



Structural Comparison of Three Glucoamylase Isozymes in order to Determination of Demonstrator Parameters in Thermal Stability of Proteins via Molecular Dynamics Simulation

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Moshref Ghahfarrokhi A.¹ MSc,
Rafiei-Pour H.A.¹ PhD,
Mahnam K.^{*2} PhD

How to cite this article

Moshref Ghahfarrokhi A, Rafiei-Pour H.A, Mahnam K. Structural Comparison of Three Glucoamylase Isozymes in order to Determination of Demonstrator Parameters in Thermal Stability of Proteins via Molecular Dynamics Simulation. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(3):297-309.

ABSTRACT

Glucoamylase is an important economic enzyme due to its ability to hydrolyze starch and β -D-glucose polymers. Understanding of factors affecting the thermal stability of the glucoamylase enzyme is critical in the production of isoenzymes with high heat or cold stability. In this study, the effect of temperature on the structure and properties of each of the isoenzymes of the mesophilic, thermophilic, and psychrophilic glucoamylase were studied. For this purpose, molecular dynamics simulation was used to assess these factors and structural differences. 240 nanosecond of MD simulation was done for three isoenzymes of glucoamylase in four temperatures at 300, 350, 400, and 450K. The variations of each of these parameters were compared for three isoenzymes, and it was found that among the computable factors in molecular dynamics simulation, electrostatic energy of protein with water, van der Waals energy between proteins and water, free energy of solvation ($\Delta G_{\text{solvation}}$), instability parameter, nonpolar solvent accessible surface, and the total solvent accessible surface can be used to predict thermal stability of a protein during increase of temperature.

Keywords Glucoamylase Enzyme; Mesophile; Thermophile; Psychrophile; Molecular Dynamics Simulation; Thermal Stability

CITATION LINKS

[1] Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources [2] General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* [3] Glucoamylase: Structure/function relationships, and protein engineering [4] Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea* [5] Purification and characterization of the glucoamylase from *Aspergillus niger* [6] Directed evolution of *Aspergillus niger* glucoamylase to increase thermostability [7] Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations [8] Structural features determining thermal adaptation of esterases [9] Effects of temperature and additives on the thermal stability of glucoamylase from *Aspergillus niger* [10] Thermostability of enzymes from molecular dynamics simulations [11] uniprot.org [12] Cloning of gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris* [13] T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment [14] Basic local alignment search tool [15] Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification [16] Comparative protein structure modeling of genes and genomes [17] Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function [18] Molecular simulation studies on B-cell lymphoma/leukaemia 11A [19] Homology modeling, molecular dynamics simulation and essential dynamics on *Anopheles gambiae* D7r1 [20] Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions [21] GROMACS: Fast, flexible, and free [22] GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation [23] Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7 [24] Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

²Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

*Correspondence

Address: Biology Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Postal code: 8818634141

Phone: -

Fax: +98 (38) 32324419

mahnam.karim@sku.ac.ir

Article History

Received: June 23, 2019

Accepted: July 5, 2020

ePublished: September 20, 2020

مقایسه ساختار سه ایزوآنزیم گلوکوآمیلاز به منظور تعیین عوامل نشان‌دهنده پایداری گرمایی پروتئین‌ها با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

آذین مشرف قهفرخی MSc

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

حسینعلی رفیعی‌پور PhD

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

کریم مهنام* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

گلوکوآمیلاز یک آنزیم مهم اقتصادی به دلیل توانایی در هیدرولیز نشاسته و پلیمرهای بتا-دی‌گلوکز است. درک عوامل موثر در گرمادوستی یا سرمادوستی آنزیم گلوکوآمیلاز در تولید ایزوآنزیم‌هایی با مقاومت گرمایی یا سرمایی بالا ضروری است. در این پژوهش، اثر دما روی تغییرات ساختاری هر یک از ایزوآنزیم‌های گلوکوآمیلاز معتدل‌دوست، گرمادوست و سرمادوست به وسیله روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. در کل ۲۴۰ نانوثانیه شبیه‌سازی برای سه ایزوآنزیم گلوکوآمیلاز در چهار دمای ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰K انجام شد. تغییرات پارامترهای ساختاری در هر سه ایزوآنزیم مقایسه و مشخص شد که از بین عوامل قابل محاسبه در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، انرژی الکتروستاتیک پروتئین با آب، انرژی واندروالسی بین پروتئین و آب، انرژی آزاد حلالیت ($\Delta G_{\text{solvation}}$)، پارامتر ناپایداری، سطح در دسترس حلال غیرقطبی و سطح در دسترس کل بهتر و دقیق‌تر می‌توانند برای پیشگویی تغییرات پایداری گرمایی یک پروتئین در اثر افزایش دما به وسیله شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شوند.

کلیدواژه‌ها: آنزیم گلوکوآمیلاز، معتدل‌دوست، گرمادوست، سرمادوست، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، پایداری گرمایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۵

*نویسنده مسئول: mahnam.karim@sku.ac.ir

مقدمه

پایداری حرارتی آنزیم‌ها در دماهای بالا و همچنین مقاومت آنها در دماهای پایین از اهمیت قابل توجهی در استفاده از آنزیم‌ها در فرآیندهای صنعتی برخوردار است. گلوکوآمیلاز (GA; Glucoamylase, $\alpha(1 \rightarrow 4)$ گلوکان‌گلوکوهِیدرولاز، آمیلوگلوکوزیداز) با EC:3.2.1.3 یک آنزیم مهم اقتصادی به دلیل توانایی در هیدرولیز نشاسته و پلیمرهای مربوط به بتا-دی‌گلوکز است. این آنزیم پیوندهای گلیکوزیدی $\alpha(1 \rightarrow 4)$ را از انتهای غیراحیاکننده نشاسته هیدرولیز می‌کند که منجر به تولید گلوکز به عنوان محصول نهایی می‌شود؛ بنابراین مهم‌ترین کاربرد صنعتی آنزیم GA تولید گلوکز است که به نوبه خود به عنوان یک ماده خام

برای تخمیر زیستی در تولید اتانول یا شربت فروکتوز به کار می‌رود^[1].

در فرآیند صنعتی، تبدیل نشاسته به گلوکز، ابتدا به کمک آنزیم آلفا-آمیلاز، نشاسته به دکسترین تبدیل می‌شود که این مرحله در دمای ۱۰۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس در دمای ۹۵°C به مدت یک ساعت به طول می‌انجامد. در مرحله دوم یعنی تبدیل دکسترین به گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد که این مرحله شامل سردکردن دکسترین تا ۶۰°C و نگهداری آن به مدت چند روز است؛ بنابراین افزایش مقاومت گرمایی GA از این دیدگاه اهمیت دارد؛ زیرا سردکردن دکسترین از دمای ۹۵ به ۶۰°C به نگهداری آن برای چند روز، به علت مقرون‌به‌صرفه‌نبودن تهیه کاتالیزگر، زمان طولانی واکنش، راندمان پایین، مشکل جداسازی و خالص‌سازی، سمیت بالا و شرایط سخت واکنش فرآیندی بسیار پرهزینه است^[1].

آنزیم GA از انواع مختلف زیست‌ریزسازواره‌ها، گیاهان و حیوانات به دست می‌آید. البته لازم به ذکر است که بیشتر گلوکوآمیلازها از قارچ‌هایی مانند قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*)، *آسپرژیلوس آواموری* (*Aspergillus awamori*) و *ریزوپوس اوریزا* (*Rhizopus oryzae*) به دست آمده‌اند^[1, 2, 5].

بیشتر گلوکوآمیلازها با ۶۱۶ باقی‌مانده، آنزیم‌های چند دومین شامل دومین واکنشگر، دومین متصل‌شونده به نشاسته و ناحیه اتصال‌دهنده هستند. دومین کاتالیتیکی (CD; Catalytic Domain) به دومین متصل‌شونده به نشاسته (SBD; Starch-Binding Domain) از طریق ناحیه اتصال (Linker)، متصل می‌شود. دومین CD به شکل یک بشکه آلفا (α -barrel) است که حاوی یک جایگاه فعال به شکل قیف مرکزی است. SBD، به شکل یک بشکه بتا ضد موازی (β -barrel) است که دو جایگاه اتصال برای نشاسته یا بتا-دکسترین دارد. بشکه آلفا از ۶ مارپیچ آلفای درونی و ۶ مارپیچ آلفای بیرونی تشکیل شده است و در جایگاه فعال نیز یک قطعه KCK (لیزین-سیستئین-لیزین) بسیار حفاظت‌شده قرار دارد. جایگاه CD شامل کاتالیزگرهای اسید و باز عمومی Glu179 و Glu400 است که در عمق پاکت واقع شده‌اند. SBD شامل ۸ رشته بتای سازمان‌دهی‌شده در ۲ صفحه بتا است که یک ساختار بشکه بتا را تشکیل می‌دهند. ناحیه اتصال‌دهنده، O-گلیکوزیده و غنی از سرین و ترئونین است. قسمت ویژه اتصال‌دهنده، نقش مهمی در پایداری و هضم نشاسته دارد^[3].

6. ساختار سه‌بعدی دومین واکنشگر آنزیم GA از قارچ *آسپرژیلوس آواموری* ایزوآنزیم X100، به کمک روش کریستالوگرافی اشعه ایکس در حالت طبیعی، در pHهای مختلف و در کمپلکس‌هایی با مهارکننده‌های مختلف به دست آمده است. علاوه بر این، ساختار دومین SBD (در حالت محلول) به وسیله طیف‌سنجی NMR به دست آمده است. ژن GA از ایزوآنزیم *آسپرژیلوس آواموری* در مخمر *ساکارومایسس سروزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) دستکاری ژنتیکی و بیان شده است^[5].

در سال ۲۰۰۸، تعدادی آنزیم GA طبیعی از قارچ *آسپریژیلوس آوآموری* در مخمر ساکارومایسز سرویزیه بیان شد و بسیاری از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی این آنزیم مانند فعالیت، دما و pH بهینه آنزیم، پایداری pH و مقاومت گرمایی آنزیم، عملکرد آنزیم بر سوبستراهای مختلف، سینتیک غیرفعال‌شدن گرمایی غیرقابل برگشت آنزیم و پارامترهای ترمودینامیکی بازشدن آنزیم مورد بررسی قرار گرفت[1].

در سال ۲۰۱۴، یک مطالعه تجربی برای خالص‌سازی و بررسی ویژگی‌های آنزیم GA از قارچ *آسپریژیلوس نایجر* صورت گرفت. طی این پژوهش pH بهینه ۶/۵ و دمای بهینه ۳۰°C برای فعالیت و پایداری آنزیم اندازه‌گیری شد[5].

در سال ۲۰۱۵ یک مطالعه روی دو گونه قارچی *آسپریژیلوس نایجر* توسط یانگ لیو و همکاران انجام شد. آنها اثرات مواد افزودنی را در غیرفعال‌شدن گرمایی از دو ایزوآنزیم GA مقاوم به گرما (GAM-1 و GAM-2) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که مواد افزودنی باعث ازدست‌رفتن ساختار منظم و همچنین تخریب ساختار سوم ایزوآنزیم‌ها می‌شود[9].

زایسکه و همکاران، پارامتر ناپایداری را برای بررسی پایداری گرمایی پروتئین‌ها پیشنهاد نمودند. آنها وابستگی پارامتر ناپایداری به دما برای چهار ایزوآنزیم RNase H هومولوگ از موجودات گرمادوست، معتدل‌دوست، گرمادوست متوسط و گرمادوست بررسی کردند و نشان دادند که پارامتر مذکور با دمای ذوب تجربی (T_m) مرتبط است. همچنین نشان دادند که ایزوآنزیم‌های مقاوم به گرما نسبت به ایزوآنزیم‌های معتدل‌دوست و گرمادوست دارای پارامتر ناپایداری کمتری هستند[10].

در روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MDS; Molecular Dynamics Simulation) پارامترهای مختلفی مانند شعاع مولکول، تعداد پیوندهای هیدروژنی و غیره را می‌توان محاسبه نمود. یک سوال مهمی که همیشه مطرح می‌شود این است که به‌وسیله کدام یک از پارامترهای قابل محاسبه در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌توان افزایش پایداری گرمایی آنزیم‌ها را پیشگویی کرد. هدف از این پژوهش مشخص کردن پارامترهایی است که در عین قابل محاسبه‌بودن در شبیه‌سازی، بتوانند بهتر و صریح‌تر پایداری گرمایی آنزیم‌ها و به‌ویژه GA را نشان دهند و به‌کمک آنها بتوان بدون صرف هزینه‌های سنگین مالی و زمانی، پایدارترشدن یک پروتئین در اثر جهش یا هر عامل فیزیکی دیگر را پیشگویی نمود. بنابر بررسی‌های انجام‌شده، تاکنون پژوهشی در مورد بررسی ساختار ایزوآنزیم‌های گرمادوست، گرمادوست و معتدل‌دوست آنزیم GA به‌کمک روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی منتشر نشده است و از این نظر محتوا و نتایج پژوهش حاضر، جدید است.

روش‌ها

این پژوهش در سه بخش انجام شد؛ بخش اول مربوط به هم‌پوشانی- هم‌ترازی چندگانه توالی‌های ایزوآنزیم‌های GA

وجود سه ایزوآنزیم مختلف گرمادوست، سرمادوست و معتدل‌دوست GA در طبیعت یکی از هدیه‌های خداوند به بشر است تا با مقایسه آنها به عوامل ساختاری موثر در سرمادوست و گرمادوست‌شدن این آنزیم پی ببرد؛ زیرا گرمادوست یا سرمادوست‌کردن آنزیم‌های صنعتی یک امر بسیار مهم و حیاتی در مهندسی پروتئین و صنایع مختلف است. طراحی پروتئین با این خواص نیازمند دانستن عوامل موثر در گرمادوست یا سرمادوست‌بودن آنزیم‌ها است. با تعیین این عوامل امکان تولید پروتئین‌های گرمادوست یا سرمادوست به‌وسیله جهش‌های هدف‌دار امکان‌پذیر می‌شود. به‌علاوه به‌کمک این اطلاعات می‌توان با داشتن ترادف یک آنزیم یا ساختار سه‌بعدی آن، گرمادوست یا سرمادوست‌بودن یک آنزیم را پیش‌بینی نمود، بدون اینکه نیاز به تهیه آنزیم و آزمایش‌های پرهزینه باشد.

برای افزایش پایداری گرمایی آنزیم‌های GA، می‌توان جهش‌هایی انجام داد که باعث ایجاد پیوندهای دی‌سولفید اضافی در ساختار آنزیم شوند. همچنین به‌منظور کاهش انعطاف‌پذیری اسکلت اصلی می‌توان یک باقی‌مانده پرولین در ساختار آن وارد کرد[7]. اطلاعات جمع‌آوری‌شده طی ۲ دهه اخیر، تنوعی از عوامل ساختاری و فیزیولوژیکی سهیم در پایداری گرمایی آنزیم‌ها را نشان می‌دهد. عواملی مانند تعداد و نحوه توزیع پل‌های نمکی و میان‌کنش‌های آبگریز، میزان سطح در دسترس حلال قطبی و غیرقطبی و تعداد باقی‌مانده‌های پرولین، آسپارژین و گلیسین در ایجاد تفاوت بین آنزیم‌های گرمادوست و سرمادوست موثر هستند. با این حال هنوز یک مدل کلی و مناسب که به‌طور دقیق گویای پایداری گرمایی بیشتر پروتئین باشد، در دسترس نیست و از این‌رو تولید آنزیم GA گرمادوست برای کاربردهای صنعتی به‌آسانی امکان‌پذیر نشده است[8].

در طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۳ توسط لیو و همکاران انجام شد، بازشدن دومین کاتالیتیکی آنزیم GA از قارچ *آسپریژیلوس نایجر* بر اثر گرما با استفاده از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد که ۱۲ جهش به‌منظور بهبود پایداری گرمایی این آنزیم در دومین کاتالیتیکی طراحی شد. بدین صورت که پیوندهای دی‌سولفید مهندسی‌شده در قفل مارپیچ یازدهم روی سطح دومین کاتالیتیکی پایداری گرمایی را افزایش دادند. جایگزین‌کردن باقی‌مانده‌های G396 و G407 با آلانین، کمی پایداری گرمایی آنزیم را افزایش داد، در حالی که فعالیت اختصاصی و بازده کاتالیتیکی آنزیم کاهش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که باقی‌مانده‌های افزوده‌شده با خاصیت آبگریز بیشتر در کلاف بختانه‌ها بین مارپیچ‌های دوازدهم و سیزدهم مناسب هستند در حالی که حضور آنها به‌صورت جزیی پیوند هیدروژنی و شبکه پل نمکی در مرکز کاتالیتیکی را از بین می‌برد[7].

مک‌دنیل و همکاران، طی یک مطالعه تجربی با استفاده از جهش‌زایی هدایت‌شده در جایگاه خاص، ایزوآنزیم‌های GA جهش‌یافته بسیار مقاوم به گرما را از قارچ *آسپریژیلوس نایجر* جدا کردند[6].

سرمادوست، معتدل دوست و گرمادوست با یکدیگر، به منظور مقایسه و پیدا کردن شباهت‌ها و تفاوت‌های آنها از نظر ساختار اول و همچنین پیدا کردن الگوی مناسب برای آنها بر اساس الگوریتم بلاست (Blast; Basic Local Alignment Search Tool) است. بخش دوم شامل مدل‌سازی متجانس و بخش سوم نیز شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. برای استفاده از سایت‌ها و نرم‌افزارها از مقادیر پیش‌فرض آنها استفاده شد و موارد متفاوت با پیش‌فرض ذکر شده‌اند.

هم‌پوشانی- هم‌ترازی ایزوآنزیم‌های GA

ابتدا، ساختار اول آنزیم سرمادوست (دمای بهینه 15°C) با ۵۹۱ باقی‌مانده حاوی ۳ باقی‌مانده حفاظت‌شده در جایگاه فعال ELW و کد دسترسی K4IBU8^[11]، ایزوآنزیم معتدل دوست (دمای بهینه 35°C) با ۶۴۴ باقی‌مانده شامل ۳ باقی‌مانده حفاظت‌شده در جایگاه فعال DLW و کد دسترسی H2JHL2^[11] و ایزوآنزیم گرمادوست (دمای بهینه 65°C) با ۶۶۷ باقی‌مانده و ۳ باقی‌مانده حفاظت‌شده در جایگاه فعال DLW و کد دسترسی GORZA2^[11, 12] از پایگاه داده Uniprot گرفته شد. سپس توالی Fasta مربوط به ایزوآنزیم‌های GA گرمادوست، معتدل دوست و سرمادوست به سرور T-coffee^[13] داده شد و از این طریق شباهت‌های بین سه ایزوآنزیم بر اساس پارامترهای پیش‌فرض این سرور مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در ابتدای هر سطر M، P و T به ترتیب برای ایزوآنزیم‌های معتدل دوست، سرمادوست و گرمادوست، علامت خط تیره نشان‌دهنده شکاف (Gap) و نقطه نشان‌دهنده شباهت کم بین توالی‌ها، علامت دونقطه نشان‌دهنده شباهت بیشتر و علامت ستاره نشان‌دهنده یکسان بودن باقی‌مانده‌ها بین سه ایزوآنزیم است.

همچنین به کمک سرور Blast (PBlast) بر اساس مقادیر پیش‌فرض‌های آن^[14, 15] برای هم‌پوشانی- هم‌ترازی الگوهای کریستالوگرافی برای مرحله مدل‌سازی به دست آمد. نتایج هم‌پوشانی- هم‌ترازی چندگانه نشان می‌دهد که هر دو ایزوآنزیم‌های GA معتدل دوست و گرمادوست با آنزیم گلیکوزیل هیدرولاز با کد PDB (Protein Data Bank) 2vn4، به ترتیب ۲۱ و ۵۹٪ توالی یکسان دارند، بنابراین ایزوآنزیم‌های GA معتدل دوست و گرمادوست با آنزیم گلیکوزیل هیدرولاز از یک خانواده هستند و ساختار سه‌بعدی یکسان دارند. همچنین چندین الگو با کدهای PDB گلوکوامیلاز 1hag، 2f6d، 4mcj و 2nv4 برای ایزوآنزیم GA سرمادوست پیدا شد که حدود ۳۰-۲۰٪ توالی یکسان داشتند که حاکی از نواحی حفاظت‌شده ایزوآنزیم GA سرمادوست با این الگوها است.

مدل‌سازی متجانس

برای انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به ساختار سه‌بعدی پروتئین به عنوان ساختار شروع نیاز است. به دلیل اینکه ساختار سه‌بعدی آنزیم GA در سه حالت معتدل دوست، سرمادوست و گرمادوست، وجود نداشت به کمک روش مدل‌سازی متجانس و برنامه مدل ۹، مدل این پروتئین‌ها تهیه شد^[16]. از آنجا که

ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های هومولوگ، محافظت‌شده و یکسان است، در روش مدل‌سازی متجانس به کمک یک پروتئین مشابه یا هومولوگ (الگو) با ترادف پروتئین هدف، می‌توان ساختار سه‌بعدی پروتئین هدف را پیش‌بینی کرد^[16, 17]. به وسیله برنامه مدلر و الگوهای ذکر شده برای هر کدام از ایزوآنزیم‌های GA، ۱۰۰۰ مدل ساخته شد و مدلی که کمترین انرژی (Discrete DOPE Optimized Protein Energy)^[18] یا انرژی molpdf را داشت به عنوان بهترین مدل برای آن ایزوآنزیم انتخاب شد. انرژی DOPE یک پتانسیل آماری است که برای ارزیابی مدل‌های متجانس در پیشگویی ساختار پروتئین‌ها استفاده می‌شود. انرژی molpdf هم یک تابع انرژی در برنامه مدلر است^[16]. در مقالات مختلف از هر دوی این انرژی‌ها برای انتخاب بهترین مدل در مدل‌سازی استفاده شده است. به نظر برای انتخاب بهترین مدل از هر کدام از این معیارهای انرژی که مدل حاصله تعداد باقی‌مانده‌های کمتری در نواحی غیرمجاز نمودار رامچاندان داشته باشند، می‌توان استفاده کرد. برای رسم نمودار رامچاندان مدل‌های انتخابی از تارنمای Rampage^[19] استفاده شد. با مقایسه نمودار رامچاندان مدل با نمودار رامچاندان ساختارهای کریستالوگرافی تعداد یا درصد باقی‌مانده‌های مدل که در نواحی مجاز و غیرمجاز و نیمه‌مجاز قرار گرفته‌اند مشخص می‌شود. همچنین نمودار ERRAT^[20] مدل این سه ایزوآنزیم از طریق سرور مربوطه به دست آمد که از طریق آن فاکتور کیفیت کلی برای سه ایزوآنزیم مورد بررسی مشخص شد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یکی از روش‌های محاسباتی رایج است که حرکت اتم‌های پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی را محاسبه می‌کند و اطلاعات دقیق از نوسانات اتم‌ها و تغییرات ساختاری مولکول ارائه می‌دهد^[18, 19]. در این پژوهش با استفاده از برنامه گرومکس^[21, 22] و میدان نیروی g43a1، شبیه‌سازی سه ایزوآنزیم GA گرمادوست، سرمادوست و معتدل دوست با شرایط مرزی متناوب (Periodic Boundary Conditions; PBC) انجام شد. بهترین مدل به دست آمده از مرحله قبل به عنوان ساختار شروع در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. تعداد مولکول‌های آب اضافه‌شده به هر یک از سامانه‌های حاوی ایزوآنزیم‌های گرمادوست، سرمادوست و معتدل دوست به ترتیب ۲۱۰۴۹، ۲۰۴۹۶ و ۲۰۶۴۲ بود. مدل مورد استفاده برای مولکول آب spc216 بود و فاصله بین سطح مولکول پروتئین و لبه جعبه ۱۰ آنگستروم در نظر گرفته شد. برای خنثی کردن بار پروتئین در هر سه ایزوآنزیم، ۱۵ یون سدیم به سامانه‌ها اضافه شد. میان‌کنش‌های الکتروستاتیک دوربرد در سامانه با استفاده از روش PME (Particle Mesh Ewald) محاسبه شد و شعاع قطع ۱۰ آنگستروم برای محاسبه میان‌کنش‌های الکتروستاتیک یا واندروالسی در نظر گرفته شد. شبیه‌سازی در سه مرحله انجام شد؛ در مرحله اول، ساختار پروتئین در حضور مولکول‌های آب و یون‌ها به وسیله الگوریتم کاهش پرشیب و شیب مزدوج کمینه‌سازی شد. در مرحله

نیست. به همین دلیل در از مقایسه پارامترهای سه سویه با هم خودداری شد و فقط تغییر ساختار هر سویه با خودش در اثر تغییر دما بررسی شد. البته تفاوت در ترداف و باقی‌مانده‌های جایگاه فعال در آنزیم‌هایی که عملکرد یکسان دارند به وفور در پروتئین‌ها دیده می‌شود و این مساله یک امر عادی در پروتئین‌ها است.

انرژی DOPE باقی‌مانده‌ها در بهترین مدل و الگوها برای سویه معتدل‌دوست، گرمادوست و سرمادوست در نمودار ۱، نشان‌دهنده هم‌پوشانی و تطابق خوب انرژی DOPE باقی‌مانده‌های الگوها با مدل‌ها است.

همچنین به منظور ارزیابی مدل‌های انتخاب‌شده برحسب انرژی DOPE و molpdf که به‌وسیله برنامه مدلر ساخته شده بود، نقشه رامچاندانر بهترین مدل‌های انتخاب‌شده برای این سه ایزوآنزیم از طریق تارنمای Rampage [19] به‌دست آمد (نمودار ۲).

نتایج مربوط به نمودار ERRAT ایزوآنزیم‌های معتدل‌دوست، گرمادوست و سرمادوست به‌وسیله سرور مذکور به‌دست آمد. برای اختصار از نمایش نمودارهای آن صرف‌نظر می‌کنیم و فقط به ذکر فاکتور کیفیت به‌دست‌آمده از آن اکتفا می‌کنیم. فاکتور کیفیت کلی برای ایزوآنزیم GA معتدل‌دوست برحسب انرژی DOPE برابر با ۳۷/۱ و بر اساس انرژی molpdf برابر با ۳۳/۳ است، بنابراین مدلی که کمترین DOPE را داشت انتخاب شد. تعداد باقی‌مانده‌های موجود در نواحی مجاز، نیمه‌مجاز و غیرمجاز به‌ترتیب ۸۵/۴، ۱۴/۱ و ۵/۵٪ بود.

فاکتور کیفیت کلی برای ایزوآنزیم GA گرمادوست برحسب انرژی DOPE برابر با ۷۲/۵ و بر اساس انرژی molpdf برابر با ۷۷/۱ است؛ بنابراین مدلی که کمترین انرژی molpdf را داشت انتخاب شد. تعداد باقی‌مانده‌های موجود در نواحی مجاز، نیمه‌مجاز و غیرمجاز این مدل به‌ترتیب ۹۳/۵، ۶/۴ و ۲/۲٪ بود.

فاکتور کیفیت کلی برای ایزوآنزیم GA سرمادوست برحسب انرژی DOPE برابر با ۱۴/۶ و بر اساس انرژی molpdf برابر با ۱۲/۵۲ است، از آنجا که فاکتور کیفیت هر دو نزدیک بود، با توجه درصد کم باقی‌مانده‌های موجود در ناحیه غیرمجاز، نمودار رامچاندانر مدلی که کمترین انرژی moldpf را داشت و تعداد باقی‌مانده‌های موجود در نواحی مجاز، نیمه‌مجاز و غیرمجاز به‌ترتیب ۷۷/۳، ۲۱/۲ و ۱/۵٪ بود، به‌عنوان بهترین مدل برای مراحل بعدی کار انتخاب شد.

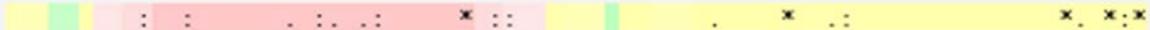
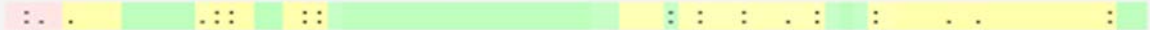
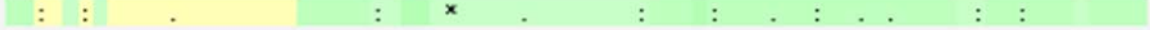
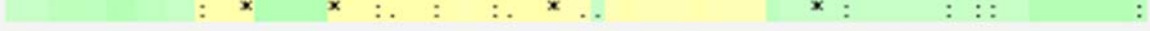
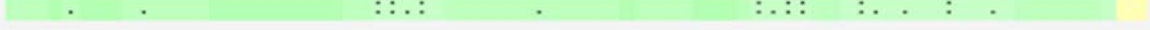
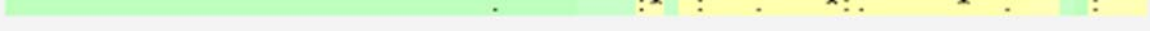
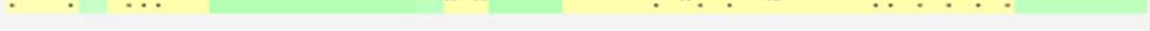
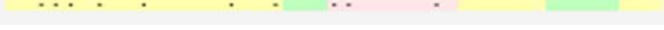
البته با توجه به اینکه این مدل‌ها از بین ۱۰۰۰ مدل ساخته‌شده انتخاب شده‌اند و در مرحله بعد این ساختارها شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و بهینه می‌شوند، حساسیت خیلی زیاد برای انتخاب بهترین مدل لازم نیست. در اکثر مقالات هم برای انتخاب بهترین مدل به درصد باقی‌مانده‌های موجود در نواحی مجاز و غیرمجاز رامچاندانر اهمیت بیشتری نسبت به انرژی DOPE یا انرژی molpdf داده می‌شود.

دوم با محدودکردن حرکت اتم‌های پروتئین به مولکول‌های آب اجازه حرکت و نفوذ به داخل خلل و فرج پروتئین داده شد. این مرحله در دو قسمت یک بار با هنگرد (Canonical Ensemble) هم‌دما و هم‌حجم (NVT) به‌مدت ۵۰۰ پیکوثانیه و یک بار با هنگرد هم‌دما و هم‌فشار (NPT) به‌مدت ۱۰۰۰ پیکوثانیه انجام شد. فشار در شبیه‌سازی یک اتمسفر بود. به این ترتیب، هم مولکول پروتئین حضور آب را احساس می‌کند و هم سامانه از لحاظ فشار و حجم و دما به تعادل می‌رسد. در این مرحله از الگوریتم برنسدن برای ثابت‌نگه‌داشتن دما و فشار استفاده شد. مرحله سوم یا مرحله نمونه‌برداری به‌مدت ۲۰ نانوثانیه در هنگرد NPT برای هر کدام از ایزوآنزیم‌ها در چهار دمای ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰K به‌طور جداگانه انجام شد. در این مرحله از الگوریتم نوز-هاور (Nose-Hoover) برای ثابت‌نگه‌داشتن دما و از الگوریتم پالینو-رحمان (Parrinello-Rahman) برای ثابت‌نگه‌داشتن فشار استفاده شد. ثابت جفت‌شدن دما و فشار برابر ۱/۰ پیکوثانیه در نظر گرفته شد. در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی فقط می‌توان سرعت اتم‌ها را متناسب با دمای واقعی تنظیم نمود یا در هنگام افزایش دما زیاد کرد. لازم به ذکر است که دمای شبیه‌سازی، نسبت به دمای واقعی و فیزیکی، اثر کمتری روی ساختار پروتئین دارد. همچنین در شبیه‌سازی، طول پیوند اتم‌ها ثابت نگه‌داشته می‌شود و اجازه داده نمی‌شود که با افزایش دما پیوندهای کووالانسی ساختار پروتئین شکسته شوند. در این مطالعه تنها اثر افزایش دما را روی ساختارها مقایسه می‌کنیم و به‌طور مقایسه‌ای کار می‌کنیم. یکی دیگر از راه‌های نشان‌دادن پایداری پروتئین و میزان حلالیت آن، محاسبه انرژی آزاد حلالیت است که هر چه کمتر باشد نشان‌دهنده حلالیت بیشتر پروتئین است [23]. در این پژوهش انرژی آزاد حلالیت هر سه ایزوآنزیم در همه دماها محاسبه شد. برای محاسبه انرژی آزاد حلالیت از ۵ نانوثانیه آخر هر شبیه‌سازی ۱۰ ساختار PDB استخراج شد و انرژی آزاد حلالیت این ساختارها توسط برنامه APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) محاسبه شد و سپس از این انرژی‌ها میانگین گرفته شد [24].

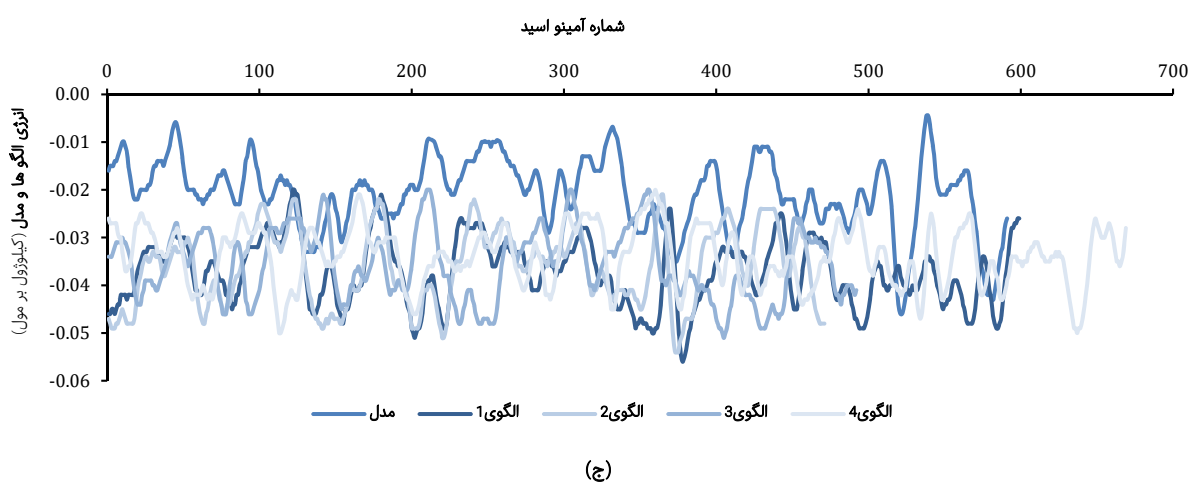
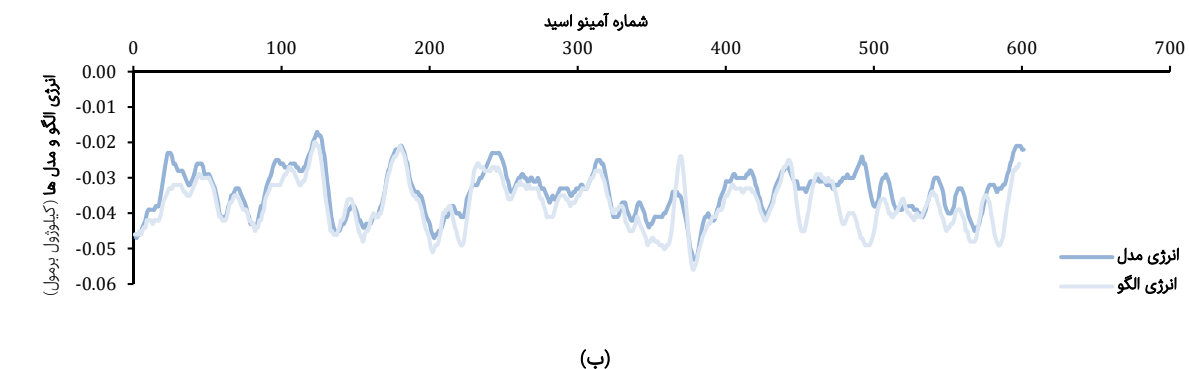
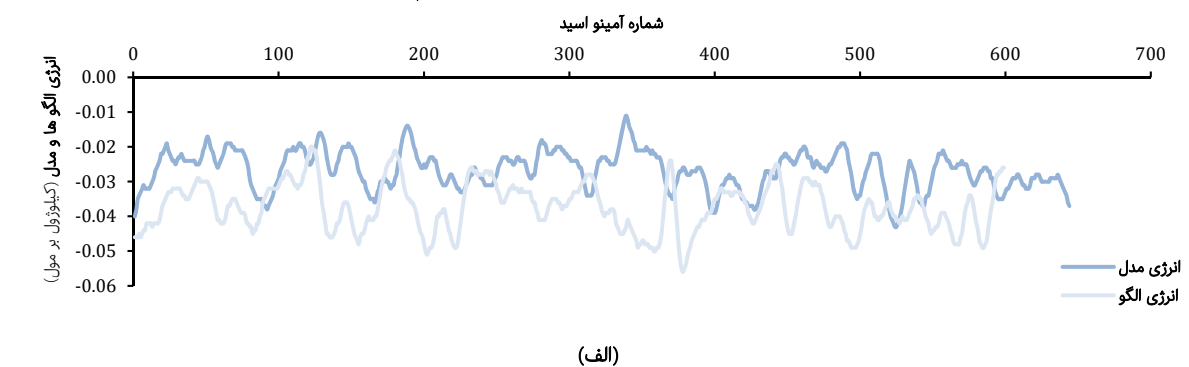
نتایج و بحث

نتایج هم‌پوشانی-هم‌ترازی چندگانه

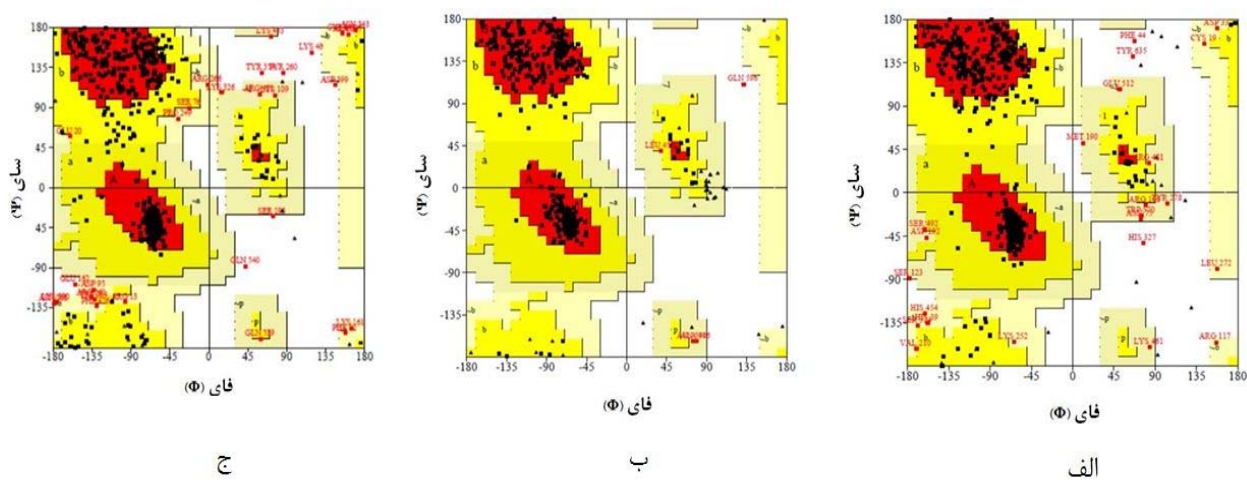
نتایج هم‌پوشانی-هم‌ترازی ترداف ایزوآنزیم‌های معتدل‌دوست، گرمادوست و سرمادوست در شکل ۱ نشان داده شد. در مقایسه ساختار اول این سه ایزوآنزیم ذکر این نکته لازم است که تعداد باقی‌مانده‌ها به‌ترتیب ۶۴۴ و ۶۰۱ و ۵۹۱ عدد بود. این شکل نشان می‌دهد که طول ترداف بین سویه‌ها و همچنین ترداف باقی‌مانده‌های جایگاه فعال متفاوت است. به‌علت تفاوت در اندازه این ایزوآنزیم‌ها، مقایسه پارامترهای ساختاری آنها با هم صحیح

P	MNN--LNYGIIGNCRTAALVSETGSIDWCCLPEFDSAS---VFAKLLDEKKGQFAFHVDDSYEISQVYVKDTSILK
M	MQKSYNNNAISGNSSMLACFSEKAELLRLFWPDIDYVOHLDKMFLGLFDKNKIGSTVWLNDRCDNH0EYLPDSNIIK
T	-----MASLLAHHHQQLLGFVQSCNVSDLIFPGIQLTmpl-----SSLLLLGACAFQSAFARPASGK--RDPHILK
c	
P	TTFSSQNA-----SFEV--YDFL-----PRYLKKDKNYHTPEL--IRYLKVTKGTPKLKVDF--
M	NTVTNFFE-----GYKVVLYDFVHPE-----MDVLVRRLEIENLHNESRELGLMSFSAAASSDSEVACSLFD
T	RAVDSYIERETPIAWNLLCNIGGPNGCRVAGAATGVVVASPSKANPDYFYTWTRDAALVFTSVVDSFSHTYNSTL--
c	
P	--NPKLEYALGNTEIFIKEN-----FI--VGLTEADEFDTLFLYTSLDKEAVANSKEISLTKDAFFLLSYNEKI----
M	FMNEAMVHYKPD SYIAITSDIPVYQFQ--IGNNANDAAINTYLYG---KDDIGMMKDAAVSWDLGVFQPHTVKT VNVY
T	--QTNIQNF IASQAKLQGVTPNSGGLSDGAGLGEPKFHVDLTRF----NGEWGRPQRDGPPLRAIALIRYAKWLKNG
c	
P	-----ELPDME-----ISLDLETTKEYWLNWSSRTPKFGT---Y-DDMILRSAMTLKLLSYDKTGAILAAATT
M	LCASDSLKSKALVRKVKTGGTLAFRETGQYWKNYLEKTTQLKSGNTFLDELYKRSLLVFKLMYNKNSGGLMAAPEA
T	YESTAKTVVWPV-----IQNDLAYTAQYWSGESGFDLWEEVAGNSFFT VASSHRALV-----EGAHLLAAQLG
c	
P	SLPETIGEVRNWDYRFC-----WIRDASMVVKVVSOLGHKRMKRYLOFIIDLIPDKNEKLOIMYGINKEKQLTEKHL
M	DEY--FT--KCGKYAYC-----WGRDAAFITGALDIGGLSESAHFYKWAVK-VQDEGDSWQQRYHMNGN-----L
T	LECRAC--TVAPHVLCYQTFWNSNGNYINSNLNH-GHNRS-----GKDANSILVSIHNFDPVAGCDAATF
c	
P	THLSGYKDSKPVRIAGNAAYAQQNDIYGILVDVIYQELVKFKSDLDN---KEELWTITKGIWVVGKHW-----QEP
M	GPCWGLQVDEGTI-----IWGMLSHYNYTK-----NTDF---LKSVDVSVKAAANFLVRFIDSETGLPSP
T	QPC-S----DRALANHKAYVDSFRSVYSINRGISQGR-----AVAVGRYSEDVY--YNGNPWYLA VFAAAEQ--LYD
c	
P	DKGIWEFRTEDRHFTFSKVL CWVAIDRAIKISKLFDKSSK-LERWKTLEKAIRNDIMENAWNEDMOAFTOSYNSTD L-
M	SFDLWEERYGEHAYSSASVCA--GLRSAAEIAIRILGKAPEDFTIWHQTADNIKKAIVKYFWKEDYRRFIRSIRVKLNG
T	ALYVWK-KQGSITITSVSLPFFRDLLPSITTGTYNRSST----FQSIIDAVQT-----YADDFMAIAEKYTPSDGS
c	
P	-----DASVL-LMETYGFIEAKDPKFVSTVKAIGEHLTNDGLLY--RYKN
M	FGOEPS---GDTMLITVNPKGYYRDVTKEDWIVDVS LVGLGIPFGIFDLDDPMLRDTVSLIEOVLTVOGVGGIKRYEN
T	LTEQFDRNTGAPIAAPHLTWSYAAFITAAERRAGIVPEGWSAQYG--NTVPSSCSRTLQVAGTYATATATATSPPAKQTP
c	
P	KDDFGLPSSSFTIC-----TFW-----YINSLFKIGEVEDAKQQFERLIGYSNHLGLM-----
M	DTYIG--GNPWILT-----TLW-----IALYHAKSGNYEKAKEYLIWAVNGKTEMGLL-----
T	KSGAAPAPSPFPTTCKNANEVYVTFHHRAQTQWGT VKL VGSIPELGSWNTNKA IPL SAVGYTGDSNPLWSITVPLKK
c	
P	SEDIDFKTKRLLGNFPQAY---SHLAL IETAINLSKV-----EKS
M	PEOVNKDTGKPEWIPLTW---SHAMYVHVYSELINA-----GVL
T	GTSFEYKFIKVNNSGVSQWESDPNRSFTPTASGNCPSQTQEASWR
c	

شکل ۱) نتایج همپوشانی-همترازی ترادف سه ایزوآنزیم گلوکوامیلاز گرمادوست (T)، معتدل دوست (M) و سرمادوست (P) به کمک سرور Tcaffee (نواحی حفاظت شده در نوار c نشان داده شده‌اند)



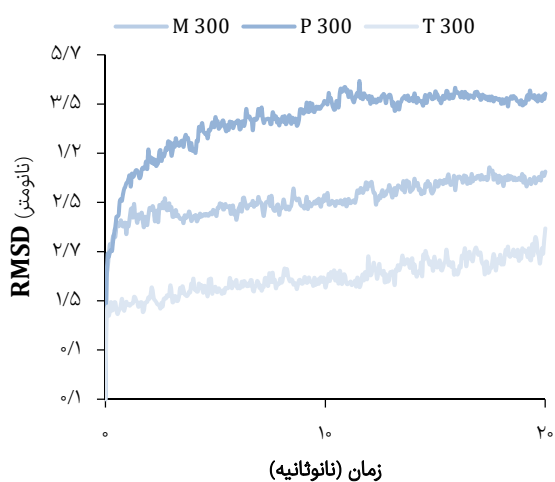
نمودار (۱) مقایسه انرژی DOPE باقی‌مانده‌ها بهترین مدل انتخاب‌شده با الگوهای مربوطه: (الف) معتدل‌دوست، (ب) گرمادوست و (ج) سرمادوست



نمودار (۲) راماچاندرا مدل‌های انتخاب‌شده ایزوآنزیم‌های گلوکوآمیلاز معتدل‌دوست (الف)، گرمادوست (ب) و سرمادوست (ج)

نتایج شبیه‌سازی

ایزوآنزیم‌ها باشد. از این‌رو شیب تغییرات پارامترها در اثر افزایش دما برای هر ایزوآنزیم محاسبه (جدول ۴) و شیب تغییرات پارامترها بین ایزوآنزیم‌ها مقایسه شد. همچنین ضریب همبستگی خطی این نمودارها نیز به‌دست آمد. از آنجا که افزایش دما معمولاً به باز شدن و ناپایداری پروتئین‌ها منجر می‌شود، انتظار داریم که هر ایزوآنزیمی که شیب تغییرات کمتری در اثر افزایش دما داشته باشد، دارای ساختار پایدارتری باشد؛ چون مقاومت بیشتری در اثر افزایش دما از خود نشان می‌دهد. بنابراین پارامترهایی که در شبیه‌سازی بهتر می‌توانستند پایداری گرمایی را نشان دهند از بین پارامترهای قابل محاسبه در شبیه‌سازی انتخاب شدند. البته دمای بالا در مدت چند میکروثانیه و بیشتر منجر به باز شدن پروتئین‌ها می‌شود ولی در این مطالعه تنها ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی برای هر ایزوآنزیم در هر دما انجام شد، بنابراین باز شدن کامل آنزیم مشاهده نشد.



نمودار (۳) منحنی جذر میانگین مربع انحرافات اسکلت اصلی سه ایزوآنزیم گلوکوامیلاز در طول ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۰۰K: M، P و T به ترتیب نماد ایزوآنزیم‌های معتدل‌دوست، سرمادوست و گرمادوست هستند.

نمودار جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD; Root Mean Square Deviation) اسکلت اصلی مربوط به سه ایزوآنزیم GA در طول ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی در دمای ۳۰۰K در نمودار ۳ نشان داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که ساختار هر سه ایزوآنزیم در دمای ۳۰۰K، در ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی به حالت پایدار رسیده‌اند؛ بنابراین از همه پارامترها در ۵ نانوثانیه آخر میانگین گرفته شد. این پارامترها عبارت بودند از: RMSD اسکلت اصلی، دما، شعاع چرخش (R_g ; Radius of Gyration)، جذر میانگین مربع نوسانات باقی‌مانده‌ها (RMSF; Root Mean Square Fluctuation)، میانگین تعداد پیوند هیدروژنی درون پروتئین، میانگین تعداد پیوند هیدروژنی بین پروتئین و آب و همچنین میانگین سطح در دسترس حلال (SASA; Solvent-Accessible Surface Area)، قطبی و غیرقطبی و انرژی الکتروستاتیک و واندروالسی پروتئین با حلال و میانگین انرژی آزاد حلالیت در ۴ دما برای هر سه ایزوآنزیم در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ گزارش شده است. انحراف استاندارد کم این مقادیر در ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی بیانگر به تعادل رسیدن سامانه‌ها و همچنین به تعادل رسیدن ساختاری و دمایی پروتئین‌ها در ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی است.

اعداد جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نتیجه ۱۲ شبیه‌سازی (هر کدام به مدت ۲۰ نانوثانیه) روی ساختارهای به‌دست‌آمده از مدل‌سازی است و تغییرات ساختاری هر ایزوآنزیم را در اثر افزایش دما از ۳۰۰ تا ۴۵۰K نشان می‌دهد. با توجه به متفاوت بودن تعداد باقی‌مانده‌ها و ساختار شروع متفاوت سه‌بعدی در شبیه‌سازی در این سه ایزوآنزیم، مقایسه پارامترهای ساختاری آنها مثل شعاع چرخش (R_g) یا تعداد پیوند هیدروژنی و غیره، خیلی نمی‌تواند دقیق باشد؛ بنابراین تغییرات پارامترهای هر ایزوآنزیم در اثر افزایش دما با خودش مقایسه شد تا نتایج مستقل از تفاوت‌های ساختاری اولیه بین

جدول (۱) میانگین پارامترهای به‌دست‌آمده مربوط به ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

نوع ایزوآنزیم	دما شبیه‌سازی (K)	دما به‌دست‌آمده (K)	RMSD (نانومتر)	RMSF (نانومتر)	انرژی الکتروستاتیک؛ پروتئین-پروتئین (کیلوژول بر مول)	انرژی واندروالسی؛ پروتئین-پروتئین (کیلوژول بر مول)
گرمادوست	۳۰۰	299.8 ± 4.1	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.4	-107896 ± 208	-20286 ± 118
	۳۵۰	350 ± 1.6	0.4 ± 0.2	1 ± 0.4	-108460 ± 289	-20399 ± 131
	۴۰۰	400 ± 1.8	0.5 ± 0.3	2 ± 0.7	-108434 ± 344	-20001 ± 194
	۴۵۰	450 ± 2	1.4 ± 0.3	2 ± 1.4	-108220 ± 322	-19044 ± 184
معتدل‌دوست	۳۰۰	299.9 ± 3.1	0.0 ± 0.7	1 ± 0.4	-130637 ± 317	-21846 ± 137
	۳۵۰	350.1 ± 1.5	0.8 ± 0.3	1 ± 0.6	-131167 ± 329	-21087 ± 104
	۴۰۰	400 ± 1.8	0.8 ± 0.4	2 ± 0.8	-131788 ± 301	-21308 ± 203
	۴۵۰	450.2 ± 2.1	1.1 ± 0.2	2 ± 0.9	-132463 ± 373	-20707 ± 219
سرمادوست	۳۰۰	300 ± 1.3	0.6 ± 0.7	0.8 ± 0.4	-127037 ± 293	-19892 ± 140
	۳۵۰	350 ± 1.5	0.8 ± 0.2	1 ± 0.6	-127878 ± 307	-19842 ± 173
	۴۰۰	400 ± 1.8	0.8 ± 0.2	1 ± 0.8	-129081 ± 341	-19099 ± 167
	۴۵۰	450 ± 2	1.2 ± 0.2	3 ± 1	-129409 ± 404	-18901 ± 236

جدول ۲) میانگین چند پارامتر دیگر در شبیه سازی ایزوآنزیم های گلوکوامیلاز در دماهای مختلف و در ۵ نانوثانیه آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

نوع ایزوآنزیم GA	دمای شبیه سازی (K)	سطح در دسترس حلال قطبی (نانومتر مربع)	سطح در دسترس حلال غیرقطبی (نانومتر مربع)	سطح در دسترس حلال کل پروتئین (نانومتر مربع)	تعداد پیوند هیدروژنی (پروتئین-پروتئین)	تعداد پیوند هیدروژنی (پروتئین-آب)
گرمادوست	۳۰۰	۴۳/۱ $\pm$ ۷	۱۵۱/۲ $\pm$ ۲	۲۲۳/۲ $\pm$ ۴/۴	۴۳۳/۶ $\pm$ ۱۱	۹۶۰/۸ $\pm$ ۱۸/۴
	۳۵۰	۴۱/۱ $\pm$ ۹/۳	۱۴۲/۲ $\pm$ ۱/۷	۲۱۱/۳ $\pm$ ۴/۳	۴۴۳/۸ $\pm$ ۱۱/۶	۷۷۸ $\pm$ ۲۰/۳
	۴۰۰	۴۰/۱ $\pm$ ۶/۴	۱۴۷/۴ $\pm$ ۸	۲۱۶/۵ $\pm$ ۰/۵	۴۲۸/۹ $\pm$ ۱۳/۲	۶۸۴/۱ $\pm$ ۲۷
	۴۵۰	۴۲/۱ $\pm$ ۱/۴	۱۵۲/۴ $\pm$ ۷	۲۱۸/۴ $\pm$ ۵/۷	۳۷۹/۷ $\pm$ ۱۴/۱	۵۹۳/۱ $\pm$ ۲۳/۷
معتدل دوست	۳۰۰	۴۳/۱ $\pm$ ۵/۲	۱۸۸/۳ $\pm$ ۵/۲	۲۷۱/۴ $\pm$ ۲	۴۳۱/۱۳/۷	۱۱۲۴/۲۱ $\pm$ ۴/۲
	۳۵۰	۴۱/۱ $\pm$ ۳/۴	۲ $\pm$ ۱۸۶/۹	۲۶۵/۴ $\pm$ ۸	۴۳۶/۱۲/۲	۹۹۶/۳ $\pm$ ۲۱/۲
	۴۰۰	۴۲/۱ $\pm$ ۷/۷	۱۷۳/۵ $\pm$ ۳/۱	۲۵۲/۶ $\pm$ ۷/۸	۴۲۶ $\pm$ ۱۳	۸۵۱/۹ $\pm$ ۲۷/۵
	۴۵۰	۴۲/۱ $\pm$ ۴/۷	۱۷۰/۳ $\pm$ ۴/۵	۲۴۵/۴ $\pm$ ۳/۶	۴۲۷/۳ $\pm$ ۱۵/۴	۸۱۸ $\pm$ ۲۳/۷
سرمادوست	۳۰۰	۳۹/۱ $\pm$ ۶	۱۸۴/۳ $\pm$ ۳/۲	۲۶۲/۴ $\pm$ ۵/۴	۴۳۱ $\pm$ ۱۳/۷	۱۱۲۴/۵ $\pm$ ۲۴/۳
	۳۵۰	۳۷/۱ $\pm$ ۰۴/۳	۱۷۰/۳ $\pm$ ۵	۲۴۶/۳ $\pm$ ۹/۶	۳۸۹/۱۲ $\pm$ ۴/۶	۹۷۸/۵ $\pm$ ۲۱/۹
	۴۰۰	۳۴/۱ $\pm$ ۵/۵	۱۶۰/۳ $\pm$ ۵/۷	۲۳۰/۴ $\pm$ ۴/۸	۴۱۷/۱۳ $\pm$ ۲/۸	۸۰۵/۶ $\pm$ ۲۳/۸
	۴۵۰	۳۸/۲ $\pm$ ۸	۱۶۵/۳ $\pm$ ۵/۷	۲۳۸/۴ $\pm$ ۴/۶	۳۹۷ $\pm$ ۱۴/۴	۸۰۸ $\pm$ ۲۳/۷

جدول ۳) میانگین چند پارامتر دیگر در شبیه سازی ایزوآنزیم های گلوکوامیلاز در دماهای مختلف و در ۵ نانوثانیه آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

نوع ایزوآنزیم GA	دمای شبیه سازی (K)	انرژی واندروالس پروتئین-حلال (کیلوژول بر مول)	انرژی الکتروستاتیک پروتئین-حلال (کیلوژول بر مول)	میانگین انرژی آزاد حلالیت (کیلوژول بر مول)	شعاع پروتئین (نانومتر)
گرمادوست	۳۰۰	-۲۹۱۴/۷ $\pm$ ۱۷۳/۵	-۴۶۶ $\pm$ ۲۸۲۱۹	-۱۹۳۳۸ $\pm$ ۳۷۸	۲/۵ $\pm$ ۰/۰۱
	۳۵۰	-۲۳۸۶/۲ $\pm$ ۱۷۴/۴	-۲۳۹۰۸ $\pm$ ۵۱۳	-۱۸۰۹۹ $\pm$ ۴۸۱	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۱
	۴۰۰	-۲۱۷۸/۴ $\pm$ ۱۷۵/۹	-۲۱۴۲۶ $\pm$ ۷۴۹	-۱۷۶۰۸ $\pm$ ۶۱۸	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۱
	۴۵۰	-۲۱۶۶/۵ $\pm$ ۱۸۵/۷	-۱۸۳۳۴ $\pm$ ۶۲۴	-۱۵۹۷۸ $\pm$ ۷۴۰	۲/۳ $\pm$ ۰/۰۱
معتدل دوست	۳۰۰	-۳۱۷۴ $\pm$ ۲۰۲	-۵۹۴ $\pm$ ۳۶۸۰۸	-۳۲۵۷۳ $\pm$ ۵۰۱	۲/۶ $\pm$ ۰/۰۱
	۳۵۰	-۲۸۴۱ $\pm$ ۱۹۰	-۳۳۰۱۱ $\pm$ ۶۲۷	-۲۹۸۶۹/۷ $\pm$ ۶۴۰	۲/۶ $\pm$ ۰/۰۱
	۴۰۰	-۲۲۷۷ $\pm$ ۲۱۸	-۲۸۷۵۴ $\pm$ ۷۴۲	-۲۷۷۹۵/۵ $\pm$ ۶۳۵	۲/۵ $\pm$ ۰/۰۲
	۴۵۰	-۲۰۹۰ $\pm$ ۲۰۳	-۲۳۹۵۴ $\pm$ ۷۰۹	-۲۶۴۰۸ $\pm$ ۹۰۲	۲/۵ $\pm$ ۰/۰۲
سرمادوست	۳۰۰	-۲۷۰۳ $\pm$ ۱۹۰	-۳۷۷۰۳ $\pm$ ۷۲۰	-۲۸۳۶۴/۳ $\pm$ ۵۴۰	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۱
	۳۵۰	-۱۹۵۳ $\pm$ ۱۸۸	-۳۳۷۱۰ $\pm$ ۷۰۰	-۲۵۹۱۳ $\pm$ ۴۶۴	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۱
	۴۰۰	۱۷۷۱/۸ $\pm$ ۱۹۵/۶	-۲۷۸۷۳ $\pm$ ۶۸۴	-۲۲۶۸۵/۹ $\pm$ ۶۴۴	۲/۳ $\pm$ ۰/۰۱
	۴۵۰	-۱۶۲۲/۱ $\pm$ ۲۱۸/۳	-۲۵۵۵۹ $\pm$ ۸۰۱	-۲۰۵۱۵ $\pm$ ۶۴۳	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۲

جدول ۴) شیب و ضریب همبستگی (R^2) نمودار دما در برابر میانگین پارامترها در ۵ نانوثانیه آخر شبیه سازی دینامیک مولکولی

پارامتر	معتدل دوست		سرمادوست		گرمادوست	
	ضریب همبستگی	شیب نمودار	ضریب همبستگی	شیب نمودار	ضریب همبستگی	شیب نمودار
مجموع انرژی واندروالس و الکتروستاتیک پروتئین-آب	۹۳/۲۶	۰/۹۹	۹۱/۳۸	۰/۹۷	۶۹/۱۴	۰/۹۸
شعاع چرخش	-/۰۰۰۹	۰/۸	-/۰۰۰۸	۰/۸	-/۰۰۰۶	۰/۶
پیوند هیدروژنی پروتئین- پروتئین	-/۰۰۳	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۷	-/۰۰۶۴	۰/۹۱
پیوند هیدروژنی پروتئین- آب	-۲/۱۲۷	۰/۹۵	-۲/۲۴۴	۰/۸۹	-۲/۳۹۴	۰/۹۶
اتم های پروتئین RMSF میانگین	۰/۰۰۰۹	۰/۹۹۶	۰/۰۰۱	۰/۸۹۱	۰/۰۰۱	۰/۹۷
سطح در دسترس حلال غیرقطبی	-/۰۱۳۳	۰/۹۱۹	-/۰۲۳	۰/۹۹	۰/۱	۰/۹۹
سطح در دسترس حلال قطبی	-/۰۰۰۷	۰/۹۹	-/۰۰۵	۰/۹۹	-/۰۰۳	۰/۹۸
سطح در دسترس حلال کل	-/۰۱۸۱	۰/۹۷۵	-/۰۳۲	۰/۹۹	-/۰۰۷	۰/۹۶
انرژی آزاد حلالیت	۴۱/۱۳	۰/۹۸	۵۳/۵۵	۰/۹۹	۲۱/۱۴	۰/۹۶
پارامتر ناپایداری	-/۰۲۹	۰/۹۸	-/۰۳۰	۰/۹۸	-/۰۲۹	۰/۹
انرژی الکتروستاتیک پروتئین- آب	۸۵/۶۳	۰/۹۹	۸۴/۵۳	۰/۹۷	۶۴/۲۷	۰/۹۸
انرژی واندروالس پروتئین- آب	۷/۶۲۸	۰/۹۶	۶/۸۵۰	۰/۸۵	۴/۸۶	۰/۸۰
انرژی الکتروستاتیک پروتئین- پروتئین	-۱۲/۱۹	۰/۹۹	-۱۴/۶۵	۰/۸۲	۲/۳۵	۰/۸۳
انرژی واندروالس پروتئین- پروتئین	۷/۰۸۵	۰/۹۶	۶/۱۳۲	۰/۸۴	۸/۲۴۶	۰/۷۵

نتایج بررسی انرژی الکتروستاتیک و انرژی واندروالسی پروتئین با خودش (پتانسیل‌های غیرپیوندی پروتئین) در جدول ۱ ذکر شده است؛ هر چه این انرژی‌ها منفی‌تر باشد، پروتئین پایداری بیشتر دارد. همان‌طور که در جدول ۴ ذکر شده است، شیب نمودار تغییرات انرژی الکتروستاتیک در برابر افزایش دما در معتدل و سرمادوست منفی بود و در گرمادوست، مثبت بود که به معنی اثر متفاوت دما روی انرژی الکتروستاتیک در سه سویه است. به عبارت دیگر، افزایش دما در سویه معتدل و سرمادوست باعث تقویت انرژی الکتروستاتیک درونی پروتئین می‌شود و در سویه گرمادوست باعث تضعیف انرژی الکتروستاتیک می‌شود که این برخلاف انتظار ما از سویه گرمادوست است؛ بنابراین این پارامتر نمی‌تواند نشانگر خوبی برای نشان‌دادن پایداری پروتئین باشد. در مورد انرژی واندروالسی پروتئین با خودش در هر سه سویه شیب مثبت است و افزایش دما باعث تضعیف میان‌کنش‌های واندروالسی پروتئین با خودش می‌شود ولی باز هم برخلاف انتظار ما شیب تضعیف این میان‌کنش‌ها در سویه گرمادوست کمتر از بقیه سویه‌ها نبود؛ بنابراین این پارامتر نشانگر خوبی برای پایداری پروتئین نیست. **RMSF** هر باقی‌مانده در پروتئین نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری و تحرک آن باقی‌مانده است. میانگین **RMSF** همه باقی‌مانده‌های پروتئین می‌تواند نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری کلی آن پروتئین باشد. شیب مقادیر میانگین **RMSF** اتم‌های سه ایزوآنزیم کوچک است (جدول‌های ۱ و ۴) که حاکی از تاثیر اندک دما روی این پارامتر در هر سه ایزوآنزیم است؛ به‌طوری که دما به‌طور ناچیزی باعث افزایش **RMSF** اتم‌ها می‌شود. همچنین تفاوت در این شیب بین سه سویه بسیار ناچیز است، بنابراین نمی‌توان بر اساس این نتایج از روی تغییرات میانگین **RMSF** در اثر افزایش دما در شبیه‌سازی، در مورد پایداری یک پروتئین قضاوت کرد. یک تفسیر دیگر این نتایج این است که با تغییر دما از ۳۰۰ تا ۴۵۰K در مدت ۲۰ نانوثانیه نمی‌توان تغییری روی **RMSF** کل اتم‌ها مشاهده کرد و برای بررسی پایداری پروتئین به کمک این پارامتر احتمالاً باید شبیه‌سازی پروتئین را در دماهای بالاتری یا زمان طولانی‌تری انجام داد تا میانگین **RMSF** اتم‌ها نیز تغییر قابل توجهی داشته باشد.

در مورد شعاع چرخش آنزیم (R_g) پروتئین، همان‌طور که در جدول‌های ۱ و ۴ مشاهده می‌شود، تغییرات آن بسیار ناچیز است و افزایش دما از ۳۰۰ به ۴۵۰K اثری روی ساختار سوم پروتئین نگذاشته است؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت این پارامتر برای بررسی تغییرات ساختار پروتئین مناسب نیست یا مطالعه در این محدوده دمایی یا زمانی برای بررسی این پارامتر کافی نیست.

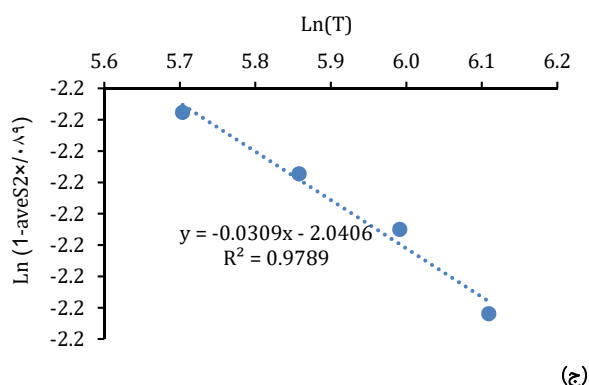
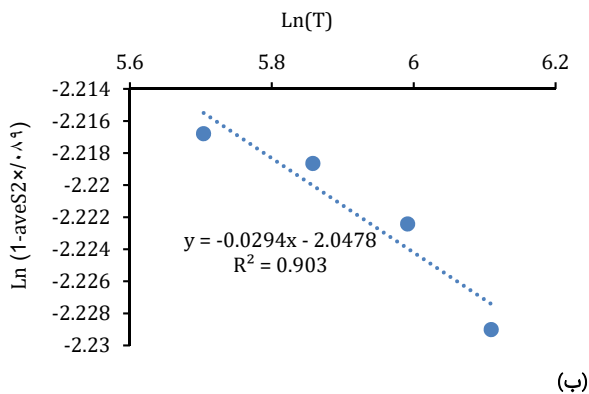
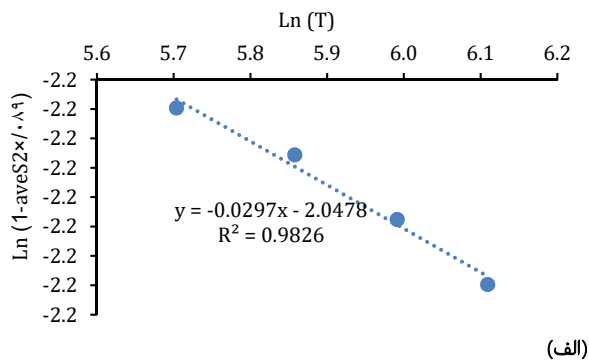
سطح در دسترس حلال (**SASA**) اهمیت ویژه‌ای در میان‌کنش پروتئین با آب، سایر لیگاندها، پروتئین‌های دیگر یا ساختار خود پروتئین دارد. این پارامتر اغلب برای بررسی ساختار پروتئین‌ها محاسبه می‌شود. در این پژوهش سطح در دسترس قطبی، غیرقطبی و کل در دماهای مختلف برای سه ایزوآنزیم **GA** محاسبه شده است. نتایج حاصل از این بررسی (جدول‌های ۲ و ۴) نشان داد که افزایش

دما باعث کاهش ناچیز یا عدم تغییر سطح در دسترس حلال قطبی می‌شود. این نتیجه با انتظار ما در مورد گروه‌های قطبی همخوانی دارد، چون گروه‌های قطبی در حالت طبیعی عموماً در سطح خارجی پروتئین قرار دارند و با افزایش دما و باز شدن پروتئین انتظار نمی‌رود سطح آنها تغییر قابل توجهی داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که این پارامتر نمی‌تواند معیار خوبی برای ارزیابی پایداری گرمایی پروتئین به‌وسیله شبیه‌سازی باشد. در مورد سطح در دسترس حلال غیرقطبی شیب‌ها بزرگ‌تر هستند و به معنی این است که دما اثر بیشتری روی سطح در دسترس حلال غیرقطبی پروتئین دارد. البته افزایش دما، سطح غیرقطبی را در ایزوآنزیم معتدل‌دوست و سرمادوست، کم کرده است ولی در ایزوآنزیم گرمادوست، زیاد کرده است و این به معنی یکسان‌نبودن اثر دما روی سطح در دسترس حلال غیرقطبی برای سه ایزوآنزیم **GA** است. در صورت عدم توجه به کاهش یا افزایش سطح غیرقطبی و تنها مقایسه قدر مطلق شیب‌ها، مشاهده می‌شود که ایزوآنزیم گرمادوست کمترین شیب یا بیشترین مقاومت در برابر تغییرات سطح در دسترس غیرقطبی داشته است که این با انتظار ما هماهنگ است؛ بنابراین تغییرات سطح در دسترس حلال غیرقطبی در شبیه‌سازی می‌تواند نشان‌دهنده پایداری یا ناپایداری ساختار پروتئین باشد. از آنجا که تغییرات سطح در دسترس حلال قطبی ناچیز و تغییرات سطح در دسترس حلال غیرقطبی بیشتر بود، انتظار می‌رود که تغییرات سطح در دسترس حلال کل مشابه تغییرات سطح در دسترس حلال غیرقطبی باشد. نتایج جدول ۴ این برداشت را تایید می‌کند؛ به‌گونه‌ای که ایزوآنزیم گرمادوست کمترین قدر مطلق تغییر سطح در دسترس کل و بیشترین مقاومت در برابر گرما را داشته است. بنابراین پارامتر تغییرات سطح در دسترس حلال کل هم می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات پایداری گرمایی پروتئین باشد.

از دیگر راه‌های نشان‌دادن پایداری پروتئین، بررسی پیوندهای هیدروژنی مربوط به ساختار داخلی پروتئین است. در مورد پیوند هیدروژنی داخل پروتئین انتظار می‌رفت که با افزایش دما، پیوندهای هیدروژنی داخل پروتئین کم شود که در مورد ایزوآنزیم‌های معتدل‌دوست و گرمادوست این اتفاق افتاد و شیب منفی بود (جدول ۴) ولی در مورد ایزوآنزیم سرمادوست، با افزایش دما تعداد پیوندهای هیدروژنی زیاد می‌شود (شیب مثبت). البته در مورد ایزوآنزیم سرمادوست ضریب همبستگی هم کم می‌شود (۰/۷) و این ممکن است که ناهماهنگی ایزوآنزیم سرمادوست با دو ایزوآنزیم دیگر را از نظر تفاوت در این پارامتر توجیه کند. حتی اگر قدر مطلق شیب‌ها با همدیگر مقایسه شوند، باز هم برخلاف انتظار ما از سویه گرما، این سویه بیشترین تغییرات و به بیانی بیشترین کاهش پیوندهای هیدروژنی داخلی در اثر افزایش دما داشته است. نتیجه اینکه بررسی تعداد پیوند هیدروژنی داخل پروتئینی نمی‌تواند معیار خوبی در بررسی پایداری پروتئین به کمک شبیه‌سازی باشد. تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با آب معیاری از حلالیت پروتئین است و حلالیت را هم می‌توان متناسب با پایداری پروتئین

اثر افزایش دما را داشته است که این رفتار نیز مورد انتظار و نشان‌دهنده مناسب بودن انرژی آزاد حلالیت برای بررسی پایداری در شبیه‌سازی است. به بیان دیگر، سویه‌ای که بیشترین مقاومت در برابر کاهش حلالیت را دارد، گرمادوست و سویه‌ای که کمترین مقاومت در برابر کاهش حلالیت را دارد سردادوست است. سویه سردادوست همواره در دماهای کم قرار دارد و در دماهای بالا نامحلول‌تر می‌شود.

همچنین برای بررسی پایداری گرمایی سه ایزوآنزیم GA معتدل‌دوست، گرمادوست و سردادوست، می‌توان پارامتر نظم پیوندهای NH یا S^2 را در طول زمان برای هر سویه در هر دما به دست آورد و میانگین گرفت ($aveS^2$) و سپس شیب نمودار $\ln(1-aveS^2 \times 10^{-89})$ برحسب $\ln(T)$ به دست آورد (نمودار ۴). این شیب نشان‌دهنده ناپایداری پروتئین و کم‌تر بودن آن، نشانه پایداری گرمایی بیشتر پروتئین است.



نمودار ۴) منحنی پارامتر $(1-aveS^2 \times 10^{-89})$ برحسب $\ln(T)$ ایزوآنزیم‌های گلوکوآمیلاز معتدل‌دوست (الف)، گرمادوست (ب) و سردادوست (ج)

در نظر گرفت. در این مورد مطابق انتظار، با افزایش دما تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با آب و حلالیت در هر سه ایزوآنزیم کم شده است (جدول‌های ۲ و ۴) ولی برخلاف انتظار، ایزوآنزیم گرمادوست بیشتر از دو ایزوآنزیم دیگر پیوند هیدروژنی خود را با آب از دست داده است، در یک برداشت دیگر هم می‌توان گفت که تغییرات کاهش پیوند هیدروژنی پروتئین با آب در اثر افزایش دما در هر سه سویه تقریباً یکسان بوده است که در هر دو حالت، استفاده از این پارامتر برای بررسی پایداری در شبیه‌سازی اهمیت خود را از دست می‌دهد. البته احتمال دارد که محدوده افزایش دما یا زمان شبیه‌سازی برای نشان دادن کاهش پیوند هیدروژنی پروتئین با آب کافی نبوده و برای مشاهده واضح‌تر این پارامتر در شبیه‌سازی بهتر است که این فرآیند در دماهای بالاتر یا زمان طولانی‌تری بررسی شود. در مجموع به نظر می‌رسد که تعداد پیوند هیدروژنی داخل پروتئین و تعداد پیوند هیدروژنی بین پروتئین و آب، پارامترهای دقیقی برای بررسی پایداری پروتئین در شبیه‌سازی نیستند.

انرژی الکتروستاتیک بین پروتئین و آب هم می‌تواند معیاری برای حلالیت باشد و هر چه منفی‌تر باشد، پروتئین بهتر با آب پیوند الکتروستاتیک ایجاد می‌کند و بهتر حل می‌شود. انتظار می‌رود با افزایش دما مقدار این انرژی بزرگ‌تر و مثبت‌تر و اندرکنش ضعیف‌تر و حلالیت کم شود. نتایج جدول‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهد که در هر سه ایزوآنزیم شیب مثبت بوده و انرژی الکتروستاتیک عدد مثبت‌تر و قدرت کمتری پیدا کرده است. همچنین ایزوآنزیم گرمادوست کمترین شیب و بیشترین مقاومت در برابر کاهش حلالیت و ضعیف شدن پیوند الکتروستاتیک بین پروتئین و آب را داشته است؛ بنابراین این پارامتر می‌تواند معیار خوبی برای بررسی حلالیت و پایداری پروتئین باشد. مشابه همین نتایج در مورد پیوند واندروالسی پروتئین با آب مشاهده می‌شود و این پارامتر هم برای بررسی پایداری مناسب است. همچنین شیب تغییرات انرژی الکتروستاتیک پروتئین با آب از شیب تغییرات انرژی الکتروستاتیک پروتئین و آب در هر سه ایزوآنزیم کمتر است (جدول ۴) که این امر نیز قابل انتظار است، چون مولکول آب قطبی است و جاذبه الکتروستاتیک آن قوی‌تر از جاذبه واندروالسی آن با پروتئین است. انرژی آزاد حلالیت ($\Delta G_{\text{solvation}}$)، نیز معیاری از حلالیت پروتئین است و هر چه منفی‌تر باشد، یعنی حلالیت پروتئین بیشتر است. در این مطالعه پس از محاسبه میانگین انرژی آزاد حلالیت هر سه ایزوآنزیم در هر دما، شیب نمودار دما در برابر انرژی آزاد حلالیت به دست آمد. با افزایش دمای شبیه‌سازی، انرژی آزاد حلالیت مثبت‌تر می‌شود که این امر حاکی از نامحلول‌تر شدن و ناپایداری‌تر شدن پروتئین است. همان‌طور که در جدول‌های ۳ و ۴ مشخص است، شیب نمودار مربوط به ایزوآنزیم گرمادوست نسبت به دو ایزوآنزیم دیگر کمتر بوده و کمترین کاهش حلالیت در اثر افزایش دما را داشته است. این نتایج با نتایج انرژی واندروالسی پروتئین با آب یا انرژی الکتروستاتیک پروتئین با آب هماهنگ است. به علاوه ایزوآنزیم سردادوست بیشترین شیب و بیشترین کاهش حلالیت در

در پایان پیشنهاد می‌شود شبیه‌سازی سه ایزوآنزیم GA در دماهای پایین‌تر از ۳۰۰ و بالاتر از ۴۵۰K و زمان شبیه‌سازی بیشتر از ۲۰ نانوثانیه انجام شود و شیب تغییرات ساختارها مقایسه شوند. همچنین پیشنهاد می‌شود این عوامل در سویه گرمادوست و سویه معتدل‌دوست یک یا چند آنزیم دیگر بررسی شوند و عوامل احتمالی دیگری که می‌توانند نشان‌دهنده پایدارتر شدن آنزیم‌ها یا پروتئین‌ها باشند، بررسی شوند. همچنین می‌توان به کمک عوامل موثر در پایداری آنزیم گلوکوآمیلاز، اقدام به طراحی جهش‌های پایدارکننده در این آنزیم نمود و نتایج آن را با کارهای تجربی مقایسه نمود. امید است که نتایج این مطالعه راهی کم‌هزینه برای تعیین پایدار شدن پروتئین‌ها به کمک جهش یا تغییرات محیطی باز کرده باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مدیریت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و دانشگاه کاشان به دلیل همکاری در انجام این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تأییدیه اخلاقی: در این کار اصول اخلاق علمی رعایت شده است.

تعارض منافع: نتایج این مطالعه با نتایج اشخاص یا مقالات دیگر تعارضی ندارد.

سهم نویسندگان: آذین مشرف قهفرخی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشن‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ حسینعلی رفیعی‌پور (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ کریم مهنام (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)

منابع مالی: توسط دانشگاه شهرکرد و دانشگاه کاشان تامین شده است.

منابع

- 1- Pavezzi FC, Gomes E, da Silva R. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. *Braz J Microbiol.* 2008;39:108-14.
- 2- Hyun HH, Zeikus JG. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Am Soc Microbiol.* 1985;49(5):1168-73.
- 3- Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, et al. Glucoamylase: Structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1543(2):275-93.
- 4- Campos L, Felix CR. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(6):2436-8.
- 5- Jebor MA, Ali ZM, Hassan BA. Purification and characterization of the glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014;3:63-75.
- 6- McDaniel A, Fuchs E, Liu Y, Ford C. Directed evolution of *Aspergillus niger* glucoamylase to increase thermostability. *Microb Biotechnol.* 2008;1(6):523-31.
- 7- Liu HL, Wang WC. Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations. *Protein Eng.* 2003;16(1):19-25.

پارامتر ناپایداری برای ایزوآنزیم‌های GA گرمادوست، معتدل‌دوست و سرمادوست، به ترتیب برابر با ۰/۲۹۷، ۰/۳۰۹ و ۰/۳۰۹ است. این نتایج نشان می‌دهد، پایداری گرمایی ایزوآنزیم‌های GA گرمادوست بیشتر از معتدل‌دوست است و پایداری گرمایی ایزوآنزیم GA سرمادوست از بقیه ایزوآنزیم‌ها کمتر است. این نتیجه منطقی است چون ایزوآنزیم GA سرمادوست معمولاً در دماهای پایین قرار دارد و دمای بالا برای آن محیطی غیرعادی محسوب می‌شود و بیشتر از بقیه ایزوآنزیم‌ها تحت تاثیر افزایش دما قرار می‌گیرد، بنابراین به کمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و بدون انجام آزمایش تجربی می‌توان پایداری یک آنزیم را تعیین کرد. لازم به ذکر است که این نتایج با مقاله زبیسکه^[10] همخوانی دارد؛ او نشان داد که سویه گرمادوست آنزیم RNase H نسبت به بقیه سویه‌ها پارامتر ناپایداری کمتری دارد. در مطالعه حاضر نیز سویه گرمادوست گلوکوآمیلاز نسبت به سایر سویه‌ها پارامتر ناپایداری کمتری دارد.

نتیجه‌گیری

پایداری حرارتی آنزیم‌ها در دماهای بالا و همچنین مقاومت آنزیم‌ها در دماهای پایین، اهمیت قابل توجهی در استفاده از آنها در فرآیندهای صنعتی دارد. کشف ویژگی‌های کلیدی برای پایداری گرمایی یا مقاومت ایزوآنزیم‌های GA در دماهای پایین به کمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، می‌تواند برای مهندسی پروتئین و طراحی ایزوآنزیم‌هایی جدید با پایداری گرمایی و سرمایی بالا مورد استفاده قرار بگیرد.

در پژوهش کنونی، ابتدا ساختار اول سه ایزوآنزیم گرمادوست، سرمادوست و معتدل‌دوست آنزیم GA از پایگاه اطلاعاتی گرفته شد و به علت نبودن ساختار سوم آنها، مدل سه‌بعدی این ساختارها با روش مدل‌سازی متجانس تهیه شد. سپس با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این سه ایزوآنزیم GA، در چهار دمای ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰K، عوامل و پارامترهایی که می‌توانند پایدارتر بودن ایزوآنزیم گرمادوست در شبیه‌سازی را نشان دهند، مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا پارامترهایی متداول در شبیه‌سازی و انرژی آزاد حلالیت پروتئین و همچنین پارامتر ناپایداری سویه‌ها محاسبه شد. از آنجایی که تعداد باقی‌مانده‌ها و ساختار اولیه سویه‌ها متفاوت بود، تغییرات هر یک از این پارامترها در هر سه ایزوآنزیم به‌طور جداگانه مقایسه شد. بر این اساس مشخص شد که انرژی الکتروستاتیک پروتئین با آب، انرژی واندروالسی بین پروتئین و آب، انرژی آزاد حلالیت ($\Delta G_{\text{solution}}$)، پارامتر ناپایداری، سطح در دسترس حلال غیرقطبی و سطح در دسترس کل بهتر و دقیق‌تر می‌توانند تغییرات پایداری گرمایی یک پروتئین را در اثر افزایش دما در محدوده دمایی ۳۰۰ تا ۴۵۰K و در مدت ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی پروتئین، نشان دهند. به کمک نتایج این پژوهش می‌توان تغییرات پایداری گرمایی پروتئین‌های صنعتی و دارویی را در اثر هر جهش یا تغییر محیطی دلخواه به‌وسیله روش کم‌هزینه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پیش‌بینی کرد.

- 17- Klepeis JL, Lindorff-Larsen K, Dror RO, Shaw DE. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(2):120-7.
- 18- Abdulazeez S. Molecular simulation studies on B-cell lymphoma/leukaemia 11A. (BCL11A). *Am J Transl Res*. 2019;11(6):3689-97.
- 19- Goswami C, Jayaraman M, Bakthavachalam T, Sethi G, Krishna R. Homology modeling, molecular dynamics simulation and essential dynamics on anopheles gambiae D7r1. *Int J Biochim Biophys*. 2017;5(3):65-77.
- 20- Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. 1993;2(9):1511-9.
- 21- Van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem*. 2005;26(16):1701-18.
- 22- Berendsen HJC, Van der Spoel D, Van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun*. 1995;91(1-3):43-56.
- 23- Chong LT, Duan Y, Wang L, Massova I, Kollman PA. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14330-5.
- 24- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10037-41.
- 8- Kovacic F, Mandrysch A, Poojari C, Strodel B, Jaeger KE. Structural features determining thermal adaptation of esterases. *Protein Eng Des Sel*. 2016;29(2):65-76.
- 9- Liu Y, Meng Z, Shi R, Zhan L, Hu W, Xiang H, et al. Effects of temperature and additives on the thermal stability of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(1):33-43.
- 10- Zeiske T, Stafford KA, Palmer AG. Thermostability of enzymes from molecular dynamics simulations. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(6):2489-92.
- 11- uniprot.org [Internet]. Geneva: Uniprot; 2012 [Cited 2019 Jun 1]. Available from: <https://www.uniprot.org/>.
- 12- Chen J, Zhang YQ, Zhao CQ, Li AN, Zhou QX, Li DC. Cloning of gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*. 2007;103(6):2277-84.
- 13- Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000;302(1):205-17.
- 14- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
- 15- States DJ, Gish W. Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification. *J Comput Biol*. 1994;1(1):39-50.
- 16- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29:291-325.