

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ---، شماره ۲۲، --- ۱۳۹۷، صفحه ---
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲

بررسی‌های زیست‌محاسباتی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌های Cry با هدف کنترل زیستی مالاریا

مهسا جلیلی‌منش: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، m.jalilimanesh@mail.um.ac.ir
علی‌اکبر حداد مشهوریزه*: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، a.haddad@um.ac.ir
علی‌مخدومی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، a.makhdomi@um.ac.ir
محمد رضا حسین‌دخت: استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، housain@um.ac.ir

چکیده

مقدمه: امروزه تغییرات اقلیمی و کاربرد گسترده حشره‌کش‌های شیمیایی ظهور گونه‌های مقاوم پشه آنوفل و مخاطرات زیست‌محیطی فراوانی را در پی داشته است؛ از این رو، ارائه راهکارهای جایگزین از جمله روش‌های کنترل زیستی چشم‌انداز روشنی برای مبارزه با این مخاطرات فراهم کرده است و در این میان، به باکتری‌های دارای قابلیت پشه‌کشی به ویژه *Bacillus thuringiensis* و پروتئین‌های اشتقاق یافته از آن نظیر پروتئین‌های سمی Cry توجه ویژه شده است؛ هرچند به بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی این سموم که در پژوهش حاضر با بررسی‌های *in silico* هدف گذاری شده چندان توجه نشده است.

مواد و روش‌ها: توالی پروتئینی Cry4، Cry11، Cry19، Cry24 و Cry39 از پایگاه داده NCBI دریافت و پایش ویژگی‌های ساختاری، عملکردی، فیزیکوشیمیایی، توپولوژیکی، ساختارهای ثانویه و الگوسازی سه‌بعدی آنها با برنامه‌هایی نظیر ProtParam، InterProScan، TMHMM، Psipred و Modeller 9.15 انجام شد و در نهایت با تعیین گیرنده‌های مرتبط قابلیت عملکردی آنها با داکینگ مولکولی با نرم‌افزار Patchdock سنجیده شد.

نتایج: نتایج ویژگی‌های متنوع فیزیکوشیمیایی، غیرترش‌حی و تجمع‌ی بودن سموم را نشان دادند. پایش عملکردی به ردیابی دمن‌هایی با عملکرد مشابه با سایر اعضای پروتئین‌های خانواده Cry منجر شد. پیش‌بینی ساختار ثانویه وجود مارپیچ‌ها و صفحات را طبق الگوی توزیع مشابه با یکدیگر نشان داد؛ همچنین طراحی و ارزیابی کیفیت ساختار در تمام پروتئین‌های سمی در حد مطلوب حاصل شد و ارزیابی میل اتصال مبین اتصال تمام پروتئین‌های Cry به گیرنده‌های مربوطه و اتصال قوی‌تر Cry11 و Cry24 به بیشتر گیرنده‌ها بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر ضمن فراهم‌آوری داده‌های عملکردی مرتبط با سموم پروتئینی Cry، الگوی عملی استفاده بهینه از آنها مبتنی بر تولید سموم توانا بر اساس طراحی پروتئین‌های چندعملکردی در راستای کنترل زیستی پشه‌های مالاریا را فراهم کرد.

واژه‌های کلیدی: مالاریا، کنترل زیستی، پروتئین‌های Cry، بیوانفورماتیک

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

حشرات در کنار آثار مفید و مثبتی که بر محیط‌زیست و انسان دارند همواره از دو جنبه تهدید امنیت غذایی در حوزه کشاورزی و سلامت جامعه در حیطه پزشکی برای انسان خطرناک تلقی شده‌اند (۱-۳). در حوزه سلامت، بیماری‌های منتقل‌شونده از حشرات در دهه‌های اخیر به علت گرم‌شدن زمین و تغییرات اقلیمی با اثرگذاری مستقیم بر بقاء، تولیدمثل و تغذیه حشرات ناقل شیوع گسترده‌ای به‌ویژه در مناطق گرمسیری و استوایی یافته‌اند (۴-۷). مالاریا شایع‌ترین، کشنده‌ترین و گسترده‌ترین بیماری بین بیماری‌های منتقل‌شونده از حشرات با آمار ۲۱۹ میلیون نمونه ابتلا و ۱/۵ تا ۳ میلیون نفر مرگ‌ومیر در سال و بیشینه شیوع در آفریقا است (۸). تک‌یاخته‌ای از جنس *Plasmodium* عامل بیماری‌زای اصلی مالاریا است که با گزش پشه *Anopheles gambiae* آلوده به انسان منتقل می‌شود؛ این پشه کارترین ناقل مالاریا در جهان و آفریقا محسوب می‌شود (۹ و ۱۰). اگرچه تاکنون رویکردهای مختلفی برای پیشگیری، درمان و جلوگیری از انتشار مالاریا استفاده شده است، در دسترس نبودن واکسن مؤثر و طراحی و کشف‌نشدن داروی ضد مالاریا سبب شده است نابودسازی و کنترل پشه ناقل بیماری یکی از مؤثرترین، کارآمدترین و عمده‌ترین رویکردها باشد (۱۱ و ۱۲)؛ از این رو، حشره‌کش‌های شیمیایی به‌طور وسیعی طی سال‌های گذشته استفاده شده‌اند. اگرچه استفاده از این نوع ترکیبات سرکوب شدید پشه آنوفل را در پی داشته است، آثار مخرب و نامطلوب زیست‌محیطی و ازهم‌گسیختگی سیستم‌های زیستی طبیعی و بروز مقاومت در پشه‌ها به اثرگذاری مقطعی این ترکیبات منجر شده است. امروزه توجه‌ها و تمایل‌ها به استفاده از روش‌های کنترل زیستی به‌عنوان جایگزین

کارآمد و دوستدار طبیعت سوق یافته است (۱۳ و ۱۴) و در این راستا، کنترل زیستی پشه‌ها با باکتری‌های حشره‌کش به‌علت تولید، دستورزی و استفاده آسان‌تر و تنوع بیشتر نسبت به سایر منابع تولید حشره‌کش زیستی در جایگاه بالاتری قرار گرفته است (۱۵). *Bacillus thuringiensis* باکتری گرم مثبت، هوازی و تشکیل‌دهنده اسپور است که ویژگی اصلی آن تولید دلتا‌اندوتوکسین حشره‌کش یا سموم Cry است (۱۶) و ۱۷). تنوع بسیار زیاد، اختصاصیت، سمی‌نبودن برای انسان و موجودات غیرهدف و تجمع مقدار زیاد این سموم به‌شکل اجسام بلوری در فاز اسپورزایی درون سلول باعث شده است بیشترین تلاش جامعه علمی و صنعتی روی آن متمرکز شود (۱۷-۱۹). در پژوهش‌های بسیاری به بررسی انواع این سموم پروتئینی پرداخته شده و فعالیت حشره‌کشی آنها بر راسته‌های مختلف حشرات مانند *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera* و سایر راسته‌ها اثبات شده است (۲۰). ویژگی پشه‌کشی اعضای Cry4A، Cry4B، Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A علیه راسته *Diptera* شناسایی شده است (۲۱-۲۵)؛ به این ترتیب که این سموم ابتدا به‌شکل پیش‌پروتئین و به حالت اجسام بلوری درون سلول باکتری تولید می‌شوند و تجمع می‌یابند و سپس با بلع و ورود به دستگاه گوارش حشره بر اثر اسیدیته خاص روده به‌شکل محلول درمی‌آیند و با فعالیت پروتئین‌ها بخشی از دو انتهای پیش‌پروتئین حذف و به سم پروتئینی فعال و عملکردی تبدیل می‌شوند (۲۶). در کل، این پروتئین‌ها با دو سازوکار سبب مرگ سلول می‌شوند: در سازوکار نخست که بیشتر دانشمندان با آن موافق‌اند الیگومریزه شدن سم با اتصال شکل فعال پروتئین به گیرنده کاده‌رین سطح سلول انجام و سپس اتصال به گیرنده ثانویه آمینوپپتیداز

AGN95448، AGH20077 و AGH20077 آشکار شدند؛ سپس از پایگاه داده پروتئینی سامانه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term>) دستیابی به توالی پروتئینی سموم Cry بررسی شده و گیرنده‌ها تحت قالب FASTA میسر شد.

پایش ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌های پشه‌کش Cry و گیرنده‌ها: طول توالی پروتئینی گیرنده سموم و سموم پشه‌کش با مراجعه به پایگاه اطلاعات پروتئین NCBI طبق آدرس یاد شده بررسی شد. محدوده پروتئین‌های فعال درخصوص سموم پشه‌کش با مراجعه به پایگاه CDsearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) آشکارسازی و دسترسی به توالی پروتئین فعال با استفاده از پایگاه NCBI انجام شد. تعیین ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، پیش‌بینی توپولوژی، ردیابی و بررسی وجود توالی‌های پپتید نشانه احتمالی منحصراً برای سموم پروتئینی پشه‌کش به ترتیب توسط برنامه‌های تحت شبکه Protparam پایگاه Expasy

(<http://web.expasy.org/protparam>)، TMHMM 2.0 و Signal peptide prediction (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-Signal-peptide-prediction>)

انجام شد. برای واکاوی تغییرات پس ترجمه گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و سولفوریلایسیون از سه برنامه تحت شبکه NetNGlyc، NetPhos و Sulfinator به ترتیب به آدرس‌های (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) و (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) و (<http://web.expasy.org/Sulfinator>) استفاده شد. به منظور پایش عملکردی که با هدف ردیابی دمین‌های احتمالی در هر پروتئین، تعیین موقعیت و طول دمین‌ها و شناسایی عملکرد و وظیفه آنها انجام می‌شود از سه

یا آلکالین فسفاتاز سطح سلول برقرار می‌شود؛ در نتیجه، نفوذ به غشای سلول و تشکیل منافذ یا کانال‌ها انجام می‌شود و لیز اسمزی و مرگ سلول رخ می‌دهد (۲۷). در سازوکار دوم، مسیر پیام‌دهی سلولی تنها با اتصال مونومر پروتئین به کاده‌رین فعال می‌شود و مرگ سلول بدون نیاز به تشکیل الیگومر رخ می‌دهد؛ این سازوکار همچنان مورد چالش است (۲۸). هر دو سازوکار بر اهمیت برهم‌کنش سموم پروتئینی Cry و گیرنده سطح سلول از نظر تعیین اختصاصیت و دامنه اثر روی حشرات هدف و همچنین قدرت و شدت عمل سم به‌عنوان مرحله کلیدی تأکید می‌کنند (۲۹). پژوهشی در دسترس نیست که به بررسی جامع و مقایسه‌ای قدرت و اختصاصیت انواع سموم Cry مؤثر بر *A. gambiae* (عضوی مهم از راسته *Diptera*) پرداخته باشد؛ از این‌رو، پژوهش حاضر برای نخستین بار به واکاوی و پایش اطلاعات در زمینه ویژگی‌های ساختاری و عملکردی این پروتئین‌ها با هدف بهبود ویژگی‌های پشه‌کشی آنها مبتنی بر مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین در گام‌های بعدی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

گردآوری داده‌ها: مطالعه منابع و پژوهش‌های انجام‌شده به شناسایی و ردیابی چند عضو از پروتئین‌های Cry مؤثر بر راسته *Diptera* مانند Cry4A، Cry4B، Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A با شماره‌های شناسایی به ترتیب ABM97547، CAD30095، CAA60504، CAA68875، CAJ43600 و BAB72016 منجر شد. گیرنده‌های سطح سلولی این سموم که شامل AgAPN2، AgALP1، AgCad1 و AgCad2 هستند با واکاوی مقاله‌ها به ترتیب با شماره‌های شناسایی 835019065،

(rm.html) انجام شد.

تعیین ساختار سه‌بعدی: در زمینه سموم و گیرنده‌های پروتئینی که ساختار سه‌بعدی آنها با روش‌های تجربی تعیین شده بود، پایگاه PDB به آدرس (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) برای دریافت کردن ساختار طبق فرمت pdb استفاده شد. دسترسی به ساختار سه‌بعدی بخش غیرپروتئینی و کربوهیدراتی گیرنده با استفاده از پایگاه Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) تحت فرمت SDF ممکن شد؛ این فرمت با کمک برنامه تحت شبکه SMILESTranslator به آدرس (<http://cactus.nci.nih.gov/translate>) به فرمت pdb تبدیل شد. برای سایر سموم پروتئینی و گیرنده‌ها به علت تعیین‌نشدن ساختار سه‌بعدی با روش‌های تجربی، طراحی ساختار سه‌بعدی با نرم‌افزار MODELLER 9.15 انجام شد؛ به این منظور، ابتدا با روش BLAST pdb انتخاب ساختار الگو بر مبنای بهترین نتایج از نظر بیشترین همسانی و هم‌پوشانی یافت‌شده انجام و سپس با فرمت pdb از پایگاه PDB طبق آدرس یادشده ذخیره شد. روش همولوژی‌مدلینگ بر پایه هم‌ردیف‌سازی بین توالی الگو و توالی هدف استوار است. پس از الگوسازی، بهترین الگو از میان پنج الگوی طراحی شده بر اساس بیشترین DOPE score در هر پروتئین سمی و گیرنده انتخاب و سپس بهینه‌سازی ساختارهای سه‌بعدی طراحی شده با نرم‌افزار MOE انجام شد. ارزیابی اعتبار الگوهای طراحی شده با نرم‌افزار تحت شبکه ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (۳۰) بر اساس ارزیابی شیمی‌فضایی (۳۱) و نمودار رامانچاندران برنامه MOE برای هر پروتئین به تفکیک انجام شد.

بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی: برنامه تحت

پایگاه Conserved domain، Motif scan و Interproscan به ترتیب به آدرس‌های (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wr>) (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) و (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequence-search>) استفاده شد.

بررسی دامنه میزبانی و تعیین قرابت نتایج همگون‌یابی: برنامه تحت شبکه Protein Blast طبق ماتریکس PAM250 به آدرس (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) برای ردیابی سایر توالی‌های پروتئینی مشابه و دیگر ریزموجودات دارای این سموم پروتئینی استفاده شد. توالی‌های پروتئینی مشابه که دارای ارزش E پذیرفته‌شده بودند و از دیدگاه هم‌پوشانی و همسانی کیفیت مناسبی داشتند برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. سپس قرابت توالی‌ها نسبت به یکدیگر با استفاده از درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده با الگوریتم Neighbor joining برنامه MEGA6 مشخص شد.

پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی‌های پروتئینی: برنامه Psipred به آدرس (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) طبق روش Psipred با هدف آشکارسازی ساختار ثانویه و وضعیت هر آمینواسید برای پذیرفتن نوعی از حالت‌های ثانویه مانند مارپیچ یا صفحات و همچنین تعیین میزان و درصد وجود هر یک از اجزای ساختار ثانویه استفاده شد. پیش‌توالی‌های پروتئینی برای ردیابی حضور ساختار Coiled-coil با برنامه‌های Paircoil2 طبق تنظیمات پیش‌فرض و COILS تحت ماتریکس MTIDK به ترتیب به آدرس‌های

(<http://paircoil2.csail.mit.edu/paircoil2.html>) و (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_fo)

بیشترین وزن مولکولی را دارد، منفی ترین بار الکتریکی و بیشترین شاخص آلفاتیک به ترتیب به Cry39A و Cry4A، pH ایزوالکتریک خنثی و قلیایی به ترتیب به Cry4A و Cry4B و بیشترین شاخص ناپایداری به Cry24Ca تعلق دارد. نتایج بررسی و پیش بینی موقعیت سلولی بخش عملکردی پروتئین های سمی وجود نقاط خارج سلولی با طول متفاوت را در تمام پروتئین ها آشکار کرد؛ به گونه ای که موقعیت خارج سلولی زنجیره پروتئینی در Cry4B، Cry11B، Cry24Ca و Cry39A مشخص و یک موقعیت درون سلولی و داخل غشایی با طول کوتاه تر در نمونه های Cry4A و Cry19A حاصل شد (جدول ۲). در زمینه پیش بینی و ردیابی وجود توالی های پپتید نشانه در شکل فعال پروتئین های Cry، توالی احتمالی تنها در Cry19A با امتیاز ۲۱/۶، همسانی ۳۵ درصد و جایگاه برش احتمالی پس از آمینو اسید ۲۹ پیش بینی شد. نتایج واکاوی تغییرات پس ترجمه، تغییرات گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون را در تمام اعضا و سولفوریلاسیون را تنها در دو عضو Cry11B و Cry19A نشان دادند. پایش عملکردی این اعضا به ردیابی چند نوع دمین با نقش های مختلف و نام مشابه و تکرار شونده در بیشتر نمونه ها منجر شد. نتایج این حوزه درباره نمونه های Cry11B، Cry4A و Cry4B کمی متفاوت بود؛ به طوری که تنها دمین آشکار شده در Cry11B با عملکرد ورود به غشا و تشکیل منفذ حاصل شد و دمینی با نقش اتصالی به گیرنده ردیابی نشد. در دو نمونه دیگر نیز دمین اتصالی به کربوهیدرات علاوه بر دمین های یافت شده در سایر اعضا آشکار شد. اطلاعات مربوط به پایش عملکردی و موقعیت دمین ها در جدول ۳ سازمان دهی شده اند.

جدول ۱- ویژگی های ساختاری و فیزیکی شیمیایی پروتئین های پشه کش Cry بررسی شده (شاخص آلفاتیک حجم نسبی زنجیره آلفاتیک در

شبکه PatchDock به آدرس <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) با هدف بررسی برهم کنش مولکولی و سنجش میل اتصال الگوهای سه بعدی و طراحی شده سموم پروتئینی به گیرنده های یاد شده استفاده شد (۳۲). این برنامه بر اساس اصول اشکال مکمل است و نتایج طبق معیار ACE (انرژی واکنش پذیری اتمی) و امتیاز محاسبه می شوند. مطلوب ترین نتایج بر اساس بیشترین امتیاز و منفی ترین ACE از میان ۲۰ راه حل اول انتخاب و درستی اتصال پروتئین - گیرنده برای هر نتیجه به شکل مجزا با نرم افزار Pymol1 بررسی و تأیید شد.

نتایج

ویژگی های ساختاری و فیزیکی شیمیایی

پروتئین های Cry: پایش پروتئین های سمی از نظر طول زنجیره آمینو اسید (جدول ۱) تنوع طول پیش پروتئین های Cry را نشان داد؛ به طوری که پیش پروتئین های سمی Cry4A و Cry4B دارای طول بلند و تقریباً مشابه بودند و سایر پیش پروتئین های Cry طول کوتاه تری داشتند. وضعیت تنوع طول در پروتئین های فعال متفاوت از پیش پروتئین ها و بسیار نزدیک و مشابه یکدیگر در محدوده ۶۰۰ تا ۷۰۰ آمینو اسید (بجز در Cry11B) مشاهده شد. ارزیابی ویژگی های فیزیکی شیمیایی پروتئین های فعال Cry به آشکار سازی وزن مولکولی تقریباً یکسان در محدوده ۶۴ تا ۸۱ کیلودالتون، بار الکتریکی منفی و مثبت، محدوده pH ایزوالکتریک اسیدی و خنثی و قلیایی، شاخص ناپایداری ۲۴ تا ۳۷ درصد و شاخص آلفاتیک ۷۶ تا ۸۶ منجر شد (جدول ۱). همان طور که در جدول ۱ دیده می شود پیش پروتئین Cry11B

آمینواسیدهای آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین پروتئین است که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارد)

| ردیف | نام پروتئین | طول پیش پروتئین (aa) | طول پروتئین فعال (aa) | وزن مولکولی پروتئین فعال (کیلودالتون) | بارالکتریکی | pH ایزوالکتریک | هیدروفوبیسیت | شاخص ناپایداری | شاخص آلیفاتیک |
|------|-------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|-------------|----------------|--------------|----------------|---------------|
| ۱ | Cry4A | ۱۱۸۰ | ۶۰۹ | ۶۹/۴۴ | -۱ | ۷/۰۳ | -۰/۲۷۶ | ۳۳/۹۴ | ۸۶/۷۵ |
| ۲ | Cry4B | ۱۱۳۶ | ۵۷۹ | ۶۵/۱۰ | ۷ | ۹/۰۲ | -۰/۲۷۶ | ۲۴/۹۹ | ۸۵/۷۲ |
| ۳ | Cry11B | ۷۲۴ | ۱۴۸ | ۸۱/۳۴ | -۲ | ۶/۳۰ | -۰/۳۶۶ | ۳۰/۳۲ | ۷۶/۴۰ |
| ۴ | Cry19A | ۶۴۸ | ۵۷۸ | ۶۶/۶۱ | -۵ | ۶/۰۱ | -۰/۴۲۴ | ۲۷/۱۲ | ۸۱/۳۰ |
| ۵ | Cry24Ca | ۶۸۶ | ۵۶۱ | ۶۴/۰۹ | -۶ | ۵/۹۸ | -۰/۴۴۷ | ۳۷/۲۶ | ۷۶/۴۹ |
| ۶ | Cry39A | ۶۶۰ | ۵۷۲ | ۶۵/۵۳ | -۱۴ | ۵/۴۳ | -۰/۳۲۴ | ۲۹/۶۲ | ۸۰/۱۴ |

جدول ۲- توپولوژی توالی عملکردی پروتئین‌های Cry بررسی شده

| ردیف | نام پروتئین | بخش داخل سلولی (موقعیت) | بخش خارج سلولی (موقعیت) | بخش داخل غشایی (موقعیت) |
|------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ۱ | Cry4A | ۱-۶ | ۳۰-۶۰۹ | ۷-۲۹ |
| ۲ | Cry4B | --- | ۱-۵۷۹ | --- |
| ۳ | Cry11B | --- | ۱-۷۲۴ | --- |
| ۴ | Cry19A | ۱-۱ | ۲۵-۵۷۸ | ۲-۲۴ |
| ۵ | Cry24Ca | --- | ۱-۵۶۱ | --- |
| ۶ | Cry39A | --- | ۱-۵۷۲ | --- |

جدول ۳- ویژگی‌های عملکردی توالی‌های بررسی شده

| ردیف | نام پروتئین | دمین Endotoxin_M (اتصال به گیرنده) | دمین Endotoxin_N (ورود به غشا و تشکیل منفذ) | دمین Delta_endotoxin_C (اتصال به گیرنده) | دمین CBM_4_9 (اتصال به کربوهیدرات) |
|------|-------------|------------------------------------|---|--|------------------------------------|
| ۱ | Cry4A | ۳۲۲-۵۲۸ | ۷۰-۳۱۷ | ۵۳۰-۶۷۸ | ۱۰۵۳-۱۱۷۸ |
| ۲ | Cry4B | ۲۸۳-۴۷۰ | ۴۵-۲۷۱ | ۴۷۱-۶۳۴ | ۷۱۰-۷۳۰ ۱۰۰۹-۱۱۳۴ |
| ۳ | Cry11B | --- | ۱-۲۳۸ | --- | --- |
| ۴ | Cry19A | ۳۰۰-۵۰۲ | ۷۱-۲۹۵ | ۵۰۴-۶۴۸ | --- |
| ۵ | Cry24Ca | ۲۹۷-۵۱۷ | ۱۰۱-۲۹۶ | ۵۲۱-۶۶۱ | --- |
| ۶ | Cry39A | ۲۹۷-۴۹۲ | ۶۴-۲۹۲ | ۴۹۴-۶۳۵ | --- |

ردیابی ریزموجودات توانا در بیان سموم Cry:

همگون‌یابی توالی‌های پروتئینی به آشکارسازی تعدادی همگون در محدوده همسانی و هم‌پوشانی ۲۰ تا ۱۰۰ درصد منجر شد. همگون‌های یافت‌شده در دسته باکتری‌های گرم مثبت بودند و نمونه‌ای از باکتری‌های

گرم منفی در نتایج ردیابی نشد. بیشتر نتایج به باکتری *Bacillus thuringiensis* از سروتایپ‌های مختلف مانند *Bt mogi*، *Bt aizawai*، *Bt sotto* و *Bt vazensis* تعلق داشتند؛ باوجود این، نمونه‌های محدودی از دیگر جنس‌ها و گونه‌ها مانند *Paenibacillus taiwanensis*

Cry39A و Cry19A در یک خوشه منجر شد (شکل ۱). فاصله تکاملی Cry4A بسیار نزدیک به دو نمونه پیشین مشاهده شد.

Bacillus cereus و ... نیز در نتایج آشکار شدند. درخت فیلوژنتیک برای مطلوب‌ترین نتایج با همسانی بیش از ۵۰ درصد به قرارگیری سموم پروتئینی



شکل ۱- قرابت توالی‌های بررسی شده و همگون‌های آشکار شده (نشانه‌ها توالی‌های مدنظر را نشان می‌دهند)

به شکل منطقه‌ای بود؛ به طوری که تمام ساختار دوم در نیمه ابتدایی توالی وضعیت مارپیچ به خود گرفته بود اما در نیمه انتهایی تماماً ساختار صفحه مشاهده شد. پیش‌بینی حضور ساختار Coiled-coil در نمونه‌های Cry4A، Cry4B، Cry11B و Cry24Ca نتیجه‌ای نداشت اما در نمونه‌های Cry19A و Cry39A نتیجه متفاوتی داشت و این ساختار به ترتیب در بازه‌های ۵۰ تا ۸۹ و ۴۰ تا ۹۳ ردیابی شد.

ساختار سوم سموم پروتئینی و گیرنده‌های بررسی شده: ساختار سوم پروتئین‌های Cry4A و Cry4B

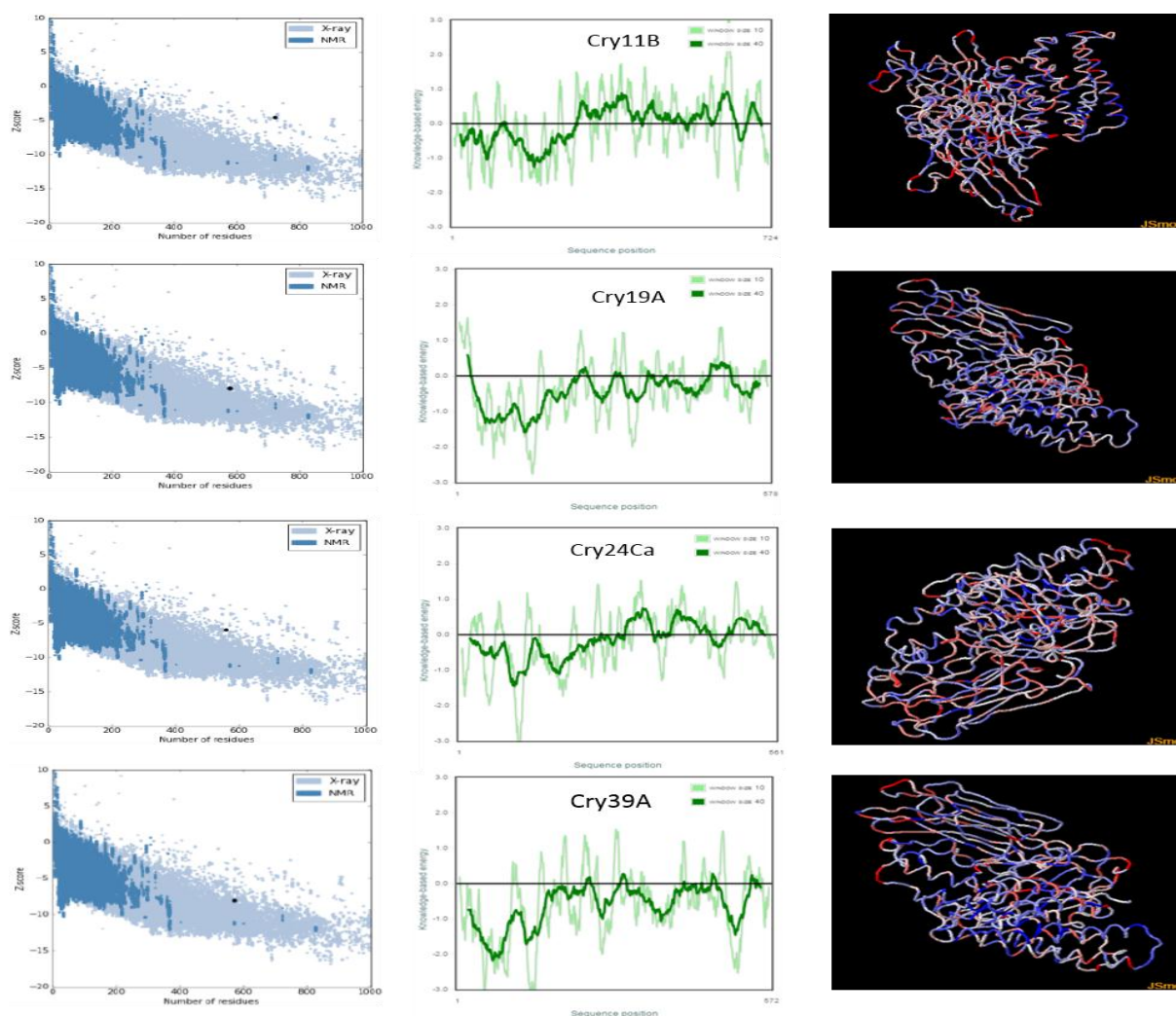
ساختار دوم توالی‌های پروتئینی خانواده Cry:

بررسی ساختار دوم هریک از پروتئین‌های Cry به شکل مجزا نشان داد در تمام نمونه‌ها، هر دو نوع ساختار مارپیچ و صفحه با میزان متفاوت اما در محدوده بسیار نزدیک ۲۵ تا ۳۲ درصد در مارپیچ و ۱۶ تا ۲۵ درصد در صفحه وجود دارد. بیشترین و کمترین محتوای مارپیچ به ترتیب با ۳۲ درصد در Cry39A و ۲۵/۵ درصد در Cry11B و بیشترین و کمترین صفحه به ترتیب با ۲۵/۶ درصد در Cry24Ca و ۱۶/۵ درصد در Cry11B پیش‌بینی شد. توزیع و پراکنش صفحات و مارپیچ‌ها در تمام نمونه‌ها

مقادیر منفی به دست آمد (شکل ۲). در ساختار سه‌بعدی نمایش‌یافته در شکل ۲ علاوه بر مشاهده چگونگی تاخوردگی و موقعیت قرارگیری اجزای ساختار دوم، نقاط دارای پیک انرژی مثبت (مناطق با انرژی زیاد) به رنگ قرمز و نواحی دارای انرژی منفی به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. مدل‌سازی سه‌گیرنده یادشده به دریافت مقادیر DOPE score منفی ۵۵۶۸۲/۹۱، منفی ۷۸۸۵۸/۱۵ و منفی ۹۱۷۴۶/۳۱ به ترتیب برای AgAPL1، AgCad1 و AgCad2 منتج شد. ارزیابی در پایگاه ProSA به کسب امتیاز منفی ۸/۱۱، منفی ۲/۰۲ و منفی ۱/۶۷ به ترتیب یادشده برای گیرنده‌های الگوشده منجر شد؛ در این میان، تنها AgALP1 در محدوده حالت طبیعی روش کریستالوگرافی واقع شد و دو گیرنده دیگر با فاصله درخور توجهی خارج از محدوده قرار گرفتند. نمودارهای انرژی محلی برای دو گیرنده AgCad1 و AgCad2 پیک‌های انرژی مثبت و بیش از صفر را در بیشتر آمینواسیدها نشان داد؛ اما نتایج در AgALP1 به شکل متفاوتی مشاهده شدند و بیشتر ریشه‌ها به استثنای تعداد کمی از آمینواسیدهای انتهایی، مقادیر انرژی منفی به خود اختصاص دادند (اطلاعات نموداری نمایش داده نشده‌اند).

ارزیابی نمودارهای رامانچاندرا برای تمام الگوهای طراحی‌شده از جمله پروتئین‌های سمی و گیرنده‌ها بیان‌کننده وجود تعدادی آمینواسید خارج از محدوده مجاز است که این تعداد برای سموم Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A به ترتیب ۳۰، ۱۴، ۱۱ و ۱۴ و برای گیرنده‌های AgAPL1، AgCad1 و AgCad2 به ترتیب ۴، ۷۷ و ۸۱ آمینواسید است. شماره و نوع این آمینواسیدها تنها برای پروتئین‌های سمی در جدول ۴ سازمان‌دهی شده است.

به ترتیب با کدهای 1w99 و 2c9k و نیز گیرنده AgAPN1 با کد 4wz9 طبق قالب pdb دریافت شد. ساختارهای الگو برای طراحی و الگوسازی ساختار سوم با کدهای 1ji6، 4qx0، 1ji6، 1i5p، به ترتیب برای Cry24Ca، Cry19A، Cry11B و Cry39A آشکار و دریافت شدند. در حوزه طراحی ساختار سوم گیرنده‌های AgALP1، AgCad1 و AgCad2 به ترتیب از ساختارهای الگو با کدهای 1kh7، 5dzv و 5dzv استفاده شد. انرژی الگوهای طراحی‌شده بر مبنای معیار DOPE score با نرم‌افزار محاسبه و بهترین الگو بر اساس کمترین DOPE score انتخاب و ارزیابی شد. مقادیر این معیار برای پروتئین‌های Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A به ترتیب منفی ۶۸۳۸۶/۵۱، منفی ۶۵۶۱۲/۵۲، منفی ۵۸۱۵۷/۵۶ و منفی ۶۴۳۵۴/۱۷ و برای گیرنده‌های AgALP1، AgCad1 و AgCad2 به ترتیب منفی ۵۵۶۸۲/۹۱، منفی ۷۸۸۵۸/۱۵ و منفی ۹۱۷۴۶/۳۱ حاصل شد. پس از انجام بهینه‌سازی ساختاری، ارزیابی کیفیت الگوها در پایگاه ProSA به دریافت امتیازهای منفی ۴/۵۸، منفی ۷/۹۷، منفی ۵/۹۴ و منفی ۸ به ترتیب برای سموم Cry19A، Cry11B، Cry24Ca و Cry39A منجر شد. این امتیاز برای تمام نمونه‌ها بجز Cry11B که اندکی خارج از محدوده مجاز واقع شده بود در محدوده حالت طبیعی حاصل از روش کریستالوگرافی قرار داشت (شکل ۲). بررسی نمودارهای انرژی محلی در چهار پروتئین سمی الگوشده نشان داد انرژی بیشتر ریشه‌های آمینواسیدی کمتر از صفر و منفی است؛ با وجود این، ریشه‌های دارای انرژی مثبت نیز مشاهده شدند که این تعداد در Cry11B و Cry24Ca بیشتر بود و در نیمه انتهایی پروتئین‌ها قرار داشت. نمودار انرژی محلی در دو نمونه دیگر تقریباً در تمام ریشه‌ها با



شکل ۲- نمودارهای ارزیابی توسط پایگاه ProSA برای چهار الگوی پروتئین سمی طراحی شده (ستون سمت چپ: نمودار انرژی کلی ساختارهای طراحی شده؛ نقطه مشکی در هر نمودار امتیاز به دست آمده و جایگاه قرارگیری در محدوده ساختار طبیعی و غیرطبیعی زیر واحد مدنظر است. ستون وسط: نمودار انرژی محلی است. ستون سمت راست: ساختار سه بعدی توسط نرم افزار Jmol است)

جدول ۴- موقعیت و نوع آمواسیدهای غیرمجاز بر اساس نمودار رامانچاندرا

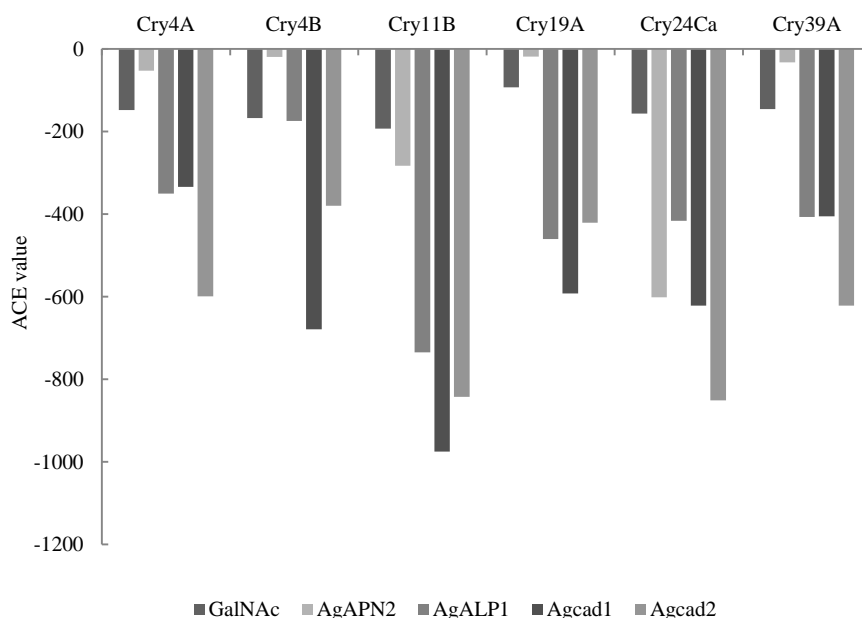
| ردیف | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Cry11B | PHE 6 | THR 8 | THR 9 | GLU 25 | GLU 247 | LEU 250 | SER 259 |
| | LYS 288 | TYR 293 | PHE 333 | LYS 343 | THR 365 | THR 384 | SER 420 |
| | PHE 470 | THR 489 | ASP 490 | GLU 531 | ALA 532 | ARG 547 | ALA 556 |
| | ASN 570 | ASP 615 | LYS 629 | LYS 634 | LYS 645 | VAL 650 | TYR 670 |
| | TYR 686 | CYS 698 | | | | | |
| Cry19A | SER 15 | THR 37 | TYR 40 | LEU 52 | ALA 157 | ASP 163 | GLU 229 |
| | ASN 244 | THR 252 | ALA 267 | LYS 397 | GLY 416 | ASN 435 | ILE 564 |
| Cry24Ca | LEU 39 | ILE 124 | SER 222 | SER 263 | THR 282 | ASN 285 | PHE 312 |
| | THR 393 | HIS 410 | ALA 425 | GLY 498 | | | |
| Cry39A | ILE 20 | ASP 39 | GLY 153 | PRO 233 | PHE 266 | THR 267 | ARG 268 |
| | ASP 318 | THR 372 | ALA 374 | LYS 416 | ARG 471 | SER 505 | ALA 540 |

به Cry19A، AgCad1، Cry24Ca، به AgCad2 و Cry39A به AgCad2 اتفاق افتاده است (شکل ۳). از بین تمام این اتصال‌های قوی، Cry11B محکم‌ترین اتصال را به AgCad1 با عدد منفی ۹۷۵/۳۰ به خود اختصاص داده است و ضعیف‌ترین میل اتصال در تمام پروتئین‌ها به گیرنده‌های AgAPN2 و GalNAC تعلق دارد.

ارزیابی میل اتصال سموم پروتئینی Cry و گیرنده‌ها: نتایج بررسی میل اتصال پروتئین‌های سمی به گیرنده‌ها چندین ناحیه اتصال و برهم‌کنشی دارای امتیاز و ACE مختلف و قابل قبول را آشکار کرد (جدول ۵). همان‌طور که در جدول ۵ دیده می‌شود بیشترین میل اتصال تمام پروتئین‌ها به گیرنده کادهرین حاصل شده است؛ به طوری که قوی‌ترین اتصال بین Cry4A به AgCad2، Cry4B به AgCad1، Cry11B به AgCad1، Cry19A به AgCad1، Cry24Ca به AgCad1 و Cry39A به AgCad1 است.

جدول ۵- میل اتصال سموم پروتئینی و گیرنده‌ها

| AgCad2 | AgCad1 | AgALP1 | AgAPN2 | GalNac | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| -۵۹۹/۴۳ | -۳۳۴/۵۴ | -۳۵۰/۴۲ | -۵۲/۶۶ | -۱۴۷/۹۵ | Cry4A |
| -۳۸۰/۱۰ | -۶۷۸/۹۶ | -۱۷۴/۴۹ | -۱۹/۳۰ | -۱۶۷/۷۱ | Cry4B |
| -۸۴۲/۸۱ | -۹۷۵/۳۰ | -۷۳۴/۹۷ | -۲۸۲/۶۷ | -۱۹۳/۱۲ | Cry11B |
| -۴۲۱/۰۸ | -۵۹۱/۹۴ | -۴۶۰/۲۲ | -۱۸/۸۲ | -۹۲/۹۹ | Cry19A |
| -۸۵۱/۱۴ | -۶۲۱/۶۴ | -۴۱۶/۳۴ | -۶۰۱/۳۰ | -۱۵۶/۴۵ | Cry24Ca |
| -۶۲۱/۵۴ | -۴۰۵/۷۷ | -۴۰۷/۱۷ | -۳۳/۰۵ | -۱۴۵/۶۴ | Cry39A |



شکل ۳- مقایسه ارزش انرژی تماس اتمی پروتئین‌های سمی Cry با گیرنده‌ها بر اساس ACE

بحث و نتیجه گیری

بیماری های منتقل شونده از حشرات و مخصوصاً مالاریا همواره و به ویژه در دهه های اخیر تهدید کننده عمده سلامت بشر بوده اند (۳) و حشره کش های شیمیایی برای کنترل این بیماری از طریق سرکوب جمعیت ناقلان به خدمت گرفته شده اند (۱۱)؛ با وجود این، آثار مخرب این مواد تلاش ها را به سوی یافتن جایگزین مناسب مانند روش کنترل زیستی سوق داده است (۳۳) و در این میان باکتری ها و به ویژه *Bacillus thuringiensis* به علت مزایایی که دارند با اقبال بیشتری در پژوهش ها و صنعت روبه رو شده اند (۱۷). سموم Cry تولیدی این باکتری که از طریق ایجاد منفذ در غشا باعث مرگ سلول و به تبع آن مرگ حشره می شوند تنوع بسیار زیادی دارند و سمیت اعضای Cry4A، Cry4B، Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A آن برای پشه ها به اثبات رسیده است (۲۱-۲۵). با توجه به اهمیت مالاریا و پشه آنوفل ناقل آن، تاکنون پژوهشی انجام نشده است که به بررسی مقایسه ای این سموم از جنبه های ساختاری و عملکردی و همچنین آشکارسازی ساختار ثانویه و فضایی برخی اعضا و میل اتصال به گیرنده های محتمل با هدف شناسایی مناسب ترین، پایدارترین و قوی ترین مورد در خصوص پشه یاد شده و فراهم کردن مقدمات در راستای توسعه روش های نوین مانند پروتئین های نو ترکیب دارای قابلیت کنترل پشه آنوفل پرداخته باشد؛ موارد یاد شده در دستور کار پژوهش حاضر قرار دارند. نتایج پایش طولی و وزن مولکولی منعکس کننده تنوع این دو شاخص در پیش پروتئین های Cry مؤثر بر *Diptera* هستند؛ نتایج یاد شده با یافته های پژوهش های انجام شده در زمینه سایر سموم Cry مؤثر بر دیگر راسته های حشرات موافق هستند (۳۴)؛ با وجود این،

بررسی پروتئین های فعال تقریباً یکنواختی طول و حذف قطعه هایی با طول های مختلف از دو انتهای پیش پروتئین و ایجاد وزن مولکولی در محدوده ۷۰ کیلودالتون را تأیید کرد (موافق با آنچه تاکنون از فعال سازی سموم Cry انتظار می رفت) (۳۵). پروتئین Cry4B در بین سایر اعضا دارای قلیایی ترین pH ایزوالکتریک، کمترین هیدروفوبیسیته و شاخص ناپایداری و شاخص آلیفاتیک زیاد بود (جدول ۱). در نتیجه، این ویژگی ها باعث عملکرد بهتر در محیط گوارشی پشه ها، سهولت استفاده در محیط آبی و مقاومت حرارتی و پایداری زیاد در شرایط زیست محیطی حاکم بر مناطق مالاریا خیز شده است. (۳۶-۳۸). نتایج بررسی توپولوژی، خارج سلولی بودن پروتئین های فعال سمی را در تمام نمونه ها نشان داد (جدول ۲) که با روش عملکرد خارج سلولی این سموم سازگار است (۳۹). نواحی داخل سیتوپلاسمی و داخل غشایی در Cry4A و Cry19A آشکار شدند که احتمالاً به علت طول بسیار کوتاه دارای جایگاه پیش بینی شده در این مناطق نیستند و می توان از آنها صرف نظر کرد. ردیابی نشدن توالی های پپتید نشانه در تمام پروتئین های بررسی شده به استثنای Cry19A تأیید کننده این موضوع است که این سموم مانند سایر اعضای خانواده Cry ترشحی نیستند و درون سلول باکتری به شکل اجسام بلوری تجمع می کنند و تنها پس از لیز سلول باکتری به محیط خارج راه می یابند (۴۰). آشکارسازی توالی رهبر در Cry19A دو احتمال را مطرح می کند: این پروتئین از طریق فرایند ترشح به خارج سلول فرستاده می شود؛ به علت اندازه بزرگ مانند سایر اعضا داخل سلول تجمع می یابد و توالی پپتید نشانه آن عملکرد ترشحی ندارد. بررسی ها برای آشکارسازی دمین های احتمالی و وظایف دمین ها (جدول ۳) نشان دادند تمام پروتئین های فعال سمی

دارای نواحی اتصالی و تشکیل دهنده منفذ و ورود به غشا مشابه دمین‌هایی هستند که تاکنون در سایر اعضای خانواده Cry مشاهده شده‌اند (۴۱). طبق پایش انجام شده، تنها دمین آشکار شده در Cry11B دارای عملکرد ورود به غشا و تشکیل منفذ بود و دمینی با عملکرد اتصالی آشکار نشد؛ باوجوداین، ویژگی حشره کشی و اتصال به گیرنده آن در پژوهش دیگری اثبات شده است (۴۲). این فرضیه مطرح است که دمین اتصالی در توالی این پروتئین وجود دارد، هرچند به علت تشابه بسیار کم آن به سایر اعضای خانواده Cry، عملکرد اتصالی و محدوده و موقعیت آن هنوز شناسایی و در پایگاه‌ها ثبت نشده است. دمین‌های متصل شونده اضافی به کربوهیدرات‌ها در دو پروتئین Cry4A و Cry4B یافت شدند که اتصال این پروتئین‌ها به کربوهیدرات‌هایی مانند N-استیل گالاکتوز آمین در ساختار گیرنده‌ها را مشابه با پروتئین Cry1A مؤثر بر *Lepidoptera* نشان می‌دهند (۴۳). از سوی دیگر، همگون‌های یافت شده وجود انحصاری این گروه سموم پروتئینی را در باکتری‌های گرم مثبت جنس *Bacillus* نشان می‌دهند؛ باوجوداین، آشکارسازی توالی‌های دارای تنوع زیاد ولی عملکرد یکسان به علت قرار گرفتن ژن این پروتئین‌ها روی پلاسمیدها یا عناصر متحرک ژنتیکی و وقوع نوترکیبی‌های بین ژنی و مخلوط شدن قطعه‌های ژنی ایجاد شده است (۴۴)؛ بنابراین دسترسی به ذخایر جدید سموم حشره کشی Cry دارای عملکرد مشابه اما توالی‌های متفاوت میسر شده است که توانایی مقابله و سرکوب حشرات مقاوم شده به سموم Cry پیشین را دارند و دارای دامنه اثر وسیع تری روی چندین گونه پشه و حشره هستند. پیش‌بینی نواحی دارای مارپیچ و صفحه در تمام نمونه‌ها نشان داد نیمه ابتدایی و انتهایی این سموم مانند گزارش‌های پیشین درباره

ساختار کلی و مشترک این خانواده پروتئینی مبنی بر آرایش مارپیچی دمین I و صفحه‌ای بودن دمین‌های II و III دارای چنین ساختاری هستند و نواحی مارپیچ به علت پایداری بیشتر نسبت به دما و ویژگی مثبت مقاومت به دماهای زیاد را به بخش‌هایی القا می‌کند که از صفحات تشکیل شده‌اند (۴۵-۴۷)؛ باوجوداین، طول، توالی، موقعیت و درصد مارپیچ‌ها و صفحات در هر نمونه با نمونه دیگر متفاوت است و نشان می‌دهد این پروتئین‌ها با وجود داشتن تنوع زیاد در توالی، ساختار ثانویه واحد و مشابهی به خود می‌گیرند که از ویژگی‌های اعضای این خانواده است (۴۵). حضور ساختار Coiled-coil که دارای موتیف تکرار هفت تایی از α -helical coiled-coil و احتمالاً محل برهم‌کنش Coiled-coil با سایر پروتئین‌ها است (۴۸) در موقعیت دمین اندوتوکسین N پروتئین‌های Cry19A و Cry39A ردیابی شد که احتمالاً در تسهیل برهم‌کنش با دیگر پروتئین‌ها طی تشکیل همودایمر و الیگومریزاسیون و به تبع آن تشکیل منفذ نقش دارد (۲۷ و ۴۹). ساختار سه بعدی طراحی شده پروتئین‌های Cry (شکل ۲، ستون راست) در تمام نمونه‌ها وجود چند مارپیچ در کنار یکدیگر و نواحی دارای تاخوردگی صفحه و نواحی لوپ‌مانند را نشان می‌دهد که با ساختار مدنظر در سایر اعضا (حاصل از روش‌های تجربی) شباهت بسیاری دارد (۵۰ و ۵۱). قرارگیری نقاط سیاه نشان‌دهنده پروتئین‌های طراحی شده در محدوده منطقه آبی نمودارهای انرژی کلی (شکل ۲، سمت چپ) درستی ساختار طراحی شده و نزدیک بودن آن به ساختارهای طبیعی را نشان می‌دهد. نمودارهای انرژی محلی (شکل ۲، ستون وسط) نیز انرژی هر ریشه آمینواسید را در ساختار پروتئین نشان می‌دهند و بیشتر پیک‌ها در Cry19A و Cry39A عدد منفی به خود اختصاص

این نتیجه به علت کیفیت کم الگوی سه‌بعدی گیرنده طراحی شده حاصل شده است و به بررسی‌های بیشتر و پیشرفته‌تر در آینده نیازمند است (۴۲). به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر ضمن فراهم کردن داده‌های عملکردی مرتبط با سموم پروتئینی Cry، الگوی عملی استفاده بهینه از آنها مبتنی بر تولید سموم توانا بر اساس طراحی پروتئین‌های چندعملکردی در راستای کنترل زیستی پشه‌های مالاریا را فراهم آورد.

References

- (1) Kumari P., Kant S., Zaman S., Mahapatro GK., Banerjee N., Sarin NB. A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic Research* 2014; 23(1): 99-107.
- (2) Montesinos E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 2003; 6(4): 245-252.
- (3) Federici BA., Park H-W., Bideshi DK., Wirth MC., Johnson JJ., Sakano Y., et al. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2007; 23(2): 164-175.
- (4) Christiansen-Jucht C., Erguler K., Shek CY., Basáñez M-G., Parham PE. Modelling anopheles gambiae ss population dynamics with temperature-and age-dependent survival. *International Journal of Eenvironmental Research and Public Health* 2015; 12(6): 5975-6005.
- (5) Christiansen-Jucht C., Parham PE., Saddler A., Koella JC., Basáñez M-G. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* ss. *Parasites and Vectors* 2014; 7(1): 1.
- (6) Gage KL., Burkot TR., Eisen RJ., Hayes EB. Climate and vectorborne diseases. *American Journal of Preventive Medicine* 2008; 35(5): 436-450.

می‌دهند که نشان‌دهنده کیفیت و درستی زیاد الگوهای طراحی شده است؛ از این نظر، نمونه‌های Cry11B و Cry24Ca در حد متوسط ارزیابی می‌شوند. ارزیابی مدل‌های طراحی شده در مورد گیرنده‌های AgCad1 و AgCad2 نتایج خوبی در پی نداشت که به دلیل عدم دسترسی به الگو مناسب و تشابه و هم‌پوشانی بسیار کم بین توالی الگو و توالی مورد نظر مدل‌های مطلوبی طراحی نشدند. آشکارسازی قرارگیری تعدادی از ریشه‌های آمینواسید خارج از محدوده مجاز نمودار رامانچاندران (جدول ۴) در محدوده دمین اتصال با رنگ قرمز نشان داده شده است که احتمالاً در کیفیت اتصال نقش دارد؛ تعداد این ریشه‌ها در Cry19A کم، در Cry24Ca و Cry39A متوسط و در Cry11B بسیار زیاد است؛ با وجود این، به علت شناسایی نشدن دمین اتصالی و قرارگیری آمینواسیدهای زیاد در محدوده غیرمجاز این ضرورت ایجاد می‌شود که ابتدا دمین اتصال و جایگاه‌های اتصالی به گیرنده در این پروتئین تعیین و سپس الگوی طراحی شده بر اساس این نمودار ارزیابی شوند؛ از این رو، در حال حاضر نمی‌توان در این زمینه نظر قطعی داد. منفی‌ترین اعداد ACE و بنابراین بیشترین میل اتصال در برهم‌کنش‌های پروتئین‌های سمی با گیرنده‌های کادهرین حاصل شد و تأییدکننده این موضوع است که احتمالاً کادهرین‌ها گیرنده‌های اصلی و اولیه این سموم هستند (۱۲ و ۲۸)؛ هرچند به علت کیفیت کم الگوهای طراحی شده کادهرین نمی‌توان نظر قطعی داد و بررسی بیشتر در این زمینه نیاز است؛ همچنین اتصال به تمام گیرنده‌ها در تمام پروتئین‌ها با شدت‌های مختلف مشاهده شد که با نتایج پژوهش‌های گذشته موافق است (۴۲ و ۵۲). قوی‌ترین اتصال به Cry11B با AgCad1 مربوط است که با نتایج پژوهش آدانگ^۱ و همکاران متناقض است و احتمالاً

- (7) Knight KL., Stone A. *A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae)*. 2nd ed. College Park, Maryland: Entomological Society of America; 1977.
- (8) WHO. World malaria report 2013. Geneva: World Health Organization; 2014.
- (9) Walker T., Moreira LA. Can Wolbachia be used to control malaria? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011; 106: 212-217.
- (10) Ketseoglou I., Koekemoer L., Coetzee M., Bouwer G. The larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against five African *Anopheles* (Diptera: Culicidae) species. *African Entomology* 2011; 19(1): 146-150.
- (11) Killeen GF., Seyoum A., Knols BG. Rationalizing historical successes of malaria control in Africa in terms of mosquito resource availability management. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; 71(2): 87-93.
- (12) Ibrahim MA., Griko NB., Bulla LA. Cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin is mediated by the cadherin receptor BT-R3 of *Anopheles gambiae*. *Experimental Biology and Medicine* 2013; 1535370213493719.
- (13) Brown AWA. *Insecticide Resistance in Arthropods*. Geneva: World Health Organisation; 1958.
- (14) Raghavendra K., Barik TK., Reddy BN., Sharma P., Dash AP. Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research* 2011; 108(4): 757-779.
- (15) Castagnola A., Stock SP. Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. *Insects* 2014; 5(1): 139-166.
- (16) Pérez-García A., Romero D., De Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 2011; 22(2): 187-193.
- (17) Ruiu L., Satta A., Floris I. Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bull Insectology* 2013; 66:181-186.
- (18) Xavier R., Reena J., Sreeramanan S. Environmental distribution and diversity of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Malaysian Journal of Microbiology* 2007; 3(2): 1-6.
- (19) Van Frankenhuyzen K., Nystrom C. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. Retrieved from <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>. On: 28 February 2010.
- (20) Crickmore N., Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(3): 807-813.
- (21) Delécluse A., Rosso M-L., Ragni A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61(12): 4230-4235.
- (22) Poncet S., Delécluse A., Klier A., Rapoport G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology* 1995; 66(2): 131-135.
- (23) Rosso M-L., Delecluse A. Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene cry19A to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63(11): 4449-4455.
- (24) Berón CM., Salerno GL. Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Current Microbiology* 2007; 54(4): 271-276.
- (25) Ito T., Sahara K., Bando H., Asano S. Cloning and expression of novel crystal protein genes cry39A and 39orf2 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* Bun1-14 encoding mosquitocidal proteins. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 2002; 71(3): 123-128.
- (26) Bravo A., Gómez I., Porta H., García-Gómez BI., Rodríguez-Almazan C., Pardo L., et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology* 2013; 6(1): 17-26.

- (27) Bravo A., Gomez I., Conde J., Munoz-Garay C., Sanchez J., Miranda R., et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2004; 1667(1): 38-46.
- (28) Zhang X., Candas M., Griko NB., Taussig R., Bulla LA. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(26): 9897-9902.
- (29) Bravo A., Likitvivanavong S., Gill SS., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 41(7): 423-431.
- (30) Wiederstein M., Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids Research* 2007; 35(2): W407-W10.
- (31) Sudan AK., Vakhlu J. Isolation and in silico characterization of novel esterase gene with β -lactamase fold isolated from metagenome of north western Himalayas. *3 Biotech.* 2015; 5(4): 553-559.
- (32) Duhovny D., Nussinov R., Wolfson HJ. Efficient unbound docking of rigid molecules. *International Workshop on Algorithms in Bioinformatics* 2002; 2452: 185-200.
- (33) Sharma HC., Sharma KK., Seetharama N., Ortiz R. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *Electronic Journal of Biotechnology* 2000; 3(2): 21-22.
- (34) Höfte H., Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 1989; 53(2): 242-255.
- (35) Bravo A., Sánchez J., Kouskoura T., Crickmore N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(27): 23985-23987.
- (36) Dadd R. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *Journal of Insect Physiology* 1975; 21(11): 1847-1853.
- (37) Munga S., Minakawa N., Zhou G., Barrack O-OJ., Githeko AK., Yan G. Effects of larval competitors and predators on oviposition site selection of *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Journal of Medical Entomology* 2006; 43(2): 221-224.
- (38) Chukwura E., Iheukwumere I. Larvicidal activity of *Ocimum gratissimum* and *Solenostemon monostachyus* leaves on *Anopheles gambiae*. *Journal of Scientific & Industrial Research* 2013; 72: 577-580.
- (39) Roh JY., Choi JY., Li MS., Jin BR., Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007; 17(4): 547.
- (40) Amadio AF., Navas LE., Sauka DH., Berretta MF., Benintende GB., Zandomeni RO. Identification, cloning and expression of an insecticide cry8 gene from *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2012; 23(6): 401-409.
- (41) Li J., Carroll J., Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 1991; 353: 815-821.
- (42) Hua G., Zhang Q., Zhang R., Abdullah AM., Linser PJ., Adang MJ. AgCad2 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae is a putative receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. jegathesan. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2013; 43(2): 153-161.
- (43) Luo K., Lu Y-J., Adang MJ. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1996; 26(8): 783-791.
- (44) de Maagd RA., Bravo A., Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics* 2001; 17(4): 193-199.
- (45) Chattopadhyay A., Bhatnagar N., Bhatnagar R. Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology* 2004; 30(1): 33-54.
- (46) Villegas V., Viguera AR., Avilés FX., Serrano L. Stabilization of proteins by rational design of α -helix stability using

- helix/coil transition theory. *Folding and Design* 1996; 1(1): 29-34.
- (47) Guo J., Harn N., Robbins A., Dougherty R., Middaugh CR. Stability of helix-rich proteins at high concentrations. *Biochemistry* 2006; 45(28): 8686-8696.
- (48) Lee SC., Stoilova-Mcphie S., Baxter L., Fülöp V., Henderson J., Rodger A., et al. Structural characterisation of the insecticidal toxin XptA1, reveals a 1.15 MDa tetramer with a cage-like structure. *Journal of Molecular Biology* 2007; 366(5): 1558-1568.
- (49) Bravo A., Gill SS., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 2007; 49(4): 423-435.
- (50) Aronson AI., Wu D., Zhang C. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *Journal of Bacteriology* 1995; 177(14): 4059-4065.
- (51) Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(3): 775-806.
- (52) Hua G., Zhang R., Abdullah MAF., Adang MJ. Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 2008; 47(18): 5101-5110.

¹- Adang