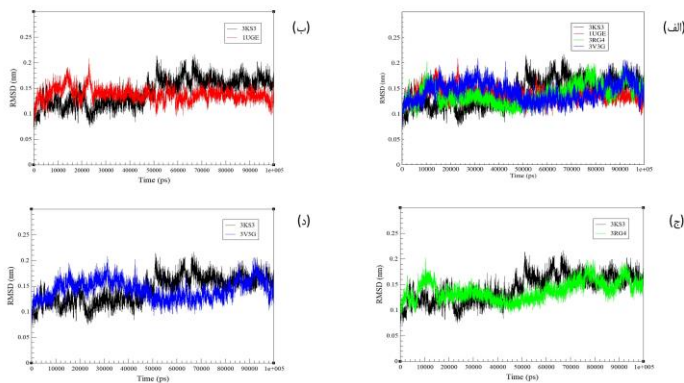
۳- نتایج

۳-۱- مطالعه پایداری پروتئین

۳-۱-۱- انحراف ریشه میانگین مربعات (RMSD)

نمودار RMSD بر اساس کربن آلفا جهت اطمینان از پایداری ساختارها برای هر چهار آنزیم در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به دست آمد. هرچه شیب نمودار RMSD به صفر نزدیک‌تر باشد مدل شبیه‌سازی‌شده پایدارتر؛ و هرچه شیب نمودار به‌تدریج افزایش یابد و دارای نوسان زیادی باشد، ساختار در طول

شبیه‌سازی ناپایدارتر است [۲۴]. به‌عنوان یک قاعده کلی اگر در انتهای شبیه‌سازی شیب نمودار بین مقدار ۰/۲ تا ۲ آنگستروم نوسان داشته باشد ساختار پایدار در نظر گرفته می‌شود [۴]. نتایج این محاسبه برای تمام شبیه‌سازی‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است.

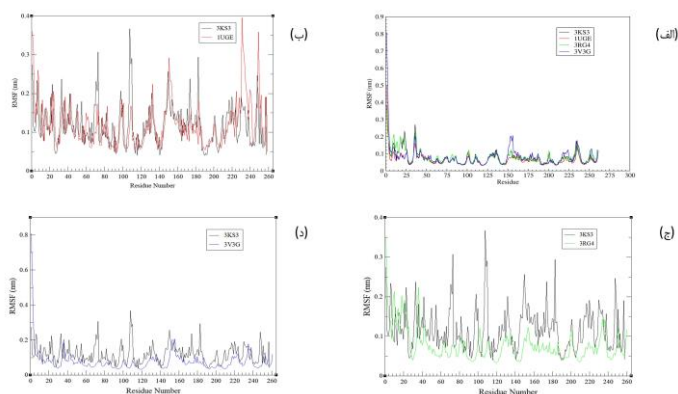


شکل ۲: تغییرات RMSD پروتئین طبیعی و ۳ پروتئین جهش‌یافته در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

همان‌طور که در شکل (۲ الف) مشاهده می‌شود نمودار RMSD مربوط به پروتئین طبیعی رفتار نسبتاً متفاوتی را نسبت به ۳ طبیعی (رنگ مشکی) در ابتدای شبیه‌سازی بعد از حدود ۵۰۰۰ پیکو ثانیه به مقدار ۰/۱۲ نانومتر رسیده است و تا زمان ۴۰۰۰۰ پیکو ثانیه روی همین مقدار نوسان مختصری را نشان می‌دهد. بعد از این زمان RMSD افزایش محسوسی داشته، به‌طوری‌که بعد از ۵۰۰۰۰ پیکو ثانیه به ۰/۱۵ نانومتر می‌رسد و تا انتهای شبیه‌سازی حول این مقدار نوسان مختصری را نشان می‌دهد. در شکل (۲ ب) بررسی جهش‌یافته 1UGL (رنگ قرمز) نشان می‌دهد که در ابتدای شبیه‌سازی RMSD مربوط به این پروتئین افزایش فراوانی داشته به‌طوری‌که در زمان ۱۵۰۰۰ پیکو ثانیه، مقدار RMSD آن به حدود ۰/۱۸ نانومتر رسیده است. بعد از این زمان RMSD این پروتئین کاهش چشمگیری داشته، به‌طوری‌که در زمان ۵۰۰۰۰ پیکو ثانیه به حدود ۰/۱۲ نانومتر می‌رسد و تا زمان حدود ۹۵۰۰۰ پیکو ثانیه روی این مقدار ثابت باقی می‌ماند، سپس در این زمان کاهش ناگهانی RMSD مشاهده شده و در انتهای شبیه‌سازی به مقدار ۰/۱ نانومتر می‌رسد.

در شکل (۲ ج) آنالیز نمودار RMSD مربوط به جهش 3RG4 (رنگ سبز) نشان می‌دهد که این پروتئین نیز همانند جهش‌یافته

برحسب نوسانات کربن آلفا صورت گرفته است. در تمامی شبیه‌سازی‌ها مقدار RMSF از ۵۰ نانوثانیه دوم شبیه‌سازی محاسبه شد.



شکل ۳: مقایسه میزان انعطاف‌پذیری (RMSF) بین پروتئین طبیعی و ۳ جهش‌یافته

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، میزان انعطاف‌پذیری اکثر اسیدآمینوهای موجود در ۴ پروتئین کاملاً یکسان است و فقط در بعضی نواحی مقدار RMSF آن‌ها متفاوت است که در ادامه این نواحی توضیح داده خواهند شد. طبق شکل (۳ الف)، در پروتئین طبیعی، ۲۵ اسیدآمینو انتهایی آمینی پروتئین به‌خصوص اسیدآمینوهای شماره ۱۵ تا ۲۵ میزان انعطاف‌پذیری بیشتری را نسبت به سایر اسیدآمینوها نشان می‌دهند. در شکل (۳ ب)، نشان داده شده است که پروتئین IUG8 در تمامی اسیدآمینوها میزان انعطاف‌پذیری پایین‌تری را نسبت به سایر پروتئین‌ها داراست، که همین امر باعث افزایش پایداری این پروتئین (مطابق RMSD) و احتمالاً افزایش فعالیت آن (طبق نتایج آزمایشگاهی) شده است [۱۴]. همان‌طور که در شکل (۳ ج) مشخص است، جهش‌یافته 3RG4 در اکثر نواحی رفتاری مشابه با پروتئین طبیعی دارد و فقط در اسیدآمینوهای شماره ۸-۲۵ مقدار انعطاف‌پذیری آن بیشتر از سایر پروتئین‌ها است؛ و در نهایت طبق شکل (۳ د)، جهش‌یافته 3V3G نیز فقط در اسیدآمینوهای شماره ۱۵۰ تا ۱۵۷ مقدار انعطاف‌پذیری بیشتری را نسبت به سایر پروتئین‌ها از خود نشان می‌دهد.

۳-۱-۳- شعاع ژیراسیون (Radius of gyration)

شعاع ژیراسیون (Rg) یکی از پارامترهای مهم در بررسی تغییرات اندازه پروتئین در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است.

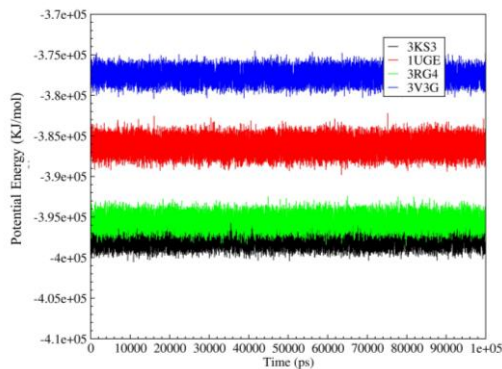
IUG8 در ابتدای شبیه‌سازی انحراف ساختاری بیشتری را نسبت به ساختار اولیه خود نشان می‌دهد، به طوری که در زمان ۱۰۰۰۰ پیکو ثانیه، RMSD مربوط به این پروتئین در حدود ۰/۱۷ نانومتر است. پس از این زمان RMSD کاهش ناگهانی داشته و در زمان ۱۵۰۰۰ پیکو ثانیه به مقدار ۰/۱۲ نانومتر می‌رسد و تا زمان ۵۰۰۰۰ پیکو ثانیه روند کاهش کند شده و در این زمان مقدار RMSD به حدود ۰/۱ نانومتر می‌رسد. بعد از زمان ۵۰۰۰۰ پیکو ثانیه دوباره افزایش RMSD مشاهده می‌شود و در زمان ۷۸۰۰۰ پیکو ثانیه به حدود ۰/۱۷ نانومتر می‌رسد و تا انتهای شبیه‌سازی این افزایش و کاهش ادامه می‌یابد. در شکل (۲ د) نمودار RMSD مربوط به جهش‌یافته 3V3G (رنگ آبی) تا زمان ۸۰۰۰۰ پیکو ثانیه روندی مشابه به پروتئین IUG8 را نشان می‌دهد. پس از این زمان RMSD مربوط به این پروتئین به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد و از مقدار ۰/۱۲ در زمان ۸۰۰۰۰ پیکو ثانیه به مقدار ۰/۱۷ نانومتر در زمان ۹۰۰۰۰ پیکو ثانیه می‌رسد. سپس RMSD کاهش‌یافته و در انتهای شبیه‌سازی مجدداً به مقدار ۰/۱۲ نانومتر می‌رسد. بررسی نهایی این نمودار نشان می‌دهد که دو پروتئین طبیعی 3KS3 و جهش‌یافته IUG8 نمودار پایدارتری را نسبت به دو جهش‌یافته دیگر در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان می‌دهند.

۳-۱-۲- جذر میانگین انعطاف‌پذیری ساختار (RMSF)

برای درک بیشتر تأثیر تغییرات اسیدآمینو بر انعطاف‌پذیری ساختاری آنزیم کربنیک انیدراز II در آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته موردنظر، محاسبه RMSF انجام شد. مقدار بالاتر RMSF در یک ناحیه از باقیمانده‌های اسیدآمینو انعطاف‌پذیری بیشتر ساختار در آن قسمت را نشان می‌دهد، درحالی‌که مقادیر پایین‌تر RMSF نشان‌دهنده حرکت محدود و نوسان کمتر اسیدآمینوهای آن ناحیه، در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. به‌طور کلی برای یک پروتئین کوچک، مقدار نوسان کمتر از ۲ آنگستروم جهت اطمینان از پایداری و عدم انعطاف‌پذیری اسیدهای آمینه قابل‌قبول است [۲۵].

در شکل ۳، مقایسه انعطاف‌پذیری ساختاری بین پروتئین‌های طبیعی 3KS3 و ۳ جهش‌یافته IUG8، 3RG4 و 3V3G

یکی از فاکتورهای مهم در بررسی پایداری سیستم شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، انرژی پتانسیل است [۲۶]. زمانی که هیچ‌گونه حرکتی در سیستم وجود نداشته باشد، انرژی پتانسیل معادل صفر است و طول پیوندها و میزان زاویه‌ها در مقدار طبیعی خود هستند؛ ولی زمانی که مقدار انرژی پتانسیل سیستم منفی باشد، نشان‌دهنده پایدارتر بودن ساختار موردنظر است.



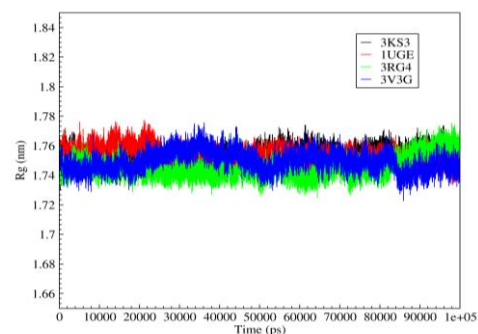
شکل ۵: تغییرات انرژی پتانسیل پروتئین طبیعی و سه جهش‌یافته در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

در نمودار شکل ۵، تغییرات انرژی پتانسیل پروتئین طبیعی و سه جهش‌یافته در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مشاهده می‌شوند. در این نمودار مقدار انرژی سیستم در پروتئین طبیعی 3KS3 و پروتئین جهش‌یافته 3RG4 منفی‌تر از سایر شبیه‌سازی‌ها بوده و نشان‌دهنده پایدارتر بودن این شبیه‌سازی‌ها نسبت به دو شبیه‌سازی دیگر است.

۳-۳- آنالیز حرکت‌های اصلی درون مولکولی (PCA)

برای به دست آوردن بینش عمیق‌تری در مورد حرکات اصلی و ضروری درون مولکولی ساختارها و پیش‌بینی حرکات هماهنگ بزرگ (large-scale collective motions) [۲۵] آنالیز PCA از طریق ماتریکس کوواریانس بردارهای ویژه، در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. PCA نشان‌دهنده میانگین حرکت‌های بزرگ درون مولکولی است و به عبارتی میزان نوسانات اتمی را آشکار می‌کند. به هرکدام از مقادیر ویژه به ازای هر بردار ویژه یک PC گفته می‌شود. مجموع مقادیر ویژه (eigen value) معیاری از حرکت کل سیستم است که می‌توان از آن برای مقایسه انعطاف‌پذیری و بررسی کانفورماسیون‌های پایدار ساختارهای مختلف نیز استفاده کرد. به

به‌منظور مشاهده تغییرات ساختاری و پایداری دینامیکی ساختارهای نوع وحشی و جهش‌یافته در طول زمان شبیه‌سازی، آنالیز Rg اجرا شد. به‌طور کلی مقادیر Rg بالاتر در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان‌دهنده ثبات کمتر و فشردگی کمتر و به تعبیری بازتر بودن ساختار پروتئین است، در حالی که مقادیر Rg پایین نشان‌دهنده ثبات و فشردگی بیشتر ساختار است [۲۵]. در شکل ۴ تغییرات اندازه پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای پروتئین طبیعی (3KS3) و سه جهش‌یافته (1UGE, 3RG4, 3V3G) نشان داده شده است.

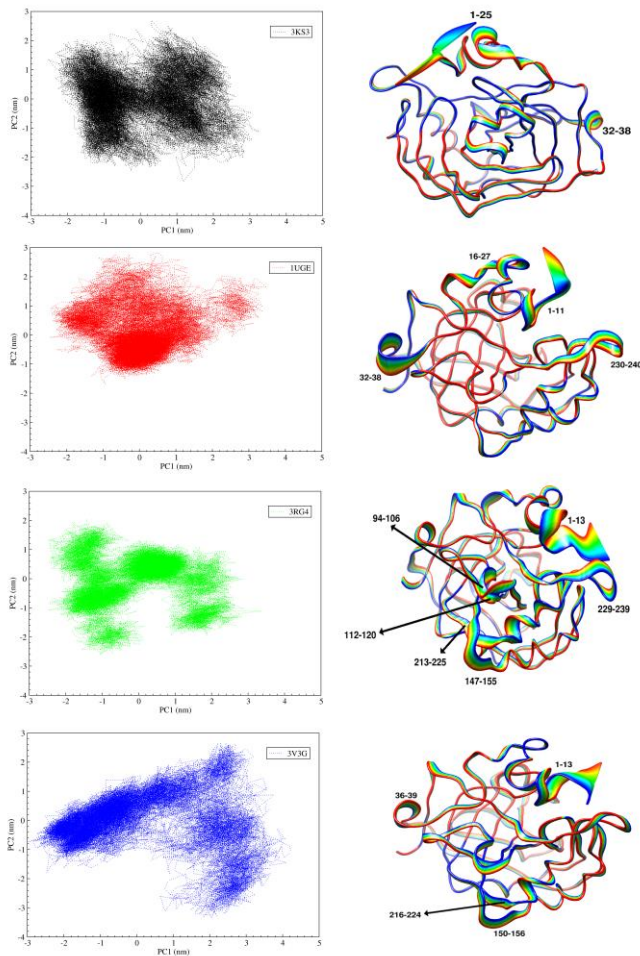


شکل ۴: تغییرات شعاع ژیراسیون پروتئین طبیعی و سه جهش‌یافته در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، Rg پروتئین جهش‌یافته 1UGE مشابه پروتئین طبیعی 3KS3 است و در طول شبیه‌سازی میزان Rg آن‌ها کاملاً ثابت و پایدار باقی‌مانده و احتمالاً همین امر نیز باعث بالا بودن فعالیت این پروتئین نسبت به دو جهش‌یافته دیگر شده است. درواقع دو فاکتور انعطاف‌پذیری پایین (پایداری بالا) و شعاع ژیراسیون مشابه پروتئین طبیعی، باعث بالا بودن فعالیت این پروتئین نسبت به دو جهش‌یافته دیگر شده است. بررسی جهش‌یافته 3RG4 نشان می‌دهد که این پروتئین تا زمان ۸۰۰۰۰ پیکو ثانیه Rg کوچک‌تری (۱/۷۴ نانومتر) را نسبت به پروتئین طبیعی 3KS3 و جهش‌یافته 1UGE (۱/۷۶ نانومتر) نشان می‌دهد، بعدازاین زمان Rg این پروتئین افزایش ناگهانی داشته و در انتهای شبیه‌سازی به مقدار ۱/۷۶ نانومتر می‌رسد. Rg جهش‌یافته 3V3G در طول شبیه‌سازی دائماً در حال نوسان است و بین دو محدوده ۱/۷۴ و ۱/۷۶ نانومتر متغیر است.

۳-۲- تغییرات انرژی پتانسیل (Potential energy)

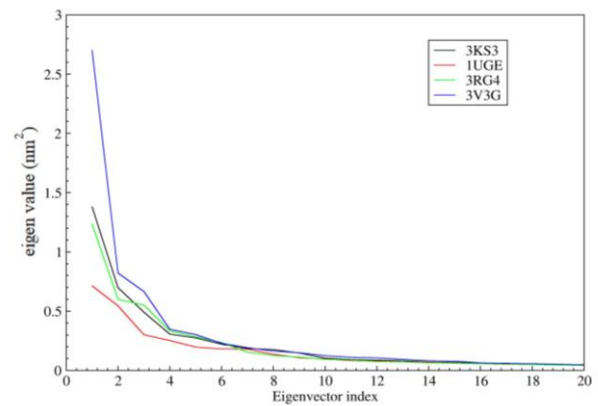
پروتئین طبیعی و سه جهش یافته رفتار به نسبت متفاوتی را نسبت به هم نشان می‌دهند.



شکل ۷: نمودار PCA مربوط به فضای فاز پروتئین‌های طبیعی و جهش یافته در PC1 و PC2

طبق این شکل، پروتئین طبیعی تقریباً در دو کلاستر مشاهده می‌شود که علت آن نیز نوسان بالای اسیدآمینه‌های انتهای آمینی است. در جهش یافته IUGE حالت‌های مختلف سیستم تقریباً در یک کلاستر مشاهده می‌شوند. بررسی ساختار سه‌بعدی این جهش یافته نشان می‌دهد که در چند قسمت مختلف از پروتئین، از جمله اسیدآمینه‌های ۱-۱۱، ۱۶-۲۷، ۳۲-۳۶ و ۲۳۰ تا ۲۴۰ دارای دامنه حرکتی بالایی است، ولی با توجه به اینکه دامنه حرکتی مربوط به این جهش یافته نسبت به ۲۵ اسیدآمینه ابتدایی در پروتئین طبیعی نسبتاً پایین است، به همین دلیل تقریباً در یک کلاستر مشاهده می‌شود. بررسی جهش یافته 3RG4 نشان‌دهنده تعداد بالای کلاستر در فضای فاز بوده که این امر نیز به دلیل نوسان بالای نواحی شماره ۹۴-۱۰۵، ۱۱۲-۱۲۰، ۱۲۰-۱۲۵، ۲۲۵-۲۳۰،

عبارتی مقادیر ویژه بالاتر نشان‌دهنده گستردگی بیشتر ساختار و کاهش تراکم آن است [۲۷]. در شکل ۶ نمودار مقادیر ویژه حاصل از مورب سازی (diagonalization) ماتریکس کوواریانس نوسان اتم‌های کربن آلفا در پروتئین طبیعی (3KS3) و پروتئین‌های جهش یافته (IUGE, 3RG4, 3V3G) برای هر بردار ویژه (eigenvector) آورده شده است. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، دو PC اول که PC1 و PC2 گفته می‌شود بیشتر مقدار حرکات مشاهده شده در طول شبیه‌سازی را به خود اختصاص داده‌اند و در بردارهای ویژه بعدی شاهد کاهش حرکات و نوسانات در پروتئین هستیم.



شکل ۸: نمودار مقادیر ویژه در برابر شاخص بردار ویژه، حاصل از ماتریکس کوواریانس نوسان اتم‌های کربن آلفا در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

باتوجه به شکل ۶، در تمام ساختارها مقادیر ویژه اولیه (PC1) که مربوط به حرکات بزرگ و هماهنگ است شیب نزولی دارد و دامنه آن کاهش یافته است. دامنه حرکتی بین پروتئین طبیعی و سه جهش یافته متفاوت است. در پروتئین جهش یافته 3V3G دامنه حرکتی شدیداً افزایش پیدا کرده است که نشان‌دهنده افزایش حرکت در این پروتئین نسبت به شبیه‌سازی‌های دیگر است. در دو جهش یافته دیگر (IUGE, 3RG4) نیز مقدار دامنه حرکتی نسبت به پروتئین طبیعی (3KS3) کاهش یافته که نشان‌دهنده کاهش انعطاف‌پذیری در این دو جهش یافته نسبت به پروتئین طبیعی است.

در ادامه در شکل ۷، نمودار دوبعدی در فضای فاز جهت بررسی دقیق‌تر دامنه حرکت پروتئین‌ها در دو PC اول (PC1 و PC2) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود،

۴- بحث

دینامیک پروتئین، ساختار و عملکرد آن بسیار باهم مرتبط هستند [۲۵]. در مورد آنزیم کربنیک انیدراز II، تغییرات ساختاری بر عملکرد آن بسیار تأثیرگذار است. در مطالعه حاضر، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی برای آنزیم‌های نوع وحشی و جهش‌یافته به‌طور جداگانه اجرا شد و سپس با توجه به تفاوت در برخی باقیمانده‌ها، نتایج حاصل از این شبیه‌سازی‌ها مقایسه شدند. همان‌طور که پیشتر اشاره شد، در مطالعات تجربی گذشته فعالیت سینتیکی آنزیم 3KS3 و 1UGE ارزیابی شده است و به این نتیجه رسیدند که در آنزیم جهش‌یافته 1UGE که آلانین در جایگاه ۶۵ با لوسین جایگزین شده، از لحاظ کاتالیتوری دارای فعالیت بیشتر و بازدهی محصول بیشتری است [۱۴].

باتوجه به اینکه اسیدآمینه آلانین در آنزیم طبیعی 3KS3، گروه R کاملاً غیرقطبی دارد، با پایین آوردن آنتروپی می‌تواند موجب افزایش پایداری شود که نتایج حاصل از Rg، انرژی پتانسیل و انرژی آزاد گیبس نیز بر این واقعیت صحه می‌گذارند؛ زیرا ساختار 3KS3 در این آنالیزها، نسبت به آنزیم‌های جهش‌یافته، تراکم ساختاری بالاتر و پایداری بیشتری داشت.

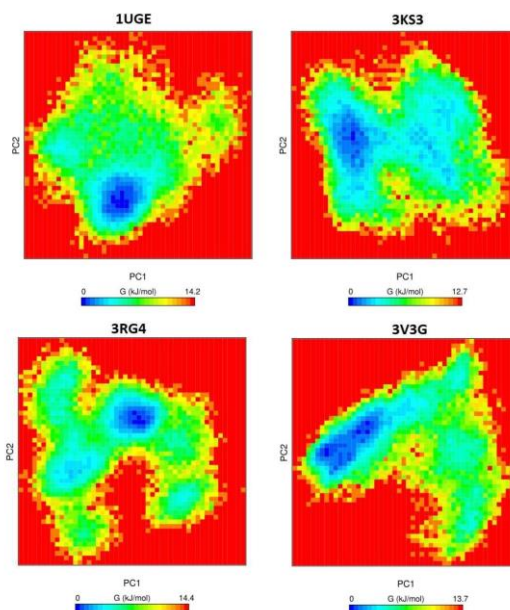
با در نظر گرفتن این نکته که اسیدآمینه لوسین دارای زنجیره جانبی بزرگ‌تری نسبت به اسیدآمینه آلانین است، در جایگاه فعال آنزیم طبیعی 3KS3 در حضور اسیدآمینه آلانین، دو حفره ایجاد می‌شود که وجود این دو حفره می‌تواند موجب اتصال غیراختصاصی لیگاند به جایگاه فعال و کاهش فعالیت کاتالیتوری این آنزیم شوند. درحالی‌که در پروتئین جهش‌یافته 1UGE با وجود زنجیره بزرگ‌تر اسیدآمینه لوسین، یک حفره در جایگاه فعال ایجاد می‌شود که می‌تواند به اتصال قوی‌تر و اختصاصی‌تر لیگاند کمک کند. همان‌طور که در بخش نتایج اشاره شد، آنزیم جهش‌یافته 1UGE در آنالیزهای RMSF، RMSD، Rg و PCA نسبت به ۳ آنزیم دیگر (3KS3، 3RG4، 3V3G) پایداری، تراکم بیشتر و انعطاف‌پذیری کمتری در باقیمانده‌ها داشت و همچنین دارای حرکات اصلی درون مولکولی کمتری بود که این نتایج با نتایج آزمایشگاهی بررسی فعالیت این آنزیم مطابقت دارد [۱۴].

در مطالعات گذشته که به‌صورت تجربی بر روی آنزیم کربنیک انیدراز II انجام شد، با ایجاد جهش‌های نقطه‌ای، در نقاط خاصی

در کنار اسیدآمینه‌های ۱-۱۳ و ۲۳۹-۲۲۹ است. جهش‌یافته 3V3G نیز رفتار مشابهی با جهش‌یافته 3RG4 از خود نشان می‌دهد.

۳-۴- چشم‌انداز انرژی آزاد گیبس (Gibbs free energy landscape)

چشم‌انداز انرژی آزاد گیبس با استفاده از پیش‌بینی بردارهای ویژه اول (PC1) و دوم (PC2) محاسبه شد که در شکل ۸ قابل مشاهده است؛ و همان‌طور که قبلاً گفته شد وجود نوسانات در سیستم و یا کانفورماسیون‌های پایدار مولکول را نیز نشان می‌دهند [۲۸]. نقاط بارنگ آبی نشان‌دهنده انرژی کمتر هستند و هر چه که به سمت رنگ قرمز پیش برویم میزان انرژی آزاد گیبس بیشتر شده و پایداری کاهش می‌یابد. طبق این شکل در پروتئین طبیعی 3KS3 نواحی آبی‌رنگ تقریباً در دو ناحیه مشاهده می‌شوند و این در حالی است که این نواحی در پروتئین 1UGE در یک ناحیه مشاهده می‌شوند. در دو جهش‌یافته 3RG4 و 3V3G نیز نواحی آبی‌رنگ در نقاط مختلف پراکنده شده‌اند که نشان‌دهنده این است که این دو پروتئین کانفورماسیون‌های پایدار متفاوتی را گرفته‌اند و همین امر می‌تواند روی فعالیت، عملکرد و همچنین پایداری این پروتئین‌ها تأثیرگذار باشد.



شکل ۸: چشم‌انداز انرژی آزاد گیبس برای دو مؤلفه اصلی (PC1 و PC2) در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

وضعیت مطلوبی نسبت به سایر ساختارها نداشت و با توجه به وجود این جهش‌ها در جایگاه فعال، این نتایج نیز قابل انتظار بود.

از طرفی همان‌طور که در بالاتر اشاره شد، در مطالعات تجربی گذشته ثابت شده که جهش تیروزین در جایگاه ۷ به فنیل آلانین منجر به افزایش فعالیت کاتالاستوری آنزیم شده است، در جهش یافته 3V3G عکس این جهش صورت گرفته است، پس می‌توان کاهش فعالیت را در مورد این آنزیم انتظار داشت که این یافته با نتایج حاصل از شبیه‌سازی نیز مطابقت دارد. همچنین، در مطالعات دیگر اشاره شده است که جهش‌زایی باقیمانده‌های آب‌گریز سطحی به قسمت‌های آب‌دوست در قسمت‌های سطحی و بیرونی مولکول، می‌تواند موجب تثبیت آنزیم کربنیک انیدراز II بر سطوح مختلف و تکامل هدایت شده آنزیم شود [۸]. همچنین در مقاله‌ای اثر جهش‌های فنیل آلانین، هیستیدین و آسپاراتات به صورت تجربی، به عنوان سه اسمولیت جهت بررسی پایداری و فعالیت آنزیم کربنیک انیدراز بررسی شدند و مشخص شد که هر سه این اسیدآمینها در جهت پایداری آنزیم در مقابل غیرفعال شدن عمل می‌کنند. در حضور فنیل آلانین به عنوان یک اسمولیت آب‌گریز، ساختار آنزیم بازتر شده و بیشتر در معرض حلال قرار می‌گیرد. همچنین وجود اسیدآمین هیستیدین باعث شده است که در آنزیم کربنیک انیدراز ساختار دوم اضافه ایجاد شود درحالی‌که در ساختار سوم تغییر محسوسی مشاهده نشده است [۳۰] که این موضوع با توجه به جهش‌هایی که در آنزیم 3V3G وجود دارد، با نتایج آنالیز حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این آنزیم مطابقت دارد.

آنزیم‌های مورد بررسی، به صورت آزاد و بدون حضور لیگاند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شدند، به‌طور کلی استفاده از آنزیم آزاد در محلول نیز می‌تواند معایبی داشته باشد، زیرا می‌تواند منجر به کاهش پایداری و همچنین کاهش فعالیت کاتالاستوری شود، به همین دلیل مطالعات متعددی برای افزایش پایداری کربنیک انیدراز II در حال انجام است که در عین حال کارایی کاتالاستوری بالا را نیز به همراه داشته باشد. یکی از این موارد ایجاد جهش در آنزیم و تبدیل برخی از باقیمانده‌ها به اسیدآمین سیستمین، جهت ایجاد پیوند دی سولفیدی و باهدف افزایش پایداری است [۸]. به‌طور کلی هر آنزیمی باید از پایداری نسبی خاصی برخوردار باشد و به‌طور مداوم در چرخه سنتز، عملکرد و تجزیه، غلظت لحظه‌ای

از توالی آنزیم به این نتیجه رسیدند که با جهش تیروزین ۷ به فنیل آلانین و همچنین آلانین ۶۵ به لوسین، افزایش فعالیت در تمام سوپستراهای موردنظر را خواهند داشت، درحالی‌که این جهش‌ها بر اختصاصیت بی‌تأثیر بودند. این مطالعات باوجود جهش آلانین به لوسین در جایگاه ۶۵، با نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم طبیعی 3KS3 و آنزیم جهش یافته IUGE منطبق است [۱۴].

باتوجه به مقالات گذشته و مطالعات آزمایشگاهی در آنزیم جهش یافته 3RG4 در جایگاه ۵، فنیل آلانین از سمت انتهای آمینی، به جای تریپتوفان قرار گرفته است که این جهش در نهایت موجب ناپایداری این آنزیم شده است [۱۵]. اسیدآمین فنیل آلانین در آنزیم جهش یافته 3RG4 و تریپتوفان در آنزیم طبیعی 3KS3 هر دو جز اسیدآمین‌های دارای حلقه آروماتیک و با خصوصیت آب‌گریز هستند. با توجه به اینکه باقیمانده‌های فنیل آلانین در تشکیل شبکه‌های آروماتیک نقش دارند [۲۹]، این واقعیت در 3RG4 می‌تواند منجر به کاهش پایداری این آنزیم نسبت به آنزیم طبیعی 3KS3 شود. با توجه به RMSD حاصل از این شبیه‌سازی می‌توان این ناپایداری را نیز در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی نسبت به ۳ آنزیم دیگر مشاهده کرد. اگر به انرژی آزاد گیبس برای جهش یافته 3RG4 برگردیم مشاهده خواهیم کرد که اسیدآمین‌های ابتدایی در سمت انتهای آمینی نیز دارای نوسان بالایی هستند.

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، آنزیم جهش یافته 3V3G در جایگاه فعال خود در محل باقیمانده‌های لوسین جهت ایجاد پایداری جهش پیدا کرده است و باقیمانده‌های هیستیدین و سرین به جای لوسین قرار گرفته‌اند؛ همچنین در جایگاه ۷، فنیل آلانین به جای تیروزین قرار گرفته است [۵]. اسیدآمین لوسین به عنوان یک اسیدآمین آلیفاتیک دارای گروه غیر قطبی و آب‌گریز است، درحالی‌که سرین دارای گروه قطبی و آب‌دوست و هیستیدین یک ترکیب آروماتیکی و آب‌گریز است، عموماً ترکیبات آروماتیکی به دلیل داشتن حلقه آریلی، پایدار هستند. این ایجاد تفاوت در گروه‌های عاملی این باقیمانده‌ها بین دو آنزیم 3KS3 و 3V3G موجب تفاوت بارزی در خصوصیات و نتایج حاصل از آنالیز این دو آنزیم می‌شود؛ به‌طوری‌که آنزیم جهش یافته 3V3G نسبت به ۳ آنزیم دیگر از نظر پایداری، Rg، تراکم ساختار و انرژی پتانسیل،

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت از این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

مراجع

- [1] Hewett-Emmett, D. and R.E. Tashian, Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1996. 5(1): p. 50-77.
- [2] Salemi, Z., S. Hosseinkhani, B. Ranjbar, and M. Nemat-Gorgani, Interaction of native and apo-carbonic anhydrase with hydrophobic adsorbents: A comparative structure-function study. *BMB Reports*, 2006. 39(5): p. 636-641.
- [3] Center of Computational Structural Biology (CCSB) - Scripps Research. 2021. Revision 8604f73b.
- [4] Shaik, N.A., et al., Molecular modelling and dynamics of CA2 missense mutations causative to carbonic anhydrase 2 deficiency syndrome. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020. 38(14): p. 4067-4080.
- [5] Fisher, Z., et al., Kinetic and structural characterization of thermostabilized mutants of human carbonic anhydrase II. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2012. 25(7): p. 347-355.
- [6] Silverman, D.N. and S. Lindskog, The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting protolysis of water. *Accounts of Chemical Research*, 1988. 21(1): p. 30-36.
- [7] Wambo, T.O., L.Y. Chen, S.F. McHardy, and A.T. Tsin, Molecular dynamics study of human carbonic anhydrase II in complex with Zn^{2+} and acetazolamide on the basis of all-atom force field simulations. *Biophysical chemistry*, 2016. 214: p. 54-60.
- [8] Aggarwal, M., C.D. Boone, B. Kondeti, and R. McKenna, Structural annotation of human carbonic anhydrases. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2013. 28(2): p. 267-277.

آن تنظیم شود؛ بنابراین، پایداری بیش از حد آنزیم نیز در سیستم‌های حیاتی می‌تواند مشکل‌ساز باشد. پس می‌توان گفت که بهینه‌شدگی ساختار و فعالیت در سیستم‌های حیاتی لزوماً به مفهوم انتخاب پایداری ساختار با بیشترین فعالیت نیست و در موجودات زنده پایداری آنزیم به حدی بهینه‌شده است که نیاز لحظه‌ای سلول به فعالیت آنزیم را فراهم کند [۳۱].

۵- نتیجه‌گیری

پس از انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و انجام آنالیزهای موردنظر مشاهده شد که در طول شبیه‌سازی آنزیم طبیعی از نظر انرژی پتانسیل و انرژی آزاد گیس در وضعیت مطلوب و پایداری قرار دارد. در ادامه، طبق نتایج حاصل از RMSF، RMSD و Rg در آنزیم 1UGE مشخص شد که این جهش یافته نسبت به سایر آنزیم‌ها نوسانات و Rg کمتر و پایداری بیشتری دارد. جهش یافته 3RG4 نسبت به دو آنزیم قبل از پایداری کمتری برخوردار بود؛ همچنین باتوجه به اینکه آنزیم 3V3G دارای جهش در جایگاه فعال است، در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، پایداری کمتر، نوسانات بیشتر و سطح انرژی پتانسیل بالاتری داشت که باعث ناپایداری این آنزیم در طول شبیه‌سازی نسبت به سایر آنزیم‌ها می‌شد. این تفاوت در نتایج را می‌توان به تفاوت ویژگی‌های باقیمانده‌های اسیدآمین و به طبع آن تفاوت در ساختار این آنزیم‌ها جستجو کرد.

در نهایت باید گفت که خواص مطلوب آنزیم کربنیک انیدراز II، شامل پارامترهای جنبشی بالا، بیان آسان، حلالیت بالا و مقاومت در برابر حرارت متوسط، آن را به‌عنوان انتخابی جذاب برای بسیاری از کاربردهای صنعتی تبدیل کرده است. به‌طور کلی تحقیقات بیشتری برای به حداکثر رساندن پایداری آنزیم کربنیک انیدراز II در طیف وسیعی از محیط‌ها بدون از دست دادن کارایی کاتالیتوری جهت کاربردهای مختلف از جمله استفاده‌های صنعتی، به‌عنوان حسگر زیستی برای روی و سایر فلزات در آب دریا یا سرم انسانی و مصارف دیگر موردنیاز است. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در مهندسی و طراحی واریانت‌های جدیدی از آنزیم کربنیک انیدراز کمک‌کننده باشند.

consequence of temperature. *Acta Biochimica Polonica*, 2004. 51(3): p. 665-671.

[19] Chen, G., D. Lu, J. Wu, and Z. Liu, Detachment of HCO₃⁻ from the Active Site of Carbonic Anhydrase: Molecular Dynamics Simulation and Machine Learning. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2018. 122(35): p. 20539-20549.

[20] Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, and H.J. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of computational physics*, 1977. 23(3): p. 327-341.

[21] Nasiripourdori, A., B. Ranjbar, and H. Naderi-Manesh, Binding of long-chain α -neurotoxin would stabilize the resting state of nAChR: A comparative study with α -conotoxin. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2009. 6: p. 1-15.

[22] Amadei, A., A.B. Linssen, and H.J. Berendsen, Essential dynamics of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1993. 17(4): p. 412-425.

[23] Tavassoli, Z., M. Taghdir, and B. Ranjbar, Renin inhibition by soyasaponin I: A potent native anti-hypertensive compound. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018. 36(1): p. 166-176.

[24] Schreiner, W., R. Karch, B. Knapp, and N. Ilieva, Relaxation estimation of RMSD in molecular dynamics immunosimulations. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2012. 2012.

[25] Rahimi, M., M. Taghdir, and F. Abasi Joozdani, Dynamozones are the most obvious sign of the evolution of conformational dynamics in HIV-1 protease. *Scientific Reports*, 2023. 13(1): p. 14179.

[26] Dabirmanesh, B., et al., Inhibition mediated stabilization effect of imidazolium based ionic liquids on alcohol dehydrogenase. *Journal of Molecular Liquids*, 2012. 170: p. 66-71.

[27] Ali, S., et al., Identification and evaluation of inhibitors of lipase from *Malassezia restricta* using virtual high-throughput screening and molecular

[9] Bauer, C., G. Gros, and H. Bartels, *Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide: Symposium Held at the University of Regensburg (FRG) April 17–20, 1979*. 2013: Springer Science & Business Media.

[10] Mishra, C.B., M. Tiwari, and C.T. Supuran, Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews*, 2020. 40(6): p. 2485-2565.

[11] Liang, J.-Y. and W.N. Lipscomb, Binding of substrate CO₂ to the active site of human carbonic anhydrase II: a molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. 87(10): p. 3675-3679.

[12] Håkansson, K. and A. Wehnert, Structure of cobalt carbonic anhydrase complexed with bicarbonate. *Journal of molecular biology*, 1992. 228(4): p. 1212-1218.

[13] Fisher, S.Z., et al., Speeding up proton transfer in a fast enzyme: Kinetic and crystallographic studies on the effect of hydrophobic amino acid substitutions in the active site of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 2007. 46(12): p. 3803-3813.

[14] Elleby, B., B. Sjöblom, and S. Lindskog, Changing the efficiency and specificity of the esterase activity of human carbonic anhydrase II by site-specific mutagenesis. *European journal of biochemistry*, 1999. 262(2): p. 516-521.

[15] Carlsson, U. and B.-H. Jonsson, Folding and stability of human carbonic anhydrase II. *The carbonic anhydrases: New horizons*, 2000: p. 241-259.

[16] Mahon, B.P., M.A. Pinard, and R. McKenna, Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules*, 2015. 20(2): p. 2323-2348.

[17] DeepView–Swiss, P., Home Page. Viewer <http://www.expasy.org/spdbv> (accessed Jan 2008).(b) Guex, N.; Peitsch, M. C. *Electrophoresis*, 1997. 18: p. 2714-2723.

[18] Sarraf, N., A. Saboury, B. Ranjbar, and A. Moosavi-Movahedi, Structural and functional changes of bovine carbonic anhydrase as a

dynamics studies. International journal of molecular sciences :(4)20.2019,p. 884.

[28] Karbassi, F., et al., Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2003. 32(2): p. 137-143.

[29] Kannan, K., et al., Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B. Three-dimensional structure at a nominal 2.2-Å resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975. 72(1): p. 51-55.

[30] Sarraf, N., A. Saboury, B. Ranjbar, and M. Nemat-Gorgani, Effect of some amino acids on the structure and activity of carbonic anhydrase. Asian Journal of Chemistry, 2005. 17(4): p. 2385.

[31] Ranjbar, B., K. Khalifeh, and S. Shirdel, Biophysical Chemistry. 2023, Iran: Tarbiat Modares University. P.290. [In persian].



Comparative study of wild-type and mutant human carbonic anhydrase II enzymes using molecular dynamics simulation

M. Mapar¹, M. Taghdir^{1*}, B. Ranjbar^{1,2*}

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract: The human enzyme carbonic anhydrase II (HCA II) is a cytosolic protein located in the membrane of red blood cells, and it is involved in various physiological and pathological processes. It can catalyze the reversible hydration of carbon dioxide efficiently. Given the critical role of the HCA II, computational methods such as molecular dynamics simulation (MD) are used to study the structure and dynamics of the wild-type and the mutant enzymes. Based on the previous experimental studies, mutant enzymes enhance kinetic activity or decrease stability. Before MD, quantum mechanics studies were performed. The native enzyme was in a stable state after MD in terms of potential energy and Gibbs-free energy. As evidenced by RMSD, RMSF, and Rg, One of the mutated enzymes that affect the activity of the enzyme has more stability, less fluctuation, and less Rg than other enzymes. In two other mutants that also affected the stability of the enzyme, compared to the previous two enzymes, lower stability, more fluctuations, and potential energy level were observed, which caused the instability of these enzymes during the simulation. These results can help in the engineering and design of new variants of carbonic anhydrase enzyme.

Keywords: Human Carbonic Anhydrase II, Molecular Dynamics, Mutation, Stability, Activity