

بررسی نقش جهش A501R در افزایش قدرت پردازش آنزیم DNA پلیمراز PFU

رایحه وفایی^۱، سید شهریار عرب^{۱*}

۱- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

sh.arab@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۹

دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۹

چکیده

آنزیم DNA پلیمراز PFU پایین ترین نرخ خطا در فرایند همانندسازی در PCR را دارد. اما نقطه ضعف این آنزیم پایین بودن قدرت پردازش آن است که پس از افزودن تقریباً ۲۰ نوکلئوتید در انتهای پرایمر از روی رشته الگو بلند می‌شود. در این پژوهش هدف افزایش توان پردازش آنزیم با طراحی منطقی و ایجاد جهش نقطه‌ای در آنزیم با کمترین هزینه آنتروپی و آنتالپی است. برای مرتفع کردن هدف پژوهش، ابتدا مقایسه توالی و ساختار میان آنزیم‌های هم‌خانواده با توان پردازش بالا انجام شد. سپس، جهش مناسب انتخاب شد و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای نمونه طبیعی و جهش یافته انجام شد و خروجی آن بررسی شد و میزان انرژی آزاد اتصال آنزیم و DNA نشان داد که نمونه جهش یافته اتصال بهتری نسبت به آنزیم طبیعی با DNA برقرار می‌کند.

کلید واژگان: آنزیم DNA پلیمراز PFU، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، توان پردازش آنزیم

۱- مقدمه

۱-۱ DNA پلیمراز

بر اساس شباهت توالی و ارتباط فیلوژنی، DNA پلیمرازها به ۷ گروه A, B, C, D, X, Y, RT تقسیم می‌شوند [۱]. DNA پلیمراز Pfu شامل ۵ ناحیه یا دومین، اگزونوکلئازی، انگشتان، کف دست، شست و انتهای N می‌شوند.

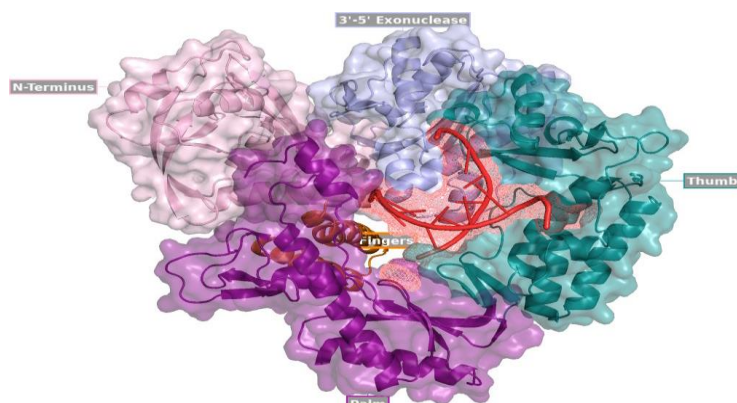
امروزه برای یافتن داروها یا روش‌های درمانی جدید، پزشکی شخصی سازی شده، شناسایی بیماری‌ها با ریسک بالا و یا بیماری‌های ناشناخته، از روش توالی‌یابی ژنوم به شکل قابل توجهی استفاده می‌شود [۲-۵] و با توجه به اینکه این روش نیازمند تکثیر DNA است این آنزیم‌ها به میزان چشمگیری مورد توجه قرار گرفته‌اند. البته در سال‌های اخیر با فراگیری بیماری COVID19 فرایند PCR به دلیل اینکه تنها روش تشخیص این بیماری بود، بازار را در دست گرفت. در این مطالعه به آنزیم DNA پلیمراز Pfu پرداخته شده است که یکی از آنزیم‌های پرکاربرد در این حوزه است. آنزیم DNA پلیمراز pfu از باکتری *Pyrococcus furiosus* استخراج شده است که قابلیت $3' \rightarrow 5'$ اگزونوکلئازی دارد و همین امر این آنزیم را به یکی از بهترین گزینه‌ها برای PCR تبدیل کرده است. باکتری منشأ این آنزیم، یک باکتری گرمادوست و بی‌هوازی است که تکثیر آن برای تأمین DNA پلیمراز Pfu کاری دشوار است. بنابراین، ژن آنزیم در باکتری‌هایی که رشد سریع و شرایط آسان‌تری برای تکثیر لازم دارند، کلون می‌شود. ژن این پلیمراز، پلی‌پپتیدی به طول ۷۷۵ آمینواسید و وزن تقریبی معادل ۹۰ کیلودالتون را کد می‌کند [۶]. ناحیه انگشت و شست در DNA پلیمراز که به DNA متصل نیست، کنفورماسیون باز دارد و هنگامی که به DNA متصل می‌شود، این دو ناحیه به سمت دومین کف دست حرکت می‌کنند تا رشته‌های الگو و پرایمر را محکم نگه دارند. این آنزیم قابلیت اگزونوکلئازی دارد و هنگامی که یک

ناجورشدگی نوکلئوتیدی در رشته در حال ساخت DNA ایجاد می‌شود، در محل پلیمرازی اتصال آنها ضعیف می‌شود و یا به خوبی با جایگاه فعال ناحیه پلیمرازی هم‌تراز نمی‌شود و در نهایت دو رشته تابیده شده از هم باز می‌شوند و به ناحیه اگزونوکلئازی حرکت می‌کند و نوکلئوتید اشتباه جدا می‌شود [۷]. این آنزیم جزء DNA پلیمرازهایی است که پایین‌ترین نرخ خطا را در میان سایر DNA پلیمرازهای مقاوم به گرما تا به امروز نشان داده است. این ویژگی موجب شده برای روش‌هایی که سنتز با صحت بالا نیاز است، این آنزیم ارجحیت داشته باشد [۹].

مسئله مورد توجه این است که این آنزیم با وجود قابلیت‌های بالایی همچون مقاومت به گرما [۹]، وفاداری و صحت بالا در همانندسازی، توان پردازش بسیار پایینی دارد [۷]. توان پردازش به تعداد نوکلئوتیدهایی گفته می‌شود که آنزیم با یک بار اتصال به DNA الگو بدون جدا شدن از آن به انتهای پرایمر اضافه می‌کند [۱۰]. در این مطالعه سعی بر این است تا با معرفی جهشی نقطه‌ای در آنزیم قابلیت پردازش آنزیم را افزایش دهیم.

۱-۲ دینامیک مولکولی

دینامیک مولکولی اولین بار اواخر دهه ۷۰ توسعه داده شد، به این دلیل که حرکت مولکول‌های زیستی بزرگ و واکنش‌های شیمیایی را با مکانیک کوانتوم نمی‌توان شبیه سازی کرد به دلیل هزینه بالای محاسباتی و نیز وجود پیچیدگی، این روش توسعه یافت تا با استفاده از قوانین فیزیکی نیوتن حرکات اتم‌ها شبیه‌سازی شود و با این روش از پیچیدگی و هزینه محاسباتی کاسته شود [۱]. در شبیه سازی دینامیک مولکولی از مدل ساختار مورد مطالعه استفاده می‌شود که با روش‌های تجربی مانند NMR و کریستالوگرافی پرتو X و میکروسکوپ کرایو و الکترونی و روش‌های تئوری مدل‌سازی به دست آمده است. در این روش نیروهایی که بین هرکدام از اتم‌های سیستم نقش دارند با استفاده از معادله ۱ تخمین زده می‌شوند.



شکل ۱ DNA پلیمرز PFU: دومین‌های عملکردی آنزیم. دومین شصت، انگشتان و کف دست در فرایند processivity نقش دارند.

$$E_{total} = \sum_{bonds} K_r \cdot (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta \cdot (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} \cdot [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^2} - \frac{B_{ij}^6}{R_{ij}} + \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

درستی و به ایده‌آل‌ترین حالت ممکن انجام شود و بار جزئی اتم‌ها که برای محاسبه برهم‌کنش‌های الکترو استاتیک استفاده می‌شود، به بهترین حالت ممکن تعریف شوند. این امر برای شعاع واندروالس و سایر مقادیر صادق است و روی هم رفته به تمام این مقادیر و معیارها میدان نیرو^۷ گفته می‌شود. به محض اینکه نیرویی برای هر کدام از اتم‌های سیستم محاسبه شود، موقعیت این اتم‌ها طبق قانون نیوتون تغییر می‌کند و به این شکل زمان شبیه‌سازی به اندازه ۱ تا ۲ فمتوثانیه پیش می‌رود و این فرایند میلیون‌ها بار تکرار می‌شود [۱۰].

۲. مواد و روش‌ها

برای بررسی مکانیسم processivity در آنزیم DNA پلیمرز PFU، ابتدا مطالعات ساختاری بر روی آنزیم انجام شد. این مطالعات بررسی ساختار دوم و سوم آنزیم، تحلیل و بررسی توالی آمینواسیدی و فراوانی آمینواسیدها بود.

به‌طور خلاصه، این نیروها برآیند برهم‌کنش‌های پیوندی و غیرپیوندی بین اتم‌ها است. پیوندهای شیمیایی و زوایای اتمی با استفاده از فرم‌هایی مجازی^۱ مدل می‌شوند و زوایای دی‌هیدرال^۲ که چرخش حول پیوند است، با استفاده از یک تابع سینوسی که اختلاف انرژی بین دو کنفورماسیون پوشیده^۳ و نهوشیده^۴ را تخمین می‌زند، مدل می‌شود. نیروهای غیرپیوندی بر مبنای برهم‌کنش‌های واندروالس مدل می‌شوند که از پتانسیل لئارد-جونز^۵ استفاده می‌شود و برهم‌کنش‌های الکترو استاتیک بر اساس قوانین کولومب^۶ مدل می‌شود. برای شبیه‌سازی رفتار واقعی مولکول‌ها در حین حرکت، باید مقادیری که به معادله ۱ نسبت داده می‌شود با مقادیر محاسبه شده در روش‌های تجربی و مقادیر محاسبه شده به روش مکانیک کوانتوم منطبق باشد. این مقدار دهی‌ها به این صورت است که طول و سختی فنر که معرف پیوند است و زوایا، به

^۵ Lennard-Jones 6-12 potential

^۶ Coulomb laws

^۷ force field

^۱ Virtual springs

^۲ dihedral angles

^۳ eclipsed

^۴ staggered

محدودیت موقعیتی^۱ برای اتم‌های سنگین حلال^۲ 1000 kJ/mol.nm^2 در نظر گرفته شد. شرایط مرزی در طول شبیه‌سازی برقرار بوده‌است. پارامترهای مختصات، سرعت و انرژی هر ۵۰۰ پیکوثانیه در طول شبیه‌سازی ذخیره شدند. گام‌های زمانی در طول شبیه‌سازی ۱ فمتوثانیه در نظر گرفته شد.

برهمکنش‌های بلند برد با استفاده از الگوریتم PME^۲ محاسبه شدند. برای ثابت نگهداشتن پیوندهای کووالان که شامل اتم هیدروژن می‌شدند از الگوریتم LINCS استفاده کردیم. کمینه‌سازی^۳ با استفاده از الگوریتم descent Steepest به مدت ۲۰ پیکوثانیه انجام شد.

تبادل‌رسانی حجمی^۴ در دمای ۳۰۸ K که دمای بهینه عملکرد آنزیم است، با ترموستات V-rescale با گام‌های زمانی ۱ پیکوثانیه به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه انجام شد. تبادل‌رسانی فشار^۵ با باروستات Parinello-Rahman با گام زمانی ۱ پیکوثانیه و به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه انجام شد. طبق بررسی‌های انجام شده جهش A501R انتخاب شد و با استفاده از نرم‌افزار yasara در ساختار ایجاد و کمینه‌سازی انرژی انجام شد. برای نمونه جهش‌یافته نیز مشابه نمونه آنزیم طبیعی تبادل‌رسانی دمایی و فشار انجام شد و به مدت ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی اجرا شد. در نهایت، نتایج با استفاده از ابزار MM-PBSA [۱۵] و ابزارهای زیرمجموعه گرومکس شبیه‌سازی تحلیل و بررسی شد.

۳. نتایج

۳-۱ بررسی تغییرات ساختاری

برای بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در حالت طبیعی و جهش‌یافته پس از انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی rms برای محاسبه RMSD ساختار بر مبنای $C\alpha$ در طول شبیه‌سازی به کار گرفته شد [۱۶]، که نتایج در شکل ۲ الف نمایش داده شده است. همچنین، از این ابزار برای محاسبه

بررسی ساختار دوم با استفاده از ابزار DSSP و فراوانی آمینواسیدی با کمک MATLAB انجام شد. اطلاعات توالی، عملکردی و ساختاری این آنزیم در پایگاه داده UniProt با کد شناسایی p61875 ثبت شده است. برای این آنزیم چند ساختار به روش کریستالوگرافیک شده که در پایگاه داده RCSB ثبت شده است و کدهای 2jgu, 3a2f, 4ail در این مطالعه استفاده است. کد 2jgu ساختار آنزیم DNA پلیمراز PFU طبیعی به تنهایی بدون لیگاند تعیین شده است، که نواحی از ساختار در فایل وجود ندارد. بنابراین، برای داشتن کل توالی آنزیم نیازمند بررسی فایل‌های ساختاری دیگر از این آنزیم بودیم. فایل 4ail شامل ساختار آنزیم با جهش‌های نقطه‌ای به صورت کمپلکس با DNA است، اما هیچ‌کدام از این دو فایل توالی کامل آنزیم را در ساختار ندارند. بنابراین، برای داشتن توالی کامل ساختار آنزیم DNA پلیمراز PFU فایل 3a2f استفاده کردیم که توالی تقریباً به صورت کامل ۷۷۳ یعنی آمینواسید از ۷۷۵ رزید و در DNA پلیمراز PFU را دارد، اما به صورت کمپلکس با مولکول PCNA است. برای ساخت کمپلکس آنزیم و DNA از ترکیب هر سه فایل استفاده شد.

برای نمایش ساختارها و ایجاد جهش از نرم‌افزارهای PyMOL [۱۱]، yasara [۱۲]، vmd [۱۳] استفاده شد. برای اطلاع از رزیدوهای حفاظت شده از ابزار HSSP استفاده شد [۷]. در ابتدا شبیه‌سازی با نرم‌افزار گرومکس [۱۴] بر روی آنزیم طبیعی همراه با DNA با میدان نیروی CHARMM27 به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. کمپلکس آنزیم و DNA در مرکز جعبه شبیه‌سازی قرار داده شد و فاصله کمپلکس تا دیواره جعبه ۱٫۲ نانومتر در نظر گرفته شد. جعبه با ساختار چندوجهی با مولکول های آب از نوع SPC پر شد.

^۴ isothermal ensemble

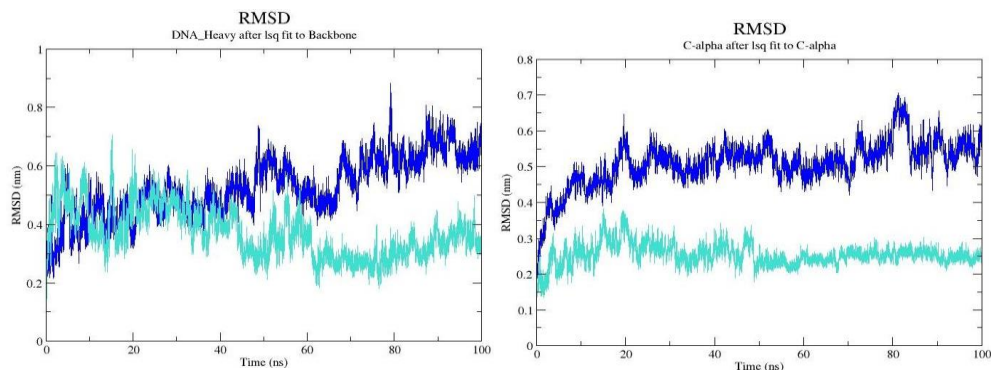
^۵ Isotherma-Isobaric ensemble

^۱ Position restraints

^۲ Particle Mesh Ewald

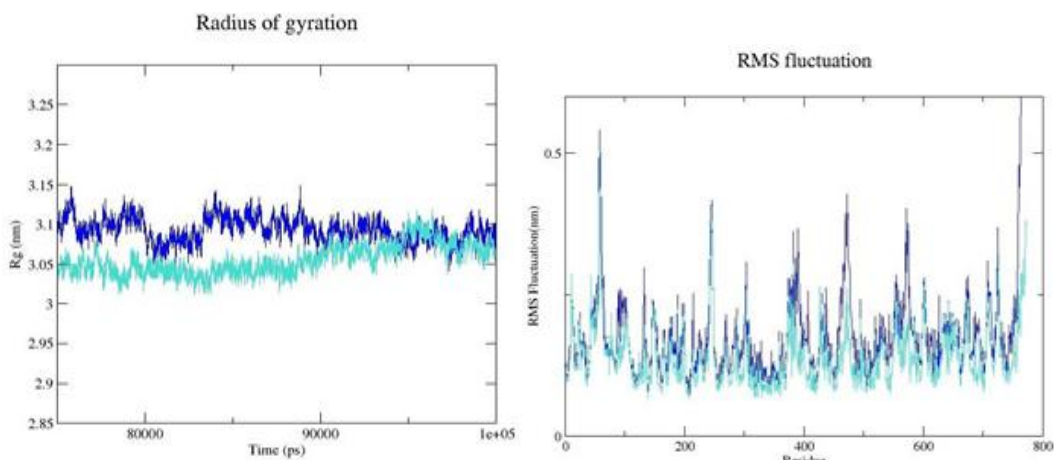
^۳ energy minimization

میزان جا به جایی مولکول DNA نسبت به زنجیره اصلی آنزیم در ناحیه پلیمرازی استفاده کردیم که نتیجه آن برای آنزیم طبیعی و جهش یافته در شکل ۲ ب گزارش شده است.



الف ب

شکل ۲ مقایسه نمودارهای rmsd نمونه جهش یافته و طبیعی که رنگ آبی نمایانگر نمودار آنزیم طبیعی و رنگ فیروزه‌ای نمایانگر نمونه جهش یافته A501R است. نمودار ب RMSD زنجیره اصلی پروتئین نسبت به اتم‌های سنگین DNA است.



الف ب

شکل ۳ الف. نمودار RMSF آنزیم طبیعی که با رنگ آبی مشخص شده است و نمونه جهش یافته A501R که با رنگ فیروزه‌ای نشان داده شده است. ب: نمودار شعاع ژیراسیون برای نمونه آنزیم طبیعی و جهش یافته.

با کمک آن اثر جهش را بر روی پایداری و تغییرات فشردگی بررسی می‌کنیم [۱۷]. در ادامه بررسی‌های ساختاری به آنالیز RMSF می‌رسیم که در آن نوسانات رزیدوها نسبت به مقدار میانگین گزارش می‌شود. تغییرات نوسانات رزیدوها نیز با استفاده از rmsf انجام شد که در شکل ۳ الف قابل مشاهده است.

برای محاسبه شعاع ژیراسیون پروتئین از ابزار آنالیز گرومکس به نام gyrate استفاده کردیم و در شکل ۳ ب نمایش داده شده است. این آنالیز می‌تواند تغییرات فشردگی و همچنین پایداری پروتئین را نشان دهد و ما

۲-۳ برهمکنش‌های هیدروژنی

کیفیت اتصال میان آنزیم و DNA با محاسبه تعداد برهمکنش‌های هیدروژنی با استفاده از ابزار hbond بررسی شد [۱۸]. می‌توان خروجی را در شکل ۴ ب مشاهده کرد. همچنین، برای بررسی میزان پایداری ساختار پروتئین بر مبنای تعداد برهمکنش‌های هیدروژنی درون ساختار، تعداد این میانکشی‌ها درون پروتئین برای هر دو نمونه آنزیم طبیعی و جهش‌یافته محاسبه شد (شکل ۴ الف).

۳-۳ سطح در دسترس

مساحت در دسترس حلال برای آنزیم طبیعی و جهش‌یافته با کمک ابزار sasa در گرومکس محاسبه شد (شکل ۵). این مؤلفه به بررسی میزان اثرگذاری جهش اعمال شده بر روی فشردگی یا بازشدگی ساختار آنزیم

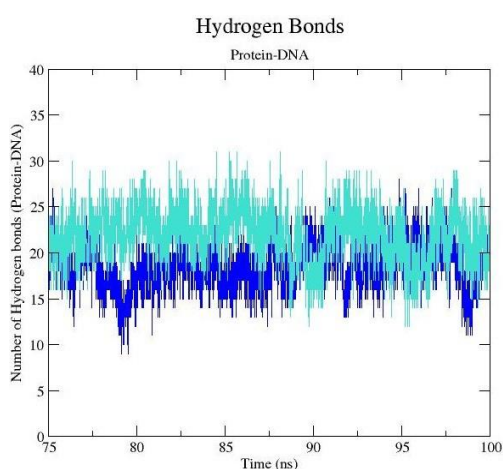
کمک می‌کند [۱۹].

۴-۳ انرژی برهمکنش

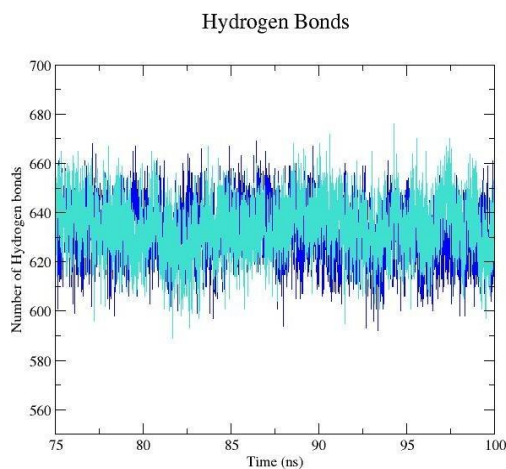
میل اتصال میان آنزیم و DNA برای فایل ترژکتوری و زمان ۲۵ نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی با استفاده از g_mmpbsa محاسبه شد (جدول ۱).

۵-۳ یافتن حفرات پروتئین

برای یافتن رزیدوهایی که در محل حفره و در تماس با DNA قرار گرفته‌اند از ابزار parKVFinder [۲۰] که از ماژول‌های نرم‌افزار PyMOL است، استفاده شد. تصاویر خروجی این ابزار در شکل ۶ نمایش داده شده است. برای بررسی تغییرات ناحیه میانکشی آنزیم با DNA فایل ساختاری میانگین از آنزیم که از ۲۵ نانوثانیه انتهایی استخراج شده بود به‌عنوان فایل ورودی به این نرم‌افزار داده شد.

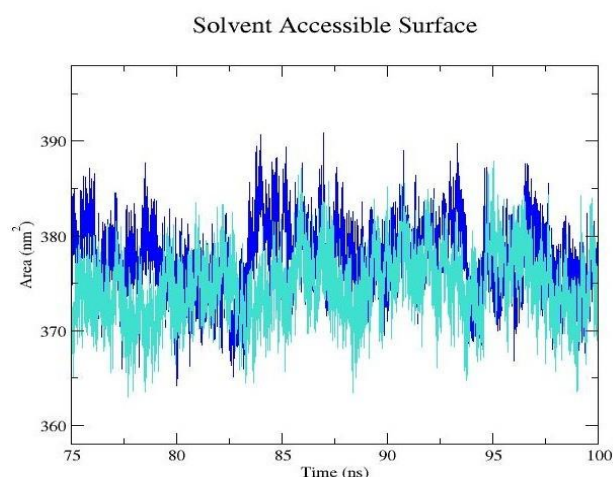


ب



الف

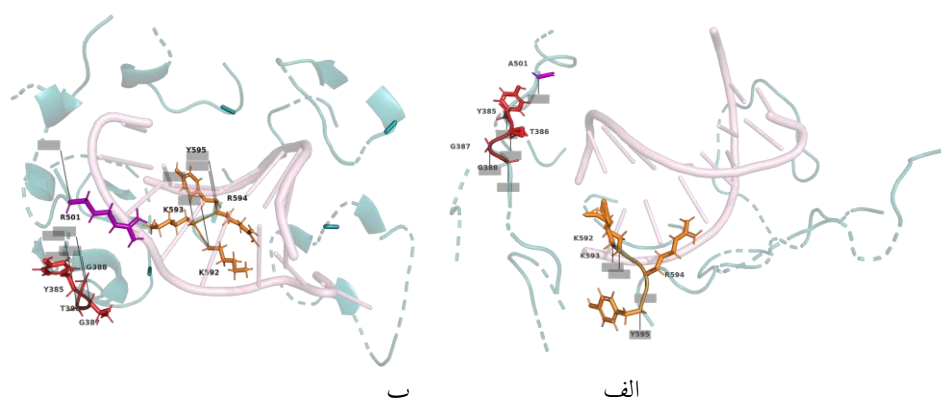
شکل ۴ نمودار مقایسه تعداد برهمکنش‌های هیدروژنی میان پروتئین و DNA و میانکشی‌های درون ساختار آنزیم. رنگ آبی تعداد برهمکنش‌ها در آنزیم طبیعی را نشان می‌دهد و رنگ فیروزه‌ای متعلق به آنزیم جهش‌یافته است.



شکل ۵ در این شکل سطح در دسترس آنزیم طبیعی با رنگ آبی نمایش و نمونه جهش یافته A501R با رنگ فیروزه‌ای نشان داده شده است.

جدول ۱ مقایسه جزئیات انرژی برهمکنش $\Delta G_{\text{binding}}$ میان آنزیم DNA پلیمراز PFU طبیعی و نمونه جهش یافته A501R و DNA. در جدول واحدها بر مبنای (KJ/mol) است.

$\Delta G_{\text{binding}}$	SASA	Polar Solvation	Electrostatics	Van der waals	Case of study
-2121.6 ± 134.178	-48.444 ± 3.876	1736.4 ± 168.7	-3401 ± 194	-408.5 ± 32.4	Native
-2458.1 ± 116	-55.7 ± 4.9	2302.1 ± 165.9	-4274 ± 191.5	-430.4 ± 47	A501R

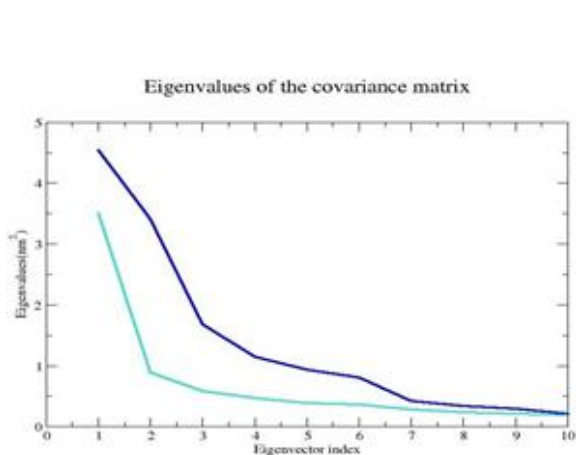


شکل ۶ نمایش خروجی ابزار KVFinder از ماژول‌های PyMOL. (الف) خروجی برای آنزیم طبیعی. (ب) خروجی برای نمونه جهش یافته A501R. در این تصویر دو موتیف YXGG و KKRY به ترتیب با رنگ قرمز و نارنجی مشخص شده‌اند. موقعیت آمینو اسید جهش داده شده با رنگ بنفش مشخص شده است.

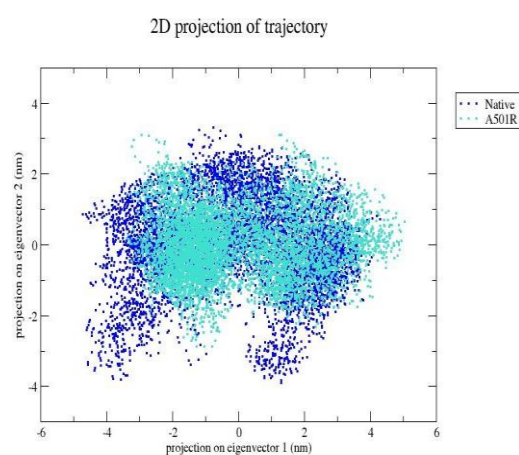
۳-۶ روش PCA

برای بررسی پایداری ساختاری و انعطاف پذیری نمونه کمپلکس آنزیم طبیعی با DNA و نمونه جهش یافته با DNA با ساده سازی داده های حاصل از ترژکتوری شبیه سازی دینامیک مولکولی اتم های αC استفاده شد. این ماتریس شامل بردار ویژه^۱ و مقدار ویژه^۲ است. همچنین، از روش PCA استفاده شد [۲۱]. برای این منظور از ابزار

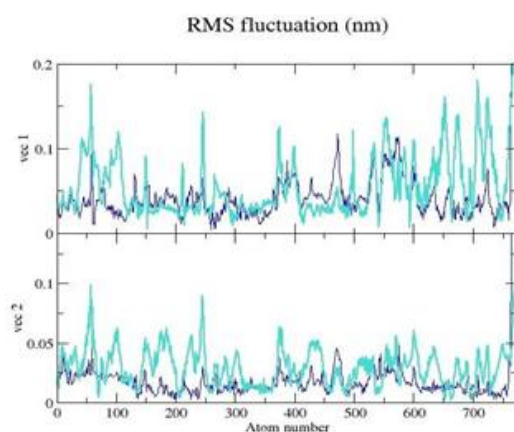
covar برای ساخت ماتریس کوواریانس و ابزار anaeig برای ترسیم داده های ترژکتوری بر طبق دو بردار ویژه اصلی استفاده شد. نتایج در تصویر ۷ الف نشان داده شده است. در نمودار ۷ ب مقدار ویژه علیه ده بردار ویژه اول ترسیم شده است. در نمودار ۷ د نوسانات تک تک آمینواسیدها طبق بردار ویژه اول و دوم ترسیم شده اند. نمودار ۷ ج تغییرات بردار ویژه اول و دوم را طبق زمان شبیه سازی نمایش می دهد.



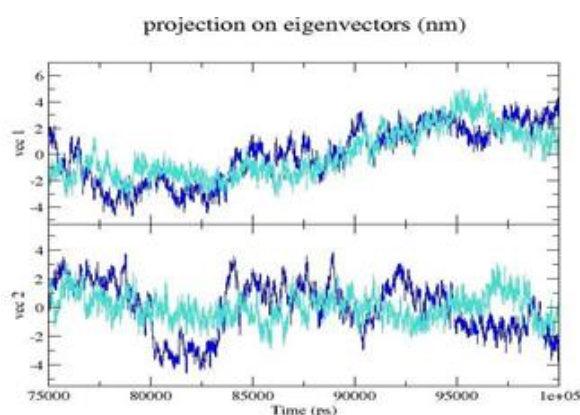
ب



الف



د

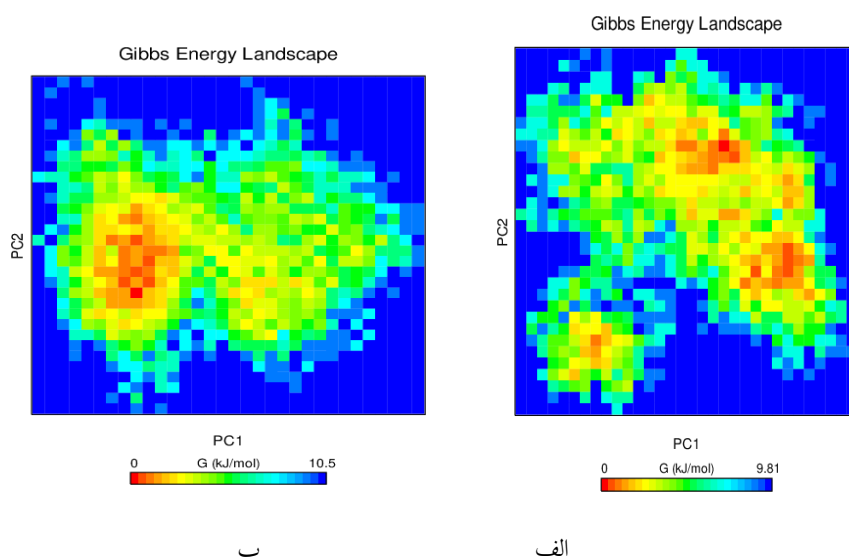


ج

شکل ۷ آنالیز PCA

² eigenvalue

¹ eigenvector



شکل ۸ نمای افقی انرژی آزاد گیبس برای: الف. آنزیم طبیعی و ب. جهش یافته A501R

۷-۳ نمای افقی انرژی آزاد گیبس

ترسیم نمای افقی انرژی آزاد گیبس^۱ برای ۲۵ نانوثانیه انتهایی شبیه سازی با استفاده از covar sham و anaeig طبق دو بردار ویژه اصلی انجام شد که در شکل ۸ گزارش شده است. در این آنالیز جهت نوسانات کربن های آلفا زنجیره اصلی پروتئین مشخص می شود. نواحی قرمز نمایانگر انرژی کمتر هستند [۲۲]. نمای افقی انرژی آزاد گیبس برای آنزیم طبیعی و جهش داده شده در شکل ۸ نمایش داده شده است. نقشه رنگی انرژی آزاد گیبس جهت گیری تغییرات ساختاری را برای اتم های $C\alpha$ ، در ساختارهایی که در ۲۵ نانوثانیه آخر ترژکتوری دیده شده اند مورد بررسی قرار می دهد. نواحی قرمز رنگ چاه انرژی آزاد را در global minima نشان می دهند.

۴- بحث و نتیجه گیری

هدف از این پژوهش افزایش توان پردازش آنزیم DNA پلیمرز PFU با استفاده از جهش نقطه ای بوده است. مطابق مطالعات انجام شده، یکی از جهش های بهینه، جهش در

رزیدو شماره ۵۰۱ در دومین کف دست است که آمینو اسید آلانین به آرژنین تغییر داده شده است. نتایج شبیه سازی برای تغییرات ساختاری اینگونه هستند که نمودار RMSD نمونه جهش یافته A501R نشان می دهد که در زمان سریع تری به پایداری نسبی رسیده است و تغییرات ساختاری کمتری را نسبت به نمونه طبیعی متحمل شده است (شکل ۲ الف). از آنجایی که توان پردازش در اغلب منابع این گونه تعریف می شود که ارتباط مستقیمی با میل اتصال آنزیم با DNA دارد [۲۳]، بنابراین، میزان جا به جایی مولکول DNA در ناحیه پلیمرازی آنزیم در طول شبیه سازی محاسبه شد (شکل ۲ ب). میزان تغییرات زنجیره DNA در نمونه جهش یافته A501R از زمان ۵۰ نانوثانیه در شبیه سازی به بعد کاهش قابل توجهی داشته است که می تواند نشان دهنده آن باشد که آنزیم اتصال محکم تری با DNA برقرار کرده است.

در شکل ۳ الف می توان مشاهده کرد که رزیدوهای شماره ۴۰۰ تا ۷۰۰ میزان نوسانات کمتری را در نمونه جهش یافته A501R نشان می دهند که دلیل آن می تواند

^۱ Gibbs Free Energy landscape

درگیری این رزیدوها در اتصال با DNA باشد. این رزیدوها دومین‌های شست، انگشتان و کف دست را می‌سازند که در واقع بخش پلیمرازی آنزیم را تشکیل می‌دهند. شکل ۳ ب نشان می‌دهد که شعاع ژیراسیون در پروتئین جهش‌یافته تغییر قابل‌توجهی نسبت به آنزیم طبیعی پیدا نکرده است. در این صورت می‌توان گفت که جهش موجب ناپایداری ساختاری آنزیم نشده است. از آنجایی که از میان‌کنش‌های دخیل میان آنزیم و DNA می‌توان به میان‌کنش‌های هیدروژنی اشاره کرد، طبق شکل ۴ ب تعداد برهم‌کنش‌های هیدروژنی بین آنزیم و DNA به‌طور میانگین در ۲۵ نانوثانیه پایانی آنزیم طبیعی ۱۹ برهم‌کنش هیدروژنی با DNA برقرار می‌کند و آنزیم جهش‌یافته A501R به تعداد ۲۰ میان‌کنش تشکیل می‌دهد و محل ایجاد برهم‌کنش با DNA از لحاظ برقراری برهم‌کنش هیدروژنی خواص آنزیم طبیعی حفظ شده است. در محاسبه تعداد برهم‌کنش هیدروژنی درون پروتئین نیز هیچ تفاوتی مشاهده نمی‌شود و این نشان می‌دهد که ساختار پروتئین از لحاظ جا به جایی بخش‌های هیدروفوب و هیدروفیل تغییری نکرده است. شکل ۵ تأییدی است بر اینکه ساختار از منظر آرایش قرارگیری نواحی هیدروفوب و هیدروفیل دست نخورده باقی‌مانده است؛ زیرا مقدار سطح در دسترس محاسبه شده برای نمونه آنزیم طبیعی و جهش‌یافته A501R بسیار نزد یک به یکدیگر هستند و از این منظر نمونه جهش‌یافته رفتاری مشابه نمونه آنزیم طبیعی دارد. انرژی اتصال آنزیم به دورشته DNA به تفکیک نوع آن در جدول ۱ نشان می‌دهد که انرژی اتصال میان آنزیم جهش‌یافته A501R و DNA به میزان ۳۳۵ کیلوژول بر مول کاهش یافته است. بنابراین، اتصال بین آنزیم و DNA قوی‌تر شده است. همانطور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، نحوه قرارگیری رزیدو جهش‌یافته و نیز دو موتیف KKRY و YTGG نشان می‌دهد که زنجیره جانبی آمینواسید KKRYArg₅₀₁ حلقه بنزنی آمینواسید تیروزین به

سمت داخل حفره پلیمرازی و به سمت بازهای نوکلئوتیدهای DNA چرخیده و شرایط برای استکینگ میان بازها و زنجیره جانبی تیروزین فراهم است. همین امر می‌تواند گویای این باشد که چرا سطح انرژی و اندروالس و الکترو استاتیک در میان‌کنش با DNA در نمونه جهش‌یافته A501R کمتر از آنزیم طبیعی است. بنابراین، نمونه جهش‌یافته A501R اتصال قوی‌تری را با DNA برقرار می‌کند.

در شکل ۷ الف می‌توان مشاهده کرد که میزان پراکندگی نقاط در نمونه جهش‌یافته A501R کمتر از نمونه آنزیم طبیعی است که نمایانگر پایداری ساختاری نمونه جهش‌یافته است. شیب تند در شکل ۷ ب برای شماره‌های ۱ تا ۷ بردار ویژه نشان می‌دهد تغییرات در ساختار زیاد بوده است. اما برای نمونه جهش‌یافته از بردار ویژه شماره ۲ مقادیر ویژه به کمتر از یک رسیده و ثابت مانده است که باز هم گویای پایداری ساختاری است و نشان می‌دهد که نوسانات تصادفی کاهش چشمگیری داشته است و می‌توان گفت که جهش طراحی شده تأثیر قابل‌توجهی بر روی پایداری ساختار داشته است. شکل ۸ ب نشان می‌دهد که راستای تغییرات کنفورماسیونی در نمونه جهش‌یافته تغییر پیدا کرده است و ناحیه با حداقل انرژی ناحیه قرارگیری ساختار metastable است، تنها یک ناحیه است، اما در نمونه طبیعی دو ناحیه را مشخص می‌کند که با سد انرژی کمی از هم تفکیک شده‌اند. در مجموع دو عامل مهم که برای عملکرد یک پروتئین، به‌ویژه آنزیم DNA پلیمراز لازم است یعنی پایداری و ویژگی قدرت پردازش با استفاده از آنالیزهای ساختاری و انرژی میان‌کنش بین آنزیم و DNA بررسی شده‌اند و نمونه جهش‌یافته پایداری و اتصال بهتری را در مقایسه با نمونه طبیعی ارائه می‌دهد و می‌تواند گزینه مناسبی برای مطالعات تجربی در آینده باشد.

۵- منابع

[1] Suhng Wook Kim et al. "Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from

- 2019, pp. 429–455.
- [11] Schrödinger, LLC. “The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8”. 2015.
- [12] Elmar Krieger and Gert Vriend. “YASARA View - molecular graphics for all devices - from smart- phones to workstations”. en. In: *Bioinformatics* 30.20 (Oct. 2014), pp. 2981–2982.
- [13] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. “VMD – Visual Molecular Dynamics”. In: *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996), pp. 33–38.
- [14] N A Baker et al. “Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome”. en. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98.18 (Aug. 2001), pp. 10037–10041.
- [15] Rashmi Kumari et al. “g_mmpbsa—a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations”. en. In: *J. Chem. Inf. Model.* 54.7 (July 2014), pp. 1951–1962.
- [16] Shahid Ali et al. “Identification and Evaluation of Inhibitors of Lipase from *Malassezia restricta* using Virtual High-Throughput Screening and Molecular Dynamics Studies”. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (Feb. 2019), p. 884.
- [17] P. Sneha and C. George Priya Doss. “Chapter Seven - Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine”. In: *Personalized Medicine*. Ed. by Rossen Donev. Vol. 102. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Academic Press, 2016, pp. 181–224.
- [18] Katie A Wilson, Jennifer L Kellie, and Stacey D Wetmore. “DNA-protein π -interactions in nature: abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar”. en. In: *Nucleic Acids Res.* 42.10 (June 2014), pp. 6726–6741.
- [19] Reena Kumari and Vikram Dalal. “Identification of potential inhibitors for LLM of *Staphylococcus aureus*: structure-based pharmacophore modeling, molecular dynamics, and binding free energy studies”. en. In: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 40.20 (Nov. 2022), pp. 9833–9847.
- [20] João Victor da Silva Guerra et al. “ParKVFinder: A thread-level parallel approach in biomolecular cavity detection”. en. In: *SoftwareX* 12.100606 (July 2020), p. 100606.
- Pyrococcus furiosus”. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 42.4 (2008), pp. 356–361. ISSN: 0141-8130.
- [2] Rafał Płoski. “Chapter 1 - Next Generation Sequencing—General Information about the Technology, Possibilities, and Limitations”. In: *Clinical Applications for Next-Generation Sequencing*. Ed. by Urszula Demkow and Rafał Płoski. Boston: Academic Press, 2016, pp. 1–18. ISBN: 978-0-12-801739-5.
- [3] M. Datto and R.L. Lundblad. “DNA, RNA Chemical Properties (Including Sequencing and Next- Generation Sequencing)”. In: *Encyclopedia of Cell Biology*. Ed. by Ralph A. Bradshaw and Philip D. Stahl. Waltham: Academic Press, 2016, pp. 24–35. ISBN: 978-0-12-394796-3.
- [4] Connie M. Westhoff. “Chapter 24 - Molecular DNA-Based Blood Group Typing”. In: *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)*. Ed. by Beth H. Shaz, Christopher D. Hillyer, and Morayma Reyes Gil. Third Edition. Elsevier, 2019, pp. 131–138. ISBN: 978-0-12-813726-0.
- [5] Urszula Demkow. “Chapter 13 - Next Generation Sequencing in Undiagnosed Diseases”. In: *Clinical Applications for Next-Generation Sequencing*. Ed. by Urszula Demkow and Rafał Płoski. Boston: Academic Press, 2016, pp. 259–269. ISBN: 978-0-12-801739-5.
- [6] Janice Cline, Jeffery C. Braman, and Holly H. Hogrefe. “PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases”. In: *Nucleic Acids Research* 24.18 (Sept. 1996), pp. 3546–3551. ISSN: 0305-1048.
- [7] Zhanghui Sun and Jin Cai. “Purification of recombinant Pfu DNA polymerase using a new JK110 resin”. en. In: *Korean J. Chem. Eng.* 23.4 (July 2006), pp. 607–609.
- [8] Kirk Nielson, Gina Costa, and Jeffrey Braman. “Optimization of PCR Using Pfu DNA Polymerase”. In: *Strategies* 9 (Jan. 1996), pp. 24–25.
- [9] “The Polymerase Chain Reaction”. In: *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, pp. 1–7. ISBN: 978-1-4020-6241-4.
- [10] Rajesh Kumar et al. “Adenovirus DNA Polymerase”. In: *Viral Polymerases*. Elsevier,

disease using computational approaches”. en. In: J. Genet. Eng. Biotechnol. 19.1 (May 2021), p. 61.

[23] Andrey R Pavlov et al. “Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications”. en. In: Trends Biotechnol. 22.5 (May 2004), pp. 253–260.

[21] Bipasa Kar et al. “Discovery of phyto-compounds as novel inhibitors against NDM-1 and VIM-1 protein through virtual screening and molecular modelling”. In: Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 41 (Dec. 2021), pp. 1–14.

[22] Rohit Shukla and Tiratha Raj Singh. “High-throughput screening of natural compounds and inhibition of a major therapeutic target HsGSK-3 β for Alzheimer’s

The role of A501 mutation in processivity improvement of PFU DNA polymerase

Rayeh Vafae¹, Seyed Shahriar Arab^{1*}

1. Biophysics Department, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

sh.arab@modares.ac.ir

Receipt: 2024/05/29

Accepted: 2024/09/09

Abstract

The Pfu DNA polymerase enzyme has the lowest error rate in the replication process during PCR. However, the drawback of this enzyme is its low processivity, which leads to halting after adding approximately 20 nucleotides at the end of the primer from the DNA template strand. Here we have studied and compared structurally and sequentially the PFU DNA polymerase and DNA polymerases in a same family with highest processivity and designed some mutations by rational design to improve processivity of the enzyme with the lowest entropy and enthalpy costs. In this investigation, conformational and behavioral changes have been studied by Molecular Dynamics simulation and for more precise information, free binding energy is calculated and the result shows that the mutant is willing to bind more tightly than native enzyme.

Keyword: DNA polymerase PFU, Molecular Dynamics, Processivity of enzyme