

A comparative study of point mutations on *Cyc₁* gene in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its effect on the bioleaching process using bioinformatics studies

Mahnaz Shojapour¹, Faezeh Fatemi^{2*},
Reza Haji Hosseini³,
Marzieh Dehghan Shasaltaneh⁴

1. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran Tehran, Iran
2. Associate Professor, Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Science, Payame Noor University, Tehran Shargh, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Laboratory of Neuro-organic Chemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran and Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: Oct. 1, 2018 - Accepted: Dec. 17, 2018)

بررسی مقایسه‌ای موتاسیون‌های نقطه‌ای ژن *Cyc₁* در باکتری اسیدیتیبواسیلوس فراواکسیدانس و اثر آن بر فرآیند بیولیچینگ با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک

مهناز شجاع‌پور^۱، فائزه فاطمی^{۲*}، رضا حاجی حسینی^۳،
مرضیه دهقان شاسلتنه^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دانشیار، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه علوم زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴. استادیار، آزمایشگاه شیمی نوروارگانیک، مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران، ایران و گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۲۶)

چکیده

اسیدیتیبواسیلوس فراواکسیدانس یک باکتری اسیدوفیل بوده که در فرایند بیولیچینگ فلزات دخیل می‌باشد. Cytochrome C552 (*Cyc₁*) یک پروتئین پری‌پلاسمی در این باکتری است که نقش کلیدی در انتقال الکترون در زنجیره تنفسی دارد. حضور هم A و B در ساختار *Cyc₁* و نقش آن در دریافت الکترون از پروتئین قبلی (*Cyc₂*) و انتقال آن به پروتئین بعدی (CcO)، دلیل اصلی انتخاب این پروتئین است. در این تحقیق، با هدف بهبود فرآیند بیولیچینگ، گلوتامات ۱۲۲ و هیستیدین ۵۴ *Cyc₁* برای جهش نقطه‌ای در مطالعات بیوانفورماتیک انتخاب شد. ابتدا جهش‌ها توسط نرم‌افزار پایمول انجام و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای پروتئین‌های وحشی و جهش یافته E122D و H54I در *Cyc₁* صورت گرفت. تغییرات ساختار فضایی پروتئین‌های وحشی و جهش یافته توسط آنالیزهای SASA, Rg, RMSF, RMSD و پیوندهای هیدروژنی انجام شد. نتایج حاکی از پایداری دو پروتئین جهش یافته پس از پایان شبیه‌سازی بود. با تبدیل گلوتامات ۱۲۲ به آسپارات، یک مولکول اسیدی، اسیدی‌تر شده و با کاهش بیش از پیش پتانسیل ردوکس در مرکز راستی سیانین، باعث سرعت انتقال الکترون به *Cyc₁* خواهد شد. همچنین، با کاهش پتانسیل ردوکس در محل جهش سرعت انتقال الکترون به هم A نیز افزایش خواهد یافت. در صورت تبدیل هیستیدین ۵۴ به ایزولوسین، حلقه ایمیدازول الکترواستاتیک به اسیدآمینوای باریشه بدون بار تغییر کرده و در نتیجه منجر به تشکیل یک پیوند هیدروژنه قوی بین دو اسیدآمینو می‌شود. بنابراین، انتقال الکترون بین *Cyc₁* و CcO از طریق یک مولکول آب (W79) بهبود یافته و به دنبال آن احتمالاً سرعت بیولیچینگ افزایش خواهد یافت.

واژه‌های کلیدی: اسیدیتیبواسیلوس فراواکسیدانس، جهش نقطه‌ای، زنجیره انتقال الکترون، سیتوکروم C552 (*Cyc₁*)، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

Abstract

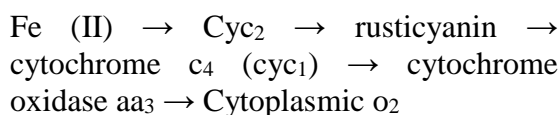
Acidithiobacillus ferrooxidans (*Af*) is an acidophilic bacterium involved in the bioleaching process. Cytochrome c₅₅₂ (*Cyc₁*) is a periplasmic protein that has a key role in the electron transportation in the respiratory chain. The presence of both heme A and B in the *Cyc₁* structure and its role in taking electrons from the previous protein and electron transfer to the next protein is the main reason for choosing this protein. In this research, with purpose of improving the bioleaching process, glutamate 122 and histidine 54 *Cyc₁* were selected for point mutation in bioinformatics studies. Mutations were performed by PYMOL software and simulated molecular dynamics for wild proteins, and mutant E122D, H54I in *Cyc₁*. The conformational changes of mutated protein were investigated by RMSD, RMSF, SASA, Rg, NH bond analysis. Our results confirmed that the mutated proteins retained its stability during the simulation. By converting glutamate to aspartate, an acid molecule changed into a more acidic molecule leading to the further decreased redox potential at the rusticyanin midpoint resulted into the improved electron transfer from the Rcy to *Cyc₁*. This will also cause the increased electron transfer rate to heme A. In the case of converting histidine 54 to isoleucine, an electrostatic imidazole loop changed into an amino acid with the root of R with lack of charge which leads to the formation of a stronger hydrogen bond between the two amino acids. Therefore, probably the electron transfers between *Cyc₁* and CcO is improved through a water molecule (W79) leading to increased bioleaching rate.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Cytochrome c₅₅₂, Molecular Dynamics Simulation, Point Mutation, Respiratory chain.

مقدمه

بیولیچینگ روشی بیولوژیکی جهت استخراج فلزات از سنگ معدن، توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. تاکنون فرآیند بیولیچینگ به‌ویژه لیچینگ اورانیوم، توسط سویه‌های مختلف باکتریایی از جمله باکتری /سیدیتیبو *باسیلوس فرواکسیدانس (Af)* در سراسر جهان به‌طور گسترده‌ای انجام گرفته است. باکتری *Af* اولین بار توسط Hinkel & Kolmer (1947) از آب اسیدی یک معدن زغال‌سنگ جدا شد (Donati & Sand, 2007) این باکتری از مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم می‌باشد که باعث استخراج اورانیوم از سنگ معدن کم‌عیار می‌شود و از نظر تولید انرژی هسته‌ای حائز اهمیت می‌باشد (Smith & Riddle, 2009). این باکتری به‌شدت هوازی است، اما می‌تواند در شرایط بی‌هوازی نیز بر روی ترکیبات گوگردی و سولفید فلزات با استفاده از آهن به‌عنوان پذیرنده الکترون رشد نماید (Donati & Boiardi, 1997). این باکتری می‌تواند توسط دو مکانیسم "مستقیم" و "غیرمستقیم" سولفید موجود در سنگ را حل نماید (Vera et al., 2013). مکانیسم مستقیم شامل ارتباط فیزیکی میکروارگانیسم‌ها با سولفیدهای نامحلول می‌باشد، بدین‌صورت که باکتری‌ها، الکترون را به‌طور مستقیم دریافت کرده و با احیاء مواد معدنی، سولفید فلزات را اکسید می‌کنند (Tributsch, 2001). در مکانیسم غیرمستقیم، یون آهن فریک (Fe^{3+})، توسط اکسیداسیون میکروبی به یون آهن فرو (Fe^{2+}) موجود در مواد معدنی، تبدیل و باعث اکسیداسیون فلزات احیاء شده می‌شود (Sand & Schippers, 2001). بیشتر محققین بر این باورند که مکانیسم غیرمستقیم از محتمل‌ترین مکانیسم‌های دخیل در بیولیچینگ اورانیوم می‌باشد. در این روش، باکتری‌ها با حمله غیرمستقیم به اورانیوم معدنی، آهن (II) پیریت را به آهن (III) محلول تبدیل می‌کنند. آهن (III) به‌آسانی به مواد معدنی حاوی U(IV) حمله کرده و آن را به U(VI) محلول در اسید سولفوریک رقیق تبدیل

می‌نماید (Bhatti et al., 1998; Quatrini et al., 2006; Appia-Ayme et al., 2006; Fatemi et al., 2015) در باکتری *Af* ژن‌های کدکننده اکسایش آهن در دو واحد رونویسی اپران‌های *rus* و *pet I* وجود دارند. اپرون *rus* شامل دو سیتوکروم از نوع C (*Cyc2*) و یک سیتوکروم اکسیداز *aa3*-type (*Cyc1*)، و راستی‌سیانین می‌باشد (Appia-Ayme & Bonnefoy, 1999). زنجیره‌های تنفسی درگیر در این واکنش‌های احیاء، احتمالاً توسط پروتئین‌های چندگانه پری‌پلاسمی، کنترل می‌شوند (Fatemi et al., 2017) مسیر زنجیره تنفسی در باکتری به شرح زیر می‌باشد:



Cyc1 Cytochrome *c4* تنها پروتئین انتقال‌دهنده الکترون می‌باشد که می‌تواند از طریق غربالگری ملایم از غشای داخلی جدا شود، بنابراین می‌توان اینگونه بیان نمود که *Cyc1* بهترین سیتوکرومی است که تاکنون شناخته شده است. حالیت این پروتئین غشای محیطی در آب، تصفیه و کریستالی شدن آن را تسهیل می‌نماید (Voet et al., 2016). *Cyc1* دارای دو گروه هم: *heme A* و *heme B* می‌باشد. (*heme A*) با اتم مس RCY ارتباط دارد و (*heme B*) الکترون را از *heme A* دریافت نموده و به *Cox* منتقل می‌نماید. تجزیه و تحلیل گروه‌های هم در ساختار *Cyc1* نشان‌دهنده ارتباط مستقیم گروه‌های کربوکسیل هم *A* و هم *B* با یکدیگر می‌باشد. این ارتباط بیانگر مسیر احتمالی انتقال الکترون به گیرنده پروتئینی بعدی می‌باشد (Patra et al., 2013). گروه کربوکسیل در *heme A* به‌طور مستقیم الکترون را از RCY دریافت می‌کند (Abergel et al., 2003). همچنین، *Cyc1* از دیگر پروتئین‌های موجود در زنجیره انتقال الکترون، کوچک‌تر می‌باشد و در فضای پری-پلاسمی قرار دارد.

Jafarpoor et al. (2019) و Farahmand et al.

سرور ProSA-web Qmean, RAMPAGE و Verify 3D آنالیز شدند و بهترین مدل انتخاب گردید (Wiederstein *et al.*, 2016; Ghasemi *et al.*, 2016; Benkert *et al.*, 2009; & Sippl, 2007; Eisenberg *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 1997).

آنالیز موتاسیون در محیط مجازی

داده پایگاه‌های زیر برای ارزیابی تغییرات پایداری پروتئین پس از جهش مورد استفاده قرار گرفت: DUET (<http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/duet>)

SDM (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/sdm/sdm.php>)

Hot spot (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>).

انجام موتاسیون بر روی پروتئین *Cyc1*

پس از آنالیز موتاسیون روی پروتئین مورد نظر و تأیید پایداری آن در محیط مجازی، با استفاده از نرم‌افزار پایمول، جهش H54I و E122D ایجاد شد (از آنجاکه اولین اسید آمینه "آلانین" در الگو وجود ندارد، اسید آمینه ۱۲۱ در الگو همان ۱۲۲ و اسید آمینه ۵۳ در الگو همان ۵۴ در مدل است) و فایل PDB برای دو اسید آمینه جهش‌یافته فوق ساخته شد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

از شبیه‌سازی برای پروتئین *Cyc1* وحشی و جهش‌یافته استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های بیشتر با پکیج شبیه‌سازی GROMACS، نرم‌افزار نسخه ۵,۱,۴ در یک سیستم لینوکس اوبونتو و با استفاده از force-field 43a1, GROMOS96 انجام شد. در نهایت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای ۱۰۰ ps تحت شرایط NVT و NPT انجام گردید. تمام شبیه‌سازی‌ها برای ۱۰۰ ns انجام شده و مختصات اتمی هر ۲ ps ذخیره شد (Ghasemi *et al.*, 2016). سپس، نتایج

al. (2018)، از باکتری *اسیدیتیبوسیلیوس* گونه FJ2 جدا شده از چشمه آبگرم رامسر (*Acidithiobacillus ferrooxidans sp.FJ2*) در فرایند بیولوژیچینگ استفاده کردند (Farahmand *et al.*, 2018; Jafarpour *et al.*, 2018). در ادامه تحقیقات آنها و با توجه به اهمیت ژن کدکننده پروتئین *Cyc1* در بالا بردن کارایی این باکتری در فرایند بیولوژیچینگ و حصول راهکاری مناسب و کم هزینه در عملی کردن بهینه‌سازی فرایند بیولوژیچینگ اورانیوم، برای اولین بار، بررسی بیوانفورماتیک جهش نقطه‌ای ژن *Cyc1* در باکتری *اسیدیتیبوسیلیوس* فرااکسیدانس، جزو اهداف اصلی این پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

همولوژی مدلینگ و اعتبار سنجی

نرم‌افزار مدل

باکتری *اسیدیتیبوسیلیوس* *فرااکسیدانس* گونه FJ2 بدون ATCC در پایگاه داده UniProt است. بنابراین *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (کد شناسایی: B7JAQ6 در UniProt) با شباهت ۹۹٪ به عنوان پروتئین مدل با استفاده از protein blast انتخاب شد. از آنجا که این پروتئین فرمت PDB ندارد، ساختار سه بعدی آن با استفاده از نرم‌افزار مدلر تولید شد. مدلر برای همولوژی مدلینگ و یا مدل‌سازی مقایسه‌ای ساختارهای سه بعدی پروتئین استفاده می‌شود. برای تهیه ساختمان سه بعدی *Cyc1* از نرم‌افزار Modeller ورژن ۹/۱۲ استفاده شد و ساختار کریستالوگرافی زنجیره A پروتئین *Cyc1* (PDB ID: 1H10) با رزولوشن ۲/۱۳ آنگستروم به عنوان ساختار الگو برای *Cyc1* پیشنهاد شد. مدل‌های ساخته شده توسط مدلر، به کمک معادله ارزیابی‌کننده Discrete Optimized Protein Energy (Dope) score از کم به زیاد مرتب شدند. ۲۵ مدل اول با کمترین میزان Dope score، با استفاده از چهار

نتایج

همولوژی مدلینگ

PDB شماره ۴۳ به دست آمده با روش همولوژی مدلینگ، با استفاده از سرورهای ProSA-web، Q Mean، RamPage و verify 3 تأیید شد که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج آنالیز موتاسیون در محیط مجازی

سرورهای DUET، SDM، Hot Spot و برای ارزیابی تغییرات پایداری پروتئین مورد استفاده قرار گرفت (جدول‌های ۲ و ۳).

ایجاد موتاسیون با استفاده از نرم‌افزار پامول تبدیل هیستیدین ۵۴ به ایزولوسین (H54I) و گلوتامات ۱۲۲ به آسپارات (E122D): مطابق شکل ۱، با استفاده از نرم‌افزار پامول و با ایجاد جهش H54I و E122D، فایل‌های PDB جهش یافته ساخته شد.

حاصل از فایل‌های تولید شده با نرم‌افزار VMD (Visual Molecular Dynamics) تجسم داده شده و با استفاده از نرم‌افزارهای استاندارد موجود در GROMACS 5.1.4، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Hess *et al.*, 2008).

آنالیز نتایج حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی

تجزیه و تحلیل نسبی تفاوت‌های ساختاری در پروتئین وحشی و جهش یافته محاسبه شد. جذر میانگین مربع تغییر در ساختار (RMSD)، شعاع ژیراسیون (Rgyr)، جذر میانگین مربع نوسانات در ساختار (RMSF)، منطقه سطح دسترسی حلال (SASA)، با استفاده از ابزارهای gm_x_rmsf، gm_x_gyrate، gm_x_rms و gm_x_sasa (به ترتیب) و پیوندهای هیدروژنی شکل گرفته به وسیله باقیمانده‌های خاص پروتئینی با حلال در زمان شبیه‌سازی (NH Bond)، با استفاده از gm_x_hbond محاسبه شد (Ghasemi *et al.*, 2016; Srikumar & Rohini, 2013).

جدول ۱. نتایج بررسی PDB به دست آمده با روش همولوژی مدلینگ با استفاده از سرورهای ProSA-web، Q Mean، RamPage و verify 3

ProSA- web	Q Mean	Ram Page less than 98%=error	Verify 3D less than 80%=error
Z-score	Z-score	% of the Residues in allowed regions	% of the residues have averaged 3D-1D score >= 0.2
-۶/۵۵	-۰/۹۹	۹۸/۹	۸۱/۵۲

جدول ۲. تغییرات پایداری پروتئین پس از موتاسیون از طریق سرور DUET

DUET server									
Amino acid position	Mutant	situation	Disorder prediction score	MCSM (Increased Stability)	SDM (Increased Stability)	DUET (Increased Stability)	Relative solvent accessibility (%)	Secondary structure	Side-chain
H54	I	Hbond-E126cox●	0.3740	0.51	1.87	0.393	55.50%	Loop or irregular	No H bond
E122	D	H bond-H143 RUS	0.4541	-0.186	-1.78	0.067	81.60%	Alpha-helix	No H bond

● پل ارتباطی Cyt c₄ به Cox از طریق پیوند هیدروژنی.

جدول ۳. تغییرات پایداری پروتئین پس از موتاسیون از طریق سرورهای Hot Spot و SDM

Amino acid position	Mutant	Situation	Disorder prediction score	Predicted pseudo $\Delta\Delta G$: (increased stability)	SDM server				Hot Spot server
					Mutant				
					Secondary structure	Solvent accessibility %	Secondary structure	Solvent accessibility %	
H54	I	Hbond-E126cox●	0.3740	0.84	G	55.5	I	62.6	□
E122	D	H bond H143 RUS	0.4541	-1.48	H	81.6	H	79.5	■

● پل ارتباطی Cyt c₄ به Cox از طریق پیوند هیدروژنی ■ سرور Hot Spot این جهش رو پیشنهاد نکرده □ سرور Hot Spot این جهش را پیشنهاد کرده است.

پیوند NH بین مولکولی در ثبات پروتئین و تعامل پروتئین و حلال، حیاتی است. پیوند NH برای ساختار وحشی و جهش یافته محاسبه شد. تعداد پیوند هیدروژنی در ساختارهای جهش یافته H54I و E122I نسبت به ساختار وحشی، به ترتیب به میزان ۶ و ۲ عدد کاهش یافته است. کاهش پیوندهای هیدروژنی جهش یافته‌ها نسبت به وحشی، بیانگر استحکام کمتر، انعطاف‌پذیری بیشتر و همچنین مشارکت کمتر در تعامل با حلال می‌باشد (شکل ۲).

شعاع ژیراسیون (Rg)

مقادیر Rg برای جهش یافته‌های (E122D) و (H54I) به ترتیب $+0.01$ و $+0.02$ نانومتر نسبت به پروتئین وحشی افزایش یافته است که نشان دهنده تغییر جزئی در فولدینگ پروتئین و فشردگی آن می‌باشد (شکل ۲، جدول ۴).

سطح دسترسی حلال به پروتئین (SASA)

دسترسی حلال به پروتئین در ساختار وحشی و دو جهش یافته توسط تغییر در SASA در طی شبیه‌سازی اندازه‌گیری شد (شکل ۲). مقدار SASA در پروتئین جهش یافته E122D، $+1/23$ نانومتر مربع و جهش یافته H54I، $+2/17$ نانومتر مربع نسبت به پروتئین وحشی افزایش یافته است. این تغییرات جزئی است و بیان‌کننده تغییر ماهیت پروتئین می‌باشد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای پروتئین وحشی و دو جهش یافته، به جهت تشخیص تفاوت ساختار جهش H54I و E122D انجام شد. براساس تحلیل‌هایی مانند RMSD، RMSF، Rg، NH بین مولکولی و SASA، تغییرات ساختاری ناشی از جهش مورد بررسی قرار گرفت.

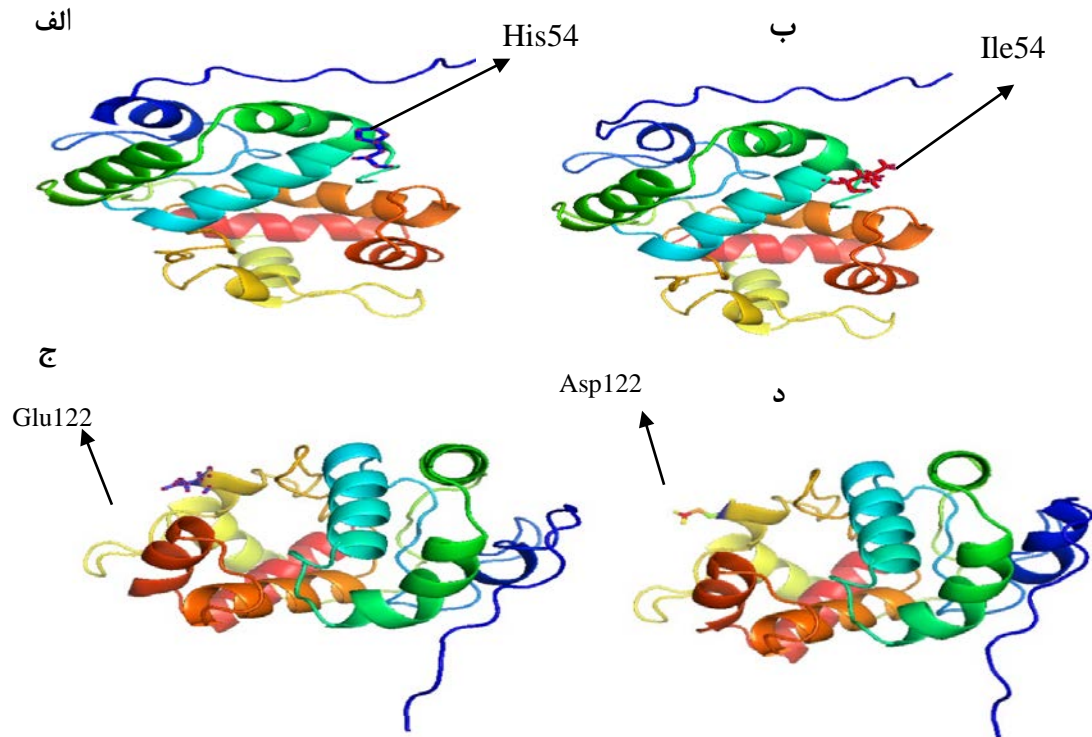
RMSD

همگرایی پروتئین از ساختار اولیه در سیستم طی شبیه‌سازی، توسط RMSD اندازه‌گیری شد. طرح RMSD ساختار وحشی و جهش یافته‌ها، الگوی همگرایی را در شبیه‌سازی ۱۰۰ نانوثانیه نشان داد (شکل ۲). مطابق جدول ۴ میزان RMSD به‌طور متوسط در E122D، $+0.0002$ نانومتر و در H54I $+0.0003$ نانومتر نسبت به ساختار وحشی افزایش یافته است همگرایی به‌دست‌آمده برای ساختار وحشی و دو جهش یافته، پایداری مسیر را تأیید کرد.

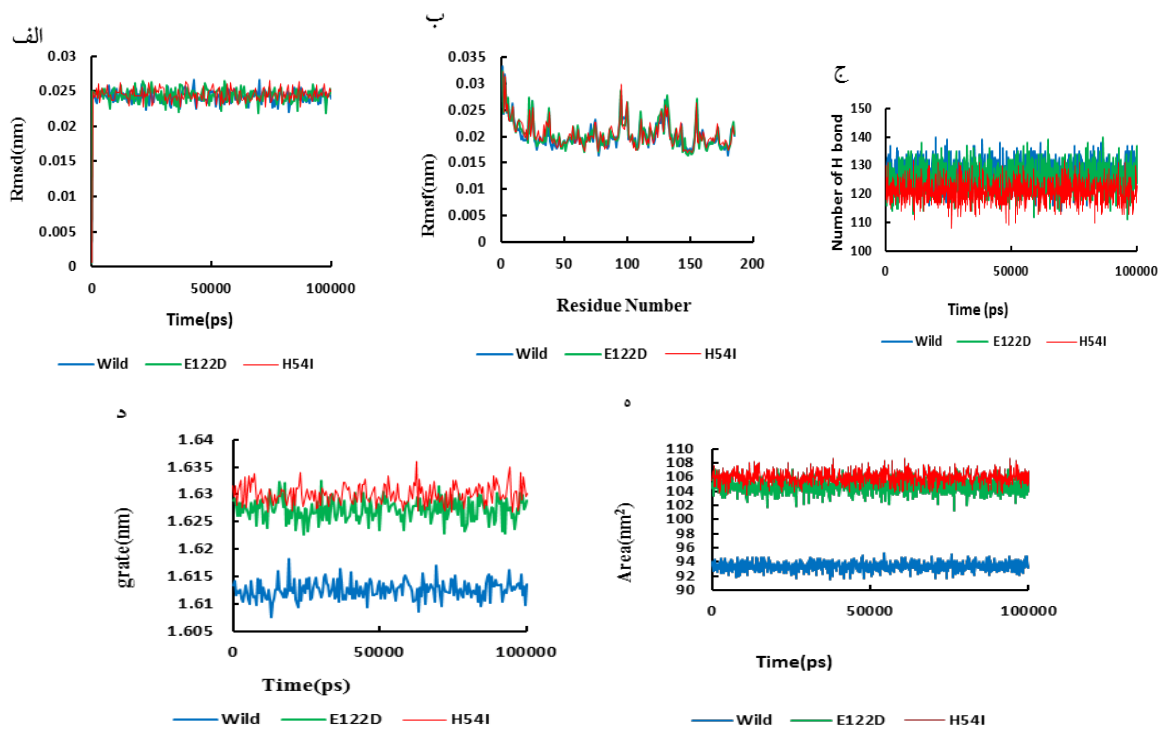
RMSF

طرح RMSF برای ساختار وحشی و جهش یافته‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. ساختارهای جهش یافته (H54I) و (E122D) میانگین افزایش $+0.0002$ nm نسبت به ساختار وحشی نشان می‌دهد.

پیوند هیدروژنی NH



شکل ۱. الف) مدل ساختار پروتئینی Cyc₁ وحشی، ب) جهش یافته (H54I)، ج) وحشی و د) جهش یافته (E122D) که توسط نرم‌افزار پایمول تولید شد.



شکل ۲. اثرات کاربردی جهش His54Ile و Glu122Asp بر پروتئین Cyc₁. الف) تجزیه و تحلیل RMSD، ب) RMSF، ج) NH bond، د) Rg، ه) SASA وحشی و دو جهش یافته (E122D) و (H54I). وحشی با رنگ آبی، جهش یافته (E122D)، با رنگ سبز و جهش یافته (H54I)، با رنگ قرمز مشخص شده است.

جدول ۴. مقایسه تغییرات RMSD, RMSF, Rg, SASA و NH در پروتئین‌های جهش‌یافته H54I و E122D نسبت به وحشی

نتایج شبیه‌سازی	H54I	E122D
RMSD	↑ ۰/۰۰۰۳ نانومتر	↑ ۰/۰۰۰۲ نانومتر
RMSF	↑ ۰/۰۰۰۲ نانومتر	↑ ۰/۰۰۰۲ نانومتر
Rg	↑ ۰/۰۲ نانومتر	↑ ۰/۰۱ نانومتر
SASA	↑ ۲/۱۷ نانومتر مربع	↑ ۱/۲۳ نانومتر مربع
NH	↓ ۶ واحد	↓ ۲ واحد

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش با استفاده از پیشینه تحقیقات و به‌کارگیری دانش بیوانفورماتیک و با شناسایی مناسب‌ترین جهش‌ها در باکتری *اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس*، پیش‌بینی می‌شود که فرآیند انتقال الکترون بهبود یافته و به‌دنبال آن راهکاری در عملی کردن بهینه سازی فرایند بیولیچینگ به‌ویژه اورانیوم ارائه شد. در راستای این هدف دو جهش نقطه‌ای H54I و E122D مورد بررسی قرار گرفت.

جهش اول (H54I)

Barrett *et al.* (2006)، اثر جهش H143M را در پروتئین راستی‌سیانین در باکتری *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* مورد بررسی قرار دادند و سپس اعلام کردند که بر اساس مطالعات شیمی کوانتومی، ساختارهای کریستالی با رزونانس اتمی و EXAFS، پتانسیل ردوکس محاسبه شده راستی‌سیانین جهش یافته حدوداً ۴۰۰ mV بیشتر از نوع وحشی می‌باشد (Barrett *et al.*, 2011). Kanbi *et al.* (2002) اثر جهش Met148Leu را در پروتئین راستی‌سیانین در باکتری *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* مورد بررسی قرار دادند (Kanbi *et al.*, 2002). ساختارهای کریستالی جهش‌یافته Met148Leu در راستی‌سیانین با رزولوشن ۱/۸۲ آنگستروم مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که پتانسیل احیای جهش‌یافته Met148Leu، (۸۰۰ میلی‌ولت) نسبت به پروتئین وحشی (۶۷۰ میلی‌ولت در pH=۳/۲) افزایش یافته است (حدوداً ۱۳۰ میلی‌ولت افزایش در پتانسیل ردوکس). با توجه به

مطالعات فوق می‌توان اینگونه بیان نمود که تبدیل His به Leu نیز پتانسیل ردوکس را افزایش می‌دهد و در نتیجه، سرعت انتقال الکترون را بهبود می‌بخشد. از آنجایی که ایزولوسین با زنجیره جانبی شاخه‌ای دارای ساختار مشابهی با هیستیدین است، جهش His54Ile انتخاب شد. نتایج نشان دهنده‌ی تغییرات ساختار فضایی بسیار ناچیز و پایداری پروتئین طی آنالیزهای مختلف شبیه‌سازی از قبیل RMSF، RMSD، SASA، NH و Rg پس از ایجاد جهش با روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌باشد. بنا به دلایل ذکرشده، می‌توان انتظار داشت که پتانسیل ردوکس در اسیدآمینه جهش یافته، افزایش و به دنبال آن انتقال الکترون بهبود یابد.

جهش دوم (E122D)

سیتوکروم‌ها یک خانواده از پروتئین‌های رنگی را تشکیل می‌دهند که به‌دلیل وجود یک گروه هم با یکدیگر مرتبط هستند و هر بار که یک الکترون را قبول می‌کنند، اتم آهن از Fe^{3+} به Fe^{2+} (حالت اکسیداسیون) تغییر می‌کند. در زنجیره انتقال الکترون، هر گیرنده به‌طور پیوسته جذب الکترون بیشتری (ΔE_0) بزرگ‌تر) نسبت به اهداکننده الکترون دارد (Lüthen & Böttger, 1988). (McRee Goodin & (1993)، پتانسیل‌های ردوکس پروتئین وحشی و جهش‌یافته Asp235Glu) سیتوکروم پراکسیداز را در مخمر، اندازه‌گیری نمودند ($E_0 = -183, -113$) (Goodin & (McRee, 1993). با توجه به اینکه Asp و Glu دارای یک کربوکسیلات هستند، پتانسیل ردوکس جهش

باعث افزایش دپروتونه شدن هیستیدین ۱۴۳ راستی سیانین (با تبدیل فرم ایمیدازول به ایمیدازولات) و کاهش بیشتر پتانسیل ردوکس (بیش‌تر از ۱۰۰ میلی‌ولت) در نقطه میانی راستی‌سیانین شود که این امر منجر به افزایش سرعت انتقال الکترون از راستی‌سیانین به Cyc_1 خواهد شد. بنابراین، با این جهش از یک‌طرف پتانسیل ردوکس راستی‌سیانین کاهش یافته و انتقال الکترون از راستی‌سیانین به Cyc_1 بهبود می‌یابد و از طرف دیگر با کاهش پتانسیل ردوکس در نقطه جهش (E122D) (با توجه به نتایج مطالعات Zhou و Goodin & McRee)، تمایل بیشتری به از دست دادن الکترون و انتقال آن به آهن هم خواهد داشت.

Tze-Kiong *et al.* (2011) جهش‌های ژن فلاووپروتئین دهیدروژناز (ETFDH) را که پروتئین فلاووپروتئین را کدگذاری می‌کنند بررسی کردند (Er *et al.*, 2011). آنها مطالعات شبیه‌سازی مولکولی (MD) را برای هر دو نوع وحشی و جهش‌یافته انجام دادند. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که RMSD در نوع وحشی $1/43 \text{ \AA}$ بود و در پروتئین‌های جهش‌یافته A84T و F128S به ترتیب $1/38 \text{ \AA}$ و $1/51 \text{ \AA}$ بود. داده‌های موجود نشان می‌دهد که تبدیل اسید آمینه هیدروفوب به اسید آمینه‌های قطبی و خنثی می‌تواند بر پایداری پروتئین تأثیر اندکی بگذارد.

در پژوهش حاضر نیز اثر جهش H54I و E122D بر ساختار پروتئین Cyc_1 به‌وسیله آنالیز نتایج به‌دست آمده از مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: RMSD، RMSF، SASA، Rg و NH مورد بررسی قرار داده شد.

همگرایی پروتئین از ساختار اولیه در سیستم طی شبیه‌سازی، توسط RMSD اندازه‌گیری گردید که اغلب برای محاسبه فاصله متوسط اتم‌های (معمولاً اتم‌های ستون فقرات) دو پروتئین و همین‌طور برای ارزیابی شباهت بین دو ساختار پروتئینی کروی استفاده می‌شود [۱۸]. همگرایی به‌دست‌آمده برای هر سه ساختار وحشی و جهش‌یافته H54I و E122D در

یافته (Glu)، ۷۰ میلی‌ولت بیشتر از نوع وحشی گزارش گردید. Huan-Xiang Zhou (1994) برای محاسبه اثرات جهش‌های نقطه‌ای و تشکیل کمپلکس بر روی پتانسیل‌های ردوکس سیتوکروم پراکسیداز (CCP) مخمر از یک مدل پیوسته استفاده نمود (Zhou, 1994). در مورد CCP، محاسبات مدل پیوسته بر روی اثرات جهش Asp235Glu منجر به این نتیجه شد که کاراکتر ایمیدازولات His175 وحشی، که توسط طیف‌سنجی رزونانس رامان و NMR نشان داده شده است، در کاهش پتانسیل ردوکس ۷۰ میلی‌ولتی وحشی نسبت به جهش یافته‌ی Glu235 (گلوتامات پتانسیل ردوکس بیشتر از آسپاراتات است) مهم است (Zhou, 1993, Goodin & McRee, 1994). با توجه به این موضوع که در پژوهش حاضر برخلاف مطالعات Goodin & McRee (1993) و Zhou (1994)، گلوتامات به آسپاراتات جهش داده شده، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پتانسیل ردوکس کاهش خواهد یافت (Zhou, 1994). با توجه به این مطلب که اگر E_0 مثبت باشد، به معنی تمایل بیشتر برای پذیرش الکترون و در صورتی که E_0 منفی‌تر باشد، به معنی تمایل بیشتر به ترک الکترون است (Lüthen & Böttger, 1988)، می‌توان نتیجه گرفت که با تبدیل گلوتامات به آسپاراتات پتانسیل ردوکس کاهش می‌یابد و سپس تمایل بیشتری به از دست دادن الکترون و دادن آن به آهن هم خواهد داشت. Abergel *et al.* (2003) عنوان کردند که از فاصله $3/2$ آنگسترومی بین $H143 \text{ Ne}$ پروتئین راستی سیانین و $O\gamma$ E121 پروتئین Cyc_1 می‌توان به تشکیل پیوند دهیدروژنی بین آنها پی برد. بنابراین، دپروتونه شدن بخشی از باقی‌مانده هیستیدین به کاهش پتانسیل ردوکس نقطه میانی rusticyanin منجر شده و در نتیجه انتقال الکترون از rusticyanin به CYC_{41} به لحاظ انرژی‌تیکی مطلوب‌تر خواهد شد (Abergel *et al.*, 2003). تبدیل گلوتامات به آسپاراتات یعنی تبدیل یک مولکول اسیدی به مولکول اسیدی‌تر که می‌تواند

پروتئین لافارین و اتم‌های حلال وحشی و جهش‌یافته را محاسبه کردند (Srikumar & Rohini, 2013). نتایج شبیه‌سازی در پروتئین وحشی، پایداری ساختار فضایی را تأیید کرد و در پروتئین جهش‌یافته با کاهش ۲۵ تایی در تعداد پیوند NH، کاهش پایداری را نشان داد. در مطالعه حاضر نیز پیوند NH برای وحشی و جهش‌یافته‌های H54I و E122D محاسبه شد. ساختار پروتئین‌های جهش‌یافته H54I، تعداد ۱۲۱ پیوند هیدروژنی NH و در جهش E122D تعداد ۱۲۵ پیوند هیدروژنی NH را نشان داد (به‌طور متوسط) که نسبت به پروتئین وحشی در جهش اول حدوداً ۶ واحد و در جهش دوم ۲ واحد کمتر است (جدول ۴) که این نتایج نشان‌دهنده پایداری بیشتر هر دو مولکول جهش‌یافته در مقایسه با پروتئین‌های جهش‌یافته در مطالعات Srikumar است.

مطالعات Lingling *et al.* (1994) بر روی تغییرات سازگاری MgATP در پروتئین آهن در باکتری *ازتوباکتر وینلانندی* نشان می‌دهد که میزان Rg پس از ایجاد جهش A157S در حضور MgATP، \AA ۹/۱ نسبت به نوع وحشی افزایش یافته است. نتایج نشان داد که ساختار پروتئین پس از تبدیل آمینو اسید هیدروفوب به هیدروفیل بازتر شد (Chen *et al.*, 1994). این مطالعات نتایج ما را تأیید کرد. همچنین، Muneeswaran *et al.* (2018)، ارزش Rg در جهش‌های Y67F و K72W مورد بررسی قرار دادند. مقدار Rg در هر دو جهش کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده پایداری بیشتر پروتئین پس از جهش است. این مطالعات با نتایج ما سازگار نبودند.

دسترسی حلال به پروتئین در ساختار وحشی و جهش‌یافته H54I و E122D توسط تغییر در SASA در طی شبیه‌سازی‌ها اندازه‌گیری شد. بر اساس طرح SASA، پروتئین‌های جهش‌یافته H54I و E122D به‌طور متوسط مقدار میانگین اندکی بیشتر از پروتئین وحشی را نشان داد که بیان‌کننده تغییر جزئی ماهیت پروتئین و بازشدگی سطحی پروتئین می‌باشد.

انتهای شبیه‌سازی ۱۰۰ نانوثانیه، پایداری مسیر را تأیید کرد که به این ترتیب نتایج مطالعات بر نتایج تحقیقات Tze-Kiong (2011) منطبق بود. Muneeswaran *et al.* (2018) اثر جهش در آپوپتوز Cyt c را بررسی کردند. آنها مطالعات شبیه‌سازی مولکولی (MD) را برای سه پروتئین وحشی و جهش یافته (Y67F و K72W) انجام دادند (Muneeswaran *et al.*, 2018). مقایسه RMSD این سه پروتئین مختلف نشان‌دهنده تغییرات ساختاری آنها در اثر جهش بود. داده‌های موجود نشان می‌دهد که تبدیل اسید آمینه قلیایی به آمینو اسید هیدروفوب (K72W) می‌تواند به مقدار کم بر پایداری پروتئین تأثیر بگذارد (افزایش ۰/۰۱۶۲ نانومتر). این مطالعات با نتایج ما سازگار بودند.

Shu *et al.* (2017)، تأثیر موتاسیون‌های F57W و Y51W را بر روی هدایت پیلی *rsulfurreducens* Geobacte بررسی کردند و نشان دادند که تریپتوفان به‌نحو بهتری در انتقال الکترون نسبت به تیروزین یا فیل‌آلنین کمک می‌کند. این نتایج نشان داد که مکانیسم انتقال الکترون در Geobacter به آمینو اسیدهای آروماتیک نسبت داده شده است. همچنین نشان داده شد که مقدار RMSF بعد از جهش به مقدار کم افزایش می‌یابد. این مطالعات تقریباً با نتایج این مطالعه سازگار بود. همچنین، Muneeswaran *et al.* (2018)، ارزش RMSF را در جهش‌های Y67F و K72W بررسی کردند (Muneeswaran *et al.*, 2018). مقادیر میانگین RMSF برای WT، Y67F و K72W جهش‌یافته به ترتیب ۰/۱۲۵۱، ۰/۱۱۹۹ و ۰/۱۲۱۶ نانومتر یافت شد. مقایسه آنالیز RMSF در این سه پروتئین مختلف نشان داد پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به وحشی پایدارترند. این مطالعات با نتایج ما سازگار نبود.

پیوند NH بین مولکولی در ثبات پروتئین و تعامل پروتئین و حلال، حیاتی است. Srikumar & Rohini (2013) نیز پیوند NH بین مولکولی ساخته شده را در

آن انتقال الکترون به آسپاراتات در Cyc₁ بهبود می‌یابد. در جهش E122D، افزایش کمتری در مقادیر RMSD، RMSF، Rg، SASA و کاهش کمتری در تعداد پیوند NH، نسبت به جهش H54I مشاهده شد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که جهش دوم (E122D)، با توجه به قرار گرفتن در جایگاه فعال و مسیر انتقال الکترون و ارتباط آن با آهن هم این آنزیم، می‌تواند جهش بهتر و مؤثرتری در بهبود انتقال الکترون باشد.

پیشنهادها

۱. بررسی بهبود انتقال الکترون از طریق محاسبات کوانتوم مکانیکی QM/MM
۲. انتخاب بهترین جهش در زنجیره انتقال الکترون باکتری اسیدیتئو باسیلوس فرواکسیدانس بر اساس نتایج QM/MM و بررسی بهبود انتقال الکترون با روش‌های آزمایشگاهی.

سپاسگزاری

از آقای محمود راحت که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

SASA (2018) Muneeswaran *et al.*

را بر جهش‌های Y67F و K72W در پروتئین Cyt c بررسی کردند. نتایج میانگین $66/98 \text{ nm}^2$ برای ساختار وحشی و $66/11 \text{ nm}^2$ و $65/31 \text{ nm}^2$ برای جهش‌های Y67F و K72W را نشان داد که بیان‌کننده فولدینگ بیشتر و پایداری بیشتر پروتئین پس از جهش است. این مطالعات با نتایج ما سازگار نبود.

نتایج نشان داد که پروتئین جهش‌یافته H54I در مدت شبیه‌سازی ثبات خود را حفظ نموده است. بنابراین، طبق مطالعات Kanbi (2002) و Barrett (2006)، می‌توان نتیجه گرفت که پتانسیل ردوکس افزایش یافته و به دنبال آن سرعت انتقال الکترون افزایش می‌یابد. همچنین، پروتئین جهش‌یافته E122D نیز در طول مدت شبیه‌سازی پایداری خود را حفظ نموده است. بنابراین طبق مطالعات Goodin & McRee (1993) و Zhou (1994)، پتانسیل ردوکس کاهش خواهد یافت و سپس تمایل بیشتری به از دست دادن الکترون و انتقال آن به آهن هم خواهد داشت. از طرف دیگر، با تبدیل گلوتامات به آسپاراتات، هیستیدین ۱۴۳ بیشتر دپروتونه می‌شود (با تبدیل ایمیدازول به ایمیدازولات)، در نتیجه، پتانسیل ردوکس در نقطه مرکزی راستی‌سیانین بیشتر کاهش می‌یابد و به دنبال

REFERENCES

- Abergel, C.; Nitschke, W.; Malarte, G.; Bruschi, M.; Claverie, J.-M.; Giudici-Ortoni, M.-T.; (2003). The structure of Acidithiobacillus ferrooxidans c 4-cytochrome: a model for complex-induced electron transfer tuning. *Structure*; 11(5): 547-555.
- Abergel, C.; Nitschke, W.; Malarte, G.; Bruschi, M.; Claverie, J.-M.; Giudici-Ortoni, M.-T.; (2003). The structure of Acidithiobacillus ferrooxidans c4-cytochrome: a model for complex-induced electron transfer tuning. *Structure*; 11(5): 547-555.
- Appia-Ayme, C.; Guiliani, N.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V.; (1999). Characterization of an Operon Encoding Two c-Type Cytochromes, an aa3-Type Cytochrome Oxidase, and Rusticyanin in Thiobacillus ferrooxidans ATCC 33020. *Applied and environmental microbiology*; 65(11): 4781-4787.
- Appia-Ayme, C.; Quatrini, R.; Denis, Y.; Denizot, F.; Silver, S.; (2006). Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph Acidithiobacillus ferrooxidans. *Hydrometallurgy*; 83(1-4): 273-280.

- Barrett, M. L.; Harvey, I.; Sundararajan, M.; Surendran, R.; (2006). Atomic resolution crystal structures, EXAFS, and quantum chemical studies of rusticyanin and its two mutants provide insight into its unusual properties. *Biochemistry*; 45(9): 2927-2939.
- Benkert, P.; Künzli, M. Schwede, T.; (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic acids research*; 37(2): 510-514.
- Bhatti, T. M.; Vuorinen, A.; Lehtinen, M.; O. H. Tuovinen.; (1998). Dissolution of uraninite in acid solutions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*; 73(3): 259-263.
- Chen, L.; Gavini, N.; Tsuruta, H.; Eliezer, D.;... (1994). MgATP-induced conformational changes in the iron protein from *Azotobacter vinelandii*, as studied by small-angle x-ray scattering. *Journal of Biological Chemistry*; 269(5): 3290-3294.
- Donati, E. R.; Sand, W.; (2007) *Microbial processing of metal sulfides*. Springer.
- Donati, E.; Pogliani, C.; Boiardi, J.; (1997). Anaerobic leaching of covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 47(6), 636-639.
- Eisenberg, D.; Lüthy, R.; Bowie, J. U.; (1997). [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. in *Methods in enzymology*; 277: 396-404.
- Er, TK.; Chen, CC.; Liu, YY.; (2011). Computational analysis of a novel mutation in ETFDH gene highlights its long-range effects on the FAD-binding motif. *BMC structural biology*; 11(1): 43.
- Farahmand, S.; Fatemi, F.; Haji Hosseini, R.; (2019). [Sequencing of the *rus* gene before and after the mutation with DES in the bacterial *Acidithiobacillus ferrooxidans* sp. FJ2] *Nova Biologica Reperta*]; in press.
- Fatemi, F.; Miri, S.; Jahani, S.; (2017). Effect of metal sulfide pulp density on gene expression of electron transporters in *Acidithiobacillus* sp. FJ2. *Archives of microbiology*; 199(4): 521-530.
- Fatemi, F.; Rashidi, A.; Jahani, S.; (2015). Isolation and identification of native sulfuroxidizing bacterium capable of uranium extraction. *Progress in Biological Sciences*; 5(2): 207-221.
- Ghasemi, F.; Zomorodipour, A.; Karkhane, A. A.; Khorramizadeh, M. R.; (2016). In silico designing of hyper-glycosylated analogs for the human coagulation factor IX. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*; 68: 39-47.
- Goodin, D. B.; McRee, D. E.; (1993). The Asp-His-iron triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry*; 32(13): 3313-3324.
- Hess, B.; Kutzner, C.; Van Der Spoel, D. Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*; 4(3): 435-447.
- Jafarpoor, R.; Fatemi, F.; Mehrnejad, F.; (2018). Investigation the UV Effect on Uranium Bioleaching Process in *Acidithiobacillus* sp FJ2 and its Possible Consequences on the CoxB Gene Sequence. *Biological Journal of Microorganisms*; 7(27): 95-111.
- Kanbi, L. D.; Antonyuk, S.; Hough, M. A.; Hall, J. F.; Dodd, F. E.; Hasnain, S. S.; (2002). Crystal structures of the Met148Leu and Ser86Asp mutants of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: insights into the structural relationship with the cupredoxins and the multi copper proteins. *Journal of molecular biology*; 320(2): 263-275.
- Lüthen, H.; Böttger, M.; (1993). Hexachloroiridate IV as an electron acceptor for a plasmalemma redox system in maize roots. *Plant physiology*; 86(4): 1044-1047.
- Muneeswaran, G.; Pandiaraj, M.;

- Kartheeswaran, S.; Sankaralingam, M.; Muthukumar, K.; Karunakaran, C.; (2018). Molecular dynamics simulation approach to explore atomistic molecular mechanism of peroxidase activity of apoptotic cytochrome c mutants. *Informatics in Medicine Unlocked*; 11: 51-60.
- Patra, M. C.; Pradhan, S. K.; Rath, S. N.; Maharana, J.; (2013). Structural Analysis of Respirasomes in Electron Transfer Pathway of Acidithiobacillus ferrooxidans: A Computer-Aided Molecular Designing Study. *ISRN Biophysic*.
- Quatrini, R.; Appia-Ayme, C.; Denis, Y.; Ratouchniak, J.; (2006). Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of Acidithiobacillus ferrooxidans by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy*; 83(1-4): 263-272.
- Sand, W.; Gehrke T.; Jozsa, P.G.; Schippers, A.; (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*; 59(2): 159-175.
- Shu, C.; Xiao, K.; Sun, X.; (2017). Structural Basis for the Influence of A1, 5A, and W51W57 Mutations on the Conductivity of the Geobacter sulfurreducens Pili. *Crystals*; 8(1): 10.
- Smith, J. J.; Riddle, M.; (2009). Sewage disposal and wildlife health in Antarctica. in *Health of Antarctic Wildlife*: Springer. pp. 271-315.
- Srikumar, P.; Rohini, K.; (2013). Exploring the structural insights on human laforin mutation K87A in Lafora disease-a molecular dynamics study. *Applied biochemistry and biotechnology*; 171(4): 874-882.
- Tributsch, H.; (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*; 59(2): 177-185.
- Vera, M.; Schippers, A.; Sand, W.; (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 97(17): 7529-7541.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; (2016). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. Wiley New York.
- Wang, W.; Xia, M.; Chen, J.; Deng, F.; (2016). Data set for phylogenetic tree and RAMPAGE Ramachandran plot analysis of SODs in Gossypium raimondii and G. arboretum. *Data in brief*; 9: 345-348.
- Wiederstein, M.; Sippl, M. J.; (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*; 35 (2): 407-410.
- Zhou, H.-X.; (1994). Effects of mutations and complex formation on the reduction potentials of cytochrome c and cytochrome c peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*; 116(23): 10362-10375.