

مطالعه ساختار و دینامیک ال-آسپارژیناز در حضور پلیمر پلی (لاکتیک اسید) به کمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

سما الزوینی، فرامرز مهرنژاد*، یاسمن محمودی، علی حسین رضایان و محمد برشان تشنیزی**

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

چکیده

آنزیم ال-آسپارژیناز به عنوان مکمل شیمی درمانی و یک داروی آنزیمی به طور گسترده در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد. با این حال استفاده از ال-آسپارژیناز، به عنوان یک دارو، به دلیل ماهیت ذاتی پروتئین‌ها با مشکلاتی همراه است. در نتیجه، از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی مختلف برای ایجاد نانو و میکروسفرهای زیست تخریب‌پذیر به منظور رسانش و رهایش آن استفاده می‌شود. در این تحقیق، اثر پلیمر پلی (اسید لاکتیک) (PLA) بر ساختار و دینامیک ال-آسپارژیناز با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مطالعه و بررسی شد. نتایج نشان داد که ساختار دوم و سوم پروتئین در حضور پلیمر در طول مسیر شبیه‌سازی تغییر نداشته است و حتی باعث افزایش پایداری ساختار و کاهش دینامیک پروتئین شده است. این تحقیق نشان داد که اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین بیشترین سهم برهم‌کنش‌ها را با پلیمر PLA دارند و همچنین تعدادی از اسیدهای آمینه آب‌گریز و قطبی در برهم‌کنش بین پلیمر و آنزیم شرکت کردند. نتایج نشان داد که نیروهای اصلی اتصال پلیمر PLA به آنزیم ال-آسپارژیناز از نوع الکترواستاتیک و واندروالسی می‌باشد. یافته‌های این تحقیق می‌تواند اطلاعات مفیدی برای روشن شدن برخی از ابهامات موجود در نتایج تجربی برای کپسوله شدن آنزیم ال-آسپارژیناز و استفاده در صنعت دارورسانی را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: ال-آسپارژیناز؛ کپسوله‌سازی؛ پلی (اسید لاکتیک)؛ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی؛ خوبازیابی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mehrnejad@ut.ac.ir ، ** پست الکترونیکی: mbarshan@ut.ac.ir

مقدمه

یک چالش بزرگ برای محققان است (۶ و ۷). پروتئین‌ها به دلیل وزن مولکولی بالا و آب دوستی، مستعد تخریب پروتئولیتیک هستند و جذب ضعیفی دارند. در حال حاضر، در مواردی که حامل‌های کلوئیدی با عبور از موانع سلولی دسترسی بالاتری را فراهم می‌کنند، از نانوذرات پلیمری به عنوان حامل دارورسانی پروتئین‌ها استفاده می‌شود (۱ و ۵). نانوذرات برای رسانش و رهایش پروتئین‌های درمانی مفید هستند به طوری که از تخریب شدن محافظت کرده و رهاسازی آنها را طولانی‌تر می‌کند، بنابراین تثبیت داروهای پروتئینی، حفظ فعالیت زیستی و اجتناب از به وجود آمدن

داروهای پروتئینی یک گزینه حیاتی برای کمک به بیمارانی هستند که بیشترین نیاز را به پیشرفته‌ترین درمان‌ها دارند. در حال حاضر پروتئین‌های نوترکیب تأیید شده برای درمان طیف وسیعی از علائم بالینی، از جمله سرطان، قرار گرفتن در معرض عوامل عفونی، خودایمنی، عفونت، و اختلالات ژنتیکی توسعه یافته‌اند (۳۵). علاوه بر این، پیشرفت‌ها در مهندسی پروتئین به داروسازان این امکان را داده است تا با حفظ یکپارچگی محصول و افزایش کارایی، خواص عملکردی مشخص پروتئین‌های ضروری را تنظیم و از آنها بهره‌برداری کنند (۳۸). توسعه سیستم‌های دارورسانی پروتئینی به دلیل ساختار مولکولی پیچیده پروتئین‌ها همچنان

عملکرد کبد، ناهنجاری‌های انعقادی، عدم تعادل عصبی و پانکراتیت است از کاربرد بالینی آنها جلوگیری می‌کند (۲۵). علاوه بر این، نیمه عمر کوتاه عامل محدود کننده اصلی در استفاده بالینی از آن است که نیاز به تزریق‌های متعدد دارد. علاوه بر حساسیت بیش از حد، که از واکنش‌های آلرژیک خفیف تا آنافیلاکسی متغیر است، ایمن‌سازی آنزیمی نیز مشاهده شده است. نیمه عمر ال-آسپارژیناز در گردش خون به دلیل تشکیل آنتی‌بادی‌های خنثی کننده به ۲/۵ ساعت کاهش می‌یابد. برای درمان این مشکل، محققان پلی اتیلن گلیکول را به صورت کووالانسی به ال-آسپارژیناز متصل کردند، که در نتیجه آن نیمه عمر به ۱۵ روز افزایش و ایمنی-زایی کاهش یافت (۴۵). برای افزایش نیمه عمر و تثبیت آنزیم، آسپارژیناز به لیپوزوم‌ها (۱۳ و ۱۵) و نانوساختارهای پلی‌لاکتیک کو گلیکولیک اسید (Poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) وارد شد (۲۶). به دلیل خاصیت زیست تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری، این کوپلیمرها توسط سازمان غذا و دارو برای استفاده در انسان تایید شده اند (۲). PLGA قادر به تشکیل نانوذراتی است که به طور گسترده برای کپسوله کردن دارو، داربست‌های جراحی و سایر کاربردها استفاده می‌شود (۱۴). همانطور که توسط گاسپارد و همکارانش گزارش شده است، نانوذرات ساخته شده از PLGA و بارگیری شده با آسپارژیناز با گروه‌های انتهایی کربوکسیل آزاد، که به آن PLGA نوع H نیز گفته می‌شود، بار پروتئین بالایی داشتند و دارو را به مدت ۲۰ روز به طور مداوم رهاسازی کردند. این در حالی است که با استری شدن گروه‌های انتهایی کربوکسیلات از PLGA، بارگیری پروتئین کمتر بود و آنزیم فعالی رسانی نشد. در طی یک دوره ۲۰ ساله، برخی از مطالعات نانوکپسولاسیون ال-آسپارژیناز با پلیمرزوم‌ها (۳) و لیپوزوم‌ها (۱۵) گزارش کرده‌اند، اما این موارد دارای محدودیت‌هایی هستند. عیب اصلی پلیمرزوم‌ها که وزیکول‌های جامد هستند، پیچیدگی خودآرایی آنها است که ممکن است منجر به کاهش تولید کپسول‌های ماکرومولکول شود (۴۳). از سمت دیگر

محصولات در حال تجزیه سمی برای درمان موفقیت آمیز، ضروری است (۷ و ۴۵)

آنزیم ال-آسپارژیناز (ASNase) از سال ۱۹۹۴ که ال-آسپارژیناز II (EcAII) باکتری اشرشیاکلی تایید شد، مورد استفاده قرار گرفته است. اولین فناوری دارویی در نانوپزشکی مربوط به این آنزیم، پیگلاسیون آن در سال ۲۰۰۶ بود (۱ و ۳ و ۹). ال-آسپارژیناز II تولید شده توسط اشریشیا کلی یک هوموترامر با وزن مولکولی حدود ۱۴۲ کیلو دالتون است (۱۰). که به عنوان مکمل شیمی درمانی و یک داروی آنزیمی برای درمان بیماری‌هایی مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphocytic leukemia (ALL))، رتیکولوسارکوم، لوسمی لنفوسیتی مزمن، لوسمی حاد میلوژن، ملانوسارکوم، لوسمی میلومونوسیتی حاد و لنفوسارکوم استفاده می‌شود (۲۳، ۳۳، ۳۶ و ۳۹). ال-آسپارژیناز ۴۰ درصد از سهم کل آنزیم‌های سفارش داده شده در سراسر جهان را به خود اختصاص داده است. همچنین یک سوم نیاز جهانی را به عنوان ترکیب ضد سرطان خون و لنفوم را تشکیل می‌دهد که آن را به یکی از مهم‌ترین داروهای ضد سرطان برای ALL تبدیل می‌کند (۱۱ و ۴۲).

ال-آسپارژیناز، هیدرولیز ال-آسپارژین را به ال-آسپاراتات و آمونیاک تحریک می‌کند (۳۲ و ۳۴) و جزء سرم خوکچه هندی است که ال-آسپارژین را در سرم تخلیه و علاوه بر جلوگیری از گسترش لنفوم، برخی از سلول‌های سرطانی را حذف می‌کند (۱۶). نتایج این فرآیند، مهار سریع سنتز پروتئین، DNA و RNA است (۱۲، ۲۸ و ۳۰). به مدت ۶۰ سال، این نتیجه در توسعه پروتکل‌های بالینی برای درمان ALL مورد استفاده قرار گرفته است که شامل تزریق ال-آسپارژیناز در حین تجویز سایر عوامل ضد سرطان است و منجر به نرخ بقای کودکان بیش از ۹۰ درصد در ایالات متحده شده است (۴۰). آسپارژیناز یکی از موثرترین ترکیبات با برخی عوارض جانبی است (۱۰). با این حال، عوارض جانبی آن که شامل حساسیت مفرط، اختلال در

قرار می‌گیرد که برای بررسی سیستم‌های تعادل و تعاملات دینامیکی پروتئین‌ها به کار می‌رود (۴). استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توصیف سیستم‌های زیستی را با جزئیات بسیار بیشتر و در مقیاس کوچک‌تر در سطح اتم‌ها و همچنین برهم‌کنش‌های بین آنها را ممکن می‌سازد (۴۱).

در حال حاضر، محققان روش‌های مختلفی را برای توسعه کپسوله کردن و افزایش پایداری آنزیم‌ال-آسپارژیناز در داخل پلیمرهای مختلف استفاده کردند و تاثیر این پلیمرها بر ساختار، عملکرد و پایداری پروتئین را در سطح ماکروسکوپی مطالعه کرده‌اند با این حال یک سوال اصلی وجود دارد که پلیمرها چه اثری بر ساختار و دینامیک پروتئین می‌گذارند؟ بنابراین در این تحقیق برای پاسخ به این سوال، جزئیات اتمی و مولکولی برهم‌کنش بین پلیمر PLA و آنزیم‌ال-آسپارژیناز به کمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد و همچنین اثر این پلیمر برای روی ساختار و دینامیک پروتئین مطالعه شد. هدف این مطالعه درک مکانیسم مولکولی برهم‌کنش بین پروتئین‌ال-آسپارژیناز با سیستم‌های پلیمری و چگونگی تجمع پلیمر در اطراف پروتئین است و همچنین تلاش می‌شود نحوه برهم‌کنش و نیروهای موثر در این برهم‌کنش معرفی گردند. در این تحقیق با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک سعی شد تا رفتار پروتئین در مواجهه با رشته‌های پلیمری با جزئیات اتمی بررسی شود. ما امیدوار هستیم که نتایج این مطالعه بتواند اطلاعات مفیدی برای روشن شدن برخی از ابهامات موجود در نتایج تجربی برای کپسوله شدن آنزیم‌ال-آسپارژیناز و استفاده در صنعت داروسازی فراهم کند.

مواد و روشها

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: مختصات ال-آسپارژیناز از پایگاه داده پروتئین (PDB ID: 6uog) مشتق شده است (۱۶). پارامترهای پلیمری از سرور Automated Topology Builder (ATB) گرفته شده است (۲۹). به منظور تهیه سیستم‌های پروتئین-پلیمر بر اساس اندازه جعبه و وزن

لیپوزوم‌ها دچار ناپایداری شیمیایی وزیکول‌های لپیدی است. کپسوله‌سازی در نانوذرات می‌تواند راهبردی برای کاهش حذف این آنزیم با محبوس کردن آن در یک ماتریکس پلیمری باشد (۲۶ و ۴۴).

گروه‌های شیمیایی استر، عمدتاً می‌توانند در طبیعت تجزیه شوند. از این رو برخی از پلیمرهای مصنوعی حاوی پیوندهای استری، قابلیت تجزیه در طبیعت را دارند. پلی‌استرهای مانند پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌گلیکولیک اسید (PGA) و کوپلیمرهای پلی‌لاکتیک گلیکولیک اسید (PLGA) زیست‌تخریب‌پذیر بوده و کاربردهای پزشکی فراوانی دارند. PLA و PLGA توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) در دهه ۱۹۷۰ به عنوان موادی برای ساخت بقیه‌های جراحی با قابلیت جذب زیستی تایید شدند (۱ و ۵). پلی‌لاکتیک اسید (Poly (lactic acid)(PLA)) یکی از معروفترین پلیمرهای زیستی است که کاربرد زیادی در پزشکی دارد از جمله ویژگی‌های بارز آن زیست‌تخریب-پذیری، استحکام بالا و زیست‌سازگاری است. این پلیمر برای رسانش و رهایش مولکول‌های دارویی کوچک تا پروتئین‌ها استفاده می‌شود (۵). پلی‌لاکتیک اسید یا پلی‌لاکتاید نوعی پلی‌استر آلفاتیکی ترموپلاستیک قابل تجزیه زیستی است که در اثر پلیمریزاسیون اسید لاکتیک تشکیل می‌شود. در واقع PLA یک پلی‌استر است، یعنی دارای واحدهای استر تکرارشونده است. این پلیمر در یک فرایند دومرحله‌ای تولید می‌شود، که ابتدا حلقه لاکتیک پلیمریزاسیون شده باز می‌شود و سپس این چرخه لاکتیک اسید تکرار می‌شود (۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۷).

برخی محدودیت‌ها برای ارزیابی خواص پروتئین‌ها توسط روش‌های تجربی وجود دارد. این محدودیت‌ها شامل هزینه بالا، راندمان کم، زمان بر بودن و بدون نتیجه ماندن است. روش‌های محاسباتی اغلب برای غلبه بر تعدادی از این محدودیت‌ها موثر هستند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از جمله روش محاسباتی است که به طور گسترده مورد استفاده

می‌باشد. برای محاسبه انرژی اتصال کل، انرژی اتصال قطبی، و انرژی اتصال غیرقطبی از معادلات زیر استفاده شد:

معادله (۲) معادله ΔG اتصال دوام

$$\begin{aligned} \Delta G_{binding} &= \Delta G_{polar\ binding} \\ &+ \Delta G_{non-polar\ binding} \end{aligned}$$

معادله (۳) معادله ΔG اتصال قطبی

$$\Delta G_{polar\ binding} = \Delta G_{polars} + \Delta G_{electrostatic}$$

معادله (۴) معادله ΔG اتصال غیرقطبی

$$\Delta G_{non-polar\ binding} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{non-polars}$$

$\Delta G_{polar\ binding}$ بیانگر انرژی آزاد اتصال قطبی، $\Delta G_{non-polar\ binding}$ انرژی آزاد اتصال غیرقطبی، $\Delta G_{electrostatic}$ انرژی آزاد الکتروستاتیک، ΔG_{polars} انرژی آزاد قطبی حلال، $\Delta G_{non-polars}$ انرژی آزاد غیر قطبی حلال و ΔG_{vdw} انرژی آزاد واندروالسی می‌باشند.

نتایج و بحث

میزان تغییرات ساختاری و پایداری پروتئین: در ابتدا دینامیک، ساختار و پایداری پروتئین L-آسپاراژیناز در حضور زنجیره های PLA مورد آنالیز قرار گرفت. در شکل ۱ آنالیز جذر میانگین مربع انحرافات (Root Mean Square Deviation (RMSD)) نسبت به ساختار اولیه در آب خالص و در حضور پلیمر PLA در طول زمان شبیه‌سازی نشان داده شده است. به طور کلی، RMSD میزان انحراف موقعیت مکانی اتم‌ها نسبت به موقعیت اولیه در هر نقطه از زمان را نشان می‌دهد هر چه قدر مقادیر RMSD بیش‌تر باشد، احتمالاً میزان تغییرات ساختاری بیش‌تر خواهد بود. در واقع با مشاهده میزان شیب نمودار بدست آمده، می‌توان میزان پایداری مولکول مورد نظر را سنجید (۳۲). در این قسمت مقادیر RMSD در برابر زمان برای اتم های کربن آلفای پروتئین محاسبه شده است. همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، پلیمر در ابتدای شبیه‌سازی باعث افزایش RMSD و ناپایداری پروتئین شده است. در واقع با اضافه

مولکولی پلیمر مورد نظر برای غلظت‌های خاص، تعداد معینی از مولکول‌های پلیمری به صورت تصادفی در جعبه شبیه سازی در کنار پروتئین ریخته شد. به عنوان یک حلال، مولکول‌های آب با بار نقطه ای ساده (SPC) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۶). سپس یون‌ها برای خنثی کردن آن‌ها به سیستم‌ها عرضه شد. برای به حداقل رساندن انرژی، از شیب دارترین الگوریتم نزولی استفاده شد. سیستم‌ها در حالت‌های گروه NVT و NPT متعادل شدند. روش های V-rescale (۱۸) و Parrinello-Rahman به ترتیب برای ثابت نگه داشتن دما و فشار سیستم استفاده شد (۳۱) پس از اتمام دو مرحله تعادل، یک شبیه سازی به مدت ۵۰۰ نانوثانیه‌ای انجام شد. برای اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی از نرم افزار GROMACS (۲۱) و میدان نیروی GROMOS96 54a7 استفاده شد. با استفاده از الگوریتم LINCS، طول پیوند محدود شد (۲۲). برهمکنش‌های الکترواستاتیکی در برد کوتاه تا فاصله ۱/۰ نانومتر محاسبه شد. برای محاسبه برهمکنش‌های الکترواستاتیکی دوربرد از تکنیک (Particle Mesh Ewald (PME)) استفاده شد (۳۷).

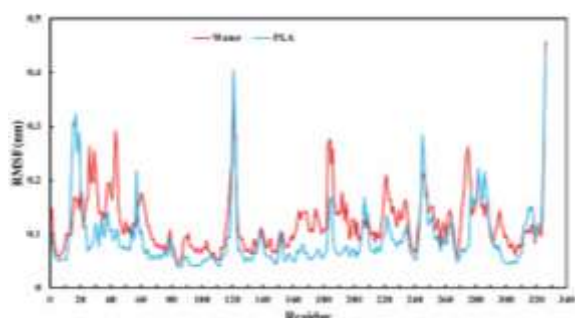
محاسبه انرژی در سیستم شبیه‌سازی: برای محاسبه انرژی آزاد از ابزار g_mmpbsa استفاده شد، که در واقع از روش (Molecular Mechanic Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA)) برای محاسبه انرژی استفاده می‌کند (۱۷). در این روش متوسط انرژی آزاد سیستم با محاسبه و میانگین‌گیری انرژی آزاد سیستم از تعداد خاصی از تصاویر لحظه‌ای (Snapshots) حاصل از فایل خروجی شبیه‌سازی بدست می‌آید. به طور کلی انرژی اتصال بین ملکول‌ها در این روش با استفاده از معادله‌ی زیر بدست می‌آید:

معادله (۱) معادله ΔG اتصال اول

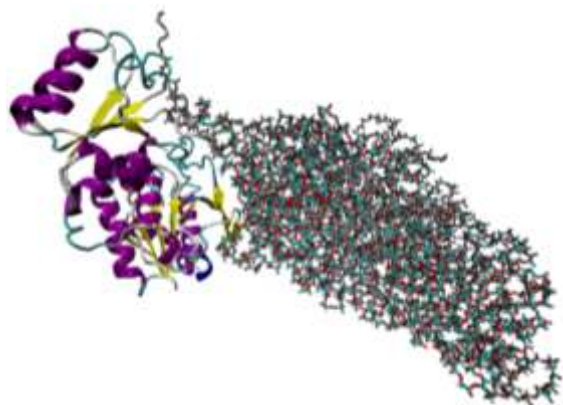
$$\begin{aligned} \Delta G_{binding} &= \Delta G_{complex} - \Delta G_{protein} \\ &- \Delta G_{ligand} \end{aligned}$$

که $G_{protein}$ نشان دهنده انرژی آزاد پروتئین مورد نظر و G_{ligand} نشان‌دهنده انرژی آزاد مربوط به لیگاند پروتئین

می‌کنید، میزان افت و خیزها در حضور پلیمر کمتر از آب خالص است که این نتیجه قابل انتظار بوده است. بنابراین در مجموع، با جذب پلیمر بر روی پروتئین، میزان متوسط انعطاف‌پذیری در قسمتهای مختلف پروتئین کاهش یافته است. شکل ۳ آخرین تصویر گرفته شده از پروتئین و پلیمرها را نشان می‌دهد. اثر پلیمر PLA بر کاهش نوسانات پروتئین‌ها در تحقیقات قبلی هم نشان داده شده است و این تحقیق نیز آنها را تایید می‌کند (۲۴).



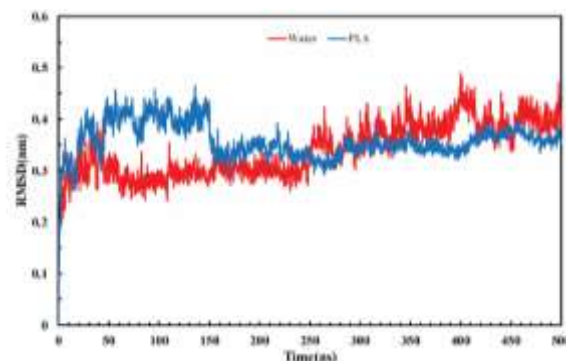
شکل ۲ - جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF) کربن آلفا به ازای هر آمینواسید



شکل ۳- تصویر گرفته شده از لحظه آخر شبیه‌سازی به کمک نرم افزار VMD

یکی دیگر از قابلیت‌های مهم شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، تحلیل ساختار دوم پروتئین با استفاده از الگوریتم Dictionary of the Secondary Structure of Protein (DSSP)) است. به منظور درک میزان تغییرات ساختار دوم

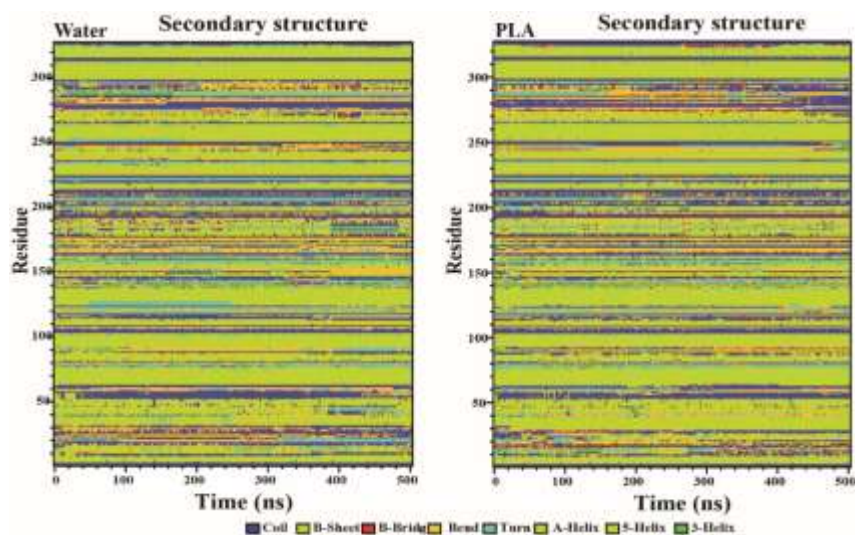
کردن پلیمر به محیط، پروتئین دچار استرس شده است و میانگین کل نوسانات آن افزایش یافته است ولی پس از گذشت ۲۵۰ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی، میزان RMSD تقریباً به یک میزان ثابتی (۰/۳ نانومتر) رسیده و تغییری نمی‌کند. لازم به ذکر است که در مقدار RMSD در سیستم پروتئین در آب خالص یک افزایش نسبی در کل طول زمان شبیه‌سازی دیده می‌شود. با مقایسه RMSD پروتئین در حضور و عدم حضور PLA، می‌توان نتیجه گرفت که در اواخر شبیه‌سازی، کنفورماسیون پروتئین مورد نظر در حضور پلیمر تغییر چشمگیری نکرده و پلیمر ساختار پروتئین را حتی پایدارتر کرده است.



شکل ۱ - انحراف جذر مربع میانگین (RMSD) برای کربن‌های آلفای پروتئین در حضور و عدم حضور پلیمر

جذر میانگین مربع نوسانات (Root Mean Square Fluctuations (RMSF)) هر آمینواسید در یک ماکرومولکول نیز از طریق مقایسه با یک ساختار مرجع به عنوان ساختار اولیه آن ماکرومولکول قابل محاسبه است. این آنالیز نیز مانند آنالیز قبلی می‌تواند به عنوان یک معیار برای بررسی میزان تغییرات در ساختار پروتئین با توجه به شرایط اعمال شده در طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گیرد (۳۲). در شکل ۲ جذر میانگین مربع نوسانات کربن آلفا به ازای هر آمینواسید نشان داده شده است. در نمودار RMSF، میانگین‌گیری بر روی کل زمان شبیه‌سازی به ازای هر آمینواسید انجام می‌گیرد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده

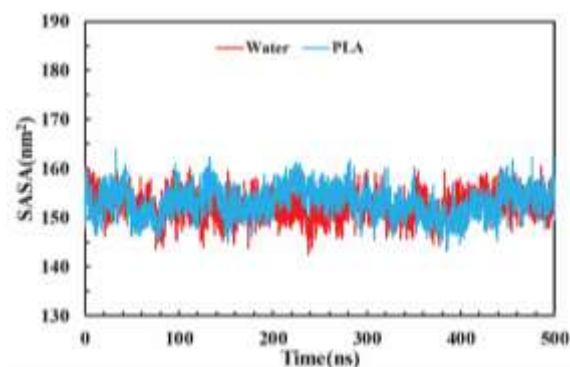
می‌تواند به علت پایدار ماندن کنفورم‌اسیون ماریچج باشد. این نتایج با مقایسه با ساختار سه بعدی اولیه تعیین شده تایید شد (۱۶). سطح قابل دسترس حلال (Solvent Accessible Surface Area (SASA)، یکی از شاخص‌های مهم در بررسی ساختار پروتئین است. شکل ۵، سطح قابل دسترس حلال بر حسب زمان را نمایش می‌دهد. همانطور که قابل ملاحظه است، در هر دو سیستم (حضور و عدم حضور پلیمر) سطح قابل دسترس حلال تغییری نداشته است. این نتیجه، داده‌های بدست آمده از آنالیزهای قبلی (RMSD، RMSF و DSSP) را تایید می‌کند.



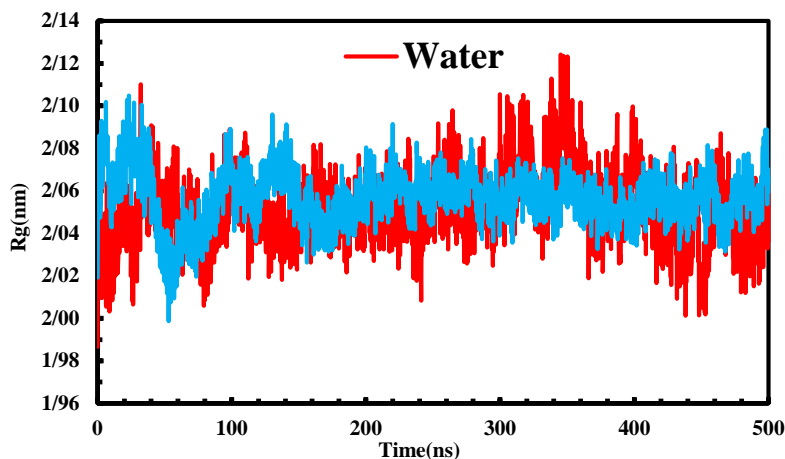
شکل ۴- نمودار DSSP در حضور و عدم حضور پلیمر PLA

برای بررسی میزان تراکم ساختار پروتئین و میزان فشردگی آن، شعاع ژیراسیون بررسی شد. شعاع ژیراسیون میزان فاصله کربن آلفا با اتم‌های اطراف را نشان می‌دهد. نمودار مربوط به شعاع ژیراسیون (شکل ۶) نشان می‌دهد در سیستمی که پلیمرهای PLA با آنزیم L - اسپاراژیناز برهم کنش دارند، شعاع ژیراسیون افت و خیز کمتری دارد و کاملاً حالت صاف دارد. این مسطح بودن نمودار شعاع ژیراسیون، پیشنهاد می‌کند پروتئین در حضور PLA به حالت ساختاری پایداری رسیده است.

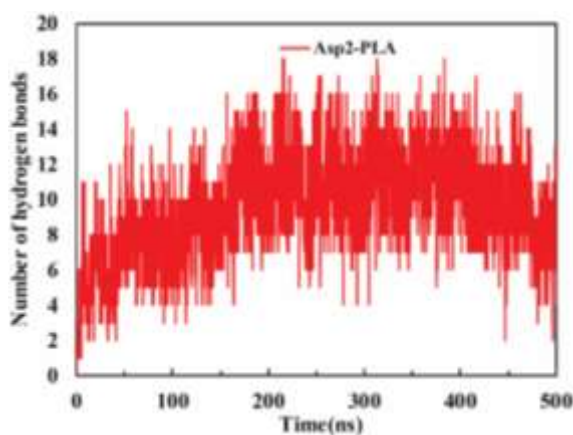
پروتئین طی ۵۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی، نمودار DSSP به دست آمد (شکل ۴). با کمک DSSP می‌توان درصد احتمال حضور و یا عدم حضور ساختارهای مختلف موجود در پروتئین را در طول زمان کل شبیه‌سازی محاسبه کرد. بطور کلی، بر اساس نتایج نمودار DSSP می‌توان گفت که تقریباً تمام ساختارهای دوم پروتئین در حضور پلیمر تا انتهای شبیه‌سازی حفظ شده‌اند. همچنین در نقاطی مشاهده می‌شود که ساختارهای ماریچج آلفا در حضور پلیمر PLA بیش‌تر حفظ شده‌اند (ناحیه مربوط به رزیدوهای ۱۶۰ تا ۲۰۰)، در صورتی که در سیستم آب خالص ماریچج‌ها کمتر شده‌اند. کاهش مقدار RMSF نیز در این ناحیه در حضور پلیمر PLA



شکل ۵- سطح قابل دسترس حلال (SASA) بر حسب زمان شبیه‌سازی در حضور و عدم حضور پلیمر



شکل ۶- نمودار شعاع ژیراسیون در دو حالت حضور و عدم حضور پلیمر



شکل ۷- آنالیز تعداد پیوند هیدروژنی میان پروتئین و پلیمر

برهم کنش پلیمر با پروتئین: جهت بررسی علت پایداری ساختار ال-آسپاراژیناز، تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و پلیمر در طول زمان شبیه‌سازی مورد محاسبه قرار گرفت. شکل ۷ تعداد پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل واضح است با گذشت زمان تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و پلیمرهای PLA افزایش یافته است، ولی بعد از ۴۰۰ نانوثانیه کمی کاهش داشته است، که احتمالاً زنجیره‌های PLA نیز میان خود پیوند هیدروژنی درون مولکولی ایجاد می‌کنند. در واقع با گذشت زمان شبیه‌سازی، برهمکنش میان زنجیره‌های پلیمر و پروتئین به تعادل رسیده و با توجه به آنالیزهای قبلی پروتئین در کنار پلیمر PLA ساختار خود را حفظ می‌کند و پایدار شده است (۲۴).

تابع توزیع شعاعی (Radial distribution function) میان پروتئین ال-آسپاراژیناز و پلیمر PLA نیز بدست آمد (شکل ۸). توزیع شعاع ذره B در اطراف ذره A به طریق زیر محاسبه می‌شود:

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}$$

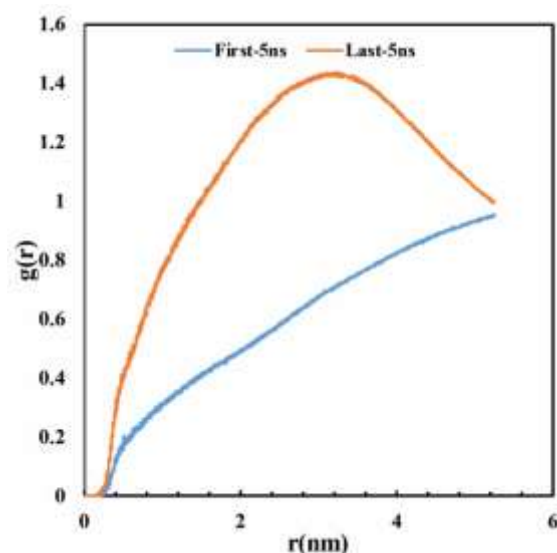
مقایسه RDF میان ۵ نانوثانیه اول و ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی حاکی از نزدیک شدن پلیمرهای PLA به پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی است. در نمودار پیک شاخصی در ناحیه ۲/۵ نانومتری مشاهده می‌شود که نشان دهنده بیشترین احتمال حضور پلیمرهای PLA در آن فاصله است. بنابراین

در این فرمول $\langle \rho_B(r) \rangle$ برابر با چگالی ذره نوع B در فاصله‌ای به شعاع r در اطراف ذره نوع A است و برابر با میانگین چگالی ذره B در بیشترین فاصله از ذره A است (r max). در این آنالیز مقدار r max برابر نصف جعبه شبیه‌سازی است.

آنالیز RDF مشخص شد که پلیمرهای PLA به طور قابل توجهی به پروتئین نزدیک و وارد برهمکنش شده‌اند. به طور کلی، نتایج نشان داد که پلیمر PLA تاثیر چندانی بر روی ساختار و دینامیک پروتئین ندارد. همچنین پلیمر PLA قادر بود برای پروتئین نقش حفاظتی بازی کند و پروتئین را پایدارتر کند. نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌تواند در اختیار محققین در رشته‌های مرتبط علم پزشکی جهت بالا بردن پتانسیل کاربردی این پلیمرها در صنعت غذایی و سیستم‌های دارورسانی قرار بگیرد. به علاوه، ما امیدواریم که نتایج این تحقیق بتواند داده‌های مفیدی را برای روشن کردن برخی از ابهامات در نتایج تجربی برهمکنش آسپاراژیناز با پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر همچون PLA فراهم کند، و بتواند دانش فعلی ما را در مورد مکانیسم‌های کپسوله کردن و برهمکنش‌های مولکولی بین پروتئین و پلیمرها را گسترش دهد.

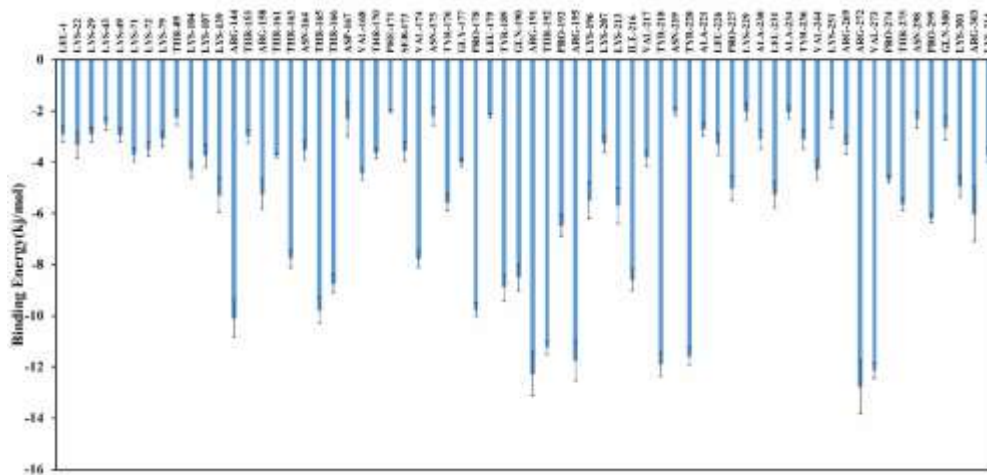
انرژی آزاد اتصال: محاسبه کل انرژی اتصال آزاد با MMPBSA از نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان می‌دهد، که کدام یک از نیروهای الکترواستاتیک، واندروالس و آبگریز در جذب پروتئین به سطح پلیمر نقش داشته‌اند (۳۴). در شکل ۹، اسیدهای آمینه با سطح انرژی کمتر از -2 KJ.mol^{-1} نشان داده شده‌اند. کمترین (بهترین) سطح انرژی برای آمینو اسید آرژنین 272 KJ.mol^{-1} ($-12/78 \text{ KJ.mol}^{-1}$) است. نتایج انرژی آزاد اتصال نشان می‌دهد با توجه به حضور گروه‌های کربوکسیلیک در روی پلیمر، آمینو اسیدهای با بار مثبت (لیزین و آرژنین) بیشترین برهم‌کنش را با پلیمر دارند. علاوه بر آمینو اسیدهای با بار مثبت، آمینو اسیدهای آب‌گریز و قطبی هم در برهم‌کنش بین پلیمر و آنزیم شرکت کردند (شکل ۹). نتایج به‌دست آمده از پارامترهای ترمودینامیک در MMPBSA نیز نشان داد که نیروهای اصلی اتصال پلیمر PLA به رشته‌های پلیمری از نوع الکترواستاتیک و واندروالس می‌باشد (شکل ۱۰).

همانطورکه از شکل ۸ هم قابل مشاهده است، می‌توان اظهار داشت که پلیمرهای PLA در ۵ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی نسبت به ۵ نانوثانیه اول به ال-آسپاراژیناز خیلی نزدیک شده‌اند.

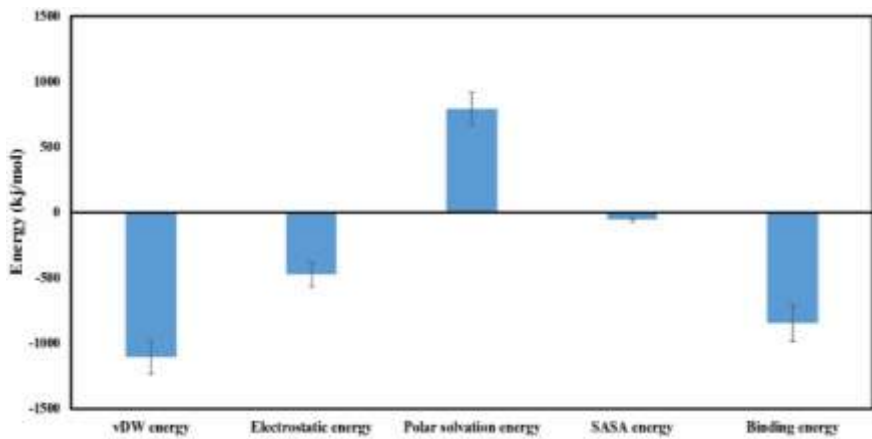


شکل ۸- نمودار تابع توزیع شعاعی ۵ نانوثانیه اول و آخر شبیه‌سازی

در این مطالعه، با استفاده از آنالیزهای صورت گرفته از جمله بررسی پایداری و تغییر ساختار پروتئین، بررسی تغییرات میزان سطح در دسترس حلال و بررسی تغییرات محتوی ساختار دوم پروتئین قبل و بعد از برهمکنش با پلیمر، شاهد عدم تغییر ساختار پروتئین و حتی پایداری بیشتر پروتئین در حضور پلیمر بودیم (۱۶ و ۲۴). با مقایسه نمودارهای حاصله از شبیه‌سازی پلیمر با ال-آسپاراژیناز، از جمله نمودارهای کاهش انحراف جذر مربع میانگین و همچنین عدم تغییر سطح در دسترس پروتئین نسبت به حالت پروتئین در آب (عدم حضور پلیمر)، شاهد پایداری هر چه بیشتر پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی خواهیم بود. هدف اصلی ما در این تحقیق، بررسی ساختار و دینامیک آنزیم آسپاراژیناز در برهمکنش با پلیمرهای PLA بود. در این تحقیق با انجام



شکل ۹- انرژی آزاد نسبت به هر آمینو اسید پرتئین



شکل ۱۰- مجموع انرژی آزاد اتصال پروتئین ال-آسپارژیناز به پلیمر

نتیجه گیری

این تحقیق نشان داد که آمینو اسیدهای لیزین و آرژنین بیشترین برهم کنش‌ها را با پلیمرها دارند همچنین آمینو اسیدهای آب گریز و قطبی در برهم کنش بین پلیمر و آنزیم شرکت کردند. نتایج نشان داد که نیروهای اصلی اتصال پلیمر PLA به آنزیم از نوع الکترواستاتیک و واندروالسی می‌باشد. در نهایت، نتایج این شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند به توضیح چگونگی محصور شدن آنزیم در حامل پلیمری در مقیاس اتمی کمک کند و اطلاعات مفیدی را در مورد ساختار و دینامیک پروتئین نشان دهد که آزمایش‌ها نمی‌توانند به راحتی آنها را ثابت کنند.

در این مطالعه با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اثر پلیمر PLA بر روی ساختار و دینامیک آنزیم ال-آسپارژیناز بررسی و مطالعه شد. نتایج این تحقیق نشان داد ساختار دوم و سوم آنزیم در حضور سیستم پلیمری در طول شبیه‌سازی کاملاً پایدار باقی می‌ماند. علاوه بر این، پلیمر PLA برای ایجاد یک تماس کامل با پروتئین خود به خود جمع می‌شود. با این حال، پروتئین در طول شبیه‌سازی به نواحی از نانوذره پلیمری متصل شده و تا آخر شبیه‌سازی متصل باقی می‌ماند.

منابع

- 1- Abu Abed, O. S., et al., 2021. PEGylated polymeric nanocapsules for oral delivery of trypsin targeted to the small intestines: *International Journal of Pharmaceutics*, 592:120094.
- 2- Andrews, J., Handler, R. A., and Blaisten-Barojas, E., 2020. Structure, energetics and thermodynamics of PLGA condensed phases from Molecular Dynamics: *Polymer*, 206 (8), 1–7.
- 3- Apolinário, A. C., et al., 2018. Challenges for the self-assembly of poly(Ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PEG-PLA) into polymersomes: Beyond the theoretical paradigms: *Nanomaterials*, 8(6): 373.
- 4- Ardalan, N., et al., 2018. Novel mutant of *Escherichia coli* asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies: *Medical Hypotheses*, 112 (1), 7–17.
- 5- Blasi, P., 2019. Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview: *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49 (4), 337–346.
- 6- Brown, L. R., 2005. Commercial challenges of protein drug delivery: *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2 (1):29–42.
- 7- Carter, P. J., 2011. Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective: *Experimental Cell Research*, 317 (9):261–1269.
- 8- Casalini, T., et al., 2019. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 (10), 1–16.
- 9- Chan, W. K., et al., 2019. Glutaminase activity of L-asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia: *Molecular Cancer Therapeutics*, 18 (9), 1587–1592.
- 10- Chand, S., Mahajan, et al., 2020. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications: *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67 (4), 619–647.
- 11- Chapman, J., Ismail, A. E., and Dinu, C. Z., 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks: *Catalysts*, 8 (6), 20–29.
- 12- Covini, D., et al., 2011, Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase: Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 7 (1), 4–13
- 13- Cruz, M. E. M., et al., 1993. Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation: *International Journal of Pharmaceutics*, 96 (1–3), 67–77.
- 14- Danhier, F., et al., 2012. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications: *Journal of Controlled Release*, 161 (2), 505–522.
- 15- De, A., and Venkatesh, D. N., 2012, Design and evaluation of liposomal delivery system for L-Asparaginase: *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (8), 112–117.
- 16- de Araújo, et al., 2021. Biophysical characterization of two commercially available preparations of the drug containing *Escherichia coli* L-Asparaginase 2: *Biophysical Chemistry*, 271 (1).
- 17- F. Hua, P. Zhou, H.-Y. Wu, G.-X. Chu, Z.-W. Xie, and G.-H. Bao, "Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoid glycosides from Lu'an GuaPian tea: molecular docking and interaction mechanism," *Food & function*, vol. 9, no. 8, pp. 4173-4183, 2018.
- 18- Hamad, K., et al., 2015. Properties and medical applications of polylactic acid: A review: *Express Polymer Letters*, 9 (5) 435–455.
- 19- Jafari, M., Doustdar, F., and Mehrnejad, F., 2019. Molecular Self-Assembly Strategy for Encapsulation of an Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptide into the Different Polymeric and Copolymeric Nanoparticles: *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59 (1), 550–563.
- 20- Jamshidian, M., et al., 2010. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (5), 552–571.
- 21- Hess, B., et al., 2008. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4 (3), 435–447.
- 22- Hess, B., et al., 1997. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations: v. 18, p. 1463–1472.

- 23- Lorenzi, P. L., et al., 2006. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells: *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (11), 2613–2623.
- 24- Lotfi-Sousefi, Z., et al., 2021. Insight into the Microcosm of the Human Growth Hormone and Its Interactions with Polymers and Copolymers: A Molecular Dynamics Perspective: *Langmuir*, 37 (1), 90–104.
- 25- Maggi, M., et al., 2015. Engineering of helicobacter pylori lasparaginase: Characterization of two functionally distinct groups of mutants e0117025: *PLoS ONE*, 10 (2), 1–15.
- 26- Manuela Gaspar, et al., 1998. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release: *Journal of Controlled Release*, 52 (1–2), 53–62.
- 27- Moradi, L., et al., 2019. Passive Enhancement of Transdermal Drug Delivery: Lipid-Based Colloidal Carriers as an Emerging Pharmaceutical Technology Platform: *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5 (1):25–40.
- 28- Muneer, F., et al., 2020. Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications: *Archives of Microbiology*, 202 (5), 967–981.
- 29- Nunes, R., et al., 2018. Biomolecular Simulations of Halogen Bonds with a GROMOS Force Field: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14 (10), 5383–5392.
- 30- Orhan, H., and Aktaş Uygun, D., 2020. Immobilization of L-Asparaginase on Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191 (4), 1432–1443.
- 31- Parrinello, M., and Rahman, A., 2012. Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method: 52 (12), 7182-7190.
- 32- Pitera, J. W., 2014. Expected distributions of root-mean-square positional deviations in proteins: *Journal of Physical Chemistry B*, 118 (24), 6526–6530.
- 33- Radadiya, A., et al., 2020. Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: *Biochemistry*, 59 (35), 3193–3200.
- 34- R. Kumari, R. Kumar, O. S. D. D. Consortium, and A. Lynn, "g_mmpbsa: A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 54, no. 7, pp. 1951–1962, 2014.
- 35- Roberts, C. J., 2014. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control: *Trends in Biotechnology*, 32(7):372-80.
- 36- Salzer, W., et al., 2018. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia: *Leukemia and Lymphoma*, 59 (8), 1797–1806.
- 37- Sargsyan, K., Grauffel, C., and Lim, C., 2017. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13 (4), 1518–1524.
- 38- Shukla, S., Ohnuma, S., and V. Ambudkar, S., 2011. Improving Cancer Chemotherapy with Modulators of ABC Drug Transporters: *Current Drug Targets*, 12 (5), 621–630.
- 39- Sauna, Z. E., et al., 2017. Recent advances in (therapeutic protein) drug development: *F1000Research*, 7(6)113.
- 40- Tabe, Y., Lorenzi, P. L., and Konopleva, M., 2019. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy: *Blood*, (13), 1014–1023.
- 41- Van Der Kamp, M. W., and Mulholland, A. J., 2013. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology: *Biochemistry*, 52 (16), 2708–2728.
- 42- Vimal, A., and Kumar, A., 2017. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33 (1), 40–61.
- 43- Wang, L., et al., 2012. Encapsulation of biomacromolecules within polymersomes by electroporation: *Angewandte Chemie - International Edition*, 51 (44), 11122–11125.
- 44- Wolf, M., et al., 2003. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres: *International Journal of Pharmaceutics*, 256 (1–2), 141–152.
- 45- Yin, L., Yuvienco, C., and Montclare, J. K., 2017. Protein based therapeutic delivery agents: Contemporary developments and challenges: *Biomaterials*, 134: 91–116.
- 46- Zielkiewicz, J., 2005, Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water: *Journal of Chemical Physics*, 123 (10).

Study of Structure and Dynamics of L-Asparaginase in the Presence of Poly (Lactic Acid) using Molecular Dynamics Simulation

Al-zuwaini S., Mehrnejad F., Mahmoodi Y., Rezayan A.H. and Barshan-tashnizi M.

Dept. of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technology, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The enzyme L-asparaginase is widely used as complementary chemotherapy and an enzymatic drug for treating many diseases. However, as a medication, L-asparaginase also faces difficulties because of the inherent nature of proteins. As a result, various natural and synthetic polymers are used to create biodegradable nanospheres and microspheres for drug delivery and release. In this study, the effect of poly (lactic acid) (PLA) on the structure and dynamics of L-asparaginase was studied using molecular dynamics (MD) simulations. The results showed that the secondary and tertiary structures of the protein in the polymer's presence did not change during the simulation time and even increased the stability of the structure and decreased the protein dynamics. This study showed that lysine and arginine actively interact with the PLA polymers. Several hydrophobic and polar amino acids interact with the polymer and the enzyme. The results showed that the main binding forces of PLA polymer to L-asparaginase are electrostatic and van der Waals interactions. The findings of this study can provide useful information to clarify some ambiguities in the experimental results for the encapsulation of the enzyme L-asparaginase and its use in the pharmaceutical industry.

Key words: L-asparaginase; Encapsulation; PLA; Molecular dynamics simulation; Self-assembly.