

ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مجموعه پروتئینی Xpt به منظور توسعه روش‌های مولکولی در طراحی نسل جدید آفت‌کشها

مهسا جلیلی منش^۱، علی اکبر حدادمشهدریزه^{۱*}، علی مخدومی^۱ و محمدرضا حسین‌دخت^۳

^۱ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه سلولی و مولکولی

^۳ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

در خصوص ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مجموعه سموم آفت‌کش Xpt اطلاعات کمی موجود است. آگاهی از دمی‌های عملکردی و اتصالاتی در جهت ایجاد سازه‌های ژنی جدید با حذف نواحی غیرضروری یا قرار دادن دمی‌های عملکردی در مجاورت پروتئین‌های دیگر و تولید سموم چندتوان حائز اهمیت است. در پژوهش حاضر محاسبات زیستی این مجموعه جهت آگاهی از ویژگی‌های نواحی مختلف آن انجام گردید. توالی ژنی و پروتئینی این مجموعه شامل زیر واحدهای XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 از پایگاه‌های داده استحصالی و بررسی ساختاری و عملکردی شامل خصوصیات فیزیکوشیمیایی، توپولوژی، دامنه میزبانی، ساختارهای ثانویه و سه‌بعدی توسط برنامه‌های رایج محاسباتی صورت پذیرفت. قابلیت ترشح مستقل از سیگنال پپتید، دمی‌های مرتبط با خاصیت حشره‌کشی و عملکرد سایر دمی‌ها آشکار گردید. واکاوی توالی نواحی عملکردی منجر به آشکارسازی آنها در طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی شد. ساختار ثانویه نشان دهنده ماهیت هلیکسی ناحیه عملکردی XptA1 و XptA2 و صفحه‌ای XptC1 است. قابلیت عملکردی مطلوب XptC1 نسبت به سایر اجزاء در اتصال به اکتین نشان داده شد. به طور کلی، نتایج حاصل از این تحقیق با آشکارسازی اطلاعات پایه‌ای نواحی مختلف مجموعه سموم Xpt امکان طراحی سازه‌های ژنی جدید مبتنی بر زیست‌شناسی سنتزی را فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین Xpt، کنترل زیستی، محاسبات زیستی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۵۱۸۷۰۰۲، پست الکترونیکی: a.haddad@um.ac.ir

مقدمه

آفت قلمداد می‌شود (۷، ۱۲ و ۲۴). با این حال، امروزه به دلیل وجود و بروز برخی کاستیها (۸ و ۱۷) در این نوع حشره‌کش‌های تلاشهایی با هدف شناسایی، تجاری‌سازی و استفاده از ذخایر جدیدی از باکتری‌ها و سموم پروتئینی حشره‌کشی آنها در حال انجام است، که منجر به شناسایی چندین باکتری جدید دارای خاصیت حشره‌کشی شده است. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به گونه‌های *Xenorhabdus* اشاره کرد. این باکتری گرم منفی، متعلق به

اهمیت دو موضوع اساسی امنیت و ایمنی غذایی ضرورت روزافزون کنترل آفات کشاورزی به ویژه حشرات به عنوان تهدید عمده در این حوزه را باعث شده است (۳، ۱۷، ۲۰ و ۲۲). تاکنون روش‌های متعددی برای نیل به این اهداف مورد استفاده قرار گرفته که در این میان کنترل زیستی با تکیه بر باکتری *Bacillus thuringiensis* و محصولات مشتق شده از آن یکی از گسترده‌ترین و کم‌مخاطره‌ترین روشها برای محیط زیست و بروز مقاومت در حشرات

خانواده انتروباکتریاسه، بی‌هوازی اختیاری و همزیست با نماتودهای جنس *Steinernema* می‌باشد (۶ و ۱۳). روابط همزیستی این باکتری با نماتود به موازات مزایایی نظیر محدوده وسیع‌تر طیف اثر، کارایی بالا، عملکرد سریع و سرعت بالا در ایجاد مرگ (۲۳)، عملکرد اختصاصی و نیز عدم نیاز به پوشش محافظ در حین کار نسبت به *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) و سایر حشره‌کشها، به دلیل مواردی مانند وابستگی شدید و عدم توانایی برای زیست مستقل در آب و خاک محدودیت استفاده از این باکتریها به عنوان حشره‌کش را در پی داشته است (۸). در این راستا پژوهشهایی با هدف شناسایی ژنها و آنزیمهای دارای خاصیت حشره‌کشی در این باکتری منجر به شناسایی یک مجموعه پروتئینی مهم به نام Xpt (*Xenorhabdus protein toxin*) شده است (۱۹، ۲۶ و ۲۹). این مجموعه پروتئینی متشکل از چهار زیر واحد XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 می‌باشد و شباهت ساختاری و عملکردی بالایی نسبت به مجموعه پروتئینی Tc (*Toxin complex*) در باکتری *Photorhabdus* به سبب ماندگاری، مشاهده خواص حشره‌کشی ژنها پس از کلون در *E. coli* دارند (۲۱). بر پایه بیان متفاوت کمی و کیفی ژنهای *xpt* اختصاصیت حشره‌کشی و دز کشندگی مختلف در لاروهای *Lepidoptera* مشاهده شده است (۷، ۱۷ و ۲۷). در پژوهشهای اخیر ترکیبات فعال زیستی در این مجموعه‌های سمی با قابلیت اثر بر روی اسکلت سلولی اکتین شناسایی شده که به دلیل مکانیسم عمل و اندامک هدف احتمالی متفاوت با *Bt* توانسته آن را به گزینه مناسب نسل آینده حشره‌کشهای میکروبی بدل نماید (۲۴ و ۲۵). زیر واحد XptA1 چهار بخشی قرینه با ساختاری شبیه قفس یا بطری مانند است. هر کدام از بخشها دارای سه دمین و یک پیچ‌خوردگی طولی با انتهایی باریک‌تر نسبت به انتهایی دیگر دارد. پیش‌بینی محتوی ساختار ثانویه پروتئین حضور مارپیچها و کویلها را در بخش عمده توالی و نسبت کمتر صفحات را نشان داده است (۱۹). در

خصوص ساختار ثانویه یا سه بعدی سایر زیر واحدها اطلاعاتی گزارش نشده است. با این حال به دلیل قدمت اندک شناسایی این باکتری و توکسین مربوطه همچنان اطلاعات اندکی در خصوص خواص این مجموعه پروتئینی و مکانیسم دقیق آن و گیرنده سطح سلولی آن در دست است. امروزه از راه‌کارهای مؤثر جهت افزایش کارایی پروتئینهای نوترکیب با قابلیت عملکرد اختصاصی و نیز افزایش عملکرد آنها، ادغام پروتئینهای عملگرا و یا دمینهای عملکردی مستتر در این پروتئینهاست. در این راستا، در حوزه مبارزه با آفات افزایش کارایی با افزایش دامنه اثر از طریق قرار دادن دمین اتصال مناسب در کنار دمینهای کاتالیتیکی و افزایش قدرت آفت‌کشی با کنار هم قرار دادن دمینهای کاتالیتیکی سموم مختلف می‌تواند مورد بهره‌برداری قرار گیرد که خود نیازمند دسترسی به اطلاعاتی کامل در مورد پروتئینها می‌باشد (۲۵). لذا با هدف فراهم آوردن و افزایش اطلاعات پایه مولکولی، شناسایی و تفکیک نواحی دارای عملکرد در این مجموعه پروتئینی، ردیابی میزبانهای جدید حامل پروتئینهای مشابه به عنوان گزینه‌های احتمالی جهت تولید سموم کارا تر، پیش‌بینی و تعیین ساختار دوم و سه بعدی به منظور پیش‌نیاز توسعه و قدرتمندسازی بیشتر نسل جدید حشره‌کشهای زیستی این تحقیق به آن پرداخته است.

مواد و روشها

واکاوی داده‌ها: با هدف شناسایی اعضای مجموعه پروتئینی سمی Xpt بررسی منابع و مقالات انجام شد که منجر به دستیابی چهار عضو XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 در این خانواده پروتئینی شد.

استحصال توالیهای نوکلئوتیدی، پروتئینی و ساختار سه بعدی: دستیابی به توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژنها و پروتئینهای مورد نظر به ترتیب با شماره شناسایی AJ308438 و شماره‌های دستیابی CAC38401، CAC38402، CAC38403 و CAC38404 از پایگاه

اطلاعات نوکلئوتیدی و پروتئینی NCBI به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) میسر شد.

ساختارهای سه بعدی با کد 1vw1 جهت زیر واحد XptA1 و XptA2، 4igl و 4o9x به ترتیب برای زیر واحدهای XptB1 و XptC1 به عنوان ساختارهای الگو جهت مدل‌سازی سه بعدی از پایگاه RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) استحصال شدند.

از سوی دیگر، توالی پروتئینی اکتین حشره *Plutella xylostalla* (یکی از مخرب‌ترین حشرات آفت راسته *Lepidoptera* در حوزه کشاورزی و به نمایندگی از سایر آفات این گروه) به عنوان اندامک سلولی هدف احتمالی این کمپلکس پروتئینی سمی با شماره شناسایی AEP25396 از پایگاه داده NCBI استحصال و مشابه‌ترین ساختار سه‌بعدی آن به صورت مونومری و بدون هیچ‌گونه لیگاندی از پایگاه Swissmodel به آدرس (<http://www.swissmodel.expasy.org>) تحت فرمت pdb و با کد 3b5u.1.N ذخیره شد.

بررسی دامنه میزبانی و قرابت‌یابی توالیها: برنامه تحت شبکه Protein Blast با آدرس (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) مبتنی بر ماتریکس PAM250 جهت آشکارسازی توالیهای پروتئینی مشابه استفاده شد. نتایج مناسب بر اساس معیارهایی نظیر ارزش E، درصد همپوشانی و همسانی انتخاب، خوشه‌بندی نتایج براساس الگوریتم Neighbor joining برنامه MEGA6 انجام و در نهایت قرابت توالیها نسبت به یکدیگر تحت درخت فیلوژنیک مشخص شد.

بررسی ساختار ثانویه توالیهای پروتئینی: به منظور پیش‌بینی و جمع‌آوری اطلاعات در خصوص وجود، میزان و موقعیت قرارگیری اجزای ساختار ثانویه مانند هلیکسها و صفحات و همچنین حضور یا عدم حضور ساختار Coiled-coil به ترتیب از برنامه‌های تحت شبکه Psipred با روشهای Psipred و Dompered، Paircoil2 با تنظیمات پیش‌فرض و COILs تحت ماتریکس MTIDK به آدرسهای (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>)، (<http://paircoil2.csail.mit.edu/paircoil2.html>) و

بررسی ویژگیهای ساختاری و عملکردی توالیهای انتخابی: بررسی توالی نوکلئوتیدی از لحاظ طول و محتوی GC به ترتیب توسط پایگاه اطلاعات نوکلئوتید به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term>) و Endmemo (<http://www.endmemo.com/bio>) صورت پذیرفت. بررسی ویژگیهای ساختاری توالیهای پروتئینی انتخابی با استفاده از پایگاه پروتئینی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/term>)، برنامه Protparam موجود در پایگاه Expasy به آدرس (<http://web.expasy.org/protparam>) جهت بررسی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی، برنامه TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) با هدف دست‌یابی به توپولوژی ساختاری زیر واحدها، برنامه Signal peptide prediction با آدرس

اطلاعات نوکلئوتیدی و پروتئینی NCBI به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) میسر شد.

ساختارهای سه بعدی با کد 1vw1 جهت زیر واحد XptA1 و XptA2، 4igl و 4o9x به ترتیب برای زیر واحدهای XptB1 و XptC1 به عنوان ساختارهای الگو جهت مدل‌سازی سه بعدی از پایگاه RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) استحصال شدند.

از سوی دیگر، توالی پروتئینی اکتین حشره *Plutella xylostalla* (یکی از مخرب‌ترین حشرات آفت راسته *Lepidoptera* در حوزه کشاورزی و به نمایندگی از سایر آفات این گروه) به عنوان اندامک سلولی هدف احتمالی این کمپلکس پروتئینی سمی با شماره شناسایی AEP25396 از پایگاه داده NCBI استحصال و مشابه‌ترین ساختار سه‌بعدی آن به صورت مونومری و بدون هیچ‌گونه لیگاندی از پایگاه Swissmodel به آدرس (<http://www.swissmodel.expasy.org>) تحت فرمت pdb و با کد 3b5u.1.N ذخیره شد.

بررسی ویژگیهای ساختاری و عملکردی توالیهای انتخابی: بررسی توالی نوکلئوتیدی از لحاظ طول و محتوی GC به ترتیب توسط پایگاه اطلاعات نوکلئوتید به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term>) و Endmemo (<http://www.endmemo.com/bio>) صورت پذیرفت. بررسی ویژگیهای ساختاری توالیهای پروتئینی انتخابی با استفاده از پایگاه پروتئینی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/term>)، برنامه Protparam موجود در پایگاه Expasy به آدرس (<http://web.expasy.org/protparam>) جهت بررسی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی، برنامه TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) با هدف دست‌یابی به توپولوژی ساختاری زیر واحدها، برنامه Signal peptide prediction با آدرس

ارزیابی میل اتصال پروتئینهای انتخابی به پروتئین اکتین: برهمکنش مولکولی و میل اتصال پروتئینهای سمی انتخابی به هدف درون سلولی احتمالی اکتین بر پایه اصول اشکال مکمل توسط برنامه تحت وب Patchdock (۱۱) به آدرس <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock> انجام شد. نتایج براساس انرژی واکنش پذیری اتمی (ACE) از میان ۲۰ راه حل اول با بیشترین اعتبار مورد بررسی قرار گرفتند و مناسب‌ترین نتایج گزینش شدند. آشکارسازی صحت اتصال در موقعیت مناسب با استفاده از برنامه Pymol1 صورت پذیرفت و توسط تصاویر حاصل از این نرم افزار نمایش داده شد.

نتایج

ویژگیهای ساختاری و عملکردی توالیهای مورد بررسی: بررسی ساختاری توالیهای موردنظر منجر به آشکارسازی اطلاعاتی در ارتباط با طول ژن و پروتئین، درصد GC ژنها و نیز تغییرات پس از ترجمه‌ای متفاوت این پروتئینها شد (جدول ۱).

استفاده (<http://www.ch.embnet.org/software/COILS>) شد.

تعیین ساختار سه‌بعدی توالیهای پروتئینی و ارزیابی کیفیت مدل‌های طراحی شده: ساختار 3D زیر واحدهای مورد بررسی توسط نرم‌افزار MODELLER 9.15 تعیین شدند. به این منظور، انتخاب ساختار الگو توسط روش همگون‌یابی در پایگاه داده Pdb صورت پذیرفت، سپس بهترین نتیجه از لحاظ همسانی و همپوشانی انتخاب و از پایگاه PDB به آدرس <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> ساختار سه بعدی به فرمت Pdb ذخیره شد. مدل‌سازی بر پایه هم‌مدیف‌سازی بین توالی الگو و هدف انجام، انرژی مدل‌های طراحی شده براساس معیار $dope\ score$ توسط نرم‌افزار محاسبه شدند و بهترین مدل براساس پایین‌ترین $dope\ score$ انتخاب و سپس بهینه‌سازی ساختارهای طراحی شده توسط نرم‌افزار MOE صورت پذیرفت. اعتبارسنجی مدل‌ها براساس ارزیابی شیمی فضایی (۲۸) با استفاده از نرم‌افزار تحت وب ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (۳۰) و نمودار رامانچاندرا برنامۀ MOE به صورت مجزا انجام شد.

جدول ۱- ویژگیهای ساختاری و تغییرات پس از ترجمه توالیهای ژنی و پروتئینی

ردیف	نام زیر واحد	طول ژن	درصد GC	طول پروتئین (aa)	سیگنال پپتید	گلیکوزیلاسیون/فسفریلاسیون/سولفوریلاسیون
۱	XptA1	۷۵۷۲	۴۰/۸۸	۲۵۲۳	+	+/+
۲	XptA2	۷۶۱۷	۴۹/۱۶	۲۵۳۸	-	+/+
۳	XptB1	۳۰۴۵	۵۰/۱۴	۱۰۱۴	-	-/+
۴	XptC1	۴۲۰۶	۵۰/۳۸	۱۴۰۱	-	+/+

ویژگیهای فیزیکوشیمیایی توالیهای پروتئینی: ارزیابی در این حوزه منجر به آشکارسازی وزن مولکولی بالای پروتئینها در محدوده ۱۱۰ تا ۲۸۷ کیلو دالتونی، بار الکتریکی ۱- تا ۷۴-، pH ایزوالکتریک (pI) ۵ تا ۷، هیدروفوبیسیتۀ ۰/۴۶- تا ۰/۲۷۶-، نیمه عمر بیش از ۱۰ ساعت و شاخص ناپایداری حدود ۳۰ تا ۴۰ و شاخص

مرور نتایج حاصله طویل و بزرگ بودن ژنها و پروتئینها و تشابه در محتوی GC ژنها را نسبت به یکدیگر آشکار نمود. نتایج ارزیابی تغییرات پس از ترجمه شامل گلیکوزیلاسیون، فسفریلاسیون، سولفوریلاسیون هر زیر واحد به صورت مجزا منجر به آشکارسازی این مدیفیکاسیونها در تمامی زیر واحدها شد (جدول ۲).

زیرواحد XptA1 بیشترین وزن مولکولی، شاخص آلفاتیک، بار منفی و شاخص ناپایداری بالای ۴۰ را به خود اختصاص داده که ناپایداری آن را نسبت به سایر زیرواحدها نشان می‌دهد.

آلفاتیک (شاخص آلفاتیک حجم نسبی زنجیره آلفاتیک در اسیدهای آمینه آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین یک پروتئین می‌باشد که اثری مثبت در افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارا می‌باشد.) ۷۵ تا ۹۰ شده است (جدول ۲). همان‌طور که در این جدول نشان داده شده

جدول ۲- مشخصه‌های فیزیکی‌شیمیایی توالیهای پروتئینی زیرواحدها

ردیف	نام پروتئین	وزن مولکولی (دالتون)	بار الکتریکی	pI	هیدروفوبیسیته	نیمه عمر (ساعت)	شاخص ناپایداری	شاخص آلفاتیک
۱	XptA1	۲۸۷۰۰۲/۹	-۷۴	۵/۲۳	-۰/۳۱۹	>۱۰	۴۰/۰۲	۹۰/۰۳
۲	XptA2	۲۸۳۹۹۷/۶	-۴۷	۵/۱۹	-۰/۲۷۶	>۱۰	۳۶/۲۸	۸۶/۴۰
۳	XptB1	۱۱۰۲۵۷/۴	-۱	۷/۰۵	-۰/۳۳۶	>۱۰	۳۰/۵۲	۸۲/۳۶
۴	XptC1	۱۵۷۷۳۶/۴	-۴۰	۵/۱۷	-۰/۴۶۳	>۱۰	۳۹/۷۴	۷۵/۱۸

امتیاز ۲۱/۶ در زیرواحد XptA1 شد. بررسیها در این حوزه در سایر نقاط توالی XptA1 و سایر زیرواحدها نتیجه‌ای در پی نداشت و سیگنال پپتید احتمالی دیگری ردیابی نشد.

بررسی عملکردی توالیهای پروتئینی: این بررسیها منجر به آشکارسازی چندین دمین عملکردی با خاصیت حشره‌کشی و با طولهای مختلف در زیرواحدهای XptA1، XptA2 و XptC1 و نیز دمینهایی با عملکردهای غیرمرتبط با خاصیت حشره‌کشی در تمامی زیرواحدها و چندین دمین با عملکرد ناشناخته در زیرواحد XptB1 شد (جدول ۳).

ویژگیهای توپولوژی توالیهای مورد بررسی: بررسی و پیش‌بینی موقعیت سلولی توالیهای مورد نظر موقعیت خارج سلولی و ترشحی بودن زیرواحدهای XptA1، XptA2 و XptC1 را آشکار کرد. با این وجود، زیر واحد XptB1 نتایج متفاوتی را نشان داد، به گونه‌ای که ۲ دمین گذرنده از غشاء در موقعیت اسیدهای آمینه ۶۲۰ تا ۶۴۶ و ۷۰۹ تا ۱۰۰۸ و همچنین نواحی داخل سلولی از محدوده اسیدآمینه ۶۴۲ تا ۷۲۶ و ۷۳۶ تا ۱۰۱۴ (انتهای پروتئین) در آن آشکار شد. از سویی ارزیابی ماهیت ترشحی بودن کلیه زیرواحدها منجر به آشکارسازی تنها یک توالی احتمالی موردنظر از اسیدآمینه ۷۱ تا ۸۷ با درصد همسانی ۵۲ و

جدول ۳- ویژگیهای عملکردی توالی پروتئینی زیرواحدهای مورد بررسی

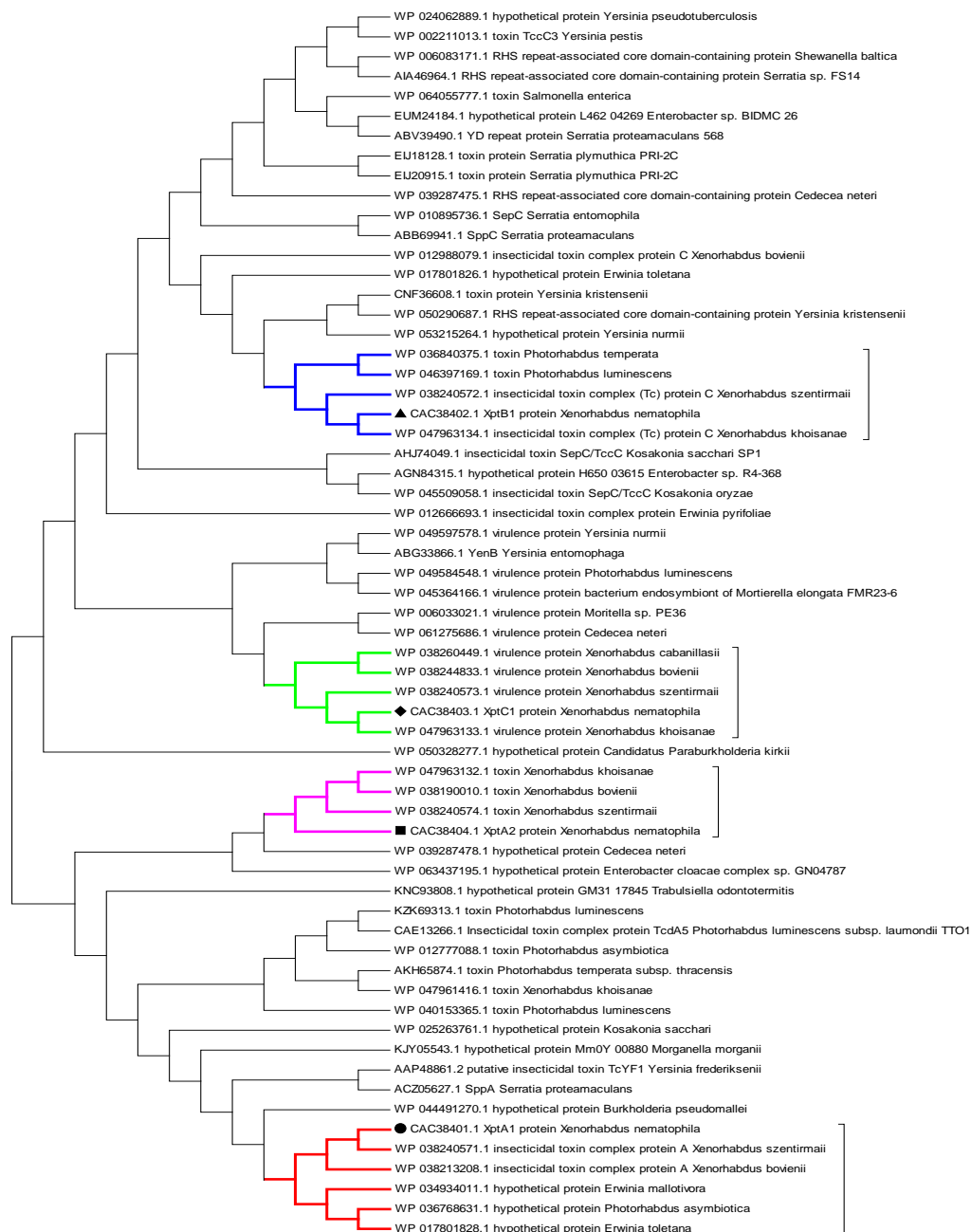
ردیف	نام پروتئین	نام دمین	موقعیت	طول	عملکرد
۱	XptA1	Insecticidal_toxin/plasmid_vir Salmonella virulence plasmid) (28.1kDa A protein	۱-۳۹۸	۳۹۸	تهاجم موفق به سلول میزبان
		Hydrogenase expression/synthesis hypA family	۲۰۷۴-۲۰۸۷	۱۴	متالوچپرون (ورود اتم نیکل به هیدروژنازاها)
۲	XptA2	Insecticidal_toxin/plasmid_vir Salmonella virulence plasmid) (28.1kDa A protein	۸-۲۹۱	۲۸۴	تهاجم موفق به سلول میزبان
		Cu-oxidase_4 Multi-copper polyphenol oxidoreductase laccase	۱۳۱۵-۱۳۳۵	۲۱	تجزیه ترکیبات فنلی و آروماتیک و برخی ترکیبات غیر فنلی

واسطه خروج هسته ای ریبونوکلئوپروتئینی ویروسی	۱۶	۲۲۳۴-۲۲۴۹	<i>Flu_NS2</i> <i>Influenza non-structural protein</i> (NS2)		
عملکرد نامشخص	۲۸	۶۵۲-۶۷۹	<i>Rhs_ assc_core super family</i>	XptB1	۳
عملکرد نامشخص	۱۰۲	۷۲۵-۸۲۶	DUF456		
عملکرد نامشخص	۶۷۱	۷-۶۷۷	<i>RhsA</i>		
پروتئین درپوش قلاب فلاژلی (اسمبل قلاب)	۲۰	۷-۲۶	<i>FlgD</i> <i>Flagellar hook capping protein</i>		
فاقد عملکرد خاص	۱۸	۱۸۰-۱۹۷	<i>Borrelia_rep</i> <i>Borrelia repeat protein</i>		
آنتی ژن سطحی ریکتزیا	۴۴	۸۶۰-۹۰۳	<i>Rick_17kDa_Anti</i> <i>Rickettsia 17 kDa surface antigen</i>		
ریبوزیله کردن اکترین (اثر بر اسکلت سلولی)	۳۰۴	۲۸-۳۳۱	<i>SpvB</i> <i>Salmonella virulence plasmid</i> 65kDa B protein		
مرتبط با توالی تکراری Rhs (نقش احتمالی در اتصال به لیگانند)	۱۸۱	۶۵۵-۸۳۵	<i>TcdB_toxin_midN</i>		
ناحیه میانی انتهای C سم حشره کش TcdB	۱۴۸	۸۸۴-۱۰۳۱	<i>TcdB_toxin_midC</i>		
نقش احتمالی در چسبندگی	۶۲	۴۷۴-۵۳۵	VCBS repeat domain		
توالی تکراری	۲۸	۴۶۶-۴۹۳	<i>FG-GAP repeat</i>		
	۲۹	۵۱۶-۵۴۴			

همسانی و همپوشانی مطلوب و ارزش E مناسب در باکتریهای *Burkholderia pseudomallei*، *Trabulsiella candidatus*، *Erwinia toletana odontotermitis*، *Morganella morganii*، *Paraburkholderia kirkii*، *Enterobacter*، *Cedecea neteri*، *Kosakonia sacchari*، *Kosakonia sacchari*، *Shewanella baltica cloacae*، *Vibrio campbellii* و *Mortierella elongata* بودند. قرابت یابی توالیهای آشکار شده در تمامی زیرواحدها با همسانی بالای ۵۰ درصد، منجر به قرارگیری گونه‌های مختلفی از *Xenorhabdus* و *Erwinia* و *Photorhabdus* با توالیهای مورد نظر در یک خوشه شد (شکل ۱).

ساختار دوم توالیهای پروتئینی: محتوی ساختار دوم زیرواحدهای XptA1 و XptA2 منجر به آشکار سازی عمده ساختار آنها به صورت هلیکس با توزیع و تراکم بیشتر در یک سوم ابتدایی و انتهایی توالی شد.

پراکنش دامنه میزبانی زیرواحدها و تعیین قرابت توالیهای پروتئینی: نتایج همگون یابی توالیهای پروتئینی در هر زیرواحد منجر به ردیابی تعداد زیادی همولوگ در محدوده همسانی و همپوشانی مختلف (همسانی و همپوشانی ۴۰ تا ۱۰۰ درصد در زیر واحد XptA1، همسانی ۳۴ تا ۱۰۰ درصد و همپوشانی بالای ۹۰ درصد برای زیر واحد XptA2، همسانی ۴۷ تا ۱۰۰ درصد و همپوشانی ۶۵ درصد به بالا در XptB1، همسانی ۴۳ تا ۱۰۰ درصد و همپوشانی ۹۶ تا ۱۰۰ درصد در زیر واحد XptC1) و ارزش E صفر در تمامی زیر واحدها شد. توالیهای مشابه یافت شده در تمامی زیرواحدها منحصراً متعلق به باکتریهای گرم منفی بوده و هیچ موردی از آنها در باکتریهای گرم مثبت آشکار نشد. همچنین نتایج مبین حوزه وسیع تر پراکنش میزبانی توالیهای مورد بررسی نسبت به گزارشهایی که تاکنون ارائه شده اند می باشد، به گونه ای که چندین جنس و گونه جدید دارای توالیهای همولوگ با



شکل ۱- قرابت توالیهای پروتئینی بررسی شده نسبت به یکدیگر و همولوگ‌های یافت شده (علائم) (بولتها) بیانگر توالیهای مورد بررسی است و شاخه‌های رنگی مبین نزدیک‌ترین همگونها به پروتئینهای بررسی شده است (آبی: زیرواحد XptB1- سبز: زیرواحد XptC1- صورتی: XptA2 و قرمز: XptA1).

در همین راستا در زیر واحدهای XptA1 و XptA2 به ترتیب تنها ۹ و ۷ درصد توالیها به صفحات بتا اختصاص یافت که بیشترین تراکم این ساختار در قسمت میانی در دو زیرواحد بود. بررسی ساختار دوم زیر واحدهای XptB1 و XptC1 نتایج متفاوتی را آشکار نمود، به طوری که مقادیر صفحات بتا در زیرواحد XptB1 نسبت به هلیکس بیشتر بوده (۱۰/۵ درصد) که تراکم آن در نیمه ابتدایی بیشتر می‌باشد. همچنین مقادیر پیش‌بینی شده برای ساختار

در همین راستا در زیر واحدهای XptA1 و XptA2 به ترتیب تنها ۹ و ۷ درصد توالیها به صفحات بتا اختصاص یافت که بیشترین تراکم این ساختار در قسمت میانی در دو زیرواحد بود. بررسی ساختار دوم زیر واحدهای XptB1 و XptC1 نتایج متفاوتی را آشکار نمود، به طوری که مقادیر صفحات بتا در زیرواحد XptB1 نسبت به هلیکس بیشتر بوده (۱۰/۵ درصد) که تراکم آن در نیمه ابتدایی بیشتر می‌باشد. همچنین مقادیر پیش‌بینی شده برای ساختار

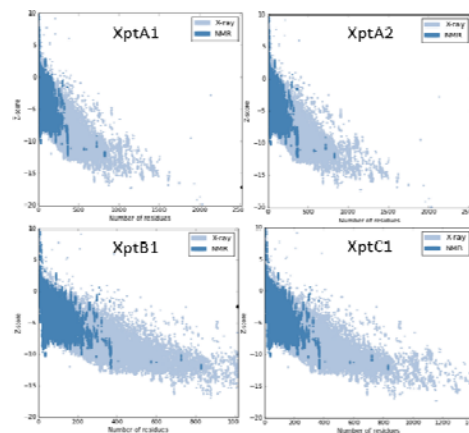
در نمودارهای انرژی محلی (شکل ۳) انرژی ریشه‌های آمینواسید اغلب نواحی در طول توالی پروتئینی در زیر واحد A1 و A2 مقادیر زیر صفر و منفی را به خود اختصاص داده‌اند و تنها تعداد کمی پیک با انرژی بالاتر از صفر در قسمت میانی پروتئینها مشاهده شده است. در خصوص زیر واحد B1 حدود ۹۰ درصد شاهد مقادیر انرژی بالاتر از صفر بوده و در نمودار زیر واحد C1 میزان انرژی بیشتر در محدوده منفی و مطلوب قرار دارد (شکل ۳). تطبیق این نمودارها با ساختار سه بعدی نمایش داده شده توسط نرم‌افزار Jsmol در شکل ۳ ریشه‌های دارای انرژی بالای صفر را به رنگ قرمز نشان داده در حالی که اسیدهای آمینه با کمترین میزان انرژی و پایدارترین حالت به رنگ آبی نشان داده شده‌اند.

بررسی نمودارهای رامچاندردان به دست آمده توسط نرم‌افزار MOE نشان دهنده فرارگیری ۴۲، ۳۷، ۳۵ و ۲۶ اسیدآمینه خارج از محدوده مجاز به ترتیب در پروتئینهای XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 است، که موقعیت و نوع این اسیدهای آمینه تحت جدول ۴ تنظیم شده است.

ارزیابی میل اتصالی توکسین‌های انتخابی به اکتین: نتایج و بررسی میل اتصال و محل برهمکنش اکتین به پروتئینهای طراحی شده مبین وجود چندین ناحیه برهمکنشی دارای امتیازها و انرژی واکنش‌پذیری اتمی مختلف و قابل قبول می‌باشند. از این رو مطلوب‌ترین نتیجه از بین ۲۰ راه‌حل اولیه در زیر واحدهای XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 به ترتیب دارای ACE و امتیاز ۲۰۰/۱۲- و ۱۴۸۴۸، ۲۱۴/۱۶- و ۱۷۱۱۲، ۴۰۷/۵۳- و ۲۳۲۰۲ و ۵۲۷/۲۴- حاصل شد (شکل ۴). همان‌طور که در نمودار مشهود است زیر واحد XptC1 محکمترین اتصال را با اکتین برقرار نموده است. برهمکنش و اتصال اکتین با زیر واحدها در شکل ۵ نشان داده شده است.

هلیکس زیر واحد XptC1 بسیار اندک در قیاس با سایر زیر واحدها بود (۵/۵ درصد) که در نیمه انتهایی توالی مقدار این ساختار بیشتر است. با این حال توزیع صفحات بتا در این زیر واحد نسبت به سایرین یکنواخت‌تر پیش‌بینی شده است. از سویی دیگر، نواحی پیش‌بینی شده حضور ساختار Coiled-coil در زیر واحد XptA1 در انتهای C با موقعیت ۲۲۴۰-۲۱۹۶ و موقعیت‌های ۲۱۳۶-۲۱۰۳، ۲۲۵۶-۲۲۱۱ و ۲۲۷۳-۲۲۵۷ برای XptA2 ردیابی شد.

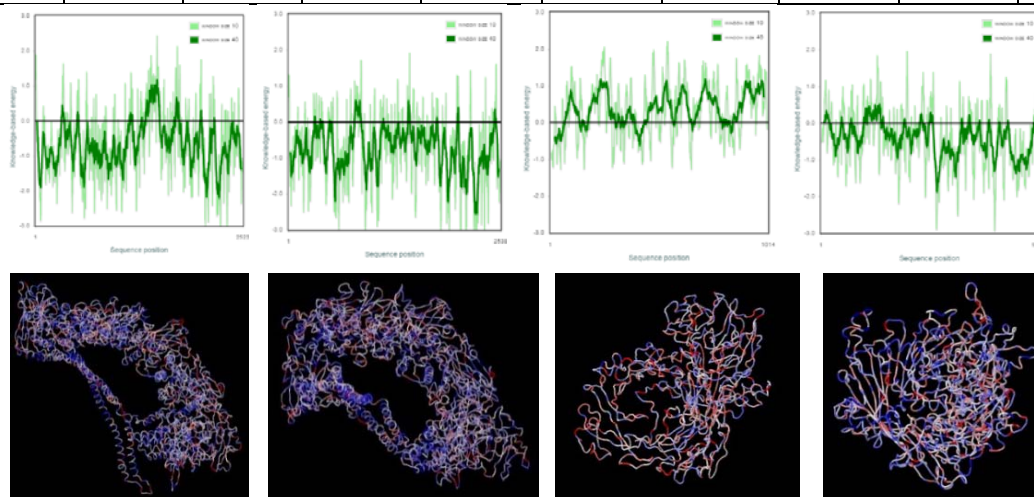
مدلسازی سه بعدی و ارزیابی کیفیت ساختارهای سه بعدی: مقادیر Dope score برای زیر واحدهای XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 به ترتیب ۲۷۱۹۳۳/۸۱۲۵۰-، ۲۶۹۷۱۷/۷۱۸۷۵-، ۶۴۷۲۲/۰۶۶۰۰- و ۱۴۲۰۷۰/۸۷۵۰۰- حاصل شد. ارزیابی کیفیت کلی مدلها توسط نرم‌افزار تحت وب ProSA مقادیر امتیاز Z برای زیر واحدهای A1، A2، B1 و C1 را به ترتیب ۱۷/۱۵-، ۱۸/۱۶-، ۲/۴۴- و ۱۲/۱۳- گزارش کرد. این مقادیر برای زیر واحدهای A1، A2 و B1 علی‌رغم منفی بودن خارج از محدوده حالت طبیعی به دست آمده توسط روش کریستالوگرافی و NMR مشاهده شدند. منحصراً در زیر واحد C1 این مقدار در محدوده طبیعی و مطلوب واقع شده است (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار انرژی کلی ساختارهای طراحی شده (نقطه مشکی در هر نمودار امتیاز به دست آمده و جایگاه فرارگیری در محدوده ساختار طبیعی و غیرطبیعی برای زیر واحد موردنظر است).

جدول ۴- موقعیت و نوع اسیدهای آمینه غیر مجاز بر اساس نمودار رامانچاندوران (موارد قرمز اسیدهای آمینه غیر مجاز در موقعیت دمین عملکردی است).

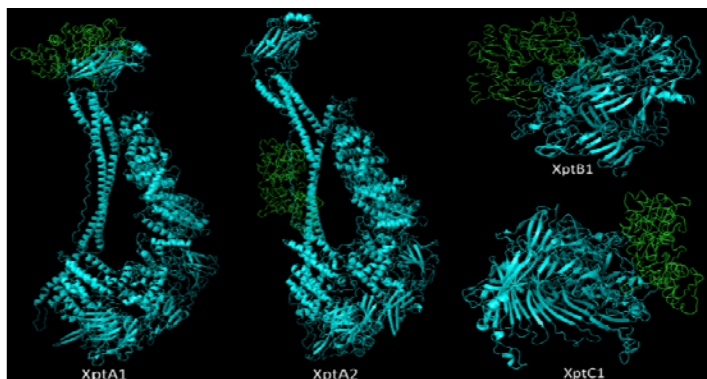
ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
XptA 1	ASN216	LEU217	SER299	GLU352	GLU365	ASN375	LYS378	ASN420	PRO421
	SER422	ASP537	ASN621	PHE730	LYS837	MET899	LYS995	ALA112 6	GLU117 0
	THR138 3	ASN139 4	PHE139 8	ASP144 0	CYS148 2	TYR154 8	ILE1550	TYR156 5	PHE161 2
	LYS165 5	ASN167 0	ILE1671	ASP167 2	SER167 5	ASP174 4	LYS175 6	LYS175 9	MET177 7
	GLY182 8	ASP184 3	PRO186 4	ALA231 8	THR236 1	ASN246 4			
XptA 2	SER3	LYS326	TYR340	ASP341	ASN362	THR424	LYS626	ALA794	ASP800
	GLU821	GLN863	SER907	GLU957	MET105 5	LYS115 4	ASP131 2	SER138 7	SER140 6
	ASP140 7	TYR142 1	LEU146 2	LYS147 8	PHE149 4	SER149 6	SER152 2	SER155 6	ASN156 2
	ASP166 8	GLU167 1	ASP175 9	PHE188 7	PRO196 9	ALA203 9	THR233 2	SER237 6	ASN248 9
	ASP252 7								
XptB 1	ASN17	GLN35	THR175	LYS198	ASP199	SER201	SER221	PHE222	ALA278
	HIS287	GLN302	TYR327	ASN350	VAL354	GLN366	THR397	ASP406	SER418
	GLY458	THR489	LYS539	ILE545	ALA550	LYS619	LEU624	ARG720	THR724
	ALA743	GLU775	SER806	GLU860	ARG861				
XptC 1	ASP556	HIS559	LEU560	LYS563	HIS605	ALA638	ASP671	THR711	SER813
	ASP989	ASP102 2	LYS113 8	THR113 9	GLU114 9	ASN129 1	SER133 4	HIS1395	GLU501



شکل ۳- نمودار انرژی محلی و ساختار سه بعدی توسط نرم افزار Jsmol (تصاویر به ترتیب از چپ به راست: XptA1, XptA2, XptB1 و XptC1)



شکل ۴- مقایسه ارزش انرژی تماس اتمی پروتئینهای طراحی شده با اکتین براساس ACE



شکل ۵- برهمکنش و اتصال زیر واحدها با مولکول اکتین (پروتئینهای سمی با رنگ آبی و اکتین با رنگ سبز نشان داده شده است).

بحث و نتیجه گیری

مجموعه پروتئینی که به عنوان کاندید مناسب در کنترل زیستی محسوب می‌شود انجام شده است. بنابراین شناخت دقیق، بررسی ویژگیهای ساختاری و عملکردی و دستیابی به ساختار سه بعدی و جایگاههای فعال این مجموعه پروتئینی سمی طبق روشهای *in silico* ضمن آنکه می‌تواند راه‌کاری در جهت به کارگیری بهتر، هدفمندتر، سریع تر و کم‌هزینه‌تر این سموم در کنترل زیستی فراهم آورد، می‌تواند به ایجاد و توسعه باکتریهای تراریخت قدرتمندتر و همچنین گیاهان خود محافظ که بتوانند از سازوکارهای مختلف قابلیت حشره‌کشی داشته باشند منجر شود، که در این پژوهش در دستور کار قرار گرفت (۱). مطالعه منابع مجموعه پروتئینی دارای ۴ زیر واحد اصلی XptA1، XptA2، XptB1 و XptC1 را برای القا و ایجاد مرگ در حشرات معرفی کرده است (۲۷). همچنین محتوی GC آنها در حد میانی و بسیار نزدیک به همتا خود یعنی توالی ژنی پروتئین Tc بود (۸) (جدول ۱). به تبع اندازه بزرگ ژن، وزن مولکولی بالای زیرواحدهای پروتئینی نیز مورد انتظار بود. پروتئین XptA1 به میزان جزئی دارای شاخص ناپایداری بالاتر از حد معمول می‌باشد. با این حال به دلیل

کنترل جمعیت حشرات آفت همواره برای بشر با هدف تأمین امنیت غذایی امری مهم تلقی شده است، از این رو حشره‌کشهای سنتزی به کار گرفته شدند (۸). با این حال به دلیل اثرات مخرب این ترکیبات، امروزه روش کنترل زیستی به خصوص باکتریها و محصولات تولید شده توسط آنها به ویژه *Bt* جایگزین مناسب این گروه محسوب می‌شود (۲۹و۸). با این وجود، گزارش به روز مقاومت علیه این سموم تلاشها را در جهت شناسایی باکتریها و سموم جدید برای نسل بعدی حشره‌کشهای میکروبی برانگیخت، که منجر به شناسایی باکتریهای همزیست نماتود از جمله فتورابدوس و زنورابدوس شد. سموم Tc و Xpt این باکتریها از طریق سازوکار احتمالی متفاوت با *Bt* منجر به مرگ سریع لارو حشره می‌شود (۱۷و۱۸). در این راستا، مجموعه پروتئین سمی Xpt به دلیل کلون موفق و حفظ عملکرد پس از کلون شدن نسبت به همتای خود توانسته توجهات را بیشتر به خود جلب کند (۲۷). با این حال تاکنون پژوهشهای مولکولی اندکی در خصوص این

دارا بودن بالاترین شاخص آلیفاتیک در بین سایر زیرواحدها می‌توان آن را پایدار در شرایط محیطی و دارای مقاومت دمایی مناسب در نظر گرفت. در خصوص سایر زیرواحدها این ویژگیها در محدوده مجاز و مناسب قرار دارد (جدول ۲). pH ایزوالکتریک گزارش شده در جدول ۲ مبین قرارگیری این معیار در محدوده اسیدی و خنثی در تمامی زیرواحدها می‌باشد، از این رو با نتایج پژوهش قبلی در مورد XptA1 مبنی بر پایداری ساختار ثانویه در محدوده pH خنثی و قلیایی (۱۹) کمی متفاوت به نظر می‌رسد که می‌توان آن را از طریق تفاوت در توالیهای مورد بررسی در دو تحقیق و همچنین تفاوت در محدوده pH در مورد پایداری ساختاری پروتئین و بیشینه عملکرد و فعالیت پروتئین در pH خاص توجیه کرد. نتایج توپولوژی حاصل کاملاً تأیید کننده ماهیت خارج سلولی و غیر تجمعی این مجموعه پروتئینی در سلول مشابه گزارشهای قبل می‌باشد (۴). با این حال به دلیل آشکار نشدن توالیهای سیگنال پپتید در تمامی زیرواحدها به جز XptA1، دو فرضیه مطرح می‌شود که این پروتئینها همانند برخی از پروتئینهای تاکنون شناسایی شده در باکتریهای گرم منفی از مسیر و مکانیسم مستقل و غیر وابسته به سیگنال پپتید می‌توانند به بیرون از سلول ترشح شوند (۹ و ۱۶)، و یا اینکه توالی سیگنال پپتید در این زیرواحدها وجود دارد اما تاکنون در پایگاههای داده سیگنال پپتید مشابه این توالیها شناسایی مثبت نشده است. وقوع تغییرات پس از ترجمه در تمامی زیرواحدهای پروتئینی (جدول ۱) این اعضا را برای تولید و توسعه موجودات تراریخت یوکاریوتی به ویژه گیاهان تراریخت و خود محافظ در جهت بهره‌وری بیشتر (۲۱) بسیار مناسب و موفق گردانده است، که همین ویژگی می‌تواند مزیت، امتیاز مثبت و ارجحیت این کمپلکس پروتئینی سمی در مقابل دیگر سموم حشره‌کش کاندید شده به حساب آید. نتایج بررسی عملکردی، آشکارکننده چندین دمین مرتبط با فعالیت کشندگی سلول در تمامی زیرواحدها به جز XptB1 است که کاملاً موافق

با یافته‌های قبلی در مورد خاصیت حشره‌کشی زیرواحدها به صورت مجزا و تلفیقی بر روی چندین گونه از حشرات آفت *Lepidoptera* با قدرت و سرعت متفاوت می‌باشد (۲۱ و ۲۷). عملکرد مؤثر بر اسکلت سلولی در پروتئین Tc باکتری فتورابدوس (۱۸) در این بررسی در زیرواحد XptCI ردیابی شد. بخشی از توالی در پروتئینهای مورد بررسی فاقد نقش عملکردی مشخص و دمین شناخته شده هستند که دلیل این موضوع را می‌توان عدم اطلاع از نحوه عمل دقیق این مجموعه بر روی سلول هدف، ناشناخته بودن گیرنده و همچنین وجود برخی دمینها و موتیفهایی با توالی و عمل ناشناخته برشمرد. لذا به سبب پاسخ به سوالات و ابهامات موجود در خصوص مکانیسم اثر و گیرنده سلولی این اعضا پروتئینی مطالعات آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی بیشتر و پیشرفته‌تری در این زمینه احساس می‌شود. همگون‌یابی مشابه با روش شکری و همکاران انجام گردید و پراکنش میزبانی آشکار شده در این پژوهش علاوه بر تأیید حضور توالیهای همگون در باکتریهای مورد انتظار و معرفی شده در سایر تحقیقات مانند گونه‌های فتورابدوس و سرایش با میزان تشابه بسیار نزدیک به مقالات گزارش شده (۲، ۵، ۱۰ و ۱۵)، چندین جنس و گونه جدید که تاکنون وجود توالیهای مشابه و بنابراین خاصیت القای مرگ سلولی و احتمالاً حشره‌کشی در آنها ردیابی نشده بود را آشکار نمود. از این رو، این یافته می‌تواند در جهت دسترسی و استفاده از منابع و ذخایر وسیع‌تر پروتئینی برای سنتز حشره‌کشهای میکروبی جدید و مقابله با بروز مقاومت در آینده راه‌گشا باشد (۱۷). در نتایج حاصل از تحلیل ساختار دوم آشکار شد که در زیرواحدهای XptA1 و XptA2 دمین عملکردی با ویژگی احتمالی حشره‌کشی بیشتر از هلیکسها تشکیل شده است (جدول ۳). در همین راستا، پایداری نسبت به دما و مواد شیمیایی با افزایش میزان این نوع ساختارها در پروتئین نمایش داده شده است (۱۴)، لذا دمینهای آشکار شده در این پروتئینها در صورت استفاده مجزا در ساختارهای

عالی حاصل شد که احتمالاً به دلیل محدودیت پایگاه proSA در سنجش پروتئین‌هایی با اندازه بزرگتر از ۱۰۰۰ اسید آمینه می‌باشد. با این حال نمودارهای انرژی محلی به دست آمده و ساختار سه بعدی نمایش داده شده (شکل ۴) نشان دهنده پایین بودن سطح انرژی و بنابراین پایدار بودن ساختار است. بررسی نمودار رامچاندرا حاکمی از قرار گرفتن تعداد نسبتاً زیادی از اسیدهای آمینه در منطقه غیرمجاز است که البته تعداد کمی از این تعداد در موقعیت دمین عملکردی قرار دارند (جدول ۴)، که البته باید در پژوهش‌های تکمیلی بررسی شوند که آیا این اسیدهای آمینه تأثیری در عملکرد دمین مربوطه دارند و همچنین شاید بتوان با اتخاذ روش‌های دیگر و پیشرفته‌تر مدل‌سازی، بهینه‌سازی و ارزیابی و به خصوص روش تجربی و آزمایشگاهی به نتیجه قطعی و مطلوب رسید. نتایج مشاهده شده در ساختار سه بعدی زیرواحد XptA1 ساختار قفس مانند و حفره میانی را مشابه با ساختار XptA1 بررسی شده در مقاله Lee و همکاران نشان می‌دهد که می‌تواند تا حدودی اثبات کننده صحت مدل‌سازی مجازی باشد (۱۹). به علاوه شباهت توالی مشاهده شده بین XptA1 و XptA2 که قبلاً عنوان شدند (۲۱) منجر به ایجاد تشابه در ساختار سه بعدی این دو نیز شد (شکل ۳ و ۵). مطالعات و تحلیل‌های میل اتصالی با اکتین آشکار کننده وجود جایگاه‌های اتصالی در هر چهار زیرواحد شد که نشان می‌دهد تمامی این اجزاء دارای فعالیت و اثر بر اسکلت سلولی اکتین هستند. با این وجود میل اتصالی XptA1 نسبت به سایر اجزاء پایین‌تر حاصل شده که می‌تواند اثبات کننده فعالیت حشره‌کشی پایین این زیرواحد به تنهایی و نیاز آن به زیرواحدهای دیگر برای القای سمیت کامل در بدن حشره داشته باشد (۲۱). همچنین بیشترین میل اتصال به پروتئین اکتین در زیر واحد XptC1 حاصل شد که با نتایج حاصله از جدول ۳ در ارتباط با وجود دمین عملکردی با وظیفه اثر بر اکتین کاملاً موافق می‌باشد.

هیبریدی ضمن آنکه می‌توانند دارای اثر مورد نظر در کنترل زیستی باشند، دارای قابلیت ماندگاری در شرایط محیطی خواهند بود. در زیر واحد XptC1 نتایج عکس مشاهده شد و دمین مؤثر بر اکتین و دمین احتمالی اتصالی بیشتر دارای ساختار صفحات بوده که از لحاظ مقاومت و پایداری در مقایسه با موارد بالا می‌تواند متفاوت باشد. بررسی وجود ساختارهای Coiled-coil، تکرارهای ۷ تایی با اولین و چهارمین اسید آمینه که اغلب هیدروفوب هستند و پنجمین و هفتمین که غالباً باردار یا قطبی هستند (۱۹)، در زیرواحد XptA1 آشکارکننده یک توالی از این ساختار، مشابه با نتیجه گزارش شده قبلی در این حوزه است (۱۹). در همین راستا، در خصوص زیرواحد XptA2 سه ناحیه با این ساختار پیش‌بینی شد. این نواحی احتمالاً برهمکنش Coiled-coil را با زیرواحدهای مجاور شکل می‌دهند، با این وجود تا کنون در این مورد گزارشی ارائه نشده است. لازم به ذکر است که گفته شود این ساختار گزینه ای مناسب برای ایجاد برهمکنش بین زیرواحدها با یکدیگر هستند (۲۳)، از این رو می‌توان نتیجه گرفت که زیرواحدها به صورت مجموعه با یکدیگر همکاری می‌کنند مشابه آنچه تاکنون انتظار میرفت (۲۶). ارزیابی ساختارهای سه بعدی طراحی شده در ProSA به ویژه در زمینه نمودارهای انرژی کل (شکل ۲) نشان داد که مقادیر امتیاز همه موارد منفی و مناسب بوده ولی به دلیل قرار نگرفتن در محدوده مجاز نمودار احتمالاً کیفیت ساختار در زیرواحدهای XptA1، XptA2 و XptB1 در حد عالی نیستند که می‌تواند به دلیل محدودیت تعداد و همسانی در توالیهای الگو یافت شده و همچنین محدودیتهای نرم‌افزاری و ارزیابی باشد، به دلیل اینکه تاکنون دمین دارای عملکرد حشره‌کشی در XptB1 آشکار نشده است. بنابراین از مدل فضایی آن نیز می‌توان صرف‌نظر کرد. ارزیابی دو زیرواحد اول در خصوص قرار گرفتن خارج از محدوده مجاز نمودار نتایج مطلوبی نداشت با اینکه معیارهای مدل‌سازی این دو مانند *dope score* و *GA341 score* در حد بسیار

منابع

- ۱- جواهری مقدم، م.، آریاپور، ح.، دهنوخلجی، ا.، ۱۳۹۴. طراحی ترکیبات کرومینی جدید با فعالیت ضد سرطانی و بررسی چگونگی میانکنش آنها با توبولین به روش داکینگ مولکولی. مجله زیست شناسی ایران، ج ۲۸، ش ۲. صفحه ۱۹۰-۱۷۸
- Algorithms in Bioinformatics, 185-200: Springer.
- 12- Federici, b. a. (2005). Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of invertebrate pathology* 89(1): 30-38.
- 13- Forst, s., Dowds, b., Boemare, n. & Stackebrandt, e. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus spp.*: bugs that kill bugs. *Annual Reviews in Microbiology* 51(1): 47-72.
- 14- Guo, j., Harn, n., Robbins, a., Dougherty, r. & Middaugh, c.r. (2006). Stability of helix-rich proteins at high concentrations. *Biochemistry* 45(28): 8686-8696.
- 15- Hurst, m.r., Glare, t.r., Jackson, t.a. & Ronson, c.w. (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. *Journal of Bacteriology* 182(18): 5127-5138.
- 16- Koronakis, v. & Hughes, c. (1993). Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. In *Seminars in cell biology*, Vol. 4, 7-15: Elsevier.
- 17- Kumari, p., Kant, s., Zaman, s., Mahapatro, g.k., Banerjee, n. & Sarin, n. b. (2014). A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic research* 23(1): 99-107.
- 18- Lang, a. e., Schmidt, g., Schlosser, a., Hey, t. d., Larrinua, i. m., Sheets, j.j., Mannherz, h. g. & Aktories, k. (2010). *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327(5969): 1139-1142.
- 19- Lee, s. c., Stoilova-Mcphie, s., Baxter, l., Fülöp, v., Henderson, j., Rodger, a., Roper, d. i., Scott, d. j., Smith, c. j. & Morgan, j. a. w. (2007). Structural characterization of the insecticidal toxin XptA1, reveals a 1.15 MDa tetramer with
- ۲- شکری، ا.، نصیری، ن.، نعمت زاده، ق.، ۱۳۹۳. همسانه سازی مولکولی ترادف رمزکننده ژن ATPase -H⁺ غشای پلاسمایی در گراس شورزی *Aeluropus littoralis* مجله زیست شناسی ایران، ج ۲۷، ش ۳. صفحه ۳۸۸-۳۷۷
- 3- Ansari, m.s., Ahmad, s., Ahmad, n., Ahmad, t. & Hasan, f. (2013). Microbial insecticides: food security and human health. In *Management of Microbial Resources in the Environment*, 341-360: Springer.
- 4- Bowen, d. (2000). Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57(5): 828-833.
- 5- Bowen, d. j. & Ensign, j. c. (1995). Characterization of a high molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*.
- 6- Brown, s. e., Cao, a. t., Hines, e. r., Akhurst, r. j. & East, p. d. (2004). A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biological Chemistry* 279(15): 14595-14601.
- 7- Castagnola, a. & Stock, s. p. (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. *Insects* 5(1): 139-166.
- 8- Chattopadhyay, a., Bhatnagar, n. & Bhatnagar, r. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Critical reviews in microbiology* 30(1): 33-54.
- 9- Delepelaire, p. & Wandersman, c. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *Journal of Biological Chemistry* 265(28): 17118-17125.
- 10- Dowling, a. & Waterfield, n.r. (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49(4): 436-451.
- 11- Duhovny, d., Nussinov, r. & Wolfson, h.j. (2002). Efficient unbound docking of rigid molecules. In *International Workshop on*

- a cage-like structure. *Journal of molecular biology* 366(5): 1558-1568.
- 20- Montesinos, e. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6(4): 245-252.
- 21- Morgan, j. a. w., Sergeant, m., Ellis, d., Ousley, m. & Jarrett, p. (2001). Sequence Analysis of Insecticidal Genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied and environmental microbiology* 67(5): 2062-2069.
- 22- Pérez-García, a., Romero, d. & De Vicente, a. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22(2): 187-193.
- 23- Poinar Jr, g. o. (1986). Entomophagous nematodes. *Fortschritte der Zoologie (Germany, FR.)*
- 24- Ruiu, l., Satta, a. & Floris, i. (2013). Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bull. Insectology* 66: 181-186.
- 25- Sainsbury, f., Benchabane, m., Goulet, m.-c. & Michaud, d. (2012). Multimodal protein constructs for herbivore insect control. *Toxins* 4(6): 455-475.
- 26- Sergeant, m., Baxter, l., Jarrett, p., Shaw, e., Ousley, m., Winstanley, c. & Morgan, j. a. w. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Applied and environmental microbiology* 72(9): 5895-5907.
- 27- Sergeant, m., Jarrett, p., Ousley, m. & Morgan, j. a. w. (2003). Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied and environmental microbiology* 69(6): 3344-3349.
- 28- Sudan, a. k. & Vakhlu, j. (2015). Isolation and in silico characterization of novel esterase gene with β -lactamase fold isolated from metagenome of north western Himalayas. *3 Biotech* 5(4): 553-559.
- 29- Wang, q. y., Nangong, z. y., Yang, j., Song, p., Wang, y., Cui, l. & Cui, l. (2012). Toxic activity of a protein complex purified from *Xenorhabdus nematophila* HB310 to *Plutella xylostella* larvae. *Insect Science* 19(3): 329-336.
- 30- Wiederstein, m. & Sippl, m. j. (2007). ProSA-web :interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research* 35(suppl 2): W407-W410.

Assessment of structural and functional properties of Xpt complex protein to develop molecular approach in design of novel generation of pesticide

Jalili-Manesh M.¹, Haddad-Mashadrizesh A.A.^{1,2}, Makhdoumi A.¹ and Housaindokht M.R.³

¹ Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

² Dept. of Cell and Molecular Biology, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

³ Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Little information is available about structural and functional characteristics of insecticidal Xpt protein complex. Awareness of the functional and binding domains is important to create new and more efficient gene constructs by eliminating unessential areas or put up functional domains adjacent to other proteins and produce new multi-functional toxins. Therefore, in this study the biological computing of this complex was done in order to acquiring data about the characteristics of its different areas. After extracting of this complex gene and protein sequences consist of XptA1, XptA2, XptB1 and XptC1 subunits from databases, structural and functional monitoring include physicochemical properties, topology, host range, secondary and three-dimensional structures was done by common softwares. The results reveal the secretion independent of signal peptides, domains related to insecticidal properties and other functions. Also functional domains BLAST leading to tracing broad spectrum of gram-negative bacteria with these sequences that up to now their ability in biocontrol not to be exist. Secondary structure indicates helix nature of functional area in XptA1 and XptA2 and strand of XptC1. Design and evaluation of three-dimensional structures report acceptable quality of all subunits except XptB1. In addition, the desirable functionality of XptC1 compared with other subunits in connection to actin was obtained. The results of this study reveal basic information of different areas of Xpt toxin complex that provides designing of new gene constructs based on synthetic biology.

Key words: Xpt protein, Biocontrol, Biological computing