



مقاله علمی - پژوهشی

طراحی ساختار پروتئینی آنزیم رانپیرناز به عنوان ایمونوتوکسین براساس ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با استفاده از مطالعات دینامیک و استاتیک مولکولی

حمید آریان نژاد^۱ - محمدرضا نصیری^{۲*} - علی جوادمش^۳ - شاهرخ قوتی^۴ - حسام دهقانی^۵ - احمد آسوده^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۴

چکیده

ریبونوکلئازها خانواده تخریب کننده RNA هستند که در حال حاضر به شکل وسیعی به خدمت سلامت انسان آمده اند. ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی به عنوان قویترین و رانپیرناز به عنوان نفوذپذیر ترین ریبونوکلئاز به سلول پستانداران شناخته می شوند. پروتئین ویژه ممانعت کننده فعالیت ریبونوکلئازی^۷ (RI) و عدم توانایی نفوذ آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، مانع بزرگ استفاده از این ریبونوکلئاز، به منظور ساخت ایمونوتوکسین هاست. از اینرو در این مطالعه، با بررسی ویژگیهای پروتئینی ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، مسیر ویژه‌ای به منظور مهندسی آنزیم رانپیرناز با ویژگیهای همچون فرار از RI، افزایش نفوذپذیری و افزایش سمیت سلولی و پایداری آنزیم با توجه به ساختار ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی طراحی گردید. بدین منظور، ساختار سوم مربوط به پروتئین‌های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، رانپیرناز و ممانعت کننده فعالیت ریبونوکلئازی از سرور PDB استخراج و سپس با استفاده از سرور آنلاین ClusPro داکینگ صورت گرفت. پیوندهای N-O کمتر از ۳/۵ انگستروم بین آنزیم ها و RI با استفاده از نرم افزار PyMOL استخراج و در نهایت آمینواسیدهای کاندید شناسایی شدند. پس از طراحی آنزیم جهش یافته، بررسی اتصال آنزیم با RI توسط دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد رانپیرناز با ۴ جهش لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین و سرین ۷۲ به آلانین دارای سمیت سلولی بالاتر نسبت به آنزیم طبیعی بوده و همچنین با توجه به عدم اتصال در محیط دینامیک مولکولی قابلیت فرار از RI را دارد. این پروتئین براساس آنالیزهای RMSD، RMSF و شعاع ژراسیون به شکل کاملا پایدار بوده و می تواند در تحقیقات تولید ایمونوتوکسین ها بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: رانپیرناز، ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، محاسبات دینامیک مولکولی، مهار کننده ریبونوکلئازی

مقدمه

پانکراتیک گاوی به عنوان یکی از پروتئین‌های پایه در بیشتر تحقیقات حوزه بیوتکنولوژی به کار گرفته شده است (۶). ریبونوکلئازها (RNase) یکی از مهمترین توکسین های بیولوژیک هستند که وظیفه تخریب RNA در سطح رونویسی به عهده دارند (۱۶ و ۲۷). مولکول های RNA واسطه اصلی برای تبدیل کدون ها به آمینواسید و تنظیم کننده اصلی سلول ها هستند. امروزه، ما می دانیم که RNase ها در سلول های یوکاریوت / پروکاریوت و مایعات بیولوژیک حضور دارند و نقش بسیار مهمی در عملکردهای حیاتی بدن ایفا می کنند (۱۲). اثر سمیت سلولی RNase ها در سیتوزل ۱۰۰۰ برابر نسبت به سطح سلول بیشتر است (۶ و ۲۹). از اینرو، محققان با دو رویکرد اعضای این خانواده را به عنوان توکسین های هوشمند در مهندسی ایمونوتوکسین بکار می گیرند. RNase می تواند اثر سمیت برای سلول های سالم و سرطانی داشته باشند، بنابراین ایمونوتوکسین ها به هدف گیری صحیح سلول سرطانی کمک می کند (۱). هنگامیکه آنتی بادی به گیرنده ویژه متصل می شود، نفوذ سلولی RNase ها از

امروزه اهمیت تولیدات دامی تنها محدود به فرآورده های خوراکی برای انسان نمی شود (۶). در حدود ۶۰ سال پیش باب رابین و تونی ماتیس در کالج لندن مکانیسم آنزیمی ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی را به جهان گزارش کرده اند (۱۱). از آن سال به بعد ریبونوکلئاز

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - ۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - ۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - ۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
 - ۵- استاد، گروه علوم دامی پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - ۶- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- *- ایمیل نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.81620

7- RNase Inhibitor

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری اطلاعات

تمامی ساختارهای مورد نیاز برای انجام این مطالعه از سرور Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) استخراج گردیده است. فایل PDB آنزیم رانپیرناز غورباقه (راننا پپینیس) با شماره دسترسی (10.2210/PDB1YV6/PDB) مهارکننده ریبونوکلئازی گاوی با شماره دسترسی (10.2210/PDB2BNH/PDB) و فایل PDB مهارکننده ریبونوکلئازی متصل به آنزیم RNaseA گاوی با شماره دسترسی (10.2210/PDB1DFJ/PDB) انتخاب گردیدند.

بررسی استاتیکی اتصال ریبونوکلئاز با RI

از آنجا که فایل کریستالوگرافی اتصال آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با RI وجود داشته، با استفاده از نرم افزار PyMOL ver 1.8x ver اتصالات اصلی کمتر از ۳/۵ آنگستروم بین آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی و RI استخراج گردید (۱۳). به منظور برآورد اتصال رانپیرناز با RI از نرم‌افزارهای PyMOL و سرور آنلاین Cluspro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) دانشگاه بوستون استفاده شد. با توجه به شباهت ساختاری رانپیرناز با RNase A، در نرم‌افزار PyMOL (۷) آنزیم رانپیرناز جایگزین آنزیم RNaseA حاضر در فایل PDB مهارکننده ریبونوکلئازی متصل به آنزیم RNaseA (10.2210/PDB2BNH/PDB) به روش دستی گردید. همچنین به منظور بررسی جهت یابی آنزیم رانپیرناز با RI، با معرفی لیگاند و رسپتور به نرم‌افزار Cluspro پیش‌بینی داکینگ صورت پذیرفت. مقایسه روش دستی و نتایج بدست آمده از داکینگ با استفاده از نرم افزار PyMOL صورت پذیرفت. بررسی سپس نتایج به دست آمده ذخیره گردید تا در مطالعات MDS^۱ مورد بررسی قرار گیرند.

ایجاد جهش در آنزیم‌های ریبونوکلئازی

با بررسی پژوهش‌های صورت گرفته در حوزه مهندسی ریبونوکلئازها، ویژگی‌هایی از قبیل: نفوذ سلولی، سمیت سلولی و توانایی فرار از RI به عنوان کاندیدای اصلی برای تغییرات آمینواسیدها مدنظر قرار گرفتند (۲۱، ۲۵ و ۲۶). تورکوت و همکاران (۲۶) و ساندلس و همکاران (۲۵) گزارش کردند که آمینواسیدهای لیزین آنزیم رانپیرناز بهترین کاندید جهت تغییر به آمینواسیدهای آرژنین و آلانین به منظور افزایش بار سطحی آنزیم و سیتوتوکسیته آنزیم می باشند. از این‌رو، در این مطالعه ۳ جایگاه آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹

طریق مسیر اندوزومی افزایش می یابد. در میان اعضای خانواده ریبونوکلئازها، ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی (RNase A) و رانپیرناز مهمترین آنزیم‌های هستند، که دانشمندان بر روی بررسی ویژگی‌های آن تمرکز کرده اند (۸، ۲۵ و ۲۶).

RNase A قویترین عضو خانواده RNase می باشد که از ۱۲۴ آمینواسید تشکیل شده و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۴۶ می باشد (۱۸). مهمترین محدودیت استفاده از این آنزیم به منظور مهندسی ایمونوتوکسین تمایل اتصال به ممانعت کننده ریبونوکلئازی داخل سلول و عدم توانایی نفوذ به داخل سلول می باشد (۸ و ۱۸). با اینحال، مطالعات زیادی وجود دارد که توانسته اند ایمونوتوکسینی موثر با استفاده از RNase A و مسیر کیسه‌های اندوزومی تولید کنند (۲۲ و ۲۴). با اینحال، RNase A پس از ورود به داخل سلول تحت تاثیر RI قرار گرفته و غیرفعال می گردد (۸).

رانپیرناز با نام تجاری آنکوناز به عنوان کوچکترین عضو خانواده RNase‌ها شناخته شده که در حال حاضر در مرحله سوم کینیک آزمايشات FDA به منظور درمان بیماران مزوتلیوم می باشد (۹، ۲۳ و ۲۵). این پروتئین از ۱۰۴ آمینواسید تشکیل شده و با نقطه ایزوالکتریک ۹/۷ دارای مشابهت ۳۰ درصدی آمینواسیدی با آنزیم RNase A است (۳). گزارشات نشان می دهد که اندازه کوچک این آنزیم و همچنین ساختار پروتئینی آن سبب شده که آنزیم قادر به فرار از RI باشد (۲۱). با اینحال در بعضی از گزارشات مشخص شده که RI به رانپیرناز نیز اتصال پیدا کرده است (۱۵). در حال حاضر، بیشتر مطالعات بر روی آنزیم رانپیرناز در حوزه افزایش سمیت سلولی است که نسبت به RNase A تا ۵ برابر کمتر می باشد (۵). پژوهشگران به منظور افزایش سمیت سلولی آنزیم رانپیرناز با تغییر آمینواسیدهای لیزین به آرژنین و آلانین موفق به معرفی آنزیم رانپیرناز جهش یافته با خاصیت سمیت سلولی بیشتر نسبت به حالت طبیعی کردند. با اینحال، گزارشات آنها نشان می دهد که این آنزیم‌ها دارای پایداری مناسب نبودند و خیلی سریع غیرفعال می شدند (۲۵ و ۲۶). امروز، با توجه به پیشرفت‌های ایجاد شده در علوم کامپیوتری و آنالیز دینامیک و استاتیک پروتئین، محققان قادر هستند که مدل‌های پروتئینی را مهندسی و مدلسازی کرده و ویژگی‌های ساختاری آنها را قبل از تولید در آزمایشگاه بدست آورند.

از این‌رو در این مطالعه، مسیری جدید به منظور مهندسی آنزیم‌های ریبونوکلئاز معرفی می گردد. با استفاده از این مسیر ساختارهای آنزیم‌های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی و رانپیرناز مورد بررسی قرار گرفته و سپس با استفاده از روش دینامیک و استاتیک مولکولی ساختاری جهش یافته از آنزیم رانپیرناز با ویژگی‌های توانایی فرار از RI، افزایش سیتوتوکسیته و شارژ سطحی و همچنین پایداری پروتئین معرفی می گردد.

به شباهت ساختاری RNase A و رانپیرناز جهت یابی اتصال مانند هم خواهد بود (شکل ۱). همانطور که در شکل (۱) قابل مشاهده است این دو پروتئین از نظر ساختاری کاملاً با یکدیگر شباهت دارند، با اینحال آنزیم RNase A دارای پروتئینی بازتر نسبت به رانپیرناز می باشد که این به نوبه خود باعث ایجاد اتصالات بیشتر با RI گردید است. آرنولد و همکاران (۳) گزارش کردند که این دو آنزیم دارای ۳۰ درصد مشابهت آمینواسیدی هستند. از آنجا که آنزیم رانپیرناز ۲۰ آمینواسید کمتر از RNase A دارد، این به نوبه خود پوشش دهنده ۱۶ درصد این عدم تشابه است. با اینحال این دو آنزیم سوبسترا ویژه خود را در سلول، برای انجام ماموریت دارند. محققان گزارش کردند که mRNA به عنوان اصلی‌ترین سوبسترا برای آنزیم RNase A شناخته می شود، با این حال ریز RNA و Ribosomal RNA نیز تحت تخریب این آنزیم قرار می گیرند (۴). سوبسترا آنزیم رانپیرناز tRNA می باشد که با نفوذ این آنزیم به سیتوزول سلول و تخریب tRNA باعث القا آپوپتوزیس می گردد (۲). شکل (۱) نشان می دهد که بسیاری از ساختارهای آلفا و صفحات بتا موجود در هر دو آنزیم کاملاً بر یکدیگر منطبق هستند. محققان گزارش کرده‌اند که استفاده از داکینگ پروتئینی برای لیگاند و رسپتورهای که نحوه عملکردشان مشخص نشده، غیرواقعی خواهد بود (۱۹). از اینرو، در این مطالعه از کریستالوگرافی RI و RNase A به عنوان معیار صحت داکینگ استفاده گردید. زیرا با توجه به شباهت ساختاری بالا و نحوه عملکرد و سایت کاتالیکی RI، اتصال به ریبونوکلئاز با یک جهت یابی مشخص خواهد بود. از طرفی، در این مطالعه با ارائه مسیر دینامیک مولکولی امکان تصحیح داکینگ پروتئین فراهم گردید بطوریکه آنزیم و RI در کنار هم قرار داده شد تا جهت یابی در صورت تمایل به اتصال مشخص گردد.

به منظور شناسایی آمینواسیدهای کاندید جهت تغییر، اتصالات بین اکسیژن و نیتروژن زیر ۳/۵ آنگستروم بین RI با هر یک از آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۱) (جدول ۱). گزارشات نشان می دهد که این اتصالات می تواند نقش بسیار موثری در غیرفعالسازی آنزیم داشته باشد (۱۴). بیشترین اتصالات بین آنزیم RNase A و RI و تعداد اتصالات آنزیم رانپیرناز با RI شامل ۵ اتصال می گردد. در شکل (۲) چگونگی اتصال بین آنزیم‌ها و RNase A آورده شده است. همانطور که در این شکل مشخص شده مهمترین اتصال بین آنزیم RNase A و RI در گلوتامین ۱۱ و سرین ۸۹ و مهمترین اتصال بین رانپیرناز با RI شامل گلوتامین ۱ و سرین ۷۲ می باشد. گلوتامین ۱۱ جزء ساختار کاتالیکی آنزیم بوده و جایگزینی آن منجر به غیرفعال شدن آنزیم می گردد. همچنین ساندلس و همکاران (۲۵) گزارش کردند که اسید آمینه پیروگلوتامین ۱ یکی از اجزای ضروری ساختار آنزیم رانپیرناز می باشد که در صورت تغییر آنزیم غیرفعال خواهد بود. از لحاظ ساختاری سرین ۸۹ در آنزیم RNase A و سرین ۷۲ در

و ۵۵ به آرژنین و آمینواسید سرین ۷۲ به منظور دستیابی به توانایی فرار از RI به آلانین تغییر داده شد (۱۳). پژوهش توالی آمینواسیدی بدست آمده به سایت آنلاین Swiss Model ارسال و پس از پردازش به شکل PDB ذخیره گردید. این فایل‌ها به عنوان نسخه‌های جهش-یافته از آنزیم ریبونوکلئاز جمع‌آوری و در آنالیزهای بعدی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز MD

تمامی مراحل شبیه‌سازی MD با استفاده از نرم‌افزار گرمکس (ورژن ۵) در محیط لینوکس ۱۷/۲ و در میدان نیروی CHARMM صورت گرفت (۱۷ و ۲۸). به‌طورمختصر، ساختارهای پروتئینی این مطالعه در جعبه مکعبی حاوی بیش از ۶۷۰۰ مولکول آب قرار داده شد. وضعیت یونی‌زاسیون برای دستیابی به pH طبیعی محیط صورت گرفت و شارژ اضافی سیستم با اضافه کردن تعداد مناسب یون در ۷- آنگسترومی سطح پروتئین تنظیم گردید. به‌حداقل رساندن انرژی سیستم به مدت ۲۰ پیکوثانیه در دمای ۳۰۰ کلوین نیز صورت پذیرفت. همچنین طول همه باندها بوسیله الگوریتم Lincs محدود شدند. معادله حرکت نیوتون با یک گام‌زمانی 2fs هماهنگ گردید و مشخصات اتمی برای تجزیه و تحلیل برای هر ۰/۵ ps ذخیره و پایداری دی‌الکتیک ۱ در نظر گرفته شد. از طرفی، شبیه‌سازی برای بررسی شرایط دینامیکی آنزیم رانپیرناز و پروتئین ممانعت‌کننده ریبونوکلئازی و همچنین آنزیم RNase پانکراتیک با ممانعت‌کننده ریبونوکلئازی در دمای ۳۰۰ کلوین و در ۱۰۰ نانوثانیه صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج خروجی MD

پایداری ساختاری، نفوذ سلولی، سیتوتوکسیته و توانایی فرار از RI ساختارهای شبیه‌سازی انجام شده در این مطالعه با استفاده از چندین پارامتر هندسی در واحد زمان مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین انحراف مربعات ریشه^۱ (RMSD)، میانگین نوسانات مربعات ریشه^۲ (RMSD) و شعاع ژیراسیون^۳ (Rg) از فایل‌های مربوطه استخراج گردید. همچنین ساختارهای پروتئینی و برآورد میزان شارژ سطحی پروتئین در زمان‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار PyMOL و VMD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

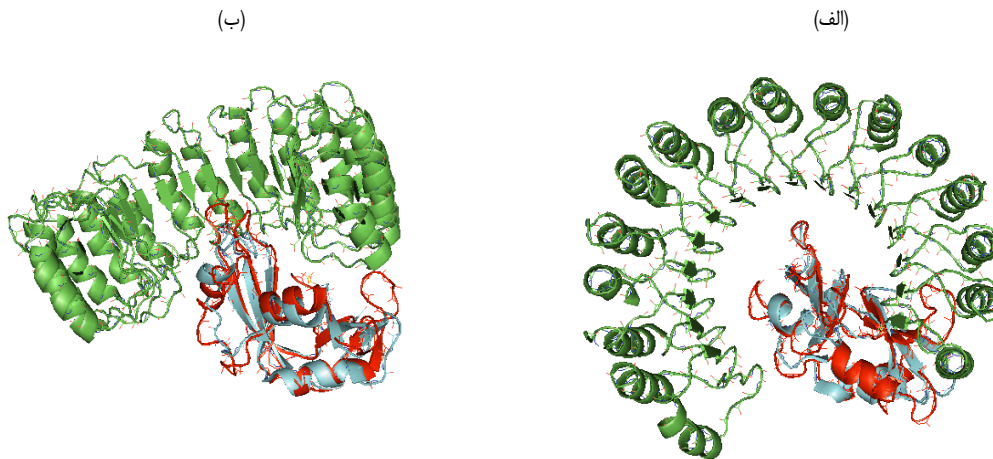
نتایج و بحث

با مقایسه نتایج بدست آمده از داکینگ پروتئینی رانپیرناز و RI و همچنین جهت یابی اتصال رانپیرناز به RI مشخص شد که با توجه

- 1- Root Mean Square Deviations
- 2- root mean Square fluctuation
- 3- gyration radius

تغییر شارژ سطحی پروتئین می‌گردد، کاندید گردید (۱۳). همچنین تغییر آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین می‌تواند نقش بسزایی در افزایش شارژ سطحی پروتئین رانپیرناز داشته باشد (۲۵) و (۲۶).

آنزیم رانپیرناز همولوگ هم بوده و از اینرو تغییر در این آمینواسید می‌تواند به شکل موثری به فرار آنزیم از RI کمک کند. سرین آمینواسید قطبی بوده که به یک آمینواسید غیرقطبی (تریپتوفان) در RI متصل شده است. به منظور ایجاد دافعه استفاده از آمینواسید غیرقطبی آلانین که دارای زنجیره‌های جانبی کوچکتر نسبت به سرین بوده و باعث



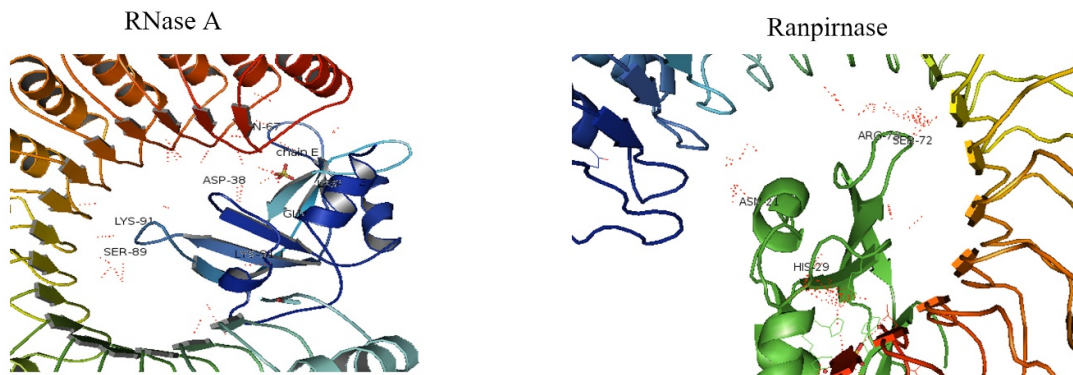
شکل ۱- بررسی جهت یابی اتصال آنزیم های RNase A و رانپیرناز با RI. رنگ سبز نشان دهنده پروتئین RI، رنگ آبی آنزیم رانپیرناز و رنگ قرمز آنزیم RNase A. الف) نمای کناری، ب) نما از بالا.

Figure 1- Investigation the orientation of RNase A and Ranpirinase that binding to RI. The green color showed RI, the blue color showed Ranpirinase and the red color showed RNase A. A) side view, B) top view.

جدول ۱- لیست آمینواسیدهای متصل شونده به RI در داکینگ پروتئین. آمینواسیدهای قرمز رنگ نشان دهنده اتصالات مهم هستند.

Table 1- The list of amino acids bonded to RI in protein docking. The most important residue bonds showed in red color.

نوع آنزیم Enzyme type	آمینواسید در ریبونوکلئاز Ribonuclease amino acids	آمینواسید در RI RI amino acids
RNase A	LYS7	SER456
	GLN11	SER456
	ASP38	ARG453
	ARG39	GLU397
		GLN426
	LYS41	ASP431
	ASN67	TYR433
	Glu 88	LEU405
	SER89	GLN6
		ASP228
رانپیرناز	GLU 1	LEU405
	ASP21	TYR433
	HIS 29	TYR 435
	SER 72	CYS 7
	ARG 73	TYR430 and SER 456
		TRP259
	GLU 202	



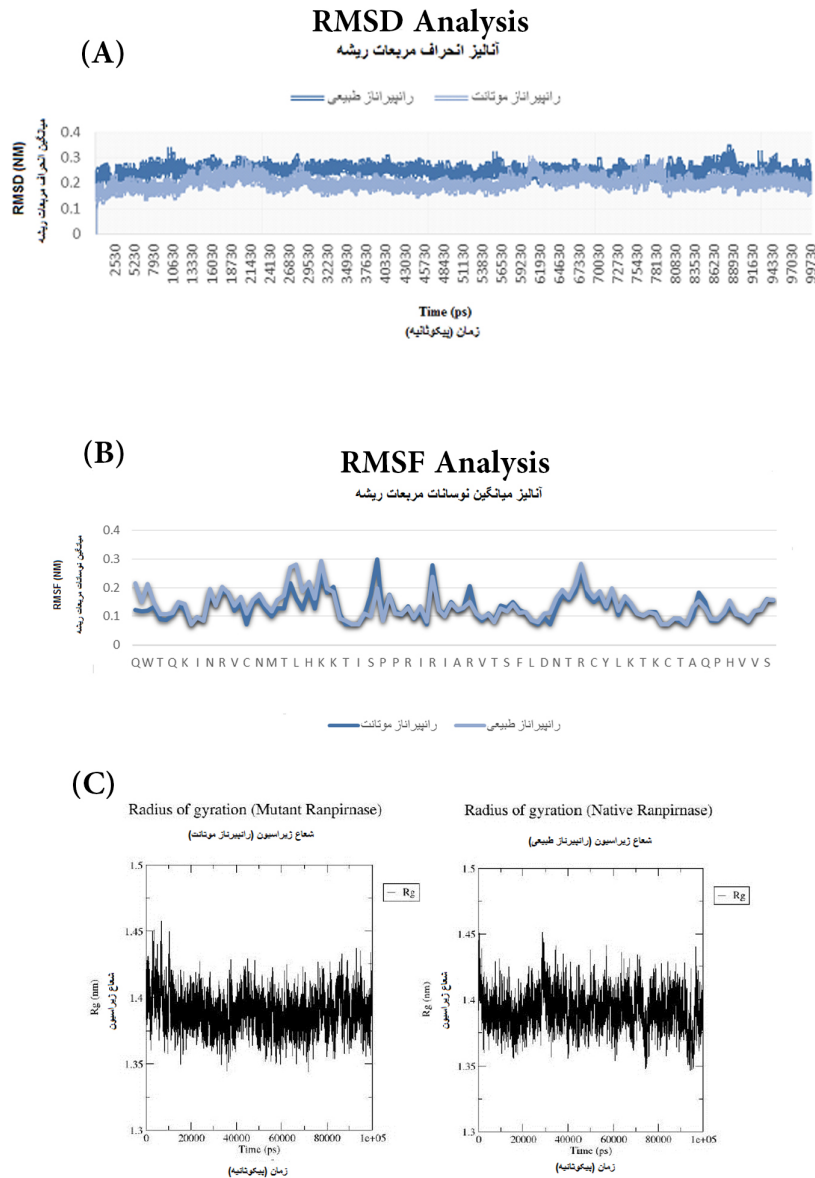
شکل ۲- بررسی اتصالات بین آنزیم های RNase A و رانپیرناز با RI.
Figure 2- Investigation of RNase A and Ranpirnase binding to RI.

آنزیم طبیعی بوده و تغییرات ایجاد شده در این آنزیم ها منجر به عدم پایداری پروتئین نگردیده است (شکل ۴). آنالیز گراف های RMSD، RMSF و Vg تایید می کند که آنزیم های جهش یافته گزارش شده از دیدگاه پایداری هیچ تفاوت معنی داری با آنزیم های طبیعی خود نداشته اند. بررسی نمودار RMSD نشان می دهد که با توجه به اینکه موتاسیون ها باعث پخش شدن شارژ الکتریکی در سطح پروتئین شده، از اینرو، پایداری آنزیم جهش یافته نسبت به طبیعی بیشتر نیز شده است. نمودار RMSF نیز نشان می دهد که سرین ۲۱، آرژنین ۳۷، آرژنین ۴۲ و گلوتامین ۹۲ به شکل میانگین ۰/۵ آنگستروم ناپایداری داشته اند که ناشی از تاثیر تغییرات آمینواسیدی بر روی پروتئین می باشد. شعاع ژیارسیون نشان دهنده پایداری فضای پروتئین های طبیعی و جهش یافته تولید شده می باشد.

در محیط ترمودینامیکی پروتئین های ریبونوکلاز در کنار RI قرار داده شدند و بررسی ویژگی های ترمودینامیکی پس از ۱۰۰ نانوثانیه صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که تغییرات داده شده سبب افزایش بارسطحی پروتئین شده است (شکل ۳). تروکت و همکاران (۲۶) گزارش کردند که افزایش بار سطحی آنزیمی می تواند سبب افزایش نفوذ سلولی ریبونوکلازها شده و با افزایش ورود به سیتوپلاسم سمیت سلولی آنزیم افزایش می یابد. تغییر آمینواسید سرین در آنزیم رانپیرناز منجر به فرار کامل این آنزیم RI گردید، اما تغییر این آمینواسید در RNase A اگرچه که فاصله ها را از RI بیشتر کرده اما منجر به فرار کامل نگردید. نتایج نشان می دهد که گلوتامین ۱۱ پیوند بسیار قوی با RI برقرار می کند که خود مانعی بزرگ برای فرار این مولکول از RI می باشد. بررسی پایداری مولکولی آنزیم های مهندسی نشان می دهد که میزان پایداری این مولکول ها منطبق بر



شکل ۳- مقایسه افزایش بار سطحی رانپیرناز در حالت های طبیعی و جهش یافته؛ رنگ آبی نشان دهنده شارژ الکتریکی مثبت است.
Figure 3- The comparison of increasing the surface charge of native and mutant Ranpirnase. The blue color showed amino acid positive charge.



شکل ۴- آزمون‌های پایداری RMSD، RMSF و V_g برای آنزیم‌های رانپیرناز در حالت‌های طبیعی و جهش یافته
Figure 4- The RMSD, RMSF and V_g stability tests for native and mutant Ranpirinase.

قابلیت فرار از RI، نفوذ سلولی و به دنبال آن سمیت سلولی بیشتر نسبت به حالت طبیعی و پایدار مهندسی گردید. تولید آنزیم رانپیرناز جهش یافته (تغییر آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین و سرین ۷۲ به آلانین) بررسی شده در این مطالعه، می‌تواند منجر به تولید آنزیمی جدید با ویژگی‌های منحصر به فرد جهت استفاده در مهندسی ایمونوتوکسین‌ها شود. همچنین مسیر ارائه شده در این مطالعه، به عنوان مسیری دقیق و کاربردی جهت مهندسی آنزیم‌های ریبونوکلئازی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه گیری کلی

اگرچه که ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی یکی از قویترین آنزیم‌های خانواده ریبونوکلئازها شناخته می‌شود، اما با توجه به ساختار پروتئینی بررسی شده در این مطالعه، امکان فرار از سد ممانعت کننده ریبونوکلئازی در داخل سلول نخواهد داشت. از اینرو، با توجه به ساختار پروتئینی ویژه رانپیرناز، با الگوبرداری از ویژگی‌های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی آنزیم رانپیرناز جهش یافته، با ویژگی:

این پژوهش توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
با شماره گرنت ۳/۳۹۱۱۷ حمایت مالی شده است.

سیاسگزاری

منابع

- Allahyari H., S. Heidari, M. Ghamgosha, P. Saffarian and J Amani. 2017. Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. *Tumour Biology*, 39(2):1-11.
- Ardelt W., K. Shogen and Z. Darzynkiewicz. 2008. Ranpirnase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):215-225.
- Arnold U. and R. Ulbrich-Hofmann. 2006. Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. *Biotechnology Letters*, 28:1615-1622.
- Aryani A. and B Denecke. 2015. In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability. *BMC Research Notes*, 8:164-172.
- Boix E., Y. Wu, V. M. Vasandani, S. K. Saxena, W. Ardel, J. Ladner and R. J. Youle. 1996. Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology*, 257(5):992-1007.
- Cuchillo C. M., M. V. Nogués and R. T. Raines. 2011. Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochemistry*, 50(37):7835-41.
- DeLano W. L. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 40: 82-92.
- Erickson H. A., M. D. Jund and C. A. Pennell. 2006. Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition. *Protein Engineering, Design and Selection*. 19(1):37-45.
- Fagagnini A., A. Pica, S. Fasoli, R. Montioli, M. Donadelli, M. Cordani, E. Butturini, L. Acquasaliente, D. Picone and G. Gotte. 2017. Ranpirnase dimerization through 3D domain swapping: structural investigations and increase in the apoptotic effect in cancer cells. *Biochemical Journal*, 474(22):3767-3781.
- Fett J.W., D. J. Strydom, R. R. Lobb, E. M. Alderman, J. L. Bethune, J. F. Riordan and B. L. Vallee. 1985. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 24:5480-5486.
- Findlay D., D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin and C. A. Ross. 1961. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature*, 190:781-784.
- Goo S. M. and S. Cho. 2013. The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty. *Genome Biology and Evolution*, 5: 21-28.
- Johnson R. J., J. G. McCoy, C. A. Bingman, G. N. Phillips and R. T. Raines. 2007. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *Journal of Molecular Biology*, 368(2), 434-449.
- Khazanov N. A. and H. A. Carlson. 2013. Exploring the composition of protein-ligand binding sites on a large scale. *PLOS Computational Biology*, 9(11): e1003321.
- Leland P. A. and R. T. Raines. 2001. Cancer chemotherapy ribonucleases to the rescue. *Chemistry & Biology*, 8(5):405-13.
- Lu L., J. Li, M. Moussaoui and E. Boix. 2018. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*, 16;9:1012.
- Merlino A., L. Mazzarella, A. Carannante, A. Di Fiore, A. Di Donato, E. Notomista and F. Sica. 2005. The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of ranpirnase mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18):17953-60.
- Narayanan C., D. N. Bernard, K. Bafna, D. Gagné, P. K. Agarwal and N. Doucet. 2018. Ligand-Induced Variations in Structural and Dynamical Properties Within an Enzyme Superfamily. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 12: 54-60.
- Ponomarenko J.V. and P.E. Bourne. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Structural Biology*. 7: 64-85.
- Richards F. M. and H. W. Wyckoff. 1971. Bovine pancreatic ribonuclease. *The Enzymes IV*, 647-806.
- Rutkoski T. J. and R. T. Raines. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):185-189.
- Schmohl J. U., D. Todhunter, E. Taras, V. Bachanova and D. A. Vallera. 2018. Development of a Deimmunized Bispecific Immunotoxin dDT2219 against B-Cell Malignancies. *Toxins (Basel)*, 6;10(1):32-39.
- Smolewski P., M. Witkowska, M. Zwolinska, B. Cebula-Obrzut, A. Majchrzak, A. Jeske, Z. Darzynkiewicz, W. Ardel, B. Ardel and T. Robak. 2014. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases ranpirnase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders. *International Journal of Oncology*, 45(1):419-

- 25.
24. Sun M., L. Sun, D. Sun, C. Zhang and Li M. 2018. Targeted delivery of immuno-RNase may improve cancer therapy. *Cancer Cell International*, 16:18:58-65.
25. Sundlass N. K. and R. T. Raines. 2011. Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of ranpirnase. *Biochemistry*, 50(47), 10293-9.
26. Turcotte R. F., L. D. Lavis and R. T. Raines. 2009. Ranpirnase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *The FEBS Journal*, 276(14), 3846-57.
27. Vakili Azghandi M., M. Nassiri and A. Javadmanesh. 2017. Engineering of bovine pancreatic ribonuclease to induce apoptosis in cancer cell. *Proceedings of the 3rd International Nastaran Cancer Symposium, Mashhad University of Medical Sciences, Iran*. Page 110.
28. Van Der Spoel D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. Berendsen. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701-18.
29. Wu Y., S. M. Mikulski, W. Ardel, S. M. Rybak and R. J. Youle. 1993. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of ranpirnase cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 268:10686–10693.



Designing of Protein Structural of Ranpirnase Based on Bovine Pancreatic Ribonuclease with Using Molecular Dynamic and Static Simulation

H. Ariannejad¹- M. R. Nassiri^{*2}- A. Javadmanesh³- Sh. Ghovvati⁴- H. Dehghani⁵- A. Asoodeh⁶

Submitted: 10-07-2019

Accepted: 15-09-2019

Introduction Animal production is not only restricted to food products but some therapeutics such as bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) (15). The RNase A is known as a powerful enzyme in ribonuclease family that is used in biotechnology industry (1). It has a potential to be used as an immunotoxin although there are two main reasons that RNase A is not suitable for immunotoxin engineering. The lack of ability to evade ribonuclease inhibitor (RI) and very weak cell penetration, which are essential properties for an immunotoxin (1). One of the small member of ribonuclease family is ranpirnase, originated from the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) that has suitable characteristics for immunotoxin engineering (24, 29). It was showed that Ranpirnase cytotoxicity was five times less than RNase A (26). Therefore, detection of enzyme properties of RNase A and Ranpirnase could be useful for engineering efficient immunotoxins from Ranpirnase. The aim of this study was in silico engineering of Ranpirnase enzyme based on properties of RNase A to design an efficient immunotoxin with the high cell penetration, low cytotoxicity, ability to evade RI and structural stability.

Materials and Methods All protein structures required for performing this study were extracted from Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>). The PDB files related to ribonuclease inhibitor (RI) with accession number of (10.2210/pdb2BNH/pdb), the PDB file related to ribonuclease inhibitor bonded to RNase A enzyme with accession number of (10.2210/pdb1DFJ/pdb), the PDB file related to Ranpirnase enzyme (pdb1YV6/pdb/10.2210) and the PDB file of RNase A enzyme with accession number of (10.2210/pdb2K11/pdb) were selected. PyMOL Software and ClusPro online server were used for docking mentioned enzymes with ribonuclease inhibitor. In PyMOL Software (ver 1.8x), RNase enzyme of PDB file related to ribonuclease inhibitor connected to RNase A enzyme (10.2210/pdb2BNH/pdb) was manually replaced by ranpirnase enzyme. Also, docking prediction related to each enzyme with enzymatic inhibitor was performed by introducing ligand and receptor to ClusPro Software. Then, obtained results were used in molecular dynamic (MD) studies. All stages of MD simulation were performed using GROMACS Software (version 5) in Linux 17.2 environment and CHARMM force filed (27). In summary, protein structures of this study were placed in a cube box filling with more than 6700 water molecules. Ionization was performed to achieve the natural pH of the environment. Extra charge of the system was adjusted by adding appropriate number of ions to the distance of 7 angstrom of protein surface. Minimizing system energy was performed at 300 K for 20 ps. The length of all bonds was limited by Links. Newton's equation of motion matched with a 2fs time interval and atomic characteristics for every 0.5 ps were stored to be analyzed. Dielectric stability is considered to be 1. Simulated temperature is 300 K. A 4-ps simulation at 300 K was performed to investigate dynamic condition of ranpirnase and ribonuclease inhibitor, pancreatic RNase with ribonuclease inhibitor. The structural stability of the simulation was assessed using several geometric parameters per unit time such as: Root mean square deviations

1-PhD Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4 -Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, University of Guilan, Iran.

5- Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

6- Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(*- Corresponding Author Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.81620

(RMSD), root mean square fluctuations (RMSF), and gyration radius. Also, protein structures at different time points were analyzed using PyMOL and VMD computer programs.

Results and Discussion Since the topological structures of ranpirnase enzyme and RNase A are similar, it was expected that binding of RI with ranpirnase enzyme is similar to RNase A enzyme. The docking results showed that RNase A enzyme was bonded to RI through 19 amino acids. This binding with RI is through 5 amino acids for ranpirnase enzyme. The glutamine 11 and serine 89 were most important residue that bonded to RI in RNase A. We found that pyroglutamine 1 and serine 72 are the homolog residue in ranpirnase. The ranpirnase ability to evade RI was obtained with mutation S72A and cytotoxicity and cell penetrate were achieved by K45R, K49R, L55R mutations. The molecular dynamic simulation confirmed the stability of mutant ranpirnase by RMSD, RMSF and Vg analysis. Also, protein charge of surface in mutant ranpirnase was increased in compare to the native ranpirnase.

Conclusion It was reported previously that ranpirnase enzyme is able to evade RI but our modeling results demonstrated that RI could bind with ranpirnase. The ranpirnase with 4 mutations (K45R, K49R, L55R and S72A) seemed to be more efficient as a suitable toxin and had favorable properties such as evading from RI, cell penetrate, cytotoxicity and protein stability in comparison of native enzyme. Also, we optimized a new approach for designing and engineering of immunotoxins.

Keywords: Bovine pancreatic ribonuclease, Molecular Dynamic Simulation, Ranpirnase, Ribonuclease Inhibitor.