

Biocomputational Investigations of Structural and Functional Properties of Cry Proteins for Malaria Biocontrol

Mahsa Jalili-Manesh

M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, m.jalilimanesh@mail.um.ac.ir

Aliakbar Haddad-Mashadrizeh*

Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, a.haddad@um.ac.ir

Ali Makhdoui

Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, a.makhdomi@um.ac.ir

Mohammad Reza Housaindokht

Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, housain@um.ac.ir

Abstract

Introduction: Nowadays, climate changes and wide usage of chemical insecticides cause the emergence of *Anopheles* mosquito resistant species and environmental hazards. Therefore, biocontrol as an alternative approach provides the vivid outlook for combating these risks. Hereupon, the special attention is paid to insecticides bacteria especially *Bacillus thuringiensis* and protein derived from it as Cry toxins. However, scrutinizing the structural and functional characteristics of these toxins have not been much attended, so it is aimed in this study by *in silico* investigations.

Materials and methods: For this purpose Cry4, Cry11, Cry19, Cry24 and Cry39 protein sequences were extracted from NCBI database, monitoring structural and functional, physicochemical, topological features, prediction of secondary and three-dimensional modelling were carried out with programs like Interproscan, Protparam, TMHMM, Psipred and modeller9.15. Finally, their binding affinity with relevant receptors was assessed by PatchDock molecular docking program.

Results: The results indicate various features of physicochemical, non-secretory and toxin accumulation. Functional monitoring has traced domains with similar functions of other Cry toxin family members. Secondary structure prediction shows the existence of helixes and sheets in similar distribution pattern with each other. In addition, the design and quality evaluation of 3D structure of all toxins were obtained in desirable level. The binding affinity assessment represents stronger binding of Cry11 and Cry24 to most of the receptors.

Discussion and conclusion: In general, the results of this study, in addition to provision functional data related to Cry toxin, provide optimum practical model of capable toxins production based on multimodal protein design for biocontrol of Malaria mosquitos.

Key words: Malaria, Biocontrol, Cry Proteins, *in silico*

* Corresponding author

Received: October 9, 2017 / **Accepted:** February 21, 2018

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۴۰-۲۵
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
علی اکبر حداد مشه‌دريزه*: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، a.haddad@um.ac.ir
علی مخدومی: 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 پشه‌آنوفل 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 TMHMM، ProtParam، InterProScan، Modeller 9.15 و Psipred 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 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 الیگومریزه‌شدن 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 گیرنده ها تحت قالب FASTA میسر شد.

پایش ویژگی های ساختاری و عملکردی پروتئین های پشه کش Cry و گیرنده ها: طول توالی پروتئینی گیرنده سموم و سموم پشه کش با مراجعه به پایگاه اطلاعات پروتئین NCBI طبق آدرس یاد شده بررسی شد. محدوده پروتئین های فعال درخصوص سموم پشه کش با مراجعه به پایگاه CDsearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) آشکار سازی و دسترسی به توالی پروتئین فعال با استفاده از پایگاه NCBI انجام شد. تعیین ویژگی های فیزیکی شیمیایی، پیش بینی توپولوژی، ردیابی و بررسی وجود توالی های پپتید نشانه احتمالی منحصراً برای سموم پروتئینی پشه کش به ترتیب توسط برنامه های تحت شبکه Protparam پایگاه Expasy

TMHMM (<http://web.expasy.org/protparam>)، و Signal peptide prediction 2.0 ([http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-Signal peptide prediction](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-Signal%20peptide%20prediction)) و انجام

شد. برای واکاوی تغییرات پس ترجمه گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و سولفوریلایسیون از سه برنامه تحت شبکه NetNGlyc، NetPhos و Sulfinator به ترتیب به آدرس های (<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 دمین های احتمالی در هر پروتئین، تعیین موقعیت و طول دمین ها و شناسایی عملکرد و وظیفه آنها انجام می شود از سه

یا آلکالین فسفاتاز سطح سلول برقرار می شود؛ در نتیجه، نفوذ به غشای سلول و تشکیل منافذ یا کانال ها انجام می شود و لیز اسمزی و مرگ سلول رخ می دهد (۲۷). در سازوکار دوم، مسیر پیام دهی سلولی تنها با اتصال مونومر پروتئین به کادهرین فعال می شود و مرگ سلول بدون نیاز به تشکیل الیگومر رخ می دهد؛ این سازوکار همچنان مورد چالش است (۲۸). هر دو سازوکار بر اهمیت برهم کنش سموم پروتئینی Cry و گیرنده سطح سلول از نظر تعیین اختصاصیت و دامنه اثر روی حشرات هدف و همچنین قدرت و شدت عمل سم به عنوان مرحله کلیدی تأکید می کنند (۲۹). پژوهشی در دسترس نیست که به بررسی جامع و مقایسه ای قدرت و اختصاصیت انواع سموم Cry مؤثر بر *A. gambiae* (عضوی مهم از راسته *Diptera*) پرداخته باشد؛ از این رو، پژوهش حاضر برای نخستین بار به واکاوی و پایش اطلاعات در زمینه ویژگی های ساختاری و عملکردی این پروتئین ها با هدف بهبود ویژگی های پشه کشی آنها مبتنی بر مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین در گام های بعدی می پردازد.

مواد و روش ها

گردآوری داده ها: مطالعه منابع و پژوهش های انجام شده به شناسایی و ردیابی چند عضو از پروتئین های Cry مؤثر بر راسته *Diptera* مانند Cry4A، Cry4B، Cry11B، Cry19A، Cry24Ca و Cry39A با شماره های شناسایی به ترتیب ABM97547، CAD30095، CAA60504، CAA68875، CAJ43600 و BAB72016 منجر شد. گیرنده های سطح سلولی این سموم که شامل AgAPN2، AgALP1، AgCad1 و AgCad2 هستند با واکاوی مقاله ها به ترتیب با شماره های 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 Cry11B، Cry4B، 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 کیلو دالتون، 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	---

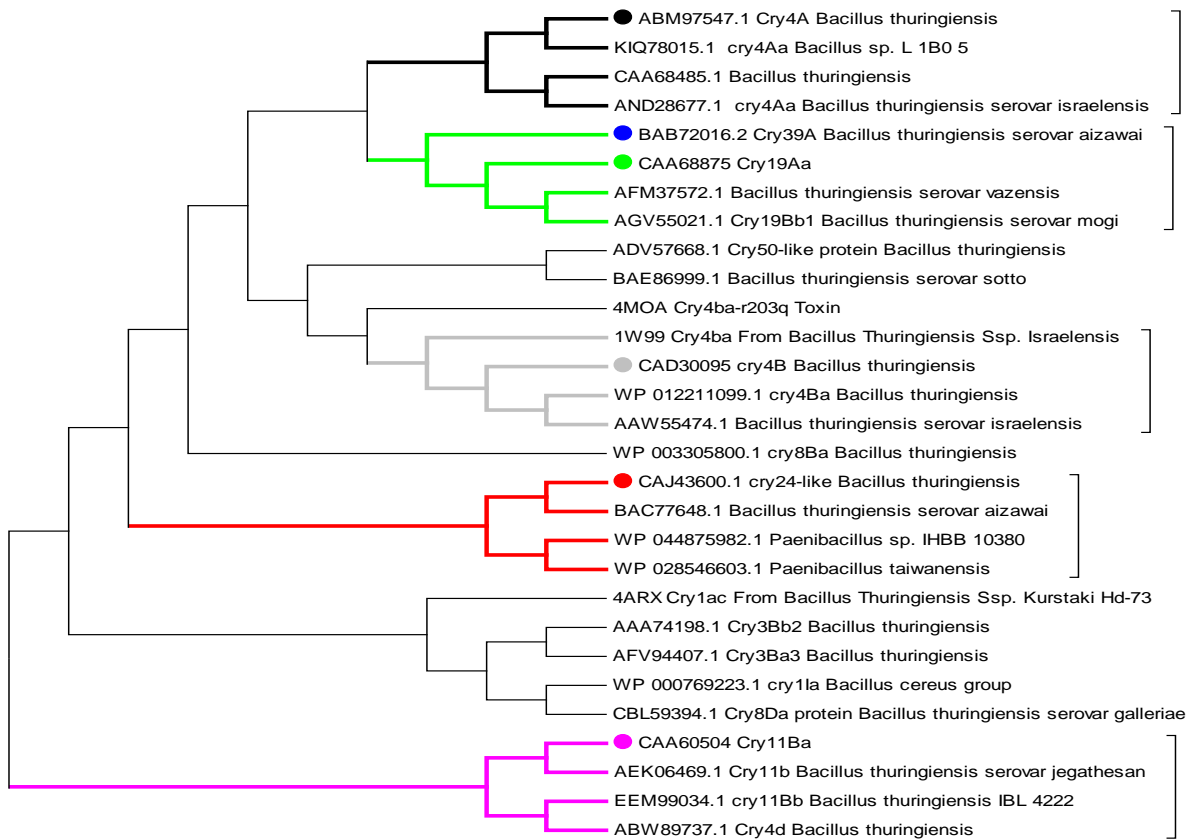
ردیابی ریزموجودات توانا در بیان سموم Cry:

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 Cry39A و Cry19A 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

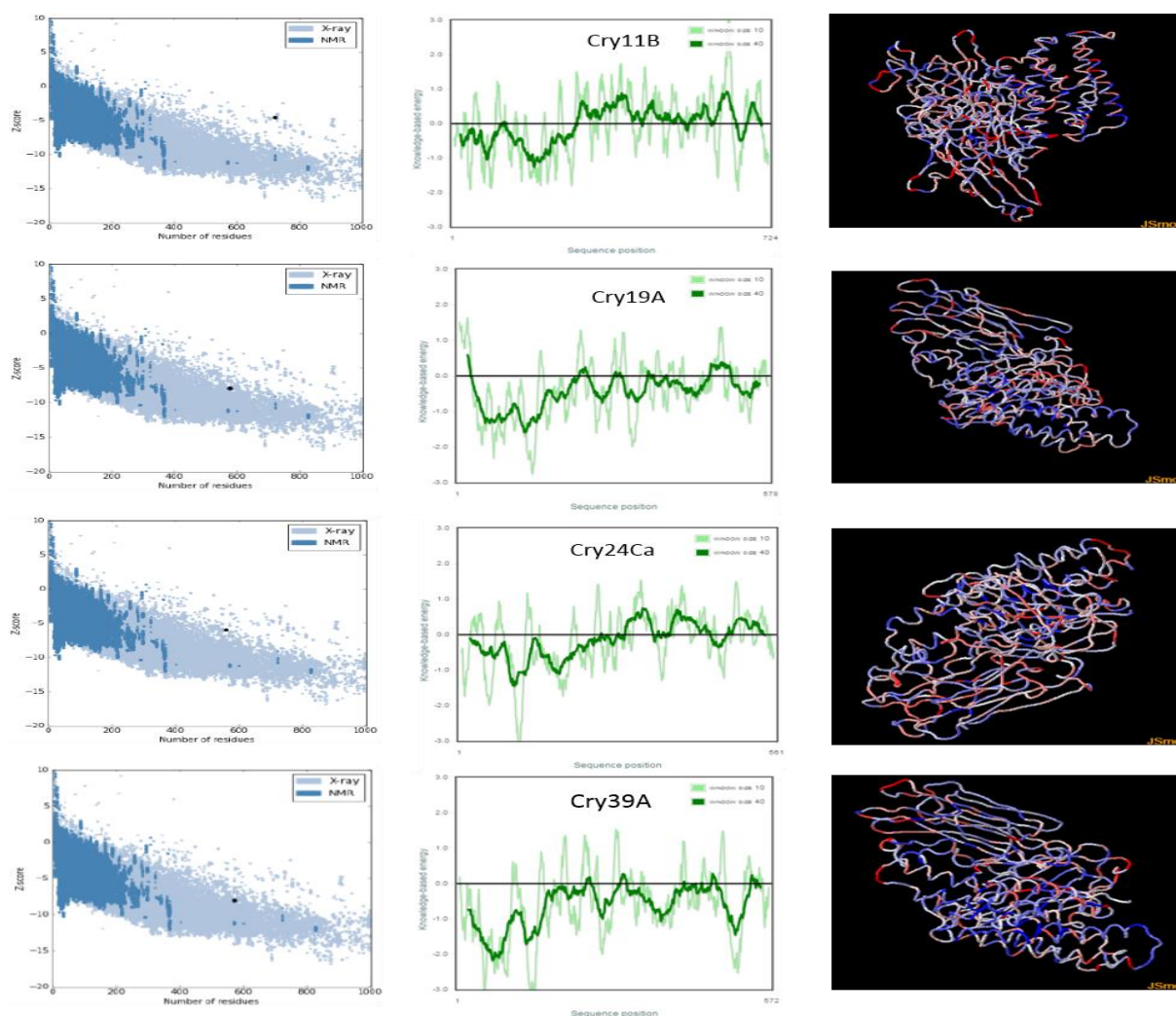
ساختار دوم توالی‌های پروتئینی خانواده Cry:

بررسی ساختار دوم هر یک 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

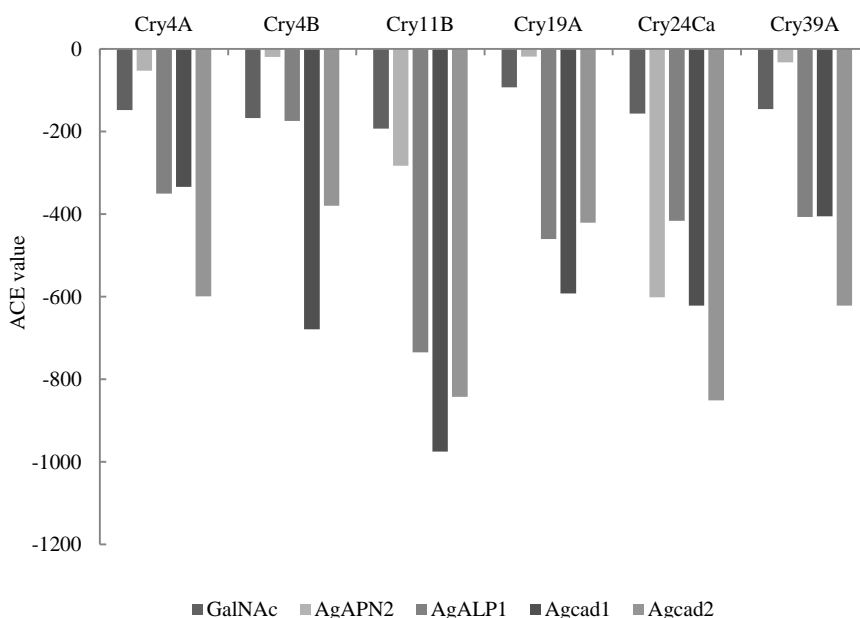
ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
Cry11B	PHE 6	THR 8	THR 9	GLU 25	GLU 247	LEU 250	SER 259
	LYS 288	TYR 293	PHE 333	LYS 343	THR 365	THR 384	SER 420
	PHE 470	THR 489	ASP 490	GLU 531	ALA 532	ARG 547	ALA 556
	ASN 570	ASP 615	LYS 629	LYS 634	LYS 645	VAL 650	TYR 670
	TYR 686	CYS 698					
Cry19A	SER 15	THR 37	TYR 40	LEU 52	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 Cry24Ca، AgCad1 به Cry19A، AgCad1 به Cry39A و AgCad2 به Cry39A و AgCad2 (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 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 AgCad2، Cry19A به AgCad1، Cry24Ca به AgCad1 و Cry39A به AgCad1

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

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 ویژگی مثبت مقاومت به دماهای زیاد را به بخش‌هایی القا می‌کند که از صفحات تشکیل شده‌اند (۴۵-۴۷)؛ باوجود این، 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

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؛ باوجود این، 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 *باسیلیوس* نشان می‌دهند؛ باوجود این، 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

این نتیجه به علت کیفیت کم الگوی سه بعدی گیرنده طراحی شده حاصل شده است و به بررسی های بیشتر و پیشرفته تر در آینده نیازمند است (۴۲). به طور کلی نتایج پژوهش حاضر ضمن فراهم کردن داده های عملکردی مرتبط با سموم پروتئینی Cry، الگوی عملی استفاده بهینه از آنها مبتنی بر تولید سموم توانا بر اساس طراحی پروتئین های چند عملکردی در راستای کنترل زیستی پشه های 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.

می دهند که نشان دهنده کیفیت و درستی زیاد الگوهای طراحی شده است؛ از این نظر، نمونه های Cry11B و Cry24Ca در حد متوسط ارزیابی می شوند. ارزیابی مدل های طراحی شده در مورد گیرنده های AgCad1 و AgCad2 نتایج خوبی در پی نداشت که به دلیل عدم دسترسی به الگو مناسب و تشابه و هم پوشانی بسیار کم بین توالی الگو و توالی مورد نظر مدل های مطلوبی طراحی نشدند. آشکار سازی قرار گیری تعدادی از ریشه های آمینو اسید 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 ریشه ها در Cry19A کم، در Cry24Ca و Cry39A متوسط و در Cry11B بسیار زیاد است؛ با وجود این، به علت شناسایی نشدن دمین اتصالی و قرار گیری آمینو اسید های زیاد در محدوده غیر مجاز این ضرورت ایجاد می شود که ابتدا دمین اتصال و جایگاه های اتصالی به گیرنده در این پروتئین تعیین و سپس الگوی طراحی شده بر اساس این نمودار ارزیابی شوند؛ از این رو، در حال حاضر نمی توان در این زمینه نظر قطعی داد. منفی ترین اعداد ACE و بنابراین بیشترین میل اتصال در برهم کنش های پروتئین های سمی با گیرنده های کادهرین حاصل شد و تأیید کننده این موضوع است که احتمالاً کادهرین ها گیرنده های اصلی و اولیه این سموم هستند (۱۲ و ۲۸)؛ هر چند به علت کیفیت کم الگوهای طراحی شده کادهرین نمی توان نظر قطعی داد و بررسی بیشتر در این زمینه نیاز است؛ همچنین اتصال به تمام گیرنده ها در تمام پروتئین ها با شدت های مختلف مشاهده شد که با نتایج پژوهش های گذشته موافق است (۴۲ و ۵۲). قوی ترین 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