

شبیه سازی دینامیک مولکولی پروتئین همولیزین *Bacillus pumilus* و داکینگ آن با کلسترول و پیشگویی تغییرات کنفورماسیونی این پروتئین در طراحی دارو با کمک بیوانفورماتیک

نیلوفر ساسانی^۱، حسن محبت کار^۲، گیتی امتیازی^{۳*} تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲۱
تاریخ تصویب: ۹۴/۳/۹

چکیده

همولیزین یک پروتئین خارج سلولی است که توسط بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا ترشح می‌شود. سطح فعالیت آنها غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز خون می‌باشد. همولیزین جزء سموم وابسته به کلسترول می‌باشد یعنی کلسترول را به عنوان گیرنده بر روی سطح سلول‌های خونی شناسایی کرده و از طریق آن به سلول هدف متصل می‌شود. در این تحقیق ما بر روی همولیزین گونه‌ای از باسیلوس به

۱ کارشناس ارشد، زیست فناوری میکروبی، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان.

۲* دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان (نویسنده مسئول (h.mohabatkar@ast.ui.ac.ir)

۳ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

نام *Bacillus pumilus* SAFR0032 کار کرده‌ایم. اهدافی که در این تحقیق دنبال شده شامل شبیه‌سازی دینامیک مولکولی همولیزین در داخل غشای زیستی که برای شبیه‌سازی این پروتئین در غشاء از نرم‌افزار گرومکس استفاده شد. هدف از این شبیه‌سازی بررسی پایداری این پروتئین در داخل غشاهای زیستی می‌باشد. همچنین ما با تعیین جایگاه اتصال این سم با غشاء و شناسایی اسیدهای آمینه درگیر در این اتصال با استفاده از نرم‌افزار اتوداکتوانستیم عوامل دخیل در میانکشی این سم با غشاء را نیز شناسایی و بررسی کنیم سپس با ایجاد موتاسیون در اسید آمینه‌های اصلی درگیر در این اتصال با استفاده از وبگاه PoPMuSiC-1، رفتار این پروتئین جهش یافته با کلسترول غشاء بررسی گردیده است. نتایج حاصل از این تحقیق تاکید می‌کند که موتاسیون‌زایی باعث کاهش تمایل پروتئین همولیزین به کلسترول می‌شود و اتصال میان آنها به شدت سست و ناپایدار می‌گردد. پس می‌توان در شناسایی و طراحی داروهای جدید به ساختار سه بعدی همولیزین‌ها توجه کرد و به عنوان یک ایده نوین در زمینه‌های داروسازی و بهبود داروهای موجود در درمان بیماری‌هایی که به علت همولیزین ترشحی توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اتوداک، باسیلوس پامیلوس، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، موتاسیون، همولیزین

مقدمه

باسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبتی هستند. گونه‌های این جنس توانایی‌های فیزیولوژیکی بسیار متنوعی از خود نشان می‌دهند به طوری که از سویه‌های سرمادوست تا گرمادوست و از سویه‌های قلیادوست تا اسیددوست در این جنس وجود دارند. اکثر گونه‌ها به صورت وسیع و گسترده در طبیعت انتشار دارند که این امر به علت وجود اسپورهای مقاوم این باکتری‌هاست. اعضای این جنس قادر به ترشح محدوده‌ی وسیعی از آنزیم‌ها به داخل محیط کشت هستند. از جمله‌ی این آنزیم‌ها می‌توان به کربوهیدراتازهای مختلف، چندین نوع پروتئاز، پنسیلیناز، نوکلئاز، فسفاتاز لیپاز، فسفولیپاز C، همولیزین یا سیتولیزین‌ها و آنزیم‌های باکتریولیتیک اشاره کرد. به طور کلی باسیلوس‌ها به دو گروه عمده و اصلی تقسیم می‌شوند که شامل گروه باسیلوس سرئوس و گروه باسیلوس سابتیلیس می‌باشند. اعضای گروه *Bacillus cereus* شامل خود *B. cereus*، *B. anthracis*، *B. mycoides*، *B. thuringiensis* سایر باسیلوس‌ها جزء گروه *Bacillus subtilis* هستند از جمله اعضای اصلی این گروه *Bacillus subtilis*، *B. pumilus*، *B. licheniformis* (Østensvik et al. (2004), Priest et al. (1988)). برخی از باکتری‌ها برای محافظت از

خود و حمله بر علیه واکنش‌های سلول‌های میزبان محصولات سمی را تولید می‌کنند که یا ماهیت پروتئینی دارند یا ممکن است طبیعت غیر پروتئینی داشته باشند، سموم می‌توانند از مولکول‌هایی تشکیل شده باشند که شامل یک یا چند زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی هستند (Zdanovsky et al. (2000) در واقع باکتری‌ها یک ابزار پیشرفته و توسعه‌یافته برای تحت تاثیر قرار دادن عملکردهای حیاتی سلول میزبان دارند و اجازه می‌دهند تا با دستکاری سلول هدف عملکرد سلول میزبان را به نفع خود تغییر دهند. Manuel R et al. (2011). گروهی از این سموم همولیزین‌ها هستند که کلاس بزرگی از سموم پروتئینی و معمولاً فاکتورهای بیماری‌زای مهمی به حساب می‌آیند. این سموم حفره‌هایی در غشای پلاسمایی سلول‌های یوکاریوتی ایجاد می‌کنند که این حفرات باعث از بین رفتن تعادل یونی غشاء و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود. فعالیت همولیتیک آنها بر روی گلبول‌های قرمز خون برای کسب مواد مغذی و ایجاد شرایط خاص مانند کم‌خونی در بدن توسط برخی از پاتوژن‌ها است. پس از اتصال مونومرهای سم به غشاء، اولیگومریزاسیون مونومرها به صورت حفره‌های تراغشایی انجام می‌گیرد که باعث تسهیل نفوذ کنترل نشده‌ی آب، یون‌ها و مولکول‌های آلی کوچک می‌گردد. خروج سریع مولکول‌های حیاتی مانند ATP، از بین

رفتن پتانسیل غشاء و شیب یونی، تغییر پتانسیل اسمزی و در نهایت منجر به تورم و تجزیه‌ی سلول میزبان می‌گردد، با تجزیه‌ی گلبول‌های قرمز خون میزان زیادی آهن در بدن آزاد می‌شود و سلامت سلول به خطر می‌افتد. تولید این پروتئین به طور گسترده‌ای در خانواده‌ی باسیلوس‌ها گسترش یافته است از جمله توسط باسیلوس سرئوس و باسیلوس ترنجنسیس و سایر اعضای این خانواده (Saritharan (2006), Vesper and Thompson et al. (2011), Vesper (2004). جالب اینجاست که توانایی تولید سموم ایجاد کننده‌ی حفره در طول تکامل در بین کرم‌ها، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی اخیراً انسان‌ها نشان داده شده است (Bischofberger et al. (2009), Iacovache et al. (2008). یکی از مهمترین اعضای این گروه که توسط باکتری‌های گرم مثبت ترشح می‌شود سموم وابسته به کلاسترول یا Cholesterol Depending Toxin می‌باشد. این سموم حفره‌هایی را در غشای پلاسمایی سرشار از کلاسترول سلول‌های یوکاریوتی ایجاد می‌کنند و می‌توانند تاثیرات سلولی متفاوتی را در غشاء القا کنند (Hotze and Tweten (2012) ساختار و عملکرد مرتبط با این سموم در چهار گونه‌ی باکتریایی از جمله استرپتوکوک، لیستریا، کلاستریدیوم و باسیلوس شناخته شده است (Alouf Geoffroy (1991), Billington et al.

(1997). شرط لازم برای عملکرد یک CDT حضور کلاسترول در غشاء است. در بین تمام لیپیدهای مختلفی که در شکل دادن به تنوع سلولی غشاء نقش دارند کلاسترول یکی از ویژگی‌های متمایز در سلول‌های پستانداران می‌باشد. در واقع کلاسترول به عنوان گیرنده برای این سموم عمل می‌کند (Ohno Iwashita et al. (1991). کلاسترول ساختار چندحلقه‌ای داشته و نقش عمده‌ی آن استحکام و انعطاف‌بخشی به غشا سلول‌ها است. اولین قدم برای فعالیت CDT‌ها شناسایی سلول هدف می‌باشد که از طریق شناسایی لیپیدهای ویژه‌ی غشاء، کلاسترول، یا به وسیله‌ی پروتئین‌های به دام افتاده در غشاء متصل می‌شوند. بعد از موفقیت در شناسایی و اتصال CDT‌ها به گیرنده‌های سطح سلول هدف اولیگومریزاسیون در سطح غشاء برای شکل‌گیری کمپلکس پیش‌حفره آغاز می‌شود. مونومرهای همولیزین از طریق شناسایی گیرنده‌های سطح سلول همان‌طور که در بالا گفته شد، به سطح غشاء متصل می‌گردند. مونومرها شروع به اولیگومریزاسیون کرده و ساختار اولیگومر را گسترش داده تا جایی که ساختار حلقه‌ای به دست آید (Hotze and Tweten (2012), Rodney (2005), Gonzalez MR et al. (2008), Hotze and Tweten (2012). در این پژوهش برای تشکیل مجموعه‌ای از ساختارهای پایه تشکیل شده بین کلاسترول

میان کلاسترول و همولیزین پرداخته و عوامل موثر در میانکنش بین آنها را مشخص کرده‌ایم و در ادامه با موتاسیون بر روی این عوامل رفتار همولیزین در برخورد با کلاسترول بررسی شده است و نتایج مورد قبولی برای کاهش میل همولیزین به کلاسترول و در نتیجه کاهش عملکرد این سم در بدن به دست آمد.

مواد و روش ها

پیش‌گویی ساختار سوم از طریق مدلسازی با همولوژی مدلینگ

از آنجایی که ساختار PDB همولیزین باسیلوس پامیلوس SAFR0032 در بانک داده‌های پروتئین وجود ندارد با استفاده از همولوژی مدلینگ با کمک نرم افزار Modeller برای پروتئین‌هایی که الگوی مناسب برای آنها وجود ندارد شبیه سازی انجام گرفته شد. توالی کامل ژنوم این باسیلوس در NCBI با عدد دسترسی AY167879,1 وجود دارد و همولیزین این سویه به عنوان الگویی برای شبیه سازی استفاده شد.

خروجی نرم‌افزار شامل ۵ مدل می‌باشد که بر اساس دستور کار نرم‌افزار و براساس امتیاز نرم‌افزار (DOPE) مدلی که کمترین امتیاز را دارد انتخاب و برای مطالعات بعدی استفاده گردید. بایستی توجه داشت یک توالی پروتئینی می‌تواند

و همولیزین و بررسی واکنش‌های بین آنها از داکینگ مولکولی استفاده گردید. داکینگ مولکولی یک روش معمول است که برای محاسبه‌ی برهمکنش پروتئین-لیگاند به کار می‌رود و یک تکنیک مفید برای پیش‌بینی جایگاه پیوندی لیگاند روی کل پروتئین می‌باشد. مطالعات دینامیکی روی شیوه‌های پیوندی جهت ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و برهمکنش‌ها ضروری می‌باشد. داکینگ مولکولی می‌تواند با استفاده از نرم‌افزار اتوداک انجام گیرد. اتوداک یک نرم‌افزار خودکار برای پیش‌بینی واکنش بین لیگاندها و ماکرومولکول‌های زیستی می‌باشد. انگیزه‌ی استفاده از این نرم‌افزار به دلیل مشکلاتی از جمله طراحی ترکیبات فعال زیستی و به ویژه طراحی کامپیوتری داروها صورت گرفته است. پیشرفت در شناسایی ساختار کریستالوگرافی مولکول‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌تواند در اهداف زیستی مورد استفاده قرار گیرد و یا کلیدی برای درک جنبه‌های اساسی زیستی باشد. تعامل دقیق این عوامل یا سایر مولکول‌ها با هدف‌هایشان یک فرایند بسیار مهم است. در واقع هدف از طراحی نرم‌افزار اتوداک کمک به محققان در شناسایی و تعیین کمپلکس‌های ماکرومولکول‌های زیستی است. در این پژوهش ما با انجام داکینگ میان همولیزین و کلاسترول به تجزیه و تحلیل واکنش‌های

سیستم شبیه‌سازی شامل پروتئین همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032، غشای لیپیدی دولایه و مولکول‌های آب بودند. حلال (شامل آب و یون‌ها) و همچنین پروتئین و لیگاند در یک دمای ثابت جفت شدند. شش یون کلر با مولکول‌های آب جایگزین گردید تا مطمئن شویم که بار کل سیستم شبیه‌سازی شده خنثی باشد. سیستم نهایی در جعبه‌ای با ابعاد $6/5 \times 6/7 \times 6/7$ آنگستروم قرار داده شد و فرایند بهینه‌سازی انرژی در دو مرحله به تعادل-رسانی و مرحله تولید انجام گرفت (بر طبق دستور کار نرم افزار گرومکس). شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در ns³⁰ به مدت ۴ روز در سیستم run گردید. تمامی نکات ذکر شده بر اساس دستور کار گرومکس در پایگاه اطلاعات www.bevanlab.biochem انجام گرفته است.

انجام داکینگ

پس از مدل‌سازی و بدست آوردن ساختار سه بعدی پروتئین مراحل کار با اتوداک آغاز می‌شود. در واقع داکینگ خودکار برای اتصال لیگاند در مکان‌های مناسب به پروتئین استفاده می‌شود. برای انجام کار برنامه اتوداک ۲,۴ اجرا شده است. تمام مولکول‌های آب از پروتئین اصلی پاک می‌شود و اتم‌های قطبی هیدروژن اضافه می‌گردند و بار، حلال پوشی اتم‌ها و حجم اجزاء با استفاده از نرم‌افزار اتوداک حساب

چندین مدل داشته باشد ولی در طبیعت وجود تمام این مدل‌ها امکان پذیر نیست و بایستی بهترین مدل با انرژی بهینه و ساختاری تقریباً نزدیک به ساختار موجود در طبیعت انتخاب گردد (<http://salilab.org/modeller/modeller.html>) Sali and Blundell (1993); Sanchez and Sali (2000). برای ارزیابی کیفیت مدل ساخته شده از توالی پروتئین همولیزین و اینکه آیا ساختار حاصل از پروتئین مورد نظر از لحاظ انرژی پایدار است بعد از مدل‌سازی با استفاده از نرم‌افزار MODELLER، با کمک نرم‌افزار دیگری به نام PROCHECK نمودار رامچاندرا پروتئین مدل شده را رسم می‌نماییم، نمودار رامچاندرا وضعیت مجاز هر زاویه را برای ساختارهای پروتئین نشان می‌دهد و بیان می‌کند که آیا اسیدهای آمینه پروتئین ما در مناطق مجازند هستند یا نه؟ (Laskowski et al. (1993)

شبیه‌سازی همولیزین در غشای لیپیدی با استفاده از نرم‌افزار گرومکس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار گرومکس ۶۱,۴ بر اساس میدان نیروی گروموس ۶a ۵۳-۹۶ انجام گرفته است. پیکربندی (ساختار سه بعدی) پروتئین همولیزین SAFR0032 با استفاده از نرم‌افزار MODELLER به دست آمد، اجزای

مطالعه‌ی داکینگ همولیزین به کلسترول با استفاده از برنامه‌ی اتوداک ۲,۴ انجام گرفت. قبل از اجرای داکینگ فایل‌های ورودی آن بایستی توسط برنامه‌ی اتوداک و اتوگرید تهیه شوند.

ایجاد موتاسیون در پروتئین همولیزین با استفاده از وبگاه ۲.۱-PoPMuSiC:

PoPMuSiC-2.1 یک وبگاه برای پیش‌بینی تغییرات ثبات ترمودینامیکی ناشی از جهش‌های منفرد در پروتئین می‌باشد. ارائه عملکرد پیش‌بینی این وبگاه بسیار کارا و موثر بوده و علاوه بر این بسیار سریع تغییرات ثبات پروتئین‌های جهش یافته را پیش‌بینی می‌کند و یک نرم‌افزار نه چندان پیچیده برای کاربران می‌باشد. علاوه بر بررسی ثبات پروتئین جهش یافته این وبگاه قادر است نقش بهینه هر اسید آمینه را در توالی پروتئین مورد نظر مشخص کند و با این ویژگی می‌توان نقاط ضعف ساختاری را با توجه به اسیدهای آمینه نامطلوب که نشان‌دهنده جایگاه‌های ویژه برای جهش است مورد هدف قرار داد. در واقع با جابجایی یک آمینو اسید با آمینو اسید دیگر در جایگاهی خاص از توالی آمینواسیدی، می‌توان تغییراتی را در ساختمان پروتئین اعمال کرد که این تغییرات عملکرد آن پروتئین را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد.

می‌شود. فایل‌های مختصاتی در فرمت pdbqt ساخته می‌شوند که شامل بارهای جزئی اتمی و نوع اتم‌ها است. این فرمت مخصوص اتوداک می‌باشد. در این فرمت‌ها اطلاعاتی از قبیل بارهای نسبی، اتم‌های هیدروژن قطبی و انواع اتم‌ها را می‌توان مشاهده کرد و همچنین حاوی اطلاعاتی در مورد درجات آزادی زاویه ای نیز می‌باشد. محاسبه‌ی سریع انرژی از طریق محاسبه‌ی پتانسیل‌های تمایل اتمی برای هر نوع اتم در مولکول لیگاند که در حال داک شدن است انجام می‌شود، در محاسبات اتوگرید پروتئین در یک شبکه‌ی سه بعدی قرار داده می‌شود و یک اتم پراب در هر نقطه از این شبکه قرار می‌گیرد. هر Grid یا شبکه متمرکز شده در ساختار کریستالی مرتبط با همولیزین سوویه مورد نظر متصل به کلسترول با ابعاد ۶۰ X ۶۰ X ۶۰ آنگستروم است. پروتئین در داخل این گرید ثابت می‌شود و لیگاند طبق دستور استاندارد در حدود ۲۷۰۰۰ بار به دور پروتئین می‌چرخد. برای کلسترول که در این Grid box قرار گرفته نقطه‌ی شروع و جهت‌گیری‌ها کاملاً تصادفی است. حداکثر ۲۵ میلیون ارزیابی انرژی برای هر اتصال انجام می‌گیرد و نتایج با استفاده تولرانس ۰/۲ آنگستروم دسته‌بندی می‌شود. مراحل انجام کار در هر مرحله به طور کامل توضیح داده شده است

(Adinarayana and Devi (2011), Garrett et al. (2009).

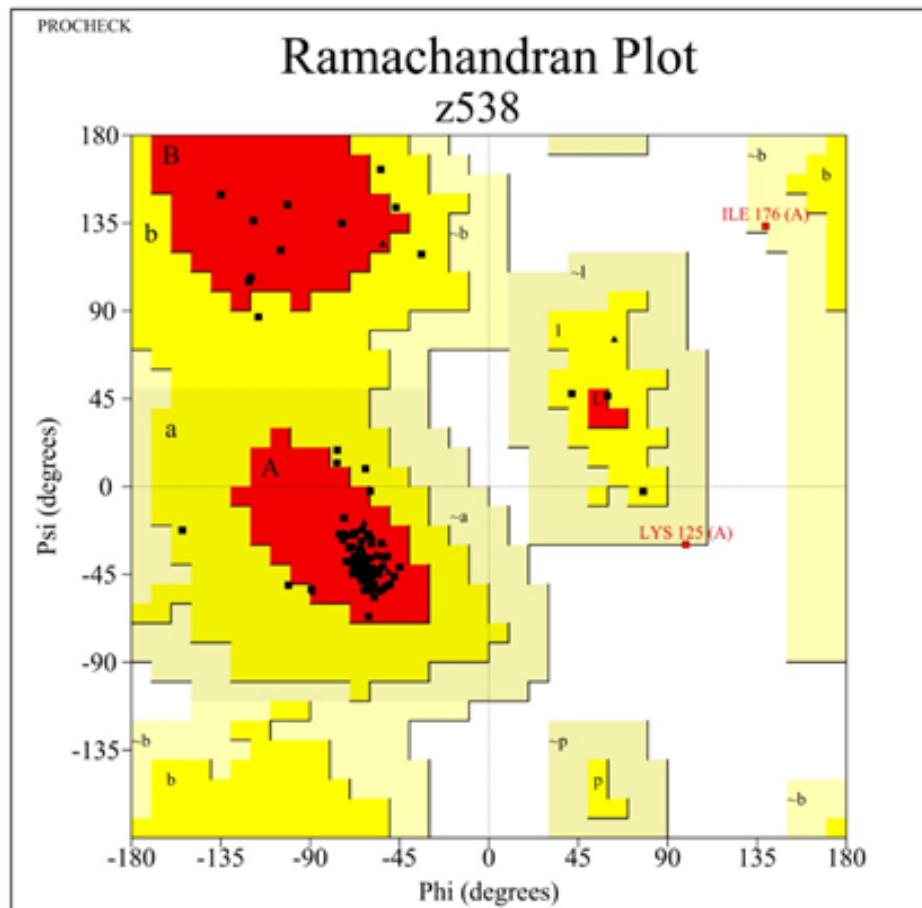
نتایج

Verify3D و PROCHECK

همان‌طور که در قسمت‌های بالاتر گفته شد، همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 پروتئینی است که ساختار PDB آن در بانک داده‌های پروتئینی وجود ندارد. در این مطالعه ما با استفاده از نرم‌افزار MOD-ELLER پروتئین مورد نظر را مدل‌سازی کرده، که خروجی نرم‌افزار برای توالی این پروتئین شامل ۵ مدل بود. بر اساس دستور کار نرم‌افزار و براساس امتیازدهی نرم‌افزار (DOPE) مدلی که کمترین امتیاز را داشت انتخاب و برای مطالعات بعدی استفاده گردید. با توجه به اینکه یک توالی پروتئینی می‌تواند چندین مدل داشته باشد ولی در طبیعت وجود تمام این مدل‌ها امکان‌پذیر نیست، بایستی بهترین مدل با انرژی بهینه و ساختاری تقریباً نزدیک به ساختاری که در طبیعت یافت می‌شود، انتخاب گردد، سپس با استفاده از نرم‌افزار PRO-CHECK نمودار رامچاندران استاندارد را به دست آمد، که نشان می‌داد بیش از ۹۰٪ این اسیدهای آمینه در ناحیه مجاز نمودار قرار گرفته شده‌اند، و این بیان‌کننده‌ی مدلی با کیفیت بالا است. در واقع نمودار رامچاندران با اندازه‌گیری زوایای فی و سای اسیدهای آمینه، زوایای مجاز اسیدهای آمینه‌ی تشکیل‌دهنده‌ی پروتئین را نمایش می‌دهد، نواحی قرمز

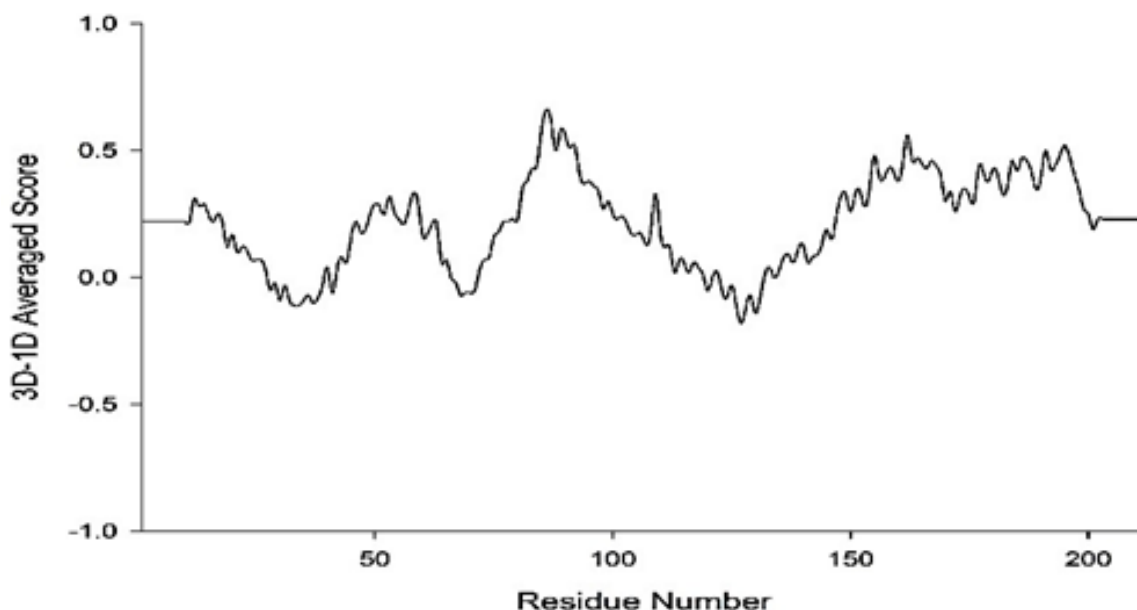
بررسی ویژگی‌های همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 با استفاده از وبگاه protparam ابزارهای مختلفی از جمله وبگاه protparam به تجزیه و تحلیل توالی‌های پروتئینی می‌پردازد. این وبگاه به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین مورد نظر پرداخته، وزن مولکولی، ترکیب اسیدهای آمینه، نیمه‌ی عمر پروتئین مورد نظر، شاخص‌های دوگانه دوستی آن و pI را نیز تعیین می‌کند. ورودی این وبگاه تنها شامل توالی پروتئین مورد نظر می‌باشد و ساختار ۳ بعدی با فرمت PDB را به عنوان ورودی قبول نمی‌کند. این وبگاه در سایت <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> قابل دسترس می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 شامل ۲۱۲ اسید آمینه، وزن مولکولی ۲۳۳۴۳٫۳ دالتون، pI این پروتئین ۹٫۳۴، کل بار منفی اسیدهای آمینه‌ی آن ۶ و کل بار مثبت اسیدهای آمینه‌ی آن (Arg + Lys) ۱۲ و نیمه عمر این پروتئین بیشتر از ۲۰ ساعت در قارچ‌ها و بیشتر از ۳۰ ساعت در باکتری‌ها می‌باشد. مدل‌سازی با استفاده از نرم‌افزار MODELLER و بررسی کیفیت مدل به دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای

در این نمودار نواحی مجاز، نواحی زرد نواحی تقریباً مجاز و نواحی خاکستری نواحی غیرمجاز برای اسیدهای آمینه هستند، که در (شکل ۱) مشاهده می‌شود. برای ارزیابی نهایی مدل مورد نظر



شکل ۱: نمودار رامچاندرا حاصل از نرم‌افزار PROCHECK که کیفیت مدل به دست آمده از نرم‌افزار MODELLER را تایید می‌کند. بیش از ۹۰٪ این اسیدهای آمینه در ناحیه مجاز نمودار قرار گرفته‌اند، و این بیان‌کننده‌ی مدلی با کیفیت بالا است

از وب‌گاه verify3D استفاده گردید که خروجی این وب‌گاه شامل یک نمودار می‌باشد که بیانگر این است که پروتئین مدل شده کیفیت مدل بسیار خوب داشته است زیرا تعداد زیادی از دنباله‌ها دارای امتیاز بالاتر از صفر هستند. (شکل ۲) خروجی وب‌گاه verify3D را نشان می‌دهد. استفاده از روش‌های مدل‌سازی در بعضی از پروتئین‌ها که ساختار کریستالی آنها به سختی در دسترس می‌باشد برای



شکل ۲: نمودار 3D verify برای ارزیابی کیفیت پروتئین همولیزین مدل شده با استفاده از نمودار رامچاندرا. (رزیدوهای بالاتر از صفر ارزشمند هستند)

دینامیک مولکولی

در ابتدا هندسه سیستم از نظر انرژی با استفاده از روش دینامیک مولکولی بهینه گردید. در واقع یکی از عواملی که روند صحیح شبیه‌سازی را بیان می‌دارد تغییرات انرژی پتانسیل است. در این مرحله که در (شکل ۳) نشان داده شده، در اوایل شروع شبیه‌سازی از آنجا که هندسه سیستم بهینه نیست مقدار انرژی پتانسیل زیاد است اما با گذر زمان سیستم به میزان بهینه انرژی پتانسیل خود نزدیک شده و انرژی پتانسیل مرتباً کاهش یافته و در زمان‌های ۴ و ۵ نانوثانیه انرژی پتانسیل همگرا گردیده است. برای ارزیابی پایداری ساختار شبیه‌سازی

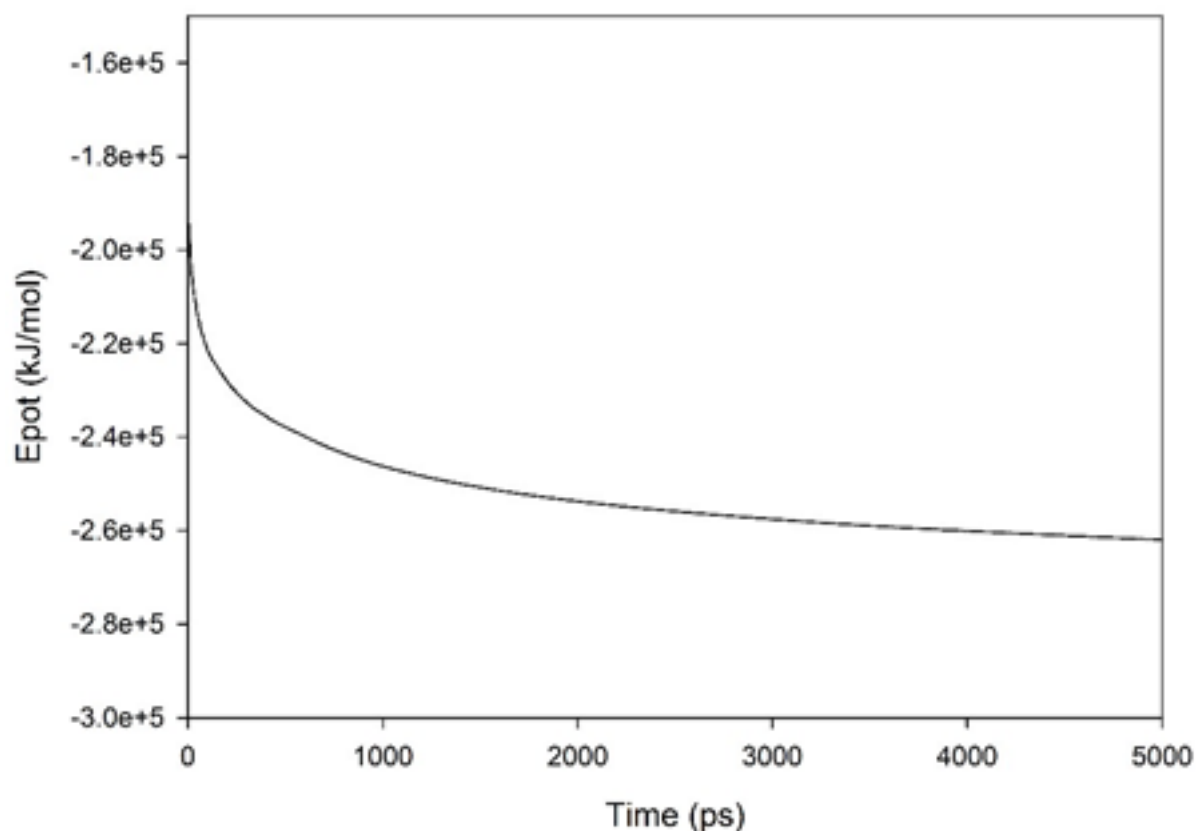
اهداف درمانی مزایای زیادی دارد. ذکر این نکته بسیار با اهمیت است که اگر پروتئینی نقش حیاتی در مسیرهای بیولوژیکی بدن داشته و یا نقش آن در یک مسیر بیماری‌زایی مشخص شده باشد پیشگویی ساختار آنها از طریق روش‌های کامپیوتری به منزله روش نوینی در طراحی دارو برای بیماری می‌باشد. به بیانی دیگر طراحی یک داروی موثر برای مهار پروتئینی خاص در یک مسیر بیماری‌زایی با روش‌های کامپیوتری و شبیه‌سازی ساختار سوم پروتئین از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده و درمان را تسریع می‌بخشد.

بررسی نتایج حاصل از شبیه‌سازی

حول یک مقدار ثابت دارند و این ثبات تا پایان شبیه سازی تداوم داشته که بیانگر سیستم مولکولی با رفتار مناسب است. میانگین RMSD برای اسکلت اصلی پروتئین از ۵ نانوثانیه تا ۳۰ نانوثانیه، ۰/۳۷ نانومتر می باشد.

نتیجه این خروجی در (شکل ۴) نشان داده شده است. همچنین برای آنالیز محتوای ساختار دوم همولیزین مورد بررسی در طول زمان از نرم افزار DSSP استفاده

شده با استفاده از دینامیک مولکولی کمیت RMSD یا Root Mean Square Deviation استفاده می شود و به عنوان شاخصی از همگرایی ساختار پروتئین همولیزین بررسی گردیده است. براساس خروجی RMSD برای اسکلت پروتئین واریانس داده ها از ۵ نانوثانیه در حدود ۰/۰۰۰۴ نانومتر است که بسیار نزدیک به صفر بوده و نشان دهنده ی این است که داده های RMSD پراکندگی بسیار کمی در

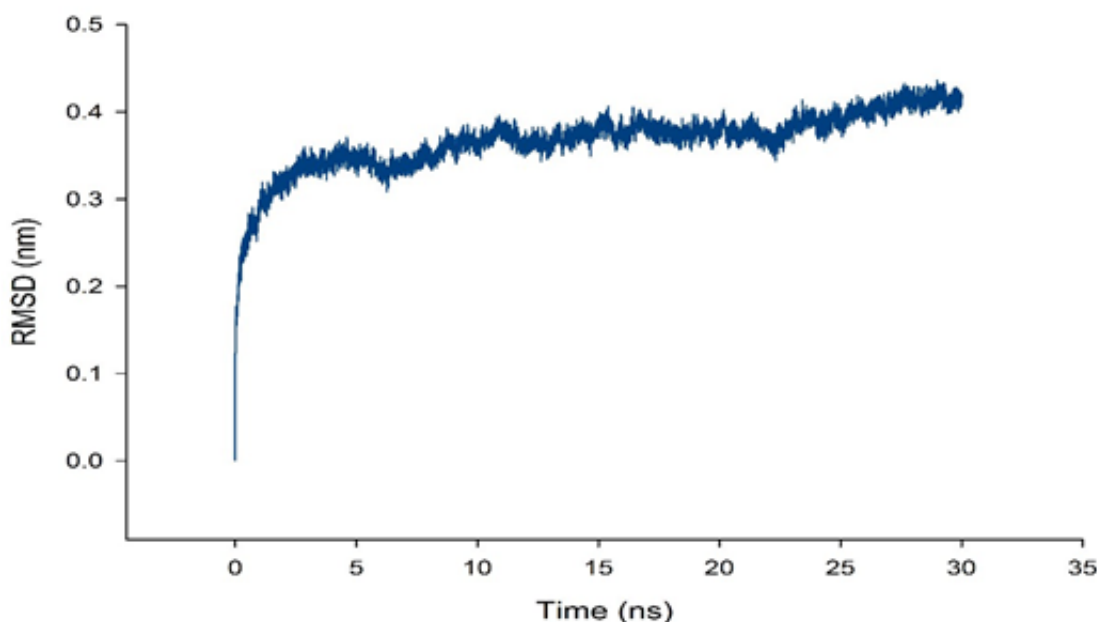


شکل ۳: تغییرات انرژی پتانسیل در مرحله بهینه سازی هندسی

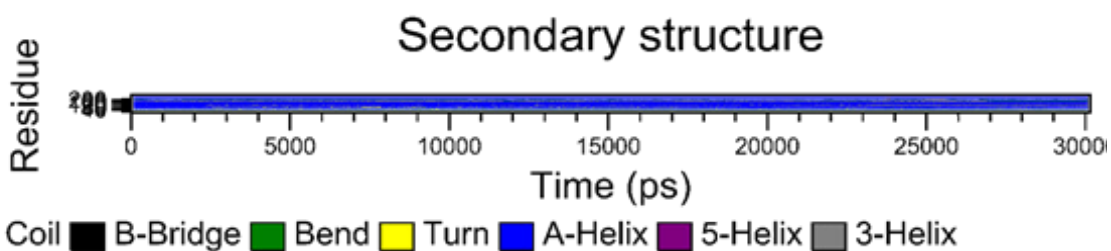
گردید. با توجه به (شکل ۵) می‌توان اذعان کرد که به واسطه‌ی برهمکنش همولیزین با غشاء لیپیدی تغییر قابل ملاحظه‌ای در ساختار دوم همولیزین مشاهده نشده است و ساختار غشاء و پروتئین در طول این مدت ثابت مانده است.

بررسی نتایج حاصل از داکینگ مولکولی
در اینجا برای تشکیل مجموعه‌ای از ساختار پایه تشکیل شده بین کلسترول و همولیزین

ساختار دوم همولیزین مشاهده نشده است و ساختار غشاء و پروتئین در طول این مدت ثابت مانده است.



شکل ۴: RMSD اسکلت پروتئینی همولیزین بعد از قرار دادن در غشاء لیپیدی



شکل ۵: خروجی DSSP که بیانگر ساختار دوم همولیزین در غشاء لیپیدی بعد از شبیه‌سازی می‌باشد. این شکل نشان می‌دهد ساختار دوم همولیزین به صورت آلفا هلیکس باقی مانده است

راماچاندران استاندارد به دست آمد که نشان می‌داد بیش از ۹۰٪ این اسیدهای آمینه در ناحیه مجاز نمودار قرار گرفته شده‌اند و در نتیجه پروتئین مورد نظر یک پروتئین بهینه می‌باشد. برای شناسایی مکان‌های اتصال در همولیزین و کلسترول

از نرم‌افزار اتوداک استفاده شد. از آنجا که اطلاعات خاصی در مورد ساختار کریستالی این پروتئین در دسترس نبود ساختار مولکولی آن با استفاده از نرم‌افزار MODELLER مدل‌سازی شد و با استفاده از نرم‌افزار PROCHECK نمودار

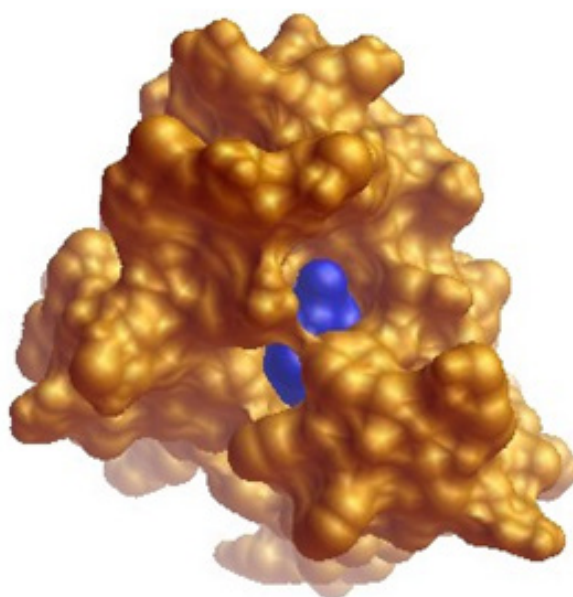
الکترواستاتیک آورده شده است. ستون چهارم نشان دهنده سهم انرژی آزاد پیچشی در انرژی کل می باشد. بهترین برهمکنش پروتئین و لیگاند در اجرای اول به دست آمده است که دارای انرژی ۱۱/۷۲- کیلوکالری بر مول بود. در این بررسی یک پیوند هیدروژنی بین کلسترول و اسید آمینه های درگیر تشکیل گردید در واقع یک جایگاه اتصال با تمایل بالا میان آنها شکل گرفته است. در این جا همولیزین با میزان انرژی ۱۱/۷۲- کیلوکالری بر مول با قدرت ترکیبی بالا با اسید آمینه های گلايسين ۱۵۲ یک پیوند هیدروژنی تشکیل داده است. اسیدهای آمینه درگیر در این اتصال

اندازه شبکه ۶۰ × ۶۰ × ۶۰ آنگستروم انتخاب شد و به نرم افزار اجازه ی جستجو در تمام حجم پروتئین داده شد. در این مرحله پس از انجام ۱۰۰ (طبق پرتکل نرم افزار اتوداک) اجرای داکینگ همولیزین با کلسترول، محلی که دارای کمترین انرژی اتصال بود، انتخاب گردید. برخی از نتایج حاصل از داکینگ در (جدول ۱) آمده است. در این جدول ستون دوم نشان دهنده ی حداقل انرژی اتصال یا انرژی اتصال کلی می باشد. در ستون سوم مجموع سهم انرژی های بین مولکولی شامل برهمکنش های واندروالس، تشکیل پیوندهای هیدروژنی، حلال ناپوشی کلسترول و همولیزین (دور شدن از حلال برای پایدار شدن) و برهمکنش های

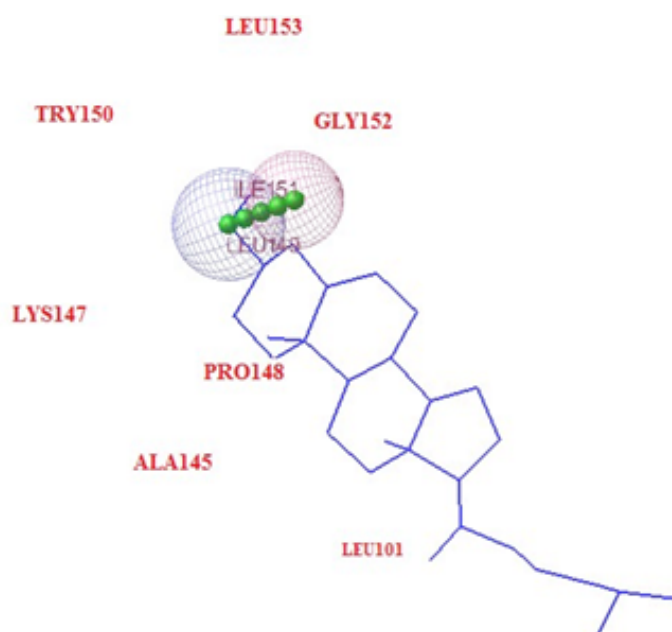
جدول ۱: نتایج نهایی داکینگ برهمکنش همولیزین با کلسترول با استفاده از نرم افزار اتوداک که هر اجرا به صورت رندم انتخاب گردیده

سهم انرژی آزاد پیچشی	سهم انرژی های بین مولکولی (کیلوکالری بر مول)	حداقل انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	دمای ۲۹۸/۱۵
۱/۷۹	-۱۳/۵۱	-۱۱/۷۲	اجرای ۱
۱/۷۹	-۱۳/۲	-۱۱/۴۱	اجرای ۵
۱/۷۹	-۱۲/۳	-۱۰/۵۲	اجرای ۱۵
۱/۷۹	-۱۱/۷۹	-۱۰	اجرای ۳۱
۱/۷۹	-۱۱/۲۵	-۹/۴۹	اجرای ۸۲
۱/۷۹	-۱۰/۸۱	-۹/۰۲	اجرای ۹۵

شامل لوسین ۱۰۱، آلانین ۱۴۵، لیزین ۱۴۷، محسوب می‌شوند. محل قرارگیری پرولین ۱۴۸، لوسین ۱۴۹، تیروزین ۱۵۰، لیگاند در پروتئین به صورت سه بعدی لوسین ۱۵۱، گلیسین ۱۵۲ و لوسین ۱۵۳ و پیوند هیدروژنی درگیر در این اتصال می‌باشند. تمامی این اسیدهای آمینه در بخش درونی پروتئین قرار گرفته‌اند و جزء اسیدهای آمینه‌ی آبگریز



شکل ۶: نمای سه بعدی بخشی از کلسترول درگیر با حفره‌ی همولیزین باسیلوس پامیلوس SAFR۰۳۲



شکل ۷: پیوند هیدروژنی ایجاد شده بین بخشی از کلسترول از ناحیه ۳oh و اسیدآمینه‌ی GLY۱۵۲ که با رنگ سبز نشان داده شده است و سایر اسیدآمینه‌های درگیر در اتصال

اسیدهای آمینه جهش یافته با اسید-های آمینه اصلی موجود در توالی پروتئین همولیزین مورد نظر یک توالی متفاوت در ۳ الی ۴ اسید آمینه با توالی اصلی به دست آمد، سپس با استفاده از نرم افزار PROCHECK براساس توالی همولیزین جدید که با جهش‌زایی ایجاد شده بود، پروتئین جهش یافته رسم گردید. پس از مدل‌سازی همولیزین جهش داده شده با استفاده از وبگاه PROCHECK طبق مراحل بالا اجرای داکینگ مولکولی بر روی این پروتئین نیز انجام گرفته شد. پس از انجام ۱۰۰ اجرای داکینگ همولیزین جهش داده شده با کلسترول، محلی که دارای کمترین انرژی اتصال بود انتخاب گردید و نتایج حاصل از این داکینگ در (جدول ۲) نشان داده شده است. همچنین در (شکل ۸ و ۹) مقایسه اتصال

کلسترول نشان دهنده مکانیسم احتمالی عملکرد همولیزین بنا بر نظریات ارائه شده توسط محققان می‌باشد این نتایج نشان می‌دهد همولیزین دارای جایگاه جذب برای کلسترول‌های غشایی است و به این ترتیب با غشاء میانکنش می‌دهد.

بررسی نتایج حاصل از جهش‌زایی همولیزین با استفاده از وبگاه PoPMuSiC-2.1

پس از شناسایی آمینواسیدهای اصلی درگیر در اتصال همولیزین مورد بررسی با کلسترول برای کاهش این اتصال و سست شدن پیوند ایجاد شده میان گیرنده و لیگاند بر روی آنها جهش‌هایی به صورت نقطه‌ای با استفاده از وبگاه PoPMuSiC-2.1 انجام گرفت. سپس با جایگزین کردن

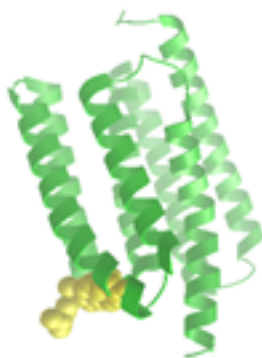
جدول ۲: اجرای داکینگ همولیزین جهش یافته با لیگاند کلسترولی خود و کاهش تمایل میان پروتئین و کلسترول به علت تغییر در اسید آمینه اصلی در این اتصال

سهم انرژی آزاد پیچشی	سهم انرژیهای بین مولکولی (کیلوکالری بر مول)	حداقل انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	دمای ۲۹۸/۱۵
۱/۷۹	-۳/۰۵	-۵/۸۴	اجرای ۱
۱/۷۹	-۳/۰۱	-۵/۸	اجرای ۵
۱/۷۹	-۲/۴۹	-۵/۲۸	اجرای ۱۵
۱/۷۹	-۲/۳۵	-۴/۷۶	اجرای ۳۱
۱/۷۹	-۲/۰۲	-۴/۱۲	اجرای ۸۲
۱/۷۹	-۱/۵۲	-۳/۹۳	اجرای ۹۵

همولیزین طبیعی با کلسترول و همولیزین که اتصال میان آنها به شدت سست
 جهش‌یافته نشان داده شده و بیان می‌کند گشته و در ناحیه ای غیر از محل اصلی
 که در سویه جهش‌یافته تمایل پروتئین به اتصال ناپایدار برقرار می‌کند.
 گیرنده به شدت کاهش یافته به طوری نتیجه گیری و بحث



شکل ۸: همولیزین وحشی (ساختار سبز رنگ) در اتصال با کلسترول (ساختار زرد رنگ) و قرارگیری کلسترول در حفره همولیزین



شکل ۹: همولیزین موتان یافته (سبز رنگ) که اتصال سست و ناپایداری با کلسترول (زرد رنگ) برقرار کرده است و در ناحیه‌ای خارج از حفره همولیزین قرار گرفته است.

هدف از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده از خواص میکروسکوپی ترکیبات برای مطالعه‌ی آن دسته از خواص توده‌ای است که به آسانی در آزمایشگاه قابل بررسی نیستند. شبیه‌سازی رایانه‌ای پلی بین مقیاس زمانی و طولی دو حالت مولکولی (میکروسکوپی) و کلان (توده‌ای) است. نتایج به دست آمده در بیشتر مطالعات انجام شده بر اساس MD بیان داشته که شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند برای تشخیص و بررسی ساختار یک پروتئین به عنوان یک مدل در غشاء به صورت درست یا نادرست

کتابخانه‌ی نرم‌افزار DSSP بیان داشته است که به واسطه‌ی برهمکنش همولیزین مورد نظر با غشاء لیپیدی تغییر قابل ملاحظه‌ای در ساختار دوم این پروتئین مشاهده شده است. لازم به ذکر است که اکثر ساختارهای دوم همولیزین شامل مارپیچ آلفا است که در طی برهمکنش با غشای لیپیدی بدون تغییر باقی مانده است. با توجه به نتایج به دست آمده و آنالیز داده‌های خروجی gromacs به این نتیجه رسیدیم که دومین‌های تراغشایی همولیزین به خوبی در داخل غشاء قرار گرفته و این پروتئین ساختار دوم خود را در طول شبیه‌سازی در داخل غشاء حفظ کرده است. در این پژوهش همچنین برای تشکیل مجموعه‌ای از ساختارهای پایه ایجاد شده بین کلسترول و همولیزین و بررسی واکنش‌های بین آنها از نرم‌افزار اتوداک استفاده گردید. با استفاده از نرم‌افزار اتوداک یک جایگاه اتصال با تمایل زیاد برای کلسترول به دست آمد. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که گروه هیدروکسیل کلسترول در کربن شماره ۳ به اسید آمینه‌ی گلایسین ۱۵۲ که در هسته‌ی آبگریز همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 قرار دارد نزدیک‌تر می‌باشد و بهترین شکل فضایی به دست آمده از اتصالات مولکولی برای همولیزین با کمترین انرژی اتصال $11/72 \text{ kcal mol}^{-1}$ بوده است. انرژی‌های تخمین زده شده با اتوداک شامل انرژی‌های

به کار رود و اینکه مدل پروتئین می‌تواند به عنوان یک ساختار با ثبات در طول شبیه‌سازی ساختار خود را حفظ کند، مورد استفاده قرار بگیرد. در واقع هدف دینامیک مولکولی از اساس کاهش میزان خطای گمان‌ها به یک مقدار بهینه است (Scott et al. 2007). در نتیجه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند به عنوان یک ابزار بسیار قوی و با ارزش برای بررسی غشاء، فرایندهای غشایی و ساختارهای بیولوژی پروتئین در غشاء به کار برده شود (Ivetac and Mark 2008). نمودار انرژی روند صحیح شبیه‌سازی همولیزین SAFR0032 *Bacillus pumilus* را نشان می‌دهد و همان طور که در (شکل ۳) مشاهده شد شیب نمودار انرژی در طول شبیه‌سازی کاهش یافته و این کاهش شیب بیانگر کیفیت بهتر در شبیه‌سازی می‌باشد، زیرا انرژی کمتر در حالت پایدار بیشتر حاصل می‌شود. همان طور که از نمودار RMSD مشخص است این شکل نشانگر ثبات پروتئین همولیزین در درون غشاء در طول زمان شبیه‌سازی بوده و بیان می‌کند که داده‌های RMSD پراکندگی بسیار کمی در حول یک مقدار ثابت دارند و این ثبات تا پایان شبیه‌سازی تداوم داشته است. میانگین RMSD برای اسکلت اصلی پروتئین همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 از ۵ نانوثانیه تا ۳۰ نانوثانیه، $0/37$ نانومتر می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از

بین مولکولی شامل انرژی‌های واندروالس، پیوندهای هیدروژنی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی درونی و انرژی آزاد پیچشی می‌باشد. در بین همه‌ی انرژی‌های اتفاق افتاده بین لیگاند و پروتئین، انرژی‌های الکترواستاتیک مهمترین انرژی هستند، زیرا در بیشتر موارد این انرژی می‌تواند قدرت و موقعیت دقیق لیگاند روی پروتئین را نشان دهد (Lengauer and Rarey (1996) این است که یک شکل فضایی بهینه از لیگاند و پروتئین به ما می‌دهد و جهت‌یابی نسبی لیگاند و پروتئین را در صورتیکه انرژی آزاد کل سیستم مینیمم است، نشان می‌دهد (Jorgensen (1991). در برهمکنش کلاسترول با پروتئین همولیزین در گلیسین ۱۵۲ و گروه هیدروکسیل بر روی کربن شماره ۳ کلاسترول پیوند هیدروژنی ایجاد می‌شود همچنین ۳ ایزولوسین ۱۵۱، گلیسین ۱۵۲ و لوسین ۱۴۹ تماس نزدیکی با کلاسترول برقرار کرده‌اند که در ایجاد برهمکنش واندوالس و آبگریز می‌تواند نقش مهمی داشته باشد. لذا می‌توان نقش برهمکنش واندروالس و آبگریز را در این اتصال تا حدودی بیشتر از برهمکنش‌های الکترواستاتیک دانست (براین اساس که بیشتر اسیدهای آمینه اطراف لیگاند از نوع آبگریز هستند). نتایج حاصل از جهش‌زایی در اسید آمینه‌های اصلی درگیر در اتصال همولیزین و کلاسترول و جایگزین کردن آنها با اسید آمینه‌هایی که پایداری پروتئین را

کاهش می‌دهد در ثبات برقراری پیوند میان همولیزین و کلاسترول به شدت تاثیر داشته تا حدی که حداقل میزان انرژی همولیزین در اتصال با کلاسترول به شدت کاهش یافته به طوری که از $11/72 \text{ kcalmol}^{-1}$ - برای قوی‌ترین اتصال که با اسید آمینه پرولین جایگزین گردیده به $5/84 \text{ kcalmol}^{-1}$ - تغییر کرده است. همان‌طور که گفته شد هر چه میزان انرژی اتصال عدد کوچکتری باشد قدرت اتصال میان لیگاند و گیرنده بیشتر خواهد بود. جانشین آمینو اسیدی ممکن است پایداری و ساختار پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد و باعث تغییر خواص آن و میانکنش آن با ذرات دیگر شود. مطالعات بیشماری نشان داده که ساختار سه بعدی پروتئین‌ها نمایانگر عمل آنهاست و جانشین‌سازی آمینو اسیدی روی پایداری و خواص پروتئین با تغییر در خواص میانکنش آن با دیگر ماکرومولکول‌ها تاثیر می‌گذارد (Zaaijer et al., (2008). از نتایج حاصل از جهش‌زایی می‌توان برای مطالعه بروی باکتری‌هایی که همولیزین آنها به عنوان عامل اصلی در حدت بیماری نقش دارد به این ترتیب استفاده کرد، یعنی ابتدا با شناسایی اسید آمینه‌های اصلی درگیر در اتصال پروتئین همولیزین با گیرنده خود بر روی غشاء و جهش‌زایی به منظور کاهش ثبات پروتئین بر روی چند آمینو اسید اصلی، اتصال میان این پروتئین با گیرنده

است و می‌تواند در آینده‌ایی نه چندان دور با همکاری زیست شناسان و داروسازان به صورت *in vivo* مورد بهره برداری قرار گیرد. شایان ذکر است با وجود روش‌های درمانی مفید برای رفع این بیماری‌ها ایده مورد بررسی نیز می‌تواند به عنوان روشی تکمیلی برای حل این مشکلات به ویژه در سویه‌های مقاوم به دارو مورد استفاده قرار گیرد و کلیت عمل مشابهی برای رفع بیماری‌های مرتبط با همولیزین که کم شمار نیز نیستند، داشته باشد.

انجام نخواهد گرفت و تا زمانی که همولیزین بر روی گیرنده خود در غشای سلول‌های یوکاریوت قرار نگیرد توانایی خود را برای ایجاد بیماری-زایی از دست خواهد داد. یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا *Bacillus cereus* است، که دارای چندین نوع همولیزین بیماری‌زا می‌باشد از جمله سرولیزین O یا همان همولیزین، این سم به شدت برای انسان مرگ‌آور است و باعث اسهال شدید در بیماران می‌شود *Ramarao and Sanchis (2013)*. روش مورد مطالعه یک ایده نوین در سیستم‌های درمانی مرتبط با پروتئین‌های همولیزین می‌باشد که به صورت *in silico* بوده و اولین بار در این پژوهش مطرح شده

منابع

- Adinarayana K.P.S. Devi R.K. (2011) Protein-Ligand interaction studies on 2, 4, 6-trisubstituted triazine derivatives as anti-malarial DHFR agents using AutoDock Bioinformation. 6: 74-82.
- Alouf J.(2003) Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins *Folia Microbiologica*. 48: 5-16.
- Alouf J.E, Geoffroy C. (1988) Production, purification, and assay of streptolysin O *Methods in Enzymology*. 165: 52-59.
- Billington SJ, Songer J.G. Jost B.H. (2001) Molecular characterization of the pore-forming toxin, pyolysin, a major virulence determinant of *Arcanobacterium pyogenes* *Veterinary Microbiology*. 82: 261-274.
- Billington S.J. Jost B.H. Cuevas W.A. Bright K.R. Songer J.G. (1997) The *Arcanobacterium pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family *Journal of Bacteriology*. 179: 6100-6106.
- Bischofberger M. Gonzalez M.R. van der Goot F.G.(2009) Membrane injury by pore-forming proteins *Current Opinion in Cell Biology*. 21: 589-595.
- Gilbert R. (2002) Pore-forming toxins *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 832-844.
- Gonzalez M. Bischofberger M. Pernot L. Van Der Goot F. Freche B. (2008) Bacterial pore-forming toxins: the (w) hole story *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 493-507.
- Gonzalez M.R. Bischofberger M. Frêche B. Ho S. Parton R.G. van der Goot F.G. (2011) Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival *Cellular Microbiology*. 13: 1026-1043.
- Hotze EM, Tweten R.K. (2012) Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. 1818: 1028-1038.
- Iacovache I, van der Goot F.G. Pernot L. (2008) Pore formation: an ancient yet complex form of attack *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*.

1778: 1611-1623.

- Ivetac A. Mark S.P. (2008) Molecular dynamics simulations and membrane protein structure quality EurBiophys Journal. 37: 403-409.
- Johnson M. (1977) Cellular location of pneumolysin FEMS Microbiology Letters. 2: 243-245.
- Laskowski R.A. MacArthur M.W. Moss D.S. Thornton J.M. (1993) Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures Journal of Applied Crystallography. 26: 283-291
- Lengauer T. Rarey M. (1996) Computational methods for biomolecular docking Current opinion in structural biology. 6: 402-406.
- Morris G. Goodsell D. Pique M. Lindstrom W. Huey R. Forli S. Hart W. Halliday S. Belew R. Olson A. (2012) User Guide AutoDock Version 4.2
- Ohno-Iwashita Y. Iwamoto M. Mitsui K-i, Ando S. Iwashita S. (1991) A cytolysin, θ -toxin, preferentially binds to membrane cholesterol surrounded by phospholipids with 18-carbon hydrocarbon chains in cholesterol-rich region Journal of Biochemistry. 110: 369-375.
- Østensvik Ø, From C. Heidenreich B. O'sullivan K. Granum P. (2004) Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B. cereus* and *B. subtilis* groups in Norwegian surface waters Journal of Applied Microbiology. 96: 987-993.
- Priest F.G. Goodfellow M. Todd C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus* Journal of General Microbiology 134: 1847-1882.
- Ramarao N. Sanchis V. (2013) The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A Review Toxins. 5: 1119-1139.
- Sali A, Blundell T.L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints J MolBiol. 234: 779-815
- Sanchez R. Sali A. (2000) Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeler Methods of Molecular Biology. 143:97-129
- Scott K.A. Bond P.J. Ivetec A. Chetwynd A.P. Khalid S. Sansom MSP. (2007) Membrane protein/bilayer interactions: structural bioinformatics via coarse-grained MD simulations Structure. 16: 621-630

- Sritharan M. (2006) Iron and bacterial virulence Indian Journal of Medical Microbiology. 24: 163-164
- Thompson J.R. Cronin B. Bayley H. Wallace MI;(2011) Rapid Assembly of a Multimeric Membrane Protein Pore Biophysical journal. 101: 2679-2683.
- Tweten R. Parker M. Johnson A. (2001). Pore-Forming Toxins. 257pp 15-33. In: F.Gisou van der Goot (ed). The cholesterol-dependent cytolysins, Springer. Berlin.
- Vesper S.J.J. Vesper M. (2004). Possible role of fungal hemolysins in sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*. 55: 191-213.
- Zaaijer H.L. Bouter S. Boot H.J. (2008) Substitution rate of hepatitis B surface gene *Journal of Viral Hepatitis*. 15: 239-245.
- Zdanovsky A. Zdanovskaya M. Yankovsky N. (2000) Bacterial toxins and their application *Molecular Biology*. 34: 168-174.