

استخراج، همسانه‌سازی، بیان و تعیین ویژگی‌های آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز جدید از *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* با قابلیت تولید آرن اکسید

نسرین احمدپور^۱، ثریا محمدزاده^۱ و وهب جعفریان^{۲*}

^۱ ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، گیلان، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۵ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

چکیده

آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز باکتریایی آنزیمی هوموتترامر وابسته به آهن غیرهم می‌باشد. در این پژوهش توالی رمزکننده آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز از *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 استخراج و در وکتور pET28a همسانه‌سازی شد بیان آنزیم در باکتری *E. coli* BL21(DE3) در حضور القاء‌کننده IPTG انجام شد و پس از تخلیص توسط ستون نیکل-آگاروز، ارزیابی بیان با روش SDS-PAGE و تعیین غلظت با روش برادفورد صورت گرفت. سنجش فعالیت در محدوده دمایی و غلظت‌های مختلف سوبسترا، سنجش فعالیت آنزیم با HPLC و بررسی محصول واکنش آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفت و در پایان ساختار و میان‌کنش‌های آن توسط نرم‌افزارها و سرورهای بیوانفورماتیکی مطالعه گردید. نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگاروز بیانگر قطعه‌ی ژنومی ۱۰۲۰ جفت‌بازی (معادل ۳۳۹ رزیدوی آمینواسیدی) می‌باشد. نتایج تعیین توالی در NCBI با کد MN197545.1 ثبت شد. نتایج الکتروفورز آنزیمی نشان‌دهنده‌ی بیان آنزیم با وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتونی بود. بررسی عملکرد بیوشیمیایی آنزیم با اسپکتوفتومتری و فلوئورومتری بیانگر فعالیت آنزیم بود. نتایج تطبیق توالی با سرور ESPript3 نیز تاییدکننده رزیدوهای به‌شدت حفاظت‌شده His 152، His 216، Glu 267، Tyr 257 و His 199 در جایگاه‌های فعال آنزیم می‌باشد. به نظر می‌رسد که آنزیم بدلیل فقدان تشکیل پیوند هیدروژنی در پاکت جایگاه فعال، واکنش را تا تولید آرن اکسید پیش می‌برد و هموجنتسیک اسید تولید نمی‌شود که می‌توان به عنوان آنزیمی جهت تولید آرن اکسید (متابولیت ضروری تولید ترکیبات متنوع دیگر) معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: آرن اکسید، بیوانفورماتیک، فلوئورسانس، همسانه‌سازی، ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Email: v.jafarian@guilan.ac.ir

مقدمه

۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز (HPPD; E.C. 1.13.11.27)، یک اکسیژناز غیرهم وابسته به Fe(II) است. این آنزیم به دلیل نقش حیاتی در تبدیل ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات به هموجنتیسیک اسید (HGA)، در مسیر متابولیک تایروزین، پتانسیل زیادی در کشف دارو و حفاظت از محصول نشان داده است (۱۴). این واکنش آنزیمی برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط لیندبلید (Lindblade) و همکارانش گزارش شده است (۱۷). در تمامی موجودات زنده بجز تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت، ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در مسیر تجزیه‌ی تایروزین نقش دارد که در این مسیر حدواسط‌های زیادی وجود دارد. نقص در فعالیت هر کدام از آنزیم‌ها که مسئول تجزیه این حدواسط‌ها می‌باشند، در انسان منجر به انواع بیماری‌های ژنتیکی می‌شود که دارای علائم ویژه مربوط به خود هستند. از این میان می‌توان به تایروزینمیا نوع ۱، تایروزینمیا نوع ۲، تایروزینمیا نوع ۳، آلکاپتونوریا و هاوکیسنینوری اشاره کرد (۲۰-۱۹-۴). بیماری تایروزینمیا نوع ۳ از جمله بیماری‌های ژنتیکی اتوزومی مغلوب و بیماری هاوکیسنینوری به‌صورت اتوزومی غالب است که در هر دوی آن‌ها نقص در آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز عامل بیماری است. نشانه‌های مربوط به این بیماری‌ها شامل افزایش تجمع تایروزین و ترکیبات فنلی مشتق از آن است که موجب اختلالات عصبی و عقب افتادگی ذهنی می‌شوند (۲۵-۲).

۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در سرطان ریه بیان بسیار بالایی دارد و با پیش آگاهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان ریه در ارتباط است. سرکوب بیان ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز به اندازه کافی، مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو (PPP) و بیوسنتز RNA را کاهش داده و سطوح گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را افزایش می‌دهد (۱۳). همچنین ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در باکتری‌ها در تولید پیومالین نقش دارد. پیومالین نقش بسیار مهمی در پایداری باکتری‌ها در شرایط تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. پیومالین توسط بسیاری از سویه‌های باکتریایی از جمله *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Pseudoalteromonas*, *Burkholderia cepacia*, *Shewanella algae*, *Vibrio cholera*, *Aeromonas media* و *Rubrivivax benzoatilyticus* در مسیر کاتابولیسم تایروزین یا فنیل آلانین از طریق اکسیداسیون HGA تولید

می‌شود (۱۵). در باکتری‌های بیماری‌زا تولید ملانین منجر به افزایش قدرت بیماری‌زایی آن‌ها می‌شود (۱۶). ژن مربوط به ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز در انواع موجودات شامل پستاندارانی مثل انسان، موش، خوک و در گیاهانی مانند *Arabidopsis thaliana* و هویج، در قارچ‌ها و در پروکاریوت‌ها برای مثال در باکتری *Pseudomonas* ، *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* و همچنین در *Streptomyces avermitilis* گزارش شده است. باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* خاکزی، مزوفیل، گرم مثبت، شکلی نامنظم و بیشتر به شکل ۷ است. این باکتری در محیط مناسب غنی از کربن در حضور نمک‌های معدنی به خوبی و بدون نیاز به اضافه کردن فاکتور دیگر، در دماهای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و در محدوده pH ۶ تا ۸ قابلیت رشد دارد (۱۰).

در یوکاریوت‌ها ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز به صورت فعال بوده و یک ساختار هومودیمر با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون دارد. درحالی که این آنزیم در پروکاریوت‌ها از یک ساختار هوموترامر با وزن مولکولی ۴۰ کیلودالتون تشکیل می‌شود. این آنزیم به وسیله ۲- (۲-نیترو-۴-تریفلوئورومتیل بنزوئیل) -۳،۱-سیکلو هگزاندیون مهار می‌شود (۲۳).

در سال ۲۰۱۷ جیشان جیانگ و همکارانش با کلونینگ ژن ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز از گیاه *Medicago sativa* L. متوجه شدند که آنزیم علاوه بر نقش مهمی که در تولید ویتامین E دارد، نقش حیاتی در جوانه زنی بذر نیز دارد (۸)، در سال ۲۰۱۸ نیز یونکیان کیائو و همکارانش به بررسی نقش ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز در افزایش تحمل دمایی و پایداری باکتری *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* پرداختند و جهش‌هایی را در موقعیت‌های مختلف اعمال کردند که متوجه شدند جهش در موقعیت P103 منجر به افزایش این ویژگی در این باکتری می‌شود (۲۱) و همچنین در سال ۲۰۱۸ یینگ فو و همکارانش با توجه به ساختار ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز، جایگاه کاتالیزور آنزیم و موقعیت آمینواسیدهای فنیل آلانین، به بررسی مهارکننده‌های مختلف این آنزیم پرداختند که در زمینه تولید علف‌کش‌ها کاربرد دارد (۵).

با توجه به کاربرد و نقش آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز در شناسایی بیماری‌های ژنتیکی و در تولید علف‌کش‌های آنزیمی با بازدهی و اختصاصیت بالا و سمیت کمتر برای انسان، پژوهش حاضر با هدف شناسایی و معرفی آنزیم جدید و بررسی ساختار و عملکرد آن انجام گرفت تا با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و ساختاری آن در شرایط مختلف و با الهام گرفتن از ساختار و مکانیسم عمل آنزیم، به طراحی مهارکننده‌های نانومولار با اهداف پزشکی و کشاورزی پرداخت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و آنزیم‌ها

آنزیم‌های *Hind III*، *BamH I*، آلکالین فسفاتاز و T4 DNA Ligase از شرکت Thermal scientific تهیه گردید. پلاسمید pET28a از شرکت Novagen جهت همسانه‌سازی و بیان ژن مورد نظر استفاده شد. خدمات سنتز پرایمر و تعیین توالی توسط شرکت تکاپو زیست نماینده Bioneer کره جنوبی انجام گردید. مارکر وزن مولکولی DNA (SM0331) از شرکت Thermo Fisher Scientifics، محیط‌های کشت Nutrient Broth و Nutrient Agar، کوماسی بلو، آگارز، تریپتون، کانامایسین، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، دی پتاسیم فسفات، اسیدآسکوربیک، کتکول، فروس سولفات هیدراته، تریس و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه گردید. کیت تخلیص محصول PCR و کیت استخراج پلاسمید از Bioneer کره جنوبی تهیه شد.

تکثیر توالی کد کننده آنزیم مورد مطالعه

در این مطالعه از باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* که پیش‌تر از خاک‌های شیل‌های نفتی مربوط به ارتفاعات منطقه کزی (34° 51' 52/6" N; 46° 08' 30/4" E) در واقع غرب کرمانشاه جداسازی شده بود استفاده شده است (۱).

با توجه به اینکه توالی 16S rDNA باکتری دارای خصوصیات منحصر به فرد جنس و گونه باکتری و مختص آن است، بعد از مراحل استخراج و سپس با استفاده از نتایج تعیین توالی جنس و گونه‌ی باکتری مورد نظر به دست آمد که باکتری فوق به اسم *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 نام‌گذاری گردید (۱). سپس تطبیق توالی 16S rDNA باکتری مورد نظر در NCBI BLAST انجام و در نهایت توالی‌ها با بیشترین همسانی به دست آمدند که از این میان باکتری *Paenarthrobacter nicotinovorans* 26Cvi1.1E با بیشترین شباهت تشخیص داده شد که توالی ژنومی این باکتری حاوی ژن آنزیم مورد نظر بود. سپس با استفاده از نرم‌افزار GenRunner طراحی پرایمرهای (5'- CGCGGATCCATGGAAACTCCCCTCTCCACCTTGC-3') Forward و (5'- CACAAGCTTTTAGCCCCGGCCCTGCTTTGCGTAG-3') Reverse انجام گردید.

استخراج و همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی آنزیم مورد مطالعه

پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش PCR تحت شرایط زیر انجام شد: مرحله اول: واسرشته سازی DNA به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه با مراحل سه گانه واسرشته سازی (۹۴ درجه سلسیوس یک دقیقه)، اتصال پرایمر (یک دقیقه در دمای ۵۲ درجه سلسیوس) و گسترش توالی (نود ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس) و مرحله سوم به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس با هدف گسترش نهایی انجام شد. بعد از انجام PCR و تکثیر توالی نوکلئوتیدی، محصول بر روی ژل آگاروز بررسی شد. محصول حاصل توسط کیت Accuprep PCR Purification Bioneer خالص‌سازی و جهت همسانه سازی همزمان برش محصول PCR و وکتور pET28a توسط آنزیم‌های برشی *BamH I* و *Hind III* به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. از آنزیم آلکالین فسفاتاز برای دفسفوریل نمودن مولکول‌های DNA دو رشته‌ای پلاسمید pET28a با هدف جلوگیری از خودالحاقی پلاسمید برش خورده استفاده گردید. پس از مراحل هضم آنزیمی، واکنش اتصال با حضور آنزیم T4DNA Ligase به منظور قرارگیری توالی موردنظر در جایگاه همسانه‌سازی حامل بیانی pET28a صورت

گرفت و در نهایت پس از انجام عمل الحاق، حدود ۸۰ نانوگرم از وکتور نو ترکیب به میزبان پروکاریوتی *E.coli* DH5 α منتقل شد. در نهایت غربالگری میزبان‌های حاوی توالی نو ترکیب با استفاده از سه روش کلونی PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد که نتایج نشان دهنده‌ی صحت انجام مراحل همسانه سازی بود.

بیان و تخلص آنزیم

جهت بیان ابتدا وکتور نو ترکیب به میزبان بیانی BL21 DE3 منتقل شد و کشت باکتری در حضور کاناماسین ۵۰ میکرومولار تحت شرایط مختلف دمایی، زمانی و غلظت‌های متفاوت القاگر IPTG مورد بررسی قرار گرفت. جهت ترسیب باکتری‌ها، محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۳ میلی‌لیتر بافر لیزکننده حاوی دی تیوتریتول ۱ میلی‌مولار (به منظور احیای آهن در جایگاه فعال آنزیم و همچنین جلوگیری از اکسید شدن سیستمین توالی پروتئینی (۱۲)، اضافه گردید. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون (شامل ۲۰ مرحله-۲۰ ثانیه‌ای) قرار گرفت که جهت جلوگیری از تخریب گرمایی تمام مراحل سونیکاسیون در یخ انجام گردید. سلول‌های لیز شده در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی جهت تخلص جدا گردید. با توجه به حضور برچسب هیسیدینی در پروتئین نو ترکیب، تخلص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل-آگاروز انجام شد. جهت تخلص بیشتر، تغلیظ و تعویض بافر آنزیم‌های خروجی در مرحله‌ی رها سازی، نمونه‌ها به ستون کروماتوگرافی اولترافیلتراسیون آمیکون با Cut off برابر ۱۰ کیلودالتون منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت تعویض بافر پروتئین‌های تخلص شده از بافر دیالیز استفاده شد. این فرایند علاوه بر تخلص و تعویض بافر می‌تواند در تغلیظ نمونه‌ای آنزیمی نیز بسیار موثر باشد. برای آنالیز کیفی و تعیین خلوص پروتئین‌ها از سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده گردید و رنگ آمیزی ژل با استفاده از کوماسی آبی درخشان G-250 انجام شده که می‌تواند حضور پروتئین را در حد ۳۰-۲۰ نانوگرم به نمایش بگذارد. برای تعیین غلظت آنزیم‌ها از روش برادفورد با استفاده از رسم منحنی استاندارد سرم

آلبومین گاوی (BSA)، استفاده شد (۳). نگهداری آنزیم‌ها در گلیسرول ۱۵٪ و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم

برای سنجش فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز از بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7.5)، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات (۰/۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌مولار) و آنزیم با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۶). سپس میزان تولید محصول واکنش آنزیمی یعنی آرن اکسید در طول موج ۲۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانش شد. همچنین فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سوبسترا در زمان‌های مختلف (تا ۵۰ دقیقه مدت انکوباسیون) مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده محاسبه پارامترهای سنتیکی K_m ، V_{max} ، K_{cat} و K_{cat}/K_m انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

بررسی واکنش آنزیمی با HPLC

به منظور بررسی دقیق‌تر عملکرد آنزیم، فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز در مقابل مصرف سوبسترا توسط HPLC انجام گرفت. دستگاه HPLC مورد استفاده دارای دتکتور فلورسانس بوده که طول موج تحریکی و نشری آن به ترتیب در ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر تنظیم شده است. بدین منظور از غلظت‌های مختلف سوبسترا (۰/۱۲۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱) استفاده شد. در آنالیز با دستگاه HPLC ابتدا منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف سوبسترا رسم شد و در نهایت بعد از تزریق کوکتل واکنش آنزیمی به دستگاه، مقدار غلظت باقی مانده‌ی سوبسترا بعد از انجام واکنش آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی محصول واکنش آنزیمی

به منظور بررسی واکنش آنزیمی و محصول واکنش، واکنش آنزیمی مطابق آنچه که در قسمت بررسی فعالیت آنزیم بیان شده است، در زمان‌های مختلف در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد سپس خوانش جذب محصول در طیف‌های گسترده مورد بررسی قرار گرفت.

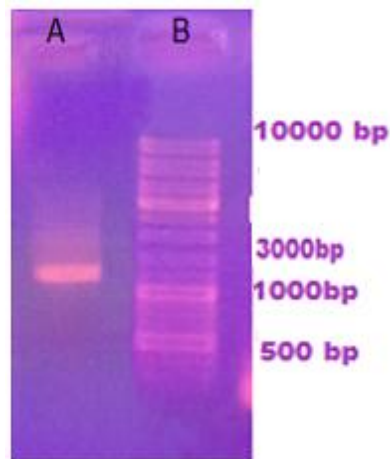
مطالعات بیوانفورماتیک

ابتدا توالی پروتئینی مورد نظر از باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 با توالی - های آمینواسیدی مشابه در NCBI تطبیق توالی شد. نتایج نشان داد که بیشترین شباهت مربوط به توالی *Pseudomonas putida* با کد 1MPY PDB است، سپس با استفاده از نرم افزار Modeller 9v19، ۱۰ مدل مختلف برای پروتئین مورد نظر ساخته شد و مدل‌ها در سرورهای Saves، Modeval و نرم افزار SPdbViewer به منظور ارزیابی پارامترهای Verify 3D، ERRAT، z-DOPE و RMSD مورد بررسی قرار گرفتند و بهترین مدل از روی این شاخصه‌ها انتخاب شد. سپس در سرور ProtParam پارامترهای بیوشیمیایی از جمله pI، شاخص ناپایداری (Index Instability) و وزن مولکولی محاسبه شد و با استفاده از سرور PIC Server میان‌کنش‌های مدل برگزیده با میان‌کنش‌های پروتئین الگو مورد مقایسه قرار گرفت. رسم مدل گرافیکی ساختار سه بعدی با نرم افزار Chimera انجام شد. تطبیق توالی آنزیم با استفاده از سرورهای ClustalW و ESPrpt3 انجام شد.

نتایج

تکثیر توالی کد کننده آنزیم مورد مطالعه

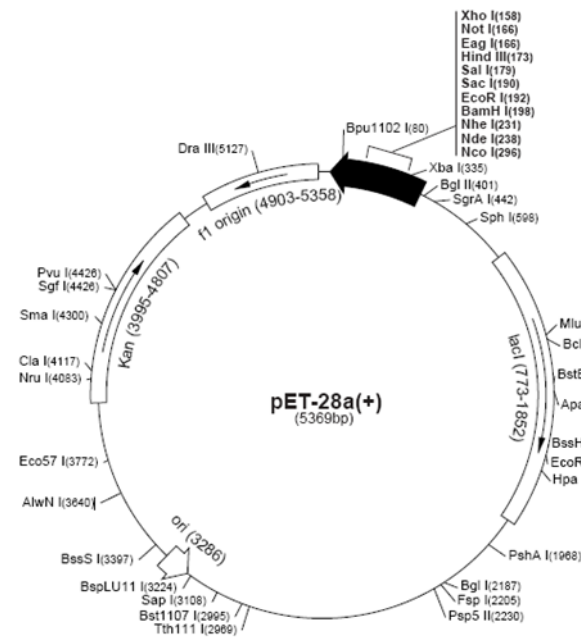
نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگاروز بیانگر قطعه‌ی نوکلئوتیدی مربوط به توالی ژنومی آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز در ناحیه ۱۰۲۰ جفت‌بازی است که نشان‌دهنده‌ی صحت انجام واکنش PCR و درستی طراحی پرایمر متناسب با پیش‌گویی‌های مطالعات تئوری و محاسبات بیوانفورماتیکی می‌باشد. آنالیز نتایج تعیین توالی منجر به ثبت توالی در NCBI با کد MN197545.1 شد.



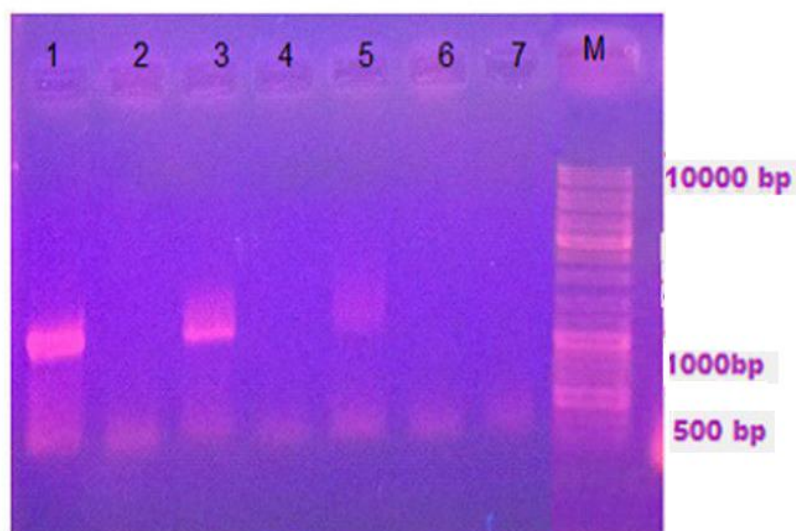
شکل ۱) A- باند مربوط به محصول PCR، B- مارکر وزن مولکولی SM0333

تعیین توالی و همسانه‌سازی ژن کد کننده آنزیم مورد مطالعه

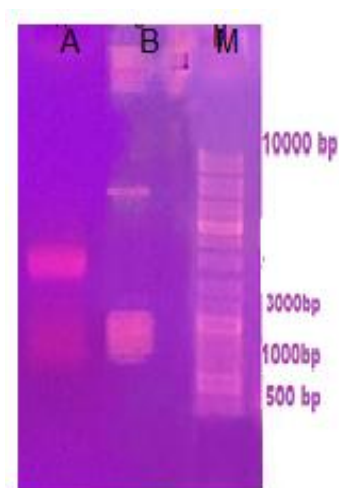
پس از مراحل هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید pET28a (شکل ۲) توسط آنزیم‌های برشی *BamH I* و *Hind III* واکنش اتصال در حضور آنزیم T4 DNA Ligase به منظور قرارگیری توالی مربوطه در جایگاه همسانه‌سازی صورت گرفت و صحت همانندسازی توسط غربالگری با PCR کلونی‌ها (شکل ۳-الف)، تعیین توالی و هضم آنزیمی (شکل ۳-ب) تایید شد.



شکل ۲) نقشه ژنومی پلاسمید pET28a از شرکت Novogene. فلش مشکی پررنگ بیانگر MCS جهت الحاق توالی نوکلئوتیدی می-باشد. وکتور دارای ژن مقاوم به کانامایسین، پروموتور Lac و برچسب هیستیدینی می‌باشد.



شکل ۳ الف) کلونی PCR توالی آنزیم مورد مطالعه در ژل آگاروز ۱ درصد: نمونه‌های شماره ۱، ۳ و ۵ بیانگر پاسخ مثبت واکنش کلونی PCR و تایید نو ترکیبی وکتور می‌باشد. نمونه شماره ۷ کنترل منفی و M مارکر وزن مولکولی (SM0333) می‌باشد.



شکل ۳ ب) A- نتایج برش آنزیمی پلاسمید غیر نوترکیب، B- هضم آنزیمی وکتور نوترکیب با آنزیم برشی *BamH I*، M- مارکر وزن مولکولی (SM0333). بخش B شکل بیانگر حضور دو باند در ناحیه حدود ۶۰۰ جفت بازی (باند توالی قطعه الحاق شده) و ۶۴۰۰ جفت بازی (باند وکتور خطی بدون نوترکیبی) می‌باشد.

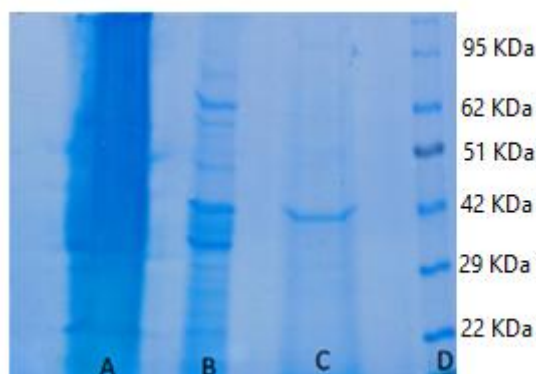
پلاسمید نوترکیب استخراج و تعیین توالی توسط شرکت Bioneer انجام گرفت. توالی به‌دست آمده از *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 با ۳۳۹ باقی‌مانده آمینواسیدی و ۱۰۲۰ نوکلئوتید با شماره دسترسی MN197545.1 در NCBI ثبت شد.

بررسی بیان و تخلیص آنزیم مورد مطالعه

نتایج الکتروفورز آنزیم به روش SDS-PAGE احیایی نشان‌دهنده‌ی بیان آنزیم در میزبان بیانی کلون شده‌ی *E.coli* سویه BL21-DE3 می‌باشد که وزنی معادل ۴۱ کیلودالتون دارد (شکل ۴).

با توجه به شکل ۴، همان‌طور که مشاهده می‌کنید، نمونه‌ی C نمایشگر نتایج تخلیص پروتئین با ستون نیکل-آگاروز و دیالیز با ستون اولترافیلتراسیون آمیکون است و حضور یک باند پروتئینی منفرد تایید کننده‌ی تخلیص پروتئین در حد مطلوب است. دیالیز نمونه‌ها با ستون اولترافیلتراسیون آمیکون با توجه به Cut off برابر ۱۰ کیلو دالتون، نه تنها موجب خالص

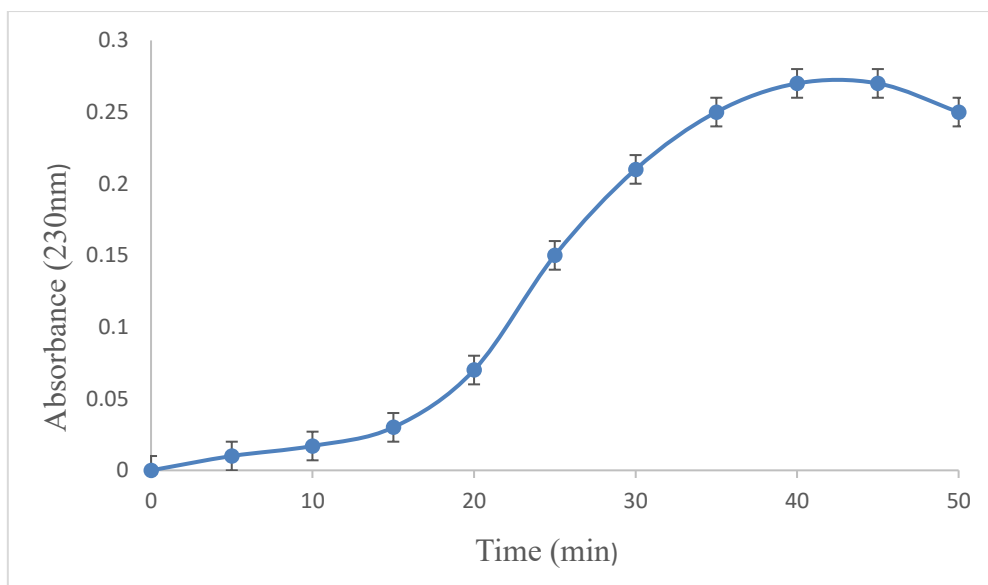
سازی بیشتر نمونه و حذف ترکیبات کوچک و ناخواسته از پروتئین موردنظر می‌شود بلکه با حذف بافر ایمیدوازول، امکان مبادله‌ی آن با بافر مطلوب را فراهم می‌نماید که برای مراحل بعدی پژوهش از جمله الکتروفورز و کروماتوگرافی لازم است.



شکل ۴) تصویر ژل SDS-PAGE: A- رسوب نمونه، B- عصاره سلولی قبل از تخلیص، C- عصاره سلولی بعد از تخلیص بعد از کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل-آگاروز. D- مارکر وزن مولکولی پروتئین با کد PM2600. با توجه به بخش C، تصویر بیانگر حضور تک باند پروتئینی آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در ناحیه ۴۱ کیلوالتون در مقایسه با مارکر وزن مولکولی پروتئین می‌باشد.

بررسی تغییرات جذب آنزیم در زمان‌های مختلف انکوباسیون

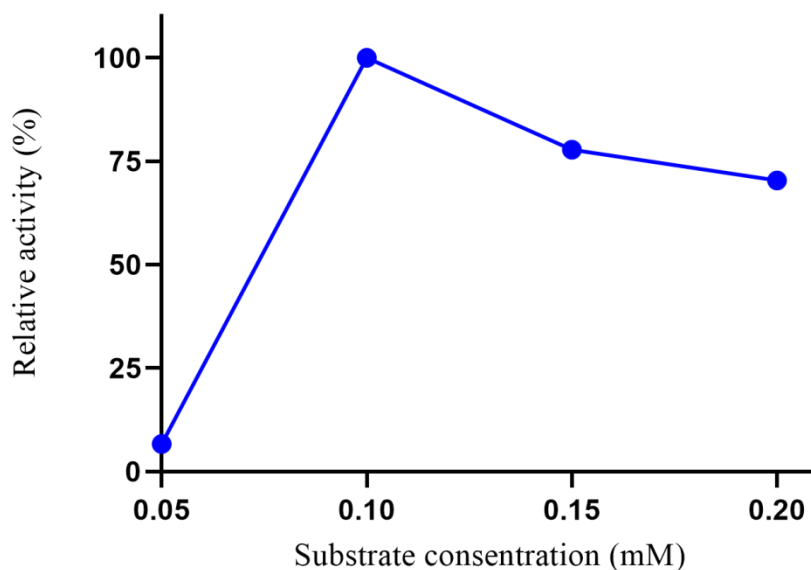
جهت تعیین بهترین مدت زمان برای تعیین فعالیت آنزیم، فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در طول موج ۲۳۰ نانومتر در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان داد در مدت زمان انکوباسیون ۴۰ دقیقه، بیشترین مقدار جذب و فعالیت آنزیمی مشاهده گردید (شکل ۵).



شکل ۵) فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۱ میلی مولار سوستر (۴-هیدروکسی فنیل پیرووات) و تغییرات جذب نسبت به زمان‌های مختلف انکوباسیون در طول موج ۲۳۰ نانومتر

بررسی فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوستر

در این پژوهش فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی‌اکسیژناز بر غلظت‌های مختلف (۰/۱۵، ۰/۱، ۰/۰۵) در این پژوهش فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات سنجیده شد که آنزیم بیشترین فعالیت را در غلظت ۰/۱ میلی مولار سوستر نشان داد (شکل ۶). جدول ۱ بیانگر نتایج بررسی پارامترهای سستیکی آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات در حضور غلظت‌های مختلف سوستر می‌باشد.



شکل ۶) تغییرات جذب نسبت به تغییرات غلظت سوبسترای ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات

جدول ۱ پارامترهای سینتیکی آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترای ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات. نتایج به صورت میانگین سه تکرار متمایز همراه با انحراف معیار استاندارد مربوطه بیان شده است.

Enzyme	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/min}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
	0.42 ± 0.25	0.23 ± 0.11	793 ± 32	1888 ± 87

تعیین فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز با استفاده از دستگاه HPLC

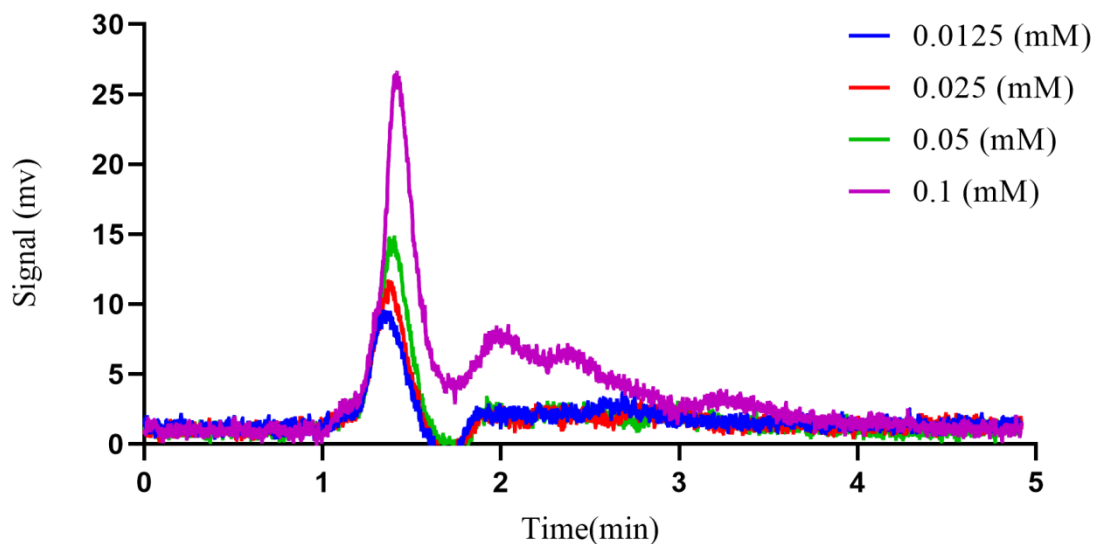
فلورسانس

جهت بررسی انجام واکنش آنزیمی با دقت بیشتر از روش HPLC با استفاده از ثبت‌کننده فلوروسانس، ابتدا طیف

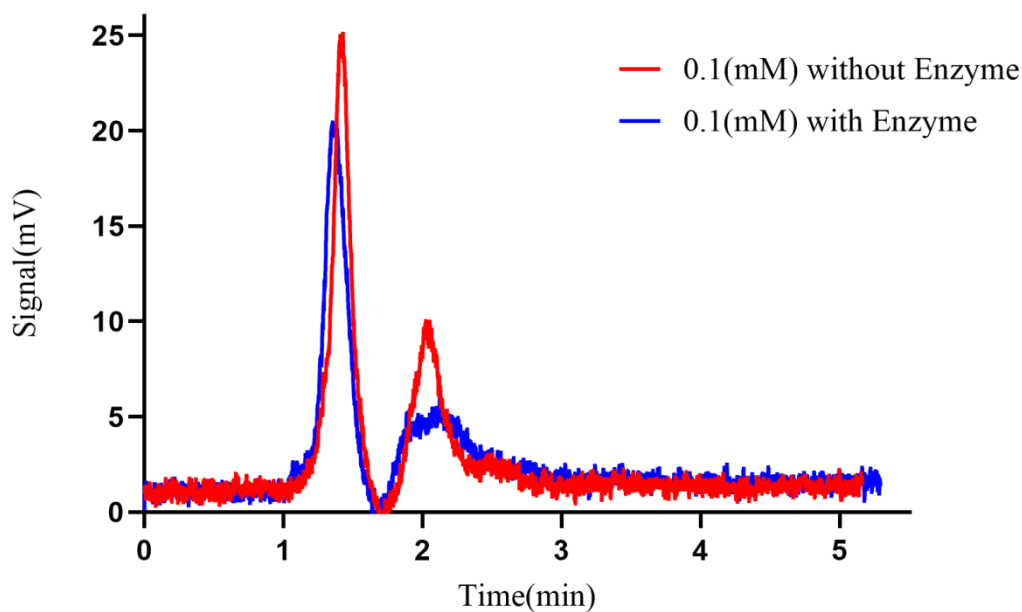
نشری غلظت‌های مختلف سوبسترا ثبت شد (شکل ۷) و سپس به بررسی واکنش آنزیمی با توجه به مصرف سوبسترا

پرداخته شد (شکل ۸). با توجه به شکل ۷، تغییر در غلظت سوبسترا، سبب تغییر در سطح زیر پیک شده است که با

استفاده از استاندارد سازی می‌توان به غلظت سوبسترای مصرف شده در حین واکنش پی برد. بررسی نتایج واکنش آنزیمی (شکل ۸) بیانگر مصرف سوبسترا در حضور آنزیم و بیانگر پیشرفت واکنش می‌باشد.



شکل ۷) کروماتوگرام غلظت‌های مختلف سوبسترای ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات ثبت شده توسط دستگاه HPLC با استفاده از ثبت کننده فلورسانسی نشان داده شده است



شکل ۸) تفاوت سطح زیر یک سوبسترا در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سوبسترا در حضور آنزیم و بدون آنزیم، نمودار بیانگر مصرف سوبسترا در حضور آنزیم و کاهش نشر فلورسانس می‌باشد.

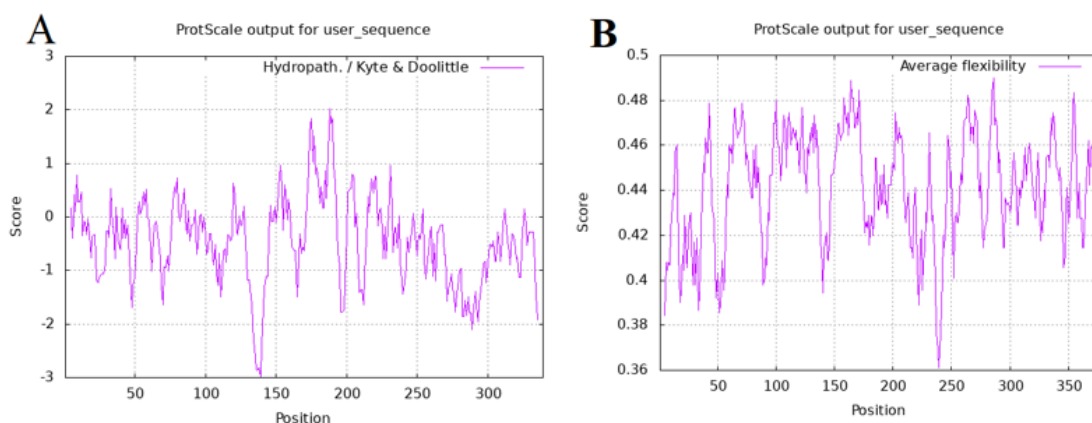
بررسی محصول واکنش

باتوجه به یافته‌های حاصل از HPLC و برای صحت کار به بررسی واکنش آنزیمی و محصول واکنش توسط دستگاه اسپکتوفتومتر پرداخته شد و باتوجه به اینکه محصول واکنش آنزیمی ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز، هموجنتیسیک اسید است که در ناحیه ۲۸۰ نانومتر جذب دارد، خوانش جذب محصول در این ناحیه بررسی شد اما جذبی مشاهده نگردید. سپس محصول واکنش در طول موج‌های مختلف واکنش مورد بررسی قرار گرفت که بیانگر جذب در ناحیه ۲۳۰ نانومتر می‌باشد که نتایج حاکی از این است که محصول واکنش آنزیم مورد مطالعه هموجنتیسیک اسید نمی‌باشد و آنزیم تا مرحله تولید حد واسط (آرن اکسید) پیش می‌رود. همچنین باتوجه به فعالیت آنزیم در غلظت استاندارد ۰/۱ میلی مولار، در این غلظت تغییرات جذب نسبت به زمان‌های مختلف انکوباسیون بررسی شد و مشخص شد که بهترین زمان انکوباسیون ۴۰ دقیقه است (شکل ۵). با توجه به مطالعات قبلی انجام شده توسط C. Raspail و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در مسیر واکنش آنزیمی ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز حدواسط-های دیگری تشکیل می‌شود که مهمترین این حدواسط‌ها آرن اکسید است که در ناحیه ۲۳۰ نانومتر دارای جذب است. در مطالعه ذکر شده، محققین به بررسی جهش نقاط مختلف حفظ شده آنزیم مورد نظر از آراییدوپسیس تالیانا با کد 1SQD, PDB پرداختند که جهش در ناحیه S246A موجب تشکیل حدواسط آرن اکسید می‌شود سرین ۲۴۶ در جایگاه بتا شیت نزدیک جایگاه فعال قرار دارد و در هیدروکسیلاسیون واکنش نقش دارد (۲۲). با توجه به این مطالعات، بررسی توالی و ساختار آنزیم مورد مطالعه، در موقعیت مشابه یعنی بتا شیت ۵ آمینو اسیدی که درگیر واکنش هیدروکسیلاسیون شود وجود ندارد.

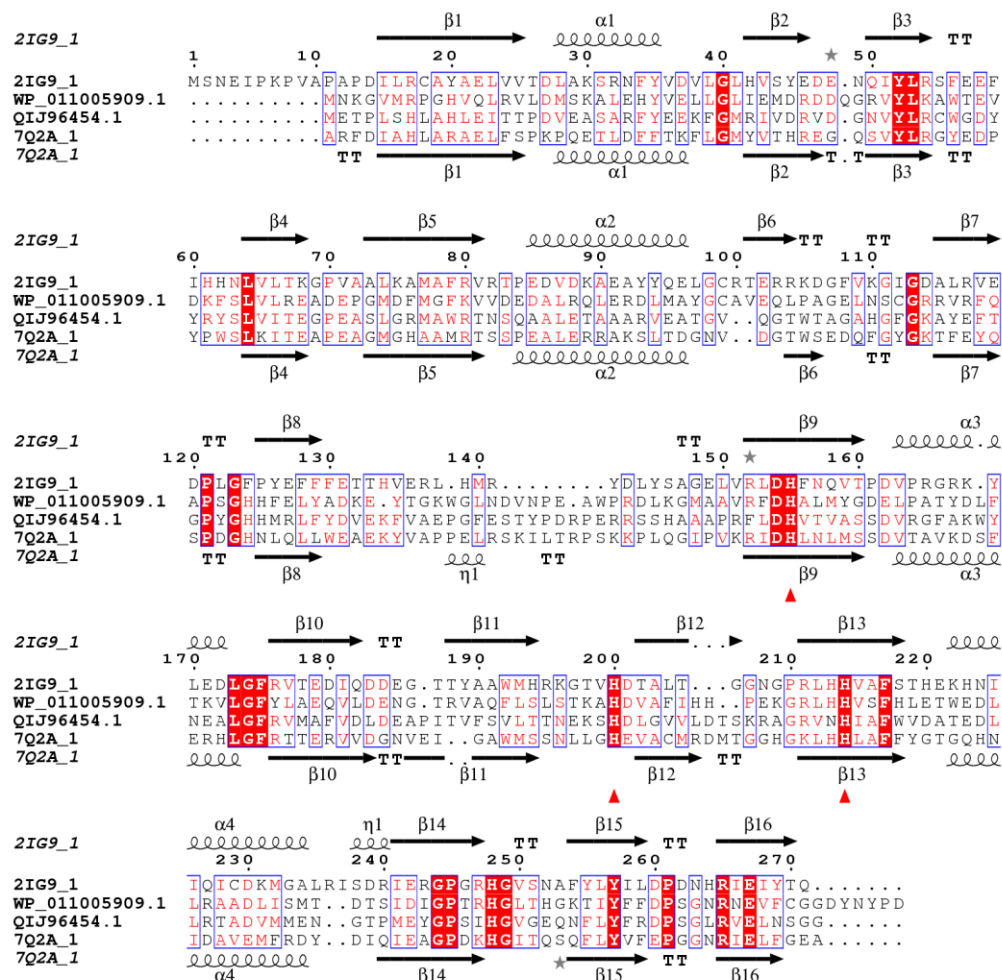
مطالعات بیوانفورماتیک

با توجه به نتایج (جداول ۱ و ۲) با بررسی شاخص ناپایداری و میان‌کنش‌های آبریز مدل ساخته شده بنظر می‌رسد که پایداری پروتئین مدل از نظر ساختاری بیشتر از پایداری پروتئین الگو (2IG9) می‌باشد. بررسی نتایج Protscal در دامنه باقی مانده‌های ۱۵۰ تا ۲۰۰ بیانگر وجود یک حفره هیدروفیل در آنزیم 4HPPD در مقایسه با آنزیم

Extradiol dioxygenase است (شکل ۹) و به نظر می‌رسد با کاهش انعطاف پذیری در بخش مرکزی آنزیم، میزان تمایل آنزیم به سوبسترا کاهش می‌یابد که با توجه به نتایج بررسی فعالیت آنزیم، این موضوع ملموس می‌باشد. تطبیق توالی‌های آنزیمی از آنزیم Homoprotocatechuate 2,3-Dioxygenase حاصل از باکتری *B. fuscum* با کد دسترسی 2IG9، توالی آنزیمی catechol 2,3-dioxygenase حاصل از باکتری *Pseudomonas putida* GJ31 با کد دسترسی WP_011005909.1، آنزیم 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase از باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 با کد دسترسی QIJ96454.1 و آنزیم Extradiol dioxygenase استخراج شده از باکتری *Actinobacterium Rhodococcus jostii* RHA1 با کد دسترسی 7Q2A در سرورهای ClustalW و ESPrpt3 تطبیق داده شدند و نتایج تطبیق توالی نشان داد (شکل ۱۰) که باقی مانده‌های متصل به اتم آهن و کاتالیتیکی در همه توالی‌های آنزیمی در طی تکامل حفظ شده هستند. این باقی مانده‌ها به این قرار است: آمینواسید هیستیدین به شماره‌های ۱۵۵، ۲۰۰ و ۲۱۴ برای اتصال آهن و تریاد هیستیدین ۲۴۸، تیروزین ۲۵۷ و گلوتامیک اسید ۲۶۷ برای اتصال به سوبسترا در طی تکامل در این آنزیم‌ها حفظ شده است (۱۸-۱۱).



شکل ۹) نمودار Kyte & Doolittle بررسی توزیع هیدروفوبیسیته باقی مانده‌های آنزیم 4HPPD (A) با آنزیم Extradiol dioxygenase (B).



شکل ۱۰) نتایج تطبیق توالی‌های آنزیمی از آنزیم Homoprotocatechuate 2,3-Dioxygenase حاصل از باکتری *B. fuscum* با کد دسترسی 2IG9، توالی آنزیمی catechol 2,3-dioxygenase حاصل از باکتری *Pseudomonas putida* GJ31 با کد دسترسی WP_011005909.1، آنزیم 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase از باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06 با کد دسترسی QIJ96454.1 و آنزیم extradiol dioxygenase استخراج شده از باکتری *actinobacterium* با کد دسترسی 7Q2A در این تطبیق توالی از نتایج PDB دو آنزیم با کد دسترسی 2IG9 و 7Q2A برای بررسی ایجاد ساختارهای ثانویه استفاده شده است. نشانگر ■ بیانگر نواحی حفاظت شده اتصال آنزیم‌ها به سوبسترا و نشانگر ▲ مناطق اتصال آنزیم‌ها به آهن می‌باشد.

با توجه به اطلاعات بدست آمده از سرور PoratParam و مقایسه انجام شده بین ۴- هیدروکسی فینیل پیرووات

دی اکسیژناز (4-HPPD) و اکسترادیول دی اکسیژناز (7Q2A) دلیل بر صحت مدل ساخته شده برای پروتئین مورد

نظر می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲) نتایج به‌دست آمده از مقایسه پارامترهای مختلف در سرورهای ModEval، SAVES، Protparam و نرم‌افزار Spdbviewer

	ERRAT	z-DOPE	RMSD	VERYFY3D	pI	Instability
7Q2A	۹۶/۵۴	-۱/۸۳۵	./	۹۲/۶۴	۵/۳۷	۴۵/۳۸
4-HPPD	۶۲/۳۸	-۰/۸۶	۰/۷	۹۱/۴	۵/۲۱	۲۵/۸

با توجه به جدول ۳ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مقایسه توالی آنزیم مورد مطالعه (4-HPPD)، با آنزیم اکسترادیول دی اکسیژناز (7Q2A) تفاوت اندکی در میان‌کنش‌های داخلی پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. این میان‌کنش‌ها در انجام واکنش آنزیمی و تشکیل حدواسط‌ها تاثیرگذار هستند. به نظر می‌رسد با مطالعه و اعمال جهش در باقی‌مانده‌های آمینواسیدی می‌توان تغییراتی در گستره فعالیت آنزیم در pH، دماهای مختلف و پایداری آنزیم ایجاد کرد.

جدول ۳) مقایسه میان‌کنش‌های داخلی پروتئین ۴- هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز (4-HPPD) و اکسترادیول دی

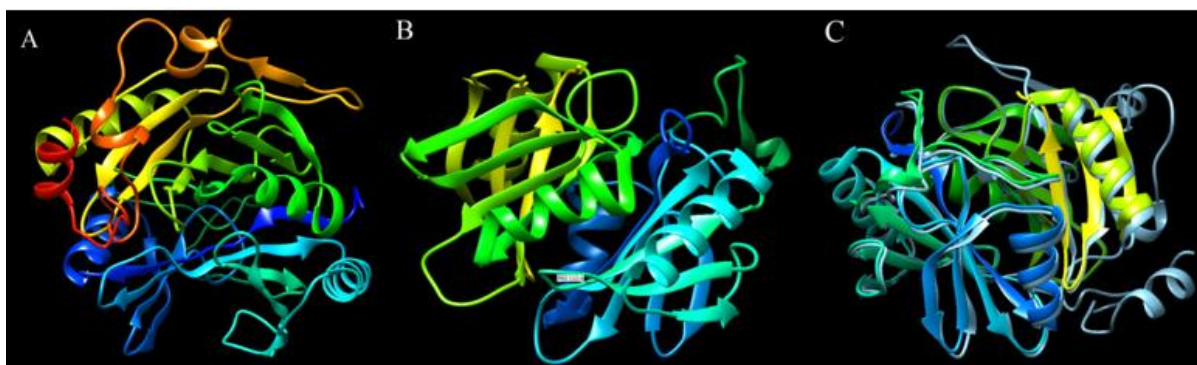
اکسیژناز (7Q2A) با استفاده از PICserver

انواع میان‌کنش‌ها	7Q2A	4-HPPD
Intrapoltein Hydrophobic Interactions	۲۴۹	۲۵۸
Intrapoltein Main Chain-Main Chain Hydrogen Bonds	۳۳۱	۳۵۶
Intrapoltein Main Chain-Side Chain Hydrogen Bonds	۱۳۲	۱۰۳
Intrapoltein Side Chain-Side Chain Hydrogen Bonds	۱۲۳	۸۵
Intrapoltein Ionic Interactions	۳۳	۳۱
Intrapoltein Aromatic-Aromatic Interactions	۱۸	۲۳
Intrapoltein Aromatic-Sulphur Interaction	۷	۳
Intrapoltein Cation-Pi Interactions	۱۶	۱۳

ساختار آنزیم ۴- هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز توسط نرم‌افزار کایمرا مورد بررسی قرار گرفت و جایگاه‌های

اتصال آهن و رزیدوهای درگیر در این اتصال شناسایی شد. شکل ۱۱ میزان شباهت ساختاری این دو آنزیم را نشان

می‌دهد.



شکل ۱۱) بررسی تفاوت ساختار سه بعدی پروتئین ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز (4-HPPD) (A) اکسترادیول دی اکسیژناز (7Q2A) (B). مقایسه توالی A و B توسط Chimera (مدل ساختاری به رنگ سفید مربوط به پروتئین الگو و ساختار به رنگ آبی مربوط به مدل پروتئین باکتری مورد مطالعه می‌باشد (C)).

بحث

ملانین در باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند باعث حفاظت باکتری در برابر آسیب اکسیداتیو، عوامل آسیب‌زای محیطی، اشعه UV، آنزیم‌های تجزیه‌کننده و سمیت فلزات سنگین گردد. پایوملانین ترکیب مشابه ملانین است که از اکسیداسیون خودبخودی هموجنتسیک اسید تولید می‌شود. هموجنتسیک اسید هم ترکیب حدواسط بین تجزیه تایروزین و فنیل آلانین به استواسات و فومارات می‌باشد. پایوملانین برای رشد باکتری ضروری نیست اما تولید آن در شرایط محیطی بد برای حفظ باکتری لازم است (۲۴). از طرفی در باکتری مورد مطالعه شکل اسپور تشکیل نمی‌شود در نتیجه لزومی به تشکیل ملانین جهت حفاظت از باکتری وجود ندارد و باکتری همیشه در حالت رویشی قرار دارد. در باکتری مورد مطالعه آنزیم ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات دی اکسیژناز، واکنش را تا مرحله تولید آرن اکسید پیش می‌برد که احتمالاً می‌تواند به دلیل عدم تشکیل فرم اسپور در باکتری و عدم نیاز به مشتقات ملانینی باشد، از این رو باکتری مسیر واکنش آنزیمی را تا حد آرن اکسید پیش می‌برد و هموجنتسیک اسید تشکیل نمی‌شود (۷). واکنش آرن اکسید میکروبی فرایندی است که آنزیم‌های میکروبی ترکیبات آروماتیک را به محصولات اکسیدشده‌ی بیشتری تبدیل می‌کنند که به این ترکیبات حدواسط اولیه، آرن اکسید گفته می‌شود (۹). باکتری *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* جهت تولید ترکیبات ضروری خود به استفاده از این ترکیبات حدواسط نیاز دارد. امروزه با

مطالعات ساختاری بیشتر این آنزیم می‌توان آنزیم‌هایی در جهت تولید آرن اکسید به عنوان متابولیت ضروری جهت تولید ترکیبات متنوع دیگر معرفی کرد.

از طرفی دیگر با بررسی‌های ساختاری آنزیم مشخص شد که هر دومین ساختاری آنزیم شامل دو تکرار از $\beta\beta\beta\alpha\beta$ می‌باشد و به ازای هر مونومر یک اتم آهن غیرهم در دومین C-ترمینال وجود دارد که به زنجیره جانبی His 155 و His 200 و His 214 و یک مولکول استات وصل می‌شود که این رزیدوها نیز در ساختار بتا قرار دارند و با آلفا-کتو اسید سوبسترا وارد واکنش می‌شوند. دومین N-ترمینال دومین کوچک بدون عملکرد کاتالیزوری گزارش شده که در مورد آنزیم مورد مطالعه ما تا رزیدو ۱۴۶ می‌باشد. تطبیق توالی با آنزیم‌های مختلف در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها نشان داد که شباهت تقریباً کمتر از ۳۰ درصد می‌باشد (شکل ۱۰) درحالی که توپولوژی ساختار آنزیم‌ها خیلی شبیه است (شکل ۱۱-C) و همچنین باقی مانده‌های حفاظت شده به طور یکسان در طول زنجیره پلی پپتیدی پخش نشده‌اند. بیشتر باقی مانده‌های حفظ شده در توالی‌های شناخته شده در دومین C-ترمینال می‌باشند و هیچ باقی مانده‌ی حفظ شده در سطح پروتئین یافت نشد. عملکرد C-ترمینال شبیه گیت می‌باشد که دسترسی به جایگاه فعال را کنترل و تفکیک می‌کند و در طی کاتالیز محدودیت سوبسترای اعمال می‌کند. همچنین باقی مانده‌های حفظ شده کمتری در دومین N-ترمینال می‌باشند که درگیر ارتباط ساختار دوم جهت تاخوردن زنجیره پلی پپتیدی هستند. مقایسه توالی‌های آمینواسیدی مربوط به جایگاه فعال مشخص کرد که آمینواسید هیستیدین ۲۴۸ به علت نقش کاتالیتیکی خود دارای اهمیت است (۴). همچنین با بررسی ساختار کنفورماسیونی آنزیم مورد مطالعه در موقعیت ۲۲۰ تا ۲۴۰ ساختار آلفاهلیکس شکسته شده است که در مورد آنزیم‌های ۲، ۳ دی اکسیژناز (2IG9) و اکسترا دیول دی اکسیژناز (7Q2A) ساختار آلفا هلیکس حفظ شده که به نظر در فعال و غیرفعال شدن آنزیم‌ها نقش دارد (۱۸-۱۱).

در مطالعه‌ای که Hong-Yan Lin و همکاران انجام دادند مشخص شد که این آنزیم هدف طراحی دارو و علف‌کش‌ها می‌باشد. از طرفی حالت اتصال سوبسترا به آنزیم هنوز ناشناخته است و هنوز شناسایی مهارکننده‌های جدید مدنظر می‌باشد. همچنین طبق مطالعات انجام گرفته مکانیسم انجام واکنش متغیر است و ۳ طرح پیشنهادی وجود دارد که این مدل‌ها همچنان کنفورماسیون اتصال واقعی سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم را منعکس نمی‌کنند.

علاوه بر این دو فرم توتومری برای سوبسترا وجود دارد که پیشنهاد می‌شود فرم کتو، فرم فعال سوبسترا است و فرم انول آنزیم را مهار می‌کند. چندین ساختار PDB از آنزیم به همراه اتصال و بدون اتصال به سوبسترا گزارش شده است. به دلیل اینکه همه مهارکننده‌های گزارش شده رقابتی هستند در نتیجه حالت اتصال دقیق آنزیم و سوبسترا در طراحی مهار کننده (ساختار-بیس) خیلی کمک کننده خواهد بود. جایگاه فعال و یون آهن در دومین C-ترمینال قرار دارد. آهن با ۲ هیستیدین و ۱ گلوتامات و ۳ مولکول آب کوردینه شده است. همچنین نتایج نشان داد که رزیدو Gln 293 که در انتهای هلیکس ورودی پاکت بتا بارل جایگاه فعال قرار دارد با تشکیل پیوند هیدروژنی در تبدیل فرم غیرفعال آنزیم به فعال نقش دارد و در جایگاه فعال بدون تشکیل باند هیدروژنی اتصال سوبسترا به آنزیم ناپایدار بوده که این رزیدو به عنوان یک مهارکننده طبیعی جدید شناسایی گردیده است که با الهام به این مشاهدات، استراتژی طراحی مولکولی مهارکننده جدید نانومولار پیشنهاد شده است (۷). آنزیم مورد مطالعه نیز تاییدی بر اهمیت تشکیل پیوند هیدروژنی در جایگاه فعال آنزیم در تبدیل آرن اکسید به محصول نهایی می‌باشد که در آنزیم مورد مطالعه ما بدلیل فقدان تشکیل پیوند هیدروژنی در پاکت جایگاه فعال، سوبسترا تا تولید آرن اکسید پیش می‌رود و هموجنتسیک اسید تولید نمی‌شود. مطالعه ساختاری این آنزیم در جهت شناسایی مکانیسم‌های اتصال سوبسترا به آنزیم و فهمیدن مکانیسم واکنش کمک موثری در جهت شناسایی مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله از محل پایان نامه خانم نسرین احمدپور دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه زنجان و با حمایت مادی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان و گیلان انجام شده است.

منابع

۱. ربانی ف. جعفریان و. آسوده ا (۱۳۹۹). غربالگری و جداسازی برخی از باکتری‌های تجزیه کننده‌ی فنول در خاک- های حاوی آلاینده‌های نفتی. زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهراء. دوره ۳۳، شماره ۳

2. Al-hemidan Al. Al-hazaa SAF (2016). Richner-Hanhart syndrome (Tyrosinemia Type II) Case report and literature review. *Ophthalmic Genetics* 16:21–6. <http://dx.doi.org/10.3109/13816819509057850>
3. Bradford M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
4. Fritze IM. Linden L. Freigang J. Auerbach G. Huber R. Steinbacher S (2004). The Crystal Structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Plant Physiology* 134:1388–400. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034082>
5. Fu Y. Sun YN. Yi KH. Li MQ. Cao HF. Li JZ. Ye F (2018). Combination of virtual screening protocol by in silico toward the discovery of novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *Frontiers in Chemistry* 6:6-14. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00014>
6. Garcia I. Rodgers M. Hsieh T. Matringe M (1999). Characterization and Subcellular Compartmentation of Recombinant 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from *Arabidopsis* in Transgenic *Tobacco*. *Plant Physiology* 119:1507–1516. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1507>
7. Han H. Iakovenko L. Wilson AC (2015). Loss of Homogentisate 1 , 2-Dioxygenase Activity in *Bacillus anthracis* Results in Accumulation of Protective Pigment. *PloS one* 10:e0128967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128967>
8. Jiang J. Chen Z. Ban L. Wu Y. Huang J. Chu J. Fang S. Wang Z. Gao H. Wang X (2017). P- hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from *Medicago sativa* is involved in vitamin E biosynthesis and abscisic acid-mediated seed germination. *Scientific Reports* 7:40625. <https://doi.org/10.1038/srep40625>
9. Johnson RA (2004). Microbial arene oxidations. *Organic Reactions* 63:117-264. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or063.02>
10. Kotoučková L. Schumann P. Durnova E. Spröer C. Sedláček I. Neča J. Zdráhal Z. Némec M (2004). *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp . nov ., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54:773–777. <http://dx.doi.org/10.1099/ij.s.0.02923-0>
11. Kovaleva EG. Lipscomb JD (2007). Crystal structures of Fe²⁺ dioxygenase superoxo, alkylperoxo, and bound product intermediates. *Science* 316:453-457. <https://doi.org/10.1126/science.1134697>
12. Lederer B. Böger P (2005). Recombinant p -Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase of High Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C* 60:549-556. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-7-807>
13. Liang W. Zhang W. Lv Z. Li C (2020). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from sea cucumber *Apostichopus japonicus* negatively regulates reactive oxygen species production. *Fish and Shellfish Immunology* 101:261–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.013>
14. Lin HY. Yang JF. Wang DW. Hao GF. Dong JQ. Wang YX. et al (2019). Molecular insights into the mechanism of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibition: enzyme kinetics, X-ray crystallography and computational simulations. *FEBS Journal*

- 286:975–990. <http://doi.org/10.1111/febs.14747>
15. Li Y. Ye Z. Lu P. Lu L (2021). Pyomelanin produced by *Streptomyces* sp. ZL-24 and its protective effects against SH-SY5Y cells injury induced by hydrogen peroxide. *Scientific Report* 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94598-3>
 16. Manzetti S (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Environmental Fate and Transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds* 33:311–330 <http://dx.doi.org/10.1080/10406638.2013.781042>
 17. Moran GR (2014). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and hydroxymandelate synthase: Exemplars of the α -keto acid dependent oxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544:58–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.022>
 18. Navas LE. Zahn M. Bajwa H. Grigg JC. Wolf ME. Chan ACK et al (2022). Characterization of a phylogenetically distinct extradiol dioxygenase involved in the bacterial catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Journal of Biological Chemistry* 298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101871>
 19. Ndikuryayo F. Kang WM. Wu FX. Yang WC. Yang GF (2019). Hydrophobicity-oriented drug design (HODD) of new human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 166:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.032>
 20. Nilson DL. Cox MM. (2008). *Lehninger Principles of biochemistry*. Macmillan
 21. Qiao Y. Wang J. Wang H. Chai B. Rao C. Chen X. Du S (2018). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase thermolability is responsible for temperature-dependent melanogenesis in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology* 85:e01926-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01926-18>
 22. Raspail C. Graindorge M. Moreau Y. Crouzy S. Lefe B. Robin AY. et al (2011). 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Catalysis: identification of catalytic residues and production of a hydroxylated intermediate shared with a structurally unrelated enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 286:26061–26070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227595>
 23. Serre L. Sailland A. Sy D. Boudec P. Rolland A. Pebay-peyroula E. et al (1999). Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Structure* 7:977–88. [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80124-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80124-5)
 24. Singh D. Kumar J. Kumar A (2018). Isolation of pyomelanin from bacteria and evidences showing its synthesis by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme encoded by hppD gene. *International journal of biological macromolecules* 119:864–873. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.003>
 25. Tomoeda K. Awata H. Matsuura T. Matsuda I. Ploechl E. Milovac T. et al (2000). Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 71:506–10. <http://dx.doi.org/10.1006/mgme.2000.3085>

Extraction, cloning and characterization of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme from *paenarthrobacter nitroguajacolicus* with the ability to produce arene oxide

Nasrin Ahmadpour¹, Soraya Mohamadzadeh¹, Vahab Jafarian^{2*}

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

²Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

* Corresponding author, Email: v.jafarian@guilan.ac.ir

Abstract

4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is an iron-dependent homotetrameric enzyme. In this study, we extracted the gene encoding this enzyme from *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* strain Znu06. The recombinant enzyme was cloned into the pET28a vector. Then expressed in *E. coli* BL21(DE3) using IPTG inducer and purified using a Ni-NTA Agarose column. SDS-PAGE was employed to evaluate the expression level and the Bradford assay was used to determine the concentration. The activity of the enzyme was assessed at different temperatures and substrate concentrations, followed by performance evaluation using HPLC and examining reaction products. The structure of the enzyme and interactions were studied using bioinformatics tools and servers. The PCR results confirmed a genomic fragment with a length of 1020 bp which encoded an enzyme with 339 amino acid residues with a molecular weight of 34 KD. The sequence was deposited in NCBI with the code MN197545.1. The activity of the enzyme was confirmed through biochemical analysis using spectrophotometry and fluorometry. Sequence alignment using ESPript3 confirmed highly conserved residues, including His 152, His 216, Glu 267, Tyr 257, His 199, and His 248 in the enzyme's active sites. The enzyme seems to promote the reaction towards aryl oxide production due to the absence of hydrogen bond formation in the active site, leading to the lack of homogentisic acid production.

Keywords: Arene oxide, Bioinformatics, Cloning, Fluorescence, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase.