Study of the Effect of Multi-Walled Carbon Nanotube on Human Hepcidin 20 by Using Molecular Dynamics Simulation

Rasoolzadeh R.¹ PhD, Mehrnejad F.^{*2} PhD, Taghdir M.³ PhD, Yaghmaei P.¹ PhD,

¹ Biology Department, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Life Sciences Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

The interactions between carbon nanotubes (CNTs) and proteins were considered much attention. Advanced CNT applied biomolecules require a mutual understanding of their interactions with biological molecules. Noncovalent interactions of blood peptides, such as hepcidin, with carbon nanotubes, have important effects in a wide range of biological applications that are detected by analyzing the thermodynamic parameters of the interaction between CNTs and peptides. In addition, the effects of different parameters in order to evaluate how the interaction of CNTs with peptide affects, structural changes and stability of peptides were studied. In this study, based on molecular dynamics (MD) simulation, the structural changes of hepcidin 20 in interaction with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH) were investigated. The simulation results revealed that carbon nanotubes cause to loose the hepcidin structure and make structural changes in this peptide. On the other hand, the loose of the hepcidin structure may lead to a change in amount of its activity. The results indicated that significant changes were made in the structure of hepcidin 20 in the presence of carbon nanotubes. The difference of parameter amounts calculated in hepcidine 20 is related to movement of the loop regions and its N-terminal.

Keywords

Carbon Nanotube [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Carbon+Nanotube]; Hepcidin [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68064451]; Molecular Dynamics Simulation [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Molecular+Dynamics+Simulation]; Interactions [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019471]

 Corresponding Author

 Tel:

 Fax:

 Post Address: Life Sciences Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

 mehrnejad@ut.ac.ir

 Received: May 6, 2019
 Accepted: September 30, 2019

 ePublished: March 14, 2020

۱۰۴ رضا رسولزاده و همکاران ـ

مطالعه اثر نانولولههای کربنی چندجداره روی هپسیدین ۲۰ انسانی با استفاده از شبیهسازی دینامیک مولکولی

رضا رسولزاده PhD

گروه زیستشناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فرامرز مهرنژاد^{*} PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مجيد تقدير PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پریچهره یغمایی PhD

گروه زیستشناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیدہ

برهمکنش میان نانولولههای کربنی (CNTs) با پروتئینها مورد توجه زیادی قرار گرفته است. کاربردهای بیومولکولی پیشرفته نانولولههای کربنی نیاز به درک متقابل برهم کنش آنها با مولکولهای زیستی دارند. برهم کنش غیرکووالانسی پپتیدهای خونی مانند هپسیدین با نانولولههای کربن اثرات مهمی در طیف گستردهای از کاربردهای بیولوژیکی دارد که از طریق آنالیز پارامترهای ترمودینامیکی برهم کنش بین نانولولههای کربنی و پپتیدها شناسایی میشوند. علاوه بر این اثرات پارامترهای مختلف در نحوه برخورد نانولولهها با پپتید، تغییرات ساختار و پایداری پپتید مورد بررسی قرار میگیرند. در این مطالعه که براساس شبیهسازی دینامیک مولکولی انجام شد، تغییرات ساختاری هپسیدین ۲۰ در برهمکنش با نانولوله چندجداره کربوکسیله (MWCNTs-COOH) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از شبیهسازی نشان داد که نانولولههایکربنی موجب بازشدن ساختار هپسیدین ۲۰ و ایجاد تغییرات ساختاری در این پپتید می شوند. از طرفی بازشدن ساختار هپسیدین احتمالاً منجر به تغییر میزان فعالیت آن میشود. نتایج حاکی از این بود که تغییرات قابل توجهی در ساختار هپسیدین ۲۰ در حضور نانولوله کربنی ایجاد میشود که این اختلاف مقادیر بهدلیل تحرکات و جابهجاییهای لوپ و انتهای آمینی آن است.

کلیدواژهها: نانولوله کربنی، هپسیدین، شبیهسازی دینامیک مولکولی، برهم کنش

ریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۶
ریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۸
ویسنده مسئول: mehrnejad@ut.ac.ir

مقدمه

از جمله پپتیدهای خونی، یک هورمون پپتیدی به نام پپتید هپسیدین است که در کبد ساخته میشود. این پپتید در سال ۲۰۰۰ میلادی کشف شد و توسط هپاتوسیتها ابتدا بهصورت پیشساز میلادی کشف شد و توسط هپاتوسیتها ابتدا بهصورت پیشساز میلادی کشف شد و توسط هپاتوسیتهای سنتز و نهایتاً پس از پردازش به فرم بیولوژیکی فعال ۲۰ و ۲۵ اسیدآمینه تبدیل میشود. دو نوع پپتید هپسیدین وجود دارد:

۱) هپسیدین ۲۰ با تعداد ۲۰ اسیدآمینه و با وزن مولکولی ۲/۲کیلودالتون

هپسیدین علاوه بر نقش ضدمیکروبی، بهعنوان اصلیترین تنظیم کننده آهن خون در انسان و سایر پستانداران شناخته میشود. نقش این هورمون در تنظیم مقدار جذب آهن از مخاط روده است که در نتیجه اثر این هورمون، از جذب بیش از اندازه آهن در روده جلوگیری میشود و سطح آهن در بدن در حالت طبیعی باقی میماند. همچنین، هپسیدین باعث مهار آزادسازی آهن از ماکروفاژها میشود. پایینبودن سطح این هورمون در خون باعث افزایش جذب آهن از غذا و درنتیجه بیشترشدن مقدار آهن در خون می شود. افزایش سطح آهن خون باعث مسمومیت آهن و بیماریهایی مانند هموکروماتوز میشود[2]. این پپتید توسط ژنی به نام HAMP در کبد کد و میزان هپسیدین با توجه به نیاز آهن بدن و شرایط التهابی تنظیم می شود. آنمی، هیپوکسی و افزایش اریتروپوئز باعث کاهش بیان هپسیدین و عواملی چون افزایش بار آهن، ترانسفرین رسپتور ۲ (TFR2 فاکتور رونویسی SMAD4)، یروتئین مورفوژنتیک استخوان و سیتوکینهای التهابی، باعث افزایش بیان هپسیدین میشود. هموکروماتوز یا سرریز و زیادی آهن در خون یک اختلال ارثی در متابولیزم آهن است که در آن تجمع آهن در ارگانها و بافتهای مختلف دیده میشود. مشکل اصلی در زیادی جذب آهن از لوله گوارش است. محل اصلی تجمع آهن کبد، غدد درونریز مانند آدرنال، لوزوالمعده و قلب است^[3]. با توجه به استفاده روزافزون از نانولولههای کربنی و افزایش در

با توجه به استفاده روزافزون از نانولولههای کربنی و افزایش در معرض قرارگیری انسان با آنها، تصور بسیاری از دانشمندان این است که واکنشهای زیستی و سمیت در خصوص نانولولههای کربنی، همانند نانومواد دیگر وجود دارد. همچنین نشان داده شده است که به ویژگیهای فیزیکی متعددی مانند طول، قطر، سطح، تمایل به متراکمشدن، دیسپرسیتی، وجود و ماهیت کاتالیزور باقیمانده و همچنین گروههای عاملی شیمیایی این نانومواد بستگی دارد. در محیطهای زیستی که برهمکنش نانولولههای کربنی با پروتئینها و تداخل با ساختار آنها انجام میشود، احتمال دارد که سمیت نانولولههای کربنی باعث مرگ سلولی شود^[4].

نانولولهها با اختلال در عملکرد طبیعی پروتئینها باعث افزودن و یا کاستن یکسری خصوصیات خاص به پروتئینها میشوند که درنتیجه، عملکرد آنها را میتوانند تحت تاثیر قرار دهند^[5]. به همین علت و بهخصوص با توجه به روند رو به رشد کارآیی نانولولههایکربنی در دارورسانی بررسی سمیت آنها در محیطهای زیستی و تلاش برای رفع این مشکل ضروری است^[6].

در برهمکنش پیپتید با نانولولهها، برای تعیین طبیعی یا غیرطبیعیبودن ساختار پپتید ابتدا باید ساختار پپتید مطالعه شود. مطالعه حاضر میتواند در درک بهتر تغییرات کنفورماسیونی پپتید هپسیدین در برهمکنش با نانولولههایکربنی موثر باشد^[7]. از طرفی در این مطالعه از شبیهسازی دینامیک مولکولی استفاده شد که

استفاده از این شبیهسازی میتواند در درک مکانیزم برهمکنش نانولولهکربنی با هپسیدین و بررسی جزئیات لازم در سطح مولکولی و اتمی موثر باشد^[8,9].

مواد و روشها

در این مطالعه از پپتید هپسیدین ۲۰ انسانی استفاده شد. این پپتید با کد 1M4E از بانک اطلاعاتی پروتئینها (RCSB) استخراج شد. نانولوله نیز با نرمافزار Nanotube Modeler طراحی شد. نانولوله کربنی از نوع کایرال و دودیواره با کایرالیته^[10, 11] استفاده شد. مطالعات ساختاری این پپتید با نرمافزارهای Pymol و VMD انجام شد^[12]. تمام شبیهسازیهای دینامیک مولکولی نیز با استفاده از نرمافزار گرومکس ۵/۰۱ (GROMACS 5.01) انجام شد^[13, 14]. هر کدام از شبیهسازیهای مربوط به پپتید بهتنهایی و برهمکنش آن با نانولوله دوجداره به مدت ۲۰۰نانوثانیه انجام شد. میدان نیرو برای تمامی سیستمها GROMOS 54A7 و محیط آبی با مدل SPC انتخاب شد^[15]. فاصله cutoff برای برهم کنشهای الکتروستاتیک و واندروالس کوتاهبرد، برابر یک بود. الگوریتم PME (Particle Mesh Ewald) برای محاسبه برهمکنشهای الکتروستاتیک بلندبرد مورد استفاده قرار گرفت. طول و زوایای تمامی پیوندها با گام زمانی ۲فمتوثانیه با استفاده از الگوریتم LINCS محاسبه شد. برای انجام یک شبیه سازی مناسب نیاز است که سیستم از نظر هندسی و جهتگیری مولکولهای حلال معقول و منطقی باشد. برای این منظور مراحلی تحت عنوان NVT 9 (Number of particles, Volume, and Temperature) (Number of particles, Pressure, and NPT (Temperature در شبیهسازی دینامیک مولکولی در نظر گرفته شدهاند که طی این مراحل مولکولهای حلال و یونها در اطراف حلشونده به تعادل میرسند. برای جلوگیری از انحراف موقعیت پروتئین طی شبیهسازی دینامیک مولکولی مدتزمان مراحل NVT و NPT در سیستمهای مورد استفاده در مطالعه حاضر به ترتیب ۲۰۰ پیکوثانیه و ۱۰۰۰ پیکوثانیه در نظر گرفته شد^[16, 17].

پس از انجام مراحل فوق سیستم از لحاظ دمایی و فشاری به یک تعادل بسیار خوبی رسیده و آماده است که برای انجام مرحله اصلی یعنی اجرای شبیهسازی مولکولی استفاده شود. همانطور که گفته شد هر کدام از شبیهسازیهای مربوط به پپتید و برهمکنش آن با نانولوله دوجداره کربوکسیله به مدت ۲۰۰نانوثانیه انجام شد. جدول ۱ جزئیات مربوط به زمان تمامی شبیهسازیهای این مطالعه را نشان میدهد (شکل ۱).

جدول ۱) شبیهسازیهای انجامشده در مطالعه حاضر و طول زمانی مربوط به هر کدام

سیستم مورد نظر	جمع کل زمان (نانوثانیه)
پپتید هپسیدین ۲۰	٢٠٠
پپتید هپسیدین ۰++MWCNT-COOH	٢٠٠



شکل ۱) ساختار هپسیدین ۲۰ با کد 1M4E گرفتهشده از سایت WWW.PDB.ORG (با استفاده از این فایل، شکل توسط نرمافزار pymol تهیه شد.)

يافتهها

نتایج حاصل در این شبیهسازی دینامیک مولکولی روی پپتید RMSD هپسیدین ۲۰ در طول ۲۰۰نانوثانیه و در دمای ۳۰۰K، شامل RMSD (Root Mean RMSF،(Root Mean Square Deviation) (Dictionary Secondary DSSP.Square Fluctuation) (Solvent-Accessible SASA .Structure of Proteins) (Radial RDF ،(Radius of gyration) Rg .Surface Area) (Radial RDF ،(Radius of gyration) Rg .Surface Area) (Inurity) بررسی تاثیر نانولوله کربنی از نوع کایرال و دودیواره با کایرالیته¹¹¹ است. در نمودار RMSD هپسیدین ۲۰ در کنار نانولولههای کربنی دودیواره کربوکسیله مشاهده میشود که مقدار نانولوله های کربنی دودیواره کربوکسیله مشاهده میشود که مقدار نانولوله دودیواره کربوکسیله از یک روند تقریباً ثابت پیروی میکنند. میانگین نوسانات هپسیدین ۲۰ در خضور نانولوله کربوکسیله کربوکسیله ۲۳/ه است (نمودار ۱).



نمودار ۱) جذر میانگین مربع تغییرات (RMSD) در ساختار کربنهای آلفای هپسیدین در آب و در حضور MWCNT

۱۰۶ رضا رسولزاده و همکاران ــ

همانطور که در نمودار ۲ (DSSP) مشاهده میشود در قسمت الف، صفحات بتا به وضوح مشخص هستند، اما وقتی هپسیدین در حضور نانولوله دوجداره کربوکسیله قرار میگیرد، از مقدار صفحات بیتا کاسته و به مقدار Coil و Bende افزوده میشود. همانطور که در نمودار ۳ (آنالیز RMSF) نیز نشان داده شده است با توجه به اینکه ساختار پپتید هپسیدین ۲۰ از یک ساختار بتا که نوساناتی وجود دارد که این نوسانات در حضور نانولولههای کربوکسیله کاهش مییابند. این کاهش گویای این است که ساختار اولیه پپتید در حضور نانولولهها دچار تغییر شده است.

طبق نمودار ۴ (Gyration)، تغییرات شعاع ژیراسیون برای هپسیدین ۲۰ در حضور نانولولههای کربوکسیله نسبت به هپسیدین ۲۰ در حضور آب افزایش داشته است. در قسمت انتهای آمینی هپسیدین ۲۰، دو اسیدآمینه ایزولوسین قرار دارد که این اسیدآمینه غیرقطبی است و درنتیجه با نانولوهای کربنی برهمکنش از خود نشان میدهند. درواقع هپسیدین ۲۰ در برهمکنش با نانولولههای کربنی بازتر میشود (نمودارهای ۴ و ۵).

در نمودار ۵ (SASA) برای هپسیدین ۲۰ مشاهده میشود که هپسیدین در حضور نانولوله کربوکسیله سطح قابل دسترس بیشتری به حلال نسبت به هپسیدین ۲۰ در حضور آب دارد. این مقدار برای هپسیدین ۲۰ در حضور نانولوله کربوکسیله در محدوده ۲۱ تا ۲۲نانومترمربع و برای هپسیدین ۲۰ در حضور آب حدود ۱۸ تا ۲۱نانومترمربع است.

براساس نتایج اسیدآمینهها میتوانند روی سطح نانولولههای عاملدار به وسیله برهمکنشهای مختلف از جمله برهمکنش قطبی، برهمکنش π-π (روی دیواره جانبی CNT)، پیوند هیدروژنی و آمید (در انتهای CNT)، پیوند کووالانسی و پیوند هیدروژنی بین مولکولی (روی دیواره خارجی) جذب شوند.

در این مطالعه تابع توزیع شعاعی مربوط به لوپ (Loop)، انتهای آمینی و هر کدام از اسیدآمینههای تشکیلدهنده آنها در ساختار هپسیدین با نانولولهکربنی است. اطلاعات حاصل از RDF میتواند بیانگر موقعیت و جهتگیری هر کدام از اسیدآمینههای تشکیلدهنده لوپ و انتهای آمینی نسبت به نانولولهکربنی باشد. نمودار ۶- ب، RDF مربوط به این ۶ باقیمانده در حضور نانولوله کربنی دودیواره کربوکسیله را نشان میدهد. در ناحیه لوپ، Ser12 گروه هیدروکسیل دارد که زوج الکترون آزاد اکسیژن آن میتواند با آب تشکیل دهد.

لیزین (Lys13) یک اسیدآمینه قطبی با بار مثبت است. هیدروژن موجود در گروه آمین با هیدروکسیل مربوط به گروه کربوکسیل تشکیل آب میدهد که این واکنش خود تاییدی بر نزدیکشدن LYS13 به نانولوله است. از طرفی این اسیدآمینه با داشتن دو گروه آمین، با گروه کربوکسیل تشکیل آمید میدهند که برهمکنش π-π

اسیدآمینه Ile1,3 در قسمت انتهای آمینی با توجه به آلیفاتیکبودن آنها و داشتن گروه آمین، ممکن است با سطح نانولوله و گروه هیدروکسیل آن، پیوندهای هیدروژنی ایجاد کنند. به همین دلیل در فاصله کمتری از نانولوله قرار دارند (نمودار ۶-الف).

در قسمت لوپ رفتار Cys8 بسیار جالب توجه است که بیشترین مقدار RDF را دارد که برابر با ۵/۹۱ است. این اسیدآمینه چون گوگرد و زوج الکترون آزاد دارد، با هیدروکسیل نانولوله، پیوند هیدروژنی درونمولکولی ایجاد میکند (نمودار ۶- ب).



نمودار ۲) آنالیز DSSP هپسیدین ۲۰ در حضور MWCNT-COOH؛ الف) هپسیدین ۲۰ در حضور آب؛ ب) هپسیدین ۲۰ در حضور نانولوله کربنی



نمودار ۳) جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF) در ساختار هپسیدین ۲۰ در آب و در حضور MWCNT



نمودار ۴) شعاع ژیراسیون (Rg) هپسیدین ۲۰ در آب و در حضور نانولولههای کربنی MWCNT



نمودار ۵) سطح قابل دسترس به حلال هپسیدین ۲۰ در آب خالص و در حضور نانولوله کربنی MWCNT



نمودار ۶) توزیع شعاع لوپ (الف) و انتهای آمینی (ب) هپسیدین ۲۰ در اطراف نانولوله کربنی کربوکسیله

بحث

مقدار RMSD در شبیهسازی نشان میدهد که تغییراتی در ساختار هیسیدین ۲۰ در حضور نانولوله کربنی اتفاق افتاده و این نانولوله باعث تغییرات ساختاری در هیسیدین شده است. همچنین آنالیز RMSF نشان میدهد که در حضور نانولوله کربنی انعطاف پذیری ساختار هیسیدین کاهش یافته است. آنالیز سطح در دسترس حلال (SASA) نشان میدهد که در حضور نانولوله کربنی میزان در دسترس قرارگرفتن هیسیدین برای حلال، افزایش یافته است که میتوان نتیجه گرفت ساختار پس از برهمکنش با نانولولهها از طریق لوپ، تا حدودی باز شده است. بنابراین نتایج حاصل به موازات هم و در تایید هم نشان میدهند که نانولوله کربنی موجب ایجاد تغییرات کنفورماسیون در ساختار هپسیدین میشود. آنالیز RDF بهخوبی نشان میدهند که اسیدآمینههای قسمت لوپ و انتهای آمینی با حرکات و جابهجاییهایی که دارند به نانولوله نزدیک و با گروههای عاملی موجود در نانولوله برهمکنش و باعث ایجاد تغییرات ساختاری در پپتید هپسیدین ۲۰ میشوند. محاسبات DSSP نیز گویای این مساله بود، زیرا با کاهش میزان صفحات بتا از استحکام و یایداری پیتید کاسته میشود.

نتيجهگيرى

نتایج حاصل از شبیهسازی نشان داد که نانولولههای کربنی موجب بازشدن ساختار هپسیدین ۲۰ و ایجاد تغییرات ساختاری در این پپتید میشوند. از طرفی بازشدن ساختار هپسیدین ۲۰ احتمالاً منجر به تغییر میزان فعالیت آن میشود.

> **تشکر و قدردانی:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است. **تاییدیهاخلاقی:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است. **تعارض منافع:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است. **سهم نویسندگان:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است. **منابع مالی:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

1- Aschi M, Bozzi A, Di Bartolomeo R, Petruzzelli R. The role of disulfide bonds and N-terminus in the structural properties of hepcidin: Insights from molecular dynamics simulations. Biopolymers. 2010;93(10):917-26.

2- Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood. 2003;102(3):783-8.

3- Cambruzzi E, Pêgas KL, Zettler CG, Ferrari MB. Hemocromatose associada a carcinoma hepatocelular e neoplasias extra-hepáticas. Revista Amrigs. 2012;56(1):67-70.

4- Madani SY, Mandel A, Seifalian AM. A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano Rev. 2013;4(1):21521.

5- Mahmoodi Y, Mehrnejad F, Khalifeh K. Understanding the interactions of human follicle stimulating hormone with single-walled carbon nanotubes by molecular dynamics simulation and free energy analysis. Eur Effects of single-walled carbon nanotube on the conformation of human hepcidin: Molecular dynamics simulation and binding free energy calculations. J Biomol Struct Dyn. 2019;37(8):2125-32.

12- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis. 1997;18(15):2714-23.

13- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1-2:19-25.

14- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: Fast, flexible, and free. J Comput Chem. 2005;26(16):1701-18.

15- Huang W, Lin Z, Van Gunsteren WF. Validation of the GROMOS 54A7 force field with respect to β -peptide folding. J Chem Theory Comput. 2011;7(5):1237-43.

16- Sodeifian GH, Rezaee Marnani H, Razmimanesh F. Study of the drug diffusion, aspirin and ibuprofen, in lipid bilayer cell membrane by molecular dynamics simulation. J Mol Cell Res. 2018;31(2):317-28. [Persian]

17- Safarzadeh M, Pazhang M, Mehrnejad F, Doustdar F, Chaparzadeh N, Rabiei FD, et al. The study of mutations effect on the inactivation of pyrazinamidase by molecular dynamics simulations. J Mol Cell Res. 2015;28(2):266-78. [Persian]

Biophys J. 2018;47(1):49-57.

6- Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. Acs Nano. 2010;4(3):1481-92.

7- Lou K, Zhu Z, Zhang H, Wang Y, Wang X, Cao J. Comprehensive studies on the nature of interaction between carboxylated multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin. Chem Biol Interact. 2016;243:54-61.

8- Ferrario V, Ebert C, Knapic L, Fattor D, Basso A, Spizzo P, et al. Conformational changes of lipases in aqueous media: A comparative computational study and experimental implications. Adv Synth Catal. 2011;353(13):2466-80.

9- Funke SA, Otte N, Eggert T, Bocola M, Jaeger KE, Thiel W. Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. Protein Eng Design Sel. 2005;18(11):509-14.

10- Ottosson J, Fransson L, Hult K. Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. Protein Sci. 2002;11(6):1462-71.

11- Rasoolzadeh R, Mehrnejad F, Taghdir M, Yaghmaei P.