مقاله تحقیقی

شناسایی جهش‌های پایدارکننده ساختارآنزیم لوسیفراز گونه ایرانی به‌وسیله روش‌های بیوانفورماتیک و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

علیرضا خندابی [۱]، حسن صاحب‌جمعی [۲،*]، فهیمه باغبانی‌آرانی [۱]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۲. گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات:** sahebjam.has@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۶/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۵- شماره ۳- پاییز۱۳۹۹

چکیده

آنزیم لوسیفراز در واکنش بیولومینسانس (نشر نور توسط موجودات زنده) دخالت دارد. این آنزیم به‌عنوان گزارشگر ژنی در تصویربرداری *in vivo* کاربردهای فراوانی دارد. علی‌رغم کاربردهای فراوان و تشخیصی آنزیم لوسیفراز، چندین عامل هم‌چون پایداری پایین لوسیفراز نسبت به حرارت و K_m بالا برای سوبسترای ATP استفاده از آن را محدود کرده است. با توجه به پایداری پایین آنزیم لوسیفراز مطالعه حاضر جهت ارزیابی تاثیر جهش‌های تک اسیدآمینه بر پایداری آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس[۱] با استفاده از وب‌سرورهای بیوانفورماتیک و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی صورت گرفت. برای این منظور ابتدا جهت تعیین پایداری، جهش‌ها با استفاده از وب‌سرورهای I-Mutant-2، Pop-music، Cupsat، istable، MUpro و ابزارهای Protparam و foldx تحت نرم‌افزار Yasara بررسی شد. وب سرورها و foldx پیش‌بینی کردند که دو جهش Q35L و H9M باعث پایداری ساختار می‌شوند. وب‌سرورPolyphen-2 هم پیشگویی کرد که این دو جهش در عملکرد آنزیم اثر مخرب ندارد. برای تایید بیش‌تر این دو جهش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد، که نتایج RMSD و RMSF و شعاع ژیراسیون و هیدروفوبیسیته هم نشان دادند که این جهش‌ها باعث پایداری این آنزیم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لوسیفراز، جهش، پایداری، دینامیک مولکولی.

[۱] *Lampyris turkestanicus*

مقدمه

بیولومینسانس از جالب‌ترین پدیده‌های زیستی در طبیعت بوده که گستردگی و تنوع فیلوژنتیکی زیادی دارد. بیولومینسانس یک واکنش آنزیمی است که با واسطه آنزیم لوسیفراز و سوبسترای لوسیفرین انجام می‌پذیرد. آنزیم لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس یک آنزیم تک زیر واحدی بوده و نشر نور سبز را از لوسیفرین، در حضور اکسیژن، Mg^{2+} و ATP کاتالیز می‌کند (۱). این پروتئین، پلی‌پپتیدی با ۵۴۷ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۶۲ کیلودالتون است که دارای یک دمین N- ترمینال بزرگ (۴۳۵-۱) و یک دمین C- ترمینال کوچک است (۵۵۰-۴۴۱) و توسط یک لوپ انعطاف‌پذیر (۴۴۰-۴۳۶) به یکدیگر متصل می‌شوند (۲).

از آن‌جایی‌که اندازه‌گیری‌ها براساس واکنش آنزیم لوسیفراز سریع، حساس و غیررادیوکتیو هستند، استفاده از این آنزیم کاربردهای گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی ازجمله تشخیص ATP، تهیه کیت تشخیص سرطان و گزارش‌گرهای ژنتیکی داشته است (۳). با وجود کاربردهای متعدد، آنزیم لوسیفراز به‌خصوص در مطالعات *invivo* به‌وسیله چند فاکتور محدود می‌شود. به‌طوری‌که آنزیم به‌سرعت و به‌صورت برگشت‌ناپذیر در دمای اتاق فعالیت خود را از دست می‌دهد که این ویژگی تقریباً بر تمام کاربردهای این آنزیم اثرات نامطلوبی دارد (۴). در هنگام استفاده از لوسیفراز در محیط *invitro* می‌توان با اضافه نمودن پایدارکننده‌های آنزیمی از قبیل گلیسرول، سولفات آمونیوم و اسمولیت‌های دیگر بر مشکلات ناپایداری آنزیم غلبه کرد (۵). اما استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین و ایجاد لوسیفراز جهش یافته با ویژگی‌های مطلوب، تنها راه حل مفید و اساسی برای غلبه بر این مشکل، به‌منظور کاربرد آن در محیط‌های *invivo* به‌شمار می‌رود (۶). بر همین اساس در سال ۲۰۱۱، مرتضوی و همکاران با استفاده از تکنیک جهش‌زایی هدفمند نشان دادند که در گونه لوسیفراز ایرانی با جایگزینی تکی یا هم‌زمان چندین رزیدوی آب‌گریز سطحی در موقعیت‌های ۱۸۲ و ۲۳۲ پایداری دمایی لوسیفرازهای جهش یافته افزایش یافته است (۷).

مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم‌ها یکی از روش‌های موثر و مفید در شناسایی خصوصیات ساختاری و عملکردی آنزیم‌ها می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان تاثیر جهش بر روی پایداری و عملکرد آنزیم‌ها را بررسی کرد. اطلاعات به‌دست آمده توسط این روش دید مناسبی نسبت به آنزیم مورد نظر برای طراحی و مهندسی پروتئین ایفا می‌کند (۸). از آن‌جایی‌که بررسی وقایع در سطح مولکولی به‌وسیله روش‌های آزمایشگاهی بسیار پیچیده، پرهزینه و زمان‌بر است بنابراین یک محقق با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و دینامیک مولکولی توانایی طراحی هدفمند و سریع‌تر را به‌دست می‌آورد.

با توجه به اهمیت پایدارسازی آنزیم لوسیفراز، در تحقیق حاضر جهش‌های موثر ابتدا با استفاده از وب‌سرورهای بیوانفورماتیک به‌دست آمد سپس تاثیر این جهش‌ها را با استفاده از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد.

مواد و روش ها

با توجه به این‌که ساختار پروتئین لوسیفراز گونه ایرانی به‌روش کریستالوگرافی تعیین شده است، از ساختار تعیین شده این پروتئین از پایگاه PDB با کد 4M46 برای این تحقیق استفاده شد. جهش و بهینه‌سازی ساختار آنزیم با استفاده از برنامه کایمرا[۲] و تنظیمات Steepest descent 1000 و Conjugated gradient=500 انجام شد. سپس ساختارهای جهش یافته و بهینه برای پیشگویی‌های پایداری در وب‌سرورها مورد استفاده قرار گرفتند.

از جمله روش‌های بسیار مهم جهت بررسی اثر یک جهش بر روی ساختار و عملکرد یک پروتئین، محاسبه مقدار انرژی آزاد پروتئین جهش یافته و مقایسه با انرژی آزاد پروتئین طبیعی است. این موضوع به‌روش‌های مختلف و با استفاده از وب‌سرورها و ابزارهای بیوانفورماتیک صورت می‌گیرد که ازجمله این وب‌سرورها ی مهم شامل Mutant-2، Pop-music، Cupsat، istable، MUpro (۹ و ۱۰) و ابزار foldx می‌باشد (۱۱). مقایسه پارامترهای فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های طبیعی با جهش یافته به‌وسیله ابزار Protparam (۱۲) در وب‌سرور EXPASY انجام شد. وب‌سرور PolyPhen-2 تاثیر احتمالی جایگزینی یک آمینواسید بر روی میزان عملکرد پروتئین را با درنظر گرفتن ملاحظات تکاملی و ساختاری پروتئین بررسی می‌کند. Polyphen-2 جهش‌ها و جایگزینی‌ها را براساس

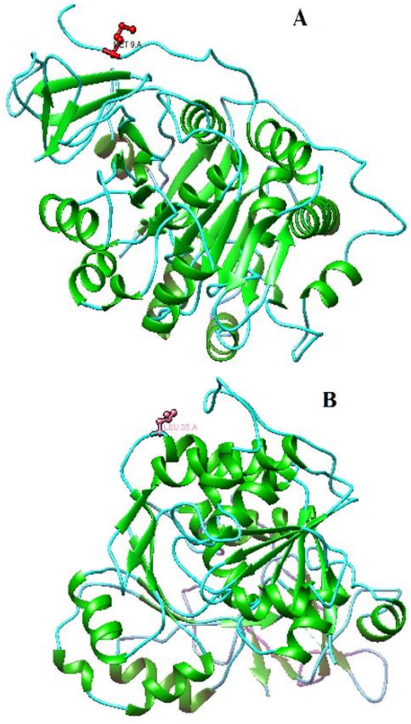
[۲] Chimera

شاخص عددی تحت عنوان" شماره مستقل مخصوص مکان" PSIC به سه فرم Benign، Probably damaging و Possibly damaging تقسیم می‌کند. این شاخص عددی دارای عددهای مختلف بین ۰ و ۱ است به‌طوری‌که هر چه عدد به یک نزدیک‌تر باشد، جهش مخرب‌تر است (شکل‌های ۶ و ۷). این ابزار جهش‌ها را به عنوان "بی‌خطر"، "مخرب" یا "احتمالاً مخرب" طبقه-بندی می‌کند (۱۳).

در این تحقیق تمام محاسبات مربوط به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GROMACS نسخه ۵.۴.۱ تحت سیستم عامل لینوکس اوبنتو انجام شد (۱۴). شبیه‌سازی‌ها با درنظر گرفتن مولکول‌های حلال در جعبه مکعبی شکل با ۲۵۰۳ مولکول آب انجام شد. فاصله از کنار جعبه مکعبی شکل یک نانومتر تنظیم شد. برای خنثی کردن بار سطحی مولکول و نزدیک شدن به شرایط طبیعی، سه یون کلر به‌جای مولکول‌های آب به سیستم اضافه گردید. در این شبیه‌سازی از مدل میدان نیرو AMBER03 و مولکول در محیط آبی با مدل TIP3P استفاده شد. سپس انرژی ساختارها به‌وسیله الگوریتم Steepest Descent در ۱۰۰۰ steps کمینه‌سازی انرژی انجام شد (۱۵). در حالت تعادل هنگرد NVT با ثابت دمایی 310K برای ۵۰۰ps و هنگرد NPT با ثابت فشار ۱bar در ۵۰۰ps به‌کار برده شد. برای کوپلینگ دما و فشار الگوریتم‌های Berendsen (۱۶) و Parrinello-Rahman (۱۷) اعمال شد و فرایند محدودیت مکانی در مراحل هنگردهای NVT و NPT به‌کار برده شد. زمان شبیه‌سازی ۶۰ نانوثانیه و گام‌ها ۲ پیکوثانیه درنظر گرفته شد. برای آنالیز نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از نرم‌افزارهای XMGRACE و VMD استفاده شد. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به‌صورت ریشه میانگین مجذور انحراف‌ها (RMSD)، ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF)، شعاع ژیراسیون (R_{gyr})، سطح در دسترس حلال (SASA) و DSSP[۳] مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

دو جهش Q35L (تبدیل اسیدآمینه گلوتامین ۳۵ به اسیدآمینه لوسین) و H9M (تبدیل اسیدآمینه هیستیدین به متیونین) از بین تمام جهش‌های پیشگویی شده در تمام وب‌سرورها نشان داد که باعث پایداری می‌شوند بدین‌صورت که نتایج وب‌سرور PopMusic برای جهش‌های Q35L و H9M به‌ترتیب برابر ΔΔG=-۰/۰۶ و ΔΔG=-۰/۰۷ به‌دست آمد بر طبق راهنمای این وب‌سرور نتایج ΔΔG کوچک‌تر از صفر بدین معنا است که آن جهش باعث پایداری شده است. نتایج foldx برای پروتئین طبیعی ΔΔG=66.46 kcal/mol و برای جهش Q35L برابر با ΔΔG=62.35 kcal/mol و برای جهش H9M برابر با ΔΔG=63.76 kcal/mol به‌دست آمد. نتیجه وب‌سرور Cupsat برای جهش Q35L و H9M افزایش پایداری و از لحظ زاویه‌ای[۴] مناسب ارزیابی شد. نتایج وب سرورهای I-Mutant2، Mupro، istable برای جهش‌های Q35L و H9M بیانگر افزایش پایداری آنزیم می‌باشد. جهش‌هایی که در آن مقدار ΔΔG بیش‌تری کاهش یافته، بیانگر این است که جهش مربوطه اثر احتمالی بیش‌تری بر روی پایداری ساختار پروتئین دارد. در شکل ۱ محل جهش‌ها در ساختار آنزیم مشخص شده است.



شکل ۱- موقعیت اسیدهای آمینه جهش یافته در ساختار پروتئین (H9M:A، Q35L:B).

[۳] Definition of Secondary structure of proteins

[۴] torsion

میانگین RMSD در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی برای پروتئین طبیعی و موتانت‌ها در جدول زیر آورده شده است (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین RMSD

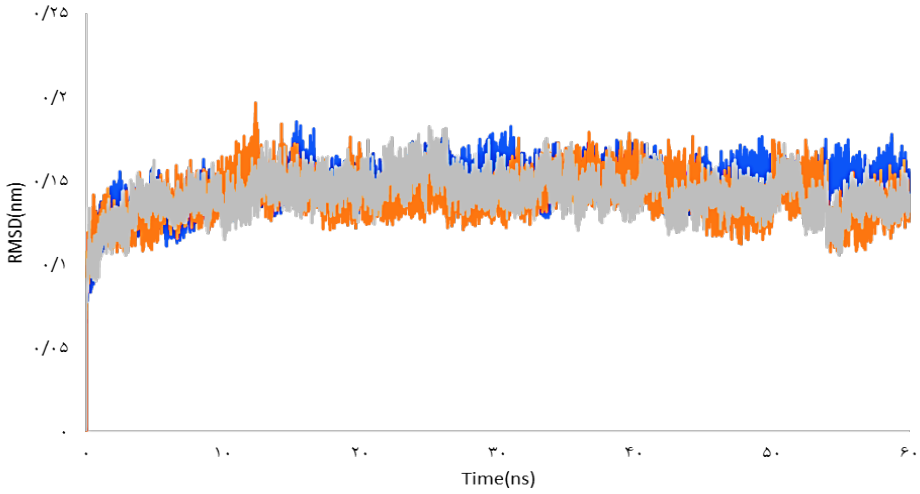
Enzymes	Wild type	Q35L	H9M
Average of RMSD	0.151	0.141	0.141

شکل ۳ نتایج RMSF برای هر رزیدیو در آنزیم را نشان می‌دهد. تحت تاثیر جهش‌های Q35L و H9M میزان RMSF یا نوسانات در اسیدآمینه‌های ۹ تا ۲۰ به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به پروتئین طبیعی کاهش یافته است.

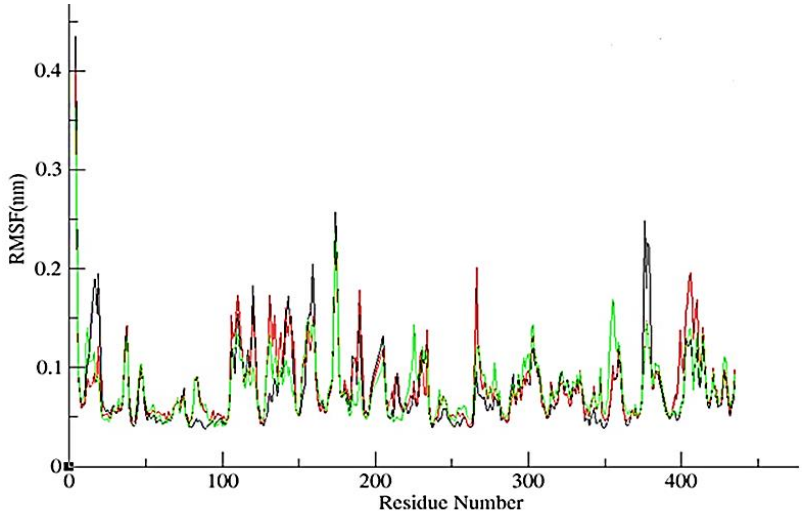
هم‌چنین در اسیدآمینه‌های ۳۶۰ تا ۳۸۰ میزان نوسانات پروتئین‌های جهش یافته کم‌تر شده است. برطبق شکل ۴ شعاع ژیراسیون در پروتئین‌های جهش یافته کم‌تر از پروتئین طبیعی شده است. میانگین شعاع ژیراسیون در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی در جدول ۲ قرار داده شده است.

جدول ۲- میانگین شعاع ژیراسیون.

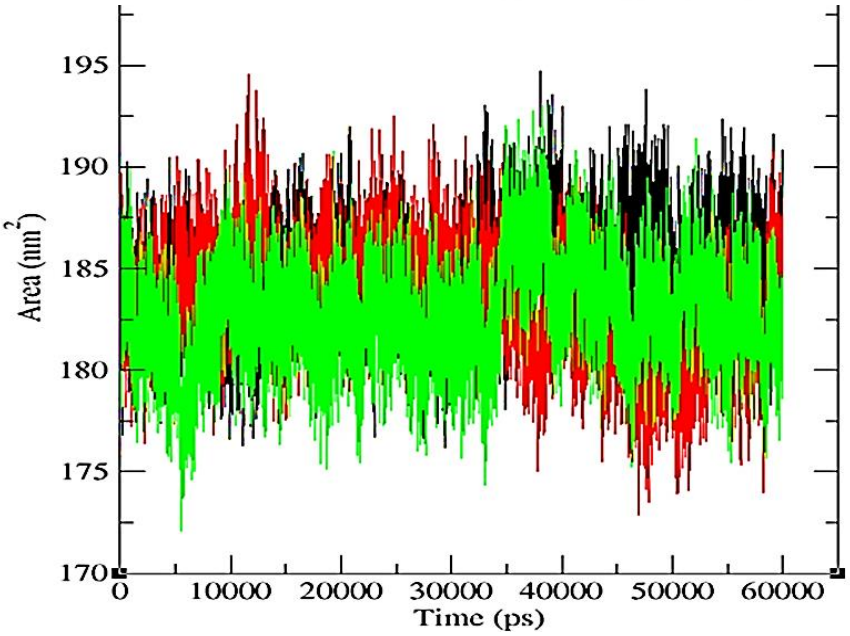
Enzymes	Wild type	Q35L	H9M
Average of R_{gyr}	1.813	1.715	1.766



شکل ۲- ریشه میانگین انحراف کربن آلفا در آنزیم لوسیفراز در پروتئین طبیعی (خط آبی)، جهش Q35L (خط نارنجی) و جهش H9M (خط طوسی).



شکل ۳- ریشه میانگین نوسانات کربن آلفا آنزیم لوسیفراز در پروتئین طبیعی (خط مشکی)، جهش Q35L (خط قرمز) و جهش H9M (خط سبز).



شکل ۵ - سطح در دسترس حلال آنزیم لوسیفراز در مدت ۶۰ نانوثانیه پروتئین طبیعی (خط مشکی)، جهش Q35L (خط قرمز) و جهش H9M (خط آبی).

بر طبق شکل ۵ و جدول ۳ سطح در دسترس حلال پروتئین‌های جهش یافته به‌مقدار کمی کاهش یافته است. میانگین سطح در دسترس حلال در ۳۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی در جدول زیر قرار داده شده است.

جدول ۳- میانگین سطح در دسترس حلال

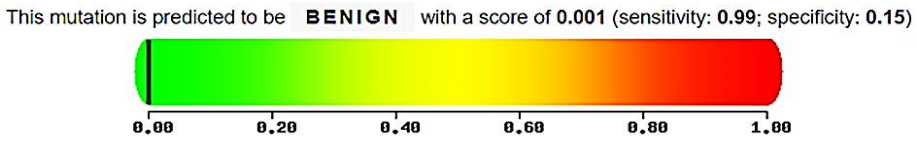
Enzymes	Wild type	Q35L	H9M
Average of SASA	185.74nm	182.19nm	183.33nm

نتایج هیدروفوبیسیته ابزار Protparam در جدول ۴ قرار داده شده است.

جدول ۴- مقدار هیدروفوبیسیته

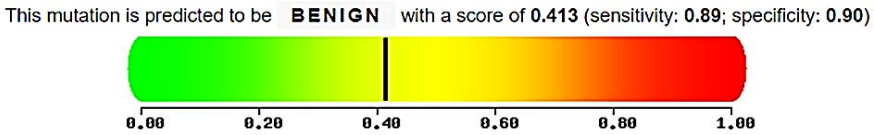
Enzymes	Wild type	Q35L	H9M
Average of Hydrophobicity	-0.117	-0.105	-0.108

طبق نتایج وب‌سرور polyphen-2 (شکل‌های ۶ و۷) جهش‌های Q35L و H9M بی‌خطر پیشگویی شده است. از پارامتر DSSP برای تعیین محتوای ساختار دوم پروتئین به‌عنوان تابعی از زمان استفاده می‌شود. این آنالیز ساختار دوم را برای هر رزیدو در هر گام زمانی تعیین می‌کند و امکان تجسم بهتری از داده‌ها را فراهم می‌آورد. شکل ۸ داده‌های DSSP پروتئین طبیعی و پروتئین‌های جهش یافته را نشان می‌دهد. در پروتئین‌های جهش یافته در رزیدوی ۲ تا ۴ در ۱۰ns آخر زمان شبیه‌سازی تبدیل کویل به پیچ مشاهده می‌شود. در رزیدوی ۱۸ تا ۲۰ در ۱۰ns آخر زمان شبیه سازی تبدیل کویل به حالت خم مشاهده می‌شود. در بقیه نواحی تفاوت چندانی بین پروتئین طبیعی و جهش یافته مشاهده نمی‌شود.

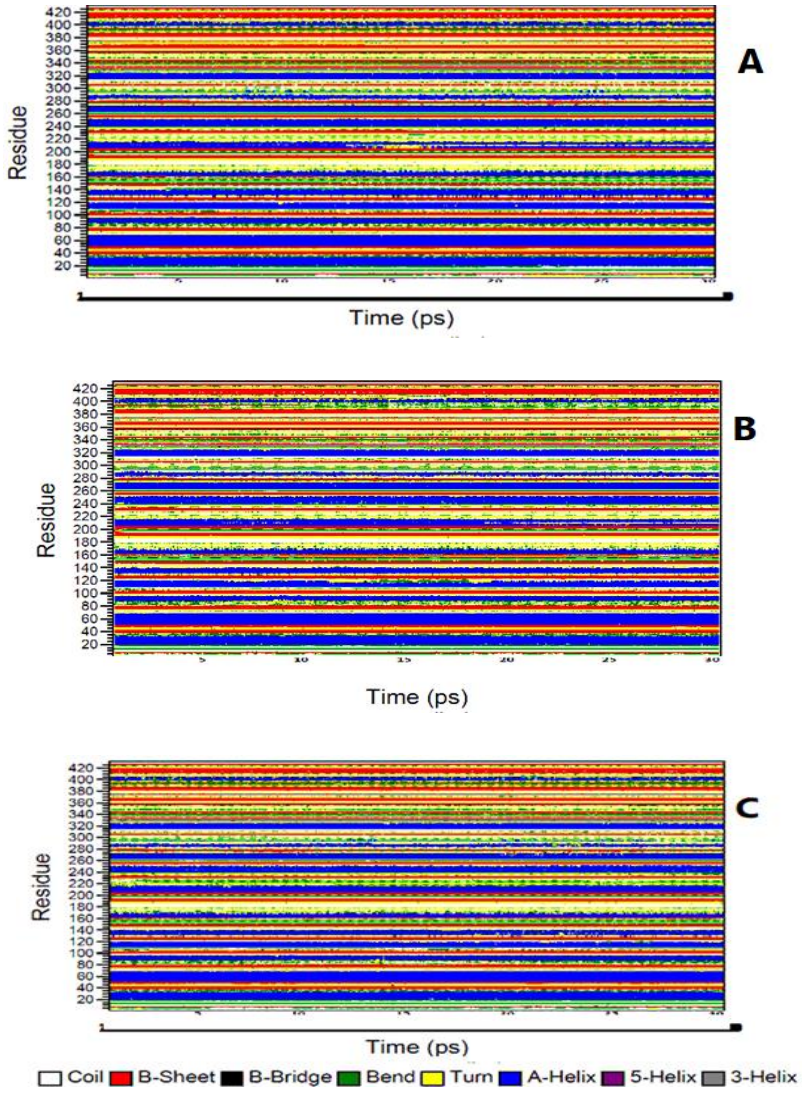


شکل ۶- پیشگویی وب‌سرور polyphen-2 برای جهش Q35L.

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۵- شماره ۲- پاییز۱۳۹۹



شکل ۷- پیشگویی وب‌سرور polyphen-2 برای جهش H9M.



شکل ۸- نمایش DSSP (تغییرات ساختار دوم) پروتئین طبیعی (A)، جهش Q35L (B) و جهش H9M (C).

بحث

امروزه در حوزه علوم زیستی، از بیولومینسانس برای شناسایی و مشاهده فرایندهای بیولوژیکی می‌توان استفاده کرد. هم‌چنین می‌توان ژن لوسیفراز را از طریق مهندسی ژنتیک به‌داخل سیستم‌های زنده برای اهداف بیولوژیک خاص منتقل کرد (۱۸). هزینه کم، حساسیت زیاد، سادگی و غیر تهاجمی بودن ازجمله مزایای بیولومینسانس نسبت به تکنیک‌های دیگر مثل فلئورسانس است. با توجه به پایداری اندک آنزیم لوسیفراز در دمای فیزیولوژیک بدن

و این‌که هیچ نمونه گرمادوستی از آنزیم لوسیفراز وجود ندارد، تنها راه حل مفید و اساسی برای افزایش پایداری لوسیفراز به منظور کاربرد آن در محیط‌های *invivo* طراحی لوسیفرازهای جهش یافته با ویژگی‌های مطلوب با استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین است (۱۹و۲۰). پایداری دمایی لوسیفراز گونه ایرانی لامفیریس ترکستانیکوس به‌وسیله جایگزینی هم‌زمان چندین رزیدوی در موقعیت‌های ۳۵، ۱۸۲ و ۲۳۲ بررسی شده و نشان داده شده که منجر به پایداری دمایی لوسیفرازهای جهش یافته می‌شود. افزایش میانکنش‌های یونی بین مولکول‌های پروتئین و حلال‌قطبی به‌عنوان تفسیر و توضیحی برای این نتایج ارائه شده است (۷). در این تحقیق، با توجه به اهمیت پایدارسازی آنزیم لوسیفراز و اهمیت بررسی پس از مشخص کردن اثر جهش‌ها از ساختار کریستالی لوسیفراز وحشی با کد بانک اطلاعی پروتئین (PDB code) 4M46 به‌عنوان الگو برای مدل‌سازی هر یک از جهش یافته‌ها استفاده شد. نتایج وب‌سرورهای I-Mutant، Pop-music، Cupsat، istable، MUpro، و foldx تحت‌نرم‌افزار Yasara نشان داد که جهش‌های Q35L و H9M انرژی منفی‌تری نسبت به سیستم طبیعی دارند و این بدین معناست که نسبت به سیستم طبیعی پایدارترند. نتایج وب سرور Protparam هم نشان داد که جهش‌ها باعث افزایش هیدروفوبیسیته می‌شوند. دقت ابزارها و وب‌سرورهای پیشگویی بین ۵۰ تا ۸۰ درصد است سپس برای تایید نتایج این دو جهش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی صورت گرفت. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داد که جهش‌های Q35L و H9M نسبت به پروتئین طبیعی مقدار RMSD در ۳۰ نانوثانیه انتهای شبیه‌سازی کاهش یافته است یعنی جهش‌ها پایداری آنزیم را افزایش داده است. در جهش H9M میزان RMSF کاهش شدیدی در رزیدوهای اطراف این جهش دارد. در جهش Q35L میزان RMSF در رزیدوهای ۳۶۰ تا ۳۸۰ کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است. در بقیه رزیدوها تفاوت چندانی بین سیستم طبیعی و جهش یافته وجود ندارد. پارامتر SASA در واقع ناحیه سطح بیومولکول است که در دسترس حلال قراردارد. میزان SASA در ۳۰ نانوثانیه پایانی سیستم جهش یافته مقداری کم‌تر از سیستم طبیعی است. بر طبق نتایج DSSP به‌طورکلی می‌توان گفت که جهش‌ها تغییرات ساختار دوم چندانی ایجاد نمی‌کنند. شعاع ژیراسیون میزان فشردگی پروتئین را محاسبه می‌کند. شعاع ژیراسیون مربوط به پروتئین‌های جهش یافته میزان کم‌تری از سیستم طبیعی دارد و در محدوده ۱۸۲ تا ۱۸۳ نانومتر قرار می‌گیرد. این کم‌تر شدن شعاع ژیراسیون در پروتئین‌های جهش یافته بیانگر این است که ساختار مولکول کمی فشرده‌تر شده است. لوسین و متیونین آمینواسیدهای غیرقطبی هستند درصورتی که آمینواسیدهای گلوتامین قطبی بدون بار و هیستیدین قطبی باردار هستند جهش اسیدآمینه‌های قطبی به غیرقطبی احتمالاً میاکنش‌های هیدروفوبیک پروتئین را بیش‌تر کرده و باعث پایداری بیش‌تر ساختار شده است.

در کل به‌نظر می‌رسد جهش‌های اسیدآمینه گلوتامین به‌لوسین در موقعیت ۳۵ و اسیدآمینه هیستیدین به متیونین در موقعیت ۹ ساختار آنزیم باعث افزایش پایداری پروتئین، کاهش انعطاف‌پذیری رزیدوها در بعضی مناطق و افزایش هیدروفوبیسیته آنزیم لوسیفراز می‌شود. بنابراین با توجه به نتایج ذکر شده به‌نظر می‌رسد انتقال رزیدوی هیدروفوب به نواحی داخلی‌تر باعث فشردگی بیش‌تر ساختار پروتئین شده و ساختار پروتئین را پایدارتر می‌کند.

تقدیر و تشکر

نتایج مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا می باشد.

منابع مورد استفاده

1. Mortazavi, M., Hosseinkhani, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Emamzadeh, A.R., 2008. Spectroscopic and functional characterization of lampyris turkestanicus luciferase: A comparative study. Acta Biochim Biophys Sin [Shanghai]. 40(5):365-374.

2. Ganjalikhany, M.R., Ranjbar, B., Hosseinkhani, S., Khalifeh, K., Hassani, L., 2010. Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase. J Mol Catal B Enzym. 62(2):127-132.

3. Lundin, A., 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes and metabolites. Method Enzymol 305:346-370.
4. Solgi, Z., Khalifeh, Kh., Hosseinkhani, S., Ranjbar, B., 2018. Comparison of Thermodynamic Stability and Kinetic Refolding of Lampyris turkestanicus and Some of Its Mutants. Modares Journal of Biotechnology 9(3):417-425.
5. Mehrabi, M., Hosseinkhani, S., Ghobadi, S., 2008. Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes. Int J Biol Macromol 43(2):187-191.
6. Maghami, P., Ranjbar, B., Hosseinkhani, S., Ghasemi, A., Moradi, A., Gill, P., 2010. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. Photochem Photobiol Sci 9(3):376-383.
7. Mortazavi, M., Hosseinkhani, S., 2011. Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent exposed loops. Protein Eng Des Sel 24(12):893-903.
8. Hildebrand, P.W., Rose, A.S., Tiemann, J.K., 2019. Bringing molecular dynamics simulation data into view. Trends in Biochemical Sciences 44(11):902-913.
9. Kamaraj, B., Rituraj, P., 2013. *In Silico* Screening and molecular dynamics simulation of disease- associated nsSNP in TYRP1 gene and its structural consequences in OCA3. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, ID 697051.
10. Bromberg, Y.R., 2007. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. Nucleic Acids Res 35: 3823-3835. PMID: 17526529.
11. Bub, O., Rudat, J., Ochsenreither, K., 2018. FoldX as protein engineering tool: better than random based approaches? Computational and Structural Biotechnology Journal 16: 25-23.
12. Garg, V.K., Avashthi, H., Tiwari, A., Jain, P.A., Ramkete, P.W., Kayastha, A.M., Singh, V.K., 2016. MFPPI- multi FASTA protparam interface. Bioinformation 12(2): 74-77.
13. Ng, P.C., Henikoff, S., 2006. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. AnnuRev Genomics Hum Genet 7:61-80.
14. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D., 2001. GROMACS: a package for molecular simulation and trajectory analysis. Molecular modeling annual 7: 306-317.
15. Li, Z., Wei, X., Zhao, Q., 2019. Scaled alternating steepest descent applied for protein structure determination from nuclear magnetic resonance data. J Comput Biol 26(9): 1020-1029.
16. Margaf, J.T., Hennemann, M., Clark, T., 2020. EMPIRE: A highly parallel semiempirical molecular orbital program: 2: Born-Oppenheimer molecular dynamics. Journal of Molecular Modeling 26(3): 43.
17. Miller, R.E., Tadmor, E.B., Gibson, J.S., Bernstein, N., Pavia, F., 2016. Molecular dynamics at constant Cauchy stress. J Chem Phys 144(18): 184107.
18. Mortazavi, M., Hosseinkhani, S., Torkzadeh-Mahani, M., Lotfi, S., Emamzadeh, R., 2020. Molecular docking and bioinformatics study of rare codons in the Lampyroidea maculate luciferase gene. Modares Journal of Biotechnology 11(2): 145-154.
19. DeLuca, M., McElroy, W.D., 1974. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions.Biochemistry 13(5): 921-925.
20. Zhou, X.X., Wang, Y.B., Pan, Y.J., Li, W.F., 2008. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. Amino Acids 34(1): 25-33.