



بررسی بیوانفورماتیک آنزیم متان مونواکسیژناز و جهش‌زایی در آن جهت بهبود عملکرد آنزیمی

علی سلیمانی‌پور^۱، علیرضا ذاکری^{۲*}، سعید خلیلی^۱، زهرالسادات هاشمی^۲، ابوالفضل جهانگیری^۳

۱- گروه علوم زیستی - دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای - دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی - تهران - ایران.

۲- دپارتمان توسعه فناوری درمان‌های نوین - مرکز تحقیقات سرطان پستان - پژوهشکده معتمد - جهاد دانشگاهی تهران - تهران - ایران.

۳- مرکز میکروبیولوژی کاربردی - پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تهران - تهران - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

چکیده

مقدمه: آنزیم SMMO دارای سه زیرواحد هیدروکسیلاز، ردوکتاز و پروتئین تنظیم‌کننده است. آنزیم SMMO علاوه بر سودمندی بالقوه در تبدیل متان به متانول، اکسیداسیون طیف وسیعی از مولکول‌های آلیگریز را انجام می‌دهد. هدف اصلی این مطالعه تغییر توالی آمینواسیدی آنزیم SMMO توسط روش‌های بیوانفورماتیک است به گونه‌ای که میزان پایداری آن بهبود یابد.

مواد و روش‌ها: از سرور ChusPro برای داکینگ زیرواحدهای هیدروکسیلاز و ردوکتاز استفاده شد. آمینواسیدهای مؤثر در برهمکنش بین زیرواحدها به وسیله نرم‌افزار LigPlot مشخص شدند. همترازی توالی‌های مشابه به دست آمده از بلاست با نرم‌افزار OMEGA انجام شد. برای آمینواسیدهای مؤثر در برهمکنش بین زیرواحدها بر اساس روند تکاملی و پیش‌بینی‌های سرور mCSM-PP12 جهش‌زایی به وسیله نرم‌افزار Molegro Virtual Docker ایجاد گردید. از سرور PRODIGY برای به دست آوردن مقدار $G\Delta$ نوع وحشی آنزیم و انواع جهش‌یافته استفاده شد.

نتایج: در جهش‌یافته‌های Q₈₃L، N₁₆₁H، K₄₃M و N₁₀₁S مقدار $G\Delta$ نسبت به نوع وحشی کمپلکس MMOH-2MMOB منفی‌تر شد. نتایج حاصل از تحلیل LigPlot نشان می‌دهد که در جهش‌یافته‌های Q₈₃L و N₁₆₁H پیوندهای هیدروژنی که در نوع وحشی آنزیم وجود داشته، حفظ شده است و این جهش‌ها در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کنند. دو جهش‌یافته T₂₉D و F₃₇VH باعث منفی‌تر شدن مقدار $G\Delta$ نسبت به نوع وحشی کمپلکس هیدروکسیلاز-ردوکتاز می‌شوند. نتایج حاصل از تحلیل LigPlot نشان می‌دهد که این جهش‌ها باعث تشکیل پیوند هیدروژنی جدید بین زیر واحد ردوکتاز و هیدروکسیلاز می‌شود که هم‌خوانی بالایی با مقادیر $G\Delta$ دارد و باعث افزایش پایداری آنزیم شود.

نتیجه‌گیری: واضح است که سطح پروتئین‌کروی باید آبدوست باشد تا بتواند در محیط‌های آبی پروتئین را محلول و پایدار کند. بنابراین تغییر آمینواسیدهای غیرقطبی سطح پروتئین به آمینواسیدهای قطبی می‌تواند در پایداری آنزیم‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: متان مونواکسیژناز، جهش‌زایی، بیوانفورماتیک.

***نویسنده مسئول:** تهران - دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی - دانشکده مهندسی مواد و علوم بین رشته‌ای - گروه علوم زیستی، تلفن: ۰۹۱۲۲۱۵۵۱۸۴، نامبر: ۰۲۱-۲۲۹۷۰۰۴۷، Email: zakeri@stu.ac.ir

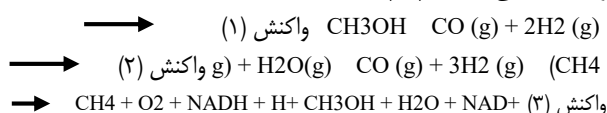
ارجاع: سلیمانی‌پور علی، ذاکری علیرضا، خلیلی سعید، هاشمی زهرالسادات، جهانگیری ابوالفضل. بررسی بیوانفورماتیک آنزیم متان مونواکسیژناز و جهش‌زایی در آن جهت بهبود عملکرد آنزیمی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۳): ۲۶-۳۸.



مقدمه

گاز طبیعی در حدود ۲۱/۴ درصد از کل منابع اولیه انرژی (Total primary energy supply: TPES) را تشکیل می‌دهد (۱). گاز طبیعی به دلیل نسبت پایین کربن به هیدروژن می‌تواند یک منبع انرژی بالقوه برای جایگزینی نفت و زغالسنگ که آلودگی بیشتری دارند، باشد (۲). متان جز اصلی تشکیل‌دهنده گاز طبیعی است. اثر گلخانه‌ای گاز متان ۳۳ بار از کربن‌دی‌اکسید قوی‌تر است (۳). فعالیت‌های انسانی مانند نشت در هنگام استخراج زغال سنگ، نفت و گاز طبیعی تقریباً دو سوم از انتشار کل متان را شامل می‌شود (۴). اخیراً مطالعات مربوط به استفاده از متان در حال افزایش است. به دلیل اینکه بیشتر گاز طبیعی در مناطق دور افتاده و دور از بازارهای مصرف یافت شده، حمل و نقل آن دشوار است و نیاز به خط لوله طولانی دارد. فرآیند در جا (In Situ Process) برای تبدیل متان به مواد شیمیایی مایع می‌تواند هزینه را کاهش دهد. تولید سوخت مایع از متان می‌تواند یک نکته مهم و امیدوارکننده در آینده باشد (۵). متانول یک سوخت تجدیدپذیر و پاک است که به‌عنوان منبع انرژی در زندگی ما برای تولید برق، گرمایش فضا، سوخت اتومبیل و پیل سوختی تقاضای زیادی دارد (۶).

در حال حاضر واکنش موسوم به گاز سنتز (Syngas) (واکنش ۱) مسیر اصلی تولید متانول در صنعت است (۷). گاز سنتز از طریق ریفرمینگ بخار آب با گاز متان به‌دست می‌آید (واکنش ۲). این مسیر غیرمستقیم تولید متانول، همراه با مصرف زیاد انرژی است (۸). در این مقطع هیچ روش مستقیمی برای تبدیل متان به متانول در مقیاس صنعتی کشف نشده است (۹). تمایل به استفاده مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست از متان باعث شده است که محققان به دنبال کاتالیزورهای جایگزین باشند. یک راه دستیابی، مطالعه باکتری‌های متانوتروفیک است (۱۰). باکتری‌های متانوتروفیک خانواده‌ای منحصربفرد از میکروارگانیسم‌های گرم منفی را تشکیل می‌دهند (۹) که در حد فاصل دنیای هوازی و بی‌هوازی وجود دارند. جایی که آنها می‌توانند متان تولید شده از متابولیسم‌های بی‌هوازی را به‌عنوان منبع کربن و انرژی مصرف کنند (۱۱). این باکتری‌ها از طریق محدود کردن انتشار گاز گلخانه‌ای متان به اتمسفر، نقش مهمی در چرخه جهانی کربن دارند (۱۲). اولین گام در متابولیسم متانوتروف‌ها، اکسیداسیون متان به متانول به‌وسیله آنزیم متان مونواکسیژناز (MMOs: Methane Monooxygenase) است (۱۳). با وجود پیوند بسیار قوی C-H در متان $\Delta H_{298} = 105 \text{ kcal/mol}$ (۱۴)، این باکتری‌ها قادر به اکسید کردن متان به متانول (واکنش ۳) تحت شرایط محیطی هستند (۱۳).



آنزیم متان مونواکسیژناز به دو فرم (Particular Methane pMMO و Soluble Methane sMMO) (Monooxygenase) وجود دارد (۱۵). بیشتر متانوتروف‌ها فقط pMMO را بیان می‌کنند در چند سویه هم فقط sMMO بیان می‌شود. یک زیر مجموعه نیز ژن‌هایی برای بیان هر دو فرم آنزیم دارند. اگرچه pMMO و sMMO واکنش‌های شیمیایی یکسانی را انجام می‌دهند اما ساختار، کوفاکتور و مکانیسم آنها کاملاً با هم متفاوت است (۱۶). آنزیم pMMO در غشای پلاسمایی قرار دارد (۱۷) و حاوی کوفاکتور مس است (۹). این آنزیم ناپایدار و خالص‌سازی آن دشوار است و فقط متان را در خود جای می‌دهد (۱۸). آنزیم sMMO در سیتوپلاسم قرار دارد (۱۷) و حاوی کوفاکتور آهن است (۹). از آنجایی که مراحل خالص‌سازی آنزیم sMMO آسان‌تر است، مطالعات ساختاری و مکانیسمی این آنزیم پیشرفت قابل توجهی داشته است (۱۹). آنزیم sMMO توانایی اکسید کردن طیف گسترده‌ای از هیدروکربن‌های اشباع و غیراشباع، خطی، شاخه‌دار و حلقوی و همچنین ترکیبات ناجور حلقه، کلره شده و سولفیدی را دارد (۲۰). این عملکرد متنوع آنزیم sMMO باعث اهمیت باکتری‌های متانوتروف در فرآیند زیست پالایی می‌شود (۱۸).

مطالعات بر روی آنزیم sMMO بر دو منبع باکتریایی Methylosinus trichosporium OB3b و Bath Methylococcus capsulatus (Bath) متمرکز شده است. این باکتری‌ها در ساختار غشای داخلی و مسیرهای جذب کربن متفاوت هستند اما ثابت شده است که آنزیم sMMO آنها به‌طور قابل توجهی از نظر ساختار و دامنه سوبستراها به هم شبیه است (۲۱). مقدار Km (ثابت میکائیلیس) در باکتری M. capsulatus (Bath) برای متان $0.94/220 \mu\text{M}$ و در باکتری M. trichosporium OB3b تقریباً $12 \mu\text{M}$ است (۲۳).

sMMO برای فعالیت به سه زیر واحد پروتئینی نیاز دارد: هیدروکسیلاز: sMMO hydroxylase (۲۵۱ kDa); ردوکتاز: (sMMO reductase:MMOR, ۳۸/۵kDa); و پروتئین تنظیم‌کننده: (sMMO Regulatory:MMOB, ۱۵/۹kDa) (۲۰). هیدروکسیلاز مسئول اکسیداسیون متان است و از سه زیر واحد آلفا (α), بتا (β) و گاما (γ) تشکیل شده است (۲۴). که تشکیل یک همودیمر ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) می‌دهند (۱۶). برای اتصال زیر واحدهای ردوکتاز و پروتئین تنظیم‌کننده به هیدروکسیلاز دو مدل در نظر گرفته شده است. مدل غیررقابتی، که بر اساس آن زیر واحدهای MMOR و MMOB به دو ناحیه مختلف از هیدروکسیلاز متصل می‌شوند. مدل رقابتی، که بر اساس آن زیر واحدهای MMOR و MMOB برای اتصال به یک ناحیه یکسان از هیدروکسیلاز با هم رقابت می‌کنند. مطالعات ساختاری اخیر، مدل رقابتی را تأیید می‌کند (۲۵). مجموعه‌ای از بازمانده‌های حفظ شده (Y۶۷-

جهش‌یافته‌ها در محیط *in silico* از لحاظ تأثیر در عملکرد مورد بررسی قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

توالی زیرواحدهای آنزیم در قالب FASTA از طریق پایگاه داده UniProt دریافت گردید. در پایگاه داده UniProt علاوه بر توالی، کد PDB (Protein data bank) ساختارهای سه بعدی پروتئین نیز وجود دارد و روش به‌دست آمدن این ساختارها (x-ray, NMR) هم مشخص شده است. در ساختارهایی که با روش اشعه ایکس به‌دست آمده‌اند میزان تفکیک‌پذیری بر حسب آنگستروم مشخص شده است که هر چقدر کمتر باشد ساختار مورد استفاده مطلوب‌تر است. در صورتی که ساختار کمپلکس زیرواحدها موجود باشد، جهت مطالعه مورد استفاده قرار می‌گیرد. تا به امروز ۲۸ ساختار از هیدروکسیلاز و یک ساختار از کمپلکس هیدروکسیلاز- پروتئین تنظیم‌کننده به‌دست آمده است که عمدتاً مربوط به باکتری *M. capsulatus* (Bath) است. برای هر یک از زیرواحدهای ردوکتاز و پروتئین تنظیم‌کننده نیز دو ساختار NMR به‌دست آمده است. ساختارهای سه بعدی زیرواحدهای آنزیم از طریق پایگاه PDB، که اطلاعات مربوط به ساختار سه بعدی ماکرومولکول‌های زیستی در آن ذخیره شده است، به‌دست می‌آید.

ساختار مورد استفاده برای زیرواحدهای هیدروکسیلاز و پروتئین تنظیم‌کننده، کمپلکس به‌دست آمده از این دو زیرواحد با کد 4GAM است. تنها ساختار به‌دست آمده از دُمین فریدوکسین ردوکتاز IJQ4 است که در این مطالعه مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به روش تهیه این ساختارها، زنجیره‌های پروتئینی زیرواحدهای آنزیم تکرار شده است که برای جهش‌زایی باید حذف شوند. از طرف دیگر با توجه به اینکه ساختار کمپلکس هیدروکسیلاز- ردوکتاز وجود ندارد، برای عمل داکینگ باستی زیر واحد هیدروکسیلاز از ساختار 4GAM جدا شود. برای حذف زنجیره‌های تکراری و جدا کردن هیدروکسیلاز از نرم‌افزار Molegro Virtual Docker استفاده می‌شود. برای انجام داکینگ لازم است برای هر یک از زنجیره‌های پروتئینی، کد زنجیره تعریف شده باشد. در ساختار مربوط به دُمین فریدوکسین ردوکتاز (IJQ4) که با هیدروکسیلاز برهمکنش دارد این کد تعریف نشده است که برای این کار از نرم‌افزار PDB Editor استفاده می‌شود. سرور ClusPro برای داکینگ زیرواحدهای ردوکتاز و هیدروکسیلاز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برای ایجاد جهش، ابتدا آمینواسیدهای مؤثر در برهمکنش بین زیرواحدها بر اساس مطالعات قبلی و با استفاده از نرم‌افزار LigPlot مشخص می‌گردد. سپس با وارد کردن توالی زیرواحدهای آنزیم در سرور BLAST، ۲۵۰ توالی مشابه با توالی هر زیرواحد دریافت می‌گردد. در مرحله بعدی جهت هم‌ردیفی (Alignment) توالی‌های مشابه از نرم‌افزار OMEGA استفاده می‌شود. هم‌ردیفی این توالی‌ها نشان‌دهنده میزان شباهت آنها به یکدیگر و حفظ

KY4-L321-G325-P329) ناحیه‌ای به نام Canyon را به‌وجود می‌آورند. این ناحیه برای اتصال زیرواحدهای MMOR و MMOB مهم است (۲۶).

هیدروکسیلاز حاوی یک نوع مرکز فلزی است. جایگاه فعال دی آبرون (the diiron active site) در زیرواحدهای آلفا قرار دارد (۱۶). Fe1 توسط His147، His114 و Glu114 و یک مولکول آب و Fe2 توسط His246، His244 و Glu209 کنور دینه می‌شوند (۲۷). دو اتم آهن به‌وسیله Glu144 و دو هیدروکسید به هم متصل می‌شوند. پس از کاهش (the diiron active site)، گروه کربوکسیلات Glu243 تحت تأثیر یک جایجایی قرار می‌گیرد و جایگزین یکی از دو یون هیدروکسید متصل شده به دو اتم آهن می‌شود (۱۶). زیرواحد ردوکتاز از سه دُمین، فریدوکسین [2Fe-2S]، دُمین متصل به فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) و دُمین متصل به نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) تشکیل شده است (۱۰). NADH منبع انتقال الکترون‌ها به دُمین فریدوکسین، از طریق دُمین متصل به FAD است. دُمین فریدوکسین الکترون‌ها را به جایگاه فعال دی آبرون که حالت اکسید شده (FeIII-FeIII) دارد، منتقل می‌کند تا آن را کاهش دهد (۱۹).

MMOH [2Fe-2S] FAD NADH (۲۸) با توجه به یافته‌ها مبنی بر این که محل اتصال MMOR و MMOB به هیدروکسیلاز مشترک است و تمایل MMOR و MMOB برای اتصال به هیدروکسیلاز بستگی به وضعیت اکسیداسیون مرکز دی آبرون دارد مدل عملکردی زیر ارائه شده است. ۱- ابتدا MMOR جایگزین MMOB متصل به هیدروکسیلاز اکسید شده (MMOHox) می‌شود و مرکز دی آبرون کاهش می‌یابد. ۲- با اتصال MMOB به هیدروکسیلاز کاهش‌یافته (MMOHred)، متان و اکسیژن به مرکز دی آبرون دسترسی پیدا می‌کنند. ۳- بعد از واکنش اکسیداسیون متان، MMOB از هیدروکسیلاز اکسید شده جدا و متانول تولید شده آزاد می‌گردد. ۴- MMOR دوباره به هیدروکسیلاز اکسید شده متصل می‌شود و چرخه کاتالیزوری دیگری آغاز می‌گردد (۲۹).

در این تحقیق آنزیم sMMO به دلیل مشخص بودن ساختار و اهمیت آن در فرآیند زیست پالایی برای مطالعه برگزیده شد و با توجه به اینکه هر چه مقدار Km کوچکتر باشد میزان گرایش آنزیم به سوبسترا بیشتر است آنزیم مربوط به باکتری *M. capsulatus* (Bath) برای مطالعه انتخاب شد. در این مطالعه سعی شده است تا با کمک روش‌های بیوانفورماتیکی توالی آمینواسیدی sMMO به گونه‌ای تغییر داده شود تا در نهایت میزان پایداری آن بهبود یابد. با مشخص بودن ساختار، مکانیسم عمل و نحوه برهمکنش زیر واحدهای آنزیم، آمینو اسیدهای مناسب از آنزیم برای جهش‌زایی انتخاب و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک جهش‌زایی ایجاد می‌گردد.

نتایج

طول زنجیره‌ی پروتئینی زیرواحدهای آنزیم از طریق پایگاه داده UniProt به دست آمد که نتایج آن در جدول (۱) آورده شده است. قطبیت متفاوت مولکول‌های سوبسترا و فرآورده و نیاز به کنترل ورود و خروج این مولکول‌ها از طریق مسیرهای غیر مداخله‌گر، احتمالاً دلیلی بر وجود چنین پروتئین بزرگی جهت کاتالیز اکسیداسیون متان است. اندازه بزرگ هیدروکسیلاز ممکن است برای اتصال دو زیر واحد دیگر آنزیم مورد نیاز باشد (۳۰). میزان تفکیک‌پذیری (Resolution) ساختار 4GAM برابر با 2.9 \AA است و ساختار دُمین فریدوکسین ردوکتاز (1JQ4) به روش NMR تهیه شده است.

زیر واحد هیدروکسیلاز آنزیم، همودیمر ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) است و از هر زیر واحد دو رشته پروتئینی وجود دارد. به هیدروکسیلاز، دو واحد پروتئین تنظیم‌کننده متصل می‌شود و کمپلکس MMOH-2MMOB را تشکیل می‌دهند. اما در ساختار 4GAM برای هر زیر واحد چهار زنجیره وجود دارد که زنجیره‌های A-F-K-P مربوط به زیرواحدهای آلفا، زنجیره‌های B-G-L-Q مربوط به زیرواحدهای بتا، زنجیره‌های C-M-H-R مربوط به زیرواحدهای گاما و زنجیره‌های D-I-N-S مربوط به پروتئین‌های تنظیم‌کننده هستند. زنجیره‌های تکراری (K-P-L-Q-M-R-N-S) به وسیله نرم‌افزار Molegro Virtual Docker حذف گردید. در ساختار دُمین فریدوکسین (1JQ4) زنجیره پروتئینی ده بار تکرار شده است که نه زنجیره حذف گردید و ساختار به دست آمده در شکل (۲) قابل مشاهده است. با توجه به اینکه کمپلکس هیدروکسیلاز-ردوکتاز وجود ندارد برای انجام داکینگ، زیر واحد هیدروکسیلاز به وسیله نرم‌افزار Molegro Virtual Docker از کمپلکس MMOH-2MMOB جدا شد. ساختار هیدروکسیلاز به همراه ساختار دُمین فریدوکسین در سرور ClusPro بارگذاری شد. ساختار کمپلکس هیدروکسیلاز-ردوکتاز به دست آمده در شکل (۳) قابل مشاهده است.

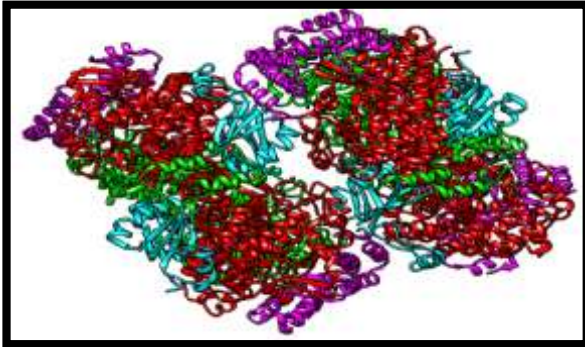
از طریق نرم‌افزار LigPlot آمینواسیدهای شرکت‌کننده در برهمکنش بین زیرواحدهای آنزیم مشخص شدند که نتایج در جدول (۲) قابل مشاهده است. در هم‌ترازی با نرم‌افزار ClustalW OMEGA مشخص شد از بین آمینواسیدهایی که در برهمکنش بین زیرواحدهای آنزیم نقش دارند، روند تکاملی آمینواسیدهای موجود در جدول (۳) را حفظ نکرده و به جای آنها آمینواسیدهای دیگری را برگزیده است. این آمینواسیدها در فرآیند جهش‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از نرم‌افزار Molegro Virtual Docker جهش‌های به دست آمده بر اساس روند تکاملی بر روی آنزیم اعمال گردید.

مقدار ΔG نوع وحشی آنزیم و انواع جهش‌یافته از طریق سرور PRODIGY محاسبه شد، که نتایج آن در جدول (۴) قابل مشاهده است. جهش‌یافته‌های N1۰۱S-K4۳M-N1۶۱H-Q8۳L مقدار ΔG

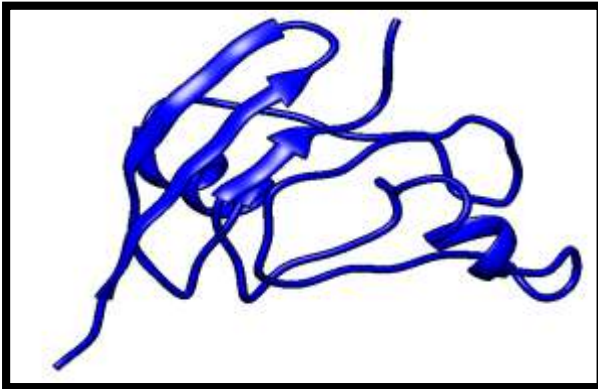
شدگی هر یک از جایگاه‌های آمینواسیدی است. برای پیدا کردن جهش‌ها، آمینواسیدهای دخیل در برهمکنش بین زیرواحدها مورد بررسی قرار گرفتند تا مشخص شود کدام یک از آمینواسیدها به صورت تکاملی در همه پروتئین‌ها ثابت هستند و کدام یک از آنها با توالی مورد نظر متفاوت است. در صورتی که آمینواسیدی در همه توالی‌ها یکسان باشد به معنی حفظ شدگی تکاملی است و جهشی برای این جایگاه تعریف نمی‌گردد. در صورتی که روند تکاملی آمینواسیدی با توالی مورد نظر متفاوت باشد، آمینواسیدی که بیشتر تکرار شده است، برای جهش و جایگزینی در توالی مورد نظر انتخاب می‌گردد. در نهایت از طریق نرم‌افزار Molegro Virtual Docker آمینواسیدی که در روند تکاملی بیشتر تکرار شده است، جایگزین آمینواسید موجود در آنزیم می‌شود. سپس ساختار مورد نظر در قالب PDB ذخیره، تا اثر جهش‌های اعمال شده بر روی آن بررسی شود.

برای بررسی اثر جهش‌های اعمال شده بر پایداری آنزیم ابتدا مقدار میل اتصال (ΔG) نوع وحشی آنزیم و انواع جهش‌یافته از طریق سرور PRODIGY محاسبه می‌شود. جهش‌یافته‌هایی که ΔG منفی‌تری نسبت به نوع وحشی آنزیم دارند پیوندها و برهمکنش‌های حاصل از آنها با استفاده از نرم‌افزار LigPlot مورد بررسی قرار می‌گیرند و با نوع وحشی آنزیم مقایسه می‌شوند. جهش‌هایی که باعث حفظ یا کوتاه‌تر شدن پیوندهای هیدروژنی قبلی و یا منجر به تشکیل پیوند هیدروژنی جدیدی می‌شوند در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کنند. اگر جهش‌هایی که بر اساس روند تکاملی ایجاد شده است باعث افزایش پایداری آنزیم نشوند، جهت تعریف جهش‌های جدید ابتدا برای هر یک از آمینواسیدهایی که در برهمکنش بین زیرواحدها نقش دارند ۱۹ جهش در قالب یک فایل txt تعریف می‌گردد. هر جهش شامل شناسه زنجیره، کد و موقعیت بازمانده (residue) نوع وحشی و کد بازمانده جهش‌یافته است که در یک خط جداگانه نوشته می‌شود. سپس ساختار نوع وحشی آنزیم در قالب PDB به همراه لیست جهش‌ها، در سرور mCSM-PP12 بارگذاری می‌شود. صفحه نتایج، لیستی از جهش‌های منفرد به همراه $\Delta\Delta G$ پیش‌بینی شده برای هر جهش را نشان می‌دهد. برای اعمال جهش‌هایی که باعث افزایش $\Delta\Delta G$ می‌شوند از نرم‌افزار Molegro Virtual Docker استفاده می‌شود.

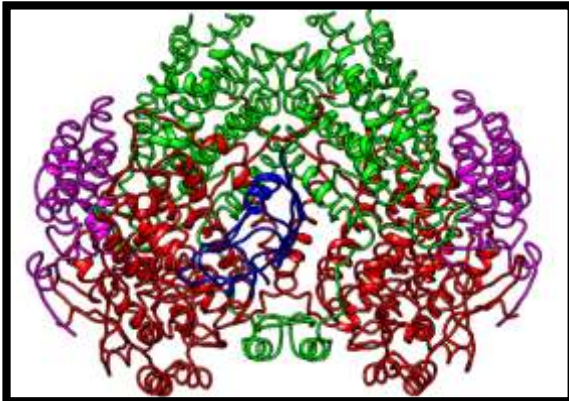
در نهایت مقدار میل اتصال (ΔG) نوع وحشی آنزیم و انواع جهش‌یافته از طریق سرور PRODIGY محاسبه می‌شود. جهش‌یافته‌هایی که ΔG منفی‌تری نسبت به نوع وحشی آنزیم دارند پیوندها و برهمکنش‌های حاصل از آنها با استفاده از نرم‌افزار LigPlot مورد بررسی قرار می‌گیرند و با نوع وحشی آنزیم مقایسه می‌شوند. جهش‌هایی که باعث حفظ یا کوتاه‌تر شدن پیوندهای هیدروژنی قبلی و یا منجر به تشکیل پیوند هیدروژنی جدیدی می‌شوند در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کنند.



شکل ۱- ساختار 4GAM: زنجیره‌های A-F-K-P قرمز رنگ، زنجیره‌های B-G-L- سبز رنگ، زنجیره‌های C-H-M-R ارغوانی رنگ، زنجیره‌های D-I-N-S فیروزه‌ای رنگ



شکل ۲- ساختار دومین فریدوکسین ردوکتاز



شکل ۳- کمپلکس هیدروکسیلاز- ردوکتاز: زنجیره‌های A,F قرمز رنگ، زنجیره‌های B,G سبز رنگ، زنجیره‌های C,H ارغوانی رنگ، زنجیره D آبی رنگ (دومین فریدوکسین)

منفی‌تری نسبت به نوع وحشی کمپلکس MMOH-2MMOB دارند. پیوندهای حاصل از این جهش‌ها به وسیله نرم‌افزار LigPlot بررسی و با نوع وحشی آنزیم مقایسه شد. در جهش‌یافته‌های K۴۳M و N۱۰۱S پیوندهای هیدروژنی به پیوندهای ضعیف‌تر هیدروفوب تبدیل شده‌اند، بنابراین جهش‌های مطلوبی در جهت افزایش پایداری آنزیم نیستند. در جهش‌یافته‌های Q۸۳L و H۱۶۱N پیوندهای هیدروژنی حفظ شده است، بنابراین در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کنند.

جهش‌های ایجاد شده بر اساس روند تکاملی تأثیری بر افزایش پایداری کمپلکس هیدروکسیلاز - ردوکتاز نداشتند، به همین دلیل از سرور mCSM-PP12 برای ایجاد جهش‌های جدید استفاده شد. نخست آمینواسیدهایی که در برهمکنش (هیدروژنی یا هیدروفوب) بین زیرواحد ردوکتاز و هیدروکسیلاز نقش دارند، از طریق نرم‌افزار LigPlot مشخص گردید که نتایج آن در جدول (۵) قابل مشاهده است. سپس برای هر یک از این آمینواسیدها ۱۹ جهش تعریف می‌شود و همراه با ساختار نوع وحشی کمپلکس هیدروکسیلاز - ردوکتاز در سرور mCSM-PP12 بارگذاری می‌گردد. بر اساس پیش بینی سرور mCSM-PP12 جهش‌های جدول (۶) می‌توانند باعث افزایش پایداری کمپلکس هیدروکسیلاز - ردوکتاز شوند. بر اساس نتایج به دست آمده از سرور mCSM-PP12 جهش‌های به وسیله نرم‌افزار Molegro Virtual Docker بر روی کمپلکس هیدروکسیلاز - ردوکتاز اعمال گردید.

مقدار ΔG نوع وحشی آنزیم و انواع جهش‌یافته از طریق سرور PRODIGY محاسبه شد که نتایج آن در جدول (۷) قابل مشاهده است. جهش یافته‌های T۲۹D و F۳۷H مقدار ΔG منفی‌تری نسبت به نوع وحشی کمپلکس هیدروکسیلاز- ردوکتاز دارند. پیوندها و برهمکنش‌های حاصل از این دو جهش با استفاده از نرم‌افزار LigPlot بررسی و با نوع وحشی آنزیم مقایسه شد. در جهش یافته‌ی T۲۹D پیوند هیدروفوب در جایگاه ۲۹ به پیوند هیدروژنی تبدیل گردید و در جهش یافته‌ی F۳۷H پیوند هیدروژنی جدیدی در جایگاه ۳۷ تشکیل شد. بنابراین نتایج حاصل از تحلیل LigPlot همخوانی بالایی با مقادیر ΔG دارد و این جهش‌ها در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل کند.

جدول ۱- طول زنجیره‌ی پروتئینی زیر واحدهای آنزیم

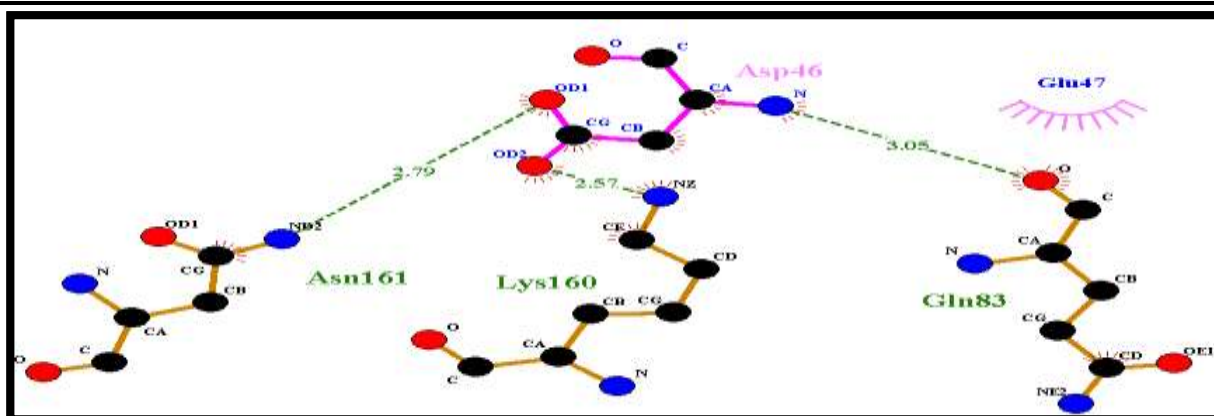
نام زیرواحد	طول زنجیره	ارگانسیم
زیر واحد آلفا هیدروکسیلاز	۵۲۷	M. capsulatus (Bath)
زیر واحد بتا هیدروکسیلاز	۳۸۹	M. capsulatus (Bath)
زیر واحد گاما هیدروکسیلاز	۱۷۰	M. capsulatus (Bath)
زیر واحد تنظیم کننده (MMOB)	۱۴۱	M. capsulatus (Bath)
زیر واحد ردوکتاز (MMOR)	۳۴۸	M. capsulatus (Bath)

جدول ۲- آمینواسیدهایی که در برهمکنش بین زیرواحدها نقش دارند

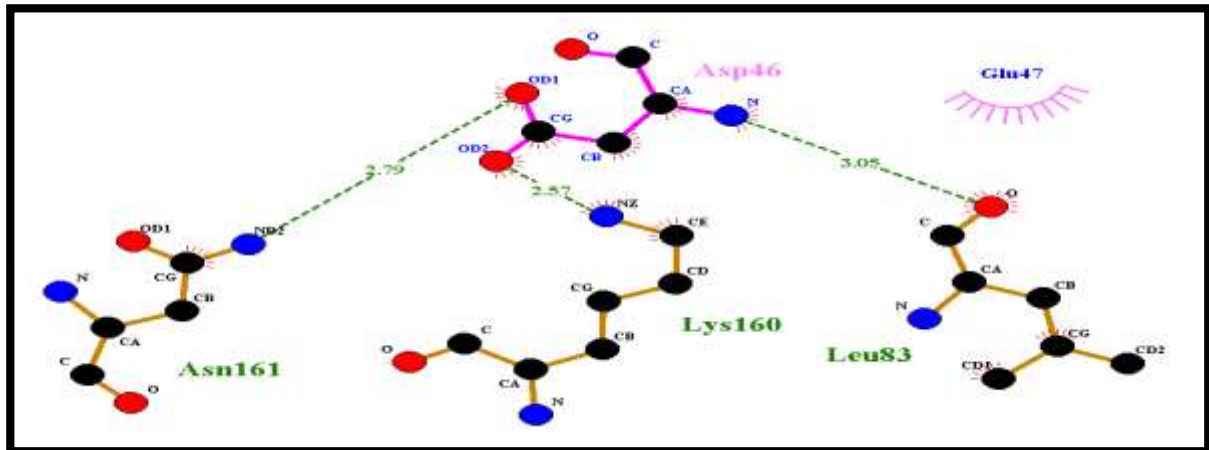
برهمکنش	نام آمینواسید	زیرواحد پروتئینی/ نام زنجیره
هیدروژنی	- ۲۳۴- Thr۲۲۲- Glu۲۱۴- Asn۱۶۱- Asn۱۶۰- Lys۸۳- Gln۷۴- Lys۶۱- Lys۵۹- Gln۲۶Gln ۳۷۷- Pro۳۳۶- Lys۳۲۰- Arg۳۱۶- Ile۳۱۵- Gly۳۱۰- Tyr۳۰۷- Arg۳۰۳- Lys۲۹۹- Glu۲۳۷Leu	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز: A
هیدروژنی	- ۲۳۷- Leu۲۲۲- Glu۲۱۴- Asn۱۶۰- Lys۸۷- Thr۸۴- Asp۷۷- Arg۶۶- Glu۵۹- Gln۲۶Gln ۳۳۶- Lys۳۲۸- Ser۳۱۶- Ile۳۱۵- Gly۳۱۰- Tyr۳۰۷Arg -۳۰۳- Lys۲۹۹- Glu۲۵۱Tyr	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز: F
هیدروژنی	۴۸- Glu۹- Arg۷Arg	زیرواحد بتا هیدروکسیلاز: B /
هیدروژنی	۴۸- Glu۳۴- Lys۳۳Asn	زیرواحد بتا هیدروکسیلاز: G /
هیدروژنی	- ۴۴- Lys۴۳- Lys۳۵- Ser۳۴- Glu۳۳- His۳۱- Val۲۹- Asn۲۴- Phe۱۸- Lys۱۵- Leu۸Tyr - ۱۱۰- Ser۱۰۶- Leu۱۰۳- Tyr۹۷- Gly۷۶- Tyr۷۴- Ala۷۲- Asp۵۴- Glu۵۰- Thr۴۷- Glu۴۶Asp ۱۳۳- Asp۱۲۷- Ser۱۱۸- Thr۱۱۵- Arg۱۱۱Ser	پروتئین تنظیم کننده (MMOB) D
هیدروژنی	- ۹۷- Gly۷۶- Tyr۶۱- Asp۴۷- Glu۳۵- Ser۳۲- Val۳۱- Val۲۹- Asn۲۴- Phe۱۵- Leu۸Tyr ۱۳۰- Met۱۱۸- Thr۱۱۵- Arg۱۱۱- Ser۱۱۰- Ser۱۰۸- Asp۱۰۳- Tyr۱۰۱Asn	پروتئین تنظیم کننده (MMOB) I
هیدروژنی	۳۵- Asn۱۸Arg	دومین فریدوکسین / D

جدول ۳- نتایج حاصل از همترازی با نرم افزار OMEGA و جهش‌های اعمال شده بر روی آنزیم

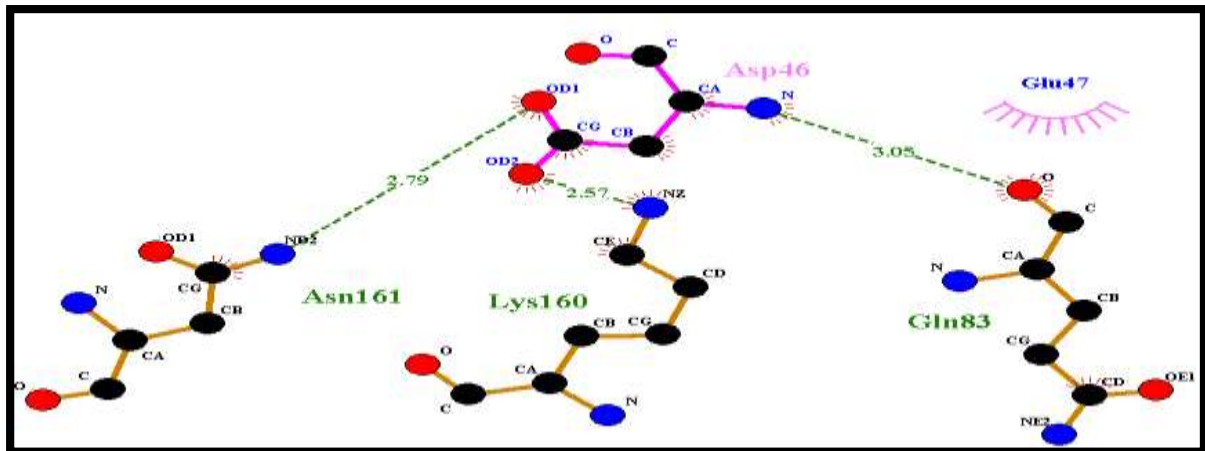
نام جهش	روند تکاملی	نوع وحشی آنزیم (میزان تکرار آمینواسید در سایر توالی‌ها)	نام زنجیره	نام زیرواحد پروتئینی
L۸۳Q	Leu(٪۵۵)	Gln۸۳(٪۴۰)	A	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز
H۱۶۱N	His(٪۵۵)	Asn۱۶۱(٪۱۳)	A	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز
R۳۳N	Arg(٪۹۱)	Asn۳۳(٪۷)	G	زیرواحد بتا هیدروکسیلاز
K۱۵L	Lys(٪۸۰)	Leu۱۵(٪۹)	D	پروتئین تنظیم کننده
M۴۳K	Met(٪۶۲)	Lys۴۳(٪۲۵)	D	پروتئین تنظیم کننده
A۵۰T	Ala(٪۶۲)	Thr۵۰(٪۱۳)	D	پروتئین تنظیم کننده
F۷۶Y	Phe(٪۶۱)	Tyr۷۶(٪۳۷)	D	پروتئین تنظیم کننده
K۱۵L	Lys(٪۸۰)	Leu۱۵(٪۹)	I	پروتئین تنظیم کننده
F۷۶Y	Phe(٪۶۱)	Tyr۷۶(٪۳۷)	I	پروتئین تنظیم کننده
S۱۰۱N	Ser(٪۴۹)	Asn۱۰۱(٪۱۰)	I	پروتئین تنظیم کننده
N۱۰۸D	Asn(٪۴۶)	Asp۱۰۸(٪۲۴)	I	پروتئین تنظیم کننده
G۳۵N	Gly(٪۵۲)	Asn۳۵(٪۷)	D	دومین فریدوکسین ردوکتاز



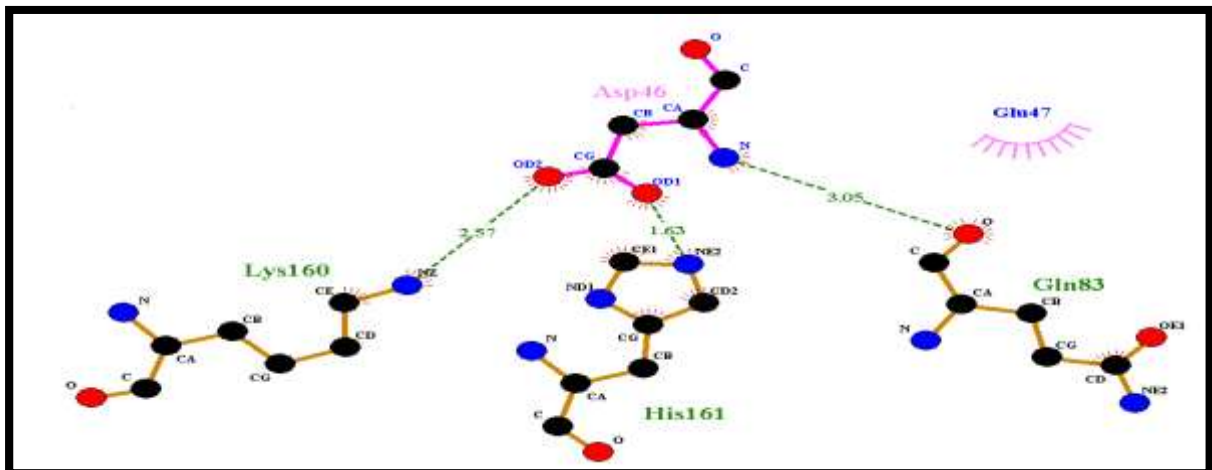
شکل ۴- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۸۳ (Q) Gln در نوع وحشی آنزیم



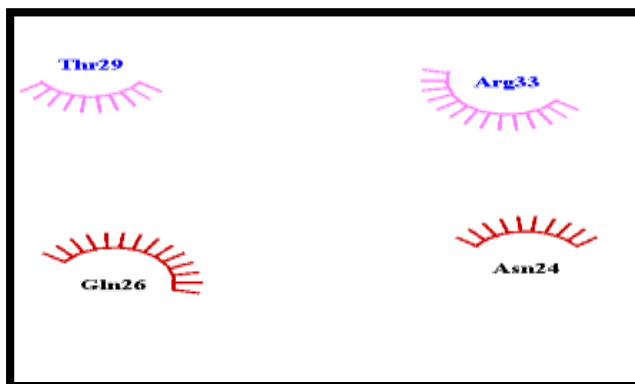
شکل ۵- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۸۳ (L) Leu در نوع جهش یافته



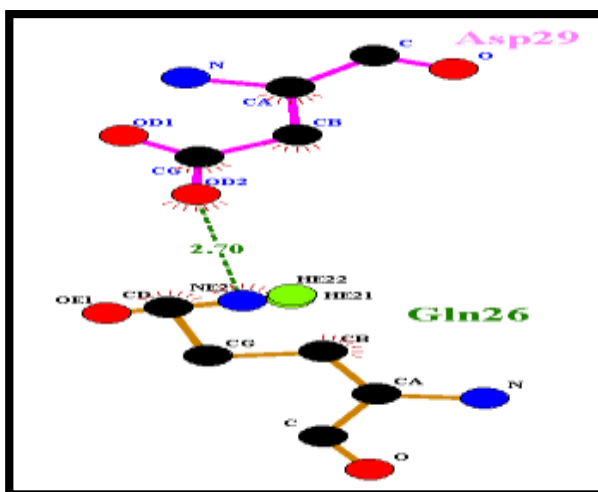
شکل ۶- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۱۶۱ (N) Asn در نوع وحشی آنزیم



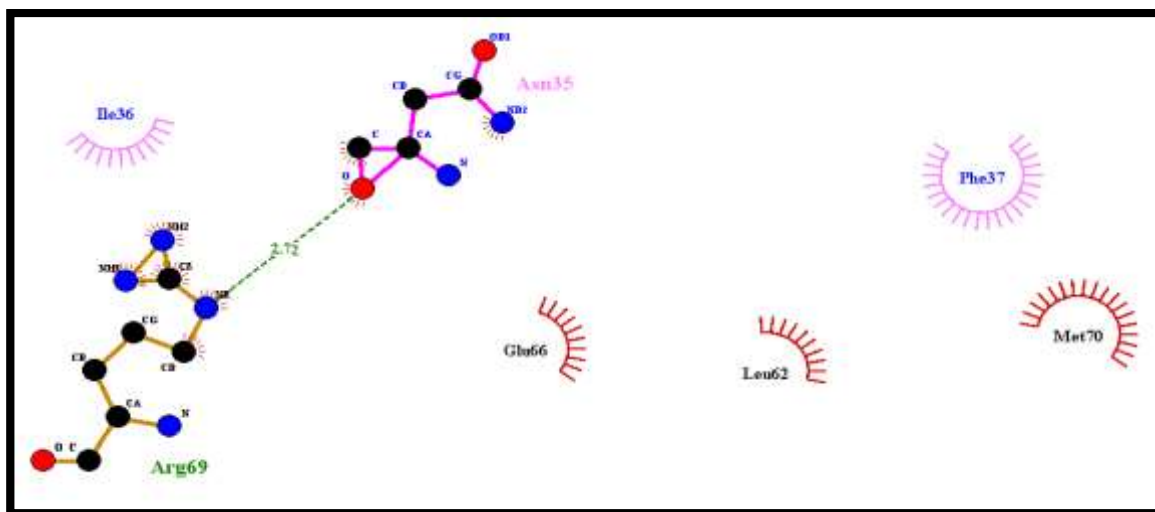
شکل ۷- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۱۶۱ (H) His در نوع جهش یافته



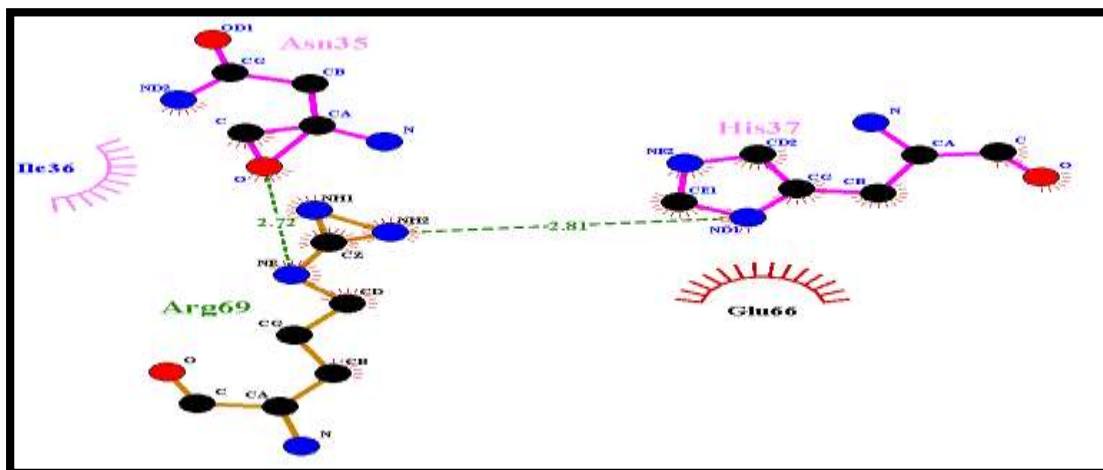
شکل ۸- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۲۹ Thr(T) در نوع وحشی آنزیم



شکل ۹- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۲۹ Asp (D) در نوع جهش یافته



شکل ۱۰- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۳۷ Phe(F) در نوع وحشی آنزیم



شکل ۱۱- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل LigPlot برای آمینواسید ۳۷ His (H) در نوع جهش یافته

جدول ۴- نتایج حاصل از سرور PRODIGY

ردیف	نام آنزیم	ΔG (Kcal mol ⁻¹)
۱	نوع وحشی کمپلکس MMOH-2MMOB	-۴۵/۶
۲	جهش یافته Q۸۳L	-۴۶/۴
۳	جهش یافته N۱۶۱H	-۴۵/۹
۴	جهش یافته N۳۳R	-۴۵/۸
۵	جهش یافته L۱۵K	-۴۵/۶
۶	جهش یافته K۴۳M	-۴۶/۰
۷	جهش یافته T۵۰A	-۴۵/۷
۸	جهش یافته Y۷۶F	-۴۵/۸
۹	جهش یافته L۱۵K	-۴۵/۶
۱۰	جهش یافته Y۷۶F	-۴۵/۷
۱۱	جهش یافته N۱۰۱S	-۴۶/۴
۱۲	جهش یافته D۱۰۸N	-۴۵/۱
۱۳	نوع وحشی کمپلکس MMOH-MMOR	-۱۲/۵
۱۴	جهش یافته N۳۵G	-۱۲/۵

جدول ۵- آمینواسیدهایی که در برهمکنش بین هیدروکسیلاز و ردوکتاز نقش دارند

نوع برهمکنش	نام آمینواسید	نام زیرواحد پروتئینی (زنجیره)
هیدروفوب	Gln۸۳- Thr۸۷- Arg۸۸- Asn۹۰	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز (A)
هیدروژنی و هیدروفوب	Gln۲۶- Gln۵۹- Phe۶۰- Leu۶۰- Glu۶۶- Tyr۶۷- Arg۶۹- Met۷۰- Arg۷۷- Thr۷۴- Leu۷۴- Arg۷۴- Met۷۴- Ala۷۴- Asp۳۱۲- Ile۳۱۶- Arg۳۲۰	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز (F)
هیدروژنی	Arg۴۵	زیرواحد بتا هیدروکسیلاز (B)
هیدروژنی	Asp۱۲۱	زیرواحد بتا هیدروکسیلاز (G)
هیدروژنی و هیدروفوب	Asp۱۳- Gly۱۴- Glu۱۵- Arg۱۸- Ile۲۸- Thr۲۹- Leu۳۲- Asp۲۶- Ala۳۰- Arg۳۲- Asn۳۵- Ile۳۶- Phe۳۷- Leu۳۸- Met۳۹- Ser۴۰- Ser۴۱- Cys۴۲- Trp۴۳- Arg۴۳- Glu۴۴- Gly۴۶- Cys۴۷- Ser۶۵- Gln۶۷- His۹۸	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)

جدول ۶- جهش‌هایی که بر اساس پیش‌بینی سرور mCSM-PP12 باعث افزایش پایداری آنزیم می‌شوند.

ردیف	زیرواحد (کد زنجیره)	نوع وحشی	پیش‌بینی سرور mCSM-PP12	نام جهش
۱	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۱۳Asp	Glu	E۱۳D
۲	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۱۵Glu	Gln	Q۱۵E
۳	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۲۶Asp	Tyr	Y۲۶D
۴	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۲۹Thr	Asp	D۲۹T
۵	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۰Ala	Phe	F۳۰A
۶	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۲Leu	Glu	E۳۲L
۷	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۳Arg	Asp	D۳۳R
۸	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۵Asn	Gly	G۳۵N
۹	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۶Ile	Tyr	Y۳۶I
۱۰	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۷Phe	His	H۳۷F
۱۱	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۳۹Met	Pro	P۳۹M
۱۲	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۴۴Glu	Ala	A۴۴E
۱۳	دومین فریدوکسین ردوکتاز (D)	۶۵Ser	Tyr	Y۶۵S
۱۴	زیرواحد آلفا هیدروکسیلاز (F)	۶۹Arg	Pro	P۶۹R

جدول ۷- مقدار ΔG برای انواع جهش‌یافته (کمپلکس هیدروکسیلاز - ردوکتاز)

ردیف	نام آنزیم	ΔG (Kcal mol ⁻¹)
۱	نوع وحشی کمپلکس	-۱۲/۵
۲	D۱۳E	-۱۲/۵
۳	E۱۵Q	-۱۲/۱
۴	D۲۶Y	-۱۲/۱
۵	T۲۹D	۱۲/۸
۶	A۳۰F	-۱۲/۵
۷	L۳۲E	-۱۲/۵
۸	R۳۳D	-۱۲/۵
۹	N۳۵G	-۱۲/۵
۱۰	I۳۶Y	-۱۲/۵
۱۱	F۳۷H	-۱۳/۱
۱۲	M۳۹P	-۱۲/۳
۱۳	E۴۴A	-۱۲/۱
۱۴	S۶۵Y	-۱۲/۳

بحث

مولکول‌های آبرگیز را انجام می‌دهد که منجر به تمایل زیاد استفاده از این آنزیم در تولید کاتالیست‌های زیستی و زیست پالایی می‌شود. هدف اصلی این تحقیق تولید انواع جهش‌یافته‌ها بود که پایداری بیشتری نسبت به نوع وحشی آنزیم داشته باشند. جهش‌های Q۸۳L، N۱۶۱H، K۴۳M، N۱۰۱S، باعث منفی‌تر شدن مقدار ΔG کمپلکس هیدروکسیلاز - پروتئین تنظیم‌کننده می‌شوند. نتایج حاصل از تحلیل LigPlot نشان داد که در جهش‌یافته‌های Q۸۳L و N۱۶۱H پیوندهای

در حال حاضر سنتز شیمیایی متانول به دما و فشار بالا و همچنین کاتالیزورهای گران قیمت نیاز دارد. توانایی متان مونواکسیژناز در تبدیل متان به متانول با نرخ بالا، در دما و فشار محیط با استفاده از اکسیژن، آن را برای کاربردهای صنعتی جذاب می‌کند. آنزیم sMMO علاوه بر سودمندی بالقوه در تبدیل متان به متانول، اکسیداسیون طیف وسیعی از

با جهش اسپارژین ۱۶۱ و جایگزینی هیستیدین در زیرواحد هیدروکسیلاز میزان $\Delta\Delta G$ برابر با $-0.73 \text{ Kcal mol}^{-1}$ محاسبه شد. این عدد بیانگر این است که جهش می‌تواند سبب افزایش پایداری ترمودینامیکی در پروتئین شود. با توجه به اینکه زنجیره جانبی اسپارژین که در سطح پروتئین قرار گرفته غیر یونی است و از طرفی پروتئین‌ها تمایل دارند سطح آبدوست مناسب برای برهمکنش با حلال اطرافشان داشته باشند، بنابراین آمینواسید هیستیدین دارای زنجیره جانبی قطبی با بار مثبت است که باعث افزایش حلالیت و سبب افزایش پایداری آنزیم می‌شود. از طرف دیگر طول پیوند هیدروژنی در این ناحیه ($1.8/\text{Å}$) نسبت به نوع وحشی آنزیم ($2.4/\text{Å}$) کوتاه‌تر شده است و این عامل می‌تواند باعث افزایش پایداری آنزیم شود. با جهش گلوتامین ۸۳ و جایگزینی لوسین در زیرواحد هیدروکسیلاز میزان $\Delta\Delta G$ برابر با $-0.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$ محاسبه شد. این عدد بیانگر این است که احتمالاً جهش می‌تواند سبب افزایش پایداری ترمودینامیکی در پروتئین شود.

در جهش‌یافته‌های T29D و F37H مقدار $\Delta\Delta G$ به ترتیب $-0.73 \text{ Kcal mol}^{-1}$ و $-0.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$ محاسبه شد. در نوع وحشی آنزیم زنجیره جانبی ترئونین و فیل آلانین که در سطح پروتئین قرار گرفته غیر یونی است که در ایجاد سطح آبدوست مورد نیاز برای حلالیت آنزیم شرکت نمی‌کنند. اما در نوع جهش‌یافته زنجیره جانبی اسید اسپارتیک و هیستیدین قطبی و دارای بار می‌باشد که باعث افزایش حلالیت و سبب افزایش پایداری آنزیم می‌شود. یک نتیجه دیگر می‌توان گرفت که این جهش‌ها باعث تشکیل پیوند هیدروژنی جدید بین دو زیرواحد هیدروکسیلاز و ردوکتاز و افزایش پایداری آنزیم می‌شوند. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان جهش‌های اعمال شده در آنزیم sMMO را به عنوان جهش‌های مؤثر در افزایش پایداری آنزیم معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان "بررسی بیوانفورماتیک آنزیم متان مونواکسیژناز و جهش‌زایی در آن جهت بهبود عملکرد آنزیمی" استخراج شده است. این مطالعه توسط دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی پشتیبانی شده است. تیم تحقیقاتی از دانشگاه و همه کسانی که در انجام این مطالعه شرکت کردند تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

تعارض منافی برای گزارش توسط هیچ یک از نویسندگان وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

کلیه نویسندگان در طراحی علمی، اجرای روش‌ها، تحلیل و بررسی نتایج، نگارش پیش‌نویس مقاله و مطالعه و تأیید شکل نهایی مقاله مشارکت یکسان داشته‌اند.

هیدروژنی که در نوع وحشی وجود داشته، حفظ شده است و جهش‌ها در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کند. با استفاده از نتایج به دست آمده از سرور mCSM-PP12 جهش‌های جدیدی در کمپلکس هیدروکسیلاز-ردوکتاز تعریف گردید. نتایج حاصل از سرور PRODIGY نشان می‌دهد که جهش‌یافته‌های T29D و F37H مقدار ΔG منفی‌تری نسبت به نوع وحشی کمپلکس هیدروکسیلاز-ردوکتاز دارند. نتایج حاصل از تحلیل LigPlot نشان می‌دهد که این جهش‌ها باعث تشکیل پیوند هیدروژنی جدید بین زیرواحد ردوکتاز و هیدروکسیلاز می‌شود که همخوانی بالایی با مقادیر ΔG دارد و جهش‌ها در جهت افزایش پایداری آنزیم عمل می‌کند.

ساختار پروتئین‌های کروی اغلب به دو منطقه تقسیم می‌شود. قسمت سطحی که با مولکول‌های اطراف در تماس است و فضای داخلی که برای مولکول‌های خارجی قابل دسترسی نیست. بسیاری از مولکول‌های اطراف، مولکول‌های آب هستند. بنابراین لازم است که سطح پروتئین قطبی (آبدوست) باشد تا بتواند در محیط‌های آبی پروتئین را محلول و پایدار کند. در مقابل بخش داخلی پروتئین، غیرقطبی و توسط آمینواسیدهای غیرقطبی و آبگریز تشکیل شده است. بنابراین تغییر آمینواسیدهای غیرقطبی سطح پروتئین به آمینواسیدهای قطبی می‌تواند در پایداری آنزیم‌ها مؤثر باشد. بر اساس مطالعات انجام گرفته بازمانده‌های آبدوست (Lys18Asp-19Asp-22Gln-23) موجود در پایانه N زیرواحد MMOB که بر روی سطح بیرونی کمپلکس هیدروکسیلاز-پروتئین تنظیم‌کننده قرار می‌گیرند در حلالیت کمپلکس نقش دارند. از آنجایی که دما یکی از عوامل مهم در واکنشده شدن ساختار آنزیم‌هاست، لذا با افزایش پایداری حرارتی آنزیم، ساختار آنزیم نسبت به حرارت مقاوم‌تر شده و می‌توان از آن در واکنش‌های بیشتری استفاده کرد. تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه‌های جانبی آمینواسیدها و یا کوتاه‌تر شدن طول پیوندهای هیدروژنی می‌تواند ساختارهای پروتئین را پایدار کند.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که جهش‌های F282L، M184V، C151T در پایداری آنزیم نقش دارند. یکی از جهش‌های انجام گرفته نقش دو باقیمانده آبدوست Cys151 و Thr213 در حفره جایگاه فعال بود. موقعیت Cys151 در آنزیم sMMO مشابه Tyr122 در زیرواحد R2 ریونوکلئوتید ردوکتاز I است. جایی که تولید رادیکال تیروزیل به وسیله سایت دی آبرون برای شروع چرخه کاتالیزوری آنزیم ریونوکلئوتید ردوکتاز ضروری است. جهش C151E نشان داد که آمینواسید Cys151 نقشی در تولید رادیکال ندارد. عدم ثبات در جهش T213A و پایداری جهش T213S منجر به اهمیت یک گروه OH برای پایداری آنزیم در این موقعیت شد.

References

1. Key World Energy Statistics. Paris: International Energy Agency;2015.
2. Kerr RA. Natural Gas from Shale Bursts onto the Scene. *Science* 2010;328:1624-6. doi:10.1126/science.328.5986.1624
3. Shindell DT, Faluvegi G, Koch DM, Schmidt GA, Unger N, Bauer SE. Improved Attribution of Climate Forcing to Emissions. *Science* 2009;326:716-8.
4. Nisbet EG, Dlugokencky EJ, Bousquet P. Methane on the rise-again. *Science* 2014;343:493-5. doi: 10.1126/science.12478285
5. Fox JM. The different catalytic routes for methane valorization: an assessment of processes for liquid fuels, *Catalysis Reviews. Science and Engineering* 1993;35:2:169-212. doi: 10.1080/01614949308014605
6. Indarto A. A review of direct methane conversion to methanol by dielectric barrier discharge. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 2008;15:1038-43. doi: 10.1109/TDEI.2008.4591225
7. Tang P, Zhu Q, Ma D. Methane Activation: The Past and Future. *Energy & Environmental Science* 2014;7: 2580-91.
8. Park M, Park E, Ahn W. Recent Progress in Direct Conversion of Methane to Methanol over Copper-Exchanged Zeolites. *Front Chem* 2019;7:514. doi: 10.3389/fchem.2019.00514
9. Vincent CW, Suman M, Peter PY, Hung KL, Steve SF, Sunney IC. Alkane Oxidation: Methane Monooxygenases, Related Enzymes, and Their Biomimetics. *Chem Rev* 2017;117:8574-621. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00624
10. Matthew OR, Rosenzweig AC. A tale of two methane monooxygenases. *J Biol Inorg Chem* 2016;22:307-19. doi: 10.1007/s00775-016-1419-y
11. Banerjee R, Jones JC, Lipscomb JD. Soluble Methane Monooxygenase. *Biochemistry* 2019;88:409-31. doi: 10.1146/annurev-biochem013118-111529
12. Seung JL, Michael S, Cormick Mc, Lippard SJ, Uhn-Soo Cho. Control of Substrate Access to the Active Site in Methane Monooxygenase. *Nature* 2013;494:380-4.
13. Semrau JD. Bioremediation via methanotrophy: overview of recent findings and suggestions for future research. *Front Microbiol* 2011;2:209. doi: org/10.3389/fmicb.2011.00209
14. Blanksby SJ, Ellison GB. Bond dissociation energies of organic molecules. *Acc Chem Res* 2003;36:255-63.
15. Elango N, Radhakrishnan R, Froland WA, Wallar BJ, Earhart CA, Lipscomb JD, Ohlendorf DH. Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Protein Science* 1997;6:6556-68.
16. Sirajuddin S, Rosenzweig AC. Enzymatic oxidation of methane. *Biochemistry* 2015;54:2283-94. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00198
17. Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. Methanotrophs and Copper. *FEMS Microbiol Reviews* 2010;34:496-531. doi: org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x
18. Soe CM. Biomimetic modeling of the active site of soluble methane monooxygenase hydroxylase (sMMOH). A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor of Arts in Chemistry. Wellesley College. 2012.
19. Lee SJ. Hydroxylation of methane through component interactions in soluble methane monooxygenases. *Journal of Microbiology* 2016;54:277-82.
20. Merckx M, Kopp DA, Sazinsky MH, Blazyk JL, Muller J, Lippard SJ. Angew. Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase. *Chem Int Ed* 2001;40:2782-07.
21. Smith TJ, Dalton H. Biocatalysis by methane monooxygenase and its implications for the petroleum industry. Elsevier B 2004;151:177-92.
22. Green J, Dalton H. Steady-state kinetic analysis of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *The Biochemical Journal* 1986;236:155-62.
23. Nesheim JC, Lipscomb JD. Large kinetic isotope effects in methane oxidation catalyzed by methane monooxygenase - evidence for C-H bond cleavage in a reaction cycle intermediate. *Biochemistry* 1996;35:10240-7.
24. Lieberman RL, Rosenzweig AC. Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2004;39:147-64. doi: 10.1080/10409230490475507
25. Weixue Wang, D Liang AD, Lippard SJ. Coupling Oxygen Consumption with Hydrocarbon Oxidation in Bacterial Multicomponent Monooxygenases. *Accounts of Chemical Research* 2015;48:2632-9. doi:10.1021/acs.accounts.5b00312
26. Leahy J G, Batchelor P J, Morcomb S M. Evolution of the Soluble Diiron Monooxygenases. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:449-79. doi:10.1016/S0168-6445(03)00023-8
27. Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ, Nordlund P. Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 1993;366:537-43.
28. Zhang S, Karthikeyan R, Fernando SD. Low-temperature biological activation of methane: structure, function and molecular interactions of soluble and particulate methane monooxygenases. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2017;16:611-23. doi:10.1007/s1157-017-9447-9
29. Baba T, Miyaji A. Catalysis and the mechanism of methane conversion to chemicals. *springer nature singapore Pte Ltd. Chapter* 2:23-38.2020.
30. Whittington DA, Rosenzweig AC, Christin A, Frederick CA, Lippard SJ. Xenon and Halogenated Alkanes Track Putative Substrate Binding Cavities in the Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase. *Biochemistry* 2001;40:3476-82.



Bioinformatics Study of Methane Monooxygenase and Its Mutagenesis to Improve Enzymatic Function

Ali Soleimanipour (M.Sc.)¹, Alireza Zakeri (Ph.D.)^{*1}, Saeed Khalili (Ph.D.)¹, ZahraaSadat Hashemi (Ph.D.)², Abolfazl Jahangiri (Ph.D.)³

1- Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran.

2- ATMP Dept., Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran.

3- Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 30 October 2021, Accepted: 19 December 2021

Abstract:

Introduction: The sMMO enzymes contain three common components: a hydroxylase, a reductase, and a regulatory protein. In addition to its potential role in converting methane to methanol, the sMMO enzyme oxidizes a wide range of hydrophobic molecules. The main aim of this study is to improve the stability of the sMMO enzyme by altering its amino acid sequence using bioinformatics techniques.

Methods: The ClusPro web server was used for docking the hydroxylase and reductase subunits. The interactions between amino acid subunits were identified by LigPlot software. Mutagenesis was generated by Molegro Virtual Docker software based on evolutionary trends and mCSM-PP12 server predictions. The ΔG value of wild-type enzymes and mutant variants was obtained using the PRODIGY server.

Results: In the Q83L, N161H, K43M, and N101S mutants, the value of ΔG was more negative than in the wild-type MMOH-2MMOB complex. The results of the LigPlot analysis showed that the hydrogen bonds present in the wild-type enzyme were preserved in the Q83L and N161H mutants and that these mutations increased the stability of the enzyme. Besides, The D29T and H37F mutants cause a more negative ΔG value than the wild-type hydroxylase-reductase complex. The results of LigPlot analysis show that these mutations form a new hydrogen bond between the reductase and hydroxylase subunits, which is highly consistent with the ΔG value and increases the stability of the enzyme.

Conclusion: It is concluded that changing the non-polar amino acids on the protein surface to polar ones can significantly improve the stability of enzymes.

Keywords: Methane monooxygenase, Mutation, Bioinformatics.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: A.R. Zakeri, Email: zakeri@sru.ac.ir

Citation: Soleimanipour A, Zakeri A, Khalili S, Hashemi Z, Jahangiri A. Bioinformatics study of methane monooxygenase and its mutagenesis to improve enzymatic function. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(3):26-38.

