مطالعه ای بیوانفارمتیکی انزایم دی هالوجنیز DehlB4 از باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29

مطالعه ای کمپیوتری ساختمان سه بعدی انزایم انزایم دی هالوجنیز DehlB4 از باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29

مطالعه ای ساختمان سه بعدی انزایم انزایم دی هالوجنیز DehlB4 از باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29

Mustafa Sedeqi, Sefatullah Zakary
yamaj69@gmail.com
+93 70 384 0788
Department of Botany, Faculty of Biology, Kabul University, 1006 Dehbori, Kabul, Afghanistan

Abstract

Halogenated organic compounds exist in great quantity in the biosphere and can cause extensive problems due to their toxic properties and persistence in nature. They can affect the quality of life of human beings and other living organisms. The degradation of these compounds by microorganisms is salient in reducing pollutants. *Bradyrhizobium elkanii* is a nitrogen-fixing bacteria that lives in symbiosis with plant roots, particularly legumes. To the best of our knowledge, up to now, there is no evidence to indicate *that Bradyrhizobium elkanii* can produce haloacid dehalogenase type II enzymes. Thus, the current study used proteogenomics techniques for homology modeling and docking assessment of a newly identified dehalogenase type II (namely, DehlB4) to predict its ability to degrade selected halogenated compounds. A total of sixty-seven genomes of *Bradyrhizobium elkanii* strains from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were searched for dehalogenase genes. These strains notably carry dehalogenase genes. Surprisingly, *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29 contains five dehalogenases, and therefore strain BR29 was further characterized. The study aimed to probe the enzyme's catalytic tendencies to optimally breakdown the selected haloacids. The modeled structure of DehlB4 was composed of a core and a cap domain. The modeled structure of DehlB4 revealed satisfactory scores on the ERRAT (90.65%), Verify3D (88.54%), and PROCHECK (100%) assessments. The active site was anticipated by docking and multiple sequence alignment assessments for possible pollutant degradation. The amino acids R40 and N174 were predicted to be catalytically important. The indispensable residue D9 which acts as a nucleophile was conserved with the crystalized structure of DehIVa and L-DEX consequently indicating a robust result of the current research. The proteogenomics study as such has a good potential for screening new types of dehalogenases and characterization of newly identified dehalogenases based on basic molecular structure and function analysis.

Keywords: Dehalogenase, Haloacid dehalogenase, Bradyrhizobium elkanii strain BR29, Protein structure, Dehalogenase type II

مقدمه

استفاده گسترده از علف کش ها و آفت کش های کیمیاوی توسط بخش زراعت برای مدیریت علف های هرزه و آفات به دلیل تاثیر مضر این مواد بر اکوسیستم منجر به نگرانی های جدی شده است. در بخش زراعت بیش از 500 نوع مختلف آفت کش ها با ترکیبات مختلف کیمیاوی استفاده می شوند که اکثر آنها در محیط زیست غیر قابل تجزیه، تغییر و زهری میباشند(Douglas, 2018).

رشد جهانی صنایع در مقیاس بزرگ با ازدیاد نگرانی ها همراه است زیرا با ازدیاد مرکبات هلوجندار که به طور طبیعی وجود دارند، کمک می کنند تا این ترکیبات باعث معضلات متعددی در محیط زیست شوند. تعداد این ترکیبات در سال 1968 کمتر از 50 نوع گزارش داده شده است و در سال 2015 م این تعداد به 5000 مرکب افزایش یافته که فعلاً هم به شکل بسیار سریع در حال افزایش می باشند (Adamu et al., 2020).

باکتریا های *Bradyrhizobium elkanii* ازجمله باکتریا های تثبیت کننده نایتروجن میباشند و با ریشه نباتات لیگومی زنده گی مشترک دارند. با تجزیه نمودن مرکبات هلوجندار جهت بدست آوردن انرژی از روابط بین کاربن و هلوجن تولید کننده خوب انزایم دی هلوجیناز نیز میباشند (Zakary et al., 2021a). باکتری های *Bradyrhizobium elkanii* به طور قابل توجهی حاصلات نباتات لیگومی را افزایش، بیماری های خاک را کاهش داده و زراعت پایدار را تقویت می بخشد (Oliveira et al., 2017). اضافه نمودن باکتریا *Bradyrhizobium elkanii* در خاک به اندازه قابل ملاحظه نایتروجن خاک را بلند برده و در حاصل خیزی نبات و جذب مواد توسط نبات کمک کرده و حاصلات نباتات را ازدیاد میبخشد (Htwe et al., 2017). به طور مثال *Bradyrhizobium* در نبات سویا حاصلات را ۱۲-۱۸ در صد افزایش میدهد (Zilli et al., 2021).

انزایم های دی هلوجینیز (Dehalogenases) باکتریای عناصر کلیدی در از بین بردن مرکبات عضوی هلوجندار میباشند که به عملیه تجزیه مرکبات هلوجندار، Dehalogenation گفته میشود. با توجه به ویژه گی های خاص مواد حاوی عناصر هلوجن، انزایم های هلواسید دی هلوجینیز (Haloacid Dehalogenase) به گروپ های مختلف طبقه بندی شده اند(.(1995) .Slater JH, et al) . در این میان انزایم الفا هلواسید دی هلوجینیز ها (α-haloacid dehalogenases) به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته و به گروپ های I و II تقسیم شده اند (Hill et al., 1999). که هردو گروه مواد هلوجندار با وزن مالیکولی پایین را از بین میبرند و بالای Cα عمل میکنند (Janssen et al., 2001). این انزایم ها تبدیل مرکبات کیمیاوی مختلف را به مواد ساده تر به شیوه ای بسیار خاص و موثر کتلایز می کنند تا آنها را بی ضرر ساخته و جهت استفاده در صنایع کیمیاوی، دوا سازی و زیستی قابل قبول بسازند. دی هلوجینازها انزایم های میکروبی هستند که رابطه هلوجن را با کاربن وصل شده در یک مرکب قطع می کند تا قابلیت آلوده کننده مرکب هلوجن دار از بین برود (Weightman et al., 2002).

در این تحقیق به تجزیه و تحلیل انزایم DehlB4 از باکتری *Bradyrhizobium elkanii* STRAIN BR29 پرداخته شده است که قبلاً صورت نگرفته است. ساختمان اولی، دومی و ساختمان سه بعدی انزایم DehlB4 و متباقی میخانیکیت های تجزیوی آن تا هنوز شناخته نشده است. هدف این تحقیق مطالعه ساختمان اولی، دومی، ساختمان سه بعدی و همچنان میکانیزم عمل این انزایم با نمونه قرار دادن مواد کیمیای هلوجن دار که باعث بیشترین آلوده گی محیط زیست می گردد به وسیله ابزار بیوانفارمتیک است. به در این تحقیق ساختمان سه بعدی انزایم DehlB4 ساخته شده است. دانستن ساختمان سه بعدی یک انزایم برای فهمیدن وظیفه و میخانیکیت عمل انزایم ضروری می باشد. ابتدا یک ساختمان سه بعدی مقایسوی DehlB4 با نمونه قرار دادن انزایم L-DEX باکتریای *Pseudomonas* sp. Strain YL ساخته شده است. ساختمان سه بعدی بدست امده، چگونه گی قاط خورده گی های این انزایم و همچنان محل اتصال آن با مواد حاوی هلوجن را برای ما ارایه می کند. شناخت این امینواسید های مهم کتلایتیک در جریان پروسه کتلالیز توسط انزایم DehlB4 به ما کمک میکند که به میکانیزم و چگونگی عمل دی هلوجینیشن توسط باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* Strain BR29 پی ببریم.

منابع و میتود

تسلسل امینواسیدی انزایم های این تحقیق یعنی DehlB4 (*Bradyrhizobium elkanii*. strain BR29; RYM28378.1)، (*Pseudomonas* sp. Strain YL; S74078.1) L-DEX و DehIVI

(*B. cepacia* MBA4; X66249.1)، از دیتابیس جن بانک سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) (https://www- .ncbi.nlm.nih.gov/)گرفته شده است. سپس تسلسل امینواسید های DehlB4 در پروگرام (Protparam) در ExPASy server (https://web.- expasy.org/protparam/) جهت مطالعه مشخصات فزیکی – کیمیاوی آپلود گردید (Gasteiger et al., 2005). جهت دریافت و مشاهده مشابهت تسلسل امینواسیدی بین انزایم DehlB4 و انزایم های از قبل کریستالو گرافی شده ای L-DEX و DehlVa از پروگرام MultAlin version 5.4.1 استفاده شده است (Corpet, 1988) . ساختمان دومی پروتین انزایم DehlB4 توسط پروگرام GOR4 بدست آمده و شناخته شد (Garnier et al., 1996).

ساختن ساختمان سه بعدی انزایم DehlB4

برای دریافت ساختمان سه بعدی کریستالوگرافی شده دی هلوجینیز از NCBI blast استفاده گردید و ساختمان در نظر گرفته شد که دارای فیصدی بلند مشابهت با ساختمان DehlB4 است. بعداً تسلسل امینواسیدهای DehlB4 در پروگرام SWISS- MODEL (https://swissmodel.expasy.org) آپلود گردید تا به شکل خودبخودی ساختمان سه بعدی DehlB4 ساخته شود (DeLano, 2002). ساختمان سه بعدی L-DEX با داشتن فیصدی بلند مشابهت به‌حیث نمونه (template) قرار گرفته است.

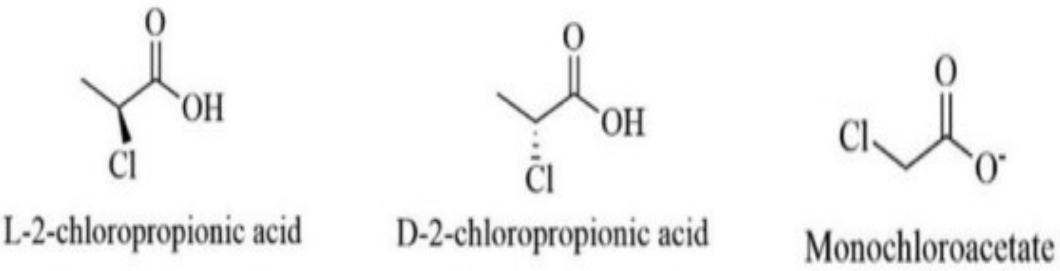
برسی کیفیت ساختمان سه بعدی DehlB4

برای برسی ساختمان سه بعدی ساخته شده انزایم DehlB4 در این تحقیق از پروگرام های ERRAT (Colovos et al., 1993)، PROCHECK (Laskowski et al., 1993) و Verify3D (Luthy et al., 1992) استفاده شده است.

تهیه ساختمان سه بعدی مواد های کیمیاوی

ساختمان سه بعدی مواد های کیمیاوی هریک (D-2-chloropropionic acid; D-2-CP)، L-2- CP (L-2-chloropropionic acid)،

MCA (Monochloroacetate) از دیتابیس (PubChem database) دانلود شده و سپس توسط پروگرام (Pymol) به فارمت PDB تبدیل شد (شکل 1) (DeLano et al., 1996).



شکل 1. ساختمان مواد کیمیاوی استفاده شده در این تحقیق.

تجزیه و تحلیل مالیکولی داکینگ

در مطالعه فعلی از برنامه های (Autodock Tools 1.5.6) و (Autodock Version 4.2.6) جهت داکینگ انزایم – مواد کیمیاوی مورد هدف استفاده شده است. بعد از حذف مالیکول های آب از ساختمان سه بعدی DehlB4، به آن هایدروجن های قطبی و

غیرقطبی اضافه شد. سپس چارج های کولمن (Kollman Charge) و (Gasteigher Charge) آن محاسبه و معین شدند. همین اعمال بالای مواد های کیمیاوی مورد نظر نیز انجام شد تا از پیچیش و دوران های احتمالی درست و صحیح مواد حین اتصال با انزایم در جریان عملیه داکینگ اطمینان حاصل شود. همچنان توسط برنامه (Autogrid Tool)، (Grid Box) انزایم DehlB4 در فضای Å1000 از کواردینات Å18.671، Å15.947 و Å15.06 با سایز های 116 ،116 و 126 به ترتیب روی محور های (x ،y و z) تنظیم شد که تمام امینواسید های انزایم را تحت پوشش قرار می دهد. از برنامه (Autodock Vina) جهت تجزیه و تحلیل داکینگ استفاده شد که بهترین نتیجه برای هر مواد که بهترین حالت ممکن رابطه با کمترین انرژی (kcal/mol) را نشان میدهد انتخاب شد. بلاخره فایل های جداگانه حاصل از هربار داکینگ با فارمت"pdbqt" به فارمت "pdb" توسط برنامه (Pymol) تبدیل، مشاهده و بررسی شد (DeLano et al., 1996).

مباحثه و نتایج تحقیق

خواص فزیکی –کیمیاوی انزایم DehlB4

برای دانستن خواص طبیعی پروتین، مطالعه خواص فزیکی – کیمیاوی آن بسیار اهمیت دارد. انزایم DehlB4 بدست آمده از باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29 حاوی 297 امینواسید، 33635.37 دالتون وزن مالیکولی و دارای pI= 5.12 میباشد. نمبر pI پایین تر از 7 نشان دهنده خاصیت اسیدی میباشد. همچنان این انزایم دارای GRAVY نمبر 0.030 میباشد. شاخص بی ثباتی (Instability Index) این مالیکول 45.74 محاسبه گردیده و شاخص الیفاتیکی (Aliphatic Index) آن 100 میباشد. شاخص بی ثباتی یک پروتین که نزدیک به 40 باشد نشان دهنده ثبات آن بوده و شاخص الیفاتیکی بالاتر از 40 ثبات حرارتی یک پروتین را نشان میدهد (جدول 1) (Harisna et al., 2017; Zakary et al., 2021a).

جدول 1. مشخصات فزیکی –کیمیاویDehlB4.

Details	DehLB4
Amino Acid Residues	297
Theoretical pI	5,12
Molecular Weight (Da)	33635,37
Positively Charged Residues	28
Negatively Charged Residues	39
Instability Index (%)	45,74
Aliphatic Index (%)	100
GRAVY	0.030

مشابهت تسلسل امینواسیدی انزایم های DehlB4, DehIVa ,L-DEX

مقایسه مشابهت تسلسل امینواسیدی انزایم های DehlB4 باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29 همراه با انزایم DehIVa باکتریای *Burkholderia cepacia* MBA4 و انزایم L-DEX باکتریای *Pseudomonas* sp. Strain YL انجام شد (شکل 2). امینواسید های (D11 T15, R42, S119, K152, Y158, S176, N178 , D181) در انزایم DehIVa به عنوان امینواسید های مهم

کتلایتیکی این انزایم گزارش شده است (Schmidberger et al., 2007). که همین امینو اسید ها در انزایم L-DEX باکتریای (*Pseudomonas* sp. Strain YL) نیز موجود بوده و در انزایم یاد شده دارای اهمیت کتلایتیکی می باشد (جدول 2) (Nardi-Dei et al. 1994). خوشبختانه تمام امینواسید های ذکر شده در انزایم تحت مطالعه یعنی DehlB4 نیز موجود می باشند (جدول 2). مشابهت مکمل امینو اسیدی انزایم DehlB4 با انزایم های L-DEX و DehIVa شناخته شد که به طور فیصدی به ترتیب هرکدام (43.50%) و (39.46%) میباشد. امینواسید های DehlB4 با DehIVa و L-DEX مقایسه شده تا پروفایل امینواسیدی آنها چک گردد (شکل 2). این مقایسه نشان دهنده ترکیب امینواسیدی تقریباً یکسان DehlB4 با DehIVa است و در هر سه این انزایم ها DehlB4 ,DehIVa و L-DEX همان 9 امینواسید مهم کتلایتیکی مشابه موجود است (جدول 2). این نتایج زمینه را فراهم ساخت تا امینواسید های مهم کتلایتیکی انزایم تحت مطالعه این تحقیق شناخته و اثبات شوند.

شکل 2. مقاسیه تسلسل امینواسید های هلواسید دی هلوجیناز های مختلف. هر یک با اکسشن نمبر های آن انزایم DehlB4 با اکسشن نمبر (RYM28378.1) ، انزایم (DehlVI) با اکسشن نمبر (CAA46976.1) انزایم L-DEX YL بااکسشن نمبر (AAB32245.1) وانزایم Dehl58.1 با اکسشن نمبر (pdb|1QQ5|A)

تجزیه و تحلیل ساختمان دومی DehlB4

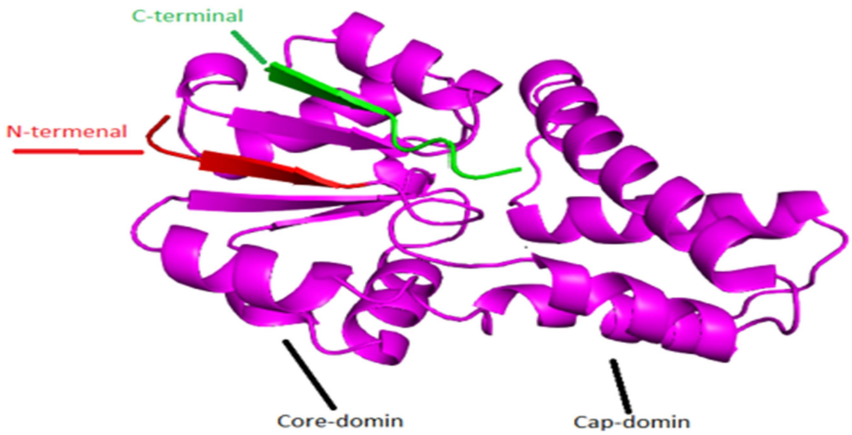
ساختمان دومی یک پروتین توسط رابطه هایدروجنی بین گروپ کاربوکسیل و گروپ امایدیک امینواسید با امینواسید دیگر در یک پولی پپتاید که ستون فقرات یک انزایم است تشکیل میشود (Zakary et al., 2022). اثبات ساختمان دومی پروتین انزایم DehlB4 باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* Strain BR29 توسط پروگرام GOR4 شناخته شد (شکل 3). فیصدی اجزای تشکیل کننده ساختمان این انزایم عبارتند از: 13.77 فیصد آن خطی Strand (e)، 42.51 فیصد آن Helix مارپیچی (h) و 43.72 فیصد آن کوایل Coil (c) میباشد. مجموعا در 11 قسمت انزایم DehlB4 ساختمان Helix بکار رفته که از آن جمله قسمت چهارمی طویل ترین و قسمت هفتمی آن کوتاه ترین می باشد.

```
        10        20        30        40        50        60        70
         |         |         |         |         |         |         |
MTIKAIIFDAYGTLYDVQSVADVTEDAFPGYGDIITQVWRIKQLEYSWLRSLMRRYQDFAVVTRDSLAYT
ccceeeeecccccccceeeecccccccccccchhhhhhhhhchhhhhhhhhhhhccceeeechhhhhhh
LRCLGLQYDAATFARIIDKYQHLALYPDAVAALEAMKDKKLAILSNGSPDMLNALVRNSGLDRMLDATIS
hhhccccchhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhheeecccccchhhhhhhhccccchhhhhcch
VDAHKVFKPAPEAYTLIEEVLKVPPAEVLFISSNPWDACGAKSFGLNVAWIERVTPEAMALACVESETVA
hhhhhccccccchhhhhhhhccccccceeeeecccccccccccccccceeeeeecccchhhhhhhhcccccc
PLTMFKALRTQMDELGVVPDHRIHGLSELPALVSARS
chhhhhhhhhhhhccceecccccccccccceeceeec
```

شکل 3. ساختمان دومی انزایم DehlB4.

ساختمان سه بعدی یا مودل سازی هومولوژیکی DehlB4

ساختن ساختمان سه بعدی انزایم ها به اساس نمونه گیری از ساختمان انزایم های از قبل کریستالوگرافی شده (مودل سازی هومولوژیکی) یک نقش مهم را در ساخت ساختمان سه بعدی انزایم بازی میکند (Zakary et al., 2022). هدف از این مرحله ساخت یک مودل ساختمان سه بعدی پروتینی انزایم با نمونه قرار دادن یک انزایم از قبل کریستالوگرافی شده است که مربوط همین فامیل از انزایم ها میباشد. اثبات ساختمان پروتین بر اساس طریقه (Target-Template) بسیار راحت وسازنده است زیرا تسلسل امینواسید پروتین های جدید اکثراً ساختار مشابهی با ساختاری دارند که از قبل در پروتین نمونه تعیین شده است. ازینرو در تحقیق فعلی ساختار پروتینی DehlB4 با استفاده از پروگرام Swiss-Model ساخته شد (شکل 4).

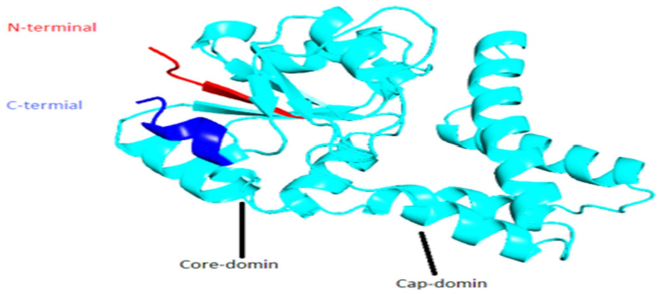


شکل 4. ساختمان سه بعدی DehlB4 که در آن قسمت های مختلف نشان داده شده است.

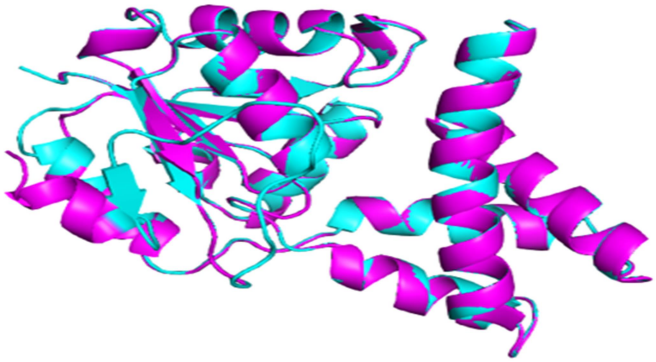
انزایم L-DEX از باکتریای *Pseudomonas* sp. Strain YL (PDB accession:Q53464) با داشتن مشابهت 47 فیصدی با انزایم DehlB4 در Swiss-Model به عنوان بهترین نمونه جهت ساخت مودل سه بعدی پروتین انتخاب شده است. این انزایم مانند دیگر انزایم های الفا هلواسید دی هلوجیناز دارای دو قسمت بنام Core Domain و Cap Domain می باشد (Zakary et al., 2021a). قسمت Core Domain انزایم DehlB4 از لحاظ ساختمانی مشابه به بقیه انزایم های فامیل (HAD) میباشد. به هرصورت، تفاوت ها

در این فامیل بزرگ از انزایم ها در ساحه (Cap Domain) دیده میشود که رول مهم را در تنوع میکانیزم عکس العملی با مرکبات دارند. ساحه (Cap Domain) انزایم DehlB4 به صورت ساختمانی مشابه L-DEX میباشد (شکل 5).

حالت قرار دادن انزایم ها بالای یکدیگر (Superimposed)، انزایم های L-DEX و DehlB4 نشان دهنده ساختمان های یکسان درهردوناحیه (Cap Domain) و (Core Domain) میباشد (شکل6).



شکل 5. ساختمان سه بعدی L-DEX که در آن قسمت های مختف نشان داده شده است.



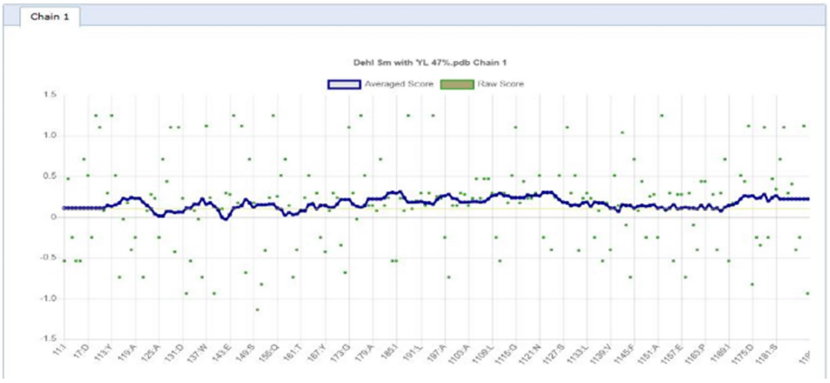
شکل 6. حالت قرار دادن ساختمان های سه بعدی DehlB4 (رنگ بنفش) و L-DEX (رنگ آبی) که هر دو نشان دهنده ساختمان تقریبی یکسان هستند.

بررسی کیفیت ساختمان سه بعدی DehlB4

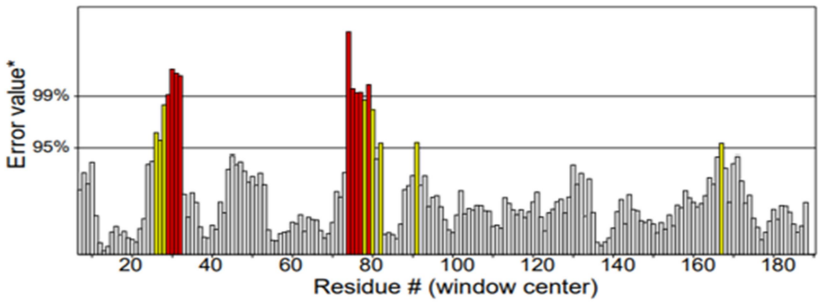
مودل ساختمانی DehlB4 تصدیق شد. نتایج Verify3D نشان داد که 88.54 فیصد از نقاط بیشتر از 0.1 نمره را در Verify3D اخذ نمود که نشان دهنده کیفیت خوب یک ساختمان سه بعدی پروتین می باشد (شکل 7). نتیجه ERRAT نشان دهنده 90.65 فیصد بود (شکل 8) که نتیجه قابل قبول در این محاسبات میباشد. نمره بالاتر از 50 فیصد در ERRAT نتیجه قابل قبول در این محاسبات است و هرقدر که این نمره بالاتر باشد نشان دهنده کیفیت بالای همان پروتین است. ساختمان سه بعدی DehlB4 توسط PROCHECK نیز بررسی شد که در آن به بررسی زوایای psi/phi (ψ, ϕ) پرداخته شده ونتایج آن در Ramachandran Plot مشخص شده است (شکل 9).

Ramachandran Plot در حقیقت یک پروفایل دو بعدی از ساختمان انزایم میباشد. نتایج این محاسبات که بیانگر نسبت قرار گرفتن امینواسید های مهم پروتینی در موقعیت مورد نظر میباشد، عبارتند از: 94.3 فیصد آن در مناطق دلخواه و 5.7 فیصد این نقاط در

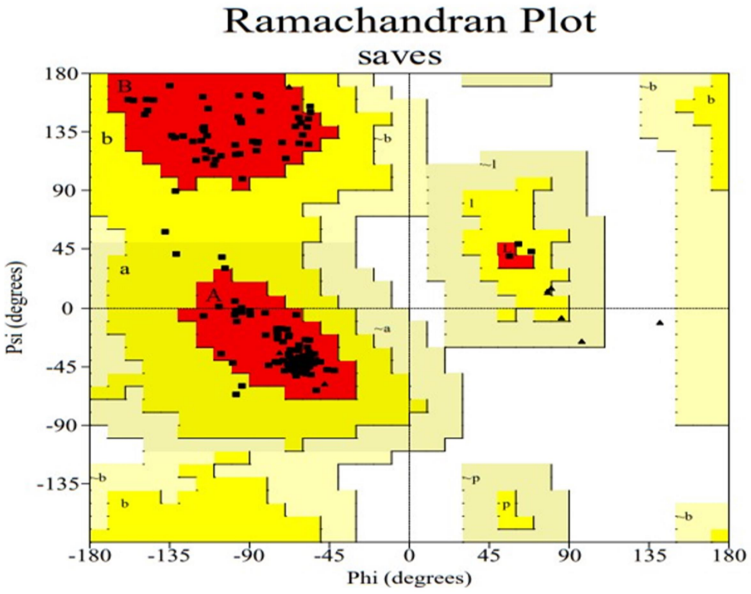
مناطق مجاز قرار گرفته اند. در مجموع 100 فیصد امینواسید ها در مناطق دلخواه و مجاز قرار گرفته اند. یک پروتین زمانی کیفیت خوب دارد که بالاتر از 90 فیصد امینواسید ها در مناطق دلخواه و مجاز قرار بگیرند(Laskowski et al., 1993).



شکل 7. نتیجه Verify3D از ساختمان سه بعدی DehlB4.



شکل 8. نتیجه ERRAT از ساختمان سه بعدی DehlB4.



شکل 9. نتیجه PROCHECK از ساختمان سه بعدی DehlB4.

پیش بینی امینواسید ساحه فعال (Active site)

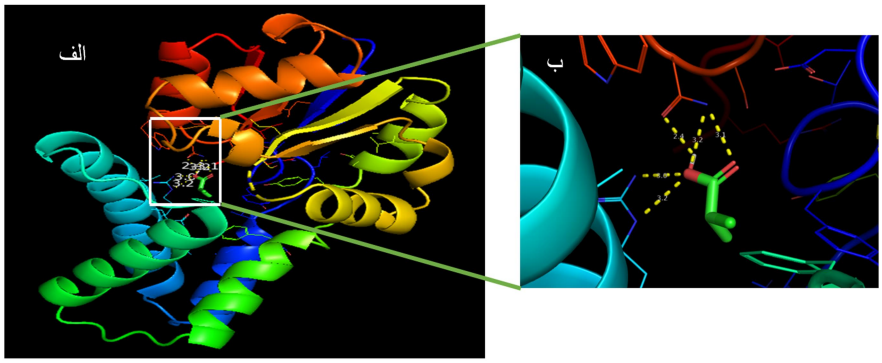
در مطالعه فعلی امینواسید های کتلایتیکی ساحه فعال انزایم DehlB4 از باکتریای *Bradyrhizobium elkanii* strain BR29 توسط Multiple Sequence Alignment (شکل 2) و Docking پیش بینی گردید (اشکال 10-12الف و ب).

عمل BlindDocking مواد کیمیاوی MCA (Monochloroacetate)، D-2-CP (D- 2-chloropropionic) و L-2- CP (L-2-chloropropionic) روی تمام سطوح انزایم DehlB4 انجام شد تا ساحه فعال انزایم شناخته شود به این دلیل که تاهنوز هیچ معلوماتی راجع به ساحه فعال این انزایم وجود ندارد. همچنان Site Specific Docking را بالای یک منطقه مشخص انزایم انجام دادیم تا نتایج بدست امده از Blind Docking دقیق تر بررسی شده و مورد اطمینان قرار گیرد. در نتیجه مشاهده گردید که امینواسید های R40 و N174 با تمام مواد کیمیاوی مورد نظر رابطه هایدروجنی برقرار نمود.

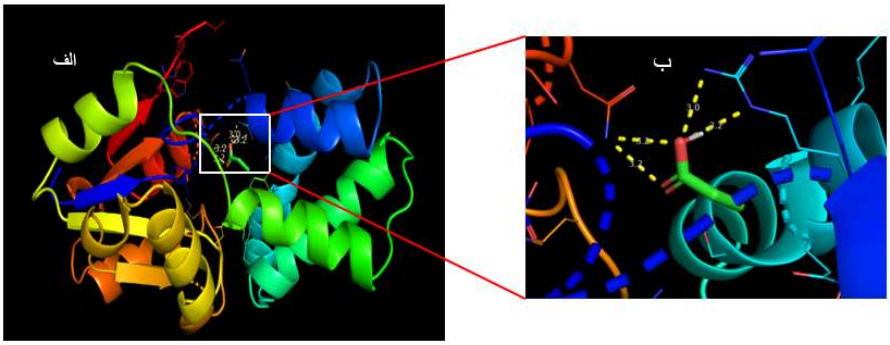
مطالعه روابط بین انزایم - مواد کیمیاوی به واسطه داکنگ (Docking)

امینواسید های کتلایتیکی رول مهمی در تجزیه بیولوژیکی مواد عضوی هلوجندار دارد(Zakary et al., 2021b). بررسی های قبلی نشان داده است که امینواسید های مهم کتلایتیکی اکثراً در همان ساحه فعال انزایم موقعیت دارند. در این مطالعه 9 امینواسید مهم کتلایتیکی انزایم DehlB4 در همان موقعیت یکسان با انزایم L -DEX و همچنان DehIVa قرار دارند. دراین تحقیق از Molecular Docking استفاده نمودیم تا به نحوه ایجاد رابطه بین انزایم - مواد کیمیاوی و میکانیزم تجزیوی آن پی ببریم. از سافت ویر AutoDock Vina همراه با AutoGrid Tools یکجا جهت Docking مودل انزایم DehlB4 با مواد کیمیاوی مورد نظر استفاده شد. دراین مطالعه تلاش ما این است که کمترین انرژی رابطوی ممکن (Lowest Binding Energy) را دریابیم. به هر اندازه که انرژی رابطوی کمتر باشد نشان دهنده محکم بودن رابطه بین انزایم - مواد کیمیاوی میباشد که با (kcal/mol) محاسبه میگردد. نتایج نشان داد که امینواسید های R40 و N174 با مواد کیمیاوی مورد نظر رابطه هایدروجنی ایجاد میکنند (اشکال 10-12الف و ب). این امینواسید ها به صورت فرضی در ساحه فعال انزایم مهم میباشند که در نتیجه باعث ایجاد رابطه موفق بین انزایم - مواد کیمیاوی میشوند. انزایم DehlB4 با مرکب D-2CP با داشتن 3.4 kcal/mol- انرژی دو رابطه هایدروجنی هر یک با طول های Å 3.2 و Å 3.0 با R40 و سه رابطه هایدروجنی با N174 هریک با طول های Å 3.1، 3.2Å و 2.4Å برقرار میکند(شکل 10الف وب). همچنان این انزایم با مرکب L-2CP با انرژی 3.4 kcal/mol-توسط دو رابطه هایدروجنی هریک با طول های 3.2Å و 3.1Å با R40 و سه رابطه با N174 هریک با طول های 3.0Å، 3.2Å، 2.6Å یکجا میشود (شکل 11الف و ب). DehlB4 با مرکب MCA با انرژی 2.9 kcal/mol- توسط دو رابطه هایدروجنی هریک با طول های 3.2Å و 3.0Å با R40 و دو رابطه با N174 هر دو با طول های 3.2Å یکجا میشود (شکل 12الف و ب). در روابط هایدروجنی بین انزایم - مواد کیمیاوی طول رابطه نشان دهنده ثبات یک رابطه است که باید کمتر از (< 3.5Å) باشد و اگر بالاتر از (> 3.5Å) باشد چنین روابطی دارای استحکام نمیباشند که خوشبختانه تمام فواصل روابط گزارش شده انزایم DehlB4 در محدوده قابل قبول جهت ایجاد یک رابطه قوی هایدروجنی میباشند. قابل یاد آوریست که دو امینو اسید R40 و N174 که در این تحقیق به حیث امینو اسید های مهم کتلایتیکی شناخته شده، قبلاً نیز در انزایم های مانند L -DEX و همچنان DehIVa گزارش داده شده اند. این اطلاعات مهم نشان دهنده این است که امینو اسید های R40 و N174 در انزایم DehlB4 دارای اهمیت کتلایتیکی برای قطع رابطه عناصر هلوجن با کاربن در یک مرکب کیمیاوی میباشد (Zakary et al., 2021a). از مطالعات و

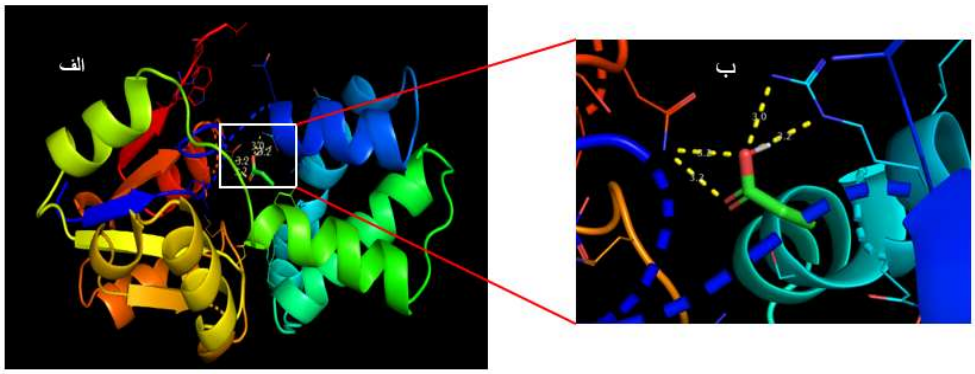
تحقیق فعلی چنین نتیجه بدست می آید که اگر یکی ازین نقاط مهم کتلایتیکی انزایم DehlB4 موجود نباشد بالای عملکرد انزایم و تجزیه مواد هلوجندارتاثیر خواهد داشت.



شکل ۱۰. الف: نتیجه داکینگ D2CP با انزایم DehlB4. ب : قسمت بزرگ شده محل اتصال امینو اسید با D2CP.



شکل ۱۱. الف: نتیجه داکینگ L2CP با انزایم DehlB4. ب : قسمت بزرگ شده محل اتصال امینو اسید با L2CP.



شکل ۱۲. الف: نتیجه داکینگ MCA با انزایم DehlB4. ب : قسمت بزرگ شده محل اتصال امینو اسید با MCA .

نتیجه گیری و پیشنهادات

این اولین گزارشی است که در رابطه به تولید انزایم دی هلوجیناز توسط این باکتریا ارایه میشود. استفاده از این طریقه بیولوژیکی جهت ازبین بردن آلوده گی های هلوجنی، توسط دهاقین بسیار موثر و کم مصرف است که در افغانستان میتواند به طور وسیع ازآن استفاده گردد. مواد های عضوی هلوجندار به طور گسترده در مرکبات مختلف کیمیاوی بخش زراعت (حشره کش ها و علف کش ها) استفاده میشود که سبب خراب شدن خاک و سخت شدن آن میشود. تکثیر این باکتریا ها ویا با میوتیشن کردن جن های مولده ای این انزایم در باکتریا میتوانیم با هزینه بسیار کم، این مرکبات را در محیط تجزیه نموده و ازآلوده گی خاک جلوگیری نماییم. همچنان جهت تصفیه آب های آلوده با این نوع مرکبات هلوجندار با استفاده از این نوع باکتریا ها در ساخت تصفیه کننده های آب در بخش زراعت مشکل آلوده گی آب را نیز حل نماییم. پیشنهاد میگردد که زرع نباتات لیگوم (عدس، لوبیا، نخود، سویابین و غیره) به صورت متناوب دربین دهاقین مروج شود. تکثیر و اضافه نمودن این باکتریا ها در خاک به عنوان کود بیولوژیکی البته بادر نظرداشت شرایط محیطی جهت رشد نباتات بسیار مهم است چون در رشد حاصلات تغییر قابل توجه را به بار می آورد.

References

1. Adamu, A., Wahab, R. A., Aliyu, F., Aminu, A. H., Hamza, M. M., & Huyop, F. (2020). Haloacid dehalogenases of *Rhizobium* sp. and related enzymes: Catalytic properties and mechanistic analysis. *Process Biochemistry*, *92*, 437-446.
2. Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, *2*(9), 1511-1519.
3. Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, *16*(22), 10881-10890.
4. DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, *40*(1), 82-92.
5. Douglas, S. H., Dixon, B., & Griffin, D. (2018). Assessing the abilities of intrinsic and specific vulnerability models to indicate groundwater vulnerability to groups of similar pesticides: a comparative study. *Physical Geography*, *39*(6), 487-505.
6. Garnier, J., Gibrat, J. F., & Robson, B. (1996). [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In *Methods in enzymology,* (266), pp. 540-553.
7. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server* . Humana press. (pp. 571-607)
8. Harisna, A. H., Mohamed, F. E., Aliyu, A., Azzmer, A., Roswanira, A. W., & Fahrul, H. (2017). In silico molecular analysis of novel L-specific dehalogenase from *Rhizobium* sp. RC1. *Malaysian Journal of Microbiology*, *13*(1), 50-60.
9. Hill, K. E., Marchesi, J. R., & Weightman, A. J. (1999). Investigation of two evolutionarily unrelated halocarboxylic acid dehalogenase gene families. Journal of bacteriology, 181(8), 2535-2547.
10. Htwe, A., Moh, S., Soe, K., Moe, K., & Yamakawa, T. (2019). Effects of Biofertilizer Produced from Bradyrhizobium and Streptomyces griseoflavus on Plant Growth, Nodulation, Nitrogen Fixation, Nutrient Uptake, and Seed Yield of Mung Bean, Cowpea, and Soybean. *Agronomy*. https://doi.org/10.3390/AGR ONOMY9020077.
11. Janssen, D. B., Oppentocht, J. E., & Poelarends, G. J. (2001). Microbial dehalogenation. Current Opinion in Biotechnology, 12(3), 254-258.
12. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, *26*(2), 283-291.
13. Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature, 356(6364), 83-85.
14. Oliveira, R., Carvalho, P., Marques, G., Ferreira, L., Pereira, S., Nunes, M., Rocha, I., Ma, Y., Carvalho, M., Vosátka, M., & Freitas, H. (2017). Improved grain yield of cowpea (Vigna unguiculata) under water deficit after inoculation with Bradyrhizobium elkanii and Rhizophagus irregularis. *Crop and Pasture Science*, 68, 1052 - 1059.
15. Slater, J. H., Bull, A. T., & Hardman, D. J. (1995). Microbial dehalogenation. *Biodegradation*, *6*(3), 181-189.
16. Weightman, A. J., Topping, A. W., Hill, K. E., Lee, L. L., Sakai, K., Slater, J. H., & Thomas, A. W. (2002). Transposition of DEH, a broad-host-range transposon flanked by IS Ppu12, in *Pseudomonas putida* is associated with genomic rearrangements and dehalogenase gene silencing. *Journal of bacteriology*, *184*(23), 6581-6591.
17. Zakary, S., Oyewusi, H. A., & Huyop, F. (2021a). Dehalogenases for pollutant degradation: A mini review. *Journal of Tropical Life Science*, *11*(1).
18. Zilli, J., Pacheco, R., Gianluppi, V., Smiderle, O., Urquiaga, S., & Hungria, M. (2021). Biological N2 fixation and yield performance of soybean inoculated with Bradyrhizobium. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 119, 323 - 336.
19. Zakary, S., Oyewusi, H. A., & Huyop, F. (2021b). Genomic Analysis of Mesorhizobium loti Strain TONO Reveals Dehalogenases for Bioremediation. Journal of Tropical Life *Science*, *11*(1).
20. Zakary, S., Mashal, H., Osmani, A. R., Oyewus, H. A., Huyop, F., & Nasim, M. M. (2022). In silico molecular characterization of a putative haloacid dehalogenase Type II. *Journal of Tropical Life Science*, *12*(2), 241-252.