

## مطالعه دینامیک مولکولی و حرکات عملکردی آنزیم لیپاز A از گونه باسیلوس سوبتیلیس

محمدرضا گنجعلی خانی و بیژن رنجبر\*

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۲۲

### چکیده

آنزیم لیپاز باسیلوس سوبتیلیس یکی از کوچک‌ترین پروتئین‌های متعلق به خانواده  $\alpha/\beta$  هیدرولازها می‌باشد. این آنزیم بر خلاف همه لیپازها خاصیت فعال‌سازی سطحی را از خود نشان نمی‌دهد ولی همانند دیگر لیپازها کاربردهای فراوانی در زمینه‌های صنعتی، دارویی، صنایع غذایی و زیست‌محیطی دارا می‌باشد. تعدادی گزارش از تولید این لیپاز مهندسی شده ارائه شده که اساس طراحی در آن به صورت جهش‌های تصادفی می‌باشد. لذا مطالعه دینامیک مولکولی این آنزیم در دماهای مختلف برای بررسی خصوصیات دینامیکی آن ضروری به نظر می‌رسد. شناسایی این حرکات مولکولی برای تغییر در روش طراحی از تصادفی به طراحی منطقی آنزیم بسیار موثر می‌باشند. بر اساس مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این آنزیم در مدت ۱۵ نانوثانیه، حرکات مولکولی در لوپ‌های دوطرف جایگاه فعال مشاهده گردید که میزان آن در دماهای مختلف با هم متفاوت بودند. از سوی دیگر دو لوپ کلیدی که در ایجاد حرکات عملکردی نقش دارند در طرف دیگر آنزیم شناسایی شدند که دارای نقش لولا در محور حرکتی اجزای ساختاری دوم در اطراف جایگاه فعال می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: لیپاز، باسیلوس سوبتیلیس لیپاز، حرکات عملکردی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۴۱۸، پست الکترونیکی: ranjbarb@modares.ac.ir

### مقدمه

مقیاس‌های صنعتی اقتصادی به نظر می‌رسد. از کاربردهای دیگر لیپاز در تولید بیودیزل‌ها به عنوان سوخت‌های پاک و تجدیدپذیر می‌توان نام برد. تولید ترکیبات شیمیایی خالص یکی دیگر از کاربردهای این آنزیم است که علاوه بر خلوص، نوع ساختار فضایی نیز در آن مهم می‌باشد و این ترکیبات معمولاً در تولید داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از کاربردهای دیگر می‌توان به تولید انواع ترکیبات غذایی فرآوری شده و استفاده این آنزیم در ترکیبات شوینده نیز اشاره نمود (۲، ۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸)

آنزیم لیپاز باسیلوس سوبتیلیس از باکتری باسیلوس سوبتیلیس به دست آمده که یک باکتری گرم مثبت هوازی می‌باشد و در آب و خاک به راحتی مشاهده می‌شود. این باکتری لیپاز ترشحی تولید می‌نماید که دارای هر دو

آنزیم لیپاز (EC 3.1.1.3) قابلیت شکستن پیوندهای استری کربوکسیلی در چربی‌های تری‌گلیسرید را به عهده دارد و این ترکیبات را به اسیدهای چرب سازنده تبدیل می‌نماید. این آنزیم توانایی انجام واکنش سنتزی استرها را نیز دارا می‌باشد. لیپازها دارای قابلیت‌های دیگری از جمله تجزیه آمینها، الکله‌ها، اسیدها می‌باشند (۴).

لیپازها یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در زمینه‌های متنوع زیست‌فناوری هستند که از این جمله می‌توان به کاربرد آنها در زمینه‌های صنایع غذایی، صنعتی، دارویی و مصارف خانگی اشاره نمود. یکی از قابلیت‌های این آنزیم در تولید بیوپلیمرهای جدیدی می‌باشد که به دلیل پیچیدگی ساختار منومری آنها، روش‌های تولید صنعتی مقرون به صرفه نبوده ولی در عوض استفاده از انواع لیپازها برای تولید در

در سطح اتمی در شرایط طبیعی برای محققین فراهم سازد. از سوی دیگر درک حرکات عملکردی در مولکول، در طراحی و مهندسی پروتئین نقش به‌سزایی ایفاء می‌نماید (۳، ۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۹، ۲۳ و ۲۷).

لیپازها به دلیل گستردگی و کاربردهای فراوان بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به مطالعه حرکات مولکولی و دینامیک ساختاری بسیاری از لیپازها با استفاده از تکنیک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اشاره کرد. به طور مثال مطالعات زیادی بر روی خصوصیات ساختاری و عملکردی آنزیم *Candida antarctica* Lipase صورت گرفته است؛ انتخاب نوع آنانتیومر فضایی در سوبسترا در این آنزیم (۲۰ و ۲۸) و همچنین اثر دما بر این فرآیند با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی گردید (۲۵). از جمله دیگر مطالعات بر آنزیم ذکر شده می‌توان به بررسی انعطاف‌پذیری ساختار در حلالهای مختلف (۳۱)، حرکات مولکولی در دریاچه جایگاه فعال و همچنین انعطاف‌پذیری آن با استفاده از این تکنیک اشاره نمود (۱۰ و ۳۰). مطالعات مشابهی بر روی آنزیم لیپاز گونه *Burkholderia cepacia* انجام گرفت؛ به طور مثال نوع انتخابگری این آنزیم برای الکلهای نوع دوم (۲۲)، حرکات مولکولی دریاچه جایگاه فعال در حلالهای مختلف (۵) و (۳۲) با استفاده از دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات دیگری نیز بر روی آنزیمهای لیپاز متعدد به منظور بررسی حرکات عملکردی انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به لیپاز *Geobacillus zalihae* T1 (۳۴)، *Candida rugosa* و *Rhizomucor miehei* و *Thermomyces lanuginose* اشاره نمود (۲۹).

از مهم‌ترین کاربردهای مطالعه دینامیک مولکولی پروتئینها می‌توان به هرچه بهتر طراحی کردن آنزیمهای نو ترکیب و مهندسی شده اشاره نمود. از آنجایی که بررسی وقایع در سطح مولکولی به وسیله تکنیکهای عملی و آزمایشگاهی بسیار پیچیده، پرهزینه و عمدتاً غیرقابل انجام می‌باشد لذا

قابلیت تجزیه و سنتز تری‌اسیل‌گلیسرولها می‌باشد. این آنزیم همچنین به دلیل ساختمان بسیار کوچک خود (۱۹ kDa) و اختصاصی بودن بالا در انتخاب ساختارهای آنانتیومری بسیار مورد توجه قرار گرفته و در صنعت کاربردهای فراوانی دارد. آنزیم لیپاز باسیلوس سوبتیلیس از ژن *lipA* به دست آمده که دارای ۱۸۱ اسیدآمینو می‌باشد (آنزیم باسیلوس سوبتیلیس A) که به اختصار BsLA خوانده می‌شود. این آنزیم جزء معدود لیپازهایی است که خاصیت فعال‌سازی سطحی در تماس با سطح آب و روغن ندارند و همچنین دارای مقاومت زیادی در مقابل تغییرات pH می‌باشد به طوری که در pH قلیایی (حدود ۱۰) دارای فعالیت بهینه می‌باشد (۳۳).

آنزیم BsLA یک ساختار کروی در ابعاد  $35 \times 35 \times 42$  آنگستروم دارد که از یک دومین فشرده شامل شش روبان بتای موازی تشکیل شده است که این روبانها به وسیله مارپیچهای آلفا احاطه شده‌اند. تاخوردگی این آنزیم نیز مانند دیگر لیپازها از نوع  $\alpha/\beta$  هیدرولاز می‌باشد. به دلیل اندازه کوچک و عدم وجود دهانه جایگاه فعال، این آنزیم به عنوان کوچکترین آنزیم از خانواده  $\alpha/\beta$  هیدرولازها محسوب می‌شود.

جایگاه فعال این آنزیم همانند دیگر آنزیمهای لیپاز از فرم کلاسیک سه تایی پیروی می‌نماید. در لیپازها سه اسیدآمینو کلیدی Ser، Asp/Glu و His به عنوان جایگاه فعال عمل می‌کنند. در این آنزیم Ser ۷۷ به عنوان عامل نوکلئوفیل، Asp ۱۳۳ به عنوان عامل اسیدی و His ۱۵۶ به عنوان جایگاه کاتالیتیک عمل می‌نمایند (۳۳).

مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیمها یکی از روشهای مفید و مؤثر در شناسایی خصوصیات ساختاری و عملکردی آنزیمها می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان از نحوه عملکرد آنزیم در دماهای مختلف و یا انواع حلالها اطلاعات مفیدی استخراج نمود. اطلاعات به دست آمده از این روش می‌تواند دید مناسبی نسبت به مولکول مورد نظر

در ساختار ایجاد و سپس بار سطحی ساختار با افزودن چند یون سدیم خنثی گردید. پروتئین در لابه‌ای از مولکولهای آب TIP3P به ضخامت ۱۰ آنگستروم به حالت مرزهای متناوب با استفاده از نرم افزار xLEaP قرار گرفت. کاهش انرژی بر روی ساختار با ۲۵۰۰ گام، ۱۰۰۰ گام به روش Steepest descent و ۱۵۰۰ گام به روش conjugate gradient انجام شد.

دینامیک مولکولی در سه مرحله صورت گرفت، بدین صورت که در مرحله اول به مدت ۱۵۰ پیکوثانیه در شرایط حجم ثابت دما از صفر کلویین تا دمای اتاق از طریق روش لانگوین بالا برده شد. در مرحله دوم در فشار ثابت به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه سیستم به حالت تعادل رسانده شد. در مرحله سوم شبیه سازی دینامیک مولکولی در فشار ثابت به مدت ۱۵ نانو ثانیه در دمای ۵، ۳۵ و ۶۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. میانکنشهای غیرپیوندی با فاصله ۱۰ Å به روش PME محاسبه گردید (۹) و دما در سامانه مدل شده با روش دینامیک لانگوین با فرکانس برخوردی  $2 \text{ ps}^{-1}$  تنظیم شد (۲۱). برای افزایش سرعت محاسبات از الگوریتم SHAKE برای محدود کردن پیوندهای درگیر در اتم هیدروژن استفاده گردید (۷).

نتایج شبیه سازی در نرم افزار AMBER tools 1.4 بعد از بررسی دما، فشار و پارامترهای انرژیکی شبیه سازی مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج به صورت ریشه میانگین مجذور انحرافها (RMSD)، ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF)، شعاع ژیراسیون ( $R_{\text{gyr}}$ ) مورد بررسی قرار گرفت. نوسانات دو لوپ ۱۵-۱۰ و ۱۳۷-۱۳۱ به عنوان معیاری از حرکات عملکردی آنزیم در دماهای مختلف در طول زمان شبیه سازی مورد استفاده قرار گرفت. تابع توزیع شعاعی مولکولهای آب و همچنین انرژی ساختار نیز محاسبه گردید. پارامترهای ترمودینامیکی ساختار با استفاده از نرم افزار MMPBSA موجود در AMBER tools 1.4 محاسبه شد. در این روش با استفاده از تقریب تعمیم یافته بورن

یک محقق با در دست داشتن دینامیک و حرکات عملکردی در آنزیم، توانایی طراحی هدفمند و دقیق تر را به دست خواهد آورد.

تا امروز تعدادی گزارش در مورد دستوری آنزیم لپیز باسیلوس سوبتیلیس A وجود دارد. تغییرات مطلوب اعمال شده عمدتاً با استفاده از روشهای تصادفی به دست آمده است؛ به طور مثال در یکی از آنها از کتابخانه ژنی آنزیم با روش رونمایی فاژی برای جداسازی آنزیم جدید که قابلیت عملکرد بر آنانتیومر فضایی متفاوت دارد استفاده گردید (۸) و در مطالعه دیگر برای افزایش پایداری آنزیم از روشهای جهش تصادفی برای بالا بردن پایداری حرارتی استفاده شد (۱). تنها روش مبتنی بر مطالعات و محاسبات رایانه ای بر روی آنزیم BsLA برای بررسی انتخابگری فضایی این آنزیم بر روی ترکیب آنانتیومری کتوبروفن مورد استفاده قرار گرفت (۲۴).

علی رغم کاربردهای زیاد شبیه سازی دینامیک مولکولی در مهندسی پروتئین در لپیزها، هنوز هیچ مطالعه مشابهی بر روی این آنزیم صورت نگرفته است. لذا بررسی خصوصیات دینامیک ساختاری در این آنزیم در دماهای مختلف می‌تواند دریچه ای جدید برای طراحی آنزیم BsLA با خصوصیات متفاوت فراهم سازد.

## مواد و روشها

ساختار بلور آنزیم از پایگاه ذخیره اطلاعات PDB با کد 1ISP (تفکیک ۱/۳ آنگستروم) به دست آمد و بعد از بررسی به عنوان ساختار اولیه جهت شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات ساختار با استفاده از نرم افزارهای Swiss-PDB viewer 4.0.1 و Pymol 1.3 انجام شد (۲۶).

شبیه سازی دینامیک مولکولی بر روی ساختار به وسیله نرم افزار AMBER 10.0 (۶) و به وسیله میدان نیروی ff99SB انجام شد (۱۳). وضعیت صحیح هیدروژن هیستیدین ۱۵۶

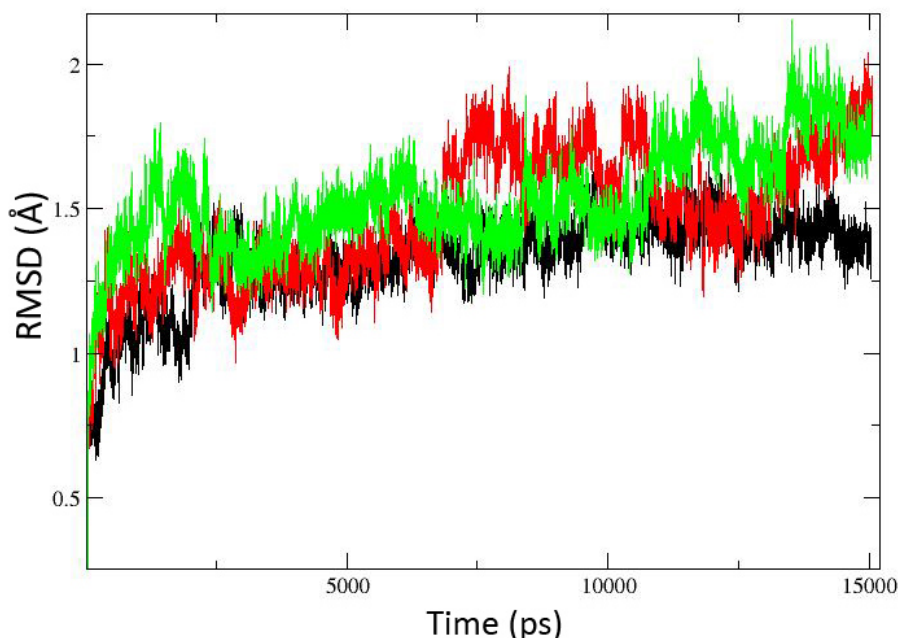
شده محاسبه گردیدند. اطلاعات مربوط به نقشه دویعدی ساختار آنزیم از پایگاه BPBsum استخراج گردید.

در شکل ۱ RMSD کربن آلفا مربوط به آنزیم BsLA در سه دمای ۵، ۳۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. میزان RMSD با افزایش دما به میزان اندکی افزایش می‌یابد. میانگین RMSD در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد از ۱/۲۵ انگستروم به ۱/۵ در دو دمای ۳۵ و ۶۰ درجه افزایش یافته است.

میزان انرژی ساختار محاسبه گردید و همچنین مقدار آنتروپی از روش تقریب شبه هارمونیک محاسبه و در مقدار نهایی انرژی آزاد لحاظ گردید.

## نتایج

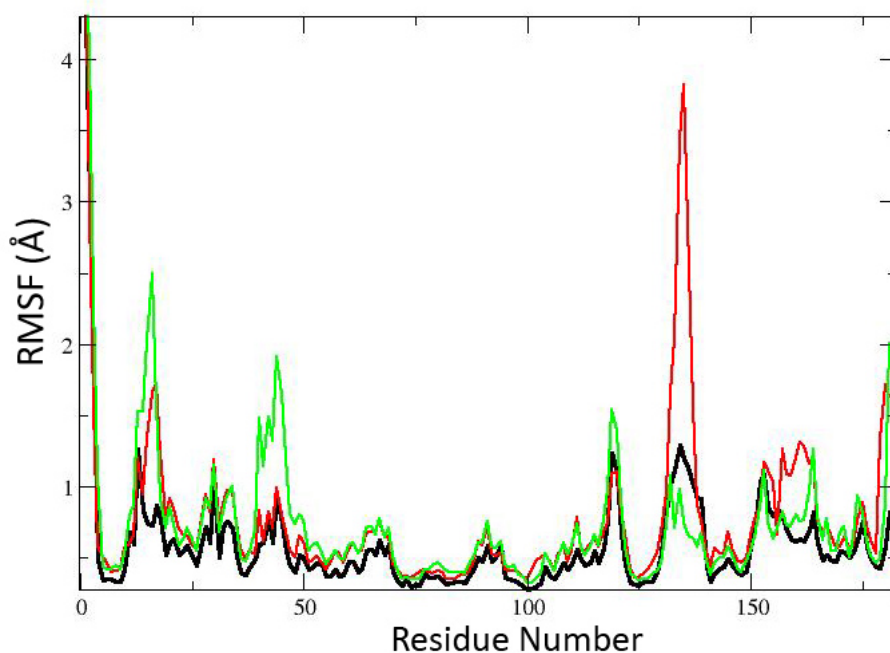
نتایج به دست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم BsLA در مدت ۱۵ نانوثانیه در دماهای مختلف شامل RMSD، RMSF و  $R_{gyr}$  می‌باشد. پارامترهای ترمودینامیکی ساختار نیز با توجه به شبیه‌سازی‌های انجام



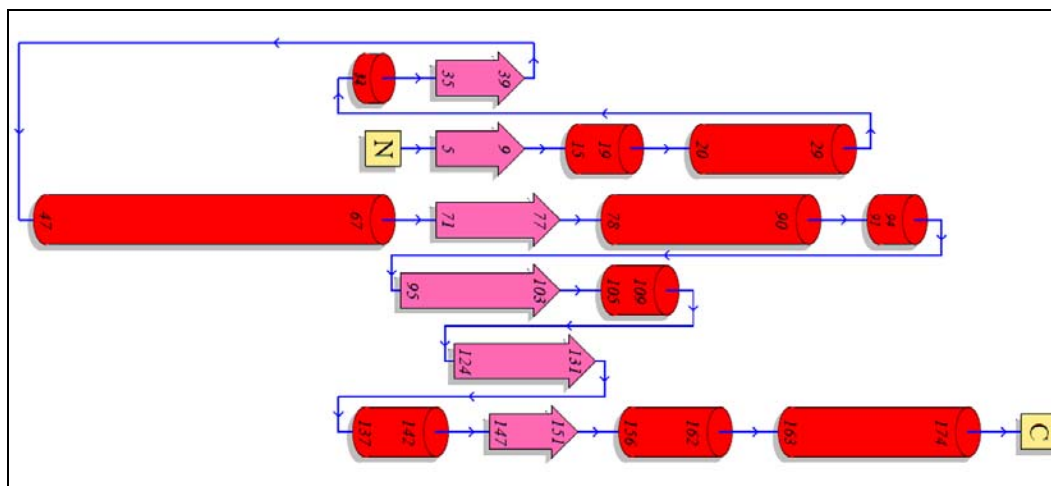
شکل ۱- ریشه میانگین مجذور انحراف کربن آلفا در آنزیم BsLA در سه دمای ۵ (خط مشکی)، ۳۵ (خط قرمز) و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (خط سبز)

مارپیچ آلفا و همچنین دومین روبان بتا به چهارمین مارپیچ آلفا می‌باشند. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نوسان قابل توجهی در اسیدآمین‌های ۱۳۷-۱۳۱ مشاهده گردید که یک لوپ حاوی یک دور بتای متصل‌کننده روبان بتای پنجم به مارپیچ آلفای هفتم می‌باشد. لازم به ذکر است که این لوپ نیز لبه مقابل جایگاه فعال را نسبت به دو لوپ ذکر شده ایجاد می‌نماید.

شکل ۲ نشان‌دهنده ریشه میانگین مجذور نوسانات کربن آلفا برای هر باقی‌مانده در آنزیم می‌باشد. با افزایش دما میزان RMSF به طور میانگین در ساختار افزایش یافته است که این افزایش نوسانات در ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دو لوپ در اسیدآمین‌های ۱۵-۱۰ و اسیدآمین‌های ۴۶-۴۰ مشاهده شد. این دو لوپ در لبه مقابل جایگاه فعال واقع شده اند که به ترتیب متصل‌کننده اولین روبان بتا به اولین



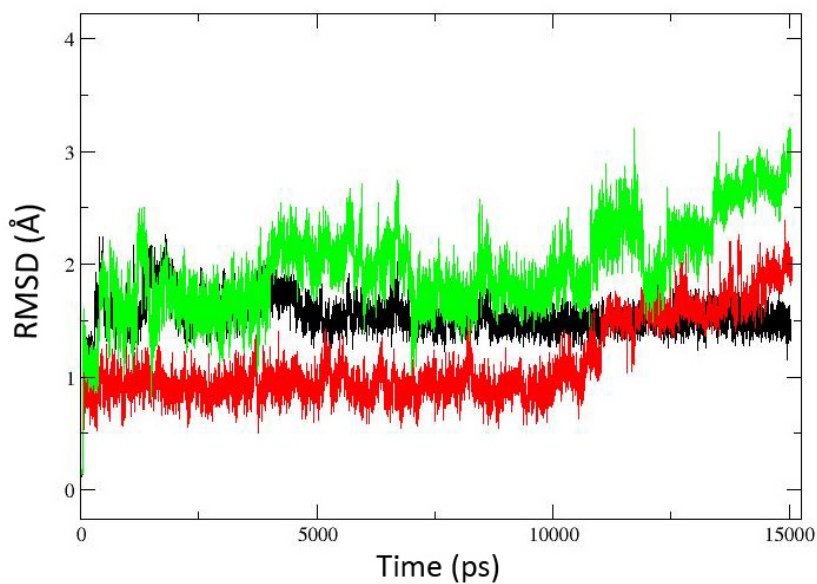
شکل ۲- ریشه مجذور میانگین نوسانات کربن آلفا آنزیم BsLA در سه دمای ۵ (خط مشکی)، ۳۵ (خط قرمز) و ۶۰ درجه سانتی گراد (خط سبز) شکل ۳ نقشه ساختمان دوم آنزیم BsLA را نشان می‌دهد. شماره گذاری از انتهای آمین به کربوکسیل انجام گرفته در این شکل ماریپچ های آلفا به صورت استوانه‌ای و رویانهای بتا به صورت فلش مانند مشخص شده‌اند. جهت



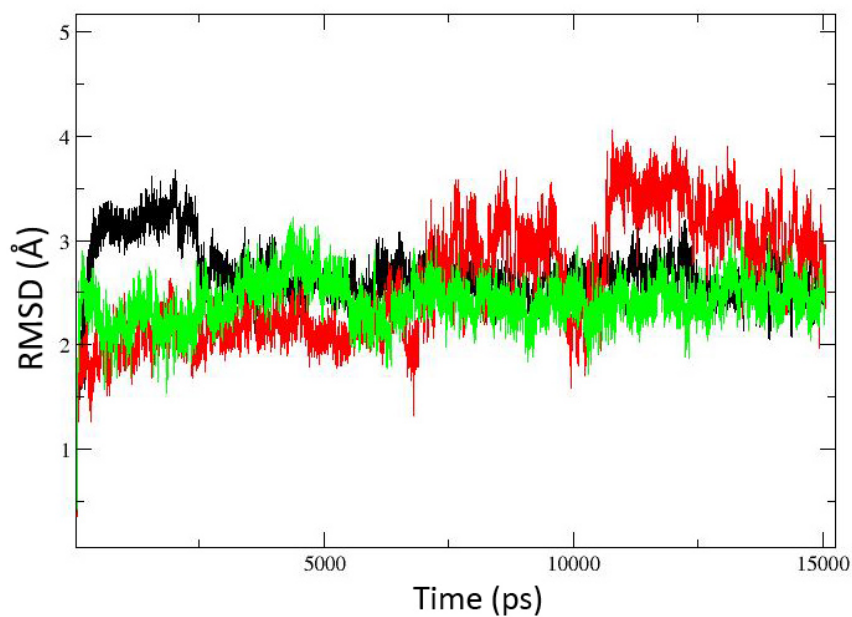
شکل ۳- نقشه دوبعدی ساختار دوم در آنزیم BsLA

دمای ذکر شده از کل ساختار جدا شده و مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ نشان دهنده RMSD اسید آمینه های ۱۰-۱۵ و شکل ۵ نشان دهنده RMSD اسید آمینه های ۱۳۱-۱۳۷ در مدت ۱۵ نانوثانیه می باشد.

شکل‌های ۴ و ۵ نشان دهنده جنبشها و نوسانات دو بخش کلیدی ساختار هستند که شامل دو لوپ واقع شده در دو لبه جایگاه فعال می باشند. به منظور بررسی بیشتر این دو بخش، RMSD اسید آمینه‌های ۱۰-۱۵ و ۱۳۱-۱۳۷ در سه



شکل ۴- RMSD اسیدآمین‌ها در ۱۵-۱۰ نانوثانیه بر حسب آنگستروم در سه دمای ۵ (خط مشکی)، ۳۵ (خط قرمز) و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (خط سبز)



شکل ۵- RMSD اسیدآمین‌ها در ۱۳۷-۱۳۱ نانوثانیه بر حسب آنگستروم در سه دمای ۵ (خط مشکی)، ۳۵ (خط قرمز) و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (خط سبز)

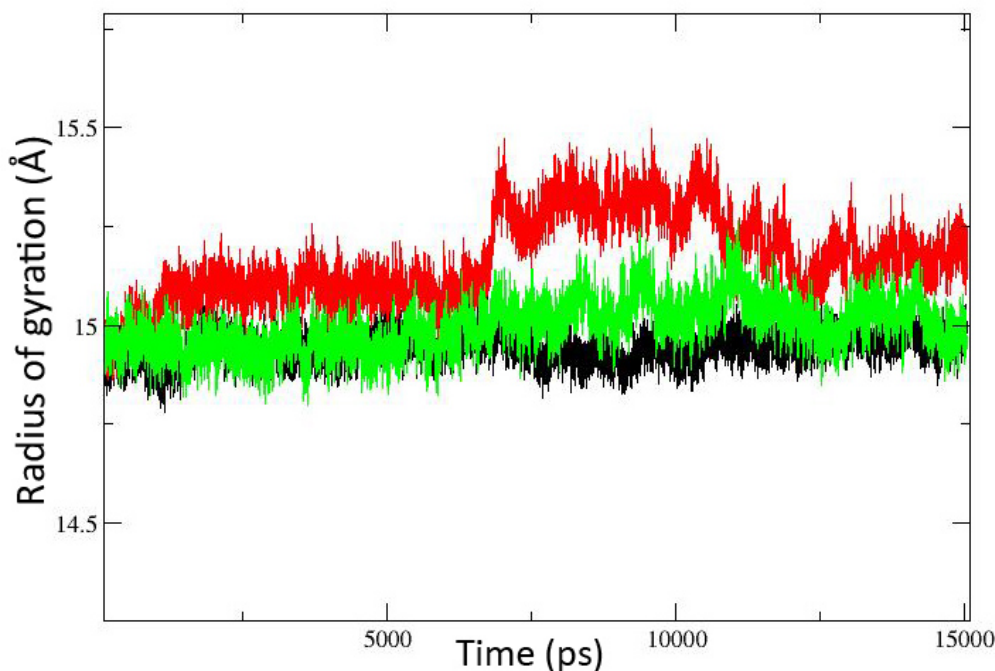
لوپ ۱۳۷-۱۳۱ در دمای ذکر شده میزان بیشتری را نسبت به لوپ مقابل از خود نشان می‌دهد (شکل ۵) به صورتی که بعد از ۷/۵ نانوثانیه مقدار آن افزایش قابل توجهی در

همان گونه که در شکل ۴ نشان داده شده میزان میانگین حرکات مولکولی در لوپ ۱۵-۱۰ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از دو دمای دیگر کمتر می‌باشد و این میزان بعد از ۱۲ نانوثانیه کمی افزایش می‌یابد. این حرکات در

دیگر بزرگتر می‌باشد. همچنین یک افزایش و کاهش نیز در شعاع مشاهده می‌شود. این افزایش شعاع در ۷/۵ نانوثانیه بعد از شروع شبیه‌سازی مشاهده می‌شود که در ۱۳ نانوثانیه به حالت اولیه خود باز می‌گردد.

مقایسه با دو دمای ۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد پیدا می‌نماید.

شکل ۶- نشان دهنده شعاع ژیراسیون آنزیم BsLA بر حسب آنگستروم در سه دمای ذکر شده می‌باشد. میزان شعاع ژیراسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از دو دمای



شکل ۶- نشان دهنده شعاع ژیراسیون آنزیم BsLA بر حسب آنگستروم در مدت ۱۵ نانوثانیه در سه دمای ۵ (خط مشکی)، ۳۵ (خط قرمز) و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (خط سبز)

تحت تأثیر قرار خواهد داد (شکل‌های ۱، ۲ و ۶). میزان آنروپی محاسبه شده از شبیه‌سازی که در جدول ۱ ذکر شده است نیز گواه این مدعا می‌باشد. با افزایش دما و افزایش حرکات مولکولی، میزان آنروپی نیز افزایش می‌یابد که در نتیجه آن RMSD ساختار در دمای ۳۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۵ درجه سانتی‌گراد تغییرات قابل مشاهده‌ای از خود نشان می‌دهد. شعاع ژیراسیون محاسبه شده نیز نشان دهنده افزایش این پارامتر در دمای بالاتر می‌باشد. میزان شعاع ژیراسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه عملکرد این آنزیم است، مقدار بیشتری را در مقایسه با ۶۰ درجه سانتی‌گراد از خود نشان می‌دهد. یک افزایش ناگهانی در مقدار این پارامتر در دمای ۳۵

نتایج مربوط به پارامترهای ترمودینامیکی با استفاده از نرم افزار MMPBSA محاسبه و در جدول (۱) ذکر شده‌اند. این پارامترها نشان دهنده این اصل می‌باشند که دما تأثیر چندانی بر انرژی آزاد ساختار BsLA ندارد. بر اساس نتایج به دست آمده میزان آنروپی ساختار با افزایش دما به طور محسوسی افزایش یافته در حالی که انرژی آزاد آب‌پوشی ساختار با افزایش دما تغییر قابل توجهی ندارد.

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنزیم BsLA در دمای پایین ساختار خشک و محکمی پیدا می‌کند که حرکات مولکولی و در نتیجه فعالیت آن را

تواند نشان دهنده حرکات عملکردی در آنزیم باشد که ناشی از باز شدگی در ساختار می باشد.

درجه سانتی‌گراد در زمان ۷/۵ نانوثانیه قابل مشاهده می باشد (شکل ۶) که بعد از حدود ۵ نانوثانیه به حالت اولیه خود بازگشت می نماید. این تغییرات ناگهانی می

جدول ۱- لیست انرژی جزئی محاسبه شده توسط روش MMGSA بر حسب کیلوکالری بر مول

Energy Component	5°C	35°C	60°C
<b>BOND</b>	480.2238	524.6099	561.9668
<b>ANGLE</b>	1292.3343	1403.4857	1493.7780
<b>DIHED</b>	1809.8366	1846.5695	1870.8794
<b>VDWAALS</b>	-1371.7503	-1357.0058	-1333.8705
<b>EEL</b>	-12887.0562	-12944.6611	-12960.0447
<b>1-4 VDW</b>	624.1959	629.3727	634.0607
<b>1-4 EEL</b>	7584.1046	7616.5687	7612.9089
<b>EGB</b>	-1569.6450	-1544.8383	-1528.4182
<b>ESURF</b>	57.7855	57.9920	59.1360
<b>G gas</b>	-2468.1114	-2281.0603	-2120.3214
<b>G solv</b>	-1511.8594	-1486.8463	-1469.2822
<b>Total</b>	-3979.9708	-3767.9066	-3589.6037
<b>Entropy Results</b>	2286.6167	2489.0015	2657.2556
<b>Delta G</b>	-6266.5875	-6256.9081	-6246.8593

های سه تایی جایگاه فعال نیز در قسمت میانی قابل مشاهده هستند. اسیدآمین Asp ۱۳۳ که اسید آمینه کلیدی جایگاه فعال می باشد نیز در لوپ ۱۳۷-۱۳۱ واقع شده است.

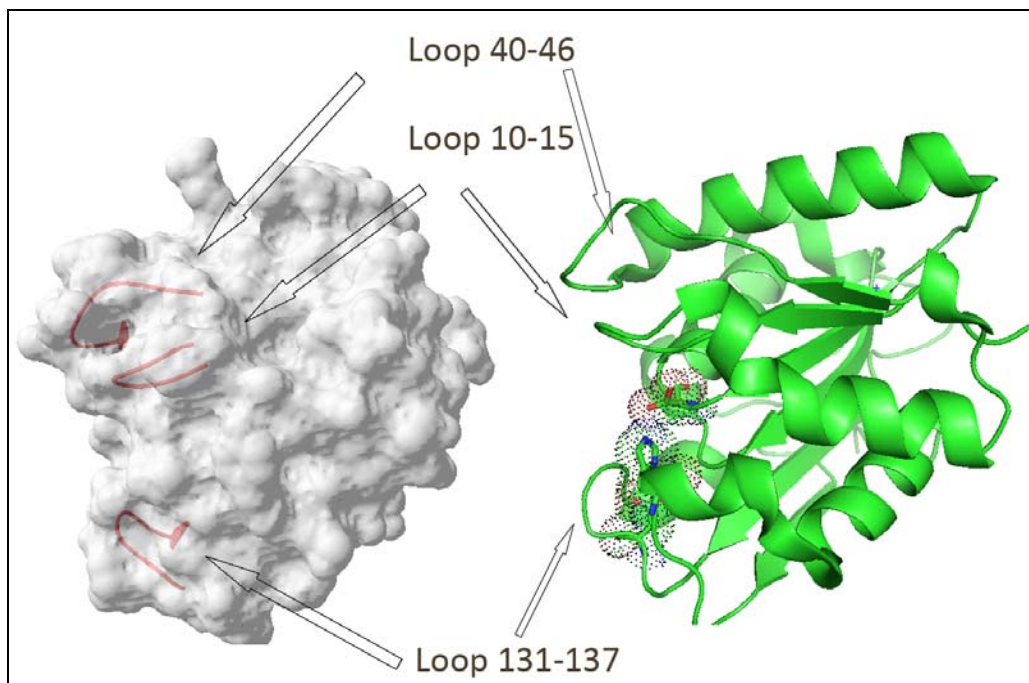
با توجه به مشاهدات انجام شده حرکت و نوسان لوپ ۱۳۷-۱۳۱ برای فعالیت مهم به نظر می رسد. همان گونه که در شکل ۵ مشخص شده است این بخش در دماهای ۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد تحرک کمتری از خود نشان می دهد. تحرک بخش ۱۵-۱۰ در دمای ۳۵ به طور محسوسی نسبت به دو دمای دیگر کمتر می باشد.

با توجه به حرکات دینامیک مولکولی که در نواحی ۱۵-۱۰ و ۴۶-۴۰ مشاهده گردید افزایش دما نقش مهمی در تحرک و نوسان در این دو بخش ایفاء می کند. لذا به منظور افزایش پایداری فعالیتی در این آنزیم، تغییراتی مفید هستند که میزان انعطاف پذیری را با افزایش دما به میزان کمتری دستخوش تغییر قرار دهند.

نتایج بسیار جالب مشاهده شده از RMSF بیانگر اثر موضعی دما بر ساختار می باشد به طوری که در دمای پایین ساختار حالت خشک و انعطاف ناپذیری دارد و با افزایش دما میزان انعطاف پذیری افزایش یافته است. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد یک انعطاف پذیری و نوسان چشمگیر در اسیدآمین‌های ۱۳۷-۱۳۱ مشاهده شد که این بخش مربوط به لبه شکاف جایگاه فعال می باشد. از سوی دیگر در دماهای ۳۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد اسید آمینه های ۱۵-۱۰ که لبه دیگر شکاف جایگاه فعال را تشکیل می دهد نوسانات قابل توجهی پیدا کرده اند. منطقه سوم (۴۶-۴۰) که در نزدیکی جایگاه فعال و در قسمت پشتی منطقه ۱۵-۱۰ قرار گرفته نیز در ۶۰ درجه سانتی‌گراد دچار نوسانات مشخصی شده است.

در شکل ۷ دو مدل مولکولی آنزیم BsLA نمایش داده شده است. دو لوپ ۱۵-۱۰ و ۴۶-۴۰ که در قسمت بالایی مولکول قرار گرفته اند لبه بالایی جایگاه فعال و لوپ ۱۳۷-۱۳۱ لبه دیگر جایگاه فعال را ایجاد می نمایند. اسیدآمین

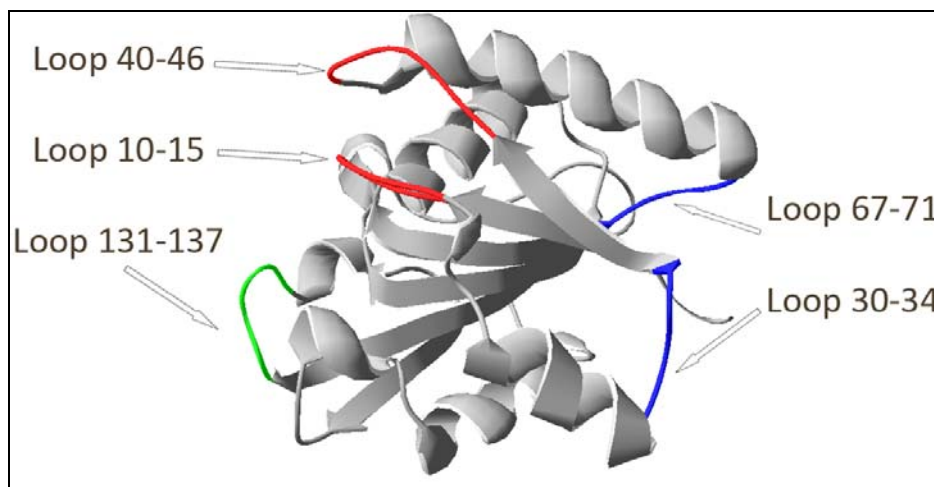




شکل ۷- مدل مولکولی آنزیم BsLA به صورت ریبون (سمت راست) و به صورت سطح در دسترس (سمت چپ). دو لوپ ۱۵-۱۰ و ۴۶-۴۰ در قسمت بالایی مولکول و لوپ ۱۳۷-۱۳۱ در قسمت پایین مولکول

همان‌گونه که در شکل ۸ مشخص شده به نظر می‌رسد دو لوپ واقع شده در سمت مقابل جایگاه فعال که متصل کننده عناصر ساختاری جایگاه فعال می‌باشند نقش کلیدی را در این حرکات ایفاء می‌نمایند. این دو بخش شامل اسیدآمین‌های ۳۴-۳۰ و همچنین ۶۷-۷۱ می‌باشد و از لحاظ انعطاف‌پذیری و نوسانات مقدار چشمگیری نشان نمی‌دهند. ولی این دو بخش به دلیل ایجاد یک بخش لولا مانند که نواحی ۱۵-۱۰ و ۴۶-۴۰ را دربر می‌گیرد به عنوان بهترین گزینه‌های دستورزی به‌نظر می‌رسند. این امر زمانی بهتر مشخص می‌گردد که در لوپ اول Gly ۳۰ و در لوپ دوم Gly ۶۷ و Ala ۶۸ مشاهده می‌شود. لذا جابه‌جایی اسیدآمین‌های ذکر شده با انواع حجیم‌تر که چرخش آزاد در زوایای دی‌هدرال را در زنجیره اصلی محدود می‌نماید پیشنهاد می‌گردد. در لوپ ۳۴-۳۰ اسیدآمین‌های Asp ۳۴ و Lys ۳۵ در کنار یکدیگر به پایداری

بیشتر لوپ کمک نموده‌اند در حالی که در لوپ ۷۱-۶۷ دو جفت اسید آمینه با بارهای هم نام در دو طرف لوپ واقع شده‌اند که می‌توانند باعث عدم پایداری در آن بخش شوند. این دو جفت اسید آمینه شامل Asp ۶۴ و Glu ۶۵ در سمت آمین لوپ و Lys ۶۹ و Lys ۷۰ در طرف کربوکسیل لوپ می‌باشند. پیشنهاد می‌شود که با جابه‌جایی Asp ۶۴ با اسیدآمین Lys از شدت دافعه بار منفی در آن بخش کاسته شود. با توجه به نزدیکی Lys ۷۰ با اسیدآمین‌هایی با بار منفی (شامل Asp ۷۲ و ۱۱۸) نیاز به جابه‌جایی در این اسیدآمین مشاهده نمی‌شود. اما با توجه به اینکه Lys ۶۹ به دلیل اینکه هیچ بار مخالفی در فاصله ۶ آنگسترمی از زنجیره جانبی آن به غیر از Lys ۷۰ وجود ندارد و بر روی سطح در دسترس حلال قرار دارد، جابه‌جایی آن با یک اسیدآمین قطبی پیشنهاد می‌شود.



شکل ۸- جایگاه لویهای ۳۰-۳۴ و ۶۷-۷۱ در مقایسه با جایگاه دو لوپ ۱۰-۱۵ و ۴۰-۴۶

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت‌های مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌شود.

## منابع

- Ahmad, S., et al., Thermostable *Bacillus subtilis* Lipases: In Vitro Evolution and Structural Insight. *Journal of Molecular Biology*, 2008. 381(2): p. 324-340.
- Alain Houde, A.K., and Danielle Leblance, Lipases and Their Industrial Applications An Overview *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 2004. 118(1): p. 155-170.
- Arnold, F.H., Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 2001. 409(6817): p. 253-7.
- Arpigny, J.L. and K.E. Jaeger, Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical journal*, 1999. 343 Pt 1: p. 177-83.
- Barbe, S., et al., Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins*, 2009. 77(3): p. 509-23.
- Case, D.A., et al., The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J Comput Chem*, 2007. 26: p. 1668-1688.
- Ciccotti, J.-P.R.G. and H.J.C. Berendsen, Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal Of Computational Physics*, 1977. 23: p. 327-341.
- Dröge, M.J., et al., Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection. *Chembiochem* : a European journal of chemical biology, 2006. 7(1): p. 149-57.
- Essmann, U., et al., A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.*, 1995. 103: p. 8577-8593.
- Ferrario, V., et al., Conformational Changes of Lipases in Aqueous Media: A Comparative Computational Study and Experimental Implications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011. 353: p. 2466-2480.
- Funke, S.A., et al., Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 2005. 18(11): p. 509-14.
- Gupta, R., N. Gupta, and P. Rathi, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004. 64(6): p. 763-81.
- Hornak, V., et al., Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006. 725: p. 712-725.
- Hwang, I. and S. Park, Computational design of protein therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2008. 5(2-3): p. e43-e48.

- 15-Jaeger, K.-E. and T. Eggert, Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 2002. 13(4): p. 390-7.
- 16-Jaeger, K.E. and M.T. Reetz, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 1998. 16(9): p. 396-403.
- 17-Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz, Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual review of microbiology*, 1999. 53: p. 315-51.
- 18-Jaeger, K.E., et al., Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*, 1994. 15(1): p. 29-63. 3
- 19-James, J.J., et al., Activation of *Candida rugosa* lipase at alkane-aqueous interfaces: a molecular dynamics study, 2007. p. 4377-83.
- 20-Li, W., et al., Molecular modeling of substrate selectivity of *Candida antarctica* lipase B and *Candida rugosa* lipase towards c9, t11- and t10, c12-conjugated linoleic acid, 2009. p. 299-303.
- 21-Loncharich, R.J., B.R. Brooks, and R.W. Pastor, Langevin dynamics of peptides: the frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanine-N'-methylamide. *Biopolymers*, 1992. 32(5): p. 523-35.
- 22-Luić, M., et al., Combined X-ray diffraction and QM/MM study of the *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed secondary alcohol esterification. *The journal of physical chemistry. B*, 2008. 112(16): p. 4876-83.
- 23-Moore, G.L. and C.D. Maranas, Computational challenges in combinatorial library design for protein engineering. *AIChE Journal*, 2004. 50(2): p. 262-272.
- 24-Ni, Z., et al., Integrating In Silico and In vitro approaches to dissect the stereoselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A toward ketoprofen vinyl ester. *Chemical biology & drug design*, 2011. 78(2): p. 301-8.
- 25-Ottosson, J., L. Fransson, and K. Hult, Substrate entropy in enzyme enantioselectivity : An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science*, 2002: p. 1462-1471.
- 26-Peitsch, N.G.a.M.C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997. 18(15): p. 2714-2723.
- 27-Peters, G.H. and R.P. Bywater, Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in *Rhizomucor miehei* lipase. *Protein engineering*, 1999. 12(9): p. 747-54.
- 28-Raza, S., L. Fransson, and K. Hult, Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: a molecular dynamics study. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2001. 10(2): p. 329-38.
- 29-Rehm, S., P. Trodler, and J. Pleiss, Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2010. 19(11): p. 2122-30.
- 30-Skjöt, M., et al., Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2009. 10(3): p. 520-7.
- 31-Trodler, P. and J. Pleiss, Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC structural biology*, 2008. 8: p. 9-9.
- 32-Trodler, P., R.D. Schmid, and J. Pleiss, Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC structural biology*, 2009. 9: p. 38-38.
- 33-van Pouderooyen, G., et al., The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme<sup>1†</sup>. *Journal of Molecular Biology*, 2001. 309(1): p. 215-226.
- 34-Wang, Y., D.-Q. Wei, and J.-F. Wang, Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism. *Journal of chemical information and modeling*, 2010. 50(5): p. 875-8.

## Molecular dynamics simulation and functional motions study of *Bacillus subtilis* lipase A

Ganjalkhany M.R. and Ranjbar B.

Biophysics Dept., faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

*Bacillus subtilis* lipase A is the smallest member of  $\alpha/\beta$  hydrolase family with no interfacial activation property. *Bacillus subtilis* lipase A has numerous applications as well as other lipases, such as industrial, pharmaceuticals, environmental and food products. There have been presented several reports about the engineering of this enzyme based on the random mutagenesis. Therefore, study of molecular dynamics simulation of the enzyme at different temperatures seems to be necessary to understand its dynamical properties. Understanding of such molecular motions is important to switch from random to rational design of the enzyme. Two flexible loops have been identified based on 15 ns molecular dynamics simulation of the enzyme. The extent of flexibility for the loops was different at three temperatures. On the other hand, two critical loops have been identified to play important role on the functional motions of the enzyme as hinges of the axial motions of the secondary elements around the active site cleft.

**Key words:** Lipase, *Bacillus subtilis* lipase A, Functional motions, Molecular dynamics simulation