2025, 1(2): 23-36

JAER

Journal of Animal Environmental Reaserch

Journal homepage: http://www.journalaer.com

Research Article

Rare codons analysis, the structure determination, and investigation of the active site of L-asparaginase II of *B. megaterium*

Safa Lotfi* *, *Mojtaba Mortazavi

Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Key Words

Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
L-asparaginase II
Bacillus megaterium
Rare codons
SWISS-MODEL

Abstract

Introduction: Currently, L-asparaginase II of *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* are prescribed for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. However, due to their short half-life and side effects related to immunogenicity and glutaminase activity, the research to find new bacterial sources of L-asparaginase with higher therapeutic effects and minimal side effects has continued. In this regard, the L-asparaginase II of *Bacillus megaterium* has been studied in this research.

Materials & methods: Rare codons of the L-asparaginase II gene of *B. megaterium* were identified with ATGme server and amino acid residues related to these codons were determined. The third protein structure was predicted using three homology modeling-based servers and the quality of the models was studied with ERRAT and Verify3D servers. The amino acid residues of the active site were determined with PyMol software.

Results: The results showed that this gene has 73 rare codons and 27 very rare codons. All three servers (SWISS-MODEL, Phyre2, and I-TASSER) used L-asparaginase II of *E. chrysanthemi* as the template, and the model created by SWISS-MODEL had higher accuracy and quality than the other two models. The comparison of the active site residues of this enzyme with L-asparaginase II of *E. chrysanthemi* indicated that out of a total of 8 residues, 5 amino acids are similar and 3 amino acids are different. Glu63, Thr95 and Ala120 are replaced with Gln103, Ser135, and Ser160 in L-asparaginase II of *B. megaterium*. According to the previous published reports, the presence of glutamine instead of glutamate in the L-asparaginase II active site reduces glutaminase activity. The analysis of amino acids with rare codons showed that all three serine of active site possess rare codons. Therefore, due to the high number of rare codons and the fact that some of them are related to the active site residues, during the process of codon optimization, a detailed and comprehensive study should be carried out to ensure high protein production and its solubility in the *E. coli* expression system.

Conclusion: Summing up, the obtained results can help the process of designing and producing the L-asparaginase II enzyme with higher therapeutic properties and lower side effects.

Article info

* Corresponding Author's email:
s.lotfi@kgut.ac.ir,
lotfisafa1@gmail.com

Received: 22 October 2024
Reviewed: 21 November 2024
Revised: 21 January 2025
Accepted: 21 February 2025

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

مقاله علمی - پژوهشی

آنالیز کدون‌های کمیاب، تعیین ساختار و بررسی جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*

صفا لطفی*، مجتبی مرتضوی

گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

کلمات کلیدی

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)
ال-آسپاراژیناز II
Bacillus megaterium
کدون‌های کمیاب
SWISS-MODEL

چکیده

مقدمه: درحال‌حاضر ال-آسپاراژیناز II *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* به‌منظور درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL) کودکان تجویز می‌شوند. به‌هرحال به‌دلیل نیمه‌عمر کوتاه و عوارض جانبی مرتبط با ایمنی‌زایی و فعالیت گلوتامینازی، محققان هم‌چنان در حال تحقیق به‌منظور یافتن منابع باکتریایی جدید ال-آسپاراژیناز با اثرات درمانی بالاتر و عوارض جانبی حداقل هستند. درهمین راستا در این تحقیق، آنزیم ال-آسپاراژیناز II *Bacillus megaterium* مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها: کدون‌های کمیاب ژن ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* با سرور ATGme شناسایی و بنیان‌های آمینواسیدی مرتبط با این کدون‌ها تعیین شد. ساختار سوم پروتئین، با سه سرور مبتنی بر هومولوژی‌مدلینگ تعیین و کیفیت مدل‌های پروتئینی با سرورهای ERRAT و Verify3D مطالعه شد. بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه فعال با نرم‌افزار PyMol تعیین شد.

نتایج: نتایج نشان داد که این ژن دارای ۷۳ کدون کمیاب و ۲۷ کدون بسیار کمیاب می‌باشد. هر سه سرور SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER، از ال-آسپاراژیناز II *E. chrysanthemi* به‌عنوان الگو استفاده کردند و مدل SWISS-MODEL از دقت و کیفیت بالاتری نسبت به دو مدل دیگر برخوردار بود. مقایسه بنیان‌های جایگاه فعال این آنزیم با ال-آسپاراژیناز II *E.chrysanthemi* نشان داد که از مجموع ۸ بنیان، ۵ آمینواسید مشابه و ۳ آمینواسید متفاوت هستند. گلوتامات۶۳، ترئونین۹۵ و آلانین۱۲۰ به گلوتامین۱۰۳، سرین۱۳۵ و سرین۱۶۰ در ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* تغییر یافته‌اند. تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که حضور گلوتامین به‌جای گلوتامات در جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز II موجب کاهش فعالیت گلوتامینازی می‌شود. بررسی آمینواسیدهای دارای کدون‌های کمیاب نشان داد که هر سه سرین جایگاه فعال دارای کدون کمیاب می‌باشند. بنابراین باتوجه به تعداد بالای کدون‌های کمیاب و هم‌چنین مرتبط بودن برخی از آن‌ها با بنیان‌های جایگاه فعال باید به‌هنگام فرایند بهینه‌سازی کدون، مطالعه دقیق و جامعی به‌منظور اطمینان از تولید بالای پروتئین و حلالیت آن در سیستم بیان *E. coli* انجام شود.

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند به فرایند طراحی و تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز II با قابلیت درمانی بالاتر و عوارض جانبی پایین‌تر کمک نماید.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
s.lotfi@kgut.ac.ir,
lotfisafa1@gmail.com_

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱۴۰۳
تاریخ داوری: ۱ آذر ۱۴۰۳
تاریخ اصلاح: ۲ بهمن ۱۴۰۳
تاریخ پذیرش: ۳ اسفند ۱۴۰۳

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

مقدمه

آنزیم ال-آسپاراژیناز (L-asparaginase) (EC 3.5.1.1) یک آمیدو هیدرولاز است که هیدرولیز گروه آمید زنجیره جانبی ال-آسپاراژین را به اسیدآسپارتیک و آمونیوم کاتالیز می‌نماید. این آنزیم که در انواع فرم‌های زندگی شامل گیاهان، برخی از جانوران، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و اکتینومیست‌ها یافت می‌شود در انسان شناسایی نشده است (۱). ال-آسپاراژیناز یک عامل آنتی‌نئوپلاستیک است که در درمان لوسمی و لنفوماهای خاص کابرد دارد. این آنزیم به‌ویژه، اهمیت زیادی در پروتکل‌های شیمی‌درمانی برای لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) و لنفوم هوچکین دارد (۲). سلول‌های سرطانی، به ویژه سلول های نئوپلاستیک لنفاوی، به منظور رشد سریع و بدخیم به مقادیر بالایی ال-آسپاراژین نیاز دارند. این سلول‌ها باید این آمینو اسید را از رژیم غذایی (سرم‌خون) دریافت کنند و یا این‌که خودشان آن را تولید نمایند. اما لنفوبلاست‌های لوسمیک و انواع دیگری از سلول‌های توموری، ال-آسپاراژین سنتتاز مورد نیاز برای سنتز ال آسپاراژین را در اختیار ندارند و یا مقادیر بسیار کمی از این آنزیم را دارا می‌باشند. بنابراین این سلول‌های بدخیم برای تکثیر و بقا به ال آسپاراژین موجود در سرم خون وابسته هستند(۳، ۴). ال-آسپارژیناز با هیدرولیز ال-آسپاراژین سرم خون منجر به فقدان یکی از عوامل ضروری برای سنتز پروتئین‌ها توسط سلول‌های توموری و در نتیجه مرگ (آپوپتوز واسته به p53) آن ها می‌شود (۵). باکتری‌هایی که ال-آسپارژیناز را در مقادیر بالا تولید می‌کنند به اعضای خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارند. در حال حاضر برای کاربردهای کلینیکی، ال-آسپارژینازهای موجود تجاری (Elspar، Kidrolase، Leunase، Spectrila، Oncaspa و Erwinase) عمدتاً به‌ترتیب توسط دو باکتری *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* تولید می‌شوند (۱، ۶، ۷). *E. coli* دونوع آنزیم ال-آسپارژیناز تولید می‌کند: ال-آسپارژیناز I (EC1) که در سیتوپلاسم وجود دارد و ال-آسپارژیناز II (EC2) که منشا پری‌پلاسمی دارد. فقط EC2 دارای فعالیت ضدسرطانی است و تمایل اتصال آن به ال-آسپارژین (Km =10-15 µM) نسبت به EC1 (Km = 3.5 mM) بالاتر است. براساس برخی مطالعات EC1 آنزیم ال-آسپاراژیناز اصلی است که به‌طور دایمی بیان می‌شود در حالی که EC2 آنزیمی است که ترشح آن فقط در پاسخ به غلظت‌های پایین نیتروژن اتفاق می‌افتد. ال-آسپاراژیناز II *E. chrysanthemi* (Erc) و *E. coli* (EC2) مکانیسم عمل مشابهی بر علیه سلول‌های توموری دارند، اما ویژگی‌های فارماکوکینتیکی و تمایل اتصال آن‌ها به سوبسترا و هم‌چنین ایمنی‌زایی آن‌ها باهم متفاوت است (۸، ۹). در صنایع غذایی، ال-آسپاراژیناز می‌تواند تشکیل ترکیب سرطان‌زای آکریلامید را که در غذاهای پخته و سرخ شده یافت می‌شود کاهش دهد. این ترکیب در نتیجه واکنش میلارد بین آسپاراژین و قندهای احیاکننده ایجاد می‌شود. بیش‌ترین میزان آکریلامید در سیب‌زمینی سرخ‌کرده و چیپس سیب‌زمینی گزارش شده است. آنزیم ال-آسپاراژیناز با از بین بردن ال-آسپاراژین، مانع انجام این واکنش و در نتیجه تشکیل آکریلامید در محصولات غذایی می‌شود. این آنزیم به‌عنوان یک افزودنی غذایی، تشکیل آکریلامید را تا ۹۷ درصد در انواع غذاهای نشاسته‌ای کاهش می‌دهد بدون این‌که طعم و ظاهر محصول نهایی را تغییر دهد. با توجه به تنوع ترکیبات و محیط با دمای بالا در غذاهای پخته و سرخ شده، ال-آسپارژیناز مورد استفاده در صنایع غذایی باید از پایداری بالایی برخوردار باشد (۱، ۵). بیش تر آمینو اسیدها توسط ۲ تا ۶ کدون مترادف، کد می‌شوند. سوگیری در استفاده از کدون (Codon usage bias) که به معنای ترجیح استفاده از کدون‌های مترادف خاص می‌باشد یک ویژگی عمومی همه ژنوم‌هایی است که تا به امروز مطالعه شده‌اند. این پدیده، به فراوانی نسبی tRNAهای کدون‌های مربوطه مرتبط است. قبلاً این تصور وجود داشت که جهش‌های کدونی مترادف، خاموش هستند. ولی هم‌اکنون مجموعه‌ای از شواهد علمی رو به رشد نشان می‌دهد که استفاده از کدون، ساختار پروتئین و بیان‌ژن را از طریق تاثیر بر روی "فولدینگ هم زمان با ترجمه پروتئین" (Co-translational protein folding) کارایی و دقت ترجمه، پایداری mRNA و رونویسی تنظیم می‌کند (۱۰، ۱۱). کدون‌های مترادف جایگزین با فرکانس‌های مساوی در یک موجود زنده یا زمانی‌که موجودات مختلف باهم مقایسه می‌شوند استفاده نمی‌شوند (۱۲). کدون‌های کمیاب (Rare codons) به آن دسته از کدون‌ها گفته می‌شود که با فرکانس پایین‌تر از ۱۰٪ در یک سیستم بیان اختصاصی نظیر *E. coli* در مقایسه با میزبان اصلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳). گاهی مواقع به منظور ارزیابی دقیق‌تر، این کدون‌ها به دو دسته کمیاب با فرکانس ۵-۱۰٪ و بسیار کمیاب با فرکانس ۵٪≥ تقسیم می‌شوند (۱۴). وقتی یک‌ژن نوترکیب بیان می‌شود ترجیح استفاده از کدون، نقش بسیار مهمی را در کارایی سیستم بیان میزبان ایفا می‌کند. وجود تفاوت مشخص بین فرکانس استفاده از کدون ارگانیسم مبدا و ارگانیسم میزبان هدف و هم‌چنین غالب بودن کدون‌های کمیاب در توالی مورد نظر می‌تواند منجر به کاهش دقت و کارایی بیان ژن شود. مطالعات نشان داده‌اند که حضور کدون‌های کمیاب بر سطح بیان ژن و حلالیت و میزان بیان پروتئین تاثیر دارد (۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷). جالب توجه است که نتایج چند مطالعه نشان می‌دهد که تعدادی از خوشه‌های کدون‌های کمیاب (در پروتئین‌هایی با بیش از ۳۰۰ بنیان آمینواسیدی) که "نواحی با سرعت‌ترجمه پایین" (Slow-translating regions) نامیده

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

می‌شوند، با فراهم نمودن زمان لازم برای فولد شدن دقیق پروتئین، نقش بسیار مهمی در فولدینگ مناسب پروتئین ایفا می‌نمایند. در واقع، افزایش سرعت ترجمه در نتیجه حذف این توقف‌گاه‌های ترجمه ایجاد شده توسط کدون‌های کمیاب، منجر به فولدینگ نامناسب پروتئین و در نتیجه عدم حلالیت آن می‌شود (۱۳، ۱۸، ۱۹). پس از آن‌که نقش کدون‌های کمیاب در توالی نوکلئوتیدی یک پروتئین در نظر گرفته شد، می‌توان استفاده از کدون را قبل از تولید پروتئین برای افزایش نرخ بیان ژن در هر سیستم بیانی بهینه کرد (۲۰). در این فرآیند بهینه‌سازی، کدون‌های کمیاب شناسایی می‌شوند و بدون تغییر توالی اسیدآمینه پروتئین به کدون‌های پرکاربرد در ارگانیسم میزبان جهش داده می‌شوند. انواع رویکردهای ریاضی و آماری برای تجزیه و تحلیل استفاده از کدون موجود است. این رویکردها هم‌چنین تجزیه و تحلیل سوگیری استفاده از کدون را در کل گروه‌های موجودات و مجموعه‌های ژنی متعدد امکان‌پذیر می‌سازد (۲۱). ال-آسپاراژیناز به‌طور گسترده در تمام اشکال زندگی، از جمله حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و اکتینومیست‌ها توزیع می‌شود. با این حال، باکتری‌ها به‌دلیل نگه‌داری و جابجایی راحت، روش‌های استخراج و خالص‌سازی پروتئین آسان که تولید در مقیاس صنعتی را تسهیل می‌کنند، بر سایر منابع ترجیح داده می‌شوند (۲۲، ۲۳). در حال حاضر ال-آسپاراژیناز II *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* به‌عنوان داروهای آنتی تومور موثر به‌منظور درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد کودکان استفاده می‌شوند به‌هرحال به‌دلیل نیمه‌عمر کوتاه، ایجاد غلظت دارویی مناسب این دو نوع آسپاراژیناز، نیازمند استفاده مداوم و منظم می‌باشد. هم‌چنین عوارض جانبی متعددی برای هر دو آنزیم گزارش شده است. هدف از این تحقیق، بررسی کدون‌های کمیاب، مدل سازی مولکولی و مطالعه جایگاه فعال آنزیم ال-آسپاراژیناز II متعلق به باکتری *Bacillus megaterium* می‌باشد. تحقیقات انجام شده می‌تواند اطلاعات مفیدی را در زمینه چگونگی افزایش بیان، حلالیت و پایداری ال-آسپاراژیناز نوترکیب و طراحی و تولید مولکول‌های آنزیمی با عملکرد و پایداری ساختاری بالاتر و عوارض جانبی کم‌تر به‌منظور استفاده در صنایع دارویی و غذایی ارائه دهد (۲۴، ۲۵).

مواد و روش‌ها

دانلود توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده ال-آسپاراژیناز II *Bacillus megaterium*: در مرحله اول تحقیق، توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* به فرمت FASTA از وب‌سایت NCBI با آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ دانلود گردید. توالی نوکلئوتیدی این آنزیم با کد دسترسی KP768443.1 حاوی ۱۱۱۳ جفت باز است.

شناسایی کدون‌های کمیاب ژن ال-آسپاراژیناز II *Bacillus megaterium* با استفاده از سرور ATGme: ATGme یک برنامه کاربردی و انعطاف‌پذیر مبتنی بر وب برای شناسایی کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب است. آنالیز ژن ال-آسپاراژیناز II در ATGme در چهار مرحله انجام شد: (۱) وارد کردن توالی نوکلئوتیدی به فرمت FASTA (۲) وارد کردن جدول استفاده از کدون *Escherichia coli* *B* [gbbct]: 11 CDS's (3771 codons) که از پایگاه داده استفاده از کدون (http://www.kazusa.or.jp/codon) (۲۶) کپی شده بود (۳) آشکارسازی کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب. این کدون‌ها به‌ترتیب با رنگ‌های نارنجی و قرمز در نتایج نهایی مشخص می‌شوند.

تعیین ساختار سوم پروتئین ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* با استفاده از سه سرور مبتنی بر هومولوژی مدلینگ (SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER): با توجه به این‌که ساختار سوم آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* هنوز با روش‌های آزمایشگاهی تعیین نشده است در این مرحله از تحقیق، ساختار این آنزیم با استفاده از وب‌سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER که همگی بر مبنای هومولوژی مدلینگ عمل می‌کنند تعیین گردید. بدین منظور توالی آمینواسیدی این آنزیم با فرمت FASTA از وب‌سایت NCBI دانلود شد و به‌عنوان ورودی در اختیار این سرورها قرار گرفت. این توالی با کد دسترسی KP768443.1 حاوی ۳۷۰ آمینو اسید می‌باشد. سرور SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org) یک سرور خودکار برای تعیین ساختار سوم پروتئین‌ها با استفاده از هومولوژی مدلینگ است (۲۷-۲۹). این سرور، برای هر پروتئین چند مدل ارائه می‌نماید. انتخاب بهترین مدل بر اساس مقادیر GMQE (Global Model Quality Estimate) و QMEANDisCo Global انجام می‌شود. GMQE و QMEANDisCo Global در مجموع نشان دهنده کیفیت مدل ساخته شده می‌باشند و مقادیر آن‌ها بین ۰ تا ۱ متغیر است. اعداد بالاتر نشان‌دهنده آن است که مدل مورد نظر از قابلیت اطمینان بالاتری برخوردار است. GMQE به‌میزان هم‌پوشانی (Coverage) مدل و توالی هدف، وابسته است. به‌طور مثال اگر مدلی فقط نیمی از توالی هدف را پوشش دهد احتمال این‌که GMQE بالاتر از ۰/۵ داشته باشد بسیار کم است. درحالی‌که QMEANDisCo، کیفیت مدل را مستقل از میزان هم‌پوشانی مورد بررسی قرار می‌دهد. Phyre2 http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index) مجموعه‌ای از ابزارهای موجود در وب برای پیش‌بینی و تجزیه و تحلیل ساختار، عملکرد و جهش‌های پروتئین است. Phyre2 جایگزین

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]
[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

Phyre، نسخه‌اصلی این سرور شده است (۳۰). یک پیش‌بینی ساختار معمولی با این سرور، بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت طول می‌کشد. Phyre2، تعداد بسیار زیادی مدل برای پروتئین مورد مطالعه ارائه می‌نماید که بهترین مدل براساس درصد Confidence و تشابه توالی انتخاب می‌شود. سرور I-TASSER (https://zhanggroup.org/I-TASSER/) یک سرویس اینترنتی است که با استفاده از یک روش سلسله مراتبی، ساختار و عملکرد یک پروتئین را پیش‌بینی می‌نماید. فرایند مدلینگ توسط I-TASSER با جستجوی الگوهای ساختاری در پایگاه داده PDB توسط LOMETS آغاز می‌شود. LOMETS یک متاسرور متشکل از چندین برنامه threading است (۳۱، ۳۲، ۳۳). I-TASSER به هر مدل ایجاد شده یک C-score (Confidence score) اختصاص می‌دهد که مقدار آن بین ۵- تا ۲ متغیر است. هرچقد این عدد برای یک مدل بالاتر باشد مدل مورد نظر از دقت بالاتری برخوردار است.

بررسی کیفیت مدل‌های ایجاد شده توسط دو سرور ERRAT و Verify3D: به منظور بررسی کیفیت بهترین مدل‌های ایجاد شده توسط سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER از دو سرور ERRAT (https://www.doe-mbi.ucla.edu/errat) (۳۴) و Verify3D (https://www.doe-mbi.ucla.edu/verify3d) (۳۵) استفاده شد. ERRAT براساس میانکنش‌های غیرپیوندی موجود بین انواع مختلف اتم‌ها در ساختار پروتئین، کیفیت ساختار را تعیین می‌کند. این وب‌سرور، فرکانس میاکنش‌های مشاهده شده در پروتئین مورد مطالعه را با فرکانس مورد انتظار به‌دست آمده از یک پایگاه داده حاوی ساختارهای پروتئینی با وضوح بالا مقایسه می‌کند. بر مبنای همین مقایسه، ERRAT یک مقدار خطا را به هر بنیان آمینواسیدی موجود در ساختار پروتئین اختصاص می‌دهد و مقادیر خطا را با توجه به توالی پروتئین رسم می‌کند. مقادیر خطای بالا، نشان‌دهنده وجود خطای احتمالی در ساختار پروتئین مورد مطالعه است. Verify3D از تطابق ساختار یک پروتئین با توالی آمینواسیدی خودش به منظور تعیین کیفیت ساختار استفاده می‌کند. این وب‌سرور یک کلاس ساختاری را با توجه به محل قرارگیری و محیط (آلفا، بتا، لوپ، قطبی، غیرقطبی و ..) به هر بنیان آمینواسیدی اختصاص می‌دهد. Verify3D سپس کلاس ساختاری مشاهده شده را با کلاس ساختاری مورد انتظار به دست آمده از یک پایگاه داده حاوی ساختارهای پروتئینی شناخته شده مقایسه می‌کند. در نهایت این سرور، یک امتیاز را برای هر بنیان آمینواسیدی محاسبه می‌کند که نشان‌دهنده آن است که هر بنیان به چه میزان با محیط مورد انتظار مطابقت دارد. یک امتیاز پایین، منعکس کننده یک خطای احتمالی در ساختار پروتئین مورد مطالعه است.

شناسایی بنیان‌های آمینواسیدی تشکیل‌دهنده جایگاه فعال آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*: به منظور شناسایی بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه فعال، از نرم‌افزار PyMol استفاده شد. بدین منظور ساختار سوم ال-آسپاراژیناز II *E. chrysanthemi* (کد PDB: 1O7J) (۳۶) بر روی ساختار سوم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* (بهترین مدل ایجاد شده توسط SWISS-MODEL) منطبق و توالی دو پروتئین هم ترازسازی شد. با توجه به این که بنیان‌های جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز II *E. chrysanthemi* قبلاً مشخص شده است از طریق هم ترازسازی انجام شده با PyMol بنیان‌های معادل در ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* شناسایی شد.

نتایج

شناسایی کدون‌های کمیاب: همان طورکه در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد به منظور شناسایی کدون‌های کمیاب توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* از سرور ATGme استفاده شد. سرور ATGme، به منظور شناسایی کدون‌های کمیاب، نیازمند جدول Codon Usage ارگانیسم مورد نظر می‌باشد. با توجه به این که باکتری *E. coli* یک سیستم بیان پروتئین رایج می‌باشد جدول استفاده از کدون *Escherichia coli B* [gbbct]: 11 CDS's (3771 codons) (جدول ۱) که از پایگاه داده استفاده از کدون (http://www.kazusa.or.jp/codon) کپی شده بود به عنوان ورودی در اختیار این سرور قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از سرور ATGme در شکل ۱ ارائه شده است. کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب به ترتیب با رنگ نارنجی و قرمز مشخص شده‌اند. هم‌چنین محاسبه محتوای GC و AT توسط این سرور نشان داد که این ژن حاوی ۳۸/۳۶ درصد GC و ۶۱/۶۴ درصد AT می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از این سرور، ژن ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* در مجموع دارای ۱۰۰ کدون با فراوانی کم می‌باشد که از این تعداد ۷۳ کدون از نوع کمیاب و ۲۷ کدون دیگر از نوع بسیار کمیاب می‌باشد. جدول ۲، موقعیت و نوع بنیان‌های آمینواسیدی مرتبط با کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب شناسایی شده توسط سرور ATGme را نمایش می‌دهد.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]
[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

جدول ۱: جدول استفاده از کدون *Escherichia coli B* [gbbct]: 11 CDS's (3771 codons). فرکانس بر اساس تعداد کدون مورد نظر به ازای هر ۱۰۰۰ کدون می‌باشد.

Table 1: Codon usage table for *Escherichia coli B* [gbbct]: 11 CDS's (3771 codons). Frequency is based on the number of codons of interest per 1000 codons

UUU 28.9(109)	UCU 8.5(32)	UAU 18.6(70)	UGU 4.2(16)
UUC 18.8(71)	UCC 8.0(30)	UAC 8.5(32)	UGC 5.8(22)
UUA 17.5(66)	UCA 6.1(23)	UAA 1.9(7)	UGA 0.8(3)
UUG 18.6(70)	UCG 11.4(43)	UAG 0.3(1)	UGG 12.7(48)
CUU 12.7(48)	CCU 5.8(22)	CAU 9.3(35)	CGU 16.4(62)
CUC 14.1(53)	CCC 2.4(9)	CAC 7.2(27)	CGC 18.8(71)
CUA 3.4(13)	CCA 7.4(28)	CAA 13.5(51)	CGA 2.4(9)
CUG 54.9(207)	CCG 24.9(94)	CAG 24.7(93)	CGG 5.0(19)
AUU 33.9(128)	ACU 7.7(29)	AAU 21.2(80)	AGU 9.0(34)
AUC 31.0(117)	ACC 25.2(95)	AAC 15.9(60)	AGC 14.3(54)
AUA 5.0(19)	ACA 6.1(23)	AAA 29.2(110)	AGA 2.4(9)
AUG 37.4(141)	ACG 14.6(55)	AAG 8.8(33)	AGG 2.1(8)
GUU 19.6(74)	GCU 13.8(52)	GAU 30.0(113)	GGU 24.4(92)
GUC 14.3(54)	GCC 25.5(96)	GAC 15.1(57)	GGC 33.1(125)
GUA 10.6(40)	GCA 19.6(74)	GAA 29.4(111)	GGA 8.2(31)
GUG 33.9(128)	GCG 32.6(123)	GAG 18.0(68)	GGG 14.3(54)

ATG GAA CTG AAA AGA ATA ATA GGC GTC ACC TGT TTA TCA AGC GTT ATC TTA TTT TCG GGA CCT TTA TCA TTG GTC AAT
GCA TCA GTA AAT GAT TCT AAA ATG ACT GTG AAA AAT TCA GTG AAA GAA AAA TTG CCC AAT ATA AAG ATT TTG GCC ACT
GGA GGT ACG ATT GCA GGT TCT TCT GAG AGC AGC ACA GAC ACA ACT GGA TAT GAA TCA GGA GCC CTT GAT ATT AAA ACC
ATC ATT AAA GCT GTT CCT CAG TTA AAA AAA CTA GCG AAT GTA AGC GGA GAA CAA GTG GTA AAT ATC GGA AGT CAA AAT
ATA AAT AAC AGC ATT TTG TTA AAG TTA GCC AAA CGA ATT AAT ACA CTA TTA GCG TCT AAG GAT GTT GAT GGT ATT GTC
GTA ACA CAC GGA TCT GAT ACG ATG GAG GAA ACG GCT TAT TTT CTA AAC TTA GTA GTA AAA AGT GAA AAA CCT GTA GTT
GTG GTT GGT TCA ATG AGA CCC GCT ACC GCT ATA AGT GCA GAT GGA CCG CTA AAC TTG TAT AAC GCA GTA AAA ATT GCT
TCT ACA AAA GAA GCA CGA AAT AAC GGC GTT TTA GTA GCG CTT AAT GAC CGA ATT GGC GCA GCC CGT TAT ATA ACG AAA
ACT CAT ACA ACG GCA GTG GAT ACG TTT AAA TCT CCT GAA CAG GGA TAT ACA GGA GAA ATA GCT GGA GAT CAG GTA TTA
TTT TAT AAC AAA GCA ACT CGT AAG CAT ACG ACG CAA TCA CTA TTT GAT GTA TCA AAA TTA GAT AAG CTT CCT CAA GTA
GAC ATC ATA TAT GGG TAT CAA AAC GAC TCT AGG AAC TTT TAT GAC ACA GCC GTA AAA GCC GGA GCA AAA GGA ATA GTC
GTC GCA GGA GCA GGA AAT GGG CTG CTA TCG GAT GCT GCC CTA ACA GGT GCT AGA GAT GCG GTA AAA AAA GGC GTA GTT
ATT GTG AGA TCC AGC CGC GTA GGA AGC GGG GTT GTG ACA CAT GAA GAA TCA GAT GAT AAA GAT ACG TTT GTT ACA TCG
GAT TCA TTA AAT CCA CAA AAA GCC CGT ATT CTT TTA ATG CTT GCT TTA ACG AAA ACA AAG GAT CCT AAA AAG ATT CAA
GAA TAT TTT AAT

شکل ۱: نتایج به‌دست آمده از سرور ATGme. کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب شناسایی شده توسط این سرور، به‌ترتیب با رنگ نارنجی و قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 1: Results obtained from the ATGme server. Rare and very rare codons identified by this server are marked in orange and red, respectively.

تعیین ساختار سوم آنزیم ال-آسپاراژیناز II: با توجه به این‌که ساختار سوم آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* هنوز با روش‌های آزمایشگاهی تعیین نشده است ساختار این پروتئین با سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER پیش‌بینی شد. نتایج مدل‌سازی با SWISS-MODEL نشان می‌دهد که بهترین مدل ساخته شده برای ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*، دارای GMQE و QMEANDisCo Global، ۰/۷۹ و ۰/۰۵±۰/۸۲ است. الگوی مورد استفاده زنجیره Aال-آسپاراژیناز جهش یافته *Erwinia chrysanthemi* (5i4b.1.A) است (۳۷). تشابه توالی (Sequence Similarity) بین ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* و 5i4b.1.A ۴۷ درصد و میزان هم‌پوشانی (Coverage) ۸۸ درصد می‌باشد. بررسی ساختار پروتئین مدل‌سازی شده نشان می‌دهد که این پروتئین شبیه به پروتئین الگو (5i4b) دارای چهار زیرواحد است. هر زیرواحد، آمینواسیدهای ۳۷۰-۴۳ ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* را در برمی‌گیرد (شکل ۲). از بین چندین مدل ساخته شده توسط سرور Phyre2، بهترین مدل بر اساس درصد اطمینان، تشابه توالی و هم پوشانی انتخاب گردید.

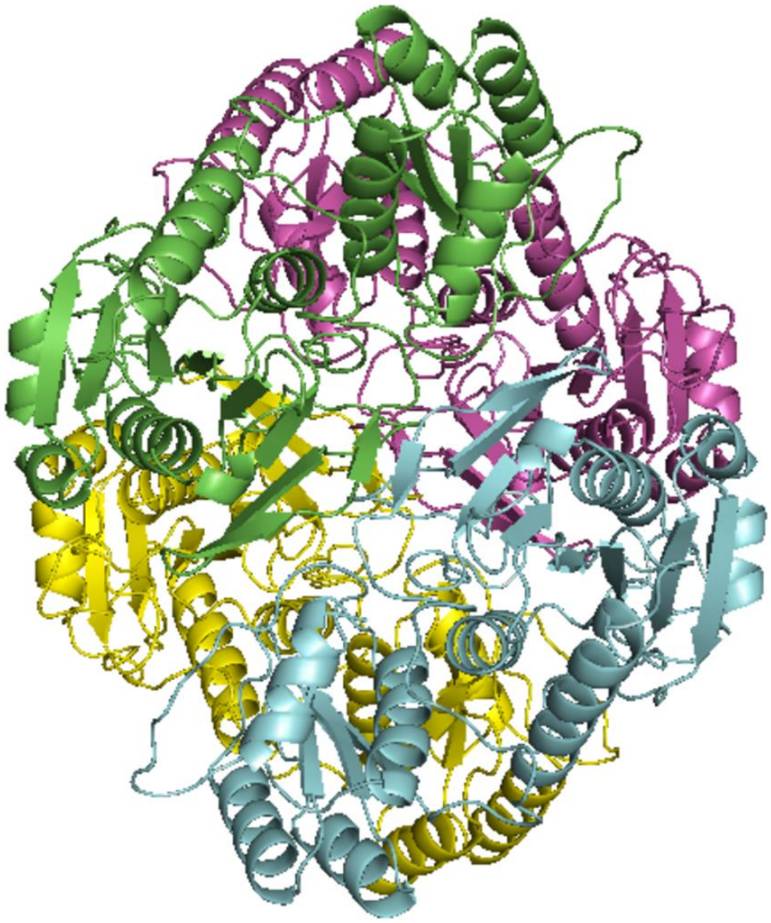
[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

جدول ۲: بنیان‌های آمینواسیدی دارای کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب در توالی ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*

Table 2: Amino acid bases with rare and very rare codons in the *B. megaterium* L-asparaginase II sequence

Amino acids with rare codons
Lysine 48, Threonine 52, Glycine 53, Serine 59, Serine 60, Threonine 64, Threonine 66, Threonine 67, Glycine 68, Serine 71, Glycine 72, Proline 84, Glycine 94, Glycine 101, Serine 102, Lysine 112, Threonine 119, Serine 123, Lysine 124, Threonine 132, Histidine 133, Glycine 134, Serine 135, Serine 151, Proline 154, Serine 160, Serine 168, Glycine 171, Serine 183, Threonine 184, Threonine 209, Histidine 210, Threonine 211, Serine 219, Proline 220, Glycine 223, Threonine 225, Glycine 226, Glycine 230, Threonine 240, Lysine 242, Histidine 243, Serine 247, Serine 252, Lysine 256, Proline 258, Serine 270, Threonine 276, Glycine 281, Glycine 284, Glycine 289, Glycine 291, Threonine 301, Serine 316, Glycine 320, Threonine 325, Histidine 326, Serine 329, Threonine 337, Serine 340, Proline 343, Threonine 357, Lysine 358, Proline 360, Lysine 362
Amino acids with very rare codons
Proline 45, Isoleucine 47, Leucine 89, Isoleucine 105, Arginine 116, Leucine 120, Leucine 145, Arginine 162, Proline 163, Isoleucine 167, Leucine 173, Arginine 188, Arginine 199, Isoleucine 206, Isoleucine 228, Leucine 248, Isoleucine 263, Arginine 271, Isoleucine 285, Leucine 295, Leucine 300, Arginine 304, Arginine 315

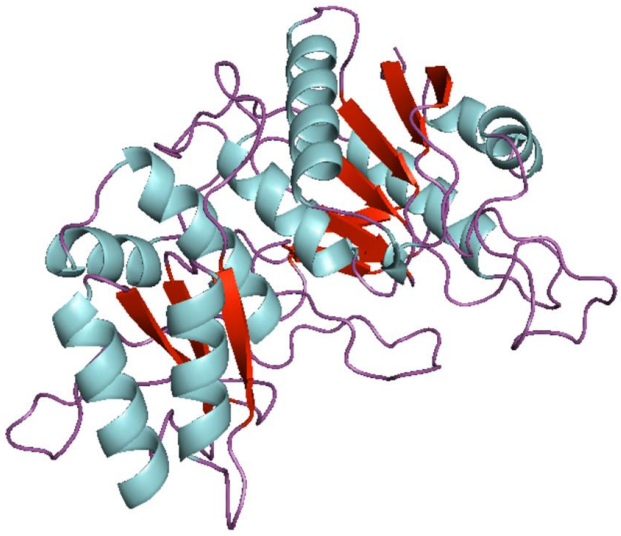


شکل ۲: بهترین مدل ارائه شده توسط سرور SWISS-MODEL برای پروتئین ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*

Figure 2: The best model provided by the SWISS-MODEL server for the *B. megaterium* L-asparaginase II protein

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

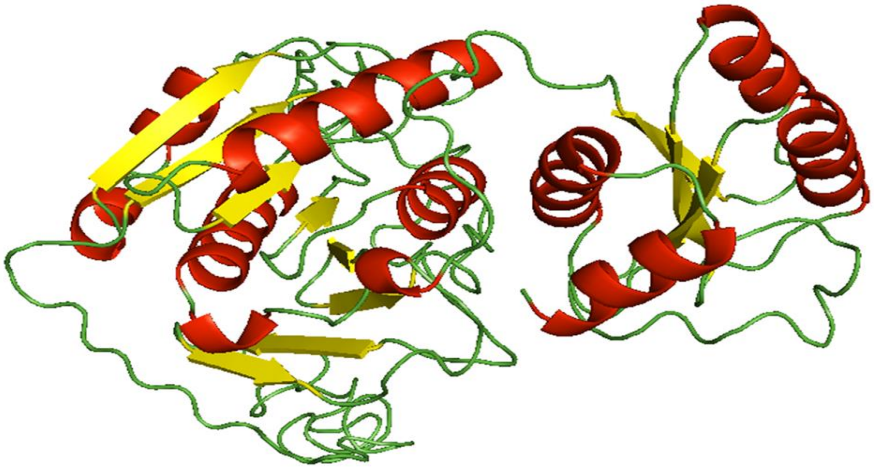
[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]



شکل ۳: بهترین مدل ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*. ساخته شده توسط سرور Phyre2

Figure 3: Best model of L-asparaginase II of *B. megaterium*. Built by Phyre2 server

این مقادیر به‌ترتیب برای بهترین مدل ساخته شده توسط این سرور، ۱۰۰، ۵۸ و ۸۸ می‌باشد. به منظور ایجاد این مدل از 1O7J (۳۶) که ساختار کریستالی ال-آسپاراژیناز II *Erwinia chrysanthemi* است به‌عنوان الگو استفاده شده است. هرچند الگوی مورد استفاده دارای چهار زیرواحد می‌باشد اما مدل ساخته شده یک مونومر است. این مدل نیز شبیه مدل ایجاد شده توسط سرور SWISS-MODEL آمینواسیدهای ۳۷۰-۴۳ ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* را در بر می‌گیرد (شکل ۳). سرور I-TASSER از متاسرور LOMETS که متشکل از ۱۰ برنامه threading است به‌منظور یافتن الگو برای مدل سازی استفاده می‌کند. هر برنامه threading چندین الگو با مقادیر Z-score مشخص برای مدل‌سازی شناسایی می‌کند. هرچه Z-score بالاتر باشد یعنی ساختار موردنظر، الگوی مناسب‌تری برای مدل‌سازی محسوب می‌شود. درنهایت از هر برنامه threading، الگویی با بالاترین Z-score انتخاب می‌شود و بنابراین در مجموع I-TASSER از ۱۰ الگوی منتخب برای مدل‌سازی استفاده می‌کند. بررسی این الگوها نشان می‌دهد که از این ۱۰ الگو، ۶ الگو یکسان و مربوط به ساختار ال-آسپاراژیناز II *Erwinia chrysanthemi* با کد 2JK0 PDB (۳۸) می‌باشد. قابل توجه این‌که ۴ الگوی باقی‌مانده نیز همگی مربوط به ساختار سوم ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* هستند (۳۹، ۴۰، ۴۱). از بین پنج مدل ساخته شده توسط I-TASSER، مدل ۱ با بالاترین میزان C-score (0.89-) بهترین مدل محسوب می‌شود. بهترین مدل ساخته شده توسط I-TASSER یک پروتئین تک‌زیرواحدی است که تمامی آمینواسیدهای ال-آسپاراژیناز II مورد مطالعه (۳۷۰-۱) را شامل می‌شود. این مدل در شکل ۴ نمایش داده شده است.



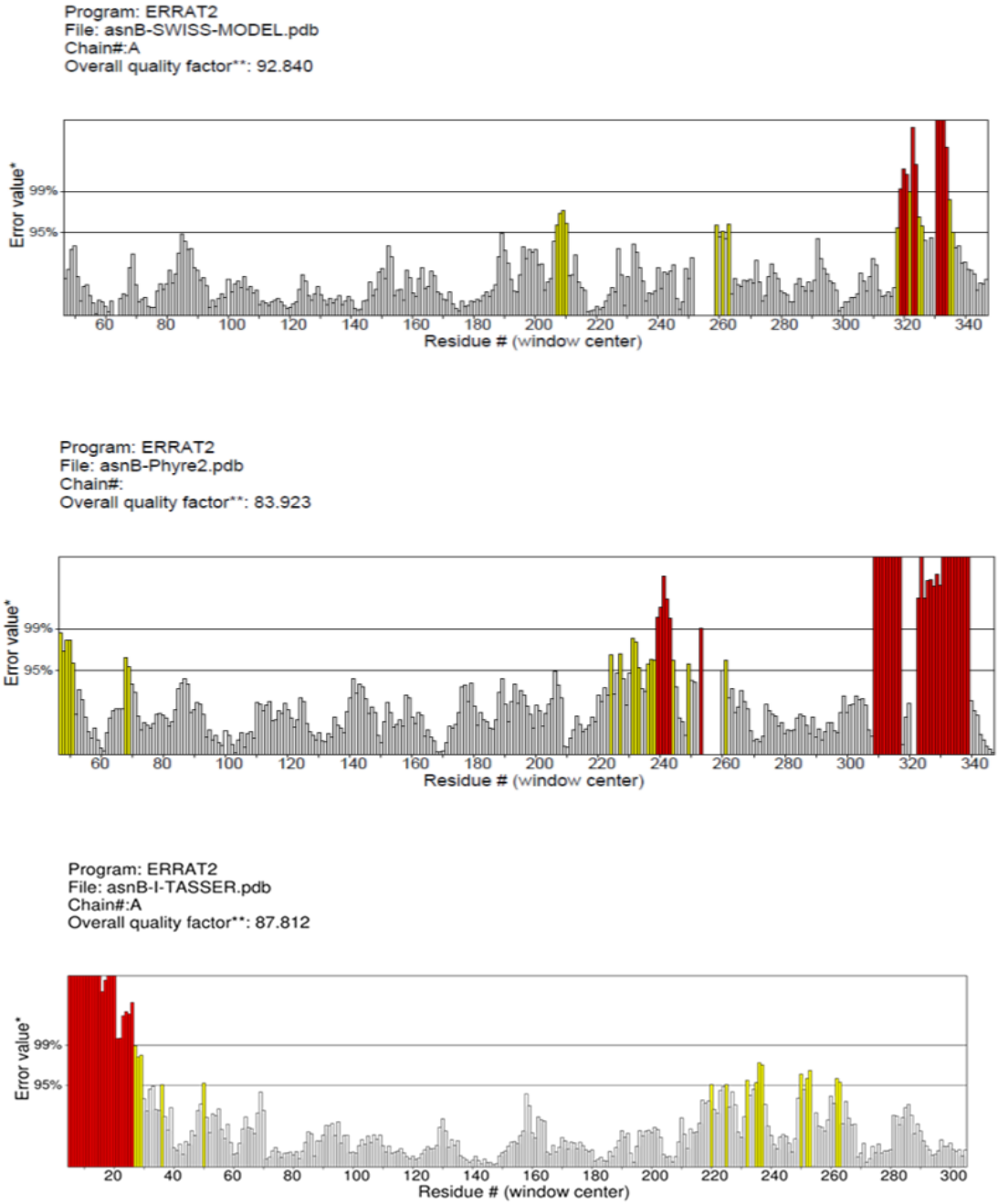
شکل ۴: بهترین مدل ساخته شده توسط سرور I-TASSER برای پروتئین ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*

Figure 4: The best model built by the I-TASSER server for the *B. megaterium* L-asparaginase II protein

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

بررسی کیفیت بهترین مدل‌های ساخته‌شده: همان‌طور که قبلاً ذکر شد به منظور بررسی کیفیت بهترین مدل‌های ساخته شده توسط سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER از دو سرور ERRAT و Verify 3D استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از دو سرور نشان‌دهنده آن است که مدل ایجادشده توسط SWISS-MODEL از کیفیت بسیار بالاتری برخوردار است. براساس نتایج به‌دست آمده از ERRAT، فاکتور کیفیت کلی (Overall Quality Factor) مدل‌های ساخته شده توسط سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER به‌ترتیب ۹۲/۸۴، ۸۳/۹۲۳ و ۸۷/۸۱۲ می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی کیفیت مدل‌های ساخته شده توسط سه سرور SWISS-MODEL ، Phyre2 و I-TASSER برای پروتئین ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* با استفاده از سرور ERRAT

Figure 5: Quality assessment of models built by three servers SWISS-MODEL, Phyre2 and I-TASSER for the protein L-asparaginase II of *B. megaterium*. Using the ERRAT server

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

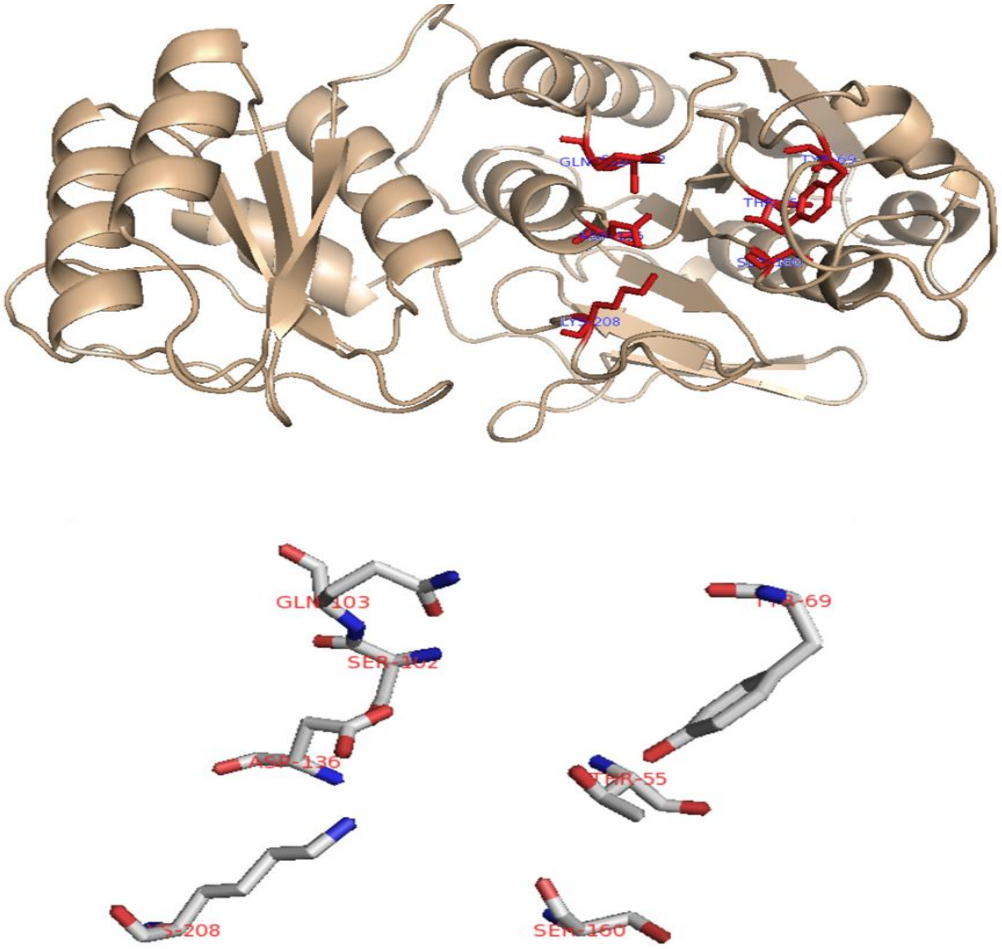
نتایج به‌دست آمده از سرور Verify3D نیز به روشنی نشان می‌دهد که مدل ساخته شده توسط SWISS-MODEL از کیفیت بالا و قابل قبولی برخوردار است درحالی‌که کیفیت مدل‌های ساخته شده توسط Phyre2 و I-TASSER، قابل قبول نیست. براساس پارامترهای ارزیابی کیفیت Verify3D، باید حداقل ۸۰ درصد اسیدآمینه‌های یک پروتئین در پروفایل 3D/1D امتیاز بزرگ‌تر مساوی (=>) ۰/۱ را کسب کنند که این درصد برای مدل‌های ساخته شده توسط سرورهای SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER به‌ترتیب ۸۲/۷۷، ۷۹/۸۸ و ۷۵/۱۴ می‌باشد.

شناسایی بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه فعال: به منظور مشخص نمودن بنیان‌های جایگاه فعال، هم‌ترازسازی ساختار سوم این پروتئین و ال-آسپاراژیناز II *E chrysanthemi* با نرم‌افزار PyMol انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده در جدول ۳ نمایش داده شده است. همان‌طورکه به‌خوبی مشاهده می‌شود بیش‌تر آمینواسیدهای تشکیل دهنده جایگاه فعال در این دو آنزیم، مشابه است. اما سه بنیان گلوتامات ۶۳، ترئونین ۹۵ و آلانین ۱۲۰ ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* به گلوتامین ۱۰۳، سرین ۱۳۵ و سرین ۱۶۰ در ال-آسپاراژیناز *B. megaterium* تغییر یافته است. شکل ۶ محل قرارگیری و بنیان‌های تشکیل‌دهنده جایگاه فعال آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* را در زیرواحد A مدل ساخته شده توسط SWISS-MODEL نشان می‌دهد.

جدول ۳: بنیان‌های آمینواسیدی تشکیل‌دهنده جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* و *B. megaterium*

Table 3: Amino acid bases constituting the active site of L-asparaginase *E. chrysanthemi* and *B. megaterium*

Erwinia chrysanthemi	*Bacillus megaterium*
Threonine 15	Threonine 55
Tyrosine 29	Tyrosine 69
Serine 62	Serine 102
Glutamate 63	Glutamine 103
Threonine 95	Serine 135
Aspartate 96	Aspartate 136
Alanine 120	Serine 160
Lysine 168	Lysine 208



شکل ۶: محل قرارگیری و بنیان‌های تشکیل‌دهنده جایگاه فعال آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium*

Figure 6: Location and bases forming the active site of the enzyme L-asparaginase II of *B. megaterium*

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

بحث

بیماری سرطان، دومین دلیل اصلی مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود. به‌طور کلی تحت تاثیر عوامل مختلف، میزان وقوع این بیماری در جوامع امروزی افزایش مشخصی را نشان می‌دهد (۴۲، ۴۳). امروزه در سراسر جهان، مطالعات گسترده‌ای به منظور یافتن داروهای ضد سرطان جدید با قابلیت درمانی بالاتر و عوارض جانبی کم‌تر در جریان است (۴۴، ۴۵). آنزیم ال-آسپاراژیناز (EC 3.5.1.1، ال-آسپاراژین آمیدوهیدرولاز) یک آنزیم مهم با اثر آنتی‌نئوپلاستیک شناخته شده است که اسیدآمینه ال-آسپاراژین را به ال-آسپارتیک اسید و آمونیاک تبدیل می‌کند. این آنزیم در ارگانیسم‌های متعددی شامل سلول‌های جانوری و گیاهی، مخمر، قارچ‌ها و باکتری‌ها یافت می‌شود. به‌هرحال آنزیم باکتریایی به دلیل ویژگی بالاتر برای سوبسترا و نیمه‌عمر طولانی‌تر توجه بیش‌تری به‌عنوان یک داروی ضدسرطان به خود معطوف نموده‌است. در حال حاضر برای کاربردهای کلینیکی، ال-آسپارژینازهای موجود تجاری عمدتاً به ترتیب توسط دو باکتری *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* تولید می‌شوند (۴۶، ۴۷، ۴۸). آنتی‌بادی‌های ایجاد شده بر علیه آنزیم ال-آسپاراژیناز دلیل اصلی ایجاد سمیت، مقاومت به درمان و کاهش کارایی درمان با این آنزیم محسوب می‌شوند. حذف سریع از پلاسما، مدت فعالیت کوتاه، تزریقات مکرر برای حفظ سطح درمانی مورد نیاز، ایجاد پاسخ‌های ایمنی و هم‌چنین شوک آنافیلاکتیک، محدودیت‌های اصلی ال-آسپاراژینازهای تجاری موجود هستند. ویژگی کم برای سوبسترا (substrate specificity) یکی دیگر از مشکلات مرتبط با ال-آسپاراژینازهای تجاری است که می‌تواند باعث اختلال عملکرد کبد، پانکراتیت، لکوپنی، تشنج عصبی و ناهنجاری‌های انعقادی منجر به ترومبوز داخل جمجمه یا خونریزی شود (۷، ۴۹). نشان داده شده است که ال-آسپاراژینازهای مشتق شده از میکروارگانیسم‌های مختلف، خواص متفاوتی از خود نشان می‌دهند و واکنش متقاطع آنتی‌ژنی مشترکی ندارند. بنابراین، هنگامی که بیماران دچار حساسیت مفرط به ال-آسپارژیناز *E. coli* می‌شوند، آنزیم *E. chrysanthemi* به‌منظور جلوگیری از خطر واکنش‌های آلرژیک جایگزین می‌شود. از این رو، درخواست برای ال-آسپاراژیناز جدید و قوی از میکروارگانیسم‌های جایگزین وجود دارد. محققان در حال مطالعه منابع میکروبی جدید ال-آسپاراژیناز هستند که پایداری بهبود یافته، فعالیت گلوتامینز کم‌تر با میل ترکیبی بالای سوبسترا و نیمه‌عمر کافی در شرایط فیزیولوژیکی داشته باشند (۷، ۴۶، ۵۰، ۵۱). در همین راستا، در این پروژه تحقیقاتی آنزیم ال-آسپاراژیناز II متعلق به باکتری *Bacillus megaterium* مورد مطالعه قرار گرفته است. در مرحله اول، کدون‌های کمیاب و بسیار کمیاب توالی کدکننده ژن ال-آسپاراژیناز II *B.megaterium* با سرور ATGme مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از سرور ATGme، این ژن در مجموع دارای ۱۰۰ کدون با فراوانی کم می‌باشد که از این تعداد ۷۳ کدون از نوع کمیاب و ۲۷ کدون دیگر از نوع بسیار کمیاب می‌باشد. بنابراین از مجموع ۳۷۰ بنیان آمینواسیدی این پروتئین، کدون‌های مرتبط با ۱۰۰ آمینواسید از نوع کمیاب می‌باشد که رقم بالایی محسوب می‌شود. همان‌طور که در بخش‌های قبلی این مقاله اشاره شد با توجه به این که ساختار سوم آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B.megaterium* هنوز با روش‌های آزمایشگاهی شناسایی نشده است ساختار سوم این پروتئین با سه سرور SWISS-MODEL، Phyre2 و I-TASSER پیش‌بینی شد. نکته قابل توجه این که همه الگوهایی که توسط این سه سرور برای مدل‌سازی استفاده شدند مربوط به ال-آسپاراژیناز II *Erwinia chrysanthemi* بودند. بررسی بهترین مدل‌های ساخته شده توسط این سه سرور نشان داد که فقط مدل ارائه شده توسط SWISS-MODEL یک تترامر می‌باشد و دو مدل دیگر تک زیرواحدی هستند. بررسی ساختارهای PDB مرتبط با ال-آسپاراژیناز *Erwinia chrysanthemi* که به روش‌های آمایشگاهی تهیه شده‌اند نشان می‌دهد که ساختار این آنزیم در اکثر موارد به‌صورت تترامر و در برخی موارد به‌صورت دایمر می‌باشد (۵۲). بررسی کیفیت بهترین مدل‌های ساخته شده توسط دو سرور ERAAT و Verify3D نشان داد که مدل ساخته شده توسط SWISS-MODEL نسبت به دو مدل دیگر از دقت و کیفیت بالاتری برخوردار است. شناسایی بنیان‌های تشکیل‌دهنده جایگاه فعال آنزیم ال-آسپاراژیناز II *B.megaterium* و مقایسه آن با جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* نشان‌دهنده آن است که از مجموع ۸ بنیان جایگاه فعال، ۵ آمینواسید مشابه و ۳ آمینواسید متفاوت هستند. بنیان‌های گلوتامات ۶۳، ترئونین ۹۵ و آلانین ۱۲۰ ال آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* در ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* به گلوتامین ۱۰۳، سرین ۱۳۵ و سرین ۱۶۰ تغییر یافته‌اند. بررسی جایگاه فعال ال-آسپاراژیناز II *E. coli* نشان می‌دهد که بنیان معادل گلوتامات ۶۳ و گلوتامین ۱۰۳ ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* و *B. megaterium*، گلوتامین ۵۹ است و بنابراین آمینواسید تشکیل دهنده این جایگاه در ال-آسپاراژیناز II *E. coli* و *B. megaterium* مشابه است. نکته جالب توجه این که جهش‌های ایجاد شده در ال آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* نشان می‌دهد که حضور گلوتامین در این جایگاه منجر به کاهش فعالیت گلوتامینازی آنزیم می‌شود (۳۷). هم‌چنین با توجه به این که این جایگاه در ال-آسپاراژیناز II *E. coli* توسط گلوتامین اشغال شده است فعالیت گلوتامینازی آن نسبت به ال-آسپاراژیناز *E. chrysanthemi* پایین‌تر است (۵۳، ۵۴، ۵۵، ۵۶). بنابراین با توجه به شواهد بالا، می‌توان نتیجه گرفت که ال-آسپاراژیناز

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]
[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

II *B.megaterium* نیز دارای فعالیت گلوتامینازی پایین می‌باشد. برخی از اثرات جانبی مشاهده شده برای ال-آسپاراژینازهای تجاری موجود شامل سرکوب سیستم ایمنی، سمیت کبدی، پانکراتیت و اختلال عملکرد انعقادی مربوط به فعالیت ال-گلوتامینازی آن‌ها می‌باشد. اعتقاد بر این است که این عوارض جانبی ناشی از اختلال در سنتز پروتئین ناشی از فعالیت ال-گلوتامینازی داروهای ال-آسپارژیناز است. بنابراین برای از بین بردن عوارض جانبی ناشی از کاهش سطح گلوتامین و هم چنین افزایش کارایی درمان با ال-آسپاراژیناز، طراحی و تولید آنزیم‌هایی با فعالیت ال-آسپارژینازی حفظ شده و یا افزایش یافته و فعالیت ال-گلوتامینازی کاهش یافته از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردار است (۸، ۳۷، ۵۳، ۵۷، ۵۸، ۵۹). بررسی کدون‌های کمیاب شناسایی شده توسط ATGme نشان می‌دهد که تعدادی از کدون‌های کمیاب، مرتبط با بنیان‌های آمینواسیدی جایگاه فعال می‌باشند. هر سه بنیان سرین جایگاه فعال (سرین ۱۰۲، سرین ۱۳۵ و سرین ۱۶۰) توسط این سرور به‌عنوان کدون‌های کمیاب شناسایی شده‌اند. تعداد و محل قرارگیری کدون‌های کمیاب در ساختار ال-آسپاراژیناز II *B. megaterium* زمانی اهمیت می‌یابد که هدف، بیان این آنزیم در سیستم بیانی *E. coli* باشد. با توجه به تعداد بسیار بالای کدون‌های کمیاب شناسایی شده و هم چنین مرتبط بودن برخی از این کدون‌ها با بنیان‌های آمینو اسیدی تشکیل‌دهنده جایگاه فعال حتما باید به هنگام فرایند بهینه سازی کدون، مطالعه دقیق و جامعی در این زمینه انجام شود تا از تولید بالای پروتئین و حلالیت آن اطمینان حاصل شود (۶۰، ۶۱). با توجه به بالا بودن تعداد کدون‌های کمیاب شناسایی شده و هم‌چنین درگیر بودن بنیان‌های جایگاه فعال شاید بهتر است برای بیان این پروتئین از سیستم‌های بیانی دیگر استفاده نمود. البته حتماً باید قبل از این اقدام، کدون‌های کمیاب این توالی را با توجه به جدول Codon usage ارگانیسم بیان پروتئین مورد نظر شناسایی کرد و سپس در مورد بیان این آنزیم در سیستم بیانی جدید اظهار نظر نمود. در مجموع نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، می‌تواند به فرایند طراحی و تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز با قابلیت درمانی بالاتر و عوارض جانبی پایین‌تر کمک نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند که از دانشگاه تحصیلات تکمیلی فناوری پیشرفته کرمان به‌دلیل فراهم نمودن بودجه تحقیقاتی لازم برای اجرای این پروژه (شماره گرنت: ۰۱/۱۴۳۸/ص/۷) قدردانی کنند.

منابع

1. **Chand, S., Mahajan, R.V., Prasad, J.P., Sahoo, D.K., Mihooliya, K.N., Dhar, M.S. and Sharma, G., 2020.** A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization & industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 67(4): 619-647. doi: 10.1002/bab.1888
2. **Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H. and Riehm, H., 2000.** Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 95(11): 3310-3322.
3. **Kiriyama, Y., Kubota, M., Takimoto, T., Kitoh, T., Tanizawa, A., Akiyama ,Y. and Mikawa, H., 1989.** Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia*. 3(4): 294-297.
4. **Stams, W.A., den Boer, M.L., Beverloo, H.B., Meijerink, J.P., Stigter, R.L., van Wering, E.R., Janka Schaub, G.E., Slater, R. and Pieters, R., 2003.** Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood*. 101(7): 2743-2747. doi: 10.1182/blood-2002-08-2446
5. **Cachumba, J.J., Antunes, F.A., Peres, G.F., Brumano, L.P., Santos, J.C. and Da Silva, S.S., 2016.** Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Brazilian journal of microbiology*. 47(1): 77-85. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.004
6. **Mortazavi, M., Torkzadeh-Mahani, M., Kargar, F., Nezafat, N. and Ghasemi, Y., 2020.** In silico analysis of codon usage and rare codon clusters in the halophilic bacteria L-asparaginase. *Biologia*. 75(1): 151-160. https://doi.org/10.2478/s11756-019-00324-w
7. **Shrivastava, A., Khan, A.A., Khurshid, M., Kalam, M.A., Jain, S.K. and Singhal, P.K., 2016.** Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 100: 1-10. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.01.002
8. **Brumano, L.P., da Silva, F.V.S., Costa-Silva, T.A., Apolinario, A.C., Santos, J., Kleingesinds, E.K., Monteiro, G., Rangel-Yagui, C.O., Benyahia, B. and Junior, A.P., 2018.** Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

Desirable Quality Profiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 6: 212.doi: 10.3389/fbioe.2018.00212

9. **Verma ,N., Kumar, K., Kaur, G. and Anand, S., 2007.** L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical Reviews in Biotechnology*. 27(1): 45-62. doi: 10.1080/07388550601173926

10. **Liu, Y., 2020.** A code within the genetic code: codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*. 18(1): 145. doi: 10.1186/s12964-020-00642-6

11. **Wang, Y., Li, C., Khan, M.R., Wang, Y., Ruan, Y., Zhao, B., Zhang, B., Ma, X., Zhang, K., Zhao, X., Ye, G., Guo, X., Feng, G., He, L. and Ma, G., 2016.** An Engineered Rare Codon Device for Optimization of Metabolic Pathways. *Scientific Reports*. 6: 20608. doi: 10.1038/ srep20608

12. **Henry, I. and Sharp, P.M., 2007.** Predicting gene expression level from codon usage bias. *Molecular Biology and Evolution*. 24(1): 10-12. doi: 10.1093/molbev/msl148

13. **Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A., 2009.** Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories*. 8: 41. doi: 10.1186/1475-2859-8-41

14. **Takenaka, Y., Haga, N., Harumoto, T., Matsuura, T. and Mitsui, Y., 2002.** Transformation of Paramecium caudatum with a novel expression vector harboring codon-optimized GFP gene .*Gene*. 284(1-2): 233-240. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00886-1

15. **Kane, J.F., 1995.** Effects of rare codon clusters on high level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 6(5): 494-500. doi: 10.1016/0958-1669(95)80082-4

16. **Kim, S. and Lee, S.B., 2006.** Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 50(1): 49-57. doi: 10.1016/j.pep.2006.07.014

17. **Correddu, D., Montano Lopez, J.J., Angermayr, S.A., Middleditch, M.J., Payne, L.S. and Leung, I.K.H., 2020.** Effect of consecutive rare codons on the recombinant production of human proteins in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*. 72(2): 266-274. doi: 10.1002/iub.2162

18. **Deane, C.M. and Saunders, R., 2011.** The imprint of codons on protein structure. *The Biotechnology Journal*. 6(6): 641-649. doi: 10.1002/biot.201000329

19. **Zhang, G., Hubalewska, M. and Ignatova, Z., 2009.** Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nature Structural & Molecular Biology*. 16(3): 274-280. doi: 10.1038/nsmb.1554

20. **Liu, L., Yang, H., Shin, H.D., Chen, R.R., Li, J., Du, G. and Chen, J., 2013.** How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*. 4(4): 212-223. doi: 10.4161/bioe.24761

21. **Roth, A., Anisimova, M. and Cannarozzi, G.M., 2012.** Measuring codon usage bias. In: Cannarozzi GM, Schneider A, editors. Codon Evolution: Mechanisms and Models: Oxford University Press.

22. **Parameswaran, B., Papamichael, E., Varjani, S. and Raveendran, S., 2019.** Introduction to Green Bioprocesses: Industrial Enzymes for Food Applications. In: Parameswaran, B., Varjani, S. and Raveendran, S., (eds) Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability. Singapore: Springer Singapore.

23. **Ghasemian, A., Al-Marzoqi, A.H., Al-Abodi, H.R., Alghanimi, Y.K., Kadhum, S.A., Shokouhi Mostafavi, S.K. and Fattahi, A., 2019.** Bacterial l-asparaginases for cancer therapy: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Cellular Physiology*. 234(11): 19271-19279. doi: 10.1002/jcp.28563

24. **Li, X., Zhang, X., Xu, S., Xu, M., Yang, T., Wang, L., Zhang, H., Fang, H., Osire, T. and Rao, Z., 2019.** Insight into the thermostability of thermophilic L-asparaginase and non-thermophilic L-asparaginase II through bioinformatics and structural analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(17): 7055-7070. doi: 10.1007/s00253-019-09967-w

25. **da Cunha, M.C., Dos Santos Aguilar, J.G., de Melo, R.R., Nagamatsu, S.T., Ali, F., de Castro ,R.J.S. and Sato, H.H., 2019.** Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. *Food Research International*. 126: 108658. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108658

26. **Nakamura, Y., Gojobori, T. and Ikemura, T., 2000.** Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*. 28(1): 292. doi: 10.1093/nar/28.1.292

27. **Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T., 2018.** SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W296-W303. doi: 10.1093/nar/gky427

28. **Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L. and Schwede, T., 2017.** The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Research*. 45(D1): D313-D319. doi: 10.1093/nar/gkw1132

29. **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M.C., 2003.** SWISS-MODEL: An automated protein homology modeling server. *Nucleic Acids Research*.31(13):3381-3385. doi: 10.1093/nar/gkg520

30. **Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. and Sternberg, M.J., 2015.** The Phyre2 web portal for protein

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

Goossens, S., Van Vlierberghe, P. and Lavie, A., 2023. In vivo stabilization of a less toxic asparaginase variant leads to a durable antitumor response in acute leukemia. *Haematologica*. 108(2): 409-419. doi: 10.3324/haematol.2022.281390

42. **Koshafar, A., Savari, A., Sakhaei, N., Archangi, B. and Karimi Organi, F., 2019.** Evaluation of carcinogenicity and non-carcinogenicity of heavy metals in the dominant muscle of Bahmanshir River. *Journal of Animal Environment.* 11(4): 155-162. (In Persian)

43. **Hassanpour, S.H. and Dehghani, M., 2017.** Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. 4(4): 127-129. https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001

44. **Zohrevand, A., Sadeghi, M.S., Emtyazjoo, M. and Hejazi, H., 2023.** Anticancer effects of coral extract of Sinularia compressa on human gastric adenocarcinoma cell line (AGS). *Journal of Animal Environment*. 15(1): 273-278. doi: 10.22034/AEJ.2022.338193.2789 (In Persian)

45. **Debela, D.T., Muzazu, S.G., Heraro, K.D., Ndalama, M.T., Mesele, B.W., Haile, D.C., Kitui, S.K. and Manyazewal, T., 2021.** New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *Sage Open Medicine*. 9: 20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366

46. **Safary, A., Moniri, R., Hamzeh-Mivehroud, M. and Dastmalchi, S., 2019.** Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. *Bioimpacts*. 9(1): 15-23. doi: 10.15171/bi.2019.03

47. **Jia, M., Xu, M., He, B. and Rao, Z., 2013.** Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(39): 9428-9434. doi: 10.1021/jf402636w

48. **de Araújo, T.S., Scapin, S.M.N., de Andrade, W., Fasciotti, M., de Magalhães, M.T.Q., Almeida, M.S. and Lima, L.M.T.R., 2021.** Biophysical characterization of two commercially available preparations of the drug containing *Escherichia coli* L-Asparaginase 2. *Biophysical Chemistry*. 271: 106554. doi: 10.1016/j.bpc.2021.106554

49. **Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A.M., Vilmer, E., Otten, J. and Philippe, N., 2002.** Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 99(8): 2734-2739. doi: 10.1182/blood.v99.8.2734

modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 10(6): 845-858. doi: 10.1038/nprot.2015.053

31. **Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y., 2010.** I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5(4): 725-738. doi: 10.1038/nprot.2010.5

32. **Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y., 2015.** The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 12(1): 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213

33. **Wu, S. and Zhang, Y., 2007.** LOMETS: a local meta threading-server for protein structure prediction. *Nucleic acids research*. 35(10): 3375-3382. doi: 10.1093/nar/gkm251

34. **Colovos, C. and Yeates, T.O., 1993.** Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*. 2(9): 1511-1519. doi: 10.1002/pro.5560020916

35. **Luthy, R., Bowie, J.U. and Eisenberg, D., 1992.** Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 356(6364): 83-85. doi: 10.1038/356083a0

36. **Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A. and Dauter, Z., 2003.** Atomic resolution structure of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. *Acta Crystallogr D Biology Crystallogr*. 59(Pt 1): 84-92. doi: 10.1107/s0907444902019443

37. **Nguyen, H.A., Su, Y. and Lavie, A., 2016.** Design and Characterization of Erwinia Chrysanthemi l-Asparaginase Variants with Diminished l-Glutaminase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 291(34): 17664-17676. doi: 10.1074/jbc.M116.728485

38. **Papageorgiou, A.C., Posypanova, G.A., Andersson, C.S., Sokolov, N.N. and Krasotkina, J., 2008.** Structural and functional insights into Erwinia carotovora L-asparaginase. *FEBS Journal*. 275(17): 4306-4316. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06574.x

39. **Jaskolski, M., Kozak, M., Lubkowski, J., Palm, G. and Wlodawer, A., 2001.** Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups. *Acta Crystallogr D Biology Crystallogr*. 57(Pt 3): 369-377. doi: 10.1107/s090744490020175

40. **Kravchenko, O.V., Kislitsin, Y.A., Popov, A.N., Nikonov, S.V. and Kuranova, I.P., 2008.** Three dimensional structures of L-asparaginase from Erwinia carotovora complexed with aspartate and glutamate *Acta Crystallogr D Biology Crystallogr*. 64(Pt 3): 248-256. doi: 10.1107/S0907444907065766

41. **Van Trimpont, M., Schalk, A.M., De Visser, Y., Nguyen, H.A., Reunes, L., Vandemeulebroecke, K., Peeters, E., Su, Y., Lee, H., Lorenzi, P.L., Chan, W.K., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Lammens, T.,**

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]

50. **Sudhir, A.P., Dave, B.R., Prajapati, A.S., Panchal, K., Patel, D. and Subramanian, R.B., 2014.** Characterization of a recombinant glutaminase-free L-asparaginase (ansA3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 174(7): 2504-2515. doi: 10.1007/s12010-014-1200-z

51. **Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Pokrovsky, V.S., Veselovsky, A.V., Grishin, D.V., Abakumova, O.Y., Podobed, O.V., Mishin, A.A., Zhdanov, D.D. and Sokolov, N.N., 2015.** Identification of functional regions in the Rhodospirillum rubrum L-asparaginase by site directed mutagenesis. *Molecular Biotechnology*. 57(3): 251-264. doi: 10.1007/s12033-014-9819-0

52. **Lubkowski, J. and Wlodawer, A., 2021.** Structural and biochemical properties of L-asparaginase. *FEBS Journal*. 288(14): 4183-4209. doi: 10.1111/febs.16042

53. **Aghaiypour, K., Wlodawer, A. and Lubkowski, J., 2001.** Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*. 40(19): 5655-5664. doi: 10.1021/bi0029595

54. **Kumar, D. and Sobha, K., 2012.** L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. *Advances in Bioresearch*. 3: 137-157.

55. **Derst, C., Henseling, J. and Rohm, K.H., 2000.** Engineering the substrate specificity of Escherichia coli asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Science*. 9(10): 2009-2017. doi: 10.1110/ps.9.10.2009

56. **Swain, A.L., Jaskolski, M., Housset, D., Rao, J.K. and Wlodawer, A., 1993.** Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(4): 1474-1478. doi: 10.1073/pnas.90.4.1474

57. **Tripathy, R.K., Anakha, J. and Pande, A.H., 2023.** Towards development of biobetter: L-asparaginase a case study. *Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects*. 1868(1): 130499. doi: 10.1016/j.bbagen.2023. 130499

58. **Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B. and Weinstein, J.N., 2014.** The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood*. 123(23): 3596-3606. doi: 10.1182/blood-2013-10-535112

59. **Ardalan, N., Mirzaie, S., Sepahi, A.A. and Khavari Nejad, R.A., 2018.** Novel mutant of *Escherichia coli* asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies. *Medical Hypotheses*. 112: 7-17. doi: 10.1016/j.mehy. 2018.01.004

60. **Mauro, V.P., 2018.** Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. *BioDrugs*. 32(1): 69-81. doi: 10.1007/s40259-018-0261-x

61. **Parvathy, S.T., Udayasuriyan, V. and Bhadana, V., 2022.** Codon usage bias. *Molecular Biology Reports*. 49(1): 539-565. doi: 10.1007/s11033-021-06749-4

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-15]

[DOI: 10.22034/aer.1.2.23]