# 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 زیست شناسی

[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 فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۵

## چکیده

پیرازین آمید یکی از مهم ترین داروها برای کنترل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل بیماری سل) است. ژن *pncA* آنزیم پیرازین آمیداز مایکو باکتریوم توبرکلوزیس را رمزدهی می نماید. این آنزیم مسئول تبدیل داروی پیرازین آمید به شکل فعالش یعنی پیرازینوئیک اسید است. علی رغم نقش این دارو در کوتاه سازی دوره درمان از نه ماه به شش ماه، ظهور سویه های 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 سویه های مقاوم به پیرازین آمید همسانه سازی، بیان، تعیین توالی شده و تعیین فعالیت شدند. با استفاده از همولوژی مدل سازی 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 داده اند. 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 وکاهش ابعاد دهانه اتصال به سوبسترا در جایگاه فعال در جهش یافته T160P شده است.

**واژه های کلیدی**: :توبرکلوزیس، پیرازین آمیداز، مقاومت به پیرازین آمید، شبیه سازی دینامیک مولکولی

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

## مقدمه

*مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* عامل بیماری سل بوده و دستگاه تنفسی انسان را آلوده می کند. بیماری سل یک مشکل جدی برای بهداشت جهانی است و سالانه مسئول مرگ و میر هزاران نفر در سراسر دنیا می باشد. داروی مرتبه اول برای درمان بیماری سل پیرازین آمید است. این دارو *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را در مر حله نهفته از بین می برد (۸ و ۱۵). با گنجاندن پیرازین آمید در رژیم درمانی حاوی ایزونیازید و ریفامپین دوره درمان از ۹ ماه به ۶ ماه کاهش می یابد (۲۰). ظهور سویه های مقاوم به پیرازین آمید برای سلامت عمومی یک مشکل مهم محسوب می گردد. سویه های حساس با تولید آنزیم پیرازین آمیداز، پیرازین آمید را به آمونیوم و پیرازینوئیک اسید تبدیل می

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 فرآیندها می شود. همچنین پیرازین آمید می تواند نیروی محرک پروتونی و فعالیت ATP سنتاز را کاهش داده (۲۶) و اسید چرب سنتاز I (۲۷) را مهار نماید.

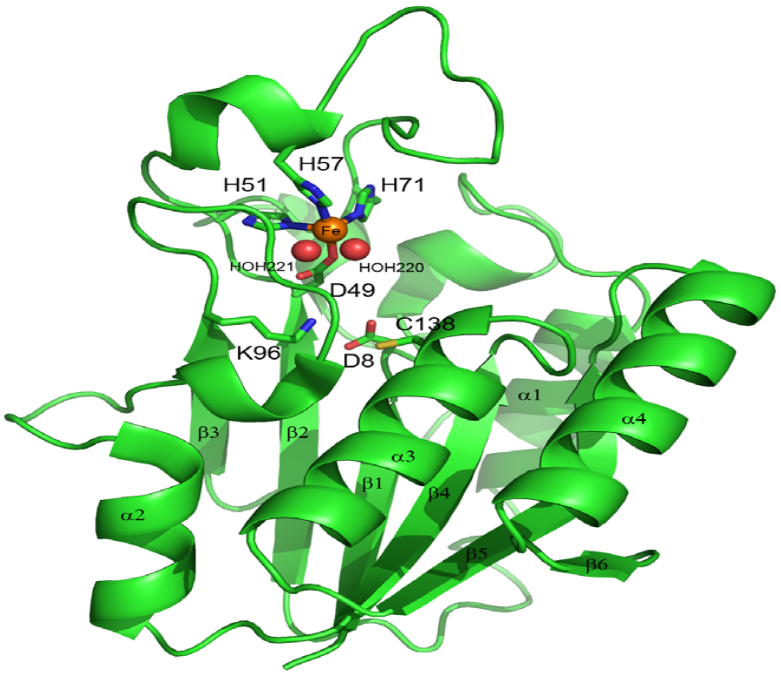
هرگونه تغییر در چرخه پیرازینوئیک اسید با جلوگیری از تجمع داخل سلولی آن و اسیدی شدن سیتوپلاسم می تواند مقاومت *مایکوباکتریوم* را تغییر دهد. فقدان فعالیت پیرازین آمیدازی به عنوان مکانیسم عمده مقاومت پیرازین آمیدی در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شناخته شده است (۷). چندین مطالعه ارتباط بین مقاومت پیرازین آمیدی 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 می کند. بنابراین فعالیت واین منفی (نبود فعالیت پیرازین آمیدازی) مقاومت پیرازین آمیدی را نشان می دهد (۱۳، ۲۱ و ۲۳). ناتوانی باکتری برای آزادسازی پیرازینوئیک اسید ممکن است به علت بیان پایین یا عدم فعالیت پیرازین آمیداز ناشی از جهش درژن *pncA* باشد (۵، ۱۴، ۲۲ و ۲۵). جهشها می توانند 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 H37Rv از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* 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 (H71, H57, H51,) می باشند. جهش در این باقیمانده‌ها و باقیمانده‌های نزدیک به این جایگاهها به شدت فعالیت پیرازین آمیدازی را تحت تأثیر قرار می دهد.

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 محدودالاثر، DNA پلیمراز 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 وجهش 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.




شکل۱- ساختار ۳ بعدی آنزیم پیرازین آمیداز. در این شکل آمینواسیدهای در گیر در جایگاه فعال و جایگاه اتصال به فلز نشان داده شده است.

**همسانه سازی ژن پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته ها:** جهت تکثیر ژن پیرازین آمیداز (وحشی و جهش یافته) ازپرایمر های رفتی(-5´ GGAATTCCATATGCGGGCGTTGATCATCGTC-3´) و برگشتی (5´-CGGAAGCTTTCAGGAACTGCAAACCAACTCG-3´) استفاده شد که به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیمهای محدودالاثر *Nde*I و *Hin*dIII هستند (نوکلئوتیدهایی که زیر آنها خط کشیده شده است، جایگاه برش آنزیمهای محدودالاثر 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 محدودالاثر، 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 *اشرشیا کلی*سویه TOP10 به روش الکتروپوراسیون انجام شد (قابل ذکر است که معمولاً برای کلون سازی از سویه های XL1 Blue، DH5á و TOP10 باکتری *اشرشیا 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 *اشرشیا کلی*سویه بیانی(DE3)BL21 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

باکتریهای القاء شده حاوی پیرازین آمیداز طبیعی و جهش یافته های آن به مدت ۱۰ دقیقه در g۱۰۰۰۰و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و رسوب باکتری به دست آمده با افزودن بافر لیزکننده (Tris-HCL ۲۰ میلی مولار، pH۷ 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 درg۲۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی، جهت آنالیز بیشتر تعیین فعالیت شده و بر روی ژلSDS-PAGE، الکتروفورز گردید (۱۱).

**سنجش فعالیت آنزیمی:** فعالیت آنزیم براساس روش واین (Wayne method) تغییر یافته تعیین گردید. در این روش ۵۰µl از محلول حاوی سوبسترا (پیرازین آمید ۴۰ میلی مولار، Tris ۱۰۰میلی مولار pH۷،۲- مرکاپتواتانول ۲میلی مولار) به ۵۰µl از هر کدام از محلولهای پروتئینی اضافه شد. بعد ازانکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰µl از$FeSO_4(NH_4)_2$ (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 3pl1 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 شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار GROMACS نسخه 4.5.4 و سیستم عامل لینوکس توزیع Ubuntu نسخه 11.10 انجام شد. شبیه سازیها 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 pH۷ 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 شبیه سازیهای 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 ۱۰آنگسترم جهت محاسبه برهمکنشها لحاظ گردید. انجام شبیه سازی در غیاب مرحله کمینه سازی انرژی منجر به ایجاد انرژی بالا و به هم ریختن ساختار می شود که این پدیده به علت اضافه شدن هیدروژن و شکستگی شبکه پیوند های هیدروژنی در آب است. برای حذف این نیروها تا یک مرحله کمینه سازی قبل از شبیه سازی انجام شد. برای جلوگیری از انحراف موقعیت پروتئین در طی شبیه سازی دینامیک مولکولی، ابتدا در طی مرحله محدودکننده مکانی ۵۰۰ پیکوثانیه ای تحت عنوان همگرد های NVT وNPT 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 می شود.

جهت آنالیز بیشتر داده ها 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.

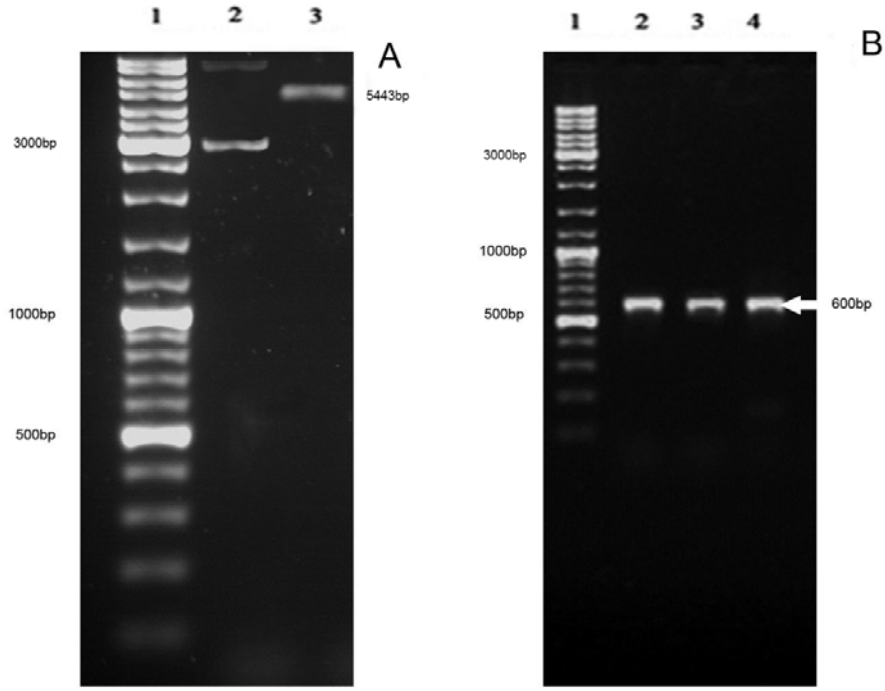
## نتایج

**همسانه 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 می دهد (شکل ۲).

ناقلهای نوترکیب حاوی ژن *pncA* نوع وحشی و جهش یافته های آن پس از استخراج توسط شرکتBioneer تعیین توالی شدند. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، 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.

**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 نوترکیب در ناحیه۲۱ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل۴A). بعد از تأیید بیان با روش الکتروفورز SDS-PAGE، عصاره سلولی با روش مبتنی بر روش واین تعیین فعالیت گردید. همان طور که در شکل۴B مشاهده می گردد آنزیم طبیعی دارای فعالیت بوده اما آنزیمهای جهش یافته فعالیت ندارند (شکل A,B ۴).

**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.




شکل۲- A – نتیجه الکتروفورز(+)pET-21aبرش یافته توسّط آنزیمهایIII*Hind*و I*Nde*. ۱، اندازه نمای DNA، ۲، وکتور (+)pET-21a قبل از برش، ۳، وکتور (+)pET-21a بعد از برشB: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR. ۱، مارکر DNA، ۲، ژن pncA نوع وحشی، ۳، جهش یافته D63G/W119C، ۴، جهش یافته T160P.

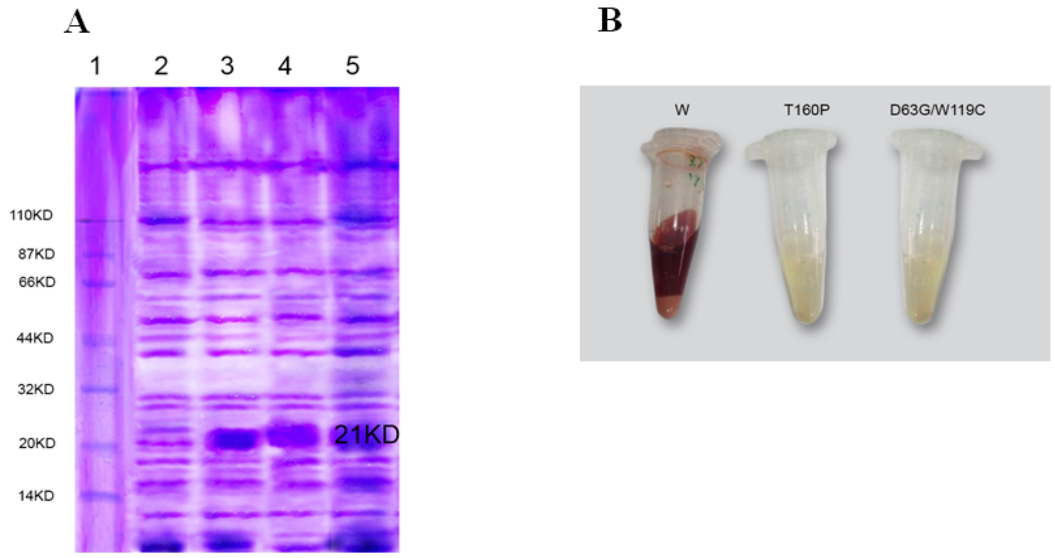
```
wild        MRALIIVDVQNDFCEGGSLAVTGGAALARAISDYLAEAADYHHVVATKDF 50
T160P       MRALIIVDVQNDFCEGGSLAVTGGAALARAISDYLAEAADYHHVVATKDF 50
D63G/W119C  MRALIIVDVQNDFCEGGSLAVTGGAALARAISDYLAEAADYHHVVATKDF 50
            **************************************************

wild        HIDPGDHFSGTPDYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
T160P       HIDPGDHFSGTPDYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
D63G/W119C  HIDPGDHFSGTPGYSSSWPPHCVSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYT 100
            **************************************************

wild        GAYSGFEGVDENGTPLLNWLRQRGVDEVDVVGIATDHCVRQTAEDAVRNG 150
T160P       GAYSGFEGVDENGTPLLNWLRQRGVDEVDVVGIATDHCVRQTAEDAVRNG 150
D63G/W119C  GAYSGFEGVDENGTPLLNCLRQRGVDEVDVVGIATDHCVRQTAEDAVRNG 150
            **************************************************

wild        LATRVLVDLTAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
T160P       LATRVLVDLPAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
D63G/W119C  LATRVLVDLTAGVSADTTVAALEEMRTASVELVCSS 186
            ************************************
```

شکل۳- تطبیق توالی آمینواسیدی پیرازین آمیدازهای نوع وحشی و جهش یافته: تغییرات آمینواسیدی داخل کادر نشان داده شده اند.




شکل۴- بررسی بیان و فعالیت آنزیم با الکتروفورز ژل SDS-PAGE و تست مبتنی بر واین: جهت بررسی بیان و فعالیت پیرازین‌آمیدازهای 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-PAGEحاصل از بیان پیرازین آمیدازهای نوع وحشی و جهش یافته در باکتری *Ecoli* 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 یافتهD63G/W119C و جهش یافته T160P را نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود، جهش یافته ها فعالیت ندارند.

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 در تشکیل ساختار های 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 D163G/W119C ۶ درصد کاهش یافته و در T160P مقدار صفحه بتا کاهش یافته است. بنابراین ساختارهای دوم

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 ساختار های 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 ساختار های 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 می‌شود، در نوع وحشی و انواع جهش یافته از نظر نوع و محل ساختار های 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.

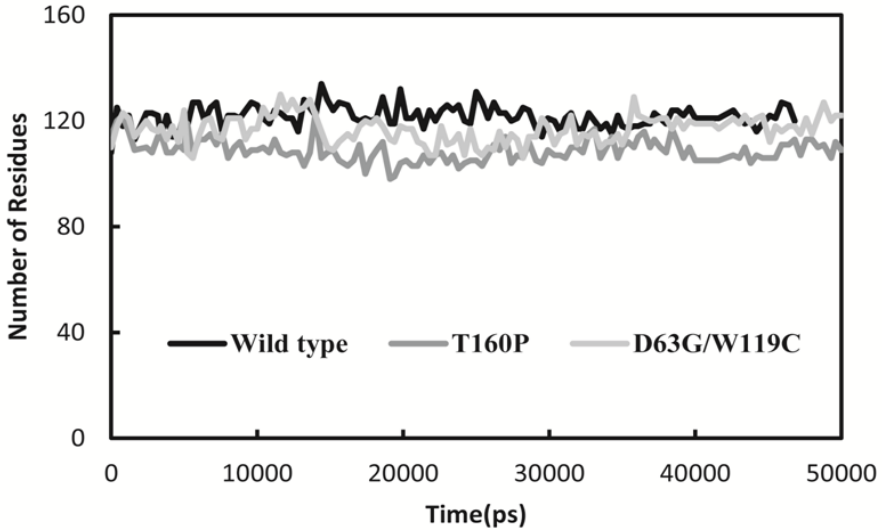
برای بررسی ساختار سوم انواع جهش یافته در ابتدا فاصله جهشها از جایگاه فعال آنزیم مطالعه شد که در جدول ۲ گزارش شده است. بر طبق محاسبات مشخص شد که هیچ کدام از جهشهای ایجاد شده به طور مستقیم در منطقه جایگاه فعال قرار ندارند. کمترین و بیشترین فاصله از جایگاه فعال به ترتیب مربوط به آمینواسیدهای سیستئین ۱۱۹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

جدول۱- سهم ساختارهای دوم مختلف در ساختار پروتئین در طول شبیه سازی

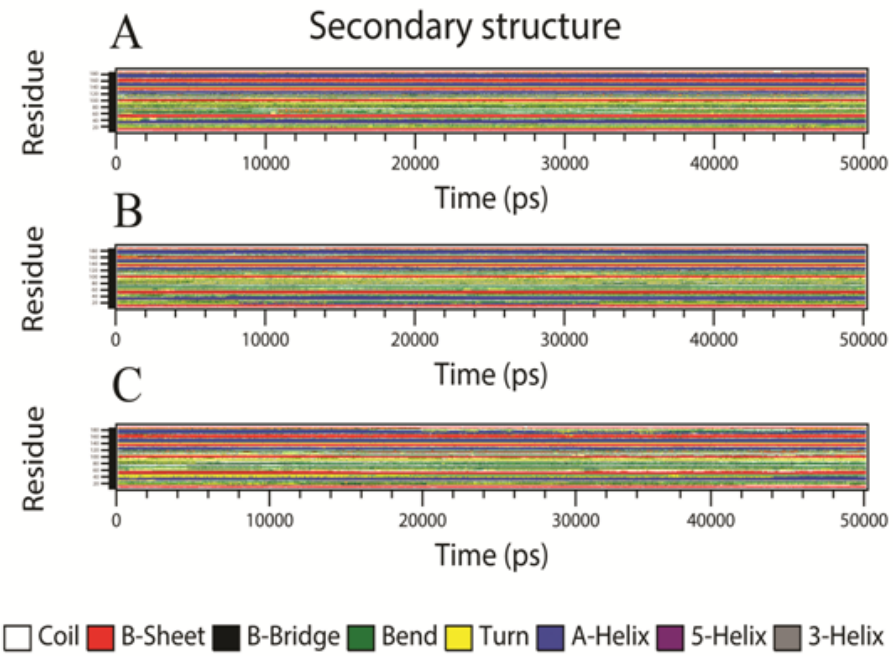
| Enzymes | Total | Coil | β-bridge | β-sheet | Bend | Turn | α-helix | 5- helix |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wild type** | 0.66 | 0.19 | 0.04 | 0.23 | 0.14 | 0.19 | 0.23 | 0.00 |
| **D63G/W119C** | 0.63 | 0.23 | 0.05 | 0.22 | 0.18 | 0.14 | 0.17 | 0.00 |
| **T160P** | 0.59 | 0.23 | 0.04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

جدول۲- فاصله آمینواسیدهای جهش یافته از جایگاه فعال آنزیم

| **Mutant** | **T160P** | **D63G/W119C** | |
|---|---|---|---|
| **Residue** | Pro 160 | Gly 63 | Cys 119 |
| **\|d\|** | 0.6376 | 1.9697 | 0.6268 |




شکل۵- 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)




شکل۶- ساختار به دست آمده از برنامه DSSP

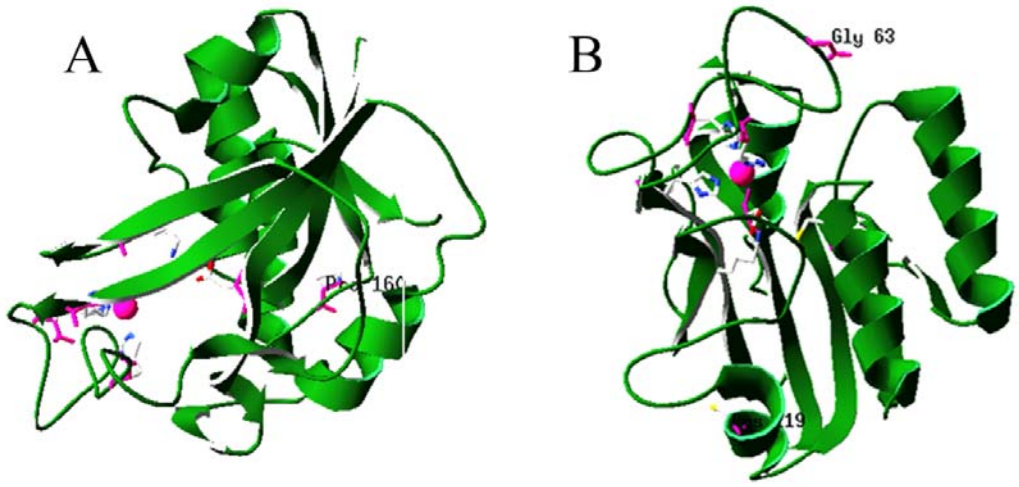
جایگاه هر کدام از جهشها در ساختار سوم جهش یافته ها در شکل ۷ آمده است. یکی از شاخصهای مناسب برای بررسی میزان تغییرات کلی ساختار پروتئین مطالعه پارامتری به نام جذر مربع میانگین تغییرات است. این آنالیز می تواند به عنوان یک معیار برای میزان تغییرات در ساختار پروتئین با توجه به شرایط اعمال شده در طی شبیه سازی 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

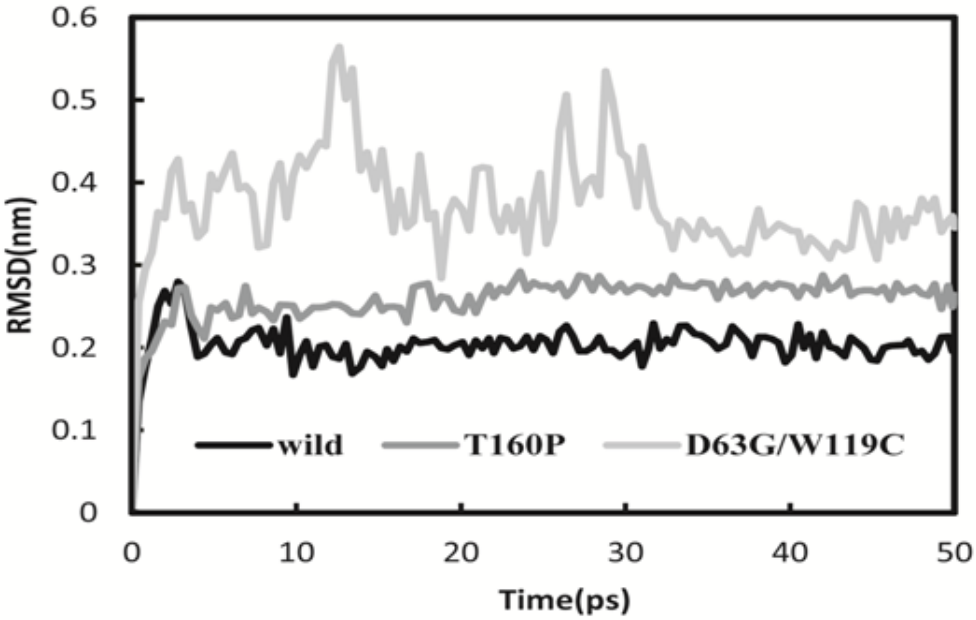
۲- مقایسه تغییرات هر پروتئین جهش یافته با نوع وحشی در طول زمان

به این منظور RMSD (Root mean square deviation) اتمهای کربن آلفای پروتئینها به عنوان تابعی از زمان شبیه سازی محاسبه شدند. همان طوری که در شکل ۸ نشان داده شده است، RMSD نوع وحشی در تمام طول شبیه سازی دارای مقادیر تقریباً ثابتی است. همچنین میانگین تغییرات در طی شبیه سازی برای آنزیم وحشی و انواع جهش یافته به دست آمد (جدول۳). طبق این نتایج بیشترین میزان تغییرات RMSD مربوط به D63G/W119C می باشد.

با شناسایی آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال، تغییر یا ثبات در فاصله بین آمینواسیدها نسبت به یکدیگر در طول شبیه سازی به عنوان شاهدی برای تغییر یا ثبات ساختار سه بعدی جایگاه فعال در نظر گرفته می شود. نتایج حاصل از محاسبه (شکل ۹) نشان می دهد که فاصله این سه آمینواسید در پروتئین نوع وحشی در طول شبیه سازی تقریبا ثابت مانده است. در ارتباط با جهش یافته ها می توان گفت که فاصله دو آمینواسید لیزین ۹۶ و سیستین ۱۳۸ در هر دو جهش یافته مقداری تقریبا 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 و سیستین ۱۳۸ همراه است.




شکل۷- موقعیت آمینواسیدهای جهش یافته در ساختار پروتئینهای جهش یافته (D63G/W119C:B ،T160P:A)



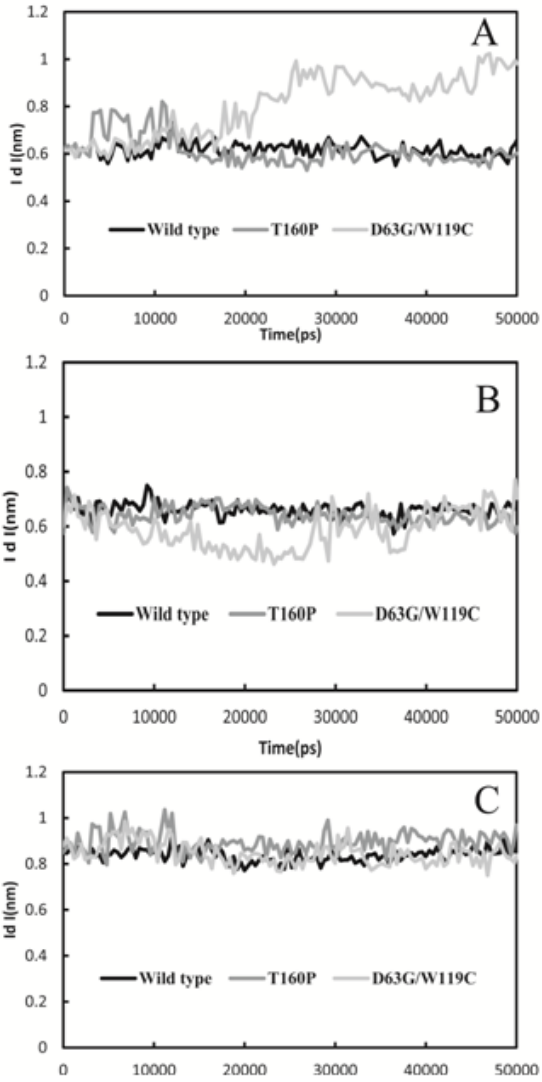

شکل۸- نتایج مربوط به RMSD پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته

جدول۳- میانگین مقادیر RMSD پروتئین نوع وحشی و انواع جهش یافته

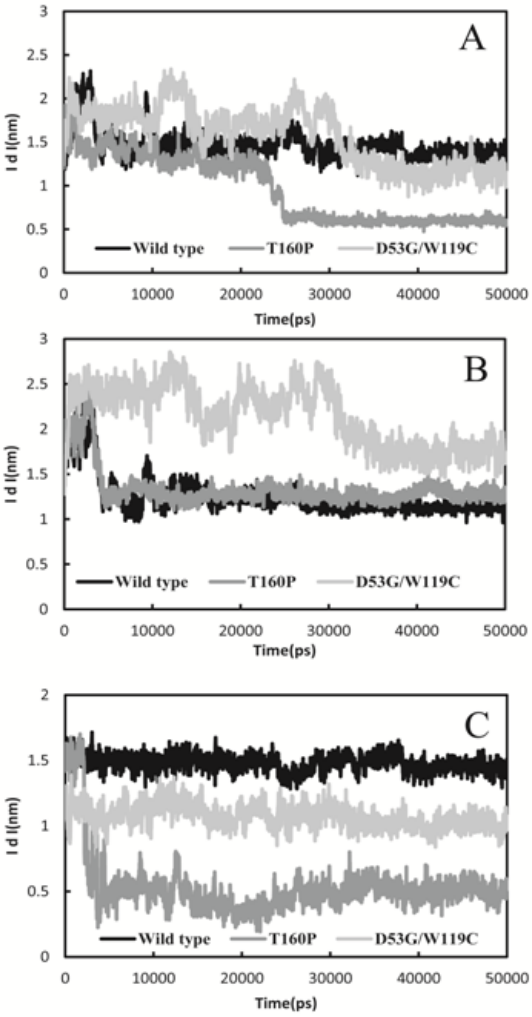
| Enzymes | Wild type | T160P | D63G/W119C |
|---|---|---|---|
| **Average of RMSD** | 0.20456 | 0.26077 | 0.3845 |

ویژگیهای (شکل، بار الکتروستاتیکی)دهانه پاکت اتصال آنزیم به سوبسترا در کنار ویژگیهای دیگر تعیین کننده اختصاصیت و کارآیی 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، آلانین ۱۰۲ و گلوتامیک اسید ۱۳۶ مورد مطالعه قرارگرفت. 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 سوبسترا در

طول شبیه سازی می باشد. همان طوری که در شکل ۱۰ مشاهده می شود، کاهش شدیدی در فاصله آمینواسیدهای ۷۶ و ۱۰۲ و همچنین فاصله بین آمینواسیدهای ۱۰۲ و ۱۳۶ در جهش یافته T160P مشاهده می شود. 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.




شکل۹- فاصله بین آمینواسیدهای جایگاه فعال : A: Asp8 و Lys96، B: Asp8 و Cys138، C: Lys96 و Cys138 در طول شبیه سازی




شکل ۱۰- فاصله بین آمینواسید های دهانه پاکت اتصال. A:Ser67 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 می تواند دلایل متفاوتی همچون تغییر در آمینواسیدهای جایگاه فعال و یا تغییر ساختار سه بعدی داشته 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 می تواند در اثر

تغییرات ساختاری باشد. برای بررسی جزئیات بیشتر ساختاری در مورد تأثیر جهشها برروی ساختار پروتئینها می توان 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 می تواند 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 می شود 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 در گیر در جایگاه فعال نشان می دهد 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 می دهد که در این جهش یافته نسبت به نوع وحشی آلفا هلیکس افزایش اما صفحات بتا کاهش یافته است. نتایج RMSD نیز نشان می دهد 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 نمی دهد اما بررسی فواصل دهانه جایگاه اتصال به سوبسترا (جایگاه فعال) حاکی از کوتاه شدن این فواصل است. در نتیجه می توان 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 احتمالا باعث تنگ تر شدن دهانه جایگاه اتصال به سوبسترادر 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 می توان گفت در دو جهش یافته مورد بحث در این تحقیق از طریق مکانیسمهای متفاوتی غیر فعال شدن آنزیم و درنتیجه مقاومت به داروی پیرازین آمید در *باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* 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.

## منابع

۱- خیرآبادی. م.، گوهله، ا.، حسین خانی، س.، هاینمن، ا.، نادری منش، ح.، ۱۳۹۲. تهیه کریستال لوسیفراز جهش یافته گونه Lampyris turkestanicus و بررسی اولیه پراشهای حاصل از آن. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، جلد ۲۶: ۱۷۴-۱۸۵

۲- گنجعلی خانی. م.، رنجبر، م.، ۱۳۹۱. مطالعه دینامیک مولکولی و حرکات عملکردی آنزیم لیپازA 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 smegmatispyrazinamidase 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 LungDis., 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 pyrazinamidasePncA. 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 multidrugresistant 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 ofpyrazinamidase 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

tuberculosiseatest 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. AntimicrobChemother., 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 tuberculosises* 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