Engineering of Dihydroxy Biphenyl Dioxygenase Enzyme to Improve Its Performance In Removing PCBs: A Molecular Docking Study

Susan Yazdankhah[1], Alireza Zakeri [2], Saeed Khalili[3], Abolfazl Jahangiri [4], Zahra Sadat Hashemi [5], Alireza Heidari [6]

1. MSc student, Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0009-0005-7678-1872
2. Assistant Professor, Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: 021-22970047, Email: zakeri@sru.ac.ir ORCID ID: 0000-0002-5718-6999
3. Associate Professor, Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3820-6242
4. Assistant Professor, Applied Microbiology Center, Research Institute for Systems Biology in Toxicology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7263-901x
5. Assistant Professor, ATMP Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6353-987x
6. MSc student, Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0009-0005-8817-1502

ABSTRACT

Background and Aim: Polychlorinated biphenyls (PCB) industrial pollutants are one of the most important environmental pollutants whose removal is very important. PCBs are degraded biologically by several enzymes and in a multi-step process. One of these enzymes is called DHBD (2,3-dihydroxy biphenyl 1,2-dioxygenase) and is encoded by the BphC gene. Enhancing the function of the enzyme and reducing the binding affinity of the enzyme to the inhibitor (tert-butanol) will improve the function of the enzyme and increase its efficiency. This research has been carried out in bioinformatics to strengthen the enzyme and weaken the inhibitory effect through mutation in the amino acids of the active site.

Materials and Methods: The amino acid sequence of the enzyme was obtained from the UniPprot database and to check similar sequences with PSI-BLAST method, similar sequences were searched from close to distant protein species. By performing multiple alignments of PSI-BLAST sequences, 250 sequences were matched. The results of sequencing the amino acids of the active site showed that some sites have variable amino acids and were used as candidates for mutagenesis. The position of the T-Butanol inhibitor was simulated using DISCOVERY software.

Results: By molecular docking with PYRX software between the wild enzyme and the substrate, the binding energy -6.2 Kcalmol-1and for the candidates of mutations resulting from the alignment, Phenylalanine 201 to Threonine (6. 9 Kcalmol-1) and Threonine 280 to serine (6. 8 Kcalmol-١) Calculated.

Conclusion: The more negative binding energy indicates the greater stability of this interaction in the mutant enzyme. As a result, these mutations will be able to improve the strength of the enzyme function. The simulation of the position of the inhibitor and the starting material in the enzyme showed that the distance of the inhibitor from the active site and the starting material is likely to be favorable if the interaction of the inhibitor on the amino acids of the active site is reduced and as a result, the binding stability of the biphenyl starting material with the enzyme is increased. Decreasing the inhibitory power will increase the catalytic power of the enzyme in the destruction of PCBs.

Keywords: Mutagenicity, Inhibitors, Informatics, PCBs

Received: Aug 7, 2023 **Accepted:** Feb 6, 2024

How to cite the article: Susan Yazdankhah, Alireza Zakeri, Saeed Khalili, Abolfazl Jahangiri, Zahra Sadat Hashemi, Alireza Heidari. Engineering of Dihydroxy Biphenyl Dioxygenase Enzyme with The Aim of Improving Its Performance In Removing PCBs: A Molecular Docking Study. SJKU 2024;29(4):25-38.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / مهر و آبان ۱۴۰۳/۳۸-۲۵

مهندسی آنزیم دی هیدروکسی بی‌فنیل دی اکسیژناز با هدف بهبود عملکرد آن در حذف آلودگی PCBs: یک مطالعه داکینگ مولکولی

سوسن یزدان خواه[۱]، علیرضا ذاکری[۲]، سعید خلیلی[۳]، ابوالفضل جهانگیری[۴]، زهرا السادات هاشمی[۵]، علیرضا حیدری[۶]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران. کد ارکید: ۱۸۷۲-۷۶۷۸-۰۰۰۵-۰۰۰۹

۲. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: zakeri@sru.ac.ir، تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۰۰۴۷ ، کد ارکید: ۶۹۹۹-۵۷۱۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳.دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران. کد ارکید: ۶۲۴۲-۳۸۲۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۴. استادیار، مرکز میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران. کد ارکید: x-۰۰۰۲-۷۲۶۳-۹۰۱-۰۰۰۰

۵. استادیار، دپارتمان توسعه فناوری درمان‌های نوین، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران . کد ارکید: ۰۰۰۰x-۰۰۰۱-۶۳۵۳-۹۸۷

۶. دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران. کد ارکید: ۱۵۰۲-۸۸۱۷-۰۰۰۵-۰۰۰۹

چکیده

زمینه و هدف: آلاینده‌های صنعتی پلی کلرو بی‌فنیل‌ها (PCB)، جزء مهم‌ترین آلاینده‌هایی محیط‌زیست هستند که حذف آن‌ها اهمیت فراوانی دارد. تخریب PCBs به روش زیستی توسط آنزیم‌های متعدد و طی فرآیندی چند مرحله‌ای، صورت می‌گیرد. یکی از این آنزیم‌ها DHBD(۲و۳دی هیدروکسی بی‌فنیل ۱و۲ دی اکسیژناز) نام داشته و توسط ژن BphC رمزدهی می‌شود. تقویت عملکرد آنزیم و کاهش میل اتصال آنزیم به مهارکننده(ترت بوتانول) موجب بهبود عملکرد آنزیم و افزایش کارایی آن خواهد شد. این تحقیق، با هدف تقویت آنزیم و تضعیف اثر مهارکننده از طریق جهش در آمینواسیدهای سایت فعال، در فضای بیو انفورماتیک انجام شده است.

مواد و روش‌ها: توالی اسیدآمینه‌ای آنزیم از پایگاه داده UniPprot دریافت و به منظور بررسی توالی‌های مشابه با روش BLAST-PSI، توالی‌های مشابه از گونه‌های نزدیک تا دور پروتئین مورد جست‌وجو قرار گرفت. با انجام هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های حاصل از BLAST-PSI ، ۲۵۰ توالی منطبق گردید. نتایج هم‌ردیفی در آمینواسیدهای جایگاه فعال، نشان داد برخی جایگاه‌ها دارای اسیدآمینه متغیر بوده و به عنوان کاندید جهش‌زایی استفاده گردید. موقعیت مهارکننده T-Butanol با استفاده از نرم‌افزار DISCOVERY شبیه‌سازی شد.

یافته‌ها: با داکینگ مولکولی با نرم‌افزار PYRX بین آنزیم وحشی و ماده اولیه انرژی اتصال ۶/۲- کیلوکالری برمول و برای کاندیدهای جهش‌ها حاصل از هم‌ترازی، فنیل‌آلانین۲۰۱ به ترئونین(۶/۹- کیلوکالری برمول) و ترئونین ۲۸۰ به سرین(۶/۸- کیلوکالری برمول) محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: انرژی اتصال منفی‌تر، نشان از پایداری بیشتر این برهم‌کنش در آنزیم جهش یافته دارد. در نتیجه این جهش‌ها توان ارتقا قدرت عملکرد آنزیمی را خواهند داشت. شبیه‌سازی موقعیت مهارکننده و ماده اولیه در آنزیم، نشان داد که احتمالا فاصله مهارکننده از سایت فعال و ماده اولیه در صورتی مطلوب است که، برهم‌کنش مهارکننده بر روی آمینواسیدهای جایگاه فعال کاهش یافته و در نتیجه پایداری اتصال ماده اولیه بی‌فنیل با آنزیم افزایش یابد. کاهش قدرت مهارکننده باعث افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیم در تخریب PCBs خواهد شد.

کلمات کلیدی: جهش‌زایی، مهارکننده، بیو انفورماتیک، PCBs

وصول مقاله:۱۴۰۲/۵/۱۶ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۲/۱۰/۸ پذیرش:۱۴۰۲/۱۱/۱۷

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

مقدمه

پلی کلرو بی‌فنیل‌ها (Polychlorinated Biphenyls) با علامت اختصاری PCBs به عنوان آلاینده‌های آلی پایدار (POPs, persistent organic pollutants) شناخته می‌شوند(۱). پلی کلرو بی‌فنیل‌ها ترکیبات کلرداری هستند که بر اساس تعداد کلر موجود بر روی حلقه‌های بنزنی میزان سمیت و انحلال آن تعریف می‌شوند و از جمله آلاینده‌هایی هستند که در اثر فعالیت‌های انسانی وارد محیط زیست می‌شوند(۲). PCBs در ضایعات مصالح صنعتی و ساختمانی مانند رنگ‌ها، روان‌کننده‌ها، ترکیبات درزگیر، ضدحریق‌ها و همچنین به مقدار قابل توجهی در مکان‌های دپوی زباله‌های الکتریکی وجود دارند(۳).

مطالعه اپیدمیولوژیک نشان داده است که افرادی که در معرض غلظت بالای PCB قرار داشته‌اند دچار اختلال در سیستم ایمنی، بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، زوال عقل و نازایی شده‌اند(۳). سوزاندن یا دفن کردن PCBها گران است و اثرات زیست محیطی بسیار خطرناکی دارد(۴). یکی از بهترین راه‌کارهای حذف آلودگی‌های محیط‌زیست؛ تجزیه زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان می‌باشد. پالایش زیستی بی‌فنیل‌های پلی کلره با توجه به سمیت، سرطان‌زایی و پایداری آن‌ها در محیط، به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا، آنزیم‌های مختلف کاتابولیکی برای تجزیه بیولوژیکی ترکیبات مختلف PCB همراه با بهینه‌سازی فرایندهای بیولوژیکی شناسایی و گزارش شده‌اند(۵).

تجزیه میکروبی PCBs توسط میکروارگانیسم‌ها به دو روش تجزیه هوازی توسط باکتری‌های هوازی و هالوژن‌زدایی احیایی توسط ارگانیسم‌های بی‌هوازی صورت می‌گیرد. تجزیه هوازی شامل دو گروه از ژن‌ها می‌باشد گروه اول مسئول تبدیل شکل‌های مختلف PCB به اسیدبنزوئیک و گروه دوم مسئول تجزیه اسید بنزوئیک می‌باشند. ماده اولیه معمول رشد برای باکتری‌های تجزیه‌کننده PCB، بی‌فنیل یا مونو کلرو بی‌فنیل است(۶). اغلب باکتری‌ها، PCB را از طریق مسیر اصلی بی‌فنیل که توسط آنزیم DHBD است، تجزیه می‌کنند. این آنزیم باعث جدا شدن کربن ۲و۳ در ترکیب PCB می‌شود. هنگامی که بی‌فنیل توسط باکتری‌ها استفاده می‌شود، محصول زرد رنگی که یک حلقه آن در موقعیت متا شکسته شده است تولید می‌شود این مورد در اغلب باکتری‌های مطالعه شده به خصوص گونه‌های سودوموناس مشاهده شده است. رنگ زرد مبنی بر در دسترس قرارگرفتن بی‌فنیل به عنوان منبع کربن برای باکتری‌ها و متابولیسم آن در محیط می‌باشد(۷).

کاتابولیسم ترکیباتی از PCBs توسط آنزیم‌های تولید شده از میکروارگانیسم‌ها با جایگزینی هیدروژن به جای کلر منجر به کاهش سمیت این ترکیب شده یا باعث تولید کلر معدنی می‌گردد. چهار آنزیم اصلی جهت تجزیه بیولوژیکی این آلاینده با ژن‌های کد شده شامل: بی‌فنیل دی اکسیژناز با ژن کد شده BphA، دی هیدرودیول دی هیدروژناز با ژن کد شده BphB،۲و۳دی هیدروکسی بی‌فنیل ۱و۲ دی اکسیژناز با ژن کد شده BphC،۲هیدروکسیل۶ اکسو۶ فنیل هگزا ۲و۴ دیونات اسید هیدرولاز با ژن کد شده BphD می‌باشند(۸).

Rhodococccus یکی از باکتری‌های اصلی تجزیه‌کننده PCBs می‌باشد که حداقل چهار ژن BphC را دارد(۹). در بین آنزیم‌های یاد شده، ۲و۳دی هیدروکسی دیول ۱و۲ دی اکسیژناز با ژن کد شده BphC نقش کلیدی ایفا می‌کند(۱۰). آنزیم ۲و۳دی هیدروکسی دیول ۱و۲ دی اکسیژناز جدا شده از سودوموناس قوی‌تر از آنزیم‌های جدا شده از باکتری‌های دیگر عمل می‌کند(۱۱). این آنزیم دارای مهارکننده رقابتی ترت بوتانول(T-Butanol) است که محصول جانبی حاصل از تخریب حلقه بی‌فنیل است(۱۲).

هدف در مهندسی آنزیم توسعه آنزیم‌های با بهبود عملکرد نسبت به آنزیم‌های وحشی است. روش‌های آزمایشگاهی در مهندسی آنزیم بسیار پرهزینه و مشمول زمان است از این رو روش‌های محاسباتی در مهندسی آنزیم توسعه یافته است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

مهندسی آنزیم محاسباتی نویدبخش تسریع فرآیند در تولید آنزیم‌ها با خواص تغییریافته است. با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی پتانسیل احتمالی جهش‌ها، ارزیابی شده و در انتخاب کاندید جهش؛ کمک‌کننده خواهد بود(۱۳).

اختصاصیت آنزیم‌ها نسبت به یک لیگاند (پیش‌ماده(substrate)، بازدارنده(inhibitor)، بازدارنده آلوستریک(allosteric)، کوفاکتور(cofactor)) برای کاربرد صنعتی آنزیم‌ها حیاتی است(۱۴). در مهندسی آنزیم برای مطالعه افزایش یا کاهش اتصال لیگاند به کمپلکس آنزیم-لیگاند، داکینگ مولکولی رایج‌ترین روش محاسباتی است(۱۵). داکینگ مولکولی یک روش پرکاربرد برای شناسایی موقعیت اتصال لیگاند به پروتئین با جست‌وجوی بهترین تناسب بین فضای ساختاری با پاکت اتصال(binding pocket) در پروتیئن است(۱۶).

تقویت عملکرد آنزیم و کاهش میل اتصال آنزیم به مهارکننده موجب بهبود عملکرد آنزیم و افزایش کارایی آن خواهد شد. امروزه، استفاده از بیوانفورماتیک و ابزارهای قدرتمند آن بسیار مورد توجه زیست‌شناسان واقع شده است. در این تحقیق با هدف، تقویت آنزیم و تضعیف اثر مهارکننده از طریق جهش در آمینواسیدهای سایت فعال در فضای بیو انفورماتیک، آنزیم۲و۳دی هیدروکسی دیول ۱و۲ دی اکسیژناز با ژن کد شده BphC و همچنین مهارکننده رقابتی ترت بوتانول جهت بررسی انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

توالی آنزیم DHBD و ساختارهای مورد نیاز

برای تعیین توالی آمینواسیدهای پروتئین DHBD، پایگاه داده UniProt مورد استفاده قرار گرفت. جستجو در گونه‌ای انجام گرفت که یکی از بیشترین کارایی را در تخریب PCB را مطابق با مطالعات پیشین(۱۱و۷) داشت. توالی آمینواسیدی با فرمت FASTA استخراج و برای ادامه بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ویژگی‌های مختلف آنزیم از جمله نام، جایگاه فعال، موقعیت در مسیر متابولیک تخریب PCBها، گونه‌ی تولید کننده و ویژگی‌های ساختاری آن از پایگاه داده UniProt استخراج گردید.

استخراج ساختارهای سه‌بعدی تعیین شده برای DHBD

پایگاه داده‌ی PDB برای به دست آوردن ساختار سه‌بعدی آنزیم DHBD مورد استفاده قرار گرفت. ساختارهای سه‌بعدی برای عملیات جهش و داکینگ مورد استفاده قرار گرفتند. انتخاب ساختار سه‌بعدی مناسب برای آنزیم DHBD بر اساس کم‌ترین مقدار قدرت تفکیک‌پذیری انجام گرفت. مقدار کم‌تر قدرت تفکیک‌پذیری منجر به دستیابی به بیشترین وضوح و دقت است. مشخصات کریستالی آنزیم در این پایگاه داده، مورد بررسی قرار گرفت. فرمت نرم‌افزاری فایل ساختاری سه‌بعدی مورد استفاده در داکینگ بین آنزیم وحشی و ماده اولیه و در داکینگ آنزیم جهش یافته و ماده اولیه، فرمت ساختاری PDB است.

داکینگ بین DHBD/DHB

برای انجام داکینگ ساختار آنزیم با استفاده از نرم افزار Molegro Virtual Dacker (مولگرو) آماده‌سازی شد. ابتدا کلیه مولکول‌ها، غیر از آنزیم هدف از ساختار با کد دسترسی 6KW1 حذف گردید. اینکار جهت ممانعت از برهم‌کنش‌های مخرب انجام گرفت. با حذف آب و کوفاکتور و لیگاندهای فرعی عمل داکینگ با استفاده از نرم افزار PYRX و Autodock vina بین ماده اولیه و آنزیم وحشی صورت گرفت. آماده‌سازی فایل‌های آنزیم و لیگاند به فرمت PDBQT توسط نرم افزار MGLtools انجام گرفت. محل اتصال بین آنزیم و لیگاند با استفاد از بررسی محل حفره توسط نرم افزار مولگرو صورت گرفت. بزرگترین حفره‌ی شناسایی شده به عنوان مختصات محل اتصال به نرم افزار PYRX و Autodock vina ارائه گردید.

رسم نقشه دوبعدی برهم‌کنشی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

برای مشخص کردن آمینواسیدهای موثر در بر هم کنش بین DHBD/DHB نقشه‌ی دوبعدی برهم‌کنشی بین آن‌ها رسم گردید. برای این منظور از نرم افزار لیگ‌پلات(LigPlot) استفاده گردید. ساختار حاصل از داک کردن DHBD-DHB برای کشیدن نقشه مورد استفاده قرار گرفت. از نرم افزار PDBeditor برای مشخص کردن Chain ID برای زنجیره‌ی مربوط به آنزیم و لیگاند استفاده گردید. سپس ساختار تهیه شده وارد نرم افزار لیگ پلات گردید و از گزینه‌ی آنزیم و لیگاند برای رسم نقشه دوبعدی استفاده گردید.

انجام بلاست برای یافتن توالی‌های مشابه

توالی آنزیم DHBD از داده پایگاه UniPprot و با فرمت FASTA دریافت گردید و برای جستجوی بلاست مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام بلاست از دیتا بیس Non-redundant protein seq، الگوریتم PSI و حداکثر توالی ۲۵۰ استفاده گردید. برای یافتن اعضا دور خانواده پروتئین مورد نظر از BLAST-PSI استفاده می‌شود. این الگوریتم ابتدا به دنبال توالی‌های بسیار مشابه می‌گردد و سپس کم کم و با دقت دایره جستجوی خود را وسعت می‌بخشد تا تمام توالی‌هایی را که در ابتدا جالب به نظرنمی‌آمدند ولی پاسخی برای خواسته ما بوده اند نیز پیدا شود.

شناسایی اسیدآمینه‌های هدف جهش، با استفاده از روش هم‌ردیفی

پس از به دست آمدن ۲۵۰ توالی‌های مشابه، با استفاده از نرم افزار MEGA۷ هم‌ردیفی چندگانه بین این توالی‌ها انجام گرفت. برای انجام هم‌ردیفی از الگوریتم CLUSTALW استفاده گردید. نتایج هم‌ردیفی انجام شده برای بررسی وجود تغییرات اسیدآمینه‌ای در ناحیه‌ی جایگاه فعال که در مرحله پیشین مشخص شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این بررسی مشخص کردن میزان حفاظت‌شدگی در ناحیه جایگاه فعال بود. در صورتی که موقعیت‌هایی از جایگاه فعال در ۲۵۰ توالی به دست آمده حفاظت شده نبوده و اسیدآمینه‌ی دیگری، فراوانی بیشتری داشت؛ در آن صورت جهش‌زایی به آن اسیدآمینه انجام خواهد پذیرفت.

مشخص کردن محل قرارگیری مهارکننده

با توجه به اینکه مهارکننده T-Butanol نیز در جهت‌گیری و انرژی اتصال ماده‌ی اولیه موثر می‌باشد، محل اتصال آن باید با دقت کافی مشخص گردد. برای این منظور ساختار T-Butanol از پایگاه داده‌ی PubChem به دست آمد و با استفاده از نرم‌افزار PYRX و Autodock vina روی ساختار آنزیم داک شده با ماده اولیه مجددا داک گردید. محل اتصال به لحاظ ممانعت در اتصال ماده اولیه مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از جایگاه صحیح اتصال مهار کننده، ساختار داک شده با ساختار آنزیمی که دارای مهار کننده می‌باشد با استفاده از نرم افزار DISCOVERY STUDIO و ابزار Superimposition مورد مقایسه قرار گرفت. با بررسی نتایج داکینگ، تمامی موقعیت‌های قرار گرفتن مهارکننده در کمپلکس هدف مورد بررسی قرارگرفت. محلی که کم‌ترین هم‌پوشانی بین مهارکننده و ماده اولیه را فراهم کرده و کم‌ترین تاثیر بر آمینواسیدهای سایت فعال آنزیم داشته باشد مشخص شد.

ایجاد جهش در آنزیم هدف و بررسی جهش یافته‌ها

با استفاده از نرم افزار Molegro Virtual Docker آنزیم وحشی وارد نرم افزار مولگرو شد، لیگاند و آب و کوفاکتور را حذف و با ابزار Protein Preparation اسیدآمینه‌ای که بیشترین تکرار را بر اساس هم‌ترازی توالی چندگانه داشت جایگزین آمینو اسید آنزیم وحشی شده و بهینه‌سازی انجام شد. نتیجه با فرمت ساختاری PDB ذخیره شد. برای بهبود عملکرد آنزیم و کاهش نقش مهارکننده برسرعت کاتالیز آنزیم، جهش به دو منظور صورت گرفت اول بر روی آمینواسیدهای موثر در اتصال ماده اولیه بی‌فنیل به آنزیم و دوم بر روی آمینواسیدهای موثر در اتصال مهارکننده با آنزیم هدف که یکی در جهت تحکیم اتصال(آمینو اسیدهای سایت فعال-ماده اولیه اصلی) و دیگری در جهت تضعیف اتصال(آمینو اسیدهای سایت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

فعال-مهارکننده) می‌باشد. جهش‌های جایگاه فعال نیز به دو دسته تقسیم بندی گردید. دسته اول، جهش‌های یافت شده توسط هم‌ردیفی و دسته دوم، جهش در اسیدآمینه‌های جایگاه فعال که با پیوند هیدروفوبی در واکنش شرکت داشتند. جهش‌های هم‌ردیفی فقط محدود یک جهش می‌باشد که هم‌ردیفی معرفی کرده است. ولی جهش دسته‌ی دوم در هر یک از اسیدآمینه‌های جایگاه فعال می‌باشد که در برهم‌کنش‌های مهم با ماده اولیه دخیل نبودند و برای جهش به ۱۹ آمینو اسید دیگر انتخاب شدند. بعد از ایجاد جهش‌ها، داکینگ بین لیگاند و آنزیم جهش یافته طبق روش پیشین انجام شده و نمودار دو بعدی برهم‌کنش توسط لیگ‌پلات رسم گردید و اتصال آمینواسیدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با آنزیم وحشی از نظر تغییرات انرژی و نوع پیوند مورد مقایسه قرار داده شد.

یافته‌ها

توالی و ساختار آنزیم

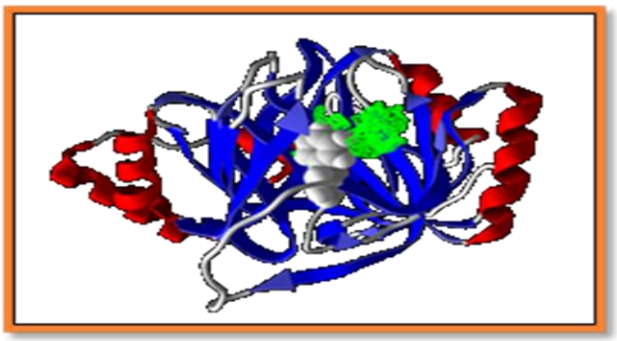
از پایگاه UniProt توالی آمینواسیدهای پروتئین DHBD با فرمت FASTA استفاده شد. و سپس توالی آنزیم DHBD و کد دسترسی PDB بدست آمد. ارگانیسم تولیدکننده آنزیم Psuedomonase sp. KKS102 است و کد آلفانومریک این آنزیم در این پایگاه داده P17297 می‌باشد. نام تخصصی این پروتئین Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase (DHBD) و سایت فعال با آمینواسیدهایی با موقعیت۱۴۶ و ۲۱۰ و ۲۶۱ به یون آهن دوظرفیتی متصل هستند. آمینواسیدهای مورد نظر از نوع Beta Strand می‌باشند. طول پروتئین مورد نظر از ۲۹۳ آمینواسید تشکیل شده است. این آنزیم یک هموآکتامر و توالی آنزیم DHBD فقط یک ایزوفرم دارد.

استخراج ساختار سه‌بعدی پروتئین

ساختار سه‌بعدی 6KW1 (تفکیک پذیری ۱.۴۵ آنگستروم) و ساختار KNF1 دارای مهارکننده برای مطالعه انتخاب شد.

داکینگ بین بی‌فنیل و آنزیم وحشی

داکینگ بین بی‌فنیل و آنزیم وحشی نشان داد که بی‌فنیل با جهت‌گیری مناسب می‌تواند در حفره مشخص شده توسط نرم افزار مولگرو قرار گیرد. این حفره، محل برهم‌کنش لیگاند و آنزیم است. انرژی اتصال بین بی‌فنیل و آنزیم DHBD برابر با ۶.۲- کیلوکالری بر مول محاسبه گردید. شکل ۱ نشان دهنده‌ی محل اتصال بی‌فنیل و نیز محل قرارگیری حفره آنزیم می‌باشد.



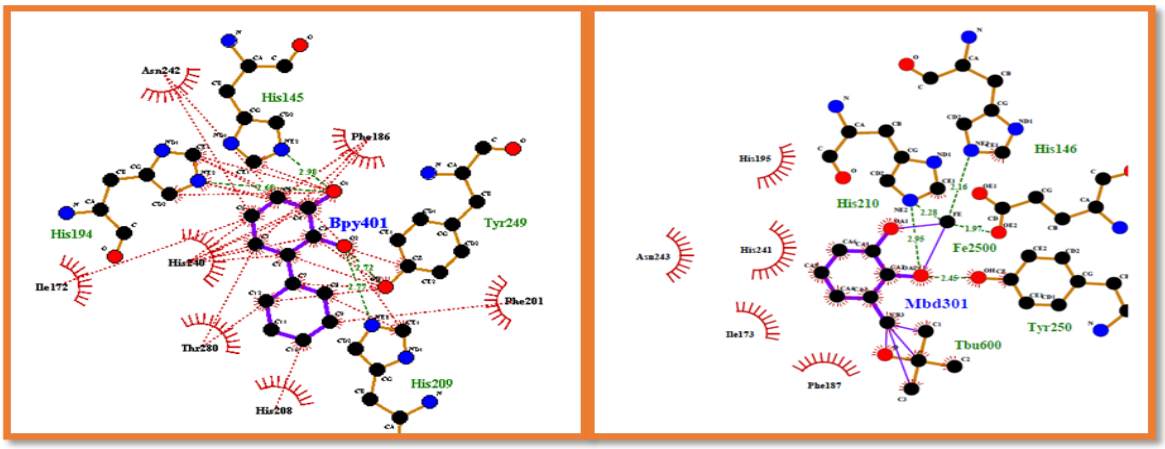
شکل ۱. حفره و لیگاند اصلی. منطقه سبز رنگ Cavity و منطقه سفید رنگ لیگاند DHB

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

نقشه دوبعدی برهم‌کنش لیگاند و آنزیم وحشی

آمینواسیدهای موثر در بر هم کنش آنزیم DHBD و ماده اولیه DHB با استفاده از نرم افزار LigPlot شناسایی شدند این نرم‌افزار خروجی‌های داکینگ و برهم‌کنش‌های آن را شبیه سازی می‌کند (ساختار خروجی‌ها PDB است). با استفاده از این نرم‌فزار آمینواسیدهایی با پیوند هیدروژنی و آمینواسیدهای هیدروفوبیک (جدول ۱) که در بر هم کنش DHBD-DHB و TERTBUTANOL-DHBD نقش دارند، شناسایی شد (شکل ۲).



شکل ۲. نقشه دوبعدی برهم‌کنشی بین آنزیم وحشی و لیگاند. DHB (سمت چپ) و مهارکننده TERTBUTANOL (سمت راست).

جدول ۱. آمینواسیدهای موثر در برهم‌کنش. در سمت راست جدول ساختار کریستاگرافی با کد دسترسی PDB نمایش داده شده است.

DHBD-DHBD-وDHB TERTBUTANOL	آمینواسیدهای موثر در برهمکنش	نوع پیوند
1KW6	ASN242,PHE186,ILE172,HIS240, THR280, HIS208, PHE201	هیدروفوبیک
1KW6	HIS194,HIS145,GLU260,HIS209	هیدروژنی
1KNF	HIS195,HIS241,ASN243,ILE173, PHE187	هیدروفوبیک
1KNF	HIS210,TRY250,HIS146	هیدروژنی

توالی‌های حاصل از بلاست

با انجام جستجوی بلاست ۲۵۰ توالی که بیشترین شباهت را با توالی آنزیم DHBD داشتند یافته شد. این توالی‌های دارای میزان شباهت و هم‌پوشانی مختلف بوده و از گونه‌های متعددی به دست آمده بودند. توالی‌های مربوط به کلیه نتایج به دست آمده به فرمت FASTA ذخیره‌سازی شد و برای مرحله هم‌ردیفی مورد استفاده قرار گرفت.

هم‌ردیفی توالی

با انجام هم‌ردیفی، ۲۵۰ توالی به دست آمده در زیر یکدیگر منطبق گردیدند. بررسی نتایج هم‌ردیفی در آمینواسیدهای محل جایگاه فعال نشان داد که آمینواسیدهای جایگاه فعال در برخی جایگاه‌ها متغییر بوده و می‌توانند به عنوان کاندید جهش‌زایی استفاده گردند. اسیدآمینه‌های جایگاه فعال با رسم نقشه دوبعدی از داکینگ اولیه شناسایی شد و برای داکینگ‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. آمینو اسیدهای His145، Tyr249، His209 و His 194 با

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

پیوند هیدروژنی به ماده اولیه DHB متصل می‌باشند و به سبب حفظ‌شدگی، جزء کاندیدهای جهش‌زایی نمی‌باشند. آمینواسیدهای هیدروفوبیک نیز در اطراف ماده اولیه DHB در برهم‌کنش با بی‌فنیل نقش دارند. این آمینواسیدها در توالی UniProt در جدول ۲ دیده می‌شوند در حالیکه در Multipe sequence alignment آمینواسیدها تغییر یافته‌اند.آمینواسیدهای حفاظت نشده به عنوان کاندید جهش‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (جدول ۲).

جدول۲. آمینواسیدهای کاندید جهش‌زایی. آمینواسیدهای کاندید جهش‌زایی در مقایسه با آمینواسیدهای موجود در آنزیم وحشی

نام و جایگاه آمینواسید در آنزیم نوع وحشی	آمینو اسید های جایگزین مشخص شده در هم ردیفی
Ile172	Phe (F)
Phe186	Thr(T)
Phe201	Thr(T)
His208	Pro(P)
His240	-
Asn242	-
Thr280	Ser(S)

آماده‌سازی ساختارها برای ایجاد جهش

نتایج (شکل ۳) نشان داد در موقعیت‌های مختلف، مهارکننده می‌تواند، رفتارهای متفاوتی در آنزیم ایجاد کند. بهترین موقعیت مهارکننده بر اساس کم‌ترین تاثیر در برهم‌کنش بین آنزیم و ماده اولیه انتخاب شد. پس از مشخص کردن بهترین موقعیت قرار گیری مهارکننده حاصل از بررسی داکینگ، برای مقایسه موقعیت داک شده و آنزیم اصلی همراه با مهارکننده (موجود در ساختار KNF1)، از نرم‌افزار Chimera استفاده گردید. از نرم افزار Chimera برای بر روی هم قرار دادن ترکیب پروتئین-مهارکننده از کریستال KNF1 وترکیب داک شده مهار کننده -ماده اولیه-پروتئین استفاده شد.

با انتخاب مناسب‌ترین موقعیت مهارکننده می‌توان پیش‌بینی کرد، دور بودن مهارکننده از ماده اولیه اصلی، میزان برهم‌کنش مهارکننده بر آمینواسیدهای سایت فعال را کاهش داده و نتیجه آن استحکام اتصال ماده اولیه-پروتئین می‌باشد و از کند شدن سرعت فعالیت آنزیم در مرحله سوم تخریب نیز جلوگیری می‌کند.

شکل۳. کمپلکس DHBD-DHB. کمپلکس DHBD-DHB با مهارکننده در نرم‌افزار Discovery (۱-T-Butanol ۲-لیگاند DHB)

جهش در آنزیم

بیش از ۱۴۰ جهش ایجاد شد و متعاقب آن داکینگ انجام گردید و نمودار دوبعدی برهکنشی آن‌ها رسم گردید. از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

میان جهش‌های ایجاد شده، تنها پنج جهش منجر به منفی‌تر شدن انرژی اتصال بین لیگاند و آنزیم گردید. انرژی‌های منفی‌تر نشان‌دهنده‌ی پایداری بیشتر برهم‌کنش می‌باشد. نمودارهای دوبعدی برهم‌کنشی نیز تایید کننده این افزایش انرژی می‌باشد. جهش‌های افزایش دهنده‌ی انرژی اتصال منجر به ایجاد پیوندهای قوی‌تر بین لیگاند و آنزیم جهش یافته نیز گردیده است. جدول ۳ نشان دهنده‌ی جهش‌های منجر به کاهش انرژی برهم‌کنشی می‌باشد.

جدول ۳. انرژی برهم‌کنش آمینواسیدهای جهش‌یافته. مقایسه انرژی‌های برهم‌کنش آمینواسیدهای جهش داده شده با آنزیم وحشی

Ligand	Binding Affinity
DHBD-DHB	-6.2
PHE201T	-6.9
THR280S	-6.8
HIS208P	-6.6
ILE172F	-6.2
PHE186T	-6.2

بحث

با توسعه روش‌ها در بیوانفورماتیک و زیست‌شناسی محاسباتی، مهندسی آنزیم در صنعت زیست‌فناوری بهبود یافته است. جهش‌های نقطه‌ای (Point mutation) در پروتئین می‌تواند باعث تغییرات در فعالیت و پایداری پروتئین شود(۱۷). غربالگری جهش‌ها در سیلیکو (in silico) قابلیت تجزیه و تحلیل تعداد فراوانی از جهش‌های ممکن را میسر می‌کند و احتمال ایجاد جهش موثرتر را افزایش می‌دهد(۱۸). در بیوانفورماتیک، هم‌ترازی توالی روش مرتب کردن توالی‌ها برای شناسایی مناطق مشابه است که ممکن است بیانگر روابط تکاملی، ساختاری یا عملکردی مابین توالی‌ها باشد(۱۹). جهش‌ها بر اساس هم‌ترازی مبتنی بر توالی و اطلاعات ساختاری پیش‌بینی می‌شود. هم‌ترازی چندگانه توالی(MSA, multiple sequence alignment) با ابزارهای بیوانفورماتیکی کمک کننده در شناسایی اسیدآمینه‌های مهم در روند تکاملی است و فرض اساسی این رویکرد این است که اسیدآمینه‌های حفاظت شده در گونه‌های همولوگ نقش مهم در عملکرد و ساختار آنزیم دارند(۱۶).

لیگاندها در عملکرد اکثر پروتئین‌ها نقش مهمی دارند. از این روی پیش‌بینی اتصال لیگاند در زیست‌شناسی مولکولی، مهندسی آنزیم و بیوشیمی حائز اهمیت است. داکینگ مولکولی رایج‌ترین شیوه بین تمام روش‌های محاسباتی برای پیش‌بینی میل اتصال است. نقش آن در مهندسی آنزیم ارزیابی سریع میل اتصال آنزیم به پیش‌ماده یا بازدارنده مورد مطالعه است(۲۰).

استفاده از روش‌های غربالگری محاسباتی در مهندسی آنزیم، در نهایت تعداد آنزیم‌هایی که باید آزمایش شوند را کاهش می‌دهد. در دهه گذشته، باتوجه به افزایش کیفیت شبیه‌سازی و بالا رفتن توان محاسباتی؛ استفاده از این رویکرد در مهندسی آنزیم افزایش فزاینده‌ای داشت. مطالعاتی که از این رویکردها، استفاده کرده‌اند دارای نرخ موفقیت قابل توجهی بودند(۲۱). با استفاده از همین رویکرد پژوهشگران در آنزیم لیپاز Geobacillus stearothermophilus T6 بر اساس هم‌ترازی توالی بین توالی‌های همولوگ لیپاز با منشا باکتریایی؛ بیست‌وپنج جهش طراحی شد. از بین جهش‌ها، جهش همزمان هیستیدین ۸۶ به تیروزین و آلانین ۲۶۹ به ترئونین موجب پایدارای ۶۶ برابری در متانول و عملکرد پایداری حرارتی را ۴.۳ درجه افزایش داد. مدلسازی نشان داد پایدارای افزایش یافته در نتیجه تشکیل پیوندهای هیدروژنی جدید است(۲۲).

مطالعات مختلفی در جهت شناخت تاثیر جهش بر فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده پلی کلرو بی‌فنیل‌ها انجام شده است. بررسی آنزیم‌های مخرب آلاینده PCB در پالایش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

زیستی نشان داد که در چهار مرحله بالادست، چهار آنزیم در تخریب این آلاینده نقش دارند. بسته به تعداد کلر و جایگاه آن در حلقه بی‌فنیل متفاوت هستند. میکروارگانیسم‌های موثر در این پالایش زیستی به شکل هوازی و بی‌هوازی و ترکیبی از هر دو می‌باشند. شناخته‌شده‌ترین مسیر در تخریب زیستی PCBها شامل اکسیداسیون هوازی و دکلره بی‌هوازی می‌باشد. میکروارگانیسم‌های دخیل در این فرآیند از بی‌فنیل به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. در نتیجه PCBها با کمک آنزیم‌ها متابولیزه می‌شوند. اپرون‌های بی‌فنیل به عنوان ژن Bph متمایز می‌باشند که شامل ژن‌های رمزکننده آنزیم‌ها می‌باشند(۲۳). کاتابولیسم ترکیباتی از PCBs توسط آنزیم‌های تولید شده از میکروارگانیسم‌ها با جایگزینی هیدروژن به جای کلر منجر به کاهش سمیت این ترکیب شده یا باعث تولید کلر معدنی می‌گردد. چهار آنزیم اصلی جهت تجزیه بیولوژیکی این آلاینده با ژن‌های کد شده شامل: بی‌فنیل دی اکسیژناز با ژن کد شده BphA، دی هیدرودیول دی هیدروژناز با ژن کد شده BphB،۲و۳دی هیدروکسی دیول ۱و۲ دی اکسیژناز با ژن کد شده BphC،۲هیدروکسیل۶ اکسو۶ فنیل هگزا ۲و۴ دیونات اسید هیدرولاز با ژن کد شده BphD می‌باشند(۸). PCBها علی‌رغم پایداری بالا در محیط‌زیست می‌توان تحت شرایطی توسط میکروارگانیسم‌های دارای ژن کدکننده بی‌فنیل دی‌اکسیژناز با کاهش تعداد کلر، سمیت آن‌ها را کاهش داد(۸).

باکتری‌هایی که از بی‌فنیل‌ها به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده می‌کنند نقش مهمی در تخریب زیستی PCBها دارند. از مهم‌ترین این باکتری‌ها به Bacillus sp. (24)، Ochrobactrum sp. (25)، Rhodococcus sp. (26–28)، Pseudomonas sp. (29–32)، می‌توان نام برد. رین و همکاران در تحقیق بیان کردند که وجود جامعه باکتریایی Arthrobacter، Sphingomonas و Pseudomonas با حذف PCBها همبستگی مثبت وجود دارد و همچنین با بیان ژن BphC همبستگی مثبت دارد(۳۳). سوناگا و همکاران در نزدیک محل فعال BphA۱ در باکتری Pseudomonas pseudoalcaligenes ۷۰۷ KF، بر اساس هم‌ترازی توالی چندگانه بین پروتئین BphA۱ و زیرواحد آلفا نفتالین دی‌اکسیژناز از Pseudomonas sp، جهش‌هایی برای اسیدآمینه ترئونین۳۷۶ به فنیل آلانین، گلوتامین، اسیدآسپارتیک، تیروزین، والین، سرین و لیزین طراحی کردند. از بین جهش‌ها، جهش به فنیل آلانین عملکرد فعالیت تخریبی را افزایش گسترده‌ای را نسبت به سایر جهش‌ها داشت(۳۴).

گوو و همکاران با شناسایی ۲،۳-دی هیدروکسی بی‌فنیل ۲،۱ دی‌اکسیژناز (به عنوان BphC_meta تعیین شد) از لجن فعال که با ژن BphC از باکتری Burkholderia xenovorans LB400 ۹۹٪ تشابه هویت(identity) داشت مورد مطالعه قرار دادند. براساس مطالعات داکینگ مولکولی اسیدآمینه‌های مهم در ارتباط با لیگاند فلزی اسیدآمینه‌های هیستیدین ۱۴۶، هیستدین ۲۱۰ و اسیدگلوتامیک ۲۶۰ و در ارتباط با سایت فعال اسیدآمینه‌های هیستدین ۱۹۵، هیستدین ۲۴۱ و تیروزین ۲۵۰ شناسایی شد(۳۵).

بیگ و مانیکام با مدل‌سازی سه‌بعدی زیرواحد آلفا بی‌فنیل دی‌اکسیژناز(BphA) از Comamonas testosteroni B-356 و داکینگ آن با کلاس بی‌فنیل کلردار مانند ۳،۳-دی‌کلروبی‌فنیل و ۴،۴-دی‌کلروبی‌فنیل اسیدآمینه‌های مهم سایت فعال شناسایی شد. این اسیدآمینه‌ها شامل اسیدآمینه‌های لوسین ۲۸۴، ایزولوسین ۲۸۳، والین ۲۸۷، والین ۲۴۳ و لوسین ۳۳۱ است. از این اسیدآمینه‌ها می‌توان به عنوان کاندید جهش‌زایی استفاده کرد که در نهایت این جهش‌ها می‌تواند منجر به بهبود در تخریب ترکیبات سمی کلروبی‌فنیل‌ها شود(۳۶).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

در این تحقیق در مرحله نخست با جهش آمینواسیدهای آب‌گریز اطراف ماده اولیه دی هیدروکسی بی‌فنیل که در برهم‌کنش آمینواسیدها نقش دارند قدرت اتصال ماده اولیه را با آمینواسیدهای جایگاه فعال مستحکم و مورد بررسی قرار گرفت، اینکار باعث تضعیف تاثیر قدرت مهارکننده بر، برهم‌کنش ماده اولیه و آنزیم شد.

با استفاده از روش بیوانفورماتیک توانستیم با عملیات توالی‌یابی، هم‌ترازی توالی‌ها، داکینگ و شبیه‌سازی آنزیم جهش‌یافته، به این هدف برسیم که قدرت مهارکننده، سرعت کاتالیزی آنزیم را کاهش داده تا عملیات تخریب زیستی بر آلاینده PCB موثر باشد. در مرحله دوم با انجام عملیات شبیه‌سازی و انطباق بوسیله نرم افزار DISCOVERY و CHIMERA امکان‌پذیر گردید و جایگاه مطلوبی برای مهارکننده رقابتی تعیین گردد که کم‌ترین تاثیر را بر روی ماده اولیه دی هیدروکسی بی‌فنیل بگذارد. باید توجه داشت که جهش‌های صورت گرفته، نباید ساختار پروتئین را به هم بریزد و موجب اختلال در عملکرد آن شود. جهش‌ها می‌توانند اثر منفی بر عملکرد پروتئین بگذارند.

بنابراین در ابتدا با استفاده از پایگاه داده Uniprot توالی آنزیم را استخراج کرده و آمینواسیدهای جایگاه فعال که شامل HIS194، HIS145، GLU260 و HIS209 هستند؛ شناسایی گردید. همچنین این داده پایگاه نشان داد که ساختار سوم کمپلکس این آنزیم دارای چند کد دسترسی PDB می‌باشد که بر اساس میکروارگانیسم موثر و میزان رزولیشن و در برگرفتن کل زنجیره آمینواسیدی کریستال (PDB code:1KW6) انتخاب شد.

با استفاده از ابزار BLAST هم‌ترازی توالی‌ها با نرم افزار OMEGA در چند گونه به‌دست آمد. بعد از هم‌ترازی، آمینواسیدهایی که قابلیت جهش داشتند استخراج شد و با نرم افزار MOLEGRO VIRTUAL DOCKER آماده‌سازی آنزیم و ماده اولیه و مهارکننده صورت گرفت. سپس آمینواسیدهای هیدروفوبیک موثر در برهم‌کنش را استخراج و با ۱۹ آمینواسید دیگر جهش داده شد، با استفاده از نرم افزار PYRX عمل داکینگ انجام شد و میزان انرژی برهم‌کنش ماده اولیه و آنزیم وحشی از این طریق به‌دست آمد. میزان این انرژی برابر با Kcal mol-1 ۶/۲- می‌باشد. بعد از آماده‌سازی ماده اولیه دی هیدروکسی بی‌فنیل، با استفاده از نرم‌افزار مولگرو ، جهش بر روی آمینواسید فنیل‌آلانین ۲۰۱ و جایگزینی ترئونین، میزان انرژی بر هم کنش Kcalmol-1 ۶/۹- را نشان داد این نتیجه بیانگر آنست که استفاده از این آمینواسید جهش‌یافته، می‌تواند سبب پایداری اتصال آنزیم و ماده اولیه دی هیدروکسی بی‌فنیل گردد. همچنین جهش بر روی ترئونین ۲۸۰ و جایگزینی آن با آمینواسید سرین به میزان انرژی Kcalmol-1 ۶/۸- نیز بیانگر افزایش پایداری ترمودینامیکی در آنزیم است. با بررسی LIGPLOTهای به‌دست آمده تشکیل پیوند هیدروژنی جدیدی ملاحظه نشد. نتایج حاصل از داکینگ و جهش آمینواسیدهای هیدروفوبیک نشان می‌دهد میزان انرژی ۵ آمینواسید جهش داده شده از ۷ آمینواسید دارای میزان انرژی برهم‌کنش بیشتر و در نتیجه قدرت اتصال بالاتری نسبت به آنزیم وحشی است بنابراین از رنکینگ یا اعتبارسنجی بهتری نیز برخوردار می‌باشند. ۷ آمینواسید هیدروفوبیک اطراف ماده اولیه دی هیدروکسی بی‌فنیل شامل:

ASN.242، PHE.186، ILE.172، THR.280، HIS.240، PHE.201 و HIS.208 می‌باشد که جهش داده شد و میزان انرژی هر یک با میزان انرژی آنزیم وحشی نیز مقایسه گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد هرچه میزان انرژی برهم‌کنش منفی‌تر باشد اتصال قوی‌تر است. همچنین هر چه ماده آلی ترت بوتانول یا مهارکننده در فاصله مطلوب از ماده اولیه قرار گیرد و کمترین تاثیر را بر روی ماده اولیه بگذارد نیز نتیجه بهتری دارد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LIGPLOT نیز نشان می‌دهد پیوندهای هیدروژنی موجود در گونه‌های جهش‌یافته آنزیم وحشی، حفاظت شده هستند و تغییری در آن‌ها بر اثر جهش رخ نمی‌دهد. براساس روند

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

تکاملی، آمینواسیدهای سایت فعال نیز حفاظت شده می‌باشند. بنابراین جهشی بر روی آن‌ها نمی‌تواند صورت بگیرد. در این پژوهش سعی شده جهش‌هایی را ایجاد کرد که پایداری بیشتری از نوع وحشی خود داشته باشند. همچنین هدف از جهش آمینواسیدهای آنزیم، افزایش قدرت انحلال در آب است که باعث رسیدن به قسمتی از هدف زیست‌پالایی می‌گردد. بنابراین در جهش انجام شده اسیدآمینه‌های آب‌گریز با اسیدآمینه‌های باردار جایگزین شده و باتوجه به اینکه اطراف مولکول پروتئین را مولکول‌های آب فراگرفته است جایگزینی اسیدآمینه‌های قطبی باعث پایداری آنزیم ودر نتیجه بهبود عملکرد آنزیم را در زیست‌پالایی به دنبال خواهد داشت. نتایج این پژوهش همراستا با پژوهش‌های(۳۶-۳۴) است و پشتیبانی نظری برای جهش‌های نقطه‌ای و مهندسی آنزیم ۲و۳دی هیدروکسی دیول ۱و۲ دی اکسیژناز را ارائه داده است. با توجه به نتایج امیدوارکننده این مطالعه، با استفاده از مطالعات تجربی می‌توان ارزیابی بیشتری از یافته‌ها انجام داد.

نتیجه‌گیری

با داکینگ مولکولی با نرم‌افزار PYRX بین آنزیم وحشی و ماده اولیه انرژی اتصال Kcal mol-1 ۶/۲- و برای کاندیدهای جهش‌ها حاصل از هم‌ترازی، فنیل‌آلانین ۲۰۱ به ترئونین(Kcalmol-1 ۶/۹-) و ترئونین ۲۸۰ به سرین(Kcalmol-1 ۶/۸-) نشان داد. انرژی اتصال منفی‌تر، نشان از پایداری بیشتر این برهم‌کنش در آنزیم جهش یافته دارد. در نتیجه این جهش‌ها توان ارتقا قدرت عملکرد آنزیمی را خواهند داشت. همچنین پس از اعمال جهش‌ها، موقعیت مهارکننده T-Butanol نیز مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار DISCOVERY شبیه‌سازی موقعیت مهارکننده و ماده اولیه در آنزیم، نشان داد که احتمالا فاصله مهارکننده از سایت فعال و ماده اولیه در صورتی مطلوب است که، برهم‌کنش مهارکننده بر روی آمینواسیدهای جایگاه فعال کاهش یافته و در نتیجه پایداری اتصال ماده اولیه بی‌فنیل با آنزیم افزایش یابد. کاهش قدرت مهارکننده باعث افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیم در تخریب PCBs خواهد شد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکارانی که ما را در گردآوری مقاله یاری نمودنده اند، سپاسگزاریم. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا مراکز تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.Melymuk L, Blumenthal J, Sáňka O, Shu-Yin A, Singla V, Šebková K, Pullen Fedinick K, Diamond ML. Persistent problem: global challenges to managing PCBs. Environmental Science & Technology. 2022 Jun 1;56(12):9029-40.
2.Parsa monfared A, Akbari noghabi K. Phenol biodegradation. Journal-of-Biosafety. 2015;8(1):17–35.
3.Montano L, Pironti C, Pinto G, Ricciardi M, Buono A, Brogna C, Venier M, Piscopo M, Amoresano A, Motta O. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: occupational and exposure events, effects on human health and fertility. Toxics. 2022 Jul 1;10(7):365 .
4.Hassan HA, Alghuthaymi MA. Biotechnology methods for succession of bacterial communities in polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminated soils and isolation novel PCBs-degrading bacteria. Scientific Reports. 2022 Nov 10;12(1):19223.
5.Zakeri A, Akbarian N, Hedayat K. Measurement of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the soil samples of Taleghan region and investigation of the presence of biological agents capable of removing PCBs. Environ Sci. 2021;19(3):237–52.
6.Teymouri B, Nabavi SM, Safaeyan S, Khatami SH. Determining level of PCBs in skin and muscle tissue of Cyprinus carpio and Esox lucius in Anzali Wetland (Abkenar). ISFJ. 2012;21(3):23–30.
7.Furukawa K, Fujihara H. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]
[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

molecular features. Journal of bioscience and bioengineering. 2008 May 1;105(5):433-49.
8.Elangovan S, Pandian SB, SJ G, Joshi SJ. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental fate, challenges and bioremediation. Microbial metabolism of xenobiotic compounds. 2019:165-88.
9.Arai H, Kosono S, Taguchi K, Maeda M, Song E, Fuji F, Chung SY, Kudo T. Two sets of biphenyl and PCB degradation genes on a linear plasmid in Rhodococcus erythropolis TA421. Journal of fermentation and bioengineering. 1998 Jan 1;86(6):595-9.
10.Dai S, Vaillancourt FH, Maaroufi H, Drouin NM, Neau DB, Snieckus V, Bolin JT, Eltis LD. Identification and analysis of a bottleneck in PCB biodegradation. nature structural biology. 2002 Dec 1;9(12):934-9.
11.Mondello FJ. Cloning and expression in Escherichia coli of Pseudomonas strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. Journal of bacteriology. 1989 Mar;171(3):1725-32.
12.Vaillancourt FH, Han S, Fortin PD, Bolin JT, Eltis LD. Molecular basis for the stabilization and inhibition of 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenase by t-butanol. Journal of Biological Chemistry. 1998 Dec 25;273(52):34887-95.
13.Scherer M, Fleishman SJ, Jones PR, Dandekar T, Bencurova E. Computational enzyme engineering pipelines for optimized production of renewable chemicals. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2021 Jun 15;9:673005.
14.Lange L, Parmar V, Meyer A. Biocatalysis. In: Encyclopedia of Sustainable Technologies. Elsevier; 2017. p. 663–73.
15.Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. Biophysical reviews. 2017 Apr;9:91-102.
16.Ebert MC, Pelletier JN. Computational tools for enzyme improvement: why everyone can–and should–use them. Current opinion in chemical biology. 2017 Apr 1;37:89-96.
17.Baammi S, Daoud R, El Allali A. In silico protein engineering shows that novel mutations affecting NAD+ binding sites may improve phosphite dehydrogenase stability and activity. Scientific Reports. 2023 Feb 1;13(1):1878.
18.Yoo YJ, Feng Y, Kim YH, Yagonia CFJ. Fundamentals of enzyme engineering. Springer; 2017.
19.Chatzou M, Magis C, Chang JM, Kemena C, Bussotti G, Erb I, Notredame C. Multiple sequence alignment modeling: methods and applications. Briefings in bioinformatics. 2016 Nov 1;17(6):1009-23.
20.Planas-Iglesias J, Marques SM, Pinto GP, Musil M, Stourac J, Damborsky J, Bednar D. Computational design of enzymes for biotechnological applications. Biotechnology Advances. 2021 Mar 1;47:107696.
21.Ferreira P, Fernandes PA, Ramos MJ. Modern computational methods for rational enzyme engineering. Chem Catalysis. 2022 Oct 20;2(10):2481-98.
22.Dror A, Shemesh E, Dayan N, Fishman A. Protein engineering by random mutagenesis and structure-guided consensus of Geobacillus stearothermophilus lipase T6 for enhanced stability in methanol. Applied and environmental microbiology. 2014 Feb 15;80(4):1515-27.
23.Hashmi MZ, Varma A, editors. Electronic Waste Pollution. 2019;57.
24.Suyamud B, Inthorn D, Panyapinyopol B, Thiravetyan P. Biodegradation of bisphenol A by a newly isolated Bacillus megaterium strain ISO-2 from a polycarbonate industrial wastewater. Water, Air, & Soil Pollution. 2018 Nov;229:1-2.
25.Horváthová H, Lászlová K, Dercová K. Bioremediation of PCB-contaminated shallow river sediments: the efficacy of biodegradation using individual bacterial strains and their consortia. Chemosphere. 2018 Feb 1;193:270-7.
26.Atago Y, Shimodaira J, Araki N, Bin Othman NA, Zakaria Z, Fukuda M, Futami J, Hara H. Identification of novel extracellular protein for PCB/biphenyl metabolism in Rhodococcus jostii RHA1. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2016 May 3;80(5):1012-9.
27.Xu Y, Yu M, Shen A. Complete genome sequence of the polychlorinated biphenyl degrader Rhodococcus sp. WB1. Genome Announcements. 2016 Oct 27;4(5):10-128.
28.Wang H, Hu J, Xu K, Tang X, Xu X, Shen C. Biodegradation and chemotaxis of polychlorinated biphenyls, biphenyls, and their metabolites by Rhodococcus spp. Biodegradation. 2018 Feb;29:1-0.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]

29.Ridl J, Suman J, Fraraccio S, Hradilova M, Strejcek M, Cajthaml T, Zubrova A, Macek T, Strnad H, Uhlik O. Complete genome sequence of Pseudomonas alcaliphila JAB1 (= DSM 26533), a versatile degrader of organic pollutants. Standards in genomic sciences. 2018 Dec;13:1-0.
30.Chakraborty J, Das S. Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium Pseudomonas aeruginosa JP-11. Chemosphere. 2016 Feb 1;144:1706-14.
31.Suenaga H, Fujihara H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T, Goto M, Shimodaira J, Furukawa K. Insights into the genomic plasticity of Pseudomonas putida KF715, a strain with unique biphenyl-utilizing activity and genome instability properties. Environmental microbiology reports. 2017 Oct;9(5):589-98.
32.Weiland-Bräuer N, Fischer MA, Schramm KW, Schmitz RA. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading potential of microbes present in a cryoconite of Jamtalferner Glacier. Frontiers in microbiology. 2017 Jun 15;8:266493.
33.Ren H, Su Y, Zhang J, Pan H, Chen B, Wang Y. Recombinant protein, AlnA, combined with transgenic alfalfa remediates polychlorinated biphenyl-contaminated soils: efficiency and rhizosphere microbial community response. Biotechnology letters. 2016 Nov;38:1893-901.
34.Suenaga H, Goto M, Furukawa K. Active-site engineering of biphenyl dioxygenase: effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. Applied microbiology and biotechnology. 2006 Jun;71:168-76.
35.Gou M, Qu Y, Xu B, Zhou J, Li X, Zhou H. Isolation, characterization and docking studies of 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenase from an activated sludge metagenome. Biotechnology letters. 2012 Jan;34:117-23.
36.Baig MS, Manickam N. Homology modeling and docking studies of Comamonas testosteroni B-356 biphenyl-2, 3-dioxygenase involved in degradation of polychlorinated biphenyls. International journal of biological macromolecules. 2010 Jan 1;46(1):47-53.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-21]

[DOI: 10.61186/sjku.29.4.25]