

Study the effect of H230M mutation on CoxB gene in Acidithiobacillus ferrooxidans using molecular dynamic Simulation

بررسی اثر جهش H230M ژن CoxB در باکتری اسیدتیوباسیلوس فرواکسیدانس با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

Somayeh Farahmand¹, Faezeh Fatemi^{2*},
Marzieh Dehghan Shasaltaneh³,
Reza Haji Hosseini⁴, Shahrar Saedyan⁵

1. Assistant Professor, Department of Biology Sciences, School of Science, Payam-e-Noor University of Tehran, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4. Professor, Department of Biology Sciences, School of Science, Payam-e-Noor University of Tehran, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biology Sciences, School of Science, Payam-e-Noor University of Tehran, Tehran, Iran

سمیه فرهمند^۱، فائزه فاطمی^{۲*}، مرضیه دهقان شاسالطنه^۳،
رضا حاجی حسینی^۴، شهریار سعیدیان^۵

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دانشیار، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۴. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(Received: Aug. 18, 2019 - Accepted: Dec. 21, 2019)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳۰)

Abstract

In Acidithiobacillus ferrooxidans, proteins, like CoxB, present in the electron transmission pathway. The structure of CoxB has two copper atoms (CuA, CuB). CuA plays an important role in electron transport. According to previous studies, the conversion of histidine to methionine in a similar protein leads to an increase the stability of protein and to improve its function. Also, the binding of methionine to CuB in the wild protein structure is another reason for the selection of the H230M mutation in CuA site. Wild-type and H230M mutants are simulated in the presence of a bilayer membrane POPC using the gromacs version 5.1.4. The conformational changes of mutated protein were investigated by RMSD, RMSF, SASA, Rg, DSSP, density, MSD, thickness, PCA, ED, DCCM and FEL analysis. The results of the wild protein and H230M mutant analysis show that the bacteria still preserves its sustainability after mutation. It seems that the H230M mutation leads to the increase of the amount of electron reception that requires further studies in this regard. Molecular dynamic simulation and principal component analysis provide compelling evidence that this H230M mutation contributes to increase the stability of protein. Thus, this finding defines new approaches in structural properties, accurate survey, and probability improves the electron transfer.

Keywords: Bacteria, Bioleaching, Molecular dynamic simulation, Mutation, POPC.

چکیده

در باکتری اسیدتیوباسیلوس فرواکسیدانس، پروتئین‌های موجود در مسیر زنجیره انتقال الکترون از جمله پروتئین سیتوکروم C اکسیداز (CoxB)، پروتئین CoxB حاوی دو اتم مس (CuA, CuB) در ساختار خود می‌باشد. CuA نقش مهمی در انتقال الکترون دارد. طبق مطالعات قبلی، تبدیل هیستیدین به متیونین در پروتئین مشابه، منجر به افزایش پایداری پروتئین و بهبود عملکرد آن می‌شود. همچنین، اتصال متیونین به CuB در ساختار پروتئین وحشی یکی دیگر از دلایل انتخاب جهش H230M در جایگاه CuA است. پروتئین وحشی و جهش‌یافته در حضور غشای دولایه POPC با استفاده از gromacs نسخه ۵٫۱٫۴ شبیه‌سازی می‌شود. تغییرات ساختاری پروتئین جهش‌یافته توسط RMSD، RMSF، SASA، Rg، DSSP، density، MSD، thickness، PCA، ED، DCCM و FEL بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته نشان می‌دهد که باکتری پایداری خود را بعد از جهش حفظ می‌کند. به نظر می‌رسد جهش منجر به افزایش میزان دریافت الکترون می‌شود که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه دارد. شبیه‌سازی دینامیکی مولکولی و نتایج آنالیزها نشان می‌دهد که جهش به افزایش پایداری پروتئین کمک می‌کند. بنابراین، این یافته رویکردهای جدیدی را از نظر خصوصیات ساختاری و احتمال انتقال الکترون ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، بیولیچینگ، جهش، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، POPC.

مقدمه

تحلیل بیوانفورماتیک قرار گرفت. اسیدآمینه‌های (H230, C222) با یون CuA در پیوند هستند و اسیدآمینه‌های His181, Cys226 و Met233 با یون CuB در ارتباط هستند (Chandra Patra *et al.*, 2013). CuA گیرنده اصلی الکترون است و نقش مهمی در انتقال الکترون ایفا می‌کند. طبق مطالعات قبلی، تبدیل هیستیدین به متیونین در پروتئین مشابه، منجر به افزایش پایداری پروتئین و بهبود عملکرد آن شد (Barrett *et al.*, 2006). همچنین با افزایش پتانسیل ردوکس، میزان الکترون دریافتی پروتئین افزایش می‌یابد (Luthen *et al.*, 1988). اتصال Met233 به یون CuB در پروتئین وحشی و پایداری پروتئین، یکی دیگر از دلایل انتخاب جهش H230M در جایگاه CuA می‌باشد. هیستیدین و متیونین تمایل دارند بیشتر در ساختار ماریپج آلفا شرکت کنند (Berg *et al.*, 2002). بنابراین، پایداری پروتئین احتمالاً پس از جهش حفظ می‌شود.

مواد و روش‌ها

همولوژی مدلینگ و اعتبارسنجی

پس از بلاست توالی باکتری اسیدتیوباسیلوس-فرواکسیدانس اس پی. FJ2. با اسیدتیوباسیلوس-فرواکسیدانس ATCC 23270 (با کدشناسایی B7JAQ4 در Uniprot)، ۹۹٪ تشابه بین این دو باکتری یافت شد. ساختار کریستالوگرافی شده زنجیره B از پروتئین CoxB (PDB ID: 2yev) با رزولوشن $2/36 \text{ \AA}$ انتخاب و به‌عنوان ساختار الگو برای مدل کردن سه بعدی CoxB مورد استفاده قرار گرفت. جهش H230M با استفاده از نرم‌افزار مدلر نسخه ۹,۱,۲ انجام شد. پس از آنالیز مدل‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار، بهترین مدل توسط چهار سرور ProSA-web¹ و QMEAN² (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at>)

بیولیچینگ فرایندی است که در آن انحلال فلزات از منابع معدنی آنها، توسط میکروارگانیسم‌های معینی که به‌طور طبیعی وجود دارند صورت می‌گیرد. به‌تازگی، بازیابی فلزات از سنگ‌های معدنی با درجه پایین با استفاده از باکتریها انجام شده است. اسیدتیوباسیلوس مهمترین باکتری اکسیدکننده گوگرد است، که در فرایند بیولیچینگ مورد استفاده قرار می‌گیرد. باکتری جهش‌یافته جداشده از چشمه آب گرم رامسر (Acidithiobacillus sp.FJ2) در فرایند بیولیچینگ استفاده می‌شود (Farahmand *et al.*, 2019).

پروتئین‌های متعددی در فضای پری‌پلاسمی باکتری وجود دارد که در زنجیره انتقال الکترون شرکت می‌کنند. مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که Fe^{+2} توسط Cyc2 در غشای بیرونی اکسیده می‌شود سپس الکترون‌ها از طریق RcY و Cyc1 به سمت پایین منتقل می‌شوند و سرانجام برای انتقال انرژی به Cox aa3 در غشای داخلی می‌رسند (Chandra Patra *et al.*, 2013). سیتوکروم c اکسیداز به‌عنوان آنزیم انتهایی حاوی گروه هم و فلز مس در ساختار خود است که باعث انتقال الکترون‌ها از سیتوکروم C به CoxB می‌شود. الکترون‌ها از طریق اتم مس در CoxB، از Cyc1 به CoxA منتقل می‌شوند. یون مس هدایت‌کننده قوی الکترون است (Amdursky *et al.*, 2015). پروتئین CoxB حاوی دو اتم مس (CuA, CuB) در ساختار خود می‌باشد. CuA گیرنده اصلی الکترون بوده و نقش مهمی در انتقال الکترون ایفا می‌کند. آنالیز پلی‌پپتیدی CoxB نشان داده که این پلی‌پپتید دارای ۲۵۴ اسیدآمینه و سه ماریپج آلفا (helix bundle) است. این پروتئین در مسیر انتقال الکترون یک ناحیه غنی از اسیدآمینه‌های آروماتیک (145-WKWTFYSY-151) در ناحیه پری پلاسمی دارد. ایجاد جهش روی باکتری نقش مهمی در بازده فرایند بیولیچینگ اورانیوم ایفا می‌کند. در این تحقیق برای اولین بار، پروتئین CoxB تحت تجزیه و

1. Protein Structure Analysis
2. Quantitative Model Energy Analysis

POPC شبیه‌سازی شد (Hernández et al., 2015).

آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی
 پروتئین شبیه‌سازی شده در غشا، قبل و بعد از جهش مورد بررسی قرار گرفت. جذر میانگین مربع تغییر در ساختار (RMSD)، جذر میانگین مربع نوسانات در ساختار (RMSF)، شعاع ژیراسیون (Rgyr)، آنالیز ساختار دوم پروتئین (DSSP) و آنالیز سطح در دسترس حلال (SASA) محاسبه شدند متوسط کمترین فاصله (Distance)، مساحت هر لیپید (thickness)، آنالیز مؤلفه اصلی (PCA)، دینامیک اساسی (ED)، نقشه همبستگی پویا (DCCM)، چشم‌انداز انرژی آزاد (FEL) و تجزیه و تحلیل میان‌کنش باقی‌مانده‌ها تعیین شد.

نتایج

نتایج حاصل از پیش‌گویی ساختار سوم از طریق مدل‌سازی به روش همولوژی با نرم‌افزار مدلر پس از آنالیز مدل‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار مدلر، نمرات مدل ProSA-web Z-scores مثبت و در محدوده ۰/۵ تا ۱/۲۴ بود. نمرات Qmean Z-score از مدل‌های مورد مطالعه منفی و در محدوده ۶/۰۵- تا ۸/۲۸- بود. پس از تجزیه و تحلیل با Rampage و Verify 3D، مدل‌های نهایی به ترتیب با محدوده بالاتر از ۹۸٪ و ۶۵٪ تأیید شدند.

نتایج حاصل از انتخاب جهش (H230M) در محیط رایانه‌ای

پایداری پروتئین با سرورهای DUET، SDM و MCSM پس از ایجاد جهش بررسی شد (جدول ۱). آنالیز با سرورهای I-stable و Mupro نشان‌دهنده افزایش پایداری است (جدول ۲). ساختار سه بعدی پروتئین وحشی و جهش‌یافته با استفاده از نرم‌افزار پایمول رسم شد (شکل ۱).

Verify3D، (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) و (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3d>) و (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) Rampage (Wei et al., 2016). پایداری پروتئین با استفاده از چندین پایگاه داده مانند I-stable، MCSM، SDM، DUET و Mupro servers مورد ارزیابی قرار گرفت.

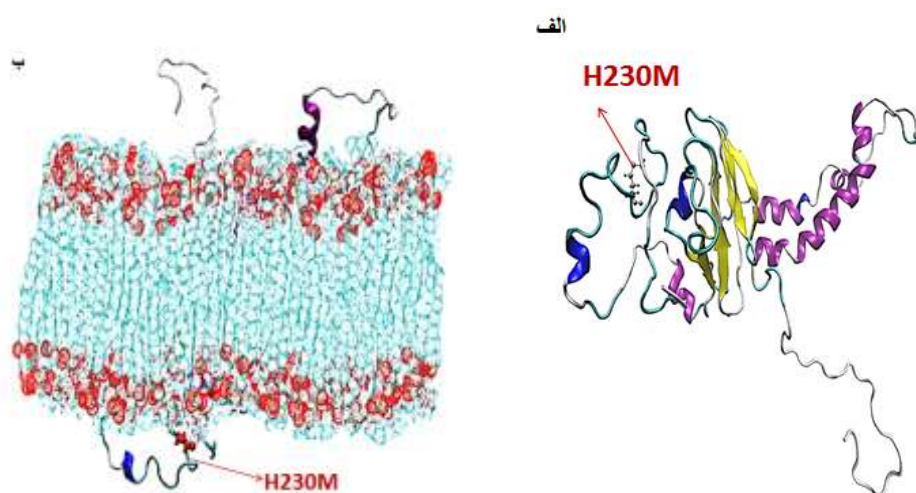
شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

مشخصات سروری که شبیه‌سازی محاسباتی توسط آن انجام شد دارای ۳۳۶ هسته محاسباتی با فناوری Xeon با سرعت ۲/۳ گیگاهرتز است. همچنین ۱۲۸۰ گیگابایت حافظه DDR4 با سرعت ۲۱۳۳ مگاهرتز و دو عدد کارت گرافیک با فناوری CUDA مخصوص انجام محاسبات (دارای ۵۷۶۰ هسته محاسباتی و ۲۴ گیگابایت حافظه DDR5) می‌باشد. جهت انجام شبیه‌سازی CoxB به غشای دو لایه متشکل از ۳۸۱۹۰ لیپید POPC وارد شد و در طی ۷۰ نانوثانیه شبیه‌سازی با استفاده از Gromacs v.5.1.4 تعادل یافت. شبیه‌سازی دو لایه POPC با استفاده از میدان نیرو Amber ff99SB انجام شد. برای حل کردن هر دو ساختار در جعبه شبیه‌سازی، مدل آب SPC مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، هشت مولکول یون کلر برای خنثی کردن بارالکتریکی به‌جای مولکول‌های حلال به سیستم اضافه شد. سپس، مراحل به حداقل‌رسانی انرژی و متعادل‌سازی در دو هنگرد nvt و npt به مدت پنج نانوثانیه انجام شد. برای این منظور، از الگوریتم برندنسن برای تثبیت دما تا ۳۰۰ درجه کلوین و قراردادن دستگاه در فشار ۱bar، استفاده شد. آنگاه شبیه‌سازی نهایی به مدت ۷۰ نانو ثانیه با گام زمانی ۲ فمتوثانیه انجام گرفت. مختصات و سرعت در هر ۵۰۰۰۰ پیکوثانیه با الگوریتم LINCS برای نگه‌داشتن مناسب طول باند ذخیره شد. پروتئین جهش‌یافته نیز در یک لیپید دو لایه

آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی
آنالیزهای RMSD، RMSF، شعاع ژیراسیون (Rg)،
سطح در دسترس حلال (SASA)

تجزیه و تحلیل RMSD نشان می‌دهد که پایداری
پروتئین پس از جهش، نسبت به نوع وحشی افزایش
یافته است. مقدار RMSF کربن آلفا پس از جهش،

نسبت به نوع وحشی کمی افزایش یافته است. نتایج
شعاع ژیراسیون پس از ایجاد جهش کمی افزایش یافته
است. نتایج سطح در دسترس حلال پروتئین پس از
ایجاد جهش به میزان ۲/۴۸۷ نانومتر افزایش یافته است
و پروتئین بیشتر در معرض حلال قرار گرفته است
(جدول ۳).



شکل ۱. محل ایجاد جهش. (الف) ساختار جهش‌یافته از پروتئین CoxB به عنوان مدل کارتونی با متیونین آن (مدل CPK).
(ب) ساختار پروتئین (مدل ساختار ثانویه) در غشا. ساختار پروتئین و POPC با استفاده از نرم‌افزار VMD رسم شد. ترادف اسیدآمینه
جهش‌یافته به عنوان مدل CPK نشان داده شده است.

جدول ۱. مطالعه پایداری پروتئین پس از ایجاد جهش توسط سرورهای DUET، SDM، MCSM و

DUET SERVER								
Amino acid position	Mutated Residue	Situation	Disorder prediction score	MCSM (Increased Stability)	SDM (Increased Stability)	DUET (Increased Stability)	Relative solvent accessibility%	Secondary structure
H230	M	Metal binding site	0.1942	0.28	-0.27	0.107	23.70%	Loop or irregular

جدول ۲. مطالعه پایداری پروتئین پس از ایجاد جهش توسط سرورهای I-Stable و Mupro.

DDG: تغییرات دلتا، Conf: نمره اطمینان در محدوده ۰-۱.

I stable SERVER							
Amino acid position	Mutated residue	Reference		Reference		Meta result	
		I-mutant 2.0 SEQ	DDG (kcal/mol)	MUpro	Conf score	I stable	Conf score
H230	M	Increase	0.50	Increase	0.018	Increase	0.799

جدول ۳. مقایسه تغییرات RMSD، RMSF، Rg و SASA در پروتئین وحشی نسبت به H230M

پروتئین	آنالیز			
	RMSD	RMSF	Rg	SASA
وحشی	۰/۰۳۹۲ ± ۰/۰۰۲۴	۰/۰۱۹۳ ± ۰/۰۰۲۵	۲/۷۷۵ ± ۰/۰۰۱۲	۲۰۲/۰۵۹ ± ۱/۱۹۴
جهش‌یافته	۰/۰۳۵۷ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۱۹۵ ± ۰/۰۰۲۴	۲/۷۷۴ ± ۰/۰۰۱۲	۲۰۴/۵۴۶ ± ۱/۱۶۴

می‌دهد که پس از جهش، Bend و Helix-3₁₀ به میزان ۱٪ افزایش یافته است، درحالی‌که میزان Turn، B-sheet و Helix-5 به میزان ۱٪ کاهش یافته است. با توجه به تمایل هیستیدین و متیونین در ماریپچ آلفا، هیچ تغییر مهمی در ساختار ثانویه پروتئین طی جهش مشاهده نمی‌شود.

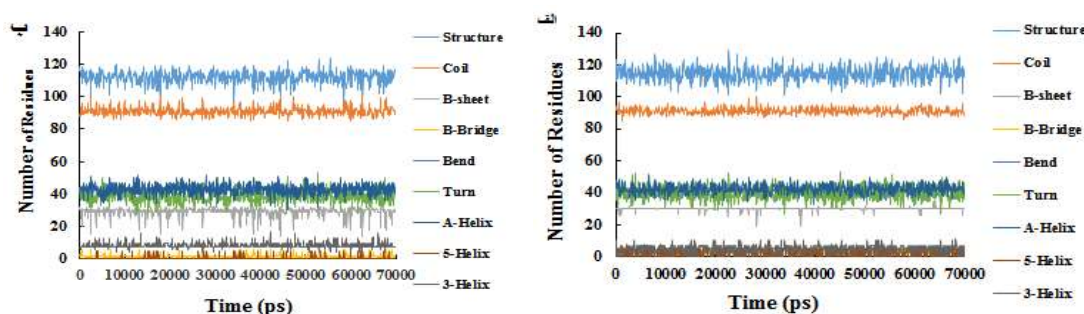
آنالیز متوسط کمترین فاصله (MSD)

متوسط فاصله بین باقی‌مانده‌ها در ساختار پروتئین وحشی و جهش‌یافته COXB تنها تغییرات کمی در بین دامنه زنجیره $\alpha 2$ و $\alpha 3$ دیده می‌شود. بنابراین آنالیز متوسط کمترین فاصله، نشان می‌دهد که فاصله بین باقی‌مانده‌ها پس از ایجاد جهش در ساختار پروتئین، اختلال ایجاد نمی‌کند و این نشان‌دهنده پایداری ساختار COXB پس از ایجاد جهش می‌باشد (شکل ۳).

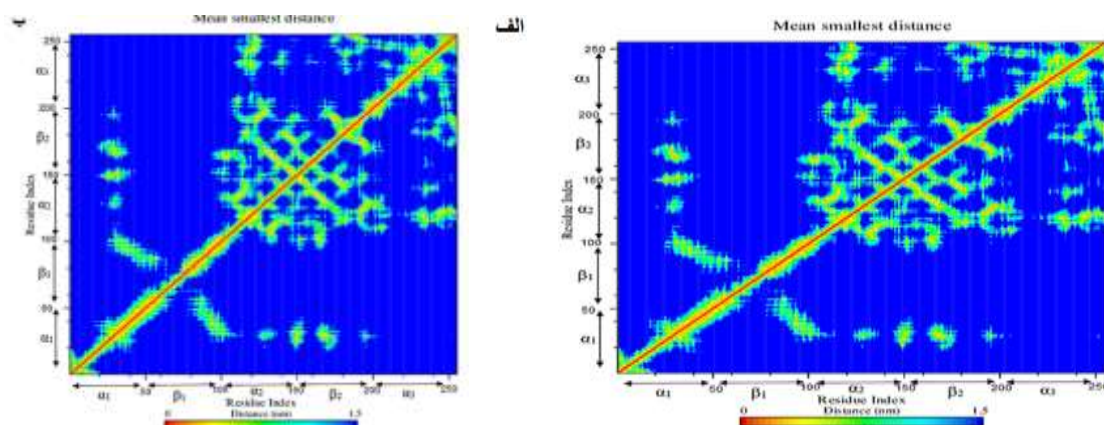
آنالیز ساختار دوم پروتئین (DSSP)

صرف‌نظر از ساختارهای منظم ثانویه در زنجیره‌های پلی‌پپتیدی، ساختارهای نامنظمی نیز وجود دارد. ساختارهای متداولی که متناوب و تکراری نیستند و مهمترین آنها را به اصطلاح پیچش (B-turn) یا خمش بتا (Bend) می‌نامند. خمش و پیچش نوعی بتا شیت هستند. پیچها صفحات بتای موازی ناهمسو را به هم متصل می‌کنند و به زنجیره پلی‌پپتیدی توانایی چرخش می‌دهند و در بعضی موارد سبب چرخش پلی‌پپتید به روی خود می‌شوند. این تغییر جهت معمولاً توسط چهار آمینواسید صورت می‌گیرد که دو تا از آنها همیشه گلیسین و پرولین می‌باشند.

تصاویر زیر تغییرات دوم پروتئین COXB را در هر دو نوع وحشی و جهش‌یافته در طی شبیه‌سازی نشان می‌دهد (شکل ۲). آنالیز ساختار COXB در غشا نشان



شکل ۲. ساختار دوم پروتئین وحشی در مقایسه با جهش‌یافته. (الف، ب) نقشه‌های زمانی در طول ۷۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در ۳۱۰ درجه کلون برای پروتئین (الف) وحشی و (ب) جهش‌یافته.



شکل ۳. متوسط کمترین فاصله بین باقی‌مانده‌های مشاهده‌شده در شبیه‌سازی. (الف و ب) میانگین فاصله تماس بین باقی‌مانده‌های مشاهده‌شده در شبیه‌سازی است. فاصله برش بین اتم‌های مورد استفاده برای تعریف متوسط کمترین فاصله ۱/۵ نانومتر است. پروتئین (الف) وحشی و (ب) جهش‌یافته.

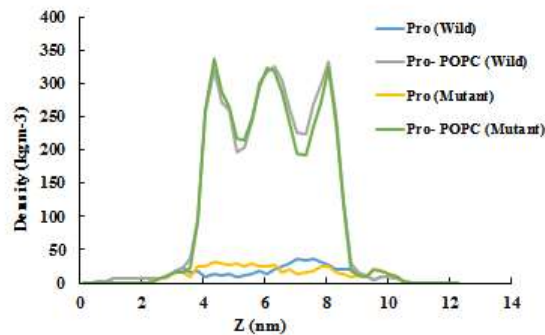
چگالی (Density)

تغییرات چگالی مربوط به توزیع پروتئین، قبل و بعد از جهش در راستای محور Z جعبه شبیه‌سازی را نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر به خوبی در هر دو لایه بالایی و پایینی غشا قرار گرفته است. همچنین نتایج بیانگر این مطلب است که توزیع اتم‌های پروتئین، POPC و پروتئین - POPC قبل و بعد از جهش تغییرات زیادی را نشان نمی‌دهد (شکل ۴- الف).

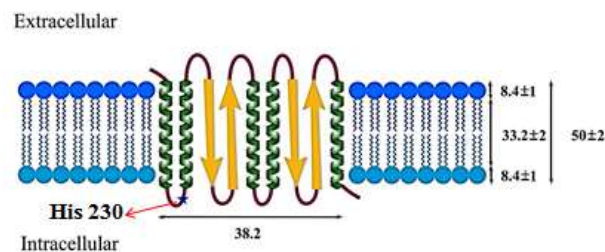
مساحت هر لیپید (Thickness)

شبیه‌سازی نشان‌دهنده این بود که ضخامت غشای دولایه POPC در اطراف پروتئین جهش‌یافته کاهش یافته است (شکل ۴- ب و ج). نتایج حاصل از چگالی نشان می‌دهد که به دلیل باز شدن ساختار پروتئین پس از جهش، فضای بیشتری از غشا توسط پروتئین اشغال شده است که در این ناحیه ضخامت غشای دولایه کاهش یافته است.

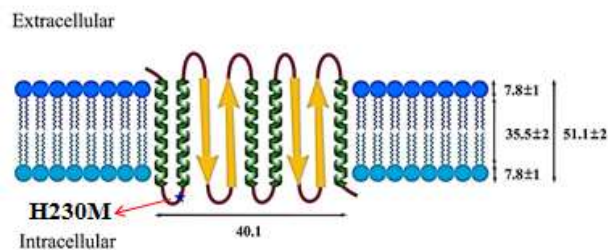
الف



ب



ج



شکل ۴. آنالیز ضخامت غشای دو لایه. (الف) آنالیز توزیع چگالی پروتئین در غشا. توزیع تراکم اجزای غشاء در امتداد جهت طبیعی برای غشای پروتئین وحشی (آبی)، پروتئین پس از جهش (نارنجی)، پروتئین وحشی - POPC (طوسی)، پروتئین - POPC بعد از جهش (سبز روشن). (ب) نمودار ضخامت POPC، CoxB وحشی. (ج) نمودار ضخامت POPC، CoxB پس از جهش. علامت ستاره نشان‌دهنده

H230 (نوع وحشی) و M230 (نوع جهش‌یافته) است.

از سه بردار ویژه، دارای یک مقدار ویژه بزرگتر در شبیه‌سازی نسبت به وحشی است.

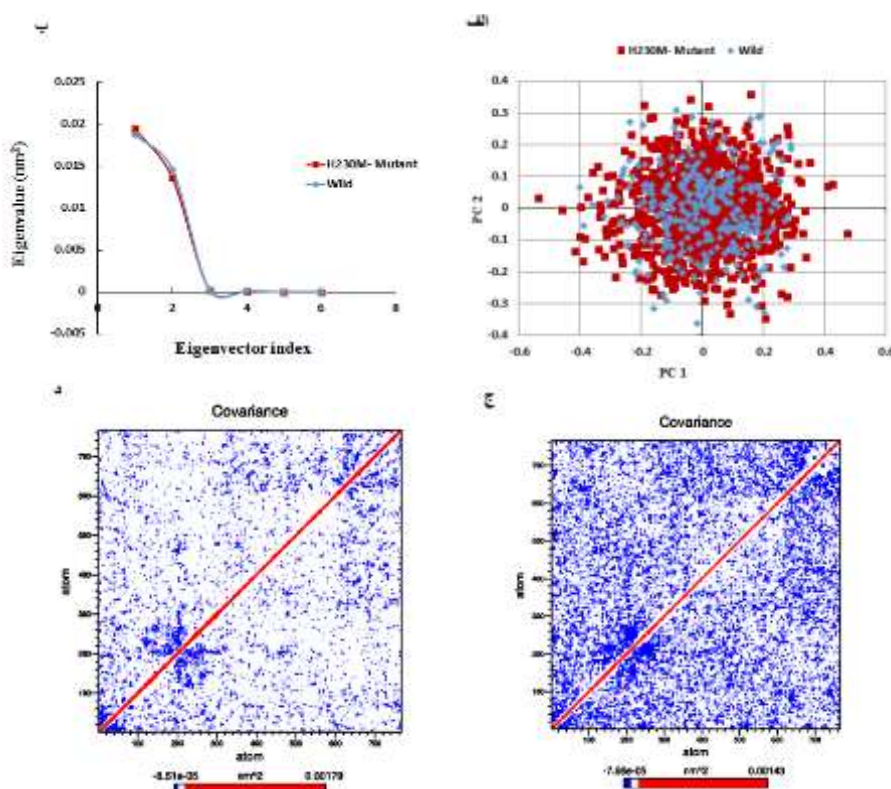
جهش ناشی از تغییرات در تشکیل پیوندهای هیدروژنی و نقش آنها در همبستگی متقاطع پویا
DCCM (نقشه همبستگی پویا) برای کلیه سیستم‌ها (شکل ۵- ج و د) در ۳۰۰ درجه کلون تجزیه و تحلیل شد. کاهش کلی در همبستگی مثبت، در سیستم وحشی مشاهده شده است که ممکن است در درجه اول ناشی از بی‌ثبات‌سازی چندین پیوند هیدروژنی باشد. مشاهدات فوق حاکی از آن است که هم جهش‌یافته و هم نوع وحشی کاهش همبستگی مثبت را نشان می‌دهند. نتایج همچنین بیانگر این مطلب است که ارتباط مثبت در مناطق مختلف جهش‌یافته می‌تواند به اثرات محلی در H230M جهش‌های داخلی ناشی از تثبیت مجموعه-های مختلف پیوندهای هیدروژنی نسبت داده شود.

آنالیز مؤلفه اصلی (PCA)

همان‌طور که در شکل ۵- الف نشان داده شده است، نمودار پراکندگی حاصل از پروتئین وحشی و جهش‌یافته، تفاوت کمی بین این دو سیستم را نشان می‌دهد و حرکت کلی بین دو سیستم، مشابه است. همچنین ساختار جهش‌یافته نسبت به ساختار وحشی توزیع چگالی اتمی بالاتر و فضای فازی مشابهی را اشغال می‌کند و نوسان بالاتری را نشان می‌دهد.

آنالیز دینامیک اساسی (ED)

آنالیز دینامیک اساسی ساختار وحشی و جهش‌یافته در مدت ۷۰ نانوثانیه نشان می‌دهد که تنها تعداد معدودی از بردارها دارای مقادیر ویژه‌ای هستند (شکل ۵- ب). تشخیص ماتریکس کوواریانس نشان داد که سیستم جهش‌یافته در زمان شبیه‌سازی میزان بیشتری از نوسانات را تجربه کرده است. به طور خاص، هر یک



شکل ۵. اثرات دینامیکی جهش H230M بر پروتئین *CoxB*. (الف) نقشه پراکندگی PCA در طول دو مؤلفه اصلی، PC1 و PC2 اولیه که توزیع مشابهی بین پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته را نشان می‌دهد. (ب) تجزیه و تحلیل دینامیک اساسی. مقادیر ویژه برای پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته به عنوان تابعی از بردارهای ویژه. (ج و د) مقایسه ماتریکس‌های همبستگی متقابل بین پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته. ماتریکس همبستگی متقابل اتم‌های کربن آلفا در طی ۷۰ نانوثانیه شبیه‌سازی برای پروتئین (الف) وحشی و (ب) جهش‌یافته.

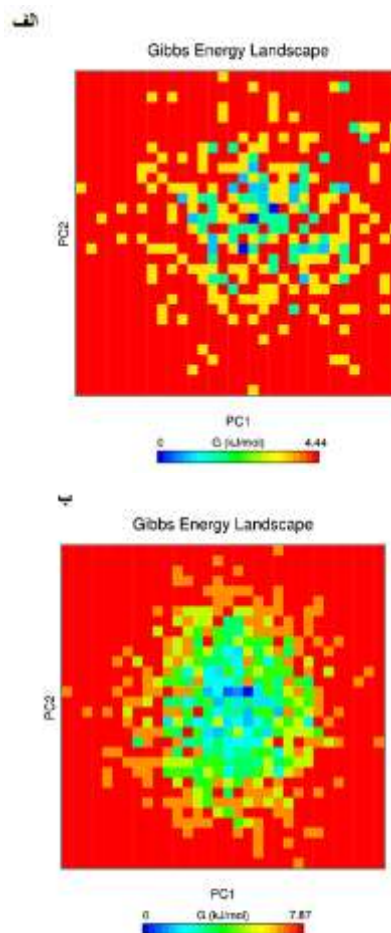
چشم‌انداز انرژی آزاد (FEL)

چشم‌انداز انرژی آزاد برای همه کربن‌های آلفای هر دو سیستم انجام شد. FEL در برابر دو مؤلفه اصلی PC1 و PC2 مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد مقدار ΔG از صفر به $4/44$ کیلوژول بر مول برای وحشی و از صفر تا $7/87$ کیلوژول بر مول برای جهش‌یافته تغییر یافته است (شکل ۶). کمترین میزان انرژی برای سیستم نوع وحشی $0/185$ کیلوکالری بر مول است. درحالی‌که نوع جهش‌یافته $0/328$ کیلوکالری بر مول است، این نشان می‌دهد که جهش باقی‌مانده H230M بر پایداری سازگاری کلی سیستم تأثیر گذاشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

سیتوکروم c اکسیداز به‌عنوان آنزیم انتهایی در زنجیره تنفسی عمل می‌کند. این آنزیم با انتقال اکسیژن مولکولی و تولید آب باعث انتقال‌الکترون در غشا می‌شود (Amdursky et al., 2015). نتایج حاصل از آنالیز RMSD نشان می‌دهد که مقدار انحراف جذر مربع میانگین پس از ایجاد جهش، به مقدار ناچیزی کاهش یافته که این تغییر بسیار کم و در جهت افزایش پایداری می‌باشد. باقی‌مانده 230 در ناحیه پیچہ تصادفی و در اتصال با اتم CuA قرار دارد. نتایج بیانگر این مطلب است که تبدیل اسیدآمینۀ بازی به خنثی تغییر زیادی در ساختار و پایداری پروتئین ایجاد نکرده است. نتایج RMSF نشان می‌دهد که با تبدیل اسیدآمینۀ آروماتیک به خطی، مقدار RMSF کمی پس از ایجاد جهش افزایش می‌یابد که این تغییر بسیار ناچیز و در جهت افزایش پایداری می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز Rg نشان می‌دهد که مقدار شعاع ژیراسیون پس از ایجاد جهش، اندکی افزایش یافته است. این افزایش شعاع ژیراسیون بدین معنی است که ساختار پروتئین کمی بازتر از حالت وحشی شده است. با توجه به نتایج RMSD و RMSF می‌توان ادعا کرد که این افزایش شعاع ژیراسیون روی پایداری پروتئین تأثیر چندانی ندارد. آنالیز تغییرات در دسترسی پروتئین به حلال نشان‌دهنده افزایش SASA پس از ایجاد جهش می‌باشد. نتایج این آنالیز با نتایج حاصل از آنالیز شعاع ژیراسیون مطابقت دارد.

نتایج حاصل از آنالیز ساختار دوم پروتئین نشان می‌دهد که ساختار دوم CoxB بعد از ایجاد جهش تفاوت کمی نسبت به نوع وحشی داشته است و پایداری این پروتئین همچنان حفظ شده است. مطالعات Song et al. (2003) نقش تریپتوفان ۱۲۱ در دمین CuA محلول سیتوکروم c اکسیداز نشان می‌دهد که پس از ایجاد جهش W121L و W121Y و ایجاد جهش حذفی W121 از دمین محلول



شکل ۶. نمایشی از طرح انرژی آزاد از فضای بنای فضایی پروتئین وحشی و جهش‌یافته بر روی PC1 و PC2 تولیدشده از PCA. منظره انرژی آزاد در طول دو مؤلفه اصلی PC1 و PC2 پروتئین (الف) وحشی و (ب) جهش‌یافته، که در آن آبی تیره نشان‌دهنده کمترین میزان انرژی و قرمز بالاترین میزان انرژی را نشان می‌دهد.

FLT3 تأثیر آن در ساختار پروتئین FLT3- بیانگر این مطلب بود که ساختار پروتئین جهش یافته، فضای بیشتری را نسبت به پروتئین وحشی اشغال می‌کند. اسپارتیک اسید یک گروه اسیدی هیدروفیلی را با شارژ منفی قوی حمل می‌کند و اتصال به مولکول‌های شارژ مثبت و یون‌ها هدایت می‌کند، در حالی که اسپاراژین در ساختار خود حاوی آمید است. این گروه آمید تحت شرایط pH زیستی هیچ باری را حمل نمی‌کند. گروه کربوکسیل اسید اسپارتیک به گروه آمید اسپاراژین تبدیل می‌شود و به صورت طبیعی قطبی می‌شود. نتایج بیانگر این مطلب است که پس از تبدیل اسید آمینه اسیدی به آبدوست، ساختار پروتئین بازتر می‌شود و در نتیجه میزان چگالی افزایش می‌یابد (Rayapadi *et al.*, 2016).

نتایج آنالیز حاصل از ضخامت غشای دولایه POPC نشان‌دهنده کاهش ضخامت غشا در اطراف پروتئین جهش یافته نسبت به نوع وحشی است. این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز Rg مطابقت دارد. مطالعات Sahoo & Fujiwar (2016) روی پپتید BMAP27 ضدباکتری گاوی کاتلیسیدین انجام شد. ضخامت غشا برای غشای متعادل (بدون BMAP27) و غشای شبیه‌سازی شده (با BMAP27)، در سیستم POPC، محاسبه شد. نتایج بیانگر این مطلب بود که تغییر ضخامت کمتر از ۵ آنگستروم بود. این نتیجه با یافته‌های تجربی سازگار است که نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در عملکرد نفوذپذیری BMAP27 در غشاهای آنیونی و زوئتریونیک پس از جهش F10A یا تغییرات هیدروفوبیک خالص است.

آنالیز مؤلفه اصلی یا دینامیک اساسی روی پروتئین وحشی و جهش یافته انجام شد. این تجزیه و تحلیل برای کنترل حرکات کلی کمپلکس استفاده شد. نتایج ما نشان داد که حرکت کلی بین دو سیستم مشابه است. نتایج ما با مطالعات قبلی مطابقت دارد. Imani *et al.* (2018) با اشاره به جایگزینی پرولین با لوسین

سیتوکروم c اکسیداز پاراکوکوس ورسیتوس، ساختار ثانویه پروتئین به طور معنی داری در جایگزینی و حذف موتاسیون‌های W121 تغییر یافت و فعالیت انتقال الکترون آنها با سیتوکروم c به شدت مهار شد. به نظر می‌رسد که حلقه آروماتیک، اندازه زنجیره جانبی و توانایی پیوند هیدروژنی W121 برای ساختار و عملکرد محدوده CuA محلول مهم هستند.

آنالیز متوسط کمترین فاصله بیانگر این مطلب است که پروتئین پس از ایجاد جهش همچنان پایداری خود را حفظ نموده است. تنها تغییرات کمی بین دامنه زنجیره $\alpha 2$ و $\alpha 3$ رخ داده است. این تغییرات ناچیز بوده و منجر به گسیختگی بین باقی‌مانده‌ها و باز شدن ساختار پروتئین نشده است. نتایج ما مطابق با نتایج زیر بود. مطالعات انجام شده توسط Pahari *et al.* (2013) در خصوص ویژگی جنسیتی در هموگلوبین حامل طبیعی انسان نشان می‌دهد که جنسیتی بین زیرواحدهای HbA، به اندازه کافی دور از هم قرار دارد. نزدیک‌ترین فاصله جنسیتی به هر یک از چهار گروه هم، تقریباً ۱۸ آنگستروم است (گروه هم از $\alpha 1$ و $\beta 2$) و تأکید می‌کند که لیگاند در اتصال به اکسیژن و در عملکرد بیولوژیکی HbA دخالت نمی‌کند. در ساختار تترامر هموگلوبین طبیعی، اکسیژن نقش مهمی را در عملکرد هموگلوبین ایفا می‌کند. تغییرات اندکی در ارتباط بین دامنه‌های زنجیره $\alpha 1$ و $\beta 1$ و همچنین بین $\alpha 1$ و $\beta 2$ مشاهده می‌شود. اما ارتباط کلی ضروری بین هر دو زنجیره‌ای بر اتصال جنسیتی به HbA غلبه می‌کند (Pahari *et al.*, 2013).

توزیع اتم‌های پروتئین، POPC و پروتئین POPC- قبل و بعد از جهش بیانگر این مطلب بود که ساختار پروتئین جهش یافته، فضای بیشتری را نسبت به پروتئین وحشی اشغال می‌کند که این تغییر بسیار کم می‌باشد. این نتیجه با نتایج حاصل از تغییر ساختار دوم پروتئین پس از جهش مطابقت دارد. مطالعات Rayapadi *et al.* (2016) روی جهش D835N در

بین باقیمانده‌های اصلی، انرژی اتصال کلی را بهبود بخشید. مطالعه آنها نشان داد که جهش دو باقیمانده اصلی در نزدیکی سایت فعال، بر نمای کلی ساختارسیستم تأثیر می‌گذارد، بنابراین میانکنش‌ها را تغییر می‌دهد. اما جهش نمای انرژی آزاد یا انرژی گیبس را در طول زمان شبیه‌سازی تغییر می‌دهد. بنابراین ساختار بنای فضایی پروتئین مشابه با نوع وحشی، پایدار خواهد بود. ما می‌توانیم نتیجه بگیریم که جهش می‌تواند با انتقال یک الکترون به مولکول اکسیژن از مسیر سیگنالینگ یک مولکول آب را تولید کند.

سپاسگزاری

از آقای جعفری به‌خاطر توصیه‌های ارزشمند فنی ایشان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نوسانات بالاتری را در نوع جهش‌یافته نشان دادند، زیرا جهش مذکور به دو نوع باقی‌مانده مختلف مربوط بود. برای کشف اثرات فیزیکوشیمیایی جهش در تغییرات بنای فضایی و پایداری پروتئین، آنالیز چشم‌انداز انرژی آزاد برای سیستم‌های وحشی و جهش‌یافته در مدت زمان شبیه‌سازی انجام شد. جهش در باقی‌مانده علاوه بر افزایش در انرژی اتصال کلی، شکل پروتئین را تغییر می‌دهد، اما این اختلاف انرژی معنی‌دار نیست. مطالعات نشان می‌دهد که جهش باقی‌مانده اصلی در نزدیکی محل اتصال *cyc1* بر نمای کلی ساختار سیستم تأثیر می‌گذارد. نتایج ما با مطالعه *Aier et al.* (2016) مطابقت نداشت، زیرا آنها تأثیر جهش در تقویت‌کننده *zeste homolog 2 (EZH2)* را ارزیابی کردند. جهش در باقی‌مانده علاوه بر تغییر شکل پروتئین و تعامل اتمی

REFERENCES

- Aier, I.; Varadwaj, PK.; Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Scientific Reports*. 6(34984): 34984-94.
- Amdursky, N.; Sepunaru, L.; Raichlin, S.; Pecht, I.; Sheves, M.; Cahen, D. (2015). Electron Transfer Proteins as Electronic Conductors: Significance of the Metal and Its Binding Site in the Blue Cu Protein. *Azurin. Adv. Sci.* 2(4): 1-11.
- Barrett, ML.; Harvey, I.; Sundararajan, M. (2006). Atomic Resolution Crystal Structures, EXAFS, and Quantum Chemical Studies of Rusticyanin and Its Two Mutants Provide Insight into Its Unusual Properties. *Biochemistry*. 45(9): 2927-2939.
- Berg, JM.; Tymoczko, JL.; Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th ed. WH Freeman and Company NewYork. P.894.
- Chandra Patra, M.; Kumar Pradhan, S.; Narayan Rath, S.; Maharana, J. (2013). Structural analysis of respirasomes in electron transfer pathway of *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a computer-aided molecular designing study. *ISRN Biophysics*. 295718(1): 1-14.
- Farahmand, S.; Fatemi, F.; Haji Hosseini, R., (2019). Sequencing of the *rus* gene before and after the mutation with DES in the bacterial *Acidithiobacillus ferrooxidans* sp. FJ2. *Nova Biologica Reperta*; 6(1): 50-60.
- Hernández VA.; Eriksson EK.; Edwards K. (2015). Ubiquinone-10 Alters Mechanical Properties and Increases Stability of Phospholipid Membranes. *BBA*. 1848(10): 2233-2243.
- Imani, S., Cheng, J., Dehghan Shasaltaneh, M., Wei, C., Yang, L., Fu, S., *et al.* (2018). Genetic identification and molecular modeling characterization reveal a novel PROM1 mutation in Stargardt4-like macular dystrophy. *Oncotarget*. 9(1): 122-141.
- Luthen, H.; Bottger, M. (1988). Hexachloroiridate IV as an Electron Acceptor for a Plasmalemma Redox System in Maize Roots. *Plant Physiol*. 86(4):1044-1047.

- Pahari, B.; Chakraborty, S.; Sengupta, B.; Chaudhuri, S.; Martin, W.; Henley, J.; *et al.*; (2013). Biophysical Characterization of Genistein in Its Natural Carrier Human Hemoglobin Using Spectroscopic and Computational Approaches. *FNS*. 4(1): 83-92.
- Rayapadi, GS.; Sudha, R.; Anand, A. (2016). Molecular Dynamics Studies on D835N Mutation in FLT3-Its Impact on FLT3 Protein Structure. *J. Cell. Biochem*. 117(6): 1439-1445.
- Sahoo, BR.; Fujiwara, T. (2016). Membrane Mediated Antimicrobial and Antitumor Activity of Cathelicidin 6: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulation on Multi-Microsecond Scale. *PLoS One*. 11(7): 1-26.
- Song, AX.; Li, LZ.; Yu, T.; Chen, SM.; Huang, ZX. (2003). Role of tryptophan 121 in the soluble CuA domain of cytochrome c oxidase: structure and electron transfer studies. *Protein Eng*. 16(6): 435-41.
- Wei, W.; Zhang, X.; Shen, F. (2016). Data set for phylogenetic tree and RAMPAGE Ramachandran plot analysis of SODs in *Gossypium raimondii* and *G. arboretum*. *Elsivier*. 9(1): 345-348.