

# مدل سازی مولکولی فتوپروتئین نمیوپسین کایمر (PMC): با رویکرد بازیابی ساختاری و عملکردی لوپ EF-hand II

حانیه رضانی<sup>۱</sup>، زهرا کریمی تکریمی<sup>۱</sup>، امیررضا محمدی<sup>۱</sup>، فاطمه خاتمی<sup>۲</sup>، وهب جعفریان<sup>۳\*</sup>

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، ایران

۲-دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، ایران

۳-استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، ایران

\*صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران  
v.jafarian@guilan.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

## چکیده

نمیوپسین ۲ فتوپروتئینی تنظیم شونده با کلسیم دارای ۲۰۷ باقی مانده آمینواسیدی و وزن مولکولی ۲۴۷۲۲ دالتون می باشد. در ساختار این فتوپروتئین موتیف های EF-hand I-III-IV عملکرد خود در اتصال به کلسیم را حفظ کرده، اما EF-hand II در طی تکامل فعالیت خود را از دست داده است. هر EF-hand دارای ساختار ماریپیچ لوپ ماریپیچ (HLH) می باشد. لوپ ها با طول ۱۲ آمینواسید مسئول اتصال به کلسیم هستند. در این پژوهش برای بازیابی ساختاری و عملکردی لوپ EF-hand II با استفاده از جهش زایی مبتنی بر تکامل و منطق مولکولی، فتوپروتئین نمیوپسین کایمر (PMC) دارای هفت جهش طراحی شد. ساختارهای جهش یافته توسط نرم افزار Modeller v.10.4 مدل سازی شدند. سپس، بهترین مدل با استفاده از نرم افزار Chimera x.1.8 و سرورهای ModEval، SAVES برای ارزیابی فراسنجه های RMSD، Errat، Z-Dope، RRDistance و Verify 3D ارزیابی شدند. همچنین، ساختار دوم، انرژی آزاد و سطوح در دسترس مدل ها توسط سرور VADAR بررسی شد. فراسنجه ی آگریزی و ناپایداری توسط سرورهای ProtParam و ProtScale ارزیابی شدند. نتایج Prosite بیانگر ایجاد لوپ EF-hand II در PMC می باشد.

کپی رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

لازم به ذکر است تغییرات آبرگری سطحی موتیف EF-hand II بازیابی شده ممکن است بر تعامل با کلسیم تاثیر بگذارد. در واقع به دلیل افزایش جایگاه‌های اتصال به کلسیم پیش‌بینی می‌شود، حساسیت به کلسیم و فعالیت PMC دچار تغییر شوند.

**کلید واژگان:** بازیابی ساختاری، بیوانفورماتیک، پرتوزایی زیستی، جهش، فتوپروتئین

## ۱- مقدمه

پرتوزایی زیستی<sup>۱</sup>، به انتشار نور توسط برخی موجودات زمینی و دریایی گفته می‌شود [۱]. نشر نور شامل دو مکانیسم متمایز می‌باشد. اولین مورد، مکانیسم لوسیفیرین-لوسیفراز است که در آن با اکسایش لوسیفیرین توسط آنزیم لوسیفراز نشر نور رخ می‌دهد و مورد دوم نشر نور توسط فتوپروتئین‌ها است [۲]. فتوپروتئین‌ها در دو شاخه دریایی کولترات‌ها<sup>۲</sup> و کتنوفورها<sup>۳</sup> وجود دارند [۳]. کولترات‌ها، اکورین<sup>۴</sup>، فیالیدین<sup>۵</sup>، هالیستارین<sup>۶</sup> (میتروکوم<sup>۷</sup>)، ابلین<sup>۸</sup> و تالاسیکولین<sup>۹</sup> را شامل می‌شوند. پرووین<sup>۱۰</sup>، فتوپروتئین باتوسسیرو<sup>۱۱</sup> (BfosPP)، بولینوپسین<sup>۱۲</sup> و نمیوپسین<sup>۱</sup> و ۲ نیز در شاخه‌ی کتنوفورها قرار دارند [۴]. فتوپروتئین‌ها به دلیل ویژگی‌هایی مانند، عدم سمیت سلولی، قدرت نفوذ بهتر و حساسیت تشخیصی بالا در زمینه‌های مختلفی به کار برده می‌شوند. این ویژگی‌ها باعث شده است که از آنها به‌عنوان نشانگر، در تجزیه و تحلیل بیان ژن، تصویربرداری از سلول‌های زنده و... استفاده شود [۳-۵]. نمیوپسین<sup>۲</sup> یک فتوپروتئین تنظیم‌شونده با کلسیم است که از گونه نمیوپسیس لیدی<sup>۱۴</sup> استخراج شده است و متعلق به خانواده کتنوفورها است. نمیوپسین<sup>۲</sup> شامل یک زنجیره پلی‌پپتیدی با ۲۰۷ باقی‌مانده و با جرم مولکولی حدود ۲۴ کیلو دالتون است [۳-۴]. فتوپروتئین

دارای یک حفره آبرگریز برای اتصال سوبسترا (کولتراتین<sup>۱۵</sup>) است که به صورت غیرکووالانسی به آن متصل است [۶]. همچنین، برای اتصال موثر به یون‌های کلسیم دارای ۳ موتیف EF-hand فعال I، III و IV است که به ترتیب در نواحی ۴۵-۵۶، ۱۳۷-۱۴۸ و ۱۸۲-۱۷۱ واقع شده‌اند [۷]. EF-hand II در نمیوپسین<sup>۲</sup> نیز مانند دیگر فتوپروتئین‌های خانواده‌های کولترات و کتنوفور در طی تکامل توانایی اتصال به کلسیم را از دست داده است [۸]. هر EF-hand با ساختار ماریچ حلقه ماریچ (HLH) و طول حدود ۳۰ آمینواسید دارای یک لوپ با طول ۱۲ باقی‌مانده و با قابلیت اتصال به کلسیم می‌باشد. باقی‌مانده‌های ۱، ۶ و ۱۲ در لوپ مذکور کاملاً حفاظت شده و با قابلیت اتصال به کلسیم و باقی‌مانده‌های ۳، ۵، ۷ و در برخی موارد ۹ با قابلیت اتصال به کلسیم می‌باشد [۷]. باقی‌مانده اول در تمامی لوپ‌ها اسپاراتات، ششمین باقی‌مانده گلایسین و دوازدهمین باقی‌مانده گلوتامات است و برای اتصال به کلسیم و نشر نور این ساختار ضروری است. در حالی که، در نمیوپسین<sup>۲</sup> باقی‌مانده مربوط در موقعیت ششم EF-hand اول گلوتامات است و به همین دلیل قادر به اتصال به کلسیم در لوپ اول نیست [۹]. در پژوهشی که توسط جعفریان و همکاران انجام شده است، گلوتامات موقعیت ششم EF-hand اول توسط جهش‌زایی هدفدار با

<sup>9</sup> Thalassicolin

<sup>10</sup> Berovin

<sup>11</sup> Bathocyroe photoprotein

<sup>12</sup> Bolinopsin

<sup>13</sup> Mnemiopsis 2

<sup>14</sup> Mnemiopsis leidy

<sup>15</sup> Coelenterazine

<sup>1</sup> bioluminescence

<sup>2</sup> Coelentrates

<sup>3</sup> Ctenophora

<sup>4</sup> Aequorin

<sup>5</sup> phialidin

<sup>6</sup> Halistarin

<sup>7</sup> mitrocomin

<sup>8</sup> Obelin

گلايسين جايزگزين شده (E50G) و اين امر موجب شد كه EF-hand اول توانايي اتصال به كلسيم خود را باز يابد و نشر نور آن حدود ۱۹ برابر افزايش يابد [۱۰]. هدف از اين پژوهش باز يابي عملكرد EF-hand II نيموپسين ۲ بر اساس الگوي لوپ EF-hand IV با استفاده از جهش زايي هدف دار مبتني بر تكامل و منطق مولكولي است. براي دستيابي به اين هدف از انواع روش هاي همولوژي مدلينگ و صحت سنجي ساختار و عملكرد پروتئين استفاده شده است.

**۲- روش ها**

براي شناسايي و مقايسه ي توالي هاي مشابه با توالي پروتئين نيموپسين ۲، جستجوي BLAST در پايگاه هاي داده حاوي توالي پروتئين ها انجام شد. پس از يافتن توالي هاي مشابه، توالي آمينو اسيد ي بين شش فتوپروتئين شناخته شده شامل برووين، نيموپسين ۱ و ۲، ابلين، بولينوپسين و آكورين مقايسه شد. اين مقايسه ابتدا با استفاده از نرم افزار ClustalW و سپس با نرم افزار Esprout3 انجام شد كه اطلاعاتي همچون هم پوشاني و تفاوت هاي توالي آمينو اسيد ي را ارائه مي دهد [۱۱-۱۲]. نرم افزار ClustalW به دليل دقت بالا در هم تراز ي توالي ها و به كارگيري الگوريتم هاي معتبر براي هم تراز ي چند گانه توالي ها و همچنين توانايي پردازش داده هاي بزرگ، نسبت به ساير نرم افزار هاي موجود برتري دارد. بر مبناي داده هاي حاصل از هم ساني و تطابق و با هدف احيا EF-hand II تعدادي جهش براي باز يابي EF-hand II مبتني بر طراحي تكاملي و منطقي پيش نهاد و فتوپروتئيني به نام فنوپروتئين نيموپسين كايمر (PMC)<sup>۱</sup> طراحي شد. علاوه بر آن، فراسنجه هاي مبتني بر توالي پروتئين نظير نقطه ايزوالكتريك، وزن مولكولي و فراسنجه ناپايداري نيز توسط برنامه ProtParam در وبگاه [ExPASy](http://ExPASy)

شدند [۱۳]. همچنين، با استفاده از Protscale فراسنجه آب گريزي پروتئين مبتني بر روش كايت و دوليتل در وبگاه (<https://protscale.expasy.org>) تعيين شد [۱۳]. اين فرا سنجه به فهم ويژگي هاي آب گريزي پروتئين كمك مي كند كه در تحليل رفتار پروتئين ها در محيط هاي مختلف بسيار مهم است. در اين مرحله، با استفاده از نرم افزار Mega7 درخت تبارزايي براي PMC رسم شد [۱۴]. Mega7 نرم افزاري پي شرفته براي تحليل داده هاي زيستي، به ويژه در زمينه تبار شناسي و تكامل مولكولي است. اين نرم افزار ابزارهايي براي ساخت درخت هاي تبارزايي (مانند روش هاي Maximum Likelihood و UPGMA) و تراز كردن توالي ها<sup>۲</sup> ارائه مي دهد. با رباط گرافيكي ساده و پشتيباني از داده هاي حجيم، Mega7 امكان محاسبه فاصله هاي ژنتيكي، نرخ تكامل و تحليل جايگاه هاي حفاظت شده در توالي ها را فراهم مي كند. از سرور PredyFlexy براي ارزيابي flexibility Class, B-factor و confidence index فتوپروتئين PMC در مقايسه با نيموپسين ۲ استفاده شد [۱۵]. براي بررسي عملكرد و قابليت اتصال به كلسيم در جهش يافته ها و مدل داراي لوپ جديد (PMC) از Prosite در وبگاه [ExPASy](http://ExPASy) (<https://prosite.expasy.org>) استفاده شد [۱۳]. در گام دوم و در بخش مطالعات ساختاري، از نرم افزار Modeller v.10.4 به عنوان يكي از نرم افزار هاي پيشرفته در حوزه مدل سازي پروتئين ها استفاده شد [۱۶]. اين نرم افزار براي مدل سازي ساختار سه بعدي پروتئين ها از روش همولوژي مدلينگ<sup>۳</sup> استفاده مي كند. Modeller امكان پيش بيني ساختار پروتئين هاي ناشناخته با تكيه بر اطلاعات ساختاري پروتئين هاي مشابه و شناخته شده با قابليت جايگذاري ليگاند و سوبسترا را مي دهد. اين نرم افزار، با تكيه بر الگوريتم هاي پيشرفته مدل سازي پروتئين،

<sup>3</sup> Homology Modeling

<sup>1</sup> Photoprotein Mnemiopsin Chimer

<sup>2</sup> Sequence Alignment

پروتئین توسط فراسنجه RRDistance محاسبه شده است. سپس، با مراجعه به وبگاه Vadar (<http://vadar.wishartlab.com>)، اطلاعات ساختار ثانویه پروتئین نظیر، درصد ساختارهای آلفا هلیکس، بتا شیت و کوئلها محاسبه شد [۲۴].

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱ آنالیز توالی

در این مطالعه برای بررسی دقیق تر ویژگی های ساختاری، مقایسه توالی های آمینواسیدی فتوپروتئین های مشابه (مانند برووین، اکورین، نمپوسین ۱ و ۲) با استفاده از برنامه ClustalW و ابزار ESPript3 انجام شد. این مقایسه ها بیانگر تطابق توالی بین پروتئین های همولوگ بود.

در شکل ۱ نتایج تطبیق توالی آمینواسیدی فتوپروتئین برووین، اکورین، نمپوسین ۱، نمپوسین ۲ و جهش یافته ها توسط ESPript نشان داده شده است. علت انتخاب توالی پروتئین های مذکور در شکل ۱، میزان همسانی آنها با نمپوسین ۲ است. درصد همسانی E50G با نمپوسین ۲، برابر با ۹۹،۵۲ درصد، PMC با نمپوسین ۲ برابر ۹۶،۱۴ درصد، برووین با نمپوسین برابر با ۹۳،۱۴ درصد، نمپوسین ۱ برابر با ۹۰،۶۹ درصد و اکورین با نمپوسین ۲ برابر با ۲۷،۲۲ درصد می باشد. نواحی با قابلیت اتصال به کلایسم در لوپ EF-hand مشخص شده دارای ۱۲ باقی مانده هستند، که در موقعیت اول آمینواسید اسپارتیک اسید و باقی مانده ششم گلایسین و باقی مانده ۱۲ آمینواسید گلوتامیک کاملاً حفاظت شده است.

لازم به ذکر است در نمپوسین ۲ در لوپ EF-hand اول در موقعیت ششم آمینواسید گلوتامیک در طی تکامل جایگزین شده است. در توالی جهش یافته E50G، این EF-hand بازیابی شده است [۱۰].

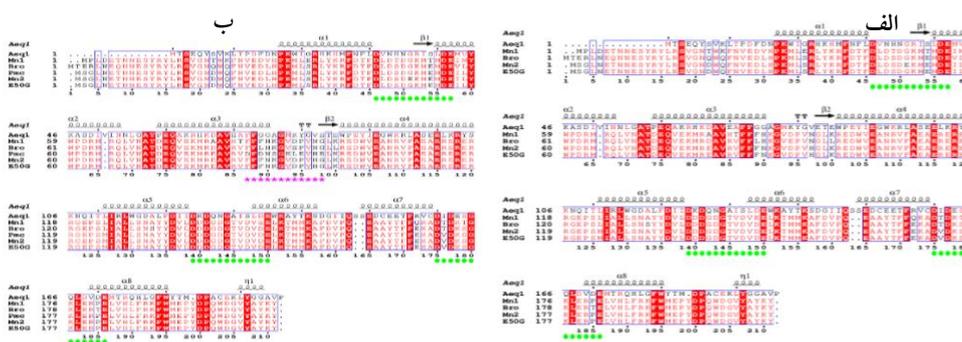
در این پژوهش برای احیاء EF-hand II منقرض شده براساس تکامل و منطق مولکولی و با الگوگیری از لوپ

ساختارهای سه بعدی دقیق و قابل اعتمادی را تولید می کند. فایل های PDB فتوپروتئین های برووین (PDB code: 5BPJ) و نمپوسین ۱ (PDB code: 5vP3) برای الگوی ساختاری، اکورین (PDB code: 1ej3) برای الگوی برهمکنش با سوبسترای کولتزازین و برووین (PDB code: 4mn0) برای الگوی اتصال با کلسیم به عنوان فایل ورودی اجرای برنامه در Modeller استفاده شده اند. در قدم بعدی، با کدنویسی پایتون فایل های دستوری Saline1 و ۲ اجرا و نهایتاً مدلینگ براساس فایل دستوری Build model انجام شد. از هر جهش ۱۰ مدل ساخته، سپس براساس فراسنجه های مختلف بهترین مدل انتخاب شدند. پس از مدل سازی، برای ارزیابی صحت و کیفیت مدل ها، فراسنجه RMSD (میانگین انحراف مربعات ریشه ای) با استفاده از نرم افزار Chimera نسخه ۱،۱۳،۱ محاسبه شد [۱۷]. این فراسنجه به عنوان یک معیار مهم برای سنجش هم ترازوی بین مدل های سه بعدی ساخته شده و ساختارهای مرجع پروتئین استفاده می شود. در ادامه، برای بررسی کیفیت مدل های ساخته شده با استفاده از وبگاه SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu>)، از فراسنجه های محاسباتی Ramachandran score و Verify3D، ERRAT استفاده شد [۱۸-۲۲]. این فراسنجه ها به صورت مکمل عمل کرده و به محققان اجازه می دهند که جنبه های مختلف صحت ساختار پروتئین را ارزیابی کنند.

علاوه بر این، برای ارزیابی بیشتر، فراسنجه Z-Dope نیز از وبگاه ModBase- (<https://modbase.compbio>) به دست آمد [۲۳]. با مقایسه ای این فراسنجه ها، مدل بهینه از نظر گرافیکی و آماری شناسایی و انتخاب شد. در مرحله بعدی، برای تحلیل ساختاری و نمایش شکل گرافیکی فتوپروتئین نمپوسین ۲ در حالت وحشی و نسخه های جهش یافته ی آن، از نرم افزار Chimera نسخه ۱،۱۳،۱ استفاده شد. همچنین، با استفاده از این نرم افزار فشردگی داخلی ساختار سوم

نشان می‌دهد که به‌طور معمول وزن ملکولی برخی پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به وحشی دچار تغییر شده است. همچنین، کاهش فرا سنجه ناپایداری در جهش‌های P93E, P93D, K89S, F85D, E50G و بالاصخ PMC مشهود است.

EF-hand IV، لوپ دوم بازسازی و با عنوان PMC و با علامت ستاره بنفش مشخص شده است (شکل ۱-ب). برای آنالیز توالی جهش‌یافته‌ها (G96E, P93E, P93D, D92L, V91K, V91Q, K89S, F87D) و فتوپروتئین نمیوپسین کایمر (PMC) از سرور ProtParam استفاده شده است. بررسی نتایج جدول ۱



شکل ۱ تطبیق توالی آمینواسیدی فتوپروتئین‌های برووین (pdb code: 5BPJ)، نمیوپسین ۱ (pdb code: 5vP3)، نمیوپسین ۲، اکورین (pdb code: 1ej3) و جهش‌یافته توسط سرور ESPrnt3 انجام شده است. باقی‌مانده‌های حفاظت شده در داخل نوار قرمز رنگ قرار گرفته‌اند. موقعیت عناصر ساختاری دوم با  $\alpha$  (helix  $\alpha$ ),  $\beta$  (strand  $\beta$ ),  $\eta$  (helix turn (T) نشان داده شده است. موقعیت EF-hand ها با علامت دایره سبز رنگ مشخص شده است. توالی‌ها در شکل، الف: اکورین (Aeq1)، نمیوپسین ۱ (Mn1)، برووین (Bro)، نمیوپسین ۲ (Mn2) و E50G. توالی‌ها در شکل ب: اکورین (Aeq1)، نمیوپسین ۱ (Mn1)، برووین (Bro)، فتوپروتئین نمیوپسین کایمر (PMC)، نمیوپسین ۲ (Mn2) و E50G. لوپ دوم بازسازی و با علامت ستاره بنفش رنگ مشخص شده است (شکل ب).

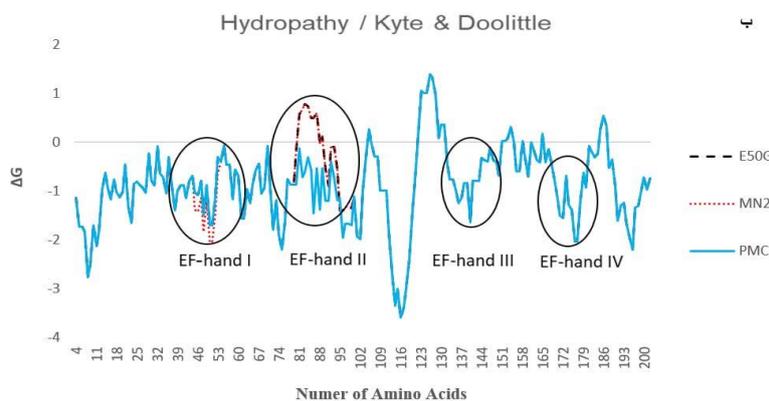
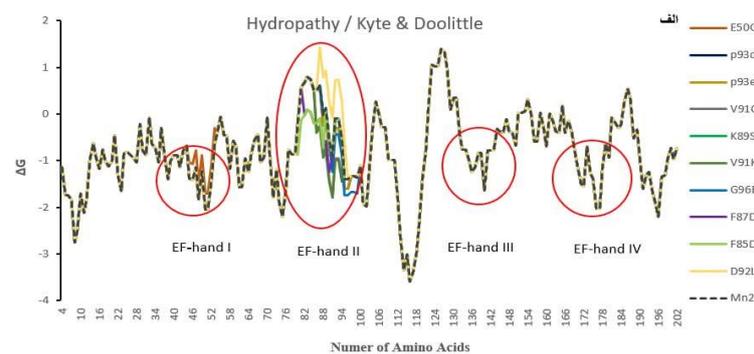
جدول ۱ بررسی فراسنجه‌های به‌دست آمده از سرور ProtParam

	PI	Instability Index	Molecular weight
Mn2	۴/۶۵	۳۷/۵۹	۲۴۷۲۲/۶
E50G	۴/۶۸	۳۷/۱۸	۲۴۶۵۰/۵
F85D	۴/۶۲	۳۶/۵۰	۲۴۶۹۰/۵
F87D	۴/۶۲	۳۸/۱۹	۲۴۶۹۰/۵
K89S	۴/۶۱	۳۶/۸۶	۲۴۶۸۱/۵
V91K	۴/۷۰	۳۷/۹۱	۲۴۷۵۱/۶
V91Q	۴/۶۵	۳۹/۲۵	۲۴۷۵۱/۶
D92L	۴/۶۹	۳۹/۲۵	۲۴۷۲۰/۷
P93D	۴/۶۲	۳۶/۶۶	۲۴۷۴۰/۶
P93E	۴/۶۲	۳۶/۶۶	۲۴۷۵۴/۶
G96E	۴/۶۲	۳۸/۰۹	۲۴۷۹۴۲/۱
PMC	۴/۵۹	۳۵/۴۳	۲۴۶۷۶/۴

سمت pH اسیدی دیده شده است. بنابراین، به نظر می‌رسد این تغییرات جزئی احتمالا بتواند بر تمایل به کلسیم لوپ بازیابی شده تاثیر بگذارد.

شکل ۲-الف نمودار هیدروپاتی هر جهش نسبت به حالت وحشی را نشان می‌دهد. تغییر میزان هیدروپاتی در آمینواسیدهای جهش‌یافته بیانگر ماهیت آبریزی متفاوت باقیمانده‌های جهش‌یافته نسبت به نمپوسین ۲ وحشی است. شکل ۲-ب نیز میزان آبریزی جهش PMC را نسبت به حالت وحشی مقایسه کرده است. همانطور که مشاهده می‌شود  $\Delta G$  آمینواسید در جهش‌یافته منفی‌تر شده است. این تغییرات دلالت بر افزایش باقیمانده‌های آبدوست دارد.

در مقابل، در جهش یافته‌های F87D، V91Q و D92L ناپایداری افزایش یافته است. به همین دلیل، از میان دو جهش در نظر گرفته شده برای موقعیت ۹۱، آمینواسید لایزین انتخاب شد. علیرغم اعمال هفت جهش برای ایجاد فرم PMC، فراسنجه ناپایداری نسبت به فرم وحشی فتوپروتئین کاهش یافته، که بر اساس الگوی تکامل استفاده شده در طراحی جهش‌ها بیانگر به تعال رسیدن ساختار در مجموع حضور تک‌تک جهش‌های پایدار و ناپایدار کننده است. بررسی نتایج تغییرات نقطه ایزوالکتریک در جهش‌یافته‌ها نسبت به فرم وحشی بیانگر تغییرات جزئی در نقطه ایزوالکتریک می‌باشد. در PMC با توجه به جایگزینی ۵ آمینو اسید اسیدی (D) و یک آمینو اسید قلیایی (K)، تغییر جزئی ۰/۰۶ در نقطه ایزوالکتریک به



شکل ۲ نمودار فراسنجه هیدروپاتی hydropathy/ Kyte & Dolittle به دست آمده با سرور ProtScale (الف) بررسی فراسنجه هیدروفوبیسیتیه تک تک جهش‌یافته‌ها با نمپوسین ۲. (ب) بررسی فراسنجه هیدروفوبیسیتیه PMC با نمپوسین ۲. بررسی کلی PMC با E50G و Mn2

همچنین، در شکل ۲-ب فراسنجه آبگریزی PMC در مقایسه با پروتئین وحشی در ناحیه لوپ EF-hand II منفی تر شده، که بیانگر افزایش مناطق در دسترس PMC می باشد. لازم به ذکر است که جهش های ایجاد شده برای باز یابی ساختاری و عملکردی عمدتاً با جایگزینی آمینواسیدهای آبگریز با آبدوست صورت گرفته است. در نمودارهای الف و ب EF-hand I,III,IV مشخص شده همگی دارای هیدروپاتی منفی هستند و همچنین EF-hand II باز یابی شده نیز از الگوی هیدروپاتی دیگر لوپ ها پیروی و دارای فراسنجه هیدروپاتی منفی می باشد. جدول ۲ به بررسی موضعی مقدار عددی فراسنجه هیدروپاتی تک تک آمینواسیدهای جهش یافته قبل و بعد از جهش می پردازد. با بررسی جدول مشخص شد با وجود مثبت بودن فراسنجه هیدروپاتی در دو جهش K89S و D92L در برآیند کلی مقدار منفی است و مشابه سایر لوپ های EF-hand فعال می باشد.

بررسی نتایج درخت تبارشناسی فتوپروتئین های ایجاد شده با سایر فتوپروتئین ها (شکل ۳) نشان می دهد، فتوپروتئین PMC در یک شاخه جداگانه نزدیک به

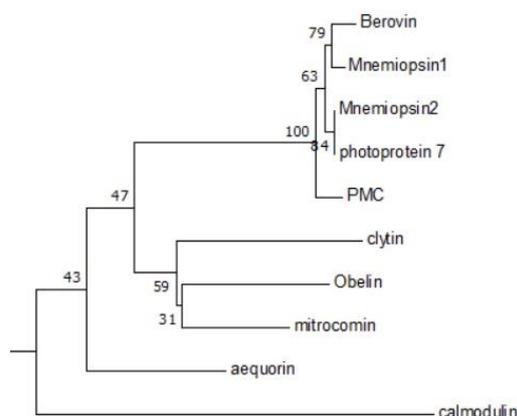
گروهی از پروتئین ها مانند نمیوپسین<sup>۱</sup>، برووین<sup>۱</sup> و نمیوپسین<sup>۲</sup> قرار گرفته است. این موقعیت تبارشناسی می تواند نشان دهنده شباهت های ساختاری و عملکردی بالقوه ای میان PMC و سایر پروتئین های موجود در این گروه باشد. درخت تبارشناسی ارائه شده نشان می دهد که PMC از نظر تکاملی نسبت به پروتئین هایی مانند، اکوارین، اوبلین و میتروکومین<sup>۲</sup> فاصله دارد. این فاصله می تواند حاکی از تفاوت های ساختاری و عملکردی عمده در میان این گروه ها باشد. PMC با توجه به جایگاه آن در درخت تبارشناسی و مقادیر آماری بوت استرپ، با پروتئین های تنظیم کننده کلسیم و سیگنال دهنده نوری در گونه های نزدیک شباهت تکاملی بالایی دارد. این پروتئین احتمالاً ویژگی های ساختاری و عملکردی مشابهی با این گروه دارد و شاید نقش مشابهی در تنظیم کلسیم یا پاسخ های نوری ایفا کند، که برای تحقیقات بیشتر در زمینه های بیوشیمیایی و تکاملی می تواند جذاب باشد. مقدار بوت استرپ شاخه ی مشترک PMC و فتوپروتئین<sup>۷</sup> در این درخت فیلوژنی ۶۳ است.

	- N	N-
E50G	-۲/۰۴۴	-۱/۷
F85D	۰/۵	-۰/۲
F87D	۰/۶۱۱	-۰/۰۸۹
K89S	۰/۱۲۲	۰/۴۶۷
V91K	-۰/۹	-۱/۸
D92L	-۰/۰۸۹	۰/۷۲۲
P93E	-۰/۰۸۹	-۰/۳
G96E	-۱/۴	-۱/۷۴۴

جدول ۲ جدول فراسنجه آبگریزی hydrophathy/ Kyte & Dolittle به دست آمده با سرور ProtScale برای بررسی موضعی تک جهش ها، - N بیانگر فراسنجه آبگریزی قبل اعمال جهش، N- بیانگر فراسنجه آبگریزی بعد از اعمال جهش

<sup>2</sup> Mitrocomin

<sup>1</sup> Berovin



شکل ۳ درخت تبارشناسی توالی‌های فتوپروتئین‌های مختلف به همراه PMC (نمیوپسین جهش‌یافته) رسم شده توسط نرم‌افزار MEGA 7.

ساختاری یا انعطاف‌پذیری بالا در نواحی خاص یا نااطمینانی در داده‌ها هستند. شکل ۴ به بررسی B-factor برای پروتئین‌های Mn2 (الف) و PMC (ج) در موقعیت لوپ EF-hand II (باقیمانده‌های آمینواسیدی ۸۵ تا ۹۶) در مقایسه با لوپ EF-hand IV (ب)، به‌عنوان یک لوپ فعال و موثر در عملکرد فتوپروتئین، می‌پردازد. نتایج بیانگر الگوی رفتاری یکسان لوپ PMC در مقایسه با لوپ EF-hand IV می‌باشد.

بررسی نتایج انعطاف‌پذیری نشان می‌دهد که توزیع نرمال آمینواسیدهای انعطاف‌پذیر در PMC اتفاق افتاده است. بالاخص در موقعیت ۱۲۱ در این لوپ که آمینواسیدهای باردار هستند و انتظار برای اتصال به کلسیم را افزایش داده است. بنابراین، به‌نظر می‌رسد این لوپ مستعد ایفا نقش در EF-hand است. در حالی که، در Mn2 شروع توالی لوپ EF-hand II با آمینواسیدهای با انعطاف‌پذیری پایین (صفر) است و احتمالاً سبب کاهش انعطاف‌پذیری لوپ امکان اتصال به کلسیم در این موقعیت‌ها به‌وجود نمی‌آید. مقایسه انعطاف‌پذیری باقی‌مانده لوپ EF-hand II در مقایسه با EF-hand IV بیانگر الگوی انعطاف‌پذیری در آمینواسیدهای حفاظت‌شده لوپ در موقعیت‌های ۱، ۶ و ۱۲ می‌باشد.

این عدد نشان‌دهنده‌ی اطمینان متوسط رو به بالا است، به این معنی که در ۶۳ درصد از تکرارهای تحلیل بوت‌استرپ، این شاخه تأیید شده است. بنابراین، می‌توان با اطمینان نسبی گفت که PMC و فتوپروتئین ۷ دارای منشأ تکاملی مشترک هستند، اما هنوز جای بررسی بیشتر دارد.

نزدیکی PMC به پروتئین‌های نمیوپسین ۲ و فتوپروتئین ۷ ممکن است به‌دلیل شباهت‌های مشترک در عملکردهای زیستی آنها باشد، که احتمالاً شامل پاسخ به سیگنال‌های نوری یا تنظیم کلسیم می‌شود. این نوع تحلیل می‌تواند به دریافت درک بهتری از تکامل و کاربردهای بالقوه زیستی PMC و پیش‌بینی عملکرد آن براساس شباهت‌های تکاملی کمک کند.

در شکل ۳ فتوپروتئین‌های دو شاخه کولترات‌ها، شامل برووین، نمیوپسین ۱ و ۲، فتوپروتئین ۷، PMC و کنیداریا<sup>۱</sup>، شامل اکورین، کلاپتین<sup>۲</sup>، ابلین، میتروکامین با سه EF-hand و کالمودولین<sup>۳</sup> با چهار EF-hand آورده شده است. در مدل‌سازی سه بعدی پروتئین‌ها B-factor به شفافیت دقت و ساختار اشاره دارد. ساختارهایی با B-factor پایین عمدتاً بیانگر دقت و وضوح بالاتر هستند. در حالی که، ساختارهایی با B-factor بالا نشان‌دهنده تغییرات

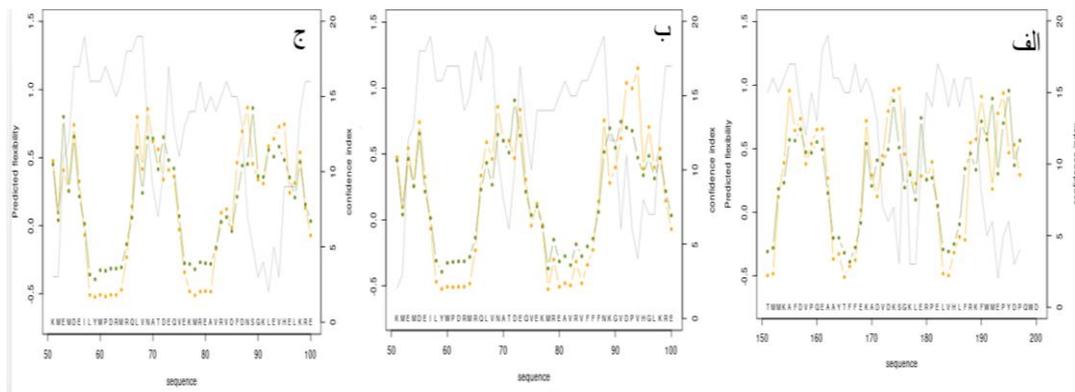
<sup>3</sup> Calmodulin

<sup>1</sup> Cnidaria

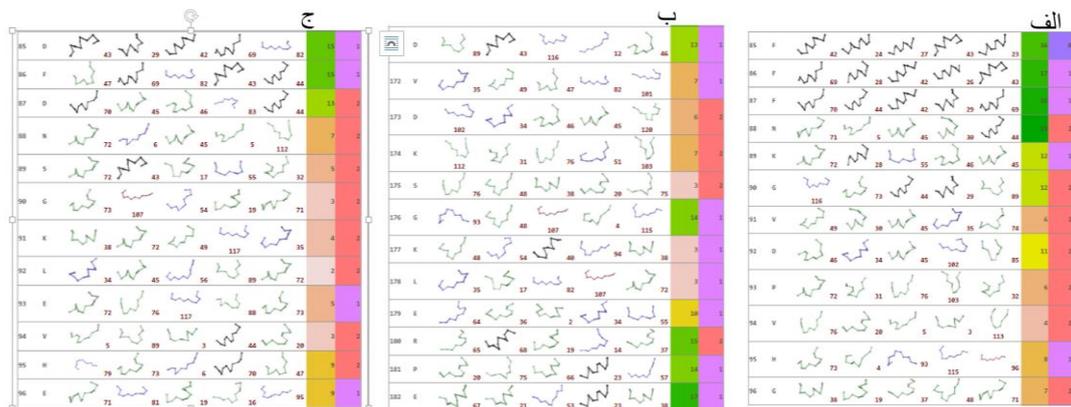
<sup>2</sup> Clytin

نهایت، ستون نهم، کلاس انعطاف پذیری<sup>۲</sup> را مشخص می‌کند که با مقادیر عددی ۰ (غیر منعطف/سخت)، ۱ (دارای انعطاف نسبی) و ۲ (منعطف) تعریف می‌شود. همان‌طور که در شکل ۶ مشخص است، در نمیوپسین ۲ وحشی دو EF-hand دارای عملکرد و اتصال به کلسیم می‌باشند.

جدول LPS در شکل ۵ دارای ۹ ستون است. از چپ ستون اول شماره اسید آمینه، ستون دوم نام آمینواسیدها است. ستون سوم تا هفتم نشانگر ۵ نوع از بهترین کانفورماسیون‌های آمینواسید را نشان می‌دهند. ستون هشتم صحت ساختار<sup>۱</sup> (CI) را نشان می‌دهد که در محدوده‌ی عددی ۱ تا ۱۹ است؛ هرچه این عدد به ۱۹ نزدیک‌تر و رنگ آن سبزتر باشد، صحت ساختار بیشتر می‌شود. در



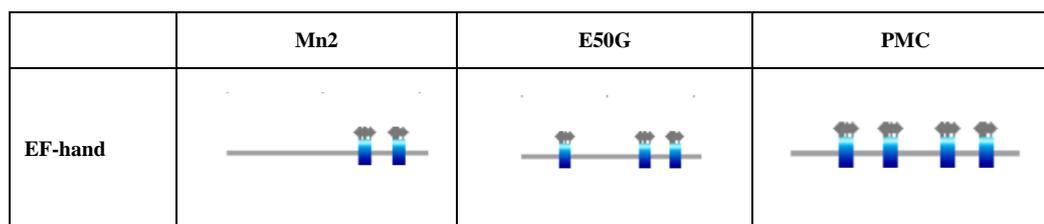
شکل ۴ نمودارهای B-factor برای پروتئین‌های نمیوپسین ۲، PMC به‌دست آمده از سرور PredyFlexy. الف) نمودار B-factor پروتئین Mn2؛ ب) نمودار B-factor پروتئین لوپ Mn2 EF-hand IV؛ ج) نمودار B-factor پروتئین PMC. در (الف-ب-ج). خطوط سبز و نارنجی و خاکستری به ترتیب بیانگر B-factor، RMSF و فراسنجه اطمینان است. هر چه B-factor کمتر و فراسنجه اطمینان (confidence index) بالاتر باشد، صحت ساختار بیشتر است.



شکل ۵ نتایج جدول LPS (Local Structure Prediction) برای پروتئین‌های Mn1، Mn2 و PMC با استفاده از سرور PredyFlexy به‌دست آمده است. الف) جدول انعطاف پذیری برای پروتئین Mn2، ب) جدول انعطاف پذیری برای پروتئین Mn2، ج) جدول انعطاف پذیری برای پروتئین PMC.

<sup>2</sup> flexibility Class

<sup>1</sup> confidence index



شکل ۶ تصویر EF-hand های فعال در Mn2 و جهش های E50G و PMC توسط سرور ExPasy (Prosite) به دست آمده است.

گذاری بر عملکرد پروتئین و کاهش پایداری آن با شد، اما با حد آستانه عدم انطباق ساختاری ( $RMSD > 2$ ) فاصله زیادی وجود دارد. صحت‌سنجی فراسنجه ERRAT براساس برهمکنش و پراکندگی غیرتصادفی اتم‌ها در ساختار پروتئین می‌باشد. بررسی مقادیر عددی ERRAT مدل‌های مختلف جهش‌یافته‌ها در مقایسه با نیوپسین ۲ وحشی قابل قبول می‌باشد. در واقع، اختلاف کم این فراسنجه بین جهش‌یافته‌ها و نیوپسین وحشی بیانگر پیروی اتم‌های آمینواسید جهش‌یافته از الگوی پراکندگی غیرتصادفی اتم‌ها در پروتئین است. با توجه به جدول ۳ بالاترین درصد ERRAT در جهش F87D با مقدار  $63/8$  و در PMC به میزان  $60/3$  می‌باشد. که در مقایسه با Mn2 قابل قبول می‌باشد. ERAT بیشتر نشان‌دهنده کیفیت قابل قبول تعاملات غیرپیوندی است که ممکن است به پایداری کلی پروتئین کمک کند. همچنین، برای ارزیابی بیشتر از فاکتور VERIFY3D استفاده شده است که بیشترین سازگاری باقی‌مانده‌های آمینواسیدی در ساختار سه‌بعدی با محیط اطراف را مشخص می‌کند. نزدیکی مقادیر VERIFY3D در جهش‌یافته‌ها نسبت به مدل وحشی دلالت بر سازگاری آمینواسیدهای تغییر یافته با ریز محیط ساختار سوم دارد و جهش یافته PMC با وجود دریافت هشت جهش، اختلال قابل ملاحظه‌ای در تطابق توالی و ساختار سه‌بعدی نشان نمی‌دهد. در نهایت فراسنجه دیگری برای صحت‌سنجی مدل‌های طراحی شده استفاده شده است.

اما با اعمال جهش در موقعیت E50G در لوپ اول EF-hand I بازیابی ساختاری و عملکردی مشاهده می‌شود. نتایج بررسی توالی‌های تک‌تک جهش‌ها در سرور Prosite نشان داد که در هیچ تک جهشی به صورت مستقل EF-hand II فعال و بازیابی نشده است و با اعمال همه‌ی جهش‌های این مطالعه در PMC، EF-hand II نیز فعال و عملکرد آن بازیابی شده است.

### ۲-۳ آنالیز ساختاری

برای انتخاب بهترین مدل ساختار سوم ساخته شده از میان ۱۰ مدل پیشنهادی توسط نرم‌افزار modeler v10.4، از فراسنجه‌های مختلفی استفاده شده است. فراسنجه RMSD شاخص مقایسه ساختار سوم پروتئین جهش‌یافته مدل شده با پروتئین الگوی مدل‌سازی با بیشترین درصد همسانی ( $5vp3$ ) می‌باشد. هرچه میزان RMSD مدل نسبت به ساختار هدف، کمتر باشد مدل در وضعیت ساختاری نزدیک‌تری نسبت به الگو قرار دارد. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، تمامی مدل‌های انتخابی در محدوده‌ی مناسبی نسبت به  $5vp3$  و در دامنه  $0/71$  الی  $0/74$  هستند که نشان‌دهنده شباهت زیاد ساختار جهش یافته به ساختار مرجع است، که بیانگر احتمال حفظ ساختار طبیعی پروتئین است. مدل‌های انتخابی D92L بیشترین انطباق و PMC با کمترین انطباق و به ترتیب دارای RMSD برابر  $0/40$  و  $0/69$  می‌باشند. علیرغم اینکه PMC دارای کمترین انطباق ساختاری می‌باشد که می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات ساختاری قابل توجه منجر به اثر

جدول ۳ نتایج فراسنجه های ساختاری به دست آمده برای بررسی صحت ساختاری مدل های پروتئینی

	ZDOPE	ERRAT	VERIFY3D	RMSD
Mn2	-۰/۵۱	۶۵/۸	۹۸/۰۷	۰/۷۳
E50G	-۰/۲۵	۶۲/۸	۹۰/۸۲	۰/۷۳
F85D	-۰/۲۹	۶۲/۳	۸۹/۳	۰/۷۴
F87D	-۰/۴۳	۶۳/۸	۹۴/۶	۰/۷۱
K89S	-۰/۳۴	۶۱/۳	۹۳/۷	۰/۷۲
V91K	-۰/۲۸	۵۶/۲	۹۷/۱	۰/۷۱
D92L	-۰/۳۸	۶۲/۸	۹۴/۶	۰/۴۰
P93D	-۰/۲۹	۵۰/۲	۸۷/۹	۰/۷۱
G96E	-۰/۴۲	۵۴/۷	۸۷/۹	۰/۷۱
PMC	-۰/۰۹۲	۶۰/۳	۹۰/۳	۰/۶۹

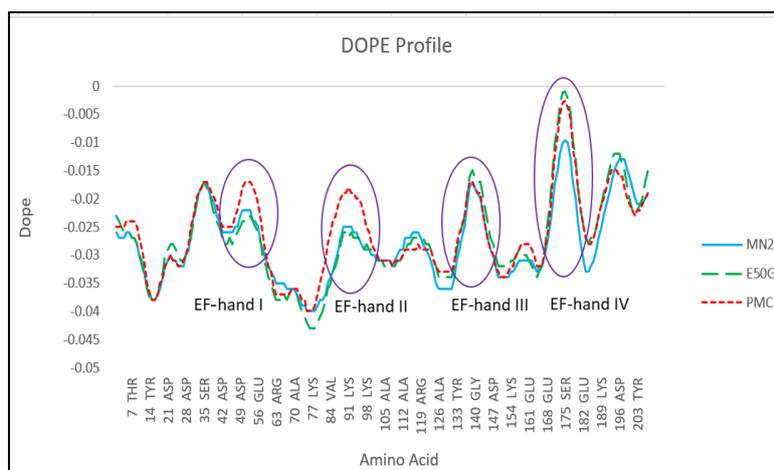
مانده های آمینواسیدی لوپ EF-hand II بازیابی شده با لوپ سایر EF-hand ها پرو فایل DOPE مطابق شکل ۷ ترسیم شد.

بررسی نتایج نمودار Z-Dope جهش یافته PMC در مقایسه با Mn2 و E50G نشان می دهد که الگوی تغییرات Z-Dope در لوپ EF-hand II بازیابی شده مشابه الگوی سایر لوپ های فعال در EF-hand I,III,IV می باشد. همچنین، علیرغم اختلاف در فراسنجه Z-Dope بین Mn2 و PMC، به میزان ۰/۴۲، این تغییرات جزئی است (جدول ۴). بنابراین، این اختلاف برابندی از اثر سایر مناطق بوده و این اثر برابندی در تغییرات Z-Dope سایر لوپ ها طبق شکل ۷ به طور واضحی قابل برداشت می باشد.

برای ترسیم مدل گرافیک مولکولی پروتئین وحشی و جهش یافته ها، بعد ارزیابی مدل های ساخته شده با فراسنجه های ذکر شده (RMSD, Z-DOPE, VERIFY3D و ERRAT)، بهترین مدل ها انتخاب شدند.

در مقدار پتانسیل آماری یا Z-Dope وابسته به فاصله اتمی، باتوجه به اعداد به دست آمده در جدول ۳ به نظر می رسد تداخلات فضایی زنجیره های جانبی در PMC بیشتر شده است که می توان علت آن را نبود الگو دارای ساختاری با چهار EF-hand در فایل aligned2 و همچنین اعمال ۸ جهش در لوپ EF-hand II نسبت داد. معمولاً مقدار عددی این فراسنجه نسبت به عدد ابتدایی مدل وحشی سنجیده می شود. به این صورت که مقدار عددی کمتر از صفر، قابل قبول است. باتوجه به مقادیر به دست آمده در جدول ۳، جهش های E50G، F85D، V91K و P93D کاهش خوبی در Z-Dope نشان می دهند.

به صورت کلی، مقایسه ی فاکتورهای فوق در پروتئین های دارای تک جهش، PMC و نمیسین ۲ وحشی در محدوده ی مناسب عددی قرار دارند. نتایج پیش بینی می کنند مدل های انتخابی در وضعیت مطلوب ساختاری قرار دارند. برای بررسی منطقه ای تغییرات Z-Dope باقی



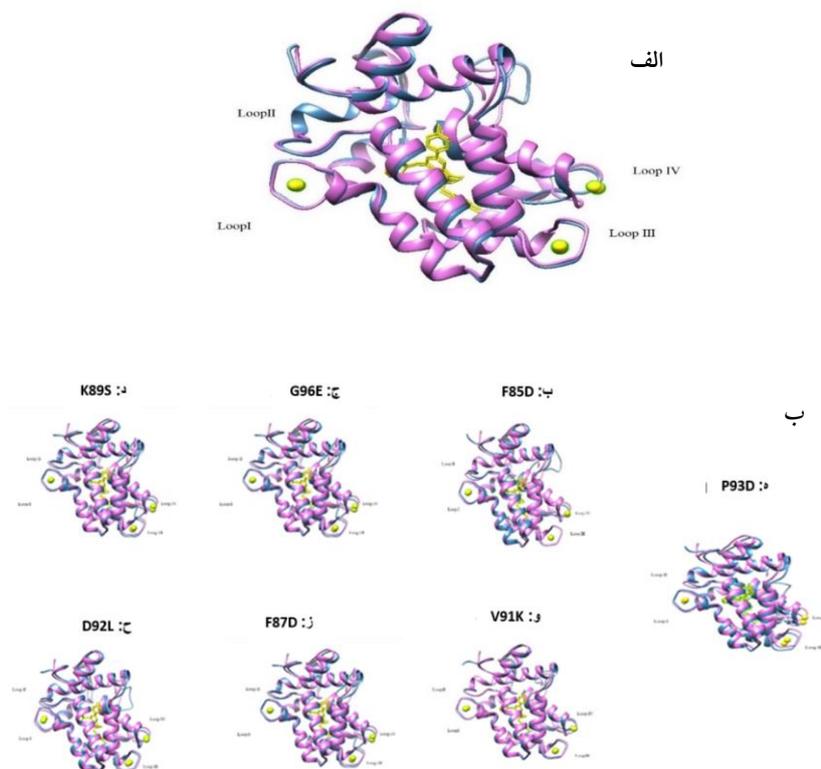
شکل ۷ نمودار Z dope به دست آمده از سرور SaliLab Model Evaluation برای بررسی کلی PMC در مقایسه با Mn2

جدول ۴ نتایج Z dope به دست آمده از سرور SaliLab Model Evaluation برای بررسی موضعی تک جهش‌ها

	N-	- N
F85D	-۰/۰۳۳	-۰/۰۲۹
F87D	-۰/۰۲۹	-۰/۰۲۶
K89S	-۰/۰۲۵	-۰/۰۲۸
V91K	-۰/۰۲۵	-۰/۰۲۰
D92L	-۰/۰۲۵	-۰/۰۲۹
P93E	-۰/۰۲۶	-۰/۰۲۲
G96E	-۰/۰۲۸	-۰/۰۲۷

ناحیه سفید مورب در شکل ۹ (الف و ب) به ترتیب برهمکنش باقیمانده‌های پروتئین را در ساختار سوم PMC و نمپوسین ۲ وحشی نشان می‌دهد (برهمکنش تک تک باقیمانده‌ها با خود آنها است). شکل ۹ (ج) برای محاسبه میانگین فاصله و انحراف استاندارد دو مدل PMC و وحشی ترکیب شده است. در شکل ۹ (ج) برای محاسبه میانگین فاصله و انحراف استاندارد برای حالت Mn2 - PMC آورده شده است. با ارزیابی مقادیر RRDistance می‌توان گفت فضای داخلی پروتئین PMC نسبت به حالت وحشی کم تراکم‌تر است.

شکل ۸ تصاویر تطبیق ساختار سه‌بعدی مدل‌های ساخته شده پروتئین‌های دارای تک جهش و هشت جهش (PMC) با مدل نمپوسین ۲ وحشی را نشان می‌دهد. بررسی نمایش ساختار در محل لوپ EF-hand II بازیابی شده در مدل‌های مختلف بیانگر تغییرات جزئی در ساختار تک جهش‌ها می‌باشد (شکل ۸ ب، ج، د، ه، و، ز، ح). همچنین، بررسی ساختار فرم وحشی با PMC (الف) بیانگر ایجاد پیکربندی لوپ در ناحیه مورد نظر می‌باشد. در این تصویر انتخاب زاویه‌ای مناسب به وضوح اختلاف ساختار سه‌بعدی مدل‌های دارای جهش و وحشی بسیار کمک کرده است.



شکل ۸ نمایش مدل‌های ساختار سوم منتخب فتوپروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera. الف) PMC به همراه Mn2، ب) F85D به همراه Mn2، ج) G96E به همراه Mn2، د) K89S به همراه Mn2، ه) P93D به همراه Mn2، و) V91K به همراه Mn2، ز) F87D به همراه Mn2، ح) D92L به همراه Mn2.

تاثیر قرار دهد. بررسی نقشه بیانگر کاهش تماس با باقی‌مانده‌های آبریز در موقیعت موتیف می‌باشد.

K89S: لیزین یک اسید آمینه باردار مثبت است و نقش مهمی در برهمکنش‌های الکترواستاتیک و هیدروژن‌باند دارد. جایگزینی با سرین (قطبی اما بدون بار) می‌تواند تعادل بار محلی را تغییر دهد و تماس‌های کلیدی را کاهش دهد. بررسی نقشه، نشان دهنده کاهش تماس در نزدیکی باقی‌مانده‌های بار منفی می‌باشد.

V91K: والین یک اسید آمینه آبریز است، در حالی که لیزین بزرگ و باردار است. این تغییر می‌تواند باعث افزایش انعطاف‌پذیری یا کاهش تماس آبریزی محلی شود. در نقشه RR این جایگزینی، ممکن است تماس‌های آبریز کاهش و تماس‌های الکترواستاتیک در نزدیکی لیزین جدید افزایش یابد.

تحلیل اثر جهش‌ها بر اساس اطلاعات جهش‌یافته‌ها (F85D، F87D، K89S، V91K، D92L، P93E، G96E) و نقشه Distance RR در تک تک جهش‌ها نشان می‌دهد که:

F85D: فنیل آلانین یک اسید آمینه آبریز است و جایگزینی آن با آسپارتیک اسید که قطبی و آب‌دوست است، می‌تواند باعث اختلال در محیط آبریز محلی و کاهش پایداری شود. در نقشه RR، این جهش ممکن است باعث ایجاد نواحی قرمز در تماس این باقی‌مانده با دیگر بخش‌های آبریز نزدیک شود.

F87D: مشابه F85D است، یعنی تغییر از آبریز به آبدوست که ممکن است باعث کاهش برهمکنش‌های آبریزی شود و ساختار لوپ یا هسته پروتئین را تحت

آبگریزی و آبدوستی پروتئین های وحشی (الف) و فتوپروتئین جهش یافته کایمر (PMC) را نشان می دهد. در این نقشه، رنگ های آبی، سفید و زرد-نارنجی نشان دهنده بخش های آبدوستی، نواحی خنثی و نواحی آبگریزی هستند. در هر دو تصویر، نواحی مشخص شده با دایره قرمز در مناطقی با مقدار تمایل به آبدوستی متفاوت قرار دارند. این تغییرات ممکن است ناشی از جهش های معرفی شده باشد. با توجه به شکل ۱۰ (الف) در نیموپسین ۲ وحشی، آمینواسیدهای غیرقطبی آبگریز با رنگ زرد در ناحیه مشخص، غالب هستند. در شکل ۱۰ (ب) پس از اعمال جهش در PMC نواحی زرد رنگ به آبی تغییر یافته که بیانگر آمینواسیدهای قطبی و آبدوست می باشد. جهش هایی مانند F85D و F87D، سبب جایگزینی اسیدهای آمینه آروماتیک آبگریزی با آمینو اسیدهای قطبی یا آبدوستی، مانند اسپارتیک اسید شده اند. این تغییر احتمالاً تأثیر زیادی بر تعاملات سطحی دارد. بنابراین، می توان نتیجه گرفت اعمال جهش ها در ساختار پروتئین باعث افزایش قطبیت شده است. با توجه به اینکه بخش جهش یافته به طور مستقیم در نواحی تعامل پروتئین با یون کلسیم می باشد، به نظر می رسد این تغییرات بر روی عملکرد زیستی فتوپروتئین تأثیرگذار خواهد بود. با توجه به جدول ۵ در تمامی جهش ها (به جز F87D) کاهش محتوی ساختار هلیکس، بتا و افزایش ساختار کویل نسبت به حالت نیموپسین وحشی مشاهده شده است. افزایش میزان سطوح در دسترس در پروتئین های دارای تک جهش و PMC نسبت به حالت وحشی ناشی از تغییرات آمینواسیدی برای بازیابی ساختاری و عملکردی می باشد. با توجه به جدول ۵ میزان سطوح در دسترس در PMC افزایش یافته که علت آن را می توان به تشکیل لوپ در این جهش نسبت داد.

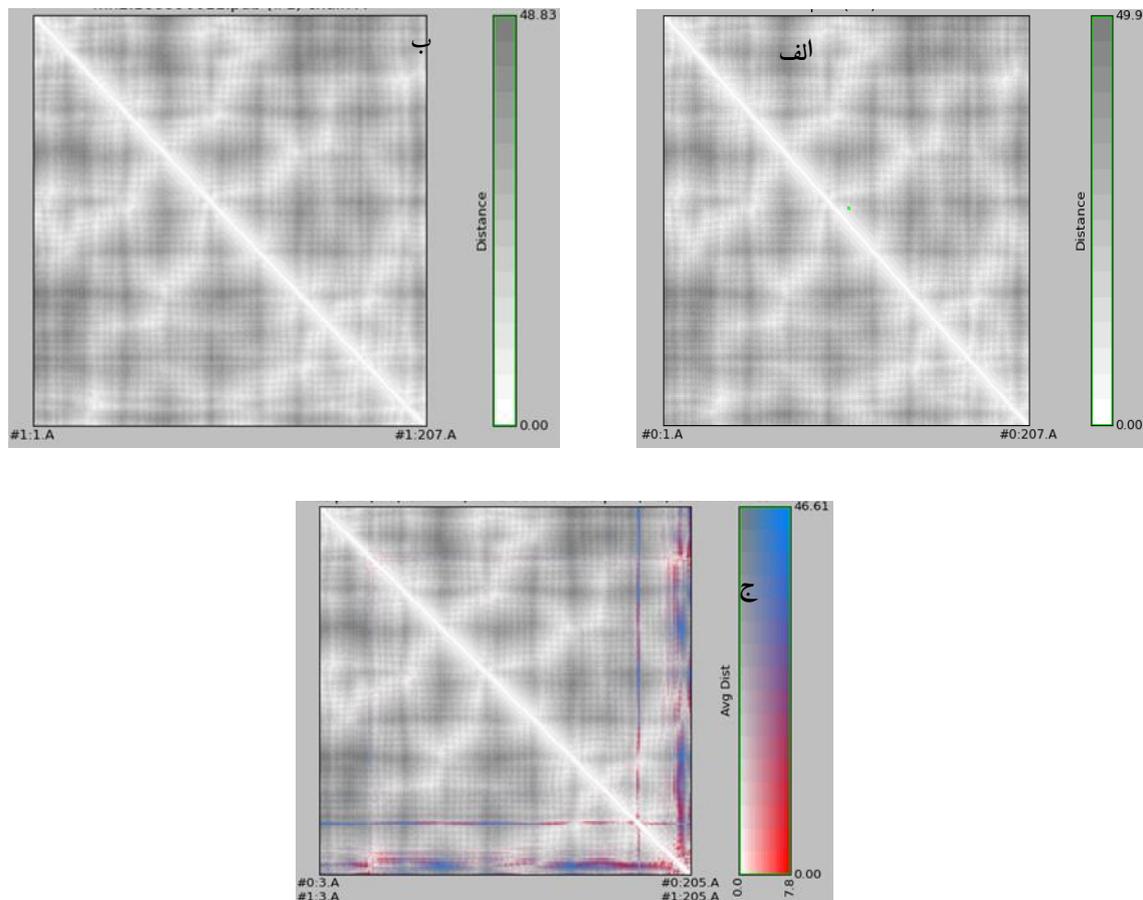
D92L: جایگزینی یک اسید آمینه قطبی با آبگریز می تواند باعث تغییر تعادل قطبی و آبگریز در محیط محلی شود. بررسی نقشه بیانگر ایجاد احتمالی نواحی سبز در نزدیکی لوسین خواهد بود که نشان دهنده تماس آبگریزی جدید است.

P93E: پرولین به دلیل ساختار حلقوی خود محدودیت های فضایی دارد و نقش کلیدی در ایجاد پیچ های لوپ ایفا می کند. جایگزینی آن با گلو تامیک اسید می تواند باعث تغییر ساختار ثانویه موضعی و انعطاف پذیری بیشتر شود. بررسی نقشه در این ناحیه بیانگر کاهش تماس ها (نواحی قرمز) در اطراف این باقی مانده می باشد.

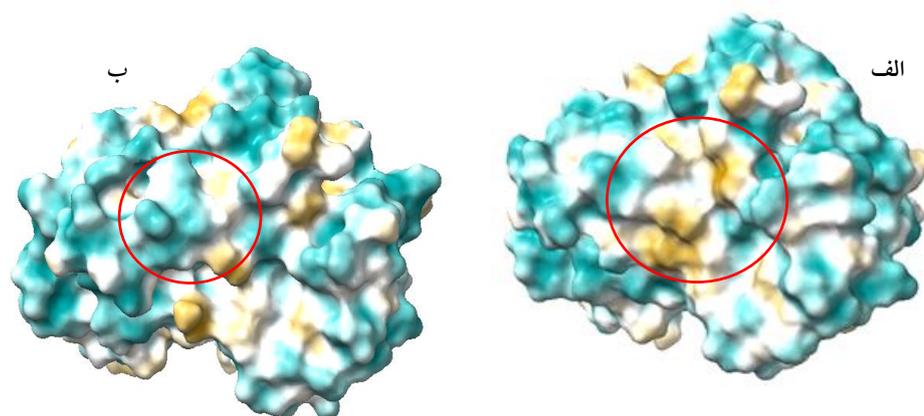
G96E: گلیسین کوچک ترین اسید آمینه است و انعطاف پذیری بالایی دارد. جایگزینی آن با گلو تامیک اسید که قطبی و حجیم است، می تواند باعث کاهش انعطاف پذیری و ایجاد تنش در زنجیره شود. در نقشه RR، ممکن است تماس های نزدیک به این باقی مانده کاهش یابد.

تحلیل کلی ناحیه PMC در ناحیه باقی مانده های ۸۵ الی ۹۶ بیانگر اثر جهش های متعدد در این بازه که باعث تغییرات در برهمکنش های آبگریز و قطبی، تعادل بار، و حتی ساختار ثانویه شده است تحلیل دقیق نقشه RR Distance نشان دهنده کاهش تماس های کلیدی در ناحیه جهش یافته (نواحی قرمز) و احتمالاً تغییرات پایداری کلی پروتئین است. در نهایت می توان گفت علیرغم کوچک بودن محدوده ی جهش، تغییرات می توانند اثراتی بر نواحی دورتر داشته باشند که به صورت کاهش تماس ها یا تغییر در الگوهای رنگی در کل نقشه RR دیده می شود. احتمالاً ساختار جهش یافته نسبت به ساختار وحشی به دلیل جهش های افزایش دهنده قطبیت یا کاهش دهنده برهمکنش های آبگریز انعطاف پذیری بیشتری دارد.

در بررسی تغییر قطبیت در لوپ موتیف EF-hand II، نقشه ی مولکولی ایجاد شده با Chimera، توزیع سطحی



شکل ۹ محاسبه فشردگی داخلی ساختار سوم پروتئین‌های Mn2 و PMC توسط فراسنجه RRDistance با استفاده از UCSF Chimera. الف) نشان‌دهنده RRDistance پروتئین Mn2. ب) نشان‌دهنده RRDistance پروتئین PMC. ج) نشان‌دهنده Difference RRDistance پروتئین Mn2 با PMC.



شکل ۱۰ تصاویر نواحی آبگریز ساختار سوم پروتئین PMC و Mn2 با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera. رنگ زرد نشان‌دهنده نواحی آبگریز و رنگ آبی نواحی آبدوست را نشان می‌دهد. الف) تصویر نواحی آبگریز پروتئین Mn2، ب) تصویر نواحی آبگریز PMC.

جدول ۵ نتایج بررسی فراسنجه‌ها بین ساختار و عملکرد با استفاده از سرور VADAR

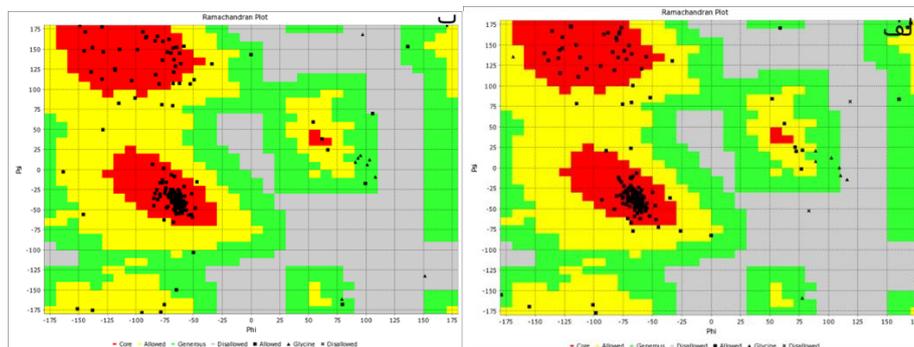
	$\alpha$ -Helix	B- Sheet	Coil	Mean hbond distance	Total ASA	Total Volume	Free Energy Of Folding
Mn2	% ۵۶	% ۵	% ۳۷	۲/۲	۹۷۹۷/۱	۲۸۰۸۳/۸	-۱۵۸/۳۱
E50G	% ۵۳	% ۵	% ۴۰	۲/۲	۱۰۱۱۸/۰	۲۸۲۳۱/۲	-۱۶۳/۲۸
F85D	% ۵۴	% ۴	% ۴۱	۲/۲	۱۰۲۶۴/۱	۲۷۹۱۳/۶	-۱۵۹/۴۷
F87D	% ۵۷	% ۴	% ۳۷	۲/۲	۱۰۰۳۸/۷	۲۸۱۲۸/۲	-۱۶۶/۲۱
K89S	% ۵۵	% ۲	% ۴۱	۲/۲	۱۰۵۴۸/۴	۲۸۷۸۹/۵	-۱۶۲/۱۷
V91Q	% ۵۵	% ۴	% ۴۰	۲/۳	۹۹۱۸/۲	۲۸۷۳۵/۶	-۱۶۲/۵۲
V91K	% ۵۵	% ۲	% ۴۲	۲/۳	۹۹۲۶/۰	۲۷۸۰۰/۲	-۱۶۴/۵۷
D92L	% ۵۵	% ۲	% ۴۲	۲/۳	۱۰۰۸۲/۸	۲۸۳۱۰/۵	-۱۶۴/۹۰
P93D	% ۵۴	% ۴	% ۴۱	۲/۳	۱۰۴۸۹/۱	۲۸۶۹۸/۲	-۱۶۱/۸۶
P93E	% ۵۵	% ۲	% ۴۱	۲/۲	۱۰۱۳۰/۶	۲۸۶۱۸/۲	-۱۶۴/۰۴
G96E	% ۵۴	% ۴	% ۴۱	۲/۳	۱۰۱۴۸/۹	۲۸۰۳۵/۵	-۱۶۱/۹۶
PMC	% ۵۳	% ۲	% ۴۳	۲/۲	۱۰۲۰۴/۰	۲۷۹۹۳/۳	-۱۵۰/۵۷

غیرمجاز<sup>۱</sup> منتقل شوند که می‌تواند بیانگر کاهش پایداری یا اختلال در عملکرد پروتئین باشد. همچنین، جهش سبب کاهش تراکم در نواحی Core و افزایش پراکندگی در نمودار جهش یافته‌ها شده است که نشان‌دهنده تغییرات ساختاری مهمی در پروتئین جهش یافته نسبت به وحشی می‌باشد. در مجموع می‌توان بیان کرد که نمودار رامانچاندران فرم جهش یافته، نشان‌دهنده افزایش تعداد باقی‌مانده‌ها در نواحی غیرمجاز و کاهش تراکم در نواحی هسته‌ای است، که بیانگر اختلال در تاخوردگی طبیعی پروتئین می‌باشد. این یافته با افزایش انرژی آزاد فولدینگ وحشی به جهش یافته PMC از ۱۵۸- به ۱۵۰- کیلوکالری بر مول کاملاً هم‌راستا بوده و نشان‌دهنده کاهش پایداری ساختار جهش یافته نسبت به فرم وحشی است. بنابراین، داده‌های ساختاری و ترمودینامیکی به صورت هم‌افزا تأیید می‌کنند که جهش مورد نظر منجر به ناپایداری نسبی پروتئین شده است.

از آنجایی که، عملکرد لوپ EF-hand II منوط به اتصال به کلسیم می‌باشد، افزایش میزان دسترسی، ممکن است باعث تشکیل جایگاه اتصال به کلسیم شود. حجم کل در تک جهش‌ها افزایش و در حالت PMC کاهش یافته است. این امر بیانگر فشردگی بیشتر ساختار PMC نسبت به پروتئین وحشی در طی جهش‌های اعمال شده است. آخرین ستون جدول ۵ به بررسی انرژی آزاد تاخوردگی پروتئین‌ها می‌پردازد. مقدار انرژی آزاد تاخوردگی در پروتئین‌های دارای تک جهش نسبت به وحشی کاهش قابل توجهی داشته است. کاهش انرژی آزاد تاخوردگی دلالت بر پایداری بیشتر دارد. لازم به ذکر است، انرژی آزاد فولدینگ در پروتئین PMC دچار افزایش شده است که نشانگر کاهش پایداری فتوپروتئین PMC است.

با توجه به شکل ۱۱ به بررسی نتایج رامانچاندران نمیوپسین وحشی و جهش یافته با استفاده از سرور SAVES می‌پردازد، بررسی نمودار نشان می‌دهد که جهش باعث شده تعداد بیشتری از باقی‌مانده‌ها به نواحی

<sup>1</sup> Disallowed



شکل ۱۱ الف) نمودار رامچاندرا ساختار پروتئین وحشی و ب) جهش یافته PMC با استفاده از سرور SAVES. این نمودار زوایای دی هدرال  $\phi$  و  $\psi$  باقی مانده های آمینواسیدی را نمایش می دهد و نواحی مجاز و غیرمجاز فضایی را مشخص می کند. تراکم باقی مانده ها در نواحی هسته ای (Core) نشان دهنده پایداری ساختار بوده و حضور در نواحی غیرمجاز بیانگر اختلال در تاخوردگی طبیعی پروتئین است. مقایسه فرم وحشی و جهش یافته نشان می دهد که جهش موجب کاهش پایداری فضایی و افزایش پراکندگی در نواحی غیرمجاز شده است.

این داده ها بررسی مختصری از کیفیت ساختاری و پایداری جهش های پروتئینی ارائه می دهند. جهش هایی با مقادیر RMSD کم و نمرات VERIFY3D و ERRAT بالا احتمالاً بیشترین پایداری و عملکرد صحیح را در محیط زیستی طبیعی دارند. از سوی دیگر، جهش هایی که در این معیارها نمرات پایینی کسب کرده اند، ممکن است مشکلات جدی در عملکرد و پایداری پروتئین ایجاد کنند.

بررسی موتیف EF-hand II بازیابی شده، نشان دهنده تغییرات واضحی در هیدروفوبیسیته سطحی است که ممکن است به دنبال جهش های متوالی در این مناطق باشد. این تغییرات می توانند بر پایداری پروتئین و توانایی تعامل با سایر مولکول ها (به طور مستقیم با کلسیم و غیرمستقیم در ارتباط با کولترازین) تأثیر بگذارند و این امر احتمالاً با تغییر عملکرد زیستی آن مرتبط خواهد بود. با مقایسه حجم و انرژی آزاد فتوپروتئین وحشی و PMC به نظر می رسد که نواحی داخلی PMC فشرده تر شده یا خلأهای درون ساختار کاهش یافته با شد و احتمالاً پروتئین PMC کارایی عملکردی خود را کاهش داده یا حتی غیرعملکردی شده باشد. اما بیشتر تک جهش ها، سبب افزایش حجم و

#### ۴- نتیجه گیری

هدف اصلی این پژوهش، بازیابی ساختاری و عملکردی EF-hand II در نمپوسین ۲ است که پس از مطالعات بیوانفورماتیکی نتایج قابل توجهی حاصل شد. الگو جهش های PMC توسط روش مهندسی تکامل مستقیم و منطقی در باقی مانده های حفاظت شده (۱،۳،۵،۷،۹،۱۲) لوپ IV نمپوسین ۲ که از نظر عملکردی فعال و دارای توانایی اتصال به کلسیم است طراحی شده است. به همین دلیل تشکیل لوپ EF-hand II قابل انتظار بود. البته مطالعات پیشین نشان داده شده است که لوپ I در نمپوسین ۲ با جهش E50G دچار بازیابی ساختاری و عملکردی شده بود و بازیابی مذکور موجب افزایش نشر نور تا ۱۹ برابر شده است [۱۰]. در ارزیابی نهایی توالی مشاهده شده در لوپ EF-hand II تعداد جایگاه های اتصال به کلسیم از ۳ به ۴ جایگاه افزایش یافته است. این افزایش می تواند منجر به اثر هم افزایی در حساسیت به کلسیم و فعالیت پرتوزایی شود. همچنین، جایگزینی باقی مانده های مذکور اتم اکسیژن را برای برهمکنش با کلسیم فراهم می کند.

انجام شد، نشان داد که در نتایج تجربی، شدت اولیه انتشار به طور قابل توجهی کاهش می یابد که دلیلی بر کاهش تعداد فوتون های ساطع شده از لوپ باز سازی شده است. این مسئله در تحقیقات تجربی نشان داد که نتایج بیوانفورماتیک به تنهایی نمی توانند در مطالعات بازیابی لوپ های بدون عملکرد معتبر باشند و برای شناسایی تفاوت های بیشتر بین مدل پیشنهادی PMC و پروتئین وحشی، انجام مطالعات تجربی ضروری است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان انجام شده است.

### منابع

- [1] Daunert, S., & Deo, S. K. (Eds.). (2006). *Photoproteins in bioanalysis* (p. 256). Weinheim, DE: Wiley-VCH.
- [2] Vafa, M., Khalifeh, K., & Jafarian, V. (2018). Negative net charge of EF-hand loop I can affect both calcium sensitivity and substrate binding pattern in mnemiopsin 2. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17, 807-814.
- [3] Hematyar, M., Jafarian, V., & Shirdel, A. (2022). Longer characteristic wavelength in a novel engineered photoprotein Mnemiopsin 2. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 21(6), 1031-1040.
- [4] Asadi Sofilar, A., Shirdel, A., Jafarian, V., & Khalifeh, K. (2023). An in silico analysis on the photoproteins Mnemiopsin 1 and Mnemiopsin 2 to explain the experimental results. *Luminescence*, 38(11), 1946-1954.
- [5] Eremeeva, E. V., & Vysotski, E. S. (2019). Exploring bioluminescence function of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins with site-directed mutagenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 95(1), 8-23.
- [6] Hakiminia, F., Khalifeh, K., Sajedi, R. H., & Ranjbar, B. (2016). Determination of structural elements on the folding reaction of mnemiopsin by spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 158, 49-55.

کاهش انرژی آزاد تاخوردگی شده است. به نظر می رسد با از بین رفتن لوپ EF-hand II در طی تکامل، انرژی آزاد فولدینگ کاهش و فولدینگ پروتئین بهتر و با پایداری بیشتر رخ می دهد و مطالعه انجام شده تا اندازه ای توانسته از بین رفتن لوپ EF-hand II طی تکامل را توجیه کند. مهم ترین تفاوت فتوپروتئین PMC نسبت به سایر فتوپروتئین های این خانواده، بازیابی عملکرد EF-hand II است. فعال شدن این لوپ تغییرات زیادی در فتوپروتئین ایجاد می کند. برای درک بهتر تأثیرات این لوپ بر پروتئین بررسی عملی برخی ویژگی ها مانند، حساسیت به کلسیم می تواند مفید باشد، زیرا وجود یک لوپ اضافی احتمالاً منجر به جذب بیشتر کلسیم و به دنبال آن افزایش حساسیت به کلسیم می شود.

تغییرات در شاخص ناپایداری نشان دهنده افزایش پایداری نسبت به حالت وحشی است که می توان علت آن را به جایگیری مناسب تر باقی مانده ها در لوپ دوم و برهمکنش های بین آن ها با یکدیگر نسبت داد. همچنین، با توجه به موقعیت دو جهش K89S و F85D که از باقی مانده های متصل به حفره محسوب می شوند، می توان نتیجه گرفت که این جهش ها موجب بهبود جایگیری و اتصال محکم تر در حفره شده اند و در نتیجه پایداری افزایش یافته است. همچنین، کاهش میزان آبگیزی از تفاوت های شاخص دیگر این فتوپروتئین نسبت به حالت وحشی است که دلیل آن می تواند جایگزینی تعداد بیشتری آمینواسید آبدوست در لوپ دوم باشد.

همچنین، کاهش تدریجی در مقادیر RMSD برای ساختار PMC نسبت به پروتئین وحشی، نشان دهنده پایداری بیشتر پروتئین PMC در این پژوهش است. با توجه به تغییرات مثبت به دست آمده در نتایج بیوانفورماتیک، انتظار می رود که این نتایج تجربی منجر به افزایش حساسیت در اتصال به کلسیم شوند. با این حال، بررسی مطالعه ای که توسط ابراهیمی و همکاران بر روی لوپ دوم اکورین

- that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253(5016), 164-170.
- [17] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- [18] Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, 2(9), 1511-1519.
- [19] Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), 83-85.
- [20] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- [21] Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 8, 477-486.
- [22] Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science*, 15(11), 2507-2524.
- [23] Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science*, 15(11), 2507-2524.
- [24] Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., & Wishart, D. S. (2003). VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic acids research*, 31(13), 3316-3319.
- [25] Ebrahimi, M., Mohseni, A., Khalifeh, K., Ranjbar, B., & Sajedi, R. H. (2017). Evolutionary conservation of EF-hand II loop in aequorin: Priority of intensity to decay rate in bioluminescence emission. *Archives of biochemistry and biophysics*, 634, 29-37.
- [7] Aghamaali, M. R., Jafarian, V., Sariri, R., Molakarimi, M., Rasti, B., Taghdir, M., ... & Hosseinkhani, S. (2011). Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins. *The protein journal*, 30, 566-574.
- [8] Ghanbarlou, R. M., Shirdel, S. A., Jafarian, V., & Khalifeh, K. (2018). Molecular mechanisms governing the evolutionary conservation of Glycine in the 6th position of loops III and IV in photoprotein mnemiopsin 2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 187, 18-24.
- [9] TOMA, S., NAKAGAWA, A., INOUE, S., & SHIMOMURA, O. (2006). The Crystal Structures of Semi-synthetic Aequorins. *Nihon Kessho Gakkaishi*, 48(5), 348-353.
- [10] Jafarian, V., Sajedi, R. H., Hosseinkhani, S., Sariri, R., Taghdir, M., Khalifeh, K., ... & Aghamaali, M. R. (2018). Structural and functional consequences of EF-hand I recovery in mnemiopsin 2. *International journal of biological macromolecules*, 118, 2006-2013.
- [11] Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.
- [12] Gouet, P., Robert, X., & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic acids research*, 31(13), 3320-3323.
- [13] Gasteiger, E. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook/Human Press Inc.*
- [14] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- [15] de Brevern, A. G., Bornot, A., Craveur, P., Etchebest, C., & Gelly, J. C. (2012). PredyFlexy: flexibility and local structure prediction from sequence. *Nucleic acids research*, 40(W1), W317-W322.
- [16] Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences

# Molecular modeling of the photoprotein Mnemiopsin chimeric (PMC): with a structural and functional recovery approach of the EF-hand II loop

Hanieh Ramezani<sup>1</sup>, Zahra Karimi Takarami<sup>1</sup>, Amir reza Mohammadi<sup>1</sup>, Fatemeh Khatami<sup>2</sup>, Vahab Jafarian<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Student of biochemistry, Department of biology, Faculty of science, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran.
2. Ph.D. Student of biochemistry, Department of biology, Faculty of science, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran.
3. Professor of biochemistry, Department of biology, Faculty of science, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran.

v.jafarian@guilan.ac.ir

Receipt: 2024/11/30

Accepted: 2025/12/03

## Abstract

Mnemiopsin 2 is a  $\text{Ca}^{2+}$  regulated photo protein with 207 residues and a molecular weight of 24722 Daltons. In the structure of this photoprotein, the EF-hand I-III-IV motifs have retained their function in binding to  $\text{Ca}^{2+}$ , while the EF-hand II has lost its activity during evolution. Each EF-hand has a helix-loop-helix (HLH) structure. Loops with length of 12 residues are responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  binding. In this study, in order to recover the structural and functional of the EF-hand loop II, a Photoprotein Mnemiopsin Chimeric (PMC) was designed using direct evolution and rational design. The mutant structure were modeled by Modeller v2.10 software. Then the best model was evaluated using the Chimera x.8.1 software and Modeval and SAVES and ModEval server for RMSD, RRDistance, Z-Dope, Errat and Verify 3D parameters were investigated. Also, the secondary structure, free energy of folding and accessible surface of the models were investigated by the VADAR server. The hydrophobicity and instability index were evaluated by ProtScale and ProtParam servers. The Prosite results indicate the formation of EF-hand II loop in PMC. It is worth mentioning that Changes in the surface hydrophobicity of the recovered EF-hand II motif may affect the interaction with  $\text{Ca}^{2+}$ . That means, due to the increase the  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites, sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  and activity were predicted to change.

**Keyword:** Bioinformatics, Bioluminescence, Mutation, Photoprotein, Structural recovery