

بررسی نحوه تأثیر جهشها بر غیر فعال شدن آنزیم پیرازین آمیداز با شبیه سازی دینامیک مولکولی

مهرنوش صفرزاده^۱، محمد پاژنگ^{۱*}، فرامرز مهرنژاد^۲، فرحنوش دوستدار^۳، نادر چاپارزاده^۱، داود ربیعی فرادنبه^۱، احمد یاری خسروشاهی^۴ و علیرضا محمدپور^۱

^۱ تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی

^۳ تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

^۴ تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۲

چکیده

پیرازین آمید یکی از مهم‌ترین داروها برای کنترل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل بیماری سل) است. ژن *pmcA* آنزیم پیرازین آمیداز مایکو بکتریوم توبرکلوزیس را رمزدهی می‌نماید. این آنزیم مسئول تبدیل داروی پیرازین آمید به شکل فعالش یعنی پیرازینوئیک اسید است. علی‌رغم نقش این دارو در کوتاه‌سازی دوره درمان از نه ماه به شش ماه، ظهور سویه‌های مقاوم به پیرازین آمید مشکل مهم سلامت جهانی است. در این مطالعه ژن پیرازین آمیداز نوع وحشی از سویه مرجع H37Rv و دو ژن از سویه‌های مقاوم به پیرازین آمید همسانه‌سازی، بیان، تعیین توالی شده و تعیین فعالیت شدند. با استفاده از همولوژی مدل‌سازی و جایگزینی آمینواسیدی، ساختار پیرازین آمیدازها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو آنزیم پیرازین آمیداز جهش یافته (T160 و D63G/W119C) فعالیت پیرازین آمیدازی خود را به طور کامل از دست داده‌اند. نتایج محاسباتی نیز تأیید کرد که فقدان فعالیت این آنزیمها عمدتاً به دلیل تأثیر موضعی جهشهای ایجاد شده در ساختار دوم (در اکثر موارد ساختارهای آلفا هلیکس) اطراف محل جهشها است که موجب تغییر ساختاری شده است. این تغییر احتمالاً موجب تغییر ساختار سه بعدی جایگاه فعال در مورد جهش یافته D63G/W119C و کاهش ابعاد دهانه اتصال به سوبسترا در جایگاه فعال در جهش یافته T160P شده است.

واژه‌های کلیدی: توبرکلوزیس، پیرازین آمیداز، مقاومت به پیرازین آمید، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۴۱۲۴۳۲۷۵۰۰، پست الکترونیکی: mpazhang@yahoo.com

مقدمه

می‌برد (۸ و ۱۵). با گنجاندن پیرازین آمید در رژیم درمانی حاوی ایزونیاژید و ریفامپین دوره درمان از ۹ ماه به ۶ ماه کاهش می‌یابد (۲۰). ظهور سویه‌های مقاوم به پیرازین آمید برای سلامت عمومی یک مشکل مهم محسوب می‌گردد. سویه‌های حساس با تولید آنزیم پیرازین آمیداز، پیرازین آمید را به آمونیوم و پیرازینوئیک اسید تبدیل می‌

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل بوده و دستگاه تنفسی انسان را آلوده می‌کند. بیماری سل یک مشکل جدی برای بهداشت جهانی است و سالانه مسئول مرگ و میر هزاران نفر در سراسر دنیا می‌باشد. داروی مرتبه اول برای درمان بیماری سل پیرازین آمید است. این دارو مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را در مرحله نهفته از بین

مایکوباکتریوم تویرکلوزیس با کریستالوگرافی اشعه X تعیین شده است (۱۶). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، باقیمانده‌های ضروری مرتبط با فعالیت پیرازین آمیدازی شامل باقیمانده‌های موجود در جایگاه فعال (D8, A96, C138) و باقیمانده‌های جایگاه اتصال به فلز D49 (H51, H57, H71) می‌باشند. جهش در این باقیمانده‌ها و باقیمانده‌های نزدیک به این جایگاهها به شدت فعالیت پیرازین آمیدازی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در این مطالعه، دو جهش یافته D63G/ W119C و T160P همسانه سازی شده، بیان گردیده و فعالیت آنزیمی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین با توجه به اینکه روش شبیه سازی دینامیک مولکولی روشی قدرتمند در بررسی جزئیات ساختاری در پروتئینهاست (۲) بنابراین با استفاده از آن سعی شده است تا ارتباط بین ساختار و عملکرد آنزیمهای جهش یافته مورد بررسی قرار گیرد.

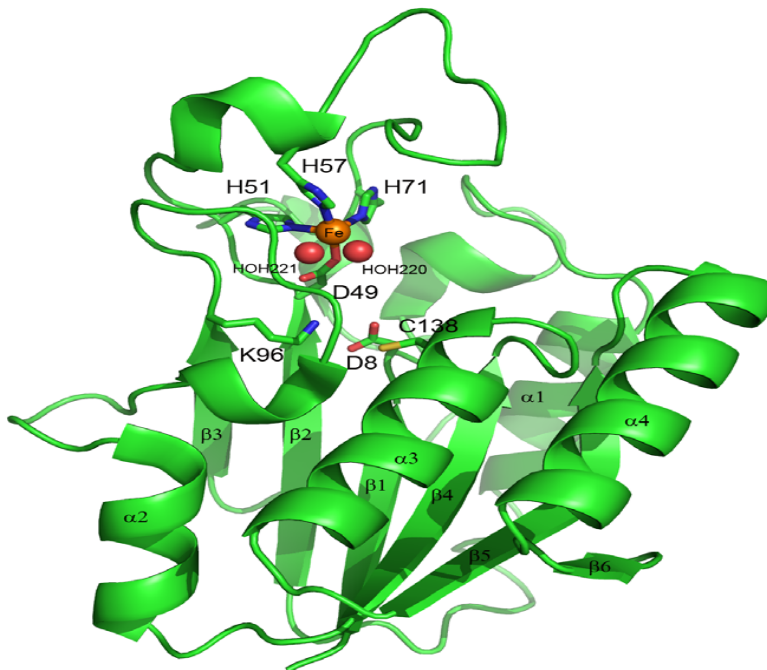
مواد و روشها

مواد: آنزیمهای محدودالثر، DNA پلیمرز و آنزیم T4 لیگاز از شرکت Fermentas تهیه شد. پیرازین آمید و سایر مواد از شرکت مرک خریداری گردید.

تهیه ژن مربوط به جهش یافته ها: جهت تهیه ژن برای همسانه سازی با توجه به در دسترس نبودن ژنوم باکتریهای وحشی و جهش یافته، ژن نوع وحشی و جهش یافته های مقاوم به پیرازین آمید از منبع شماره ۷ انتخاب) و جهت سنتز ژن به شرکت شاین ژن کشور چین فرستاده شد. ژنهای سنتز شده بصورت همسانه شده داخل ناقل pUC57، به عنوان الگو برای مرحله همسانه سازی استفاده شدند. قابل ذکر است که در این تحقیق جهشی طراحی نشده است و ژن های جهش یافته صرفاً از سویه های مقاوم بررسی شده توسط دوستدار و همکاران (۷)، انتخاب شده اند.

کنند (۱۰، ۱۷ و ۲۴). پیرازینوئیک اسید یک ترکیب فعال بوده و مقداری از آن از سلول به بیرون ترشح می‌شود. در صورتی که pH محیط اسیدی باشد، پیرازینوئیک اسید پس از گرفتن پروتون به عنوان پیرازینوئیک اسید پروتونه شده سریع تر از خود پیرازینوئیک اسید به داخل سلول انتشار می‌یابد (۱۷، ۲۵). تجمع پیرازینوئیک اسید و پیرازینوئیک اسید پروتونه، pH داخل سلولی را کاهش داده و با اسیدی کردن داخل سلول باعث مهار بسیاری از فرایندها می‌شود. همچنین پیرازین آمید می‌تواند نیروی محرک پروتونی و فعالیت ATP سنتز را کاهش داده (۲۶) و اسید چرب سنتز I (۲۷) را مهار نماید.

هرگونه تغییر در چرخه پیرازینوئیک اسید با جلوگیری از تجمع داخل سلولی آن و اسیدی شدن سیتوپلاسم می‌تواند مقاومت مایکوباکتریوم را تغییر دهد. فقدان فعالیت پیرازین آمیدازی به عنوان مکانیسم عمده مقاومت پیرازین آمیدی در مایکوباکتریوم تویرکلوزیس شناخته شده است (۷). چندین مطالعه ارتباط بین مقاومت پیرازین آمیدی و جهش در ژن رمز کننده پیرازین آمیداز (*pnca*) را تأیید کرده است (۶، ۹، ۱۲، ۱۸، ۱۹ و ۲۵). آزمایش واین میزان پیرازینوئیک اسید آزاد شده توسط باسیل به محیط کشت را تعیین می‌کند. بنابراین فعالیت واین منفی (نبود فعالیت پیرازین آمیدازی) مقاومت پیرازین آمیدی را نشان می‌دهد (۱۳، ۲۱ و ۲۳). ناتوانی باکتری برای آزادسازی پیرازینوئیک اسید ممکن است به علت بیان پایین یا عدم فعالیت پیرازین آمیداز ناشی از جهش در ژن *pnca* باشد (۵، ۱۴، ۲۲ و ۲۵). جهشها می‌توانند با تأثیر بر روی ساختار و یا عملکرد آنزیم باعث کاهش یا از بین رفتن فعالیت آنزیم شوند (۱). بنابراین درک چگونگی تأثیر جهشها بر فعالیت آنزیمی و همچنین تجزیه و تحلیل ساختار پیرازین آمیدازهای جهش یافته ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعات اخیر ساختار پیرازین آمیداز سویه از H37Rv



شکل ۱- ساختار ۳ بعدی آنزیم پیرازین آمیداز. در این شکل آمینواسیدهای درگیر در جایگاه فعال و جایگاه اتصال به فلز نشان داده شده است.

الکتروپوراسیون انجام شد (قابل ذکر است که معمولاً برای کلون سازی از سویه های XL1 Blue، DH5 α و TOP10 باکتری /شرشیا کلی استفاده می شود که در این تحقیق از سویه TOP10 استفاده گردید). در ادامه کلنیهای حاوی ناقلهای نوترکیب توسط کلونی PCR و انتقال بر روی الکتروفورز ژل آگارزمشخص شدند. ناقلهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer استخراج شده و برای تعیین توالی به شرکت Bioneer فرستاده شدند. مطالعات تطبیق توالی با استفاده از BLASTP و BLASTN از طریق سرور NCBI انجام شد.

بیان پیرازین آمیداز طبیعی و جهش یافته های آن: جهت بیان پیرازین آمیداز، ناقلهای حاوی ژن طبیعی و جهش یافته های آن به /شرشیا کلی سویه بیانی BL21(DE3) منتقل و سپس با استفاده از محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، بیان پروتئین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد توسط غلظت نهایی یک میلی مولار از IPTG به مدت ۱۴ ساعت القاء شد. ۵۰۰ میلی لیتر از هرکدام از سوسپانسیون

همسانه سازی ژن پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته ها: جهت تکثیر ژن پیرازین آمیداز (وحشی و جهش یافته) از پرایمر های رفتی (5' -
(GGAATTCATATGCGGGCGTTGATCATCGTC-3' و

برگشتی (CGGAAGCTTTCAGGAAGTCAAACCAACTCG-3') استفاده شد که به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیمهای محدودالانتر *HindIII* و *NdeI* هستند (نوکلئوتیدهایی که زیر آنها خط کشیده شده است، جایگاه برش آنزیمهای محدودالانتر را نشان می دهد). با استفاده از پرایمرهای فوق و وکتور های حاوی ژن، ژن آنزیم از طریق PCR تکثیر یافت. بعد از تکثیر ژن، با استفاده از آنزیمهای محدودالانتر، محصول واکنش PCR و ناقل pET21a(+) (ناقل بیانی) مورد هضم قرار گرفتند. بعد از هضم آنزیمی واکنش الحاق ژن به وکتور انجام گرفت. انتقال ناقلهای نوترکیب حاوی *pnca* طبیعی و جهش یافته های آن به باکتری /شرشیا کلی سویه TOP10 به روش

استفاده از نرم افزار GROMACS نسخه 4.5.4 و سیستم عامل لینوکس توزیع Ubuntu نسخه 11.10 انجام شد. شبیه‌سازیها با در نظر گرفتن مولکولهای حلال به صورت حلال ساده در جعبه آبی هشت وجهی مملو از مولکولهای آب دارای بار نقطه ای ساده انجام گرفت. در تمام محاسبات حالت پروتونه آمینواسیدهای قابل یونیزه با pKa آن آمینواسید به تنهایی در pHV در نظر گرفته شد. در محاسبات جهت خنثی کردن بار سطحی مولکول و نزدیک شدن به شرایط طبیعی به تعداد آمینواسیدهای باردار یونهای مثبت و منفی به محیط افزوده شد. همچنین در شبیه‌سازیهای دینامیک مولکولی از مدل میدان نیرو GROMOS 53a6 و مولکول در محیط آبی با مدل SPC به عنوان حلال استفاده شد. ضخامت این حلال حداقل ۹ آنگستروم در نظر گرفته شد. در تمامی محاسبات حد آستانه فاصله ۱۰ آنگسترم جهت محاسبه برهمکنشها لحاظ گردید. انجام شبیه‌سازی در غیاب مرحله کمینه‌سازی انرژی منجر به ایجاد انرژی بالا و به هم ریختن ساختار می‌شود که این پدیده به علت اضافه شدن هیدروژن و شکستگی شبکه پیوند های هیدروژنی در آب است. برای حذف این نیروها تا یک مرحله کمینه‌سازی قبل از شبیه‌سازی انجام شد. برای جلوگیری از انحراف موقعیت پروتین در طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، ابتدا در طی مرحله محدودکننده مکانی ۵۰۰ پیکوثانیه ای تحت عنوان همگرد های NVT و NPT انجام شد که در مرحله NPT فشار و دما و در مرحله NVT حجم و دما ثابت شدند. در این روش نوسانات پیوندی در مراحل ۲ فمتو ثانیه ای محدود می‌شود.

جهت آنالیز بیشتر داده‌ها از نرم افزارهایی مانند GROMACS نسخه 4.5.4 و جهت رسم و مقایسه مدلها از Pymol نسخه 0.99 rc6 و VMD نسخه 1.9.1 استفاده شد.

نتایج

باکتریهای القاء شده حاوی پیرازین آمیداز طبیعی و جهش یافته‌های آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و رسوب باکتری به دست آمده با افزودن بافر لیزکننده (Tris-HCL ۲۰ میلی مولار، pHV و PMSF ۱ میلی مولار) به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن سوسپانسیون باکتری در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری وارد و میکروتیوب‌ها به روی یخ منتقل و سپس با دستگاه سونیکاتور شرکت Biocompare تحت سونیکاسیون (۵ دور سونیکاسیون هر دور، ۲۰ ثانیه ضربه و ۴۰ ثانیه استراحت) قرار گرفت. سلولهای لیز شده در ۲۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی، جهت آنالیز بیشتر تعیین فعالیت شده و بر روی ژل SDS-PAGE، الکتروفورز گردید (۱۱).

سنجش فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم براساس روش واین (Wayne method) تغییر یافته تعیین گردید. در این روش ۵۰ μl از محلول حاوی سوبسترا (پیرازین آمید ۴۰ میلی مولار، Tris ۱۰۰ میلی مولار pHV ۲- مرکاپتواتانول ۲ میلی مولار) به ۵۰ μl از هر کدام از محلولهای پروتئینی اضافه شد. بعد از آنکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ μl از $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2$ (۲۰ درصد وزنی به حجمی) و ۸۹۰ μl از Gly.HCl (pH = ۳/۴) و غلظت ۱۰۰ میلی مولار) به آن اضافه گردید. با حذف ناخالصیها با سانتریفیوژ، جذب محلول رویی در طول موج ۴۸۰ نانومتر تعیین شد. لازم به ذکر است تعیین فعالیت انجام شده براساس پیرازینوئیک اسید تولیدی است (۳ و ۴).

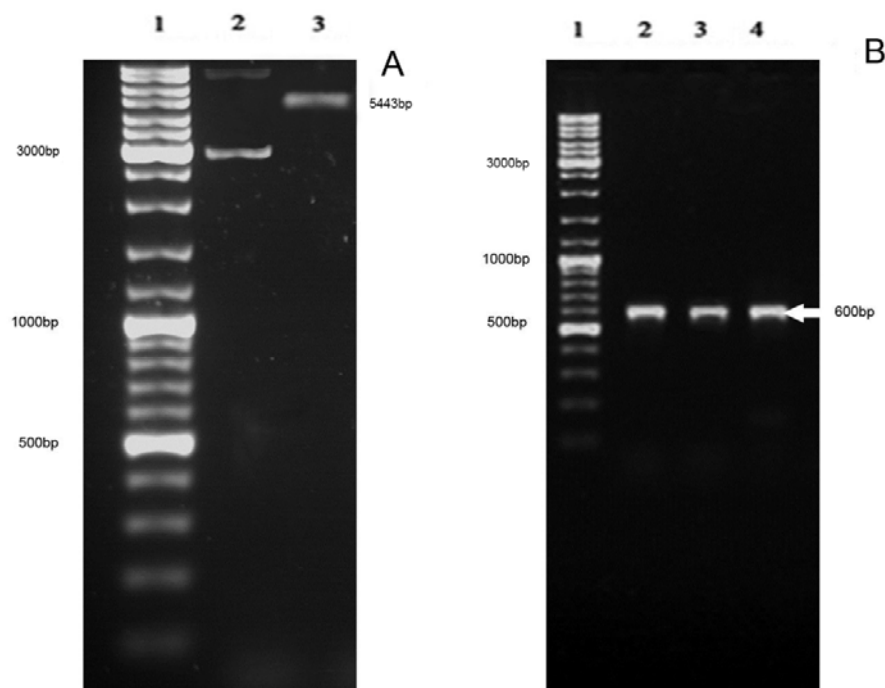
روشهای محاسباتی: ساختار کریستالوگرافی پیرازین آمیداز نوع وحشی با کد 3p11 از بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) استخراج شد. مدل‌های ساختاری آنزیمهای جهش یافته با استفاده از برنامه modeler براساس این الگو ساخته شد (<http://salilab.org/modeller>). در این تحقیق تمام محاسبات مربوط به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با

بررسی بیان و فعالیت پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته های آن: با انتقال ۱۰ میکرولیتر از عصاره سلولهای القاء شده بر روی ژل SDS-PAGE و مقایسه آن با نمونه شاهد (قبل از القاء) باند مورد انتظار حاصل از بیان پروتئینهای نو ترکیب در ناحیه ۲۱ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۴A). بعد از تأیید بیان با روش الکتروفورز SDS-PAGE، عصاره سلولی با روش مبتنی بر روش واین تعیین فعالیت گردید. همان طور که در شکل ۴B مشاهده می‌گردد آنزیم طبیعی دارای فعالیت بوده اما آنزیمهای جهش یافته فعالیت ندارند (شکل ۴A, B).

نتایج روشهای محاسباتی: با توجه به اینکه آنزیمهای جهش یافته به لحاظ زیستی غیر فعال شده بودند لذا جهت بررسی علل غیر فعال شدن از شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد.

همساز سازی پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته های آن: ژن *pnca* نوع وحشی و جهش یافته های آن و ناقل pET21a(+) پس از برش آنزیمی به صورت جداگانه، برای واکنش الحاق مورد استفاده قرار گرفتند که نتایج برش در شکل ۲ آمده است. با استفاده از روش کلون PCR کلنیهای حاوی ناقل دارای ژن مشخص شدند که محصول PCR با اندازه ۵۶۱ جفت باز ورود ژن در ناقل را نشان می‌دهد (شکل ۲).

ناقلهای نو ترکیب حاوی ژن *pnca* نوع وحشی و جهش یافته های آن پس از استخراج توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شدند. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در یکی از جهش یافته ها (W119C /D63G) تریپتوفان ۱۱۹ به سیستئین و آسپارتیک اسید ۶۳ به گلیسین و در جهش یافته دیگر (T160P) ترئونین ۱۶۰ به پرولین تبدیل شده است.



شکل ۲- A - نتیجه الکتروفورز pET-21a(+) برش یافته توسط آنزیمهای *HindIII* و *NdeI*، ۱. اندازه نمای DNA، ۲. وکتور pET-21a(+) قبل از برش، ۳. وکتور pET-21a(+) بعد از برش B: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR، ۱. مارکر DNA، ۲. ژن *pnca* نوع وحشی، ۳. جهش یافته D63G/W119C، ۴. جهش یافته T160P.

```

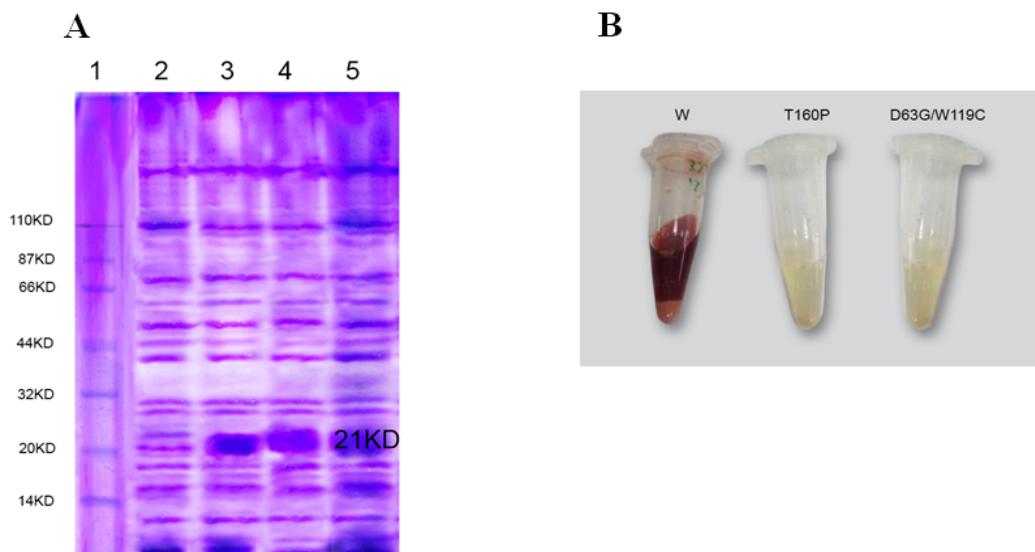
wild      MRALIIVDVQNDFCGGSLAVTGGAALARAI SDYLAEAADYHHVVATKDF 50
T160P    MRALIIVDVQNDFCGGSLAVTGGAALARAI SDYLAEAADYHHVVATKDF 50
D63G/W119C MRALIIVDVQNDFCGGSLAVTGGAALARAI SDYLAEAADYHHVVATKDF 50
*****

wild      HIDPGDHFSGTDPYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
T160P    HIDPGDHFSGTDPYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
D63G/W119C HIDPGDHFSGTDPYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
*****

wild      GAYSGFEGVDENGTPLLNWL RQRGVDEVDVVG IATDHCVRQTAEDAVRNG 150
T160P    GAYSGFEGVDENGTPLLNWL RQRGVDEVDVVG IATDHCVRQTAEDAVRNG 150
D63G/W119C GAYSGFEGVDENGTPLLNWL RQRGVDEVDVVG IATDHCVRQTAEDAVRNG 150
*****

wild      LATRVLVDLTPAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
T160P    LATRVLVDLTPAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
D63G/W119C LATRVLVDLTPAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
*****
    
```

شکل ۳- تطبیق توالی آمینواسیدی پیرازین آمیدازهای نوع وحشی و جهش یافته: تغییرات آمینواسیدی داخل کادر نشان داده شده اند.



شکل ۴- بررسی بیان و فعالیت آنزیم با الکتروفورز ژل SDS-PAGE و تست مبتنی بر واین: جهت بررسی بیان و فعالیت پیرازین آمیدازهای وحشی و جهش یافته، باکتریهای حاوی ناقل دارای ژن مربوطه با IPTG القاء شده (جزئیات بیشتر در قسمت مواد و روشها) و ۱۴ ساعت بعد از القاء با الکتروفورز و تست مبتنی بر واین مورد ارزیابی قرار گرفتند: (A) ژل SDS-PAGE حاصل از بیان پیرازین آمیدازهای نوع وحشی و جهش یافته در باکتری *E. coli* BL21 که نمونه ها بعد از سونیکاسیون با غلظت پروتئینی یکسان بر روی آن بارگذاری شدند. ۱، مارکر پروتئین ۲، نمونه قبل از القاء، ۳، ژن Wild type، ۴، جهش یافته D63G/W119C، ۵، جهش یافته T160P. (B) نتیجه تست واین در مورد آنزیم نوع وحشی، جهش یافته D63G/W119C و جهش یافته T160P را نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود، جهش یافته ها فعالیت ندارند.

در تشکیل ساختارهای دوم (مارپیچ آلفا، صفحه بتا، بتا بریج و پیچ بتا) شرکت دارند در نوع وحشی نسبت به تمام جهش یافته ها بیشتر است. به نحوی که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقدار آلفا هلیکس در جهش یافته D63G/W119C ۶ درصد کاهش یافته و در T160P مقدار صفحه بتا کاهش یافته است. بنابراین ساختارهای دوم

به منظور بررسی تغییرات ساختاری که در اثر وقوع جهش در هر کدام از جهش یافته ها رخ داده است، تعداد کل آمینواسیدهایی که در هر لحظه از زمان شبیه سازی در ساختار دوم پروتئینهای جهش یافته وجود داشتند محاسبه و با نوع وحشی مقایسه شد (شکل ۵). نتایج نشان می دهد تعداد آمینواسیدهایی که در هر لحظه از زمان شبیه سازی

پروتئینهای جهش یافته مقداری کاهش یافته که می تواند بر ساختار سوم این پروتئینها تأثیر گذاشته و منجر به تغییر ساختار سه بعدی جایگاه فعال و یا ناپایداری جهش یافته ها شود. همچنین سهم ساختارهای دوم مختلف در ساختار پروتئین در طول شبیه سازی در جدول ۱ خلاصه شده است. با توجه به این جدول، آمینواسیدهایی که در انواع جهش یافته از ساختار دوم خارج شده اند تقریباً به میزان یکسانی بین ساختارهای پیچ خورده و خمیده تقسیم شده اند و ترجیح معنی داری برای تبدیل به هیچ کدام از این دو ساختار دیده نمی شود. در کل در میان ساختارهای دوم ساختار پیچ (ترن) بیشترین تغییرات را در انواع جهش یافته نشان می دهد. همچنین برای بررسی تغییرات در ساختار دوم پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته در طول شبیه سازی پارامتری تحت عنوان DSSP (Dictionary of

protein secondary structure) محاسبه شد. همان طوری که در شکل ۶ مشاهده می شود، در نوع وحشی و انواع جهش یافته از نظر نوع و محل ساختارهای دوم در ۱۰ نانو ثانیه اول شبیه سازی اختلاف چندانی وجود نداشته و پس از آن نوسانهای ساختاری در ساختار دوم انواع جهش یافته رخ می دهد.

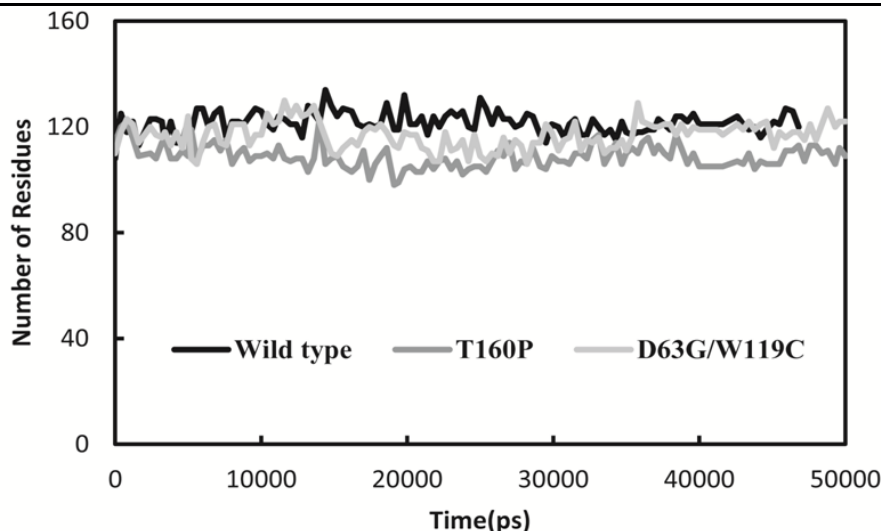
برای بررسی ساختار سوم انواع جهش یافته در ابتدا فاصله جهشها از جایگاه فعال آنزیم مطالعه شد که در جدول ۲ گزارش شده است. بر طبق محاسبات مشخص شد که هیچ کدام از جهشهای ایجاد شده به طور مستقیم در منطقه جایگاه فعال قرار ندارند. کمترین و بیشترین فاصله از جایگاه فعال به ترتیب مربوط به آمینواسیدهای سیستئین ۱۱۹ و گلیسین ۶۳ در جهش یافته D163G/W119C است.

جدول ۱- سهم ساختارهای دوم مختلف در ساختار پروتئین در طول شبیه سازی

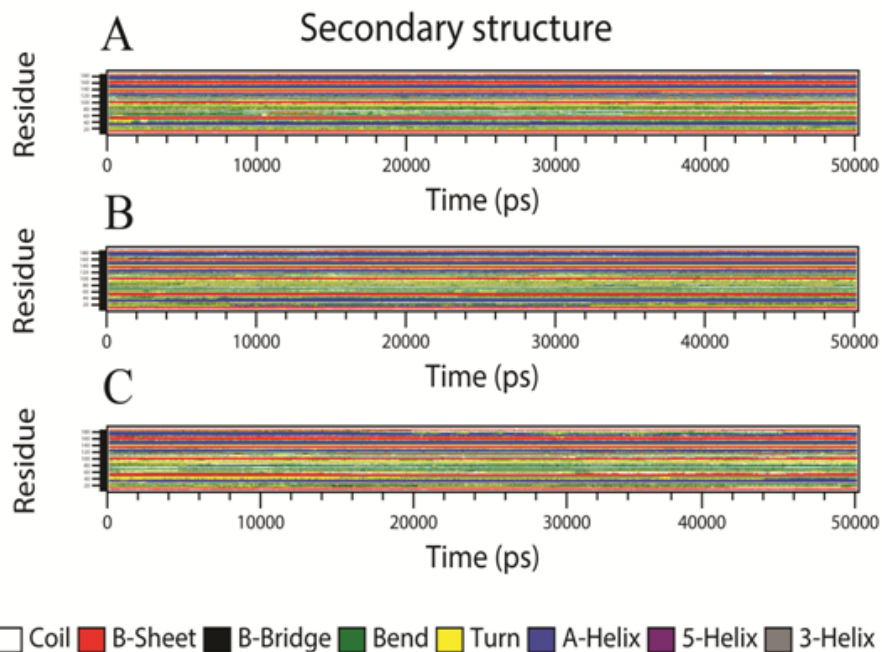
Enzymes	Total	Coil	β -bridge	β -sheet	Bend	Turn	α -helix	5- helix
Wild type	0.66	0.19	0.04	0.23	0.14	0.19	0.23	0.00
D63G/W119C	0.63	0.23	0.05	0.22	0.18	0.14	0.17	0.00
T160P	0.59	0.23	0.04	0.19	0.18	0.12	0.25	0.00

جدول ۲- فاصله آمینواسیدهای جهش یافته از جایگاه فعال آنزیم

Mutant	T160P	D63G/W119C
Residue	Pro 160	Gly 63
d	0.6376	1.9697



شکل ۵- تعداد کل آمینواسیدهایی که در هر لحظه از زمان شبیه سازی در ساختار دوم پروتئین وجود دارد (Total: A-Helix+B-Sheet+B- (Bridge+Turn)



شکل ۶- ساختار به دست آمده از برنامه DSSP

جایش یافته به دست آمد (جدول ۳). طبق این نتایج بیشترین میزان تغییرات RMSD مربوط به D63G/W119C می‌باشد.

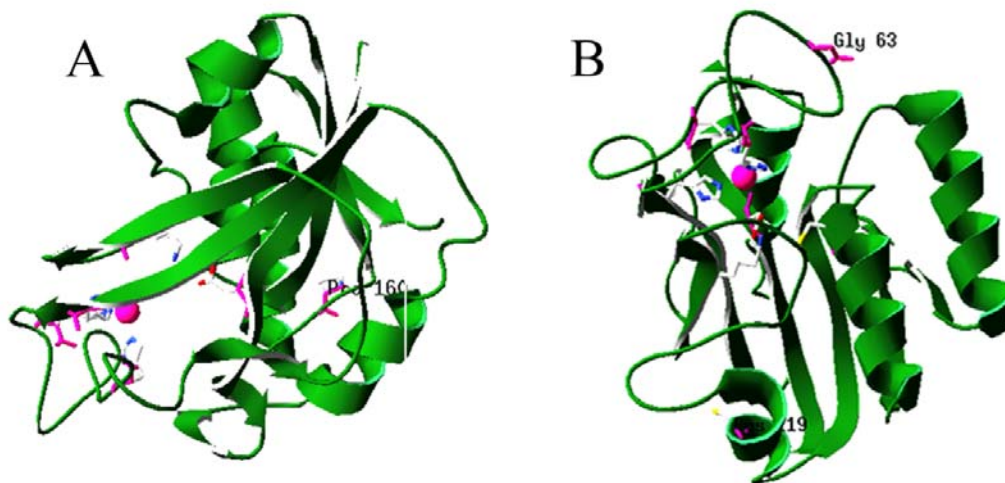
با شناسایی آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال، تغییر یا ثبات در فاصله بین آمینواسیدها نسبت به یکدیگر در طول شبیه‌سازی به عنوان شاهدهی برای تغییر یا ثبات ساختار سه بعدی جایگاه فعال در نظر گرفته می‌شود. نتایج حاصل از محاسبه (شکل ۹) نشان می‌دهد که فاصله این سه آمینواسید در پروتئین نوع وحشی در طول شبیه‌سازی تقریباً ثابت مانده است. در ارتباط با جهش یافته‌ها می‌توان گفت که فاصله دو آمینواسید لیزین ۹۶ و سیستمین ۱۳۸ در هر دو جهش یافته مقداری تقریباً ثابت و نزدیک به نوع وحشی دارد. با این حال فاصله ی آمینواسیدهای آسپارتیک‌اسید ۸ و لیزین ۹۶ در جهش یافته D63G/W119C نسبت به نوع وحشی افزایش چشمگیری داشته است که این افزایش در مورد این جهش یافته با کاهش فاصله دو آمینواسید آسپارتیک‌اسید ۸ و سیستمین ۱۳۸ همراه است.

جایگاه هر کدام از جهشها در ساختار سوم جهش یافته‌ها در شکل ۷ آمده است. یکی از شاخصهای مناسب برای بررسی میزان تغییرات کلی ساختار پروتئین مطالعه پارامتری به نام جذر مربع میانگین تغییرات است. این آنالیز می‌تواند به عنوان یک معیار برای میزان تغییرات در ساختار پروتئین با توجه به شرایط اعمال شده در طی شبیه‌سازی مورد استفاده قرار گیرد که نتایج آن از دو دیدگاه قابل بررسی است:

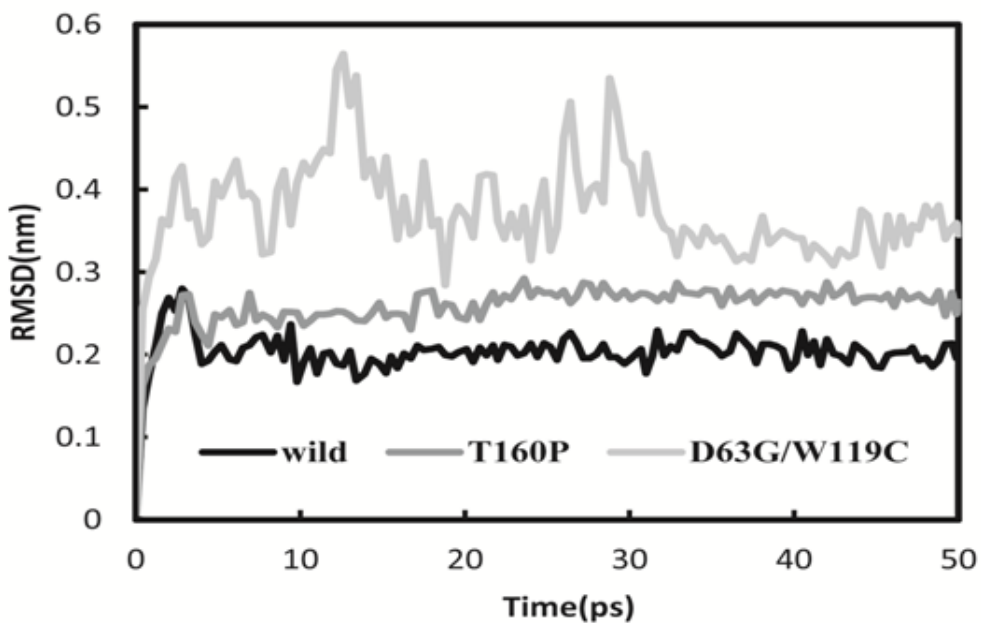
۱- مقایسه تغییرات هر پروتئین نسبت به ساختار اولیه در طول زمان

۲- مقایسه تغییرات هر پروتئین جهش یافته با نوع وحشی در طول زمان

به این منظور RMSD (Root mean square deviation) اتمهای کربن آلفای پروتئینها به عنوان تابعی از زمان شبیه‌سازی محاسبه شدند. همان طوری که در شکل ۸ نشان داده شده است، RMSD نوع وحشی در تمام طول شبیه‌سازی دارای مقادیر تقریباً ثابتی است. همچنین میانگین تغییرات در طی شبیه‌سازی برای آنزیم وحشی و انواع



شکل ۷- موقعیت آمینواسیدهای جهش یافته در ساختار پروتئینهای جهش یافته (D63G/W119C:B.T160P:A)

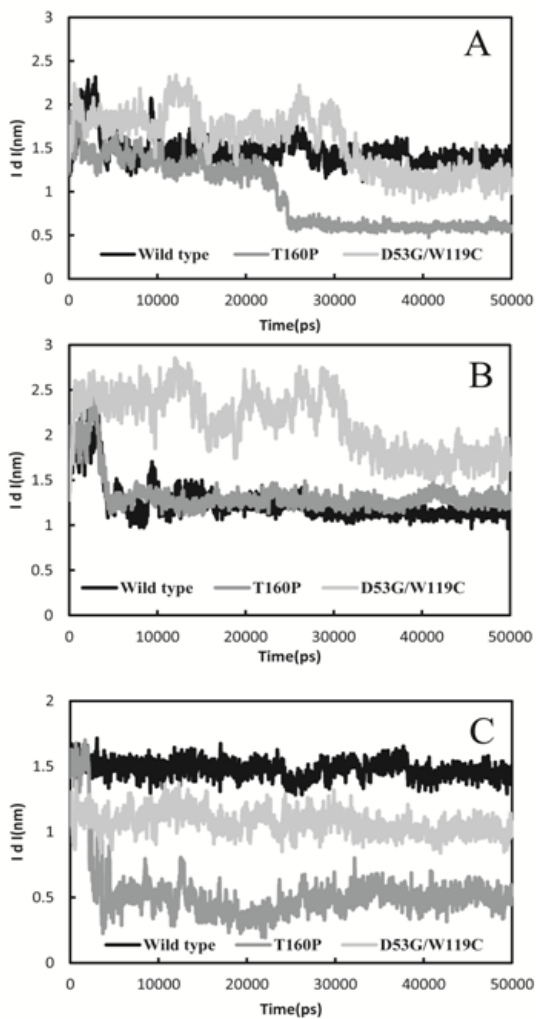


شکل ۸- نتایج مربوط به RMSD پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته
جدول ۳- میانگین مقادیر RMSD پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته

Enzymes	Wild type	T160P	D63G/W119C
Average of RMSD	0.20456	0.26077	0.3845

آلانین ۱۰۲ و گلوتامیک اسید ۱۳۶ مورد مطالعه قرار گرفت. این سه آمینواسید روی هم دهانه پاکت اتصال آنزیم پیرازین آمیداز را تشکیل می دهند. برای محاسبه فواصل بین آنها، اتم هایی در نظر گرفته شد که فواصل بین آنها نشان دهنده قطر تقریبی دهانه پاکت اتصال به سوپسترا در

ویژگیهای (شکل، بار الکتروستاتیکی) دهانه پاکت اتصال آنزیم به سوپسترا در کنار ویژگیهای دیگر تعیین کننده اختصاصیت و کارایی آنزیم می باشد. در این مطالعه ابعاد دهانه پاکت اتصال برای پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته به وسیله محاسبه فواصل سه آمینواسید سرین ۶۷،

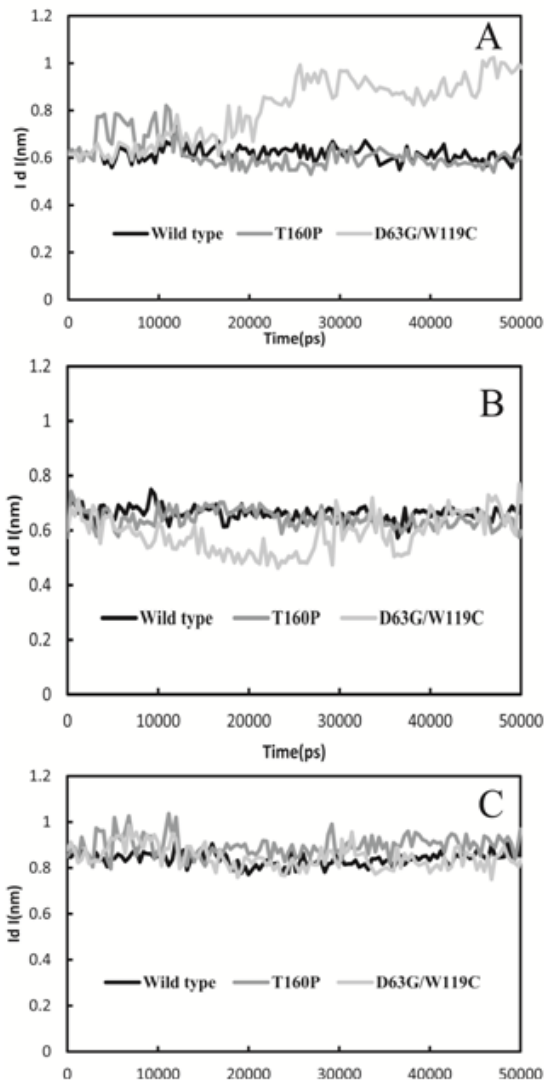


شکل ۱۰- فاصله بین آمینواسیدهای دهانه پاکت اتصال. Ser67:A و Ala102 :B. Ser67 و Glu136 :C. Ala102 و Glu136 در طول شبیه سازی.

بحث

نتایج بیان و تعیین فعالیت نشان داد که جهش یافته‌های مورد مطالعه باعث از دست رفتن کامل فعالیت آنزیم پیرازین آمیداز شدند. غیر فعال شدن آنزیم می‌تواند دلایل متفاوتی همچون تغییر در آمینواسیدهای جایگاه فعال و یا تغییر ساختار سه بعدی داشته باشد. با توجه به ساختار سه بعدی آنزیم و جایگاه جهشها، دیده می‌شود که جهشها در جایگاه فعال و یا نزدیکی آن قرار ندارند. بنابراین غیر فعال شدن جهش یافته‌ها می‌تواند در اثر

طول شبیه سازی می‌باشد. همان طوری که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، کاهش شدیدی در فاصله آمینواسیدهای ۷۶ و ۱۰۲ و همچنین فاصله بین آمینواسیدهای ۱۰۲ و ۱۳۶ در جهش یافته T160P مشاهده می‌شود. در مورد جهش یافته D63G/ W119C نیز وجود تفاوت در فواصل آمینواسیدهای دهانه پاکت اتصال نسبت به نوع وحشی وجود دارد اما این تغییر فاصله نسبت به جهش یافته T160P کمتر است.



شکل ۹- فاصله بین آمینواسیدهای جایگاه فعال :A : Asp8 و Lys96 :B. Asp8 و Cys138 :C. Cys138 و Lys96 در طول شبیه سازی

اما بررسی فواصل دهانه جایگاه اتصال به سویسترا (جایگاه فعال) حاکی از کوتاه شدن این فواصل است. در نتیجه می‌توان گفت در اثر جهش T160P تغییر ساختاری رخ داده است که منجر به کاهش پایداری آنزیم و یا تغییر در جایگاه فعال نشده است بلکه این جهش احتمالاً باعث تنگ تر شدن دهانه جایگاه اتصال به سویسترا در جایگاه فعال آنزیم شده است. در اثر تنگ تر شدن دهانه جایگاه فعال امکان ورود پیرازین آمید به جایگاه فعال کاهش یافته و بنابراین پیرازین آمید در دسترس جایگاه فعال قرار نگرفته و آنزیم غیر فعال شده است.

در نهایت می‌توان گفت در دو جهش یافته مورد بحث در این تحقیق از طریق مکانیسم‌های متفاوتی غیر فعال شدن آنزیم و در نتیجه مقاومت به داروی پیرازین آمید در باکتری *مایکوباکتریوم توبریکولوزیس* رخ داده است. در جهش یافته D63G/W119C در اثر به هم خوردن ساختار جایگاه فعال و در دیگری (T160P) در اثر تنگ تر شدن دهانه جایگاه فعال، آنزیم غیر فعال شده است. در این تحقیق آنزیم‌های پیرازین آمیداز جهش یافته از باکتری‌های مقاوم به داروی پیرازین آمید مورد بررسی قرار گرفت اما جهت بررسی امکان فعال ساختن آنزیم‌های غیر فعال شده (درجهت امکان سنجی حساس نمودن باکتری‌های مقاوم، به داروی پیرازین آمید) نیاز به تحقیق با روش‌هایی همچون جهش زایی هدفمند است تا جهش‌یافته‌هایی طراحی گردد که اثر (ساختاری) جهش غیر فعال کننده را تعدیل نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مساعدتهای گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تغییرات ساختاری باشد. برای بررسی جزئیات بیشتر ساختاری در مورد تأثیر جهش‌ها بر روی ساختار پروتئین‌ها می‌توان از روش بلورنگاری اشعه X و یا شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده نمود (۱ و ۲). در این تحقیق جهت بررسی جزئیات ساختاری و تغییرات ایجاد شده در اثر جهش در آنزیم پیرازین آمیداز از شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. مطالعات ساختار دوم، کاهش شش درصدی سهم کلی ساختار آلفا هلیکس در ساختار جهش یافته D63G/W119C را نشان داد که می‌تواند به علت جایگزینی آمینواسید سیستئین به جای آمینواسید تریپتوفان در موقعیت ۱۱۹ واقع در آلفا هلیکس شماره ۲ پروتئین و شکسته شدن هلیکس مذکور باشد. همچنین با توجه به جدول ۱ دیده می‌شود کمترین مقدار آلفا هلیکس مربوط به جهش یافته D63G/W119C است. از طرف دیگر نتایج RMSD نشان داد که ساختار آنزیم در مقایسه با نوع وحشی ناپایدارتر شده است. همچنین بررسی فواصل آمینواسیدهای درگیر در جایگاه فعال نشان می‌دهد که فواصل این آمینواسیدها نیز تغییر یافته است. بنابراین در مورد جهش یافته D63G/W119C می‌توان گفت بروز جهش در این جهش یافته باعث تغییر ساختار و کاهش پایداری آنزیم شده است به نحوی که این تغییر باعث به هم خوردن ساختار جایگاه فعال شده و در نتیجه آنزیم غیرفعال گشته است.

در مورد جهش یافته T160P ساختار دوم مقداری تغییر یافته است، نتایج نشان می‌دهد که در این جهش یافته نسبت به نوع وحشی آلفا هلیکس افزایش اما صفحات بتا کاهش یافته است. نتایج RMSD نیز نشان می‌دهد این جهش یافته به لحاظ پایداری دچار تغییر نشده است. نتایج مربوط به بررسی فواصل آمینواسیدهای جایگاه فعال تغییر معنی داری را نسبت به آنزیم نوع وحشی نشان نمی‌دهد

منابع

- ۲- گنجعلی خانی. م. م. رنجبر، م. م. ۱۳۹۱. مطالعه دینامیک مولکولی و حرکات عملکردی آنزیم لیپاز A از گونه باسیلوس سوبتیلیس. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۷: ۲۹۶-۳۰۷
- 3- Boshoff, H., Mizrahi, V., 1998. Purification, Gene Cloning, Targeted Knockout, Overexpression, and Biochemical Characterization of the Major Pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol., 180:5809-5814.
- 4- Boshoff, H. I., Mizrahi, V., 2000. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. J Bacteriol., 182:5479-5485.
- 5- Butler, W. R., Kilburn, J. O., 1983. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. Antimicrob Agents Chemother., 24:600-601.
- 6- Cheng, S. J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L., Zhang, Y., 2000. pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrob Agents Chemother., 44:528-532.
- 7- Doustdar, F., Khosravi, A. D., Farnia, P., 2009. *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. Microb Drug Resist., 15: 251-256.
- 8- Hu, Y., Coates, A. R., Mitchison, D. A., 2006. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis., 10:317-322.
- 9- Juréen, P., Werngren, J., Toro, J. C., Hoffner, S., 2008. Pyrazinamide resistance and pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 52:1852-1854.
- 10- Konno, K., Feldmann, FM., McDermott, W., 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis., 95:461-469.
- 11- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227: 680-685.
- 12- Lemaitre, N., Sougakoff, W., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., 1999. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. Antimicrob Agents Chemother., 43:1761-1763
- 13- McClatchy, J. K., Tsang, A. Y., Cernich, M. S., 1981. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. Antimicrob Agents Chemother., 20: 556-557.
- 14- Mestdagh, M., Fonteyne, P. A., Realini, L., Rossau, R., Jannes, G., Mijs, W., 1997. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the pncA locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 43:2317-2319.
- 15- Mitchison, D. A., 1985. The action of antituberculosis drugs in short course chemotherapy. J Tubercle., 66:219-225.
- 16- Petrella, S., Gelus-Ziental, N., Maudry, A., Laurans, C., Boudjelloul, R., Sougakoff, W., 2011. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. PLoS One., 24:6(1):e15785.
- 17- Raynaud, C., Laneelle, M. A., Senaratne, R. H., Draper, P., Laneelle, G., Daffe, M., 1999. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. J Microbiology., 145: 1359-1367.
- 18- Scorpio, A., Zhang, Y., 1996. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med., 2:662-667.
- 19- Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y., 1997. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 41:540-543.
- 20- Tarshis, M. S., Weed, W. A., 1953. Lack of significant in vitro sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide on three different solid media. Am Rev Tuberc., 67: 391-395.
- 21- Trivedi, S. S., Desai, S. G., 2004. Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium*

- tuberculosis test of sensitivity to pyrazinamide. *J Tubercle.*,68:221-224.
- 22-Wade, M. M., Zhang, Y., Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci.*,9:975-994.
- 23-Wayne, L. G., 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.*,109:147-151.
- 24-Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., Sun, Z. H., 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in the unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol.*, 181: 2044-2049.
- 25-Zhang, Y., Mitchison, D., 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.*,7: 6- 21.
- 26-Zhang, Y., Wade, M.M., Scorpio, A., Zhang, H., Sun, Z., 2003. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Antimicrob Chemother.*, 52:147-159.
- 27-Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C., Jacobs, W. R., 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.*, 6:1043-1047.

The Study of mutations effect on the inactivation of pyrazinamidase by molecular dynamics simulations

Safarzadeh M.¹, Pazhang M.¹, Mehrnejad F.², Doustdar F.³, Chaparzadeh N.¹, Rabiei Faradonbeh D.¹, Yari Khosroshahi A.⁴ and Mohammadpour A.¹

¹ Biology Dept., Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

² Life Science Engineering Dept., Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

³ Microbiology Dept., Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

⁴ Drug Applied Research Center, Pharmacognosy Dept., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Pyrazinamide is one of the most important drugs in the treatment of latent *tuberculosis* infection. *PncA* gene encodes Pyrazinamidase (PZase) enzyme of *Mycobacterium tuberculosis* that is responsible for conversion of Pyrazinamide (PZA) to Pyrazinoic acid (active form). In spite of the role of this drug in shortening of the treatment period from 9 months to 6, the emergence of strains resistant to PZA represents an important public health problem. Pyrazinamidase mutations are associated to PZA – resistant phenotype. However, the relationship between mutations and structural changes that inactive the enzyme, has not been known very well. In this study, the PZase gene from the H37Rv strain (wild type) and two resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* to PZA were cloned, expressed and their activity were investigated by the method based on Wayne test. The structures of wild type enzyme and mutants (D63G/W119C and T160P) were modeled using homology modeling and single amino acid replacement, then structural parameters were calculated. Enzyme activity determination results revealed that the mutants lose their activity, completely. Computational results also confirmed that mutations affect the secondary structure of the enzyme and induce structural changes. These changes can alter the structure of the enzyme active site in D63G/W119C or shorten opening of the substrate binding site in T160P.

Key words: Tuberculosis, Pyrazinamidase, Pyrazinamide resistance, Molecular dynamic simulation