

مقاله کامل

بررسی قدرت اتصال آنزیم‌های DEP-A و DEP-B با میکوتوکسین ۱۵ADON با استفاده از داکینگ مولکولی

• زهرا موسوی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• محمد هادی سخاوتی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• محسن فرزانه

گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

• علی جوادمنش (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۰۱-۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۴-۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲-۰۴-۰۴ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۰۱-۱۹

Email: javadmanesh@um.ac.ir



چکیده

۱۵- استیل-دی‌اکسی‌نیوالونول (۱۵ADON) یکی از رایج‌ترین کموتایپ میکوتوکسین دی‌اکسی‌نیوالونول (DON) است که با روش‌های رایج نظیر جاذب‌های معدنی و آلی به طور کامل قابل کنترل نیست. از این رو، روش‌های مبتنی بر آنزیم‌ها جهت سم‌زدایی این نوع میکوتوکسین‌ها پیشنهاد می‌شود که قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی نیازمند مطالعات بیوانفورماتیک می‌باشد. از این رو، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی قدرت اتصال آنزیم‌های DEP-A و DEP-B با کموتایپ ۱۵ADON از طریق داکینگ مولکولی می‌باشد. ساختار سه بعدی پروتئین‌های DEP-A و DEP-B با استفاده از سرور SWISS MODEL پیش‌بینی شد. سپس، پایداری این ساختارها در شرایط دینامیکی مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور شبیه‌سازی با کمک نرم‌افزار GROMACS انجام شد و سپس منحنی RMSD مربوط به این دو آنزیم جهت بررسی پایداری ساختار رسم شد. به منظور بررسی برهم‌کنش‌های آنزیم DEP-A با ۱۵ADON و DEP-B با ۱۵ADON Oxid، از سرور آنلاین H-DOCK استفاده شد. بررسی ساختارهای پیش‌بینی‌شده توسط پلات‌های Ramachandran و ERRAT، Verify³D، Z-score و نشان داد که پیش‌بینی ساختارها با موفقیت انجام شده‌است. منحنی‌های RMSD نشان داد که DEP-A و DEP-B به ترتیب در ۲۴۰ و ۴۰ نانوثانیه با میزان ۰/۵۸ و ۰/۳۵ nm پایدار شده‌اند. نتایج مربوط به داکینگ مولکولی نیز نشان داد که هر دو آنزیم DEP-A و DEP-B به ترتیب با انرژی اتصال نسبتاً قوی (۱۴۱/۷۸- و ۱۵۷/۹۰-) به سوبسترا متصل شده‌اند. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که هر دو آنزیم مورد مطالعه قادر به اتصال به کموتایپ ۱۵ADON در جایگاه مناسب بوده که نشان می‌دهد این آنزیم‌ها می‌توانند در غیرفعال‌سازی این کموتایپ موثر واقع شوند. اگرچه مطالعات آزمایشگاهی به منظور تایید این نتایج مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: داکینگ مولکولی، میکوتوکسین، آنزیم، ۱۵-استیل-دی‌اکسی‌نیوالونول

• Veterinary Research & Biological Products No 142 pp: 15-26

Investigating of the binding energy of DEP-A and DEP-B enzymes with DON mycotoxin chemotype by molecular docking

By: Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Sakhavi, M.H., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Farzaneh, M., Department of Agricultural Engineering, Research Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. and Javadmanesh, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2023-04-18 Accepted: 2023-06-27

Revised: 2023-06-25 Published: 2024-04-07

Email: javadmanesh@um.ac.ir

15-acetyl-deoxynivalenol (15ADON) is the most common chemotype of deoxynivalenol (DON) mycotoxin, which cannot be controlled by common methods such as absorbents. Hence, enzyme-based methods are suggested for detoxification of these types of mycotoxins, which requires bioinformatics studies before laboratory investigations. Therefore, the aim of the present study was to investigate the binding energy of DEP-A and DEP-B enzymes with 15ADON through molecular docking. The three-dimensional structures of DEP-A and DEP-B proteins were predicted using the SWISS MODEL server. Then, the stability of these structures was evaluated in molecular dynamic conditions. For this purpose, the simulation was carried out with GROMACS software and then the RMSD curve of these two enzymes was drawn to check the stability of the predicted structure. H-DOCK online server was used to performed the interaction of DEP-A enzyme with 15ADON and DEP-B with Oxid15ADON intermediate. Checking the accuracy of the predicted structures by ERRAT Verify3D, Z-score and Ramachandran plots showed that the prediction of tertiary structures successfully performed. The RMSD curves showed that DEP-A and DEP-B were stabilized in 240 and 40 nanoseconds with 0.58 and 0.35 nm, respectively. The results of molecular docking also showed that both DEP-A and DEP-B enzymes could bind to their substrates with relatively strong binding energy -157.90 and -141.78, respectively. Overall, it can be concluded that both studied enzymes were able to bind to the 15ADON chemotype of DON in the appropriate position, which shows that these enzymes can be effective in deactivating this chemotype, although laboratory studies are needed to confirm the results.

Key words: Molecular Docking, Mycotoxin, Enzyme, 15-Acetyl-Deoxynivalenol

تیپ A (سم های ۲-T و ۲-HT) و تیپ B (دی اکسی نیوالنول، نیوالنول و مشتقات آنها) می باشند. در میان آنها، دی اکسی نیوالنول (DON) رایج ترین مایکوتوکسین آلوده کننده غلات در سراسر جهان است که سلامت انسان و بهره‌وری حیوانات مزرعه را دچار مشکل می کند (۲۱). اثر اصلی مایکوتوکسین‌های تریکوتسن، محدودیت اولیه سنتز پروتئین در سلول و به دنبال آن متوقف کردن سنتز DNA و RNA است. مکانیسم عمده سمیت بر عدم سنتز پروتئین و ماکرومولکول‌ها و سرکوب سیستم ایمنی متمرکز می باشد. این مایکوتوکسین در دوزهای پایین موجب تهوع، اسهال، زخم و ضایعات دستگاه گوارش، کاهش بهره‌وری مواد

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط قارچ‌های رشته‌ای می باشند که دارای ریشه یونانی مایکس به معنی قارچ و کلمه لاتین توکسیکوم به معنی سم بوده و مسمومیت آن محدود به مسمومیت حاصل از غذا می باشد (۱۵). تریکوتسن‌ها (TCs) که توسط گونه‌های مختلف قارچ‌های فوزاریوم ترشح می شوند؛ از جمله فراوان ترین مایکوتوکسین‌های آلوده کننده‌ی خوراک در مناطق معتدل آمریکا، اروپا و آسیا می باشند (۷). انواع مختلفی از تریکوتسن‌ها توسط میکروارگانیسم‌های قارچی ترشح می شوند که شامل:

و اپیمریزه شده‌ی مایکوتوکسین DON هستند که در موقعیت فضایی گروه ۳-OH دچار تغییر شده است. این متابولیت‌ها سمیت کمتری را نسبت به DON (ترتیب ۱۰ برابر و ۵۰ برابر کمتر) در شرایط *In vivo* و *In vitro* نشان داده است. کره و همکاران (۴؛ ۵) آنزیم اکسید کننده و اپیمریزه کننده‌ی مایکوتوکسین DON را به ترتیب با نام DEP-A و DEP-B گزارش کردند.

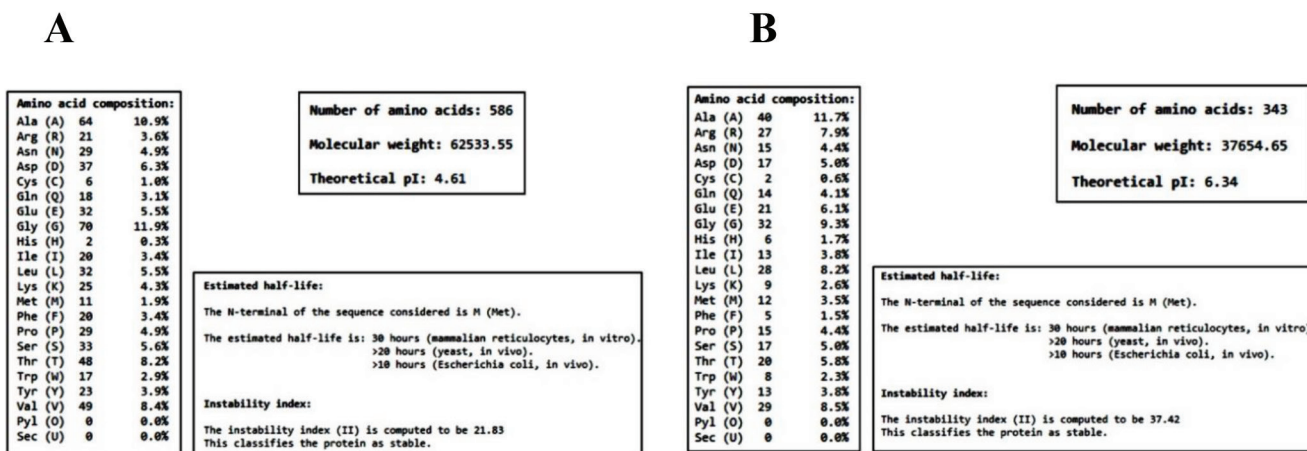
اخیراً؛ استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید انبوه آنزیم به‌همراه استفاده از دانش بیوانفورماتیک به‌منظور پیش‌بینی برهم‌کنش میان آنزیم و سوبسترا راهی مناسب جهت کاهش هزینه‌ها و افزایش سرعت و دقت در تولید آنزیم‌ها می‌باشد. امروزه با توجه به گسترش تکنولوژی و روش‌های آزمایشگاهی و همچنین هزینه‌های بالای آن‌ها، استفاده از روش‌های محاسباتی مانند داکینگ مولکولی برای تخمین فعالیت مولکول‌های مختلف به عنوان کاندیدای دارویی پیش از سنتز آن‌ها، فرایند کشف داروهای جدید را تسریع و موجب کاهش هزینه‌ها می‌شود (۱۸؛ ۱۳؛ ۲۱).

پژوهشگرانی همچون هی و همکاران (۱۰) اتصال مولکولی مایکوتوکسین DON را بر روی ساختار کریستالی DEP-A (حاصل از باکتری دوسیا موتانت) به صورت بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار دادند. همچنین یانگ و همکاران (۲۳) جایگاه فعال آنزیم DEP-A به صورت بیوانفورماتیک ارزیابی کردند. با این حال تا به امروز مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی دو آنزیم DEP-A و DEP-B بر روی کموتایپ‌های نظیر ۱۵ADON گزارش نشده است. لذا؛ با توجه به اینکه ۱۵ADON کموتایپ مایکوتوکسین DON می‌باشد و این دو مایکوتوکسین از نظر ساختاری بسیار مشابه یکدیگر هستند و از طرفی مطالعات اتصال آنزیم‌های DEP-A و DEP-B را با DON اثبات کرده اند؛ پیشنهاد می‌شود بررسی داکینگ این دو آنزیم با ۱۵ADON مورد ارزیابی واقع شود. بنابراین؛ هدف از این مطالعه پیش‌بینی ساختار آنزیم‌های DEP-A و DEP-B با منشا باکتریایی به روش بیوانفورماتیکی و سپس داکینگ مولکولی این

خوراکی و از دست دادن وزن و در دوز بالا منجر به استفراغ، کاهش شدید وزن و اختلالات سیستم ایمنی می‌شود (۱۵). محققین گزارش کردند که قارچ‌های فوزاریوم نه تنها DON بلکه دو مشتق استیله DON شامل ۳- استیل-دی اکسی نیوالنول (۳ADON) و ۱۵- استیل-دی اکسی نیوالنول (۱۵ADON) را نیز تولید می‌کنند که در واقع کموتایپ‌های DON هستند. امروزه ژنوتیپ‌های فوزاریوم گرامینیوم تولید کننده‌ی DONs (مجموع هر سه شکل DON، ۳ADON، ۱۵ADON) شناسایی شده‌اند (۲۵). مطالعات نشان داده‌اند با توجه به اثرات مشابه DON با کموتایپ‌های آن، ۱۵ADON در برخی موارد همچون تضعیف سد رودهای قوی‌تر از DON عمل می‌کند (۲).

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های مختلف برای مقابله با مایکوتوکسین‌ها نظیر جاذب‌ها به کار برده شده است. گزارش‌ها حاکی از آن است که جاذب‌ها به منظور مهار سمومی همچون آفاتوکسین‌ها بسیار کار آمد بوده‌اند؛ اما برای برخی دیگر از سموم به‌خصوص DON موفقیت‌آمیز نبوده است. یکی از راه‌های مقابله با این مایکوتوکسین استفاده از آنزیم‌ها است که می‌توانند با تغییر شکل زیستی مایکوتوکسین‌ها و تبدیل آن‌ها به مواد غیرسمی اثر خود را اعمال کنند (۶؛ ۸؛ ۲۰). واکنش‌های آنزیمی، اغلب غیرقابل برگشت، موثر و سازگار با محیط زیست هستند که بقایای باقی نمی‌گذارند.

در حال حاضر، چندین میکروارگانیزم با منشا خاک، گیاهان و دستگاه گوارش حیوانات گزارش شده‌اند که توانایی تغییر شکل زیستی مایکوتوکسین DON را از طریق ترشح آنزیم‌ها دارا می‌باشند. باکتری نوکاردیوئیدها سویه ۲-WSN۰۵ مستخرج از خاک مزارع گندم موجب تغییر شکل زیستی DON و تبدیل آن به یک حدواسط بی‌خطر می‌شود (۱۲). هی و همکاران (۱۰) باکتری دوسیا موتانت ۸-E-۲-۱۷ را در خاک‌های زمین کشاورزی کشف کردند. این محققین نشان دادند که این باکتری قابلیت تغییر DON را به ۳-Keto-DON و سپس به *epi*-۳-DON دارد. ۳-Keto-DON و *epi*-۳-DON به ترتیب شکل اکسید شده



شکل ۱- مشخصات فیزیوشیمیایی پروتئین DEP-A (A) و DEP-B (B).

آنزیم ها با ۱۵ADON جهت بررسی قدرت و محل اتصال در شرایط In silico می باشد.

مواد و روش ها

تهیه توالی اسیدآمینهای آنزیم DEP-A و DEP-B از NCBI

توالی اسیدآمینهای آنزیم های DEP-A و DEP-B از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) با شماره های دسترسی KFL۲۵۵۵۱ و KFL۲۸۰۶۸ به منظور پیش بینی ساختار سوم پروتئین و ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمیایی مورد استفاده واقع شد. ساختار مربوط به ۱۵ADON به فرمت SDF با کد دسترسی ۱۰۲۵۱۵۰۳۸ از پایگاه داده Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) تهیه شد و از طریق نرم افزار Open babel به فرمت PDB تبدیل شد (۲۰۲۰,۲۲۵۴۰۴.dls/۱۰,۳۰۴۹۳). در ارتباط با ساختار اکسید شده ۱۵ADON (در این مطالعه ۱۵ADON Oxid نامیده شد) از نرم افزار ChemDraw استفاده گردید.

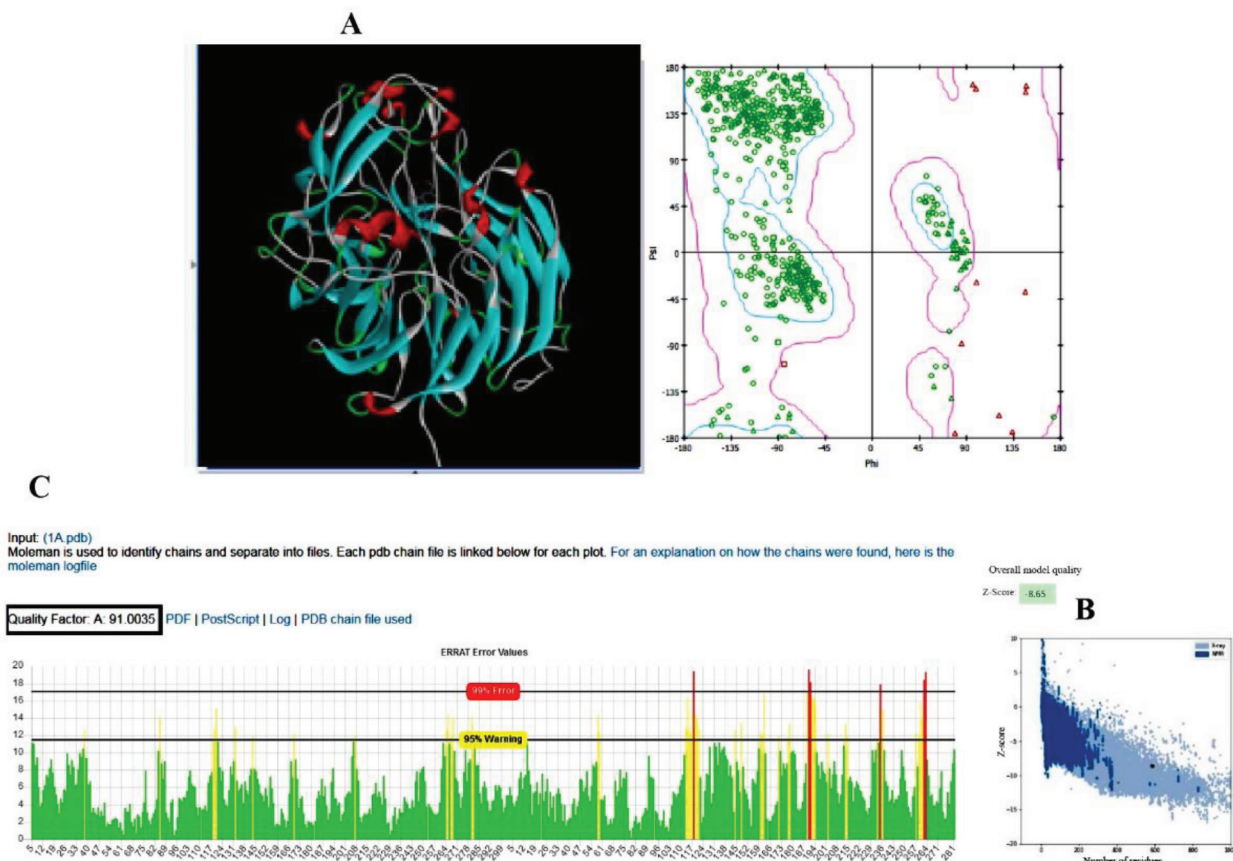
پیش بینی ساختار سوم آنزیم DEP-A و DEP-B سرورهای آنلاین

ساختار سوم آنزیم DEP-A و DEP-B با استفاده از نرم افزار SWISS MODEL پیش بینی شد و اسیدآمینهای از دست رفته از طریق نرم افزار Modeller جایگزین شدند. جهت سنجش میزان دقت و صحت ساختارهای ایجاد شده و گزینش مناسب ترین آنها، بهترین ساختارها در قالب فرمت PDB ذخیره و توسط سرورهای آنلاین (<https://saves.>) SAVES v۶/۰ (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/>) و (<https://prosa.php>) ProSA مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی پایداری ساختار پیش بینی شده آنزیم DEP-A و DEP-B در شرایط دینامیک

شرایط دینامیک

بررسی پایداری ساختار آنزیم DEP-A و DEP-B (ساختارهای مناسب انتخاب شده از مرحله ی قبل) با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) صورت گرفت. شبیه سازی از طریق نرم افزار GROMACS نسخه ۵/۲/۴ با استفاده از میدان نیرو اصلاح شده ی amber ۹۹sb و مولکول های



شکل ۲- A: نمودار رامچاندرا رسم شده از آنزیم DEP-A

B: نمودار Z Score رسم شده از آنزیم DEP-A

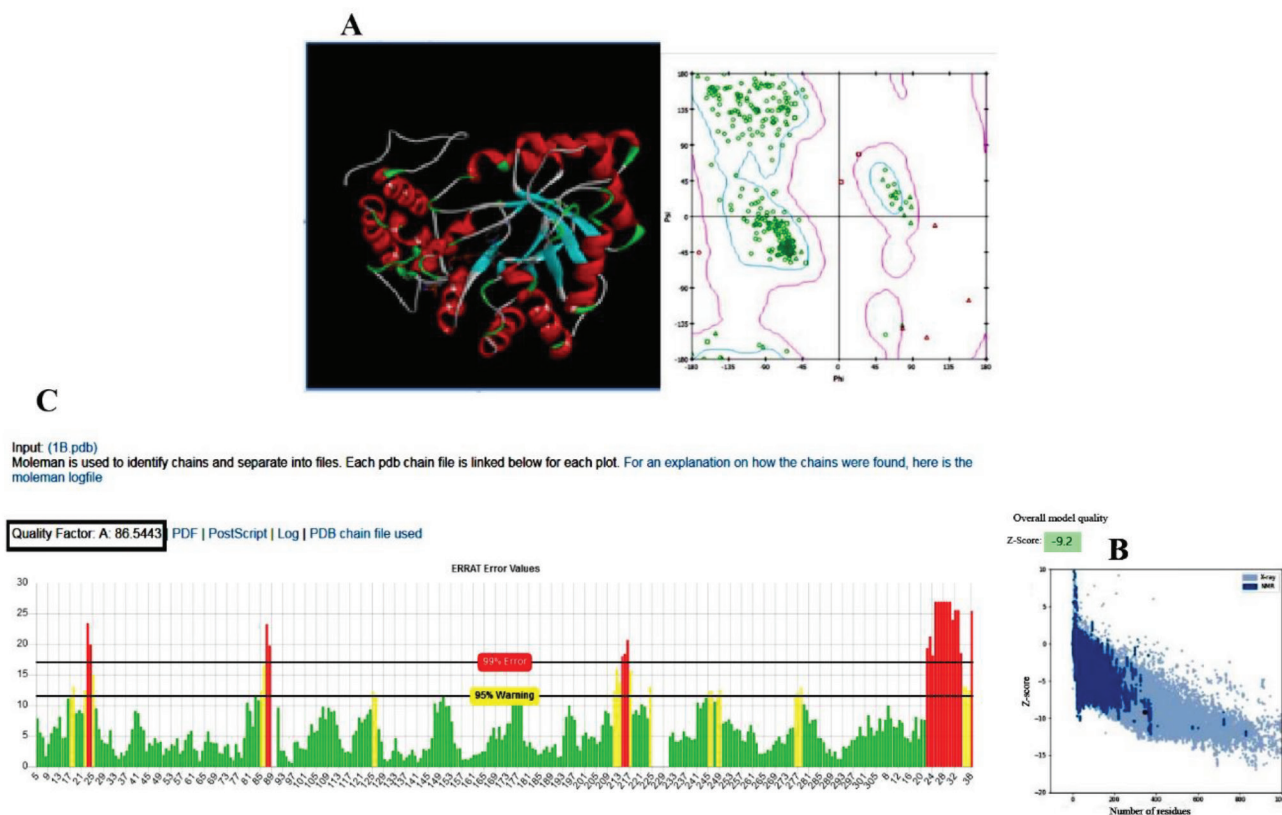
C: نمودار ERRAT رسم شده از آنزیم DEP-A.

آلفا بهتر است که کمتر از ۲ آنگستروم باشد یا شیب نمودار RMSD بهتر است که صفر و یا نزدیک به صفر باشد تا پروتئین مورد نظر به‌عنوان یک ترکیب پایدار در نظر گرفته شود و هرچه نوسانات در طول تراژکتوری در نمودار RMSD و یا شیب این نمودار بیشتر شود ساختار ناپایدارتر خواهد بود و با سرعت بیشتری از هم گسسته خواهد شد (۱۸).

انجام داکینگ مولکولی

برهم کنش بین آنزیم DEP-A و ۱۵ADON، همچنین DEP-B و H-DOCK (http://hdock.phys. ۱۵ADON Oxid آنلاین نرم‌افزار آنلین (/huft.edu.cn) انجام شد که در آن آنزیم به‌عنوان رسپتور و مایکوتوکسین به‌عنوان لیگاند در نظر گرفته شدند (۱۷). ساختارهای مناسب بر اساس کمترین انرژی اتصال و جهت‌یابی صحیح به‌وسیله‌ی نرم‌افزارهای Pymol و (http://www.ebi.ac.uk) PDBsum (به‌منظور مشاهده‌ی پیوندهای هیدروژنی، پس از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی واقع گردیدند.

آب E/SPC۲۱۶ انجام شد. مولکول مورد نظر در فضای مرکزی جعبه مکعبی شبیه‌سازی شده با فاصله ۱ nm از دیواره‌ها و با شرایط periodic boundary قرار داده شد. خنثی‌سازی این سیستم با استفاده از یون‌های سدیم و کلر (براساس شرایط فیزیولوژیکی آنزیم) صورت پذیرفت. انرژی الکترواستاتیک کل هر جعبه تناوبی با استفاده از روش جمع‌بندی (نیروهای الکترواستاتیک و واندرالس) نیز از طریق مدل لنارد-جونز با شعاع قطع ۱۰°A تخمین زده شدند. کاهش انرژی سیستم با استفاده از الگوریتم steepest descent و با استفاده از الگوریتم کولپینگ Berendsen و ترموستات V-rescale انجام شد. کوپل کردن دما (۳۱۰ درجه‌ی کلون) و فشار قبل از انجام شبیه‌سازی اصلی به مدت ۱ ps انجام شد. در نهایت، شبیه‌سازی MD در شرایط مذکور انجام گردید. به‌منظور ارزیابی پایداری ساختار آنزیم پیش‌بینی شده، منحنی RMSD در مقایسه با زمان در طول دوره شبیه‌سازی رسم شدند (۱۸). در واقع نمودار RMSD معیاری برای واگرایی موقعیتی یک یا چند اتم می‌باشد که میانگین فاصله بین اتم‌های پیکره پروتئین‌ها را تفسیر می‌کند. هر چه انحرافات کوچکتر باشد، ساختار پروتئین پایدارتر است (۱۸)؛ به طوری که پیشنهاد می‌شود RMSD کربن



شکل ۳- A: نمودار رامانچاندران رسم شده از آنزیم DEP-B
B: نمودار Z Score رسم شده از آنزیم DEP-B
C: نمودار ERRAT رسم شده از آنزیم DEP-B.

پایگاه داده دارای ساختار کریستالوگرافی هستند؛ ساخته شده است. اگر امتیاز گزارش شده برای پروتئین مورد مطالعه خارج از محدوده مشخصه برای پروتئین‌های وحشی با اندازه مشابه باشد، ساختار احتمالاً دارای خطاهایی است (۱۹). ولی همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود نقطه سیاه در محدوده مجاز این نمودار قرار دارد. بررسی نمودار ERRAT به دست آمده توسط سرور v۶,۰ SAVE که کیفیت پروتئین مورد نظر را نشان می‌دهد، به ترتیب برای DEP-A و DEP-B حدود ۹۱ و ۸۶ درصد می‌باشد. ERRAT یک سرور آنلاین است که ساختار سه‌بعدی پروتئین را بر فرض اتصال هسته‌ای بین اتم‌های مختلف تأیید می‌کند (۳). براساس این سرور شاخص بالاتر از ۸۰ برای آنزیم مورد مطالعه قابل قبول است (شکل‌های ۲ و ۳). در سرور H-DOCK امتیازات اتصال توسط تابع امتیاز دهی مبتنی بر ITScorePP یا ITScorePR محاسبه می‌شود. هر چقدر نمره‌ی اتصال منفی‌تر باشد مدل احتمالی اتصال قوی‌تری خواهد داشت، اما این امتیاز نباید به عنوان تنها معیار اتصال واقعی دو مولکول در نظر گرفته شود؛ زیرا با داده‌های تجربی اعتبارسنجی نشده است. هر چه میزان نمره‌ی اتصال به ۲۰۰- نزدیک‌تر باشد، قدرت اتصال احتمالاً بالاتر است.

نتایج دینامیک مولکولی آنزیم DEP-A و DEP-B

دینامیک مولکولی آنزیم DEP-A و DEP-B توسط نرم‌افزار GROMACS با موفقیت اجرا گردید. خط سیر نمودار RMSD این دو آنزیم نشان داد که ساختار DEP-A در طی ۲۴۰ نانوثانیه و DEP-B در ۴۰ نانوثانیه به پایداری رسیده اند. RMSD برای اندازه‌گیری تفاوت بین کانفورمیشن یک پروتئین از ساختار اولیه تا موقعیت نهایی آن استفاده می‌شود؛ چرا که پایداری پروتئین را می‌توان با نسبت انحرافات تولید شده در طول شبیه‌سازی آن تعیین کرد. همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، آنزیم‌های DEP-A در مدت زمان ابتدای شبیه‌سازی تا ۵۰ نانوثانیه‌ی اول نوسانات شدیدی را نشان داد و سپس با نوسات کمتری همراه بوده و در

نتایج

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم DEP-A

این پروتئین دارای ۵۸۶ اسید آمینه است و ۶۳ کیلوالتون وزن دارد. pH ایزوالکتریک آن در محدوده اسیدی (۴/۶۱) است. بر اساس داده‌های محاسباتی نیمه عمر این پروتئین بیش از ۲۰ ساعت و شاخص ناپایداری حدود ۲۲ است که نشان‌دهنده‌ی پایداری مناسب پروتئین در شرایط آزمایشگاهی در تولید توسط میزبان‌هایی نظیر مخمر است (شکل ۱A).

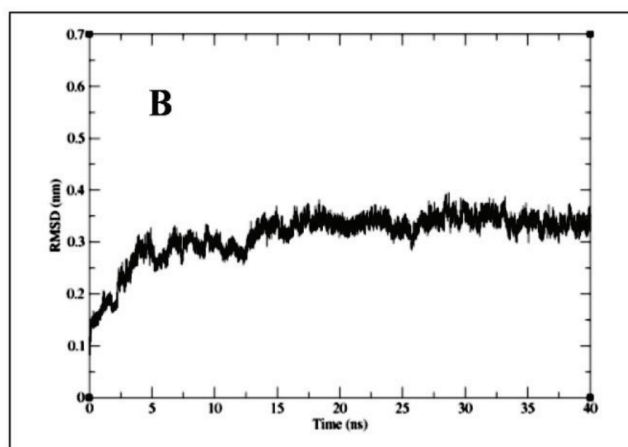
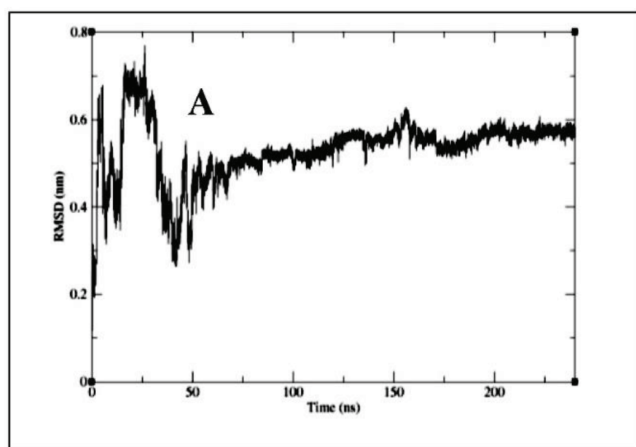
بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم DEP-B

پروتئین DEP-B

این پروتئین دارای ۳۴۳ اسید آمینه است و حدود ۳۸ کیلوالتون وزن دارد. pH ایزوالکتریک آن در محدوده خنثی (۶/۳۴) است. بر اساس داده‌های محاسباتی نیمه عمر این پروتئین در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و شاخص ناپایداری حدود ۳۷ است که نشانگر پایداری نسبتاً خوب در شرایط آزمایشگاهی در تولید توسط میزبان‌های خوراکی نظیر مخمر است (شکل ۱B).

پیش‌بینی و بررسی ساختار سوم آنزیم‌های DEP-A و DEP-B

ساختار سوم پیش‌بینی شده آنزیم‌های DEP-A و DEP-B توسط سرور تحت وب (<https://swissmodel.expasy.org/>) (SWISS-MODEL) با موفقیت پیش‌بینی شد. صحت پیش‌بینی ساختار سوم در چندین گام ارزیابی گردید. بر اساس پلات راماچاندارن، حدود ۸۵ درصد اسیدآمینه‌های ساختارهای DEP-A و DEP-B در ناحیه مطلوب قرار گرفته‌اند که نشان از صحت ساختار سوم پیش‌بینی شده دارد. علاوه بر این، بررسی‌ها از طریق دو سرور آنلاین ProSA و v۵,۰ SAVES نیز انجام گرفت و که مقدار Z-score در نمودار به دست آمده از سرور ProSA به ترتیب برای DEP-A و DEP-B برابر با -۸/۶۵ و -۹/۲ گزارش شد. این نمودار با استفاده از Z-score زنجیره‌های پروتئین‌هایی که در



شکل ۴- نمودار خط سیر RMSD آنزیم (A) DEP A و RMSD آنزیم (B) DEP B مربوط به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

ترتیب ۳/۳ و ۲/۴ صورت گرفته است. در مطالعه‌ی حاضر Asp ۳۱۱، Val ۴۵۳، Leu ۱۳۱، Gln ۱۹۸، Trp ۴۵۴، Phe ۴۱۲، Leu ۵۵۶ و PQQ عمدتاً برهمکنش‌های آبگریز با ۱۵ADON ایجاد کردند (شکل ۷). همچنین نتایج نشان دادند که اتصال عامل O کربن ۳ مایکوتوکسین صورت گرفته است (شکل ۶، جدول ۱). در مطالعه‌ی حاضر Arg ۲۴۴، Trp ۲۰۶، Gln ۱۸۰، Met ۲۱، NADPH عمدتاً برهمکنش‌های آبگریز با ۱۵ADON Oxid ایجاد کردند (شکل ۷).

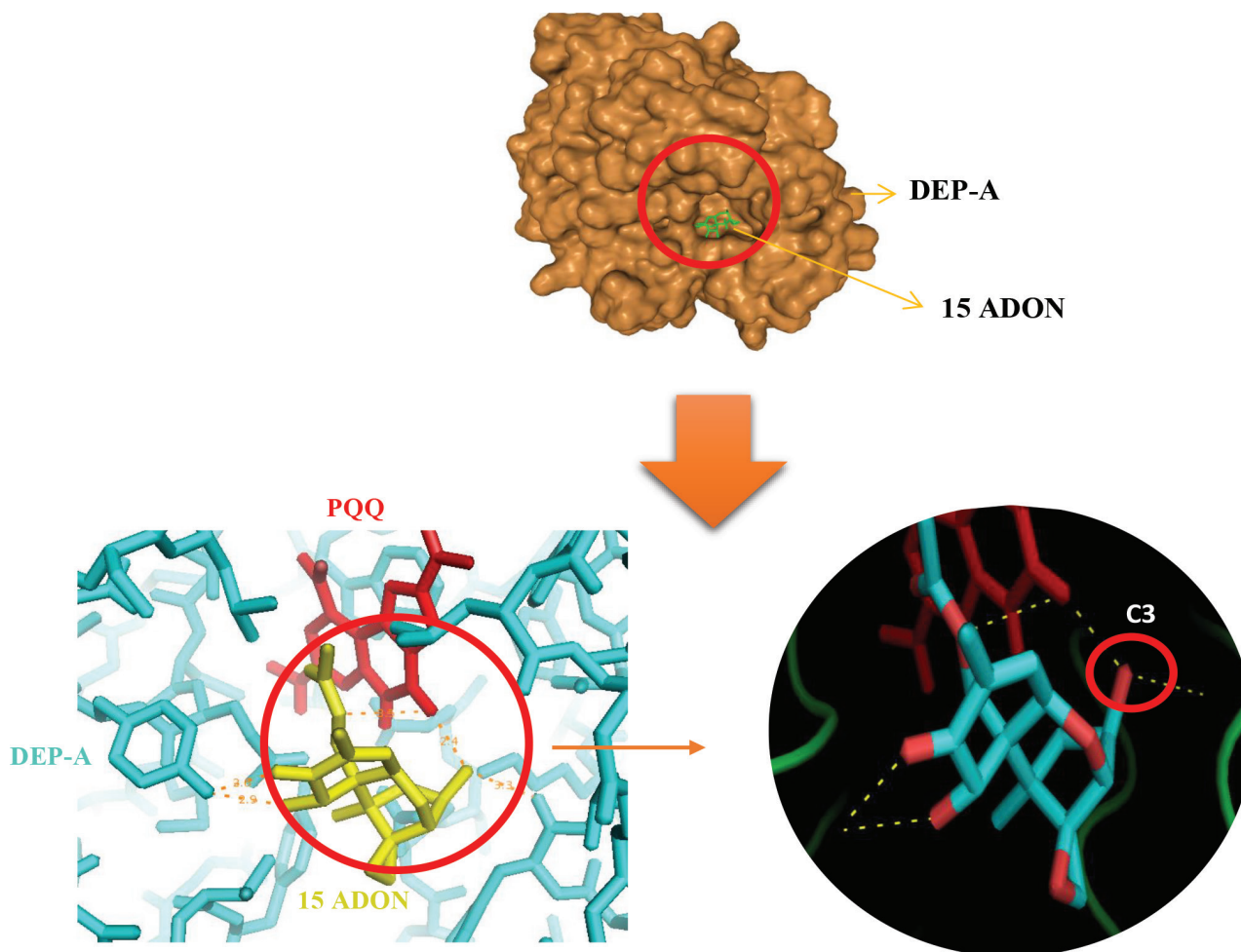
بحث

تریکوتسن‌ها (TCs) از فراوان‌ترین مایکوتوکسین‌های آلوده‌کننده‌ی خوراک دام در مناطق معتدل آمریکا، اروپا و آسیا به شمار می‌روند. انواع مختلفی از تریکوتسن‌ها توسط پاتوژن‌های قارچی ترشح می‌شوند که

نهایت در مدت زمان بین ۲۰۰ تا ۲۴۰ نانوثانیه به کمترین میزان نوسان با میزان RSMD حدود ۰/۵۸ nm رسیده است که نشان از پایداری این آنزیم‌ها در شرایط مورد مطالعه دارد. در ارتباط با آنزیم DEP-B در ابتدای شبیه‌سازی به صورت صعودی بوده و سپس از مدت زمان حدود ۲۰ نانوثانیه تا ۴۰ نانوثانیه روال با نوسانات تقریباً پایدار با میزان RSMD حدود ۰/۳۵ nm همراه بوده است.

داکینگ مولکولی

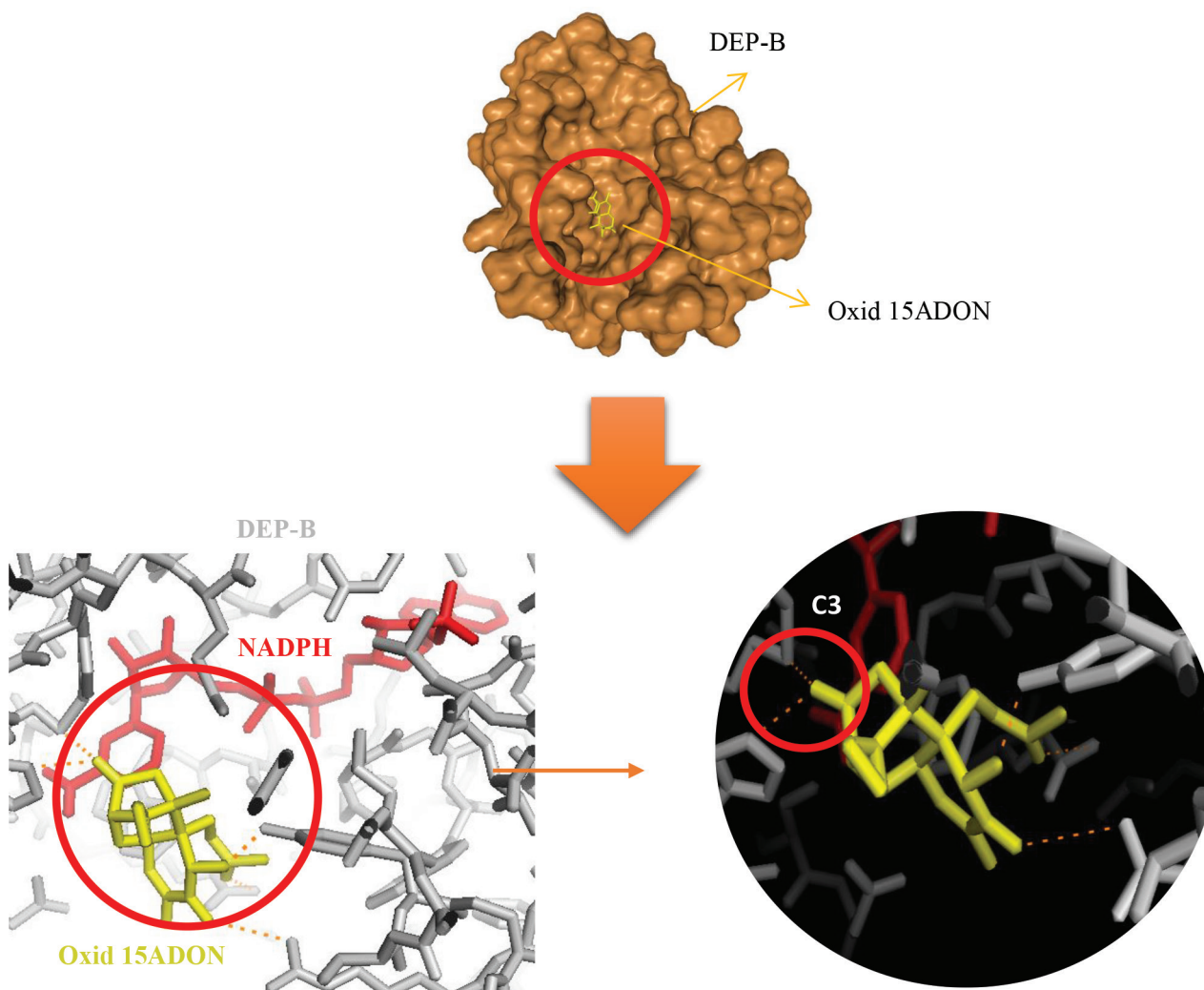
نتایج مربوط به داکینگ مولکولی آنزیم DEP-A با ۱۵ADON در شکل (۵) نشانگر این موضوع است که این آنزیم در موقعیت مناسب در اتصال با مایکوتوکسین قرار دارد (جدول ۱). نتایج نشان داد که اتصال کربن ۳ مایکوتوکسین ۱۵ADON به آنزیم DEP-A از طریق ایجاد دو پیوند با Phe ۴۱۲ و PQQ (کوفکتور آنزیم DEP-A) با انرژی‌های اتصال به



شکل ۵- نتایج مربوط به داکینگ مولکولی آنزیم DEP-A با مایکوتوکسین ۱۵ADON توسط سرور آنلاین DOCK-H. (نقطه چین‌ها پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهند و C۳ موقعیت کربن شماره ۳ از ساختار ۱۵ADON را به عنوان جایگاه فعال این مایکوتوکسین نشان می‌دهد).

شامل: تیپ A (سم ۲-T و ۲-HT) و تیپ B (دی اکسی نیوالنول، نیوالنول و مشتقات آنها) می‌باشند. در میان آنها، مایکوتوکسین نوع B، به ویژه دی اکسی نیوالنول (DON) رایج‌ترین مایکوتوکسین آلوده‌کننده ی غلات در سراسر جهان است که سلامت انسان و بهره‌وری حیوانات مزرعه را دچار مشکل می‌کند. یکی از مشکلاتی که در ارتباط با تریکوتسن‌ها وجود دارد این است که روش‌های رایج مهار مایکوتوکسین‌ها نظیر جاذب‌ها برای آنها کارآمد نیست؛ لذا یافتن روش‌های جدید و نوین جهت حذف این ترکیبات از خوراک حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از آنزیم‌ها یکی از راه‌کارهای کنترل مایکوتوکسین‌هایی نظیر DON می‌باشد؛ اما تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با تاثیر این آنزیم‌ها بر کموتایپ‌های آن گزارش نشده است. در این مطالعه با روش بیوانفورماتیک نشان داده شد که آنزیم

DEP-A (PQQ دهیدروژناز) و DEP-B ممکن است بر روی کموتایپ DON ۱۵A اثر گذار باشند. تاکنون مطالعات بسیار اندکی در ارتباط با بررسی بیوانفورماتیک این دو آنزیم صورت گرفته است. هی و همکاران (۱۱) اتصال مولکولی DON را بر روی ساختار کریستالی DEP-A (حاصل از باکتری دووسیا موتانت) نشان دادند. نتایج این محققین نشان داد که به طرز چشمگیری DON از جایگاه فعال آنزیم فاصله دارد و علیرغم وجود انرژی آزاد کم اتصال، کاتالیز را تقریباً غیرممکن می‌کند (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط یانگ و همکاران (۲۶) انجام شد جایگاه فعال آنزیم DEP-A (با منشا پکتربایی ترشح شده از باکتری دووسیا آلبوگیلوا) شناسایی شد که احتمالاً در اتصال و کاتالیز DON دخیل هستند. به طور کلی، این محققین اظهار داشتند که داکینگ مولکولی DON با



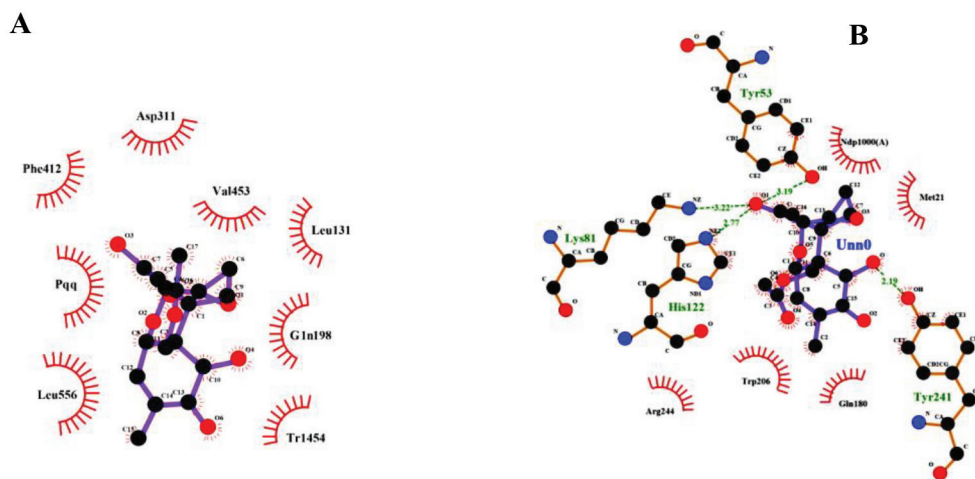
شکل ۶- نتایج مربوط به داکینگ مولکولی آنزیم DEP-B با حد واسط Oxid 15ADON توسط سرور آنلاین DOCK. H. نقطه چین‌ها پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهند و C۳ موقعیت کربن شماره ۳ از ساختار Oxid 15ADON را به عنوان جایگاه فعال این مایکوتوکسین نشان می‌دهد.

DEP-A برای تسهیل اتصال مورد نیاز است. در مطالعه‌ی یانگ و همکاران (۲۶)، اسیدآمین‌های درگیر در پیوند هیدروفوبیک شامل Asp، Leu و Phe بود که هم راستا با مطالعه‌ی حاضر می‌باشد و Phe جز اسیدآمین‌های مشترک مطالعه‌ی حاضر با یانگ و همکاران می‌باشد. همچنین؛ فرحانا و همکاران (۱۰) نشان دادند که آنزیم‌های خانواده‌ی دهیدروژناز دارای جایگاه فعال شامل اسیدآمین‌هایی همچون His و Arg، Thr، Arg و Asp بوده که نقش مهمی را در فعالیت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها بازی می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر نیز Asp نیز در اتصالات مربوط به جایگاه فعال دخیل

ساختار کریستالی DEP-A با کمترین انرژی اتصال (۶٫۵۶- کیلوکالری در مول) انجام شد. نشان داده شد که گروه هیدروکسیل در C^۳ مربوط به سمیت DON نزدیک به PQQ و Ca^{۲+} قرار دارد، در حالی که دو گروه هیدروکسیل نامرتب دیگر نسبتاً با فاصله هستند؛ که با این واقعیت مطابقت دارد که فقط گروه هیدروکسیل در موقعیت C^۳ تبدیل می‌شود و قابلیت اطمینان نتایج اتصال را افزایش می‌دهد که مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاصل است. از آنجایی که DON دارای جرم مولکولی زیاد و ساختار چند حلقه‌ای است، برهمکنش‌های دیگر نظیر هیدروفوبیک با

جدول ۱- پیوندهای هیدروژنی درگیر در داکینگ مولکولی DEP-A و DEP-B با سوپستراهای مورد مطالعه.

انرژی اتصال	اسید آمینه های درگیر	طول پیوند (آنگستروم)	تعداد پیوند
	DEP-A		
-۱۵۷/۹۰	Tyr ^{۱۹۹}	۲/۶، ۲/۹	۲
	Phe ^{۴۱۲}	۳/۳	۱
	PQQ	۲/۴، ۳/۵	۲
	DEP-B		
-۱۴۱/۷۸	Arg ^{۲۴۴}	۳/۵	۱
	Tyr ^{۲۴۱}	۲/۲	۱
	Lys ^{۸۱}	۳/۲	۱
	His ^{۱۲۲}	۲/۸	۱
	Gln ^{۱۹۰}	۳/۲	۱



شکل ۷- نتایج مربوط به پیوند هیدروفوبیک حاصل از داکینگ مولکولی آنزیم A (DEP A) و B (DEP B) با مایکوتوکسین ۱۵ADON و ۱۵ADON Oxide (نیم دایره های قرمز رنگ نشان دهنده ی پیوندهای هیدروفوبیک می باشند).

می باشد. یانگ و همکاران (۲۶) گزارش کردند که Tyr^{۱۹۲} و Phe^{۵۵۳} نزدیک به DON اما دور از PQQ هستند و جهش در این دو آمینواسید منجر به کاهش فعالیت آنزیم شد؛ به ویژه Tyr^{۱۹۲}، که با تغییر این آمینواسید توانایی اکسیداسیون DON توسط آنزیم از بین رفت که نشان می دهد این دو اسیدآمینو احتمالاً در تعامل با DON بوده و به فعالیت DEP-A کمک می کنند. در مطالعه‌ی حاضر نیز ۱۵ADON به دو اسیدآمینوی PHE و TYR در محدوده‌ی نزدیک به نواحی گزارش شده پیوند برقرار کرده است که می تواند نشان از موثر بودن این آنزیم بر این کموتایپ داشته باشد.

یانگ و همکاران (۲۶) اتصال مولکولی و مکانیسم انتقال الکترون را پیشنهاد کردند که در آن Asp^{۳۰۴} به عنوان پایه کاتالیزوری شرکت می کند. رزیوم و همکاران (۲۲) نیز گزارش کردند Asp^{۳۳۳} به عنوان پایه کاتالیزوری در آنزیم دهیدروژناز وابسته به PQQ گزارش کردند. در مطالعه‌ی حاضر نیز Asp^{۳۱۱} در این موقعیت قرار دارد. مطالعات نشان دادند که PQQ می تواند پذیرش و انتقال پروتون‌ها را از طریق تغییر حالت‌های اکسیداسیون و احیا انجام دهد و در نتیجه به اکسیداسیون سوبسترا کمک کند. در این فرآیند، پیوندهای دی سولفیدی حفظ شده، پل‌های غمکی و هم‌سی ممکن است در انتقال پروتون‌ها دخیل باشند. علاوه بر این، Glu^{۱۷۱} یا Arg^{۲۹۱} به عنوان پایه کاتالیزوری برای تأثیرگذاری بر کل واکنش در دهیدروژنازهای وابسته به PQQ نوع I عمل می کند. در مطالعه‌ی حاضر، DEP-A حاوی گروه هم‌سی یا دو اسیدآمینوی سیستئین و گروه Glu^{۱۷۱} حفظ شده نیست. در عوض، Gln^{۱۹۸} اسیدآمینوی است که معادل Glu^{۱۷۱} بوده و به عنوان رابط اتصال بین PQQ و Ca^{۲+} در نظر گرفته می شود. مشابه با مطالعه‌ی حاضر نیز یانگ و همکاران (۲۶) Gln^{۱۹۱} را در آنزیم DEP-A (ترشح شده از باکتری دوسیا آلبوگیلوا) به عنوان رابط بین PQQ و Ca^{۲+} در نظر گرفتند.

نتیجه گیری کلی

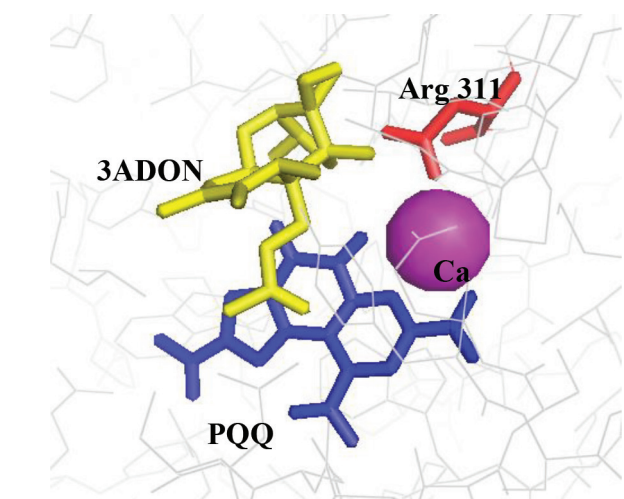
نتایج نشان داد که آنزیم DEP-A و DEP-B علاوه بر تأثیر پذیری که بر روی مایکوتوکسین DON دارند، می توانند بر روی کموتایپ‌های آن نظیر ۱۵ADON با انرژی اتصال نسبتاً قوی (به ترتیب ۱۵۷/۹۰- و ۱۴۱/۷۸-) متصل شوند. هر چند اثبات این ادعا نیازمند بررسی‌های آزمایشگاهی در آینده است. امید است در آینده از این قبیل آنزیم‌ها در صنعت دامپروری به عنوان ترکیبات ضد مایکوتوکسینی به منظور حفظ سلامت جامعه با حداقل اثرات مضر بهره برد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد با گرنت شماره ۳/۴۹۵۴۹ انجام شد.

پاورقی‌ها

- 1- 3- acetyl-deoxynivalenol.
- 2- 15-acetyl-deoxynivalenol.
- 3- Fusarium graminearum.
- 4 - Nocardiooides WSN05-2.
- 5- Devosia mutans 17-2-E-8.
- 6- Backbone.



شکل ۸- Arg^{۳۱۱} به عنوان رابط بین ۱۵ADON و PQQ پس از داکینگ مولکولی با آنزیم DEP A.

12. Ikunaga, Y., Sato, I., Grond, S., Numaziri, N., Yoshida, S., Yamaya, H., ... & Ito, M. (2011). *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(2), 419-427.
13. Javadmanesh, A., Mohammadi, E., Mousavi, Z., Azghandi, M., & Tanhaeian, A. (2021). Antibacterial effects assessment on some livestock pathogens, thermal stability and proposing a probable reason for different levels of activity of thanatin. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
14. Kratzer, R., Kavanagh, K. L., Wilson, D. K., & Nidetzky, B. (2004). Studies of the enzymic mechanism of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR 2B5): X-ray structure and catalytic reaction profile for the H113A mutant. *Biochemistry*, 43(17), 4944-4954.
15. Liu, M., Zhao, L., Gong, G., Zhang, L., Shi, L., Dai, J., ... & Sun, L. (2022). Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 1-16.
16. Mousavi, S. Z., Kazemi, S. A., Mahroughi, M., & Tanhaeian, A. (2021). Evaluation of antibacterial activity and toxicity of enterocin P peptide and two essential oils against animal pathogens. *Veterinary Researches & Biological Products*, 34(3), 48-54. doi: 10.22092/vj.2020.342383.1707.
17. Mousavi, S.Z. and Javadmanesh, A., 2022, February. Molecular docking of Enterocin-P peptide with DNA: an in silico study. In *The 1st International and the 10th National Iranian Conference on Bioinformatics*.
18. Mousavi, Z., Rashidian, Z., Zeraatpisheh, Y., & Javadmanesh, A. (2022). Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing *E. coli* antigen in cattle. *Veterinary Researches and Biological Products*. 137: 115-123.
19. Nemaish, V., & Luthra, P. M. (2017). Computational analysis revealing that K634 and T681 mutations modulate the 3D-structure of PDGFR- β and lead to sunitinib resistance. *RSC advances*, 7(60), 37612-37626.
20. Qiu, T., Wang, H., Yang, Y., Yu, J., Ji, J., Sun, J., ... & Sun, X. (2021). Exploration of biodegradation mechanism by AFB1-degrading strain *Aspergillus niger* FS10 and its metabolic feedback. *Food Control*, 121, 107609.
21. Roshanak, S., Yarabbi, H., Shahidi, F., Tabatabaei Yazdi, F., Movaffagh, J. and Javadmanesh, A., 2023. Effects of adding poly-histidine tag on stability, antimicrobial activity and safety of recombinant buforin I expressed in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 13(1), p.5508.
22. Rozeboom, H. J., Yu, S., Mikkelsen, R., Nikolaev, I., Mulder, 7- Trajectory.
- 8- *Devosia albogilva*.

منابع مورد استفاده

1. Abraham, N., Schroeter, K. L., Zhu, Y., Chan, J., Evans, N., Kimber, M. S., ... & Seah, S. Y. (2022). Structure-Function characterization of an aldo-keto reductase involved in detoxification of the mycotoxin, deoxynivalenol.
2. Alizadeh, A., Braber, S., Akbari, P., Kraneveld, A., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2016). Deoxynivalenol and its modified forms: are there major differences?. *Toxins*, 8(11), 334.
3. Beg, M., Thakur, S. C., & Meena, L. S. (2018). Structural prediction and mutational analysis of Rv3906c gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv to determine its essentiality in survival. *Advances in Bioinformatics*, 2018.
4. Carere, J., Hassan, Y. I., Lepp, D., & Zhou, T. (2017). The enzymatic detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol: identification of DEP-A from the DON epimerization pathway. *Microbial Biotechnology*, 11(6), 1106-1111.
5. Carere, J., Hassan, Y.I., Lepp, D. and Zhou, T., 2018. The identification of DepB: an enzyme responsible for the final detoxification step in the deoxynivalenol epimerization pathway in *Devosia mutans* 17-2-E-8. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.1573.
6. Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2020). In vitro detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(1), 289-301.
7. Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1-3), 19-28.
8. Fang, Q. A., Du, M., Chen, J., Liu, T., Zheng, Y., Liao, Z., ... & Wang, J. (2020). Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by tea-derived *Aspergillus niger* RAF106. *Toxins*, 12(12), 777.
9. Farhana, A., & Lappin, S. L. (2022). *Biochemistry*, lactate dehydrogenase. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
10. He, J. W., Bondy, G. S., Zhou, T., Caldwell, D., Boland, G. J., & Scott, P. M. (2015). Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol-transformation product by *Devosia mutans* 17-2-E-8. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 250-259.
11. He, W. J., Shi, M. M., Yang, P., Huang, T., Zhao, Y., Wu, A. B., ... & Liao, Y. C. (2020). A quinone-dependent dehydrogenase and two NADPH-dependent aldo/keto reductases detoxify deoxynivalenol in wheat via epimerization in a *Devosia* strain. *Food chemistry*, 321, 126703.

- H. J., & Dijkstra, B. W. (2015). Crystal structure of quinone-dependent alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoketogenes*. A versatile dehydrogenase oxidizing alcohols and carbohydrates. *Protein Science*, 24(12), 2044-2054.
23. Sherif, S. O., Salama, E. E., & Abdel-Wahhab, M. A. (2009). Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *International journal of hygiene and environmental health*, 212(4), 347-368.
24. Vidal, L. S., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T. (2018). Review of NAD (P) H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866(2), 327-347.
25. Yan, P., Liu, Z., Liu, S., Yao, L., Liu, Y., Wu, Y., & Gong, Z. (2020). Natural occurrence of deoxynivalenol and its acetylated derivatives in Chinese maize and wheat collected in 2017. *Toxins*, 12(3), 200.
26. Yang, H., Yan, R., Li, Y., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., ... & Chen, M. (2022). Structure-Function Analysis of a Quinone-Dependent Dehydrogenase Capable of Deoxynivalenol Detoxification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

