Journal of Microbial World
Volume 13, No. 1, April 2020

Original Article

Modeling and determining the structures and characteristics of cytochrome P450 enzymes in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

Maryam Rashki[1] and Mojtaba Mortazavi[2]

[1]Assistant professor, Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, 7631818356. [2]Assistant professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Cytochrome P450 enzymes are a large family of proteins containing haem and play an important role in metabolism of various compounds. Entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* also contains these enzymes for targeting insect alkanes. The aim of this study was to investigate the properties and protein structure of seven cytochrome P 450 enzymes in this fungus and to predict the three-dimensional structure of these enzymes by homology modeling method.

Materials & Methods: Predicting possible situations with intracellular helices was performed with the TMHMM program. SignalP4.1 program was used to predict the probability of the presence and location of shear sites of signal peptides in amino acid sequences. Some of the physical and chemical parameters of the proteins were performed with the ProtParam program. The modeling was conducted in the Modebase database.

Results: In all sequences, a motif was identified and had about 200 amino acids that were related to P450. The motif was in the sequence of 96-45 to about 477-520. CYP539B5 and CYP52G11 proteins were stable. CYP584Q1 had the highest and CYP617N1 had the lowest hydrophilic acid of all. Among the selected models, the model with lowest e-value and the highest coverage was selected as the best model. CYP5337A1 and CYP52G11 lacked helix and CYP617N1 had two helices. Number of estimated amino acids in the helices, in all cases except CYP584Q1, CYP5337A1 and CYP52G11, was greater than 18. No signal peptide was detected.

Conclusion: In this study, the modeled structures of seven cytochrome P450 enzymes were reported for the first time in the fungus *B. bassiana*. The enzymes' stability and their resistance to adverse environmental factors such as temperature and UV can increase the fungal pathogenicity against the pests.

Keywords: *Beauveria bassiana,* Cytochrome P450, three-dimensional structure, motif, homology.

Correspondence to: Maryam Rashki

Tel: +98 3433776611

E-mail: ma_rashkigh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 47-57.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره اول (پیاپی ۴۲) بهار ۱۳۹۹
صفحات ۵۷-۴۷

Original Article

مدل سازی و تعیین ساختار و ویژگی‌های آنزیم‌های سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا*

مریم راشکی[1*] و مجتبی مرتضوی[2]

[1]استادیار، گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، [2]استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان.

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌های سیتوکروم P450 خانواده بزرگی از پروتین‌های دارای آهن هستند و نقش مهمی در متابولیسم ترکیبات مختلف دارند. قارچ بیمارگر حشرات، *بووریا بازیانا* نیز حاوی این آنزیم‌ها برای هدف‌گیری آلکان‌ها در حشرات است. هدف از این پژوهش، بررسی ویژگی‌ها و ساختار پروتینی هفت آنزیم سیتوکروم P450 در این قارچ و پیش‌بینی ساختار سه بعدی این آنزیم‌ها با روش مدلسازی هومولوژی بود.

مواد و روش‌ها: برای پیش‌بینی احتمال حضور و موقعیت سایت‌های برشی پپتیدهای سیگنال در توالی‌های اسیدآمینه از برنامه SignalP4.1 استفاده شد. برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی پروتین‌های مورد نظر با برنامه ProtParam و مدل سازی در پایگاه Modebase انجام شد.

یافته‌ها: در تمامی توالی‌ها یک ناحیهٔ حفاظت‌شده با حدود ۲۰۰ اسیدآمینه مرتبط با P450 شناسایی شد. این ناحیهٔ حفاظت‌شده در توالی ۴۵-۹۶ تا حدود ۴۷۷-۵۲۰ قرار داشت. پروتئین‌های CYP539B5 و CYP52G11 پایدارند. CYP584Q1 بیشترین و CYP617N1 کمترین میزان اسیدآمینه آب دوست را داشت. از بین مدل های انتخاب شده مدلی که دارای کمترین ارزش e و بالاترین پوشش بود، به عنوان بهترین مدل انتخاب شد. CYP5337A1 و CYP52G11 فاقد مارپیچ و CYP617N1 دارای دو مارپیچ بود. تعداد اسیدهای‌آمینه تخمین‌زده‌شده در مارپیچ، در تمام موارد به جز CYP584Q1، CYP5337A1 و CYP52G11 بیشتر از ۱۸ بود. اما هیچ سیگنال پپتیدی شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق، برای اولین بار ساختارهای سه بعدی هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *بووریا بازیانا* مدل سازی شد. پایداری آنزیم‌ها و مقاومت آن‌ها در مقابل عوامل نامطلوب محیطی مانند دما و اشعهٔ ماورای بنفش می‌تواند میزان بیمارگری قارچ را علیه آفات افزایش دهد.

واژگان کلیدی: بووریا بازیانا، سیتوکروم P450، ساختار سه بعدی، توالی حفاظت شده، همولوژی.

دریافت مقاله: دی ۹۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۹۸

مقدمه

قارچ بیمارگر حشرات، *بووریا بازیانا* (*Beauveria bassiana*) دارای زندگی فرصت طلب با دو روش بیمارگری و گندخواری است. بدیهی است که این انعطاف‌پذیری به دلیل بیان افتراقی ژن در پاسخ به محیط اطراف می‌باشد. بیان ژن در این قارچ در

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، گروه تنوع زیستی.
تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱ پست الکترونیک: ma_rashkigh@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

پاسخ به کوتیکول‌های مختلف حشرات تغییر می‌کند. این ژن‌ها دارای نقش‌های مختلف هستند و طبیعت عمومی‌خواری این قارچ را با نفوذ به داخل کوتیکول بسیاری ازحشرات مختلف شکل می‌دهند (۱). محصولات تولید شده براساس *بووریا بازیانا* و *متاریزیوم آنیزوپلیه* (*Metarhizium anisopliae*) با ۳۳/۹ درصد، بیشترین حشره‌کش‌ها و کنه‌کش‌های قارچی را تشکیل می‌دهند (۲). قارچ *بووریا بازیانا* به طور طبیعی در بیش از ۷۰۰ گونه میزبان یافت شده است. آفات هدف این قارچ شامل ساقه خوار آسیایی و اروپایی ذرت، سفید بالک‌ها، تریپس‌ها، شته‌ها و شپشک‌های آردآلود روی گیاهان ذرت، سبزیجات و گیاهان زینتی هستند (۳). آنزیم‌های سیتوکروم P450 خانواده بزرگی از پروتین‌های دارای آهن را تشکیل‌می‌دهند که در شکل‌های مختلف زندگی شامل پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها پخش شده اند. این آنزیم‌ها نقش مهمی در متابولیسم ترکیبات مختلف و تغییر کاتالیز دامنهٔ وسیعی از ترکیبات چربی‌دوست بازی می‌کنند. قارچ بیمارگر حشرات، *بووریا بازیانا* حاوی یک سری از این آنزیم‌ها برای هدف‌گیری لیپیدهای حشرات میزبان است. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها، نشان دهندهٔ القای افتراقی آن‌ها بوسیلهٔ زنجیرهٔ بلند آلکان و لیپیدهای حشرات است و هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات، *بووریا بازیانا* جدایه ATCC90517 با کدهای GU566074، GU566075، GU566076، GU566077، GU566078، GU566079 و GU566080 در پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ثبت شده‌اند (٤). به طورکلی، هرکدام از پروتین‌های CYP450 دارای یک گروه پروتوپورفیرین (protoporphyrin) دارای آهن می‌باشد. گروه پروستتیک با داشتن آهن، این خانواده را به آنزیم‌های مونواکسیژناز تبدیل کرده است. ساختار این آنزیم‌ها از سه ناحیه تشکیل شده است. ناحیه انتهای آمینی پروتین که آب‌گریز و دارای یک توالی است که به درون غشا نفوذ می کند. همچنین، در این ناحیه یک توالی متوقف کننده انتقال وجود دارد که مانند یک لنگر درون غشا عمل کرده و جهت‌یابی توپولوژیکی سیتوکروم P450 را تعیین می‌کند (۵). پس از این ناحیهٔ آب‌گریز، یک ناحیه لولامانند غنی از پرولین وجود دارد. قسمت انتهای کربوکسیلی سیتوکروم P450 از یک ساختار مرکزی حفاظت شده تشکیل شده که از تعدادی مارپیچ آلفا و صفحات بتا و یک ناحیه پیچیده تشکیل شده است و برای جهت‌یابی مناسب ساختار گروه پروستتیک ضروری است (۵). از نظر توالی آمینواسیدی، پروتئین‌های CYP450 یک ناحیهٔ حفاظت‌شده پپتیدی در نزدیکی انتهای کربوکسیل دارند که بیشترین خاصیت آنزیم‌های P450 به این ناحیه حفاظت‌شده مربوط می‌شود. این سیستئین در نزدیک بسته متصل به سوبسترا قرار گرفته است و در انتقال یک اتم اکسیژن اتمسفری به سوبسترا نقش دارد (٦). مطالعات بسیار کمی در رابطه با خصوصیات مولکولی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و توپولوژی آنزیم‌های سیتوکروم P450 قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* صورت گرفته است. همچنین، باتوجه به این که تاکنون ساختار سه بعدی برای هفت آنزیم یادشده در پایگاه بانک داده‌های پروتینی گزارش نشده است. بدین منظور، از نرم‌افزارهای مختلف و پایگاه های اطلاعاتی محاسبه ای مانند مدبیس (Modebase) برای مدل سازی استفاده شد. با این روش پیوندهای اسیدهای‌آمینهٔ کلیدی و ساختار سه بعدی جایگاه فعال تعیین شد. اهمیت این داده‌ها در این است که با مهندسی آنزیم امکان افزایش میزان بیمارگری قارچ وجود خواهد داشت؛ همچنین، پیش‌بینی ساختار سه بعدی آنزیم‌های سیتوکروم P450 قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* منبع مهم اطلاعاتی برای درک بهتر عملکرد آن، برهم کنش آن با اجزای دیگر (لیگاندها، پروتئین و DNA) و فهم اثرات فنوتیپیکی جهش ها برای پژوهش‌های بعدی خواهد بود. هدف از این پژوهش، بررسی ویژگی‌ها و ساختار پروتینی هفت آنزیم سیتوکروم P450 قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* و پیش‌بینی ساختار سه بعدی این آنزیم‌ها با روش مدل سازی هومولوژی بود.

مواد و روش‌ها

الف) انتخاب داده‌ها و بررسی توالی پروتین‌های آنزیم سیتوکرم P450 *قارچ بیمارگر بووریا بازیانا*: ابتدا کدهای مربوط به هفت

آنزیم مختلف سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* سویه ATCC90517 مشخص شدند (٤) و با مراجعه به پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، توالی ژن‌های مربوط به هر آنزیم جستجو و پس از مرتب کردن، به شکل فستا (FASTA) ذخیره شدند (جدول ۱). حفاظت شده‌ترین توالی ژنی P450 در قارچ‌ها با نام CYP51F1 مربوط به مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) (با کد U10555) به‌عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت.

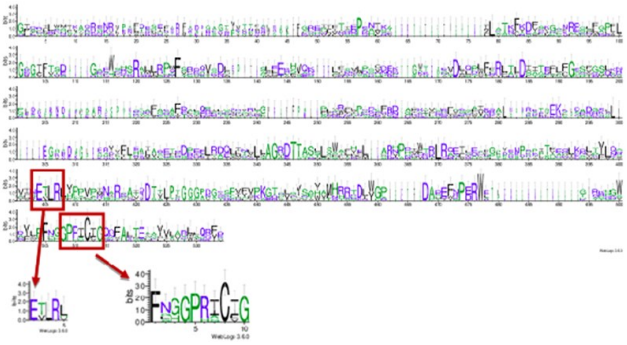
ب) بررسی ویژگی‌ها و ساختار پروتینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 قارچ بیمارگر بووریا بازیانا: برای مشاهده موقعیت نواحی حفاظت شده در هر توالی پروتئینی، از سایت جستجوی موتیف (MOTIF Search) استفاده شد. برنامه موجود در این سایت با استفاده از پایگاه داده PFAM به یافتن و بررسی نواحی حفاظت شده روی پروتئین‌ها می‌پردازد. سپس نواحی حفاظت شده با جزئیات بیشتر با برنامه وبلوگو نسخه ۲.۸.۲ (Weblogo.v.2.8.2) (۷) بررسی و به تصویر کشیده شدند. برای پیش‌بینی موقعیت‌های احتمالی دارای مارپیچ‌های درون‌غشایی در ساختارهای پروتینی مورد نظر از برنامه TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) استفاده شد. این برنامه از مدل هیدن مارکف (hidden Markov) برای یافتن مارپیچ‌ها استفاده می‌کند. بر اساس دستورالعمل برنامه در صورتی که تعداد اسیدهای آمینه تخمین‌زده شده (ExpAA) در مارپیچ بیشتر از ۱۸ باشد احتمال وجود یک پروتین درون غشایی افزایش می‌یابد (۸ و ۹). در ادامه، برای پیش‌بینی احتمال حضور و موقعیت سایت‌های برشی پپتیدهای سیگنال در توالی‌های اسیدآمینه از برنامه سیگنال P نسخهٔ ٤.١ (SignalP4.1) (۱۰) استفاده شد. در این برنامه با توجه به ماهیت ارگانیسم بکار رفته در قسمت گروه ارگانیسم، گزینه یوکاریوت انتخاب شد. برنامه مورد نظر وجود پپتید سیگنال را با محاسبه شاخص D (D-score) در موقعیتی با بیشترین احتمال حضور محاسبه می‌کند. برای بررسی برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی پروتین‌های مورد نظر از برنامه پروت پارام (ProtParam) استفاده شد (۱۱).

ج) مدل سازی آنزیم‌های سیتوکرم P450 قارچ بیمارگر بووریا بازیانا بر پایه همولوژی: به منظور مدلسازی پروتین‌های مورد بررسی از پایگاه مدبیس https://modbase.compbio.ucsf.edu) استفاده شد (۱۲). در پایگاه یادشده با استفاده از برنامه مدلسازی مدپایپ (ModePipe) توالی‌های مورد بررسی با پروتین‌های دارای ساختار سه بعدی در پایگاه بانک داده‌های پروتینی مقایسه شدند. این ساختارها دارای کیفیت بالا و حاصل روش کریستالوگرافی یا رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (Nuclear magnetic resonance) بودند. در نهایت، مدل با کمترین ارزش e (e-value) و بالاترین پوشش به عنوان بهترین مدل برای هر پروتین انتخاب شد. برای بررسی کیفیت مدل‌های پیش‌بینی شده از دو روش استفاده شد. در ابتدا نمودار راماچاندران با برنامه SwissPDB viewer برای نشان دادن دامنه اندازه زاویه‌های دهیدرال اسیدهای آمینه رسم شد (۱۳). سپس برای یافتن خطاهای احتمالی در مدل‌های موجود از برنامه ProSAاستفاده شد و نمودار انرژی مربوط به مدل‌ها نیز رسم شد (١٤ و ١٥). تعداد مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا در مدل‌های پیش‌بینی‌شده پس از به تصویر کشیده شدن با برنامه Stride Web interface شمارش شد.

نتایج

الف) بررسی ویژگی‌ها و ساختار پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 قارچ بیمارگر بووریا بازیانا: نتایج حاصل از بررسی موقعیت دقیق نواحی حفاظت شده با برنامه موتیف سرچ در جدول ۲ آورده شده است. تمامی توالی‌های مورد بررسی یک ناحیهٔ حفظ شده با حدود ۲۰۰ اسیدآمینه مرتبط با P450 دارند. این ناحیهٔ حفظ شده در توالی ٤٥–٩٦ تا حدود ٤٧٧–٥٢٠ قرار داشت. نواحی حفاظت شده با برنامه وبلوگو نسخهٔ ۲.۸.۲ نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). دو ناحیهٔ حفاظت شده FXXGXRXCXG (CXG) در ناحیهٔ متصل شده به آهن و EXXR در مارپیچ K (K-helix) قابل شناسایی بود (شکل ۱). ناحیهٔ حفاظت‌شدهٔ CXG دارای ۱۰ اسید آمینه و ناحیهٔ EXXR دارای سه اسید آمینه است.

بر اساس نتایج حاصل، تعداد مارپیچ‌ها در توالی های مختلف از ۰ تا ۲ متغیر بود (جدول ۳). CYP5337A1 و CYP52G11 فاقد مارپیچ یادشده و CYP617N1 (با بیشترین طول) CYP51F1 دارای دو مارپیچ بود. تعداد اسیدهای‌آمینهٔ تخمین‌زده‌شده در مارپیچ، در تمام موارد به جز CYP584Q1، CYP5337A1 و CYP52G11 بیشتر از ۱۸ بود. در صورتی که تعداد اسیدهای‌آمینه تخمین‌زده‌شده در مارپیچ، بیشتر از ۱۸ باشد احتمال وجود یک پروتئین درون غشایی بیشتر می شود. تعداد اسیدهای آمینه موجود در مارپیچ‌های غشایی در ۶۰ اسیدآمینهٔ اول پروتین‌ها بین ۳/۸۸ و ۴۰/۹۰ تخمین زده شد. برای شناسایی پپتیدهای سیگنال از برنامه سیگنال P نسخهٔ ۴.۱ (SignalP 4.1) (۸) استفاده شد (جدول ٤). بر اساس مدل هیدن مارکف در این تحقیق، یک تا دو مارپیچ شناسایی شد، اما سیگنال پپتید در هیچ یک از توالی های مورد بررسی شناسایی نشد. ناحیه برشی در توالی های مختلف بین موقعیت های ۱٤–۳۱ قرار داشتند (جدول ٤). برای بررسی برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی پروتین‌های مورد بررسی از برنامهٔ پروت پارام (ProtParam) استفاده شد (جدول ۵). وزن مولکولی پروتئین های مورد بررسی بین ۵۷ تا ٦٤ کیلو دالتون محاسبه شد. نتایج حاصل از محاسبه میزان ناپایداری پروتین نشان داد که پروتین‌های CYP539B5 و CYP52G11 (با شاخص ناپایداری کمتر از ٤۰) پایدارند. میزان آبگریز یا آب دوست‌بودن اسیدهای‌آمینه موجود در پروتین نشان داد که CYP584Q1 بیشترین و CYP617N1 کمترین میزان اسیدآمینه



شکل ۱: موقعیت نواحی حفاظت شده شامل CXG و EXXR.

جدول ۱: مشخصات ژن‌های هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *بووریا بازیانا*.

کد آنزیم	ژن	اندازهٔ نوکلئوتید (جفت باز)	کد پروتئین	اندازهٔ پروتئین (اسید آمینه)
GU566080	CYP584Q1	۳۸۸۲	ADK36666	۵۳۹
GU566077	CYP539B5	۳۸۸۱	ADK36663	۵۱۵
GU566074	CYP52X1	۳۸۲۳	ADK36660	۵۲۸
GU566075	CYP5337A1	٤۹۳۰	ADK36661	۵۳٤
GU566076	CYP52G11	٥٦٤۰	ADK36662	۵۲۸
GU566078	CYP617N1	٥٤٥۹	ADK36664	۵٤۹
GU566079	CYP53A26	۲۲۲۵	ADK36665	۵۱۳

جدول ۲: موقعیت نواحی حفاظت شده بر اساس نتایج حاصل از موتیف سرچ در هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *بووریا بازیانا*.

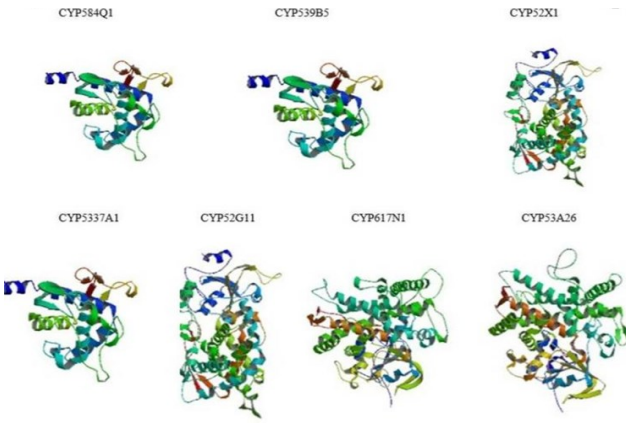
کد ژن	موقعیت ابتدایی	موقعیت انتهایی	شاخص e
CYP584Q1	۸۲	٤۹۵	۳/۵e -۵۲
CYP539B5	۹۳	٤۷۷	۱/۸e-٦۱
CYP52X1	۹٦	٤۹٦	۲e-۵۹
CYP5337A1	۹۰	۵۱٦	۱/۳e-٤۷
CYP52G11	۷۸	٤۹۷	۹e-۵۹
CYP617N1	۷۲	۵۲۲	۲/۸e-۷۲
CYP53A26	٤۵	۵۰۷	۱۷/۳e-۸۹

جدول ۳: مشخصات عملکرد پروتئینی با TMHMM.

ژن	طول	تخمین تعداد اسید آمینه	تعداد اسید آمینه در ٦۰ اسیدآمینه اول	تعداد مارپیچ پیش‌بینی شده	توپولوژی
CYP584Q1	۵۳۹	۱٦/۱٤	۱٦/۱۱	۱	i21-40o
CYP539B5	۵۱۵	۲۱/٦٤	۲۱/٤۸	۱	i9-31o
CYP52X1	۵۲۸	۲۲/۰۸	۲۲/۰٤	۱	i7-29o
CYP5337A1	۵۳٤	۱٤/۷۹	۱۳/۸۳	۰	o
CYP52G11	۵۲۸	٤/۰۰	۳/۸۸	۰	o
CYP617N1	۵٤۹	۵۳/۲۹	٤۰/۹۰	۲	o10-29i36-58o
CYP53A26	۵۱۳	۲٤/۱۵	۲۲/٤٤	۱	i7-29o
CYP51F1	۵۳۰	٤۳/۵۹	۲۵/۵۵	۲	o29-51i58-80o

آب دوست را در بین سایرین دارند. شاخص حضور زنجیره های آلیفاتیک (*aliphatic index*) در پروتین با میزان تحمل به حرارت رابطه مستقیم دارد. بیشترین شاخص حضور زنجیره های آلیفاتیک محاسبه‌شده مربوط به CYP617N1 و کمترین مربوط به CYP52X1 بود.

ب) مدل سازی آنزیم‌های سیتوکرم P450 *قارچ بیمارگر بووریا بازیانا بر پایهٔ همولوژی:* نتایج حاصل از مدل سازی هفت آنزیم مورد بررسی در شکل ۲ مشاهده می‌شود. شمارش تعداد مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا با برنامه Stride Web interface انجام شد. تعداد مارپیچ‌های آلفا ۷ تا ۱۸ و صفحات بتا ٤ تا ۱۳ بود (جدول ٦). برای بررسی برهم کنش زوایای دهیدرال اسیدهای آمینه، نمودار راماچاندران رسم شد. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می شود اکثر اسیدهای آمینه در محدوده مرزهای نمودار قرار گرفته اند و برهم کنش مناسبی بین زوایای دو وجهی مشاهده می شود. ارزیابی کیفیت مدل‌های رسم شده با بررسی کیفیت مدل بر اساس انرژی و محاسبه شاخص Z



شکل ۲: ساختار سه بعدی مدل‌های پیش بینی شدهٔ آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ *بووریا بازیانا*.

جدول ٤: بررسی پپتید سیگنال با سیگنال پ.

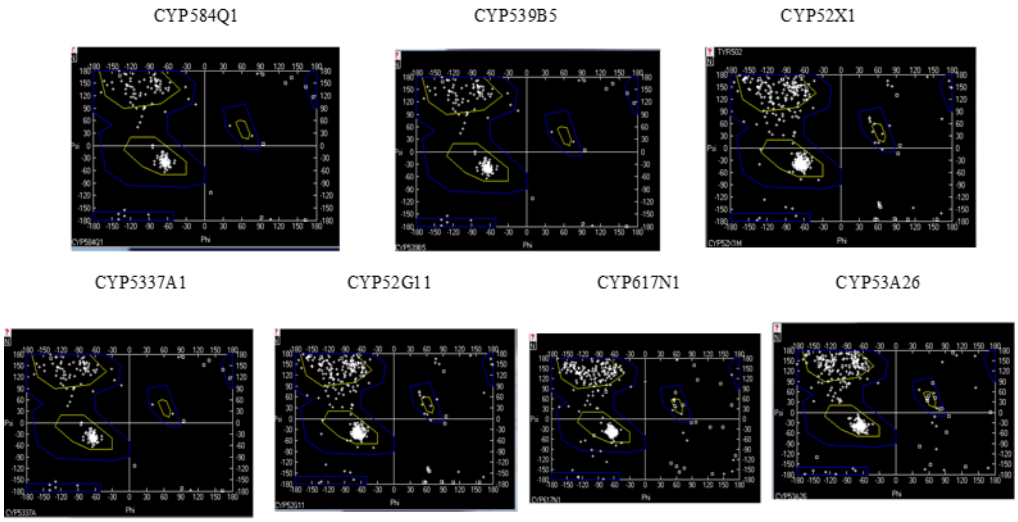
کد ژن	شاخص D	موقعیت	وجود سیگنال پپتید
CYP584Q1	۰/۲۰٤	۱-۱٤	خیر
CYP539B5	۰/۲۳۷	۱-۳۱	خیر
CYP52X1	۰/۳۵۳	۱-۱۹	خیر
CYP5337A1	۰/۳۲٤	۱-۲۲	خیر
CYP52G11	۰/۳۳۹	۱-۱۸	خیر
CYP617N1	۰/۳۰۸	۱-۱۸	خیر
CYP53A26	۰/۳۹۷	۱-۱٦	خیر

جدول ۵: نتایج حاصل از آنالیز پروتین‌های مورد بررسی با ProtParam.

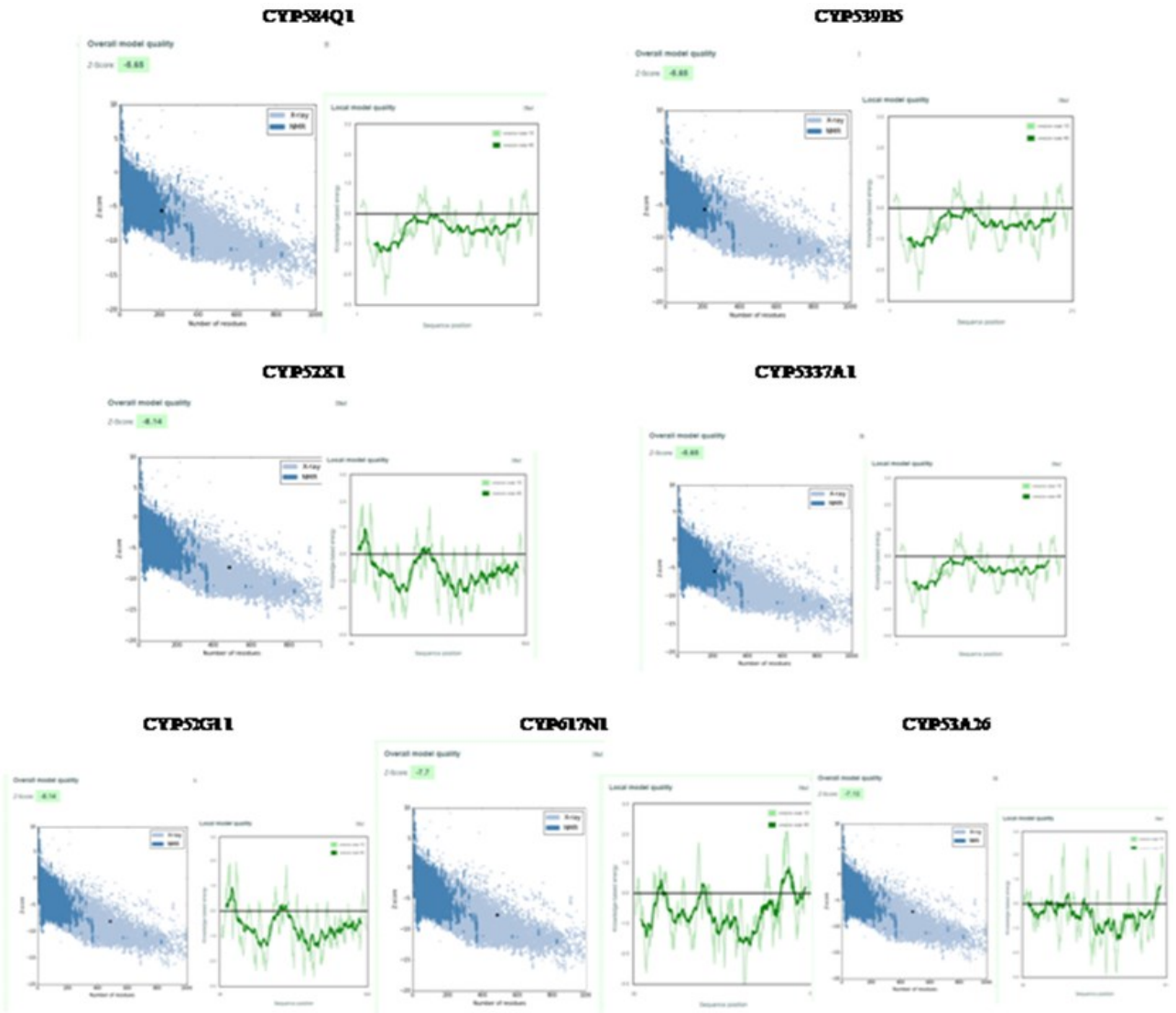
کد	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک تئوری	آسپارتیک + گلوتامیک	آرژنین + لیزین	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	آب گریزی و یا آب دوستی
CYP584Q1	٦٤۳۲۰/۸۲	۸/۳۲	٦۸	۷۱	٤۰/۷۵	۸۷/٦۳	-۰/۳٤۰
CYP539B5	۵۸۷۲۰/٤۰	٦/٤۸	۵۸	۵٦	۳۹/۰۱	۸٦/۵۲	-۰/۱۸۹
CYP52X1	۵۹٤۸۰/٦٦	۷/۲۷	٦٤	٦۵	٤۰/۰٦	۸٤/۰۷	-۰/۳۱۱
CYP5337A1	۵۸۲۷۱/٦۵	۸/۸۲	۵۲	۵۸	٤۳/۰۹	۹۰/۳٦	-۰/۱۳۲
CYP52G11	۵۹۳۳۲/۰۸	۸/۲٤	٦۲	٦۵	۳۸/۵۱	۸۷/۵٦	-۰/۲۸۸
CYP617N1	٦۰۵۰۵/۹۸	٦/۵۸	۵٦	۵۳	٤۱/۰٤	۹۵/۰۹	-۰/۰۲۰
CYP53A26	۵۷۵۵٦/۸۰	۷/٦٦	٦۰	٦۱	٤۲/۱۲	۸۵/۹۸	-۰/۲٦۳

جدول ٦: مشخصات الگوی مدل سازی پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ *بووریا بازیانا*.

کد	شناسه پروتئین در بانک اطلاعاتی	روش شناسایی الگو	مشخصات	ارگانیسم الگو	تعداد مارپیچ آلفا و صفحات بتا در مدل
CYP584Q1	1pq2A	اشعه ایکس	مونومر	*کاندیدا مالتوزا* (*Candida maltosa*)	۷م؛ ٤ص
CYP539B5	1pq2A	اشعه ایکس	مونومر	*کاندیدا مالتوزا* (*Candida maltosa*)	۷م؛ ٤ص
CYP52X1	1tqnA	اشعه ایکس	مونومر	*دباریومیسز هنسنی* (*Debaryomyces hansenii*)	۱۸م؛ ۹ص
CYP5337A1	1pq2A	اشعه ایکس	مونومر	*کاندیدا مالتوزا* (*Candida maltosa*)	۷م؛ ٤ص
CYP52G11	1tqnA	اشعه ایکس	مونومر	*دباریومیسس هانسنئی* (*Debaryomyces hansenii*)	۱۷م؛ ۹ص
CYP617N1	1bu7A	اشعه ایکس	مونومر	*اوریزا ساتیوا* (*Oryza sativa*)	۱۷م؛ ۱۳ص
CYP53A26	1bu7A	اشعه ایکس	مونومر	*آسپرجیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*)	۱٦م؛ ۱۳ص



شکل ۳: نمودار راماچاندران.



شکل ٤: نتایج حاصل از ProSA.

(Z-score) با استفاده از برنامه ProSA صورت گرفت. همان گونه که در شکل ٤ مشاهده می شود در همه موارد میزان انرژی زیر صفر و شاخص زی نشان دهنده مناسب بودن مدل رسم شده است. تمام مدل‌ها در محدوده ساختارهای سه بعدی تعیین شده با روش اشعهٔ ایکس قرار می گیرند.

بحث

بررسی توالی پروتینی P450 در برخی گیاهان وجود یک پپتید سیگنال را نشان می دهد که هدف برخی از آن ها پلاستید و یا میتوکندری است (١٦). پروتین‌های درون غشایی امکان ورود و انتقال سوبستراهای مختلف را از طریق غشا فراهم می‌سازند. در تایید این ویژگی و بر اساس مدل هیدن مارکف در این تحقیق، یک تا دو مارپیچ شناسایی شد، اما سیگنال پپتید در هیچ کدام از توالی های مورد بررسی شناسایی نشد. تحقیقات گذشته نشان دادند که در انتهای یک قطعهٔ آب‌گریز متعلق به ٢٠ اسیدآمینه باقی مانده، فرایند داخل شدن در غشا متوقف می‌شود که احتمالاً یک مارپیچ را برای کاهش هزینه‌های انرژی‌بر، برای جایگیری پپتید قطبی در هسته غیرقطبی دولایه تشکیل می‌دهد (١٧). در تحقیق حاضر، تعداد مارپیچ‌های آلفا ٧ تا ١٨ و صفحات بتا ٤ تا ١٣ بود. بررسی های انجام شده در گذشته، روی ساختار سه بعدی P450 در *استرپتومیسس کولی کولر* (*Streptomyces coelicolor*) نشان‌دهنده ١٢ مارپیچ آلفای اصلی و سه گروه صفحات بتا بود (١٨). شواهد آزمایشگاهی نشان‌می‌دهد اما، در تحقیق حاضر تنها به صورت مونومر مشاهده شد. این انعطاف‌پذیری برای جهت‌یابی مجدد صفحات جلویی مربوط به مارپیچ‌های درون غشایی برای تشکیل یک دیمر P450 از طریق تعاملات ناحیهٔ مارپیچ اف-جی ضروری‌است. دیمریزاسیون P450 در غشا در برخی موارد از واکنش احیا توسط سیتوکروم P450 رداکتاز میکروزومی خودداری‌می‌کند، بنابراین مونومر احتمالاً شکل فعال و غالب این آنزیم است (٢٠). ویژگی جالب ساختار P450 توانایی در سازگاری با اندازه‌ها و شکل‌های مختلف بستر فعالیت آن‌ها می‌باشد (٢١). ساختارهای سه بعدی و انعطاف‌پذیری ساختار در نوع وحشی و جهش‌یافتهٔ سیتوکروم P450 کد 1A2 با استفاده از شبیه سازهای مولکولی تعیین شد و نتایج نشان داد که ساختار جهش‌های موجود در باقی مانده‌های اسیدآمینه در بخش‌های دور از این پروتین‌ها نیز تغییر کرده‌است و همچنین مشخص شد که تنها جهش در یک اسیدآمینه،می تواند موجب تغییر خمش‌های ساختاری پروتین‌ها شود و ممکن است روی شناسایی سوبسترا و فعالیت آنزیم موثر باشد (٢٢). بر اساس تجزیه و تحلیل محصولات پروتینی پیش‌بینی‌شده در ژن سیتوکروم P450 در قارچ *بووریا بازیانا*، CYP5337A1 اولین عضو یک خانواده جدید از سیتوکروم P450 بود. اما CYP52X1، CYP617N1 و CYP584Q1 به عنوان اولین ژن‌های متعلق به سه زیرخانواده جدید تعیین شدند (٤). این آنزیم‌های سیتوکروم P450 روی بسیاری از مولکول‌های داخلی و خارجی عمل می‌کنند که از جمله این مولکول‌ها می‌توان به آلکان‌ها یعنی ترکیب اصلی هیدروکربنی کوتیکول بسیاری از حشرات اشاره کرد (٢٣). مسیر اکسیداسیون در موجودات یوکاریوت بوسیلهٔ یک سیستم آنزیمی پ ٤٥٠ شروع می‌شود. آنزیم منواکسیژناز P450 به وسیله یک آنزیم احیا کننده نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) در سیتوکروم P450 عمل می‌کند و ابتدا در تعدادی از مخمرها تشریح شد درحالی‌که، پراکنش آن‌ها در قارچ‌های آسکومیست نادر بود (٢٤ و ٢٥). آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین در تجزیه پسماندهای کیتینی و در نتیجه تولید الیگوساکاریدها و کاربرد در صنعت و کنترل بیولوژیک آفات در کشاورزی نقش دارند. قارچ‌های مفید آنزیم کیتیناز را به صورت طبیعی بصورت اندک تولید می‌کنند. از این رو، استفاده از تکنولوژی نوترکیبی DNA می تواند راهکار مناسبی برای افزایش میزان تولید این آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی باشد. بدین منظور، محققان نشان دادند که در بهترین شرایط میزان بیان پروتین نوترکیب نسبت به پروتین تام برابر ٥٧/٤٥ درصد بوده است (٢٦). در تحقیق حاضر، ویژگی‌های پروتینی و نواحی حفاظت شده که نقش مهمی در اتصال به آهن داشتند، در هفت آنزیم سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* با استفاده از نرم‌افزارهای معتبر

مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت برای اولین بار ساختار مدل سازی شده برای این هفت آنزیم با روش مبتنی بر همولوژی پیش‌بینی و گزارش شد. همان گونه که مشاهده شد آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* دارای تنوع ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هستند. به نظر می‌رسد حضور اسید آمینه‌های متنوع با خصوصیات مختلف در نواحی حفاظت شده توانسته دامنه میزبانی این قارچ را در کنترل حشرات آفت افزایش دهد. همچنین باعث شده تا علاوه بر حشرات که دارای کوتیکول حاوی کیتین در سطح بدن هستند، به داخل بافت گیاهی نیز نفوذ کنند. به عبارتی، انعطاف‌پذیری ساختار این آنزیم‌ها باعث سازگاری آن‌ها با اندازه‌ها و شکل‌های مختلف سوبسترا شده است.

نتیجه‌گیری

اطلاعات ساختاری جدید از این آنزیم‌ها به ویژه در درک بهتر آنزیم سیتوکروم P450 و چگونگی سازگار شدن جایگاه فعال آن با سوبستراهای متنوع از نظر اندازه و شکل مفید خواهد بود (٦). پایداری آنزیم‌ها و مقاومت آن‌ها در مقابل عوامل نامطلوب محیطی مانند دما و اشعهٔ ماورای بنفش می‌تواند میزان بیمارگری قارچ بیمارگر حشرات *بووریا بازیانا* را علیه حشرات آفت افزایش دهد. در نتیجه با مهندسی این آنزیم‌ها امکان افزایش میزان بیمارگری قارچ وجود خواهد داشت.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته و به شماره طرح ۹۱۸/۹٦/ص/۷ انجام شد.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Pathan AAK, Devi KU, Vogel H, Reineke A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.). Fungal Genet and Biol. 2007; 44: 1231-1241.
2. Faria MRde, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol Control. 2007; 43: 237-256.
3. Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI Publishing; 2001: 23-69.
4. Pedrini N, Zhang Sh, Juarez MP, Keyhani NO. Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiology. 2010; 156: 2549-2557.
5. Stoilov I. Cytochrome P450s: coupling development and environment. Trends Genet. 2001; 17 (11): 629-632.
6. Poulos TL, Johnson EF. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In: Montellano PROde, editors. Cytochrome P450. Springer International Publishing Switzerland; 2015: 3-32.
7. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res. 2004; 14(6): 1188-1190.

8. Sonnhammer ELL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D, Sensen C, editors. Proceeding of the Sixth International Conference on intelligent systems for molecular biology. AAAI press, Menlo Park, CA; 1998: 175-182.

9. Krogh A, Larsson B, von Heigne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov modeling application to complete genomes. J Mol Biol. 2001; 305: 567-580.

10. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods. 2011; 8: 785-786.

11. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker M, editor. The proteomics protocols Handbook. Humana press; 2005: 571-607.

12. Pieper U, Webb B M, Dong GQ, Schneidman-Duhovny D, Fan H, Kim SJ, Khuri N, Spill YG, Weinkam P, Hammel M, Tainer JA, Nilges M, Sali A. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. Nucleic Acids Res. 2014; 42: D336-46.

13. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the SWISS-PDBViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis. 1997; 18: 2714-2723.

14. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Proteins. 1993; 17: 355–362.

15. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res. 2007; 35, doi:10.1093/nar/gkm290.

16. Schuler M, Duan H, Bilgin M, Ali S. Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. Phytochem Rev. 2006; 5: 205-237.

17. White SH, Ladokhin AS, Jayasinghe S, Hristova K. How membranes shape protein structure. J Biol Chem. 2001; 276: 32395-32398.

18. Zhao B, Moody SC, Hider RC, Lei L, Kelly SL, Waterman MR, Lamb DC. Structural analysis of cytochrome P450 105N1 involved in the biosynthesis of the Zincophore, Coelibactin. Int J Mol Sci. 2012; 13: 8500-8513.

19. Szczesna-Skorupa E, Mallah B, Kemper B. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cytochromes P450 2C2 and 2E1 molecular interactions in living cells. J Biol Chem. 2003; 278: 31269-31276.

20. Davydov DR. Microsomal monooxygenase as a multienzyme system: the role of P450-P450 interactions. *Expert* Opin Drug Metab Toxicol. 2011; 7: 543-558.

21. Nagano S, Li H, Shimizu H, Nishida C, Ogura H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK. J Biol Chem. 2003; 278: 44886-44893.

22. Watanabe Y, Fukuyoshi S, Hiratsuka M, Yamaotsu N, Hirono S, Takahashi O, Oda A. Prediction of three-dimensional structures and structural flexibilities of wild-type and mutant cytochrome P450 1A2 using molecular dynamics simulations. J Mol Graph Model. 2016; 68: 48-56.

23. Montellano PROde. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2005.

24. Tanaka A, Fukui S. Metabolism of n-alkanes. In: Tanaka A, Fukui S, editors. The yeast. New York: Academic Press; 1989: 261-287.

25. van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM,Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Technol. 2003; 58: 427-440.

26. Yazdanpanah-Samani M, Zamani MR, Motallebi M, Moghaddassi Jahromi Z. Heterologous expression of Chit36 from *Trichoderma atroviride* in prokaryotic system. J Cell Mol. Res. 2015; 28(3): 448-457. [In Persian]