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 غشای‌پلاسمایی 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 گونه‌ایی 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 درمیانکنش 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-۲,۱ 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.

واژه های کلیدی: اتوداک، باسیلوس پامیلوس، شبیه سازی 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، پنیسیلیناز، نوکلئاز، فسفاتاز لیپاز، فسفولیپاز C،همولیزین یا سیتولیزین‌ها و آنزیم-های 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* ، . *Banthracis* ، *B. mycoides* ،*B. thuringiensis* سایر باسیلوس‌ها جزء گروه Bacillus subtilis هستند از جمله اعضای اصلی این گروه *Bacillus subtilis* *B. pumilus. B. licheniformis* می‌باشند. 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 توسعه-یافته برای تحت تاثیر قراردادن 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 همولیتک 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، ازبین

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 وسایر اعضای این خانواده (Sritharan (2006, Thompson et al. (2011), Vesper and Vesper (2004).جالب اینجاست که توانایی تولید سموم ایجاد کننده‌ی حفره در طول تکامل در بین کرم‌ها، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها وحتی 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 کلسترول یا Cholesterol Depending Toxin می‌باشد. این سموم حفره‌هایی را در غشای پلاسمایی سرشار از کلسترول سلول‌های یوکاریوتی ایجاد می‌کنند و می‌توانند تاثیرات سلولی متفاوتی را در غشاء القا کنند(Hotze and Tweten (2012 ساختار و عملکرد مرتبط بااین سموم در چهار گونه‌ی باکتریایی از جمله استرپتوکوک، لیستریا، کلستریدیوم و باسیلوس شناخته شده است Alouf Geoffroy (1991), Billington et al. (1997).شرط لازم برای عملکرد یک CDT حضور کلسترول در غشاء است.در بین تمام لیپیدهای مختلفی که در شکل دادن به تنوع سلولی غشاء نقش دارند کلسترول یکی از ویژگی‌های متمایز در سلول‌های پستانداران می‌باشد. در واقع کلسترول به عنوان گیرنده برای این سموم عمل می‌کند Ohno-Iwashita et al. (1991).کلسترولساختار چندحلقه‌ای داشته و نقش عمده‌ی آن استحکام و انعطاف‌بخشی به غشا سلول‌ها است. اولین قدم برای فعالیت CDT ها شناسایی سلول هدف می‌باشد که از طریق شناسایی لیپیدهای ویژه‌ی غشاء، کلسترول، یا به وسیله‌ی پروتئین‌های به دام افتاده در غشاء متصل می‌شوند. بعد از موفقیت در شناسایی و اتصال CDT ها 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 وساختار اولیگومر را گسترش داده تا جایی که ساختار حلقه‌ای به دست آید 2002), Gonzalez MR et al.(2008), Hotze and Tweten (2012), Rodney (2005). در این پژوهش برای تشکیل مجموعه‌ای از ساختارهای پایه تشکیل شده بین کلسترول

و همولیزین و بررسی واکنش‌های بین آنها از داکینگ مولکولی استفاده گردید. داکینگ مولکولی یک روش معمول است که برای محاسبه‌ی بر همکنش 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 کلسترول به تجزیه وتحلیل واکنش‌های میان کلسترول 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 کلسترول بررسی شده است و نتایج مورد قبولی برای کاهش میل همولیزین به کلسترول 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 AY۱۶۷۸۷۹,۱ 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

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 انرژتیک پایدار است بعد از مدل‌سازی با استفاده نرم‌افزار MODELLER، با کمک نرم‌افزار دیگری به نام PROCHECK نمودار راماچاندران پروتئین مدل شده را رسم می‌نماییم، نمودار راماچاندران وضعیت مجاز هر زاویه را برای ساختارهای پروتئین نشان می‌دهد و بیان می‌کند که آیا اسیدهای امینه پروتئین ما درمناطق مجازنمه دار 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 ٦١,٤ بر اساس میدان نیروی گروموس ٦a ٥٣-٩٦ انجام گرفته است. پیکربندی (ساختار سه بعدی) پروتئین همولیزین SAFR0032 *Bacillus pumilus* با استفاده از نرم‌افزار MODELLER به دست آمد، اجزای سیستم شبیه‌سازی شامل پروتئین همولیزین SAFR0032 *Bacillus pumilus* ، 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 ٦/٥× ٦/٧ × ٦/٧ 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). شبیه سازی دینامیک مولکولی در ns٣٠ به مدت ٤ 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 ٢,٤ اجرا شده است. تمام مولکول-های 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

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. محاسبه ی 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 سویه 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 حدود۲۷۰۰۰ 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).

مطالعه‌ی داکینگ همولیزین به کلسترول با استفاده از برنامه ی اتوداک ۲,٤ 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 PoPMuSiC-۲.۱:

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 پیش-بینی می‌کند و یک نرم‌افزار نه چندان پیچیده برای کاربران می‌باشد. علاوه بر بررسی ثبات پروتئین جهش‌یافته این وبگاه قادر است نقش بهینه هر اسیدآمینه 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، می توان تغییراتی را در ساختمان پروتئین اعمال کرد که این تغییرات عملکرد آن پروتئین را تحت تاثیر خود قرار می دهد.

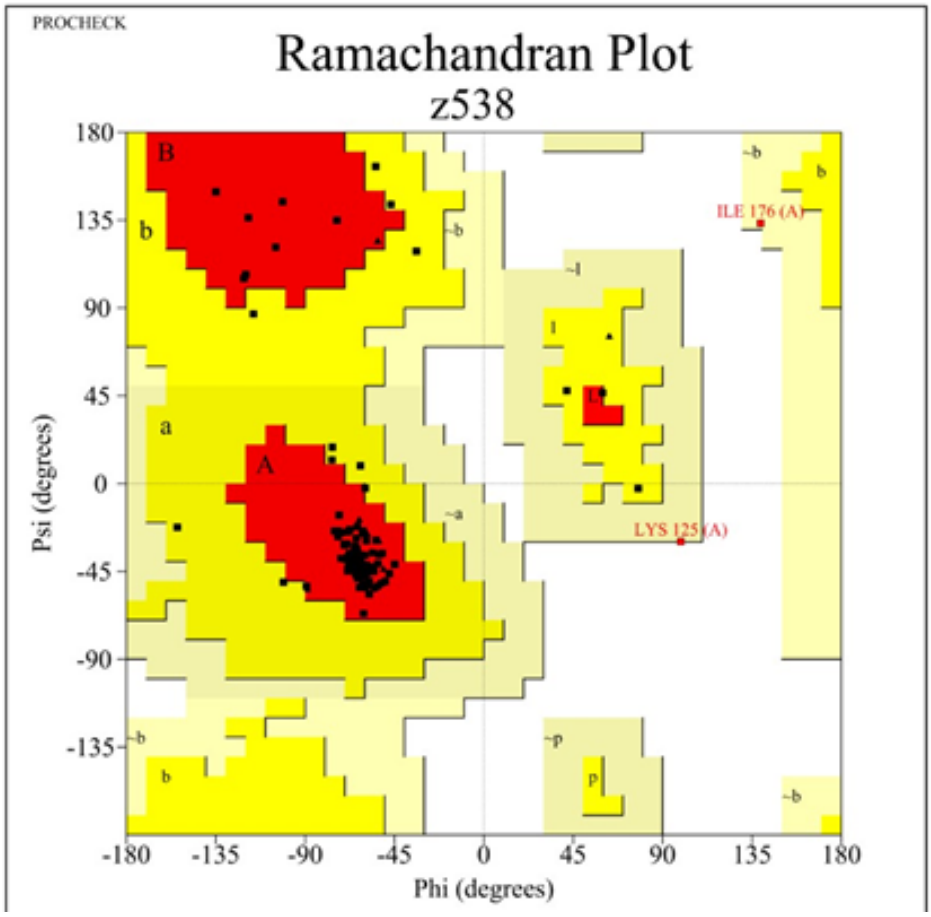
نتایج

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، شاخص-های 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 به‌دست آمده همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032، شامل ۲۱۲ اسیدآمینه، وزن مولکولی ۲۳۳۴۳,۳ دالتون، pI این پروتئین ۹,۳۴، کل بار منفی اسیدهای آمینه‌ی آن (Asp + Glu) ٦ 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 PROCHECK و Verify3D

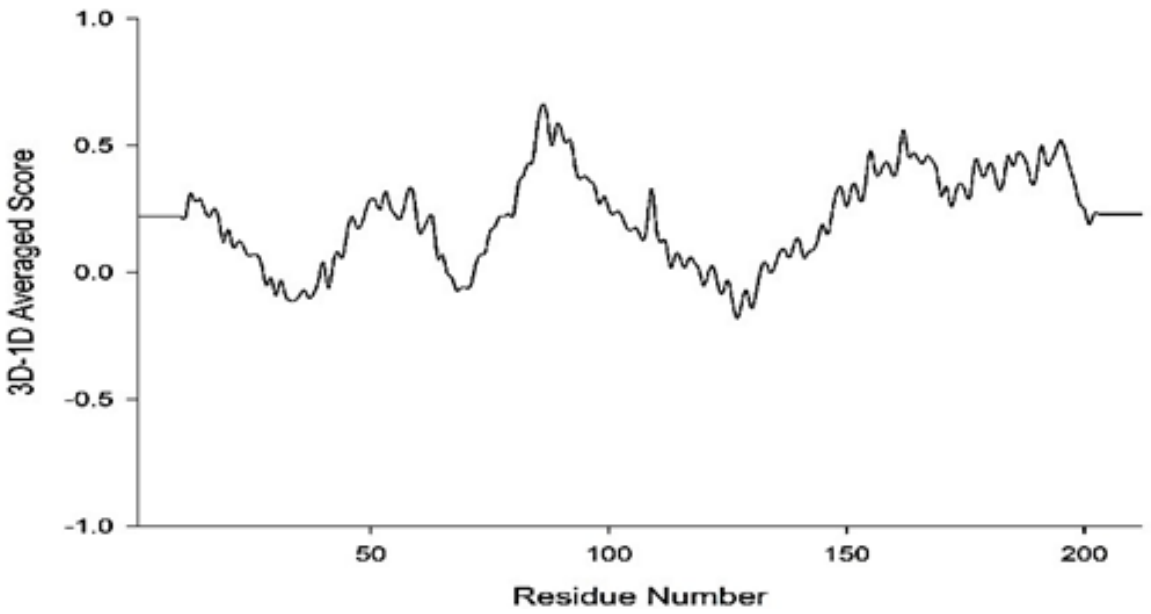
همان‌طور که در قسمت‌های بالاتر گفته شد، همولیزین *Bacillus pumilus* SAFR0032 پروتئینی است که ساختار PDB آن در بانک داده‌های پروتئینی وجود ندارد. در این مطالعه ما با استفاده از نرم‌افزار MOD-ELLER پروتئین مورد نظر را مدل-سازی کرده، که خروجی نرم‌افزار برای توالی این پروتئین شامل ۵ مدل بود. بر اساس دستور کار نرم‌افزار و براساس امتیازدهی نرم-افزار (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 نرم-افزار PRO-CHECK نمودار راماچاندران استانداردی به دست آمد، که نشان می‌داد بیش از ۹۰% این اسیدهای‌آمینه در ناحیه مجاز نمودار قرار گرفته شده‌اند،و این بیان کننده‌ی مدلی با کیفیت بالا است .در واقع نمودار راماچاندران با اندازه‌گیری زوایای فی و سای اسیدهای آمینه، زوایای مجاز اسیدهای آمینه‌ی تشکیل دهنده‌ی پروتئین را نمایش می‌دهد، نواحی قرمز

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 راماچاندران حاصل از نرم‌افزار PROCHECK که کیفیت مدل به دست آمده از نرم‌افزار MODELLER را تایید می‌کند. بیش از ۹۰٪ این اسیدهای‌آمینه در ناحیه مجاز نمودار قرار گرفته‌اند، و این بیان کننده‌ی 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 verify۳d برای ارزیابی کیفیت پروتئین همولیزین مدل شده با استفاده از نمودار راماچاندران. (رزیدوهای بالاتر از صفر ارزشمند هستند)

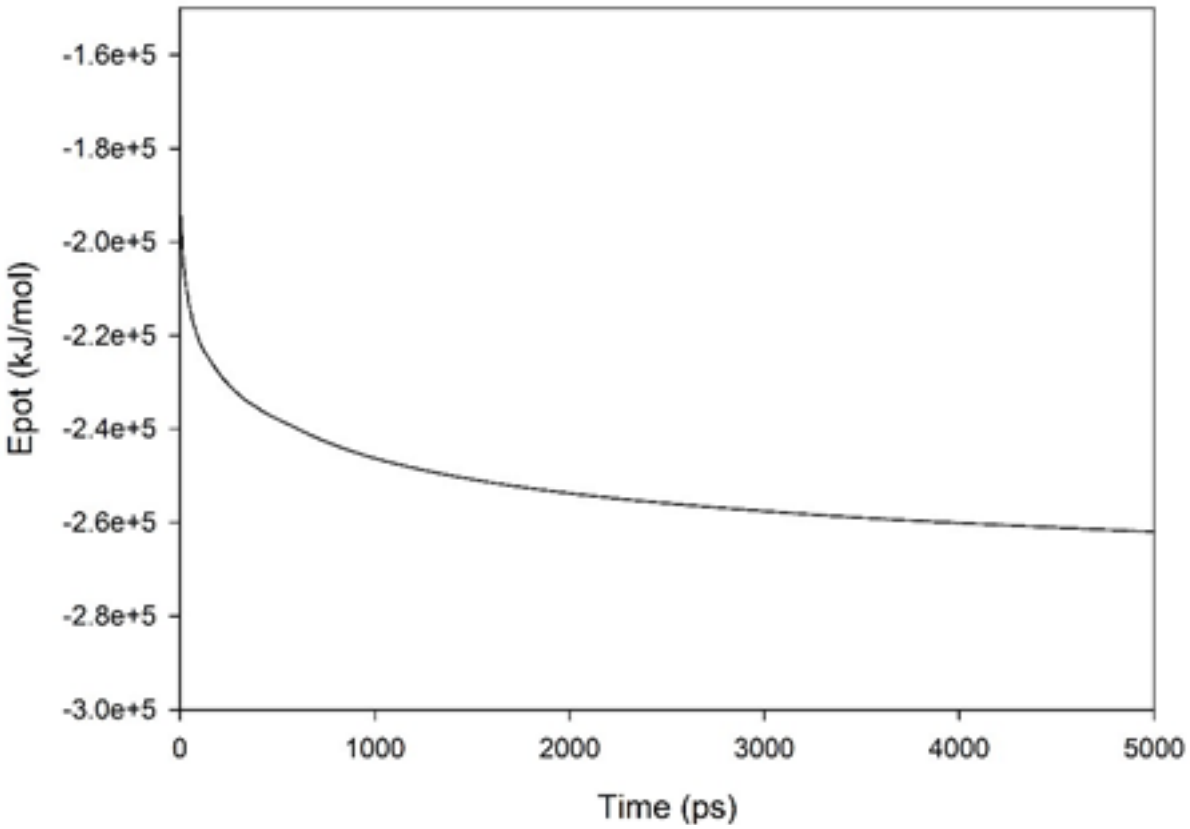
اهداف درمانی مزایای زیادی دارد. ذکر این نکته بسیار با اهمیت است که اگر پروتئینی نقش حیاتی در مسیرهای بیولوژیکی بدن داشته و یا نقش آن در یک مسیر بیماریزایی مشخص شده باشد پیشگویی ساختار آنها از طریق روش های کامپیوتری به منزله روش نوینی در طراحی دارو برای بیماری می‌باشد. به بیانی دیگر طراحی یک داروی موثر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

بررسی نتایج حاصل از شبیه‌سازی 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 شبیه-سازی 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 ٤ و ٥ نانوثانیه انرژی پتانسیل همگرا گردیده است. برای ارزیابی پایداری ساختار شبیه‌سازی

شده با استفاده از دینامیک مولکولی کمیت RMSD یا Root Mean Square Deviation استفاده می‌شود و به عنوان شاخصی از همگرایی ساختار پروتئین همولیزین بررسی گردیده است. براساس خروجی RMSD برای اسکلت پروتئین واریانس داده‌ها از ۵ نانوثانیه در حدود ۰/۰۰۰٤ نانومتر است که بسیار نزدیک به صفر بوده و نشان دهنده‌ی این است که داده‌های RMSD پراکندگی بسیار کمی در 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 می‌باشد.

نتیجه این خروجی در (شکل ٤) نشان داده شده است. همچنین برای آنالیز محتوای ساختار دوم همولیزین مورد بررسی در طول زمان از نرم‌افزار DSSP استفاده

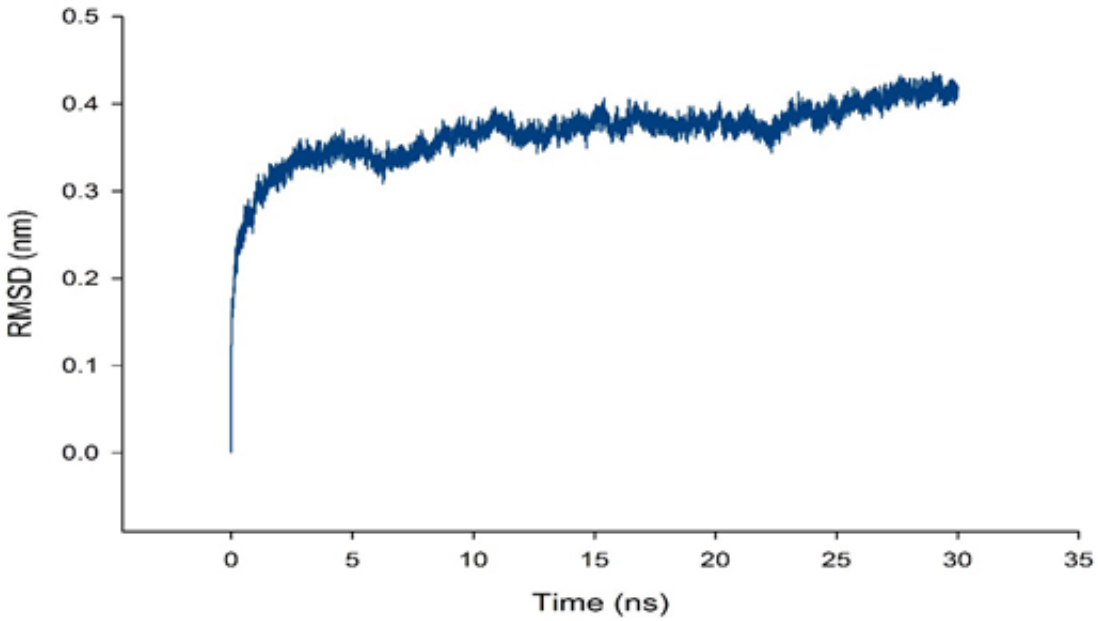


شکل ۳: تغییرات انرژی پتانسیل در مرحله بهینه‌سازی هندسی

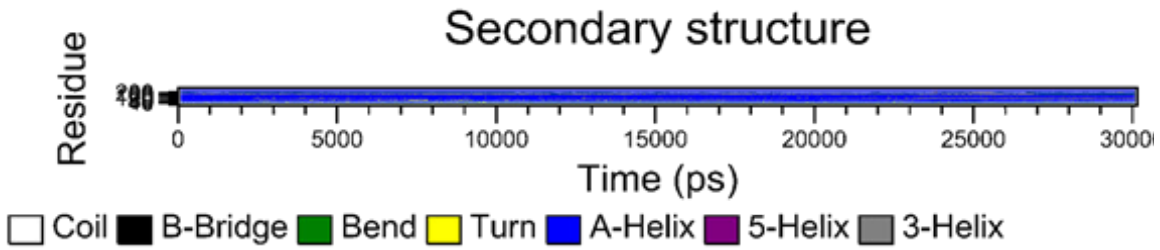
گردید. با توجه به (شکل ۵) می‌توان اذعان کرد که به واسطه‌ی برهمکنش همولیزین با غشاء لیپیدی تغییر قابل ملاحظه‌ای در ساختار دوم همولیزین مشاهده نشده است و ساختار غشاء و پروتئین در طول این مدت ثابت مانده است.

بررسی نتایج حاصل از داکینگ مولکولی

در اینجا برای تشکیل مجموعه‌ای از ساختار پایه تشکیل شده بین کلسترول و همولیزین



شکل ٤: RMSD اسکلت پروتئینی همولیزین بعد از قرار دادن در غشاء لیپیدی



شکل۵: 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

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 راماچاندران استانداردی 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

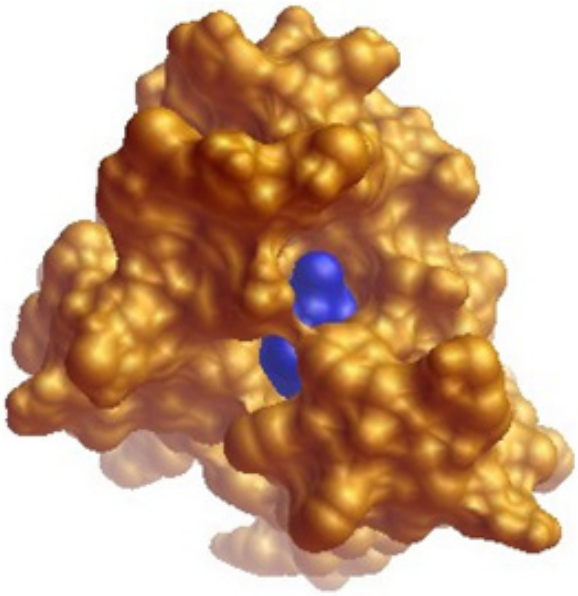
اندازه شبکه ۶۰× ۶۰× ۶۰ آنگستروم انتخاب شد و به نرم‌افزار اجازه‌ی جستجو در تمام حجم پروتئین داده شد. در این مرحله پس از انجام ۱۰۰ (طبق پرتکل نرم افزار اتوداک) اجرای داکینگ همولیزین با کلسترول، محلی که دارای کمترین انرژی اتصال بود، انتخاب گردید. برخی از نتایج حاصل از داکینگ در (جدول ۱)آمده است. در این جدول ستون دوم نشان دهنده‌ی حداقل انرژی اتصال یا انرژی اتصال کلی می‌باشد. در ستون سوم مجموع سهم انرژی‌های بین مولکولی شامل برهمکنش‌های واندروالس، تشکیل پیوندهای هیدروژنی، حلال ناپوشی کلسترول و همولیزین (دور شدن از حلال برای پایدار شدن) و برهمکنش‌های الکترواستاتیک آورده شده است. ستون چهارم نشان دهنده‌ی سهم انرژی آزاد پیچشی در انرژی کل می‌باشد. 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 اسیدآمینه‌های 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 اسیدآمینه‌ی گلایسین۱۵۲ یک پیوند هیدروژنی تشکیل داده است.

اسیدهای آمینه درگیر در این اتصال

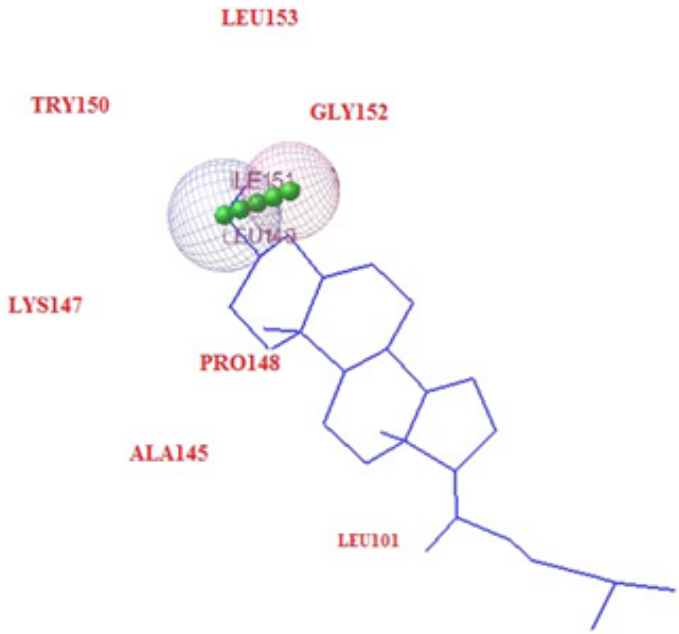
جدول ۱: نتایج نهایی داکینگ برهمکنش همولیزین با کلسترول با استفاده از نرم‌افزار اتوداک که هر اجرا به صورت رندم انتخاب گردیده

دمای ۲۹۸/۱۵	حداقل انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	سهم انرژیهای بین مولکولی (کیلوکالری بر مول)	سهم انرژی آزاد پیچشی
اجرای۱	-۱۱/۷۲	-۱۳/۵۱	۱/۷۹
اجرای۵	-۱۱/۴۱	-۱۳/۲	۱/۷۹
اجرای۱۵	-۱۰/۵۲	-۱۲/۳	۱/۷۹
اجرای۳۱	-۱۰	-۱۱/۷۹	۱/۷۹
اجرای۸۲	-۹/۴۹	-۱۱/۲۵	۱/۷۹
اجرای۹۵	-۹/۰۲	-۱۰/۸۱	۱/۷۹

شامل لوسین ۱۰۱، آلانین ۱۴۵، لیزین ۱۴۷، پرولین ۱۴۸، لوسین ۱۴۹، تیروزین ۱۵۰، لوسین ۱۵۱، گلایسین ۱۵۲ و لوسین ۱۵۳ می‌باشند. تمامی این اسیدهای آمینه در بخش درونی پروتئین قرار گرفته‌اند و جزء اسیدهای آمینه‌ی آبگریز محسوب می‌شوند. محل قرارگیری لیگاند در پروتئین به صورت سه بعدی و پیوند هیدروژنی درگیر در این اتصال به ترتیب در (شکل‌های ٦ و ٧) نشان داده شده است. چنین اتصالی میان اسیدهای آمینه همولیزین و هیدروکسیل



شکل ٦: 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

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

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 نقطه‌ایی با استفاده از وبگاه PoPMuSiC-2.1انجام گرفت. سپس با جایگزین کردن اسیدهای آمینه جهش یافته با اسید-های آمینه اصلی موجود در توالی پروتئین همولیزین مورد نظر یک توالی متفاوت در ۳الی ٤ 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.

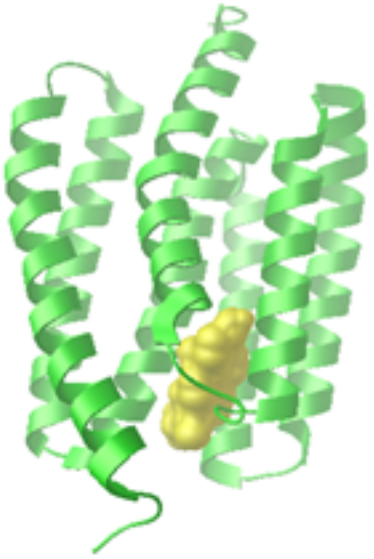
همچنین در (شکل ۸ و ۹) مقایسه اتصال

جدول۲: 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

دمای ۲۹۸/۱۵	حداقل انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	سهم انرژیهای بین مولکولی (کیلوکالری بر مول)	سهم انرژی آزاد پیچشی
اجرای۱	-۵/۸۴	-۳/۰۵	۱/۷۹
اجرای۵	-۵/۸	-۳/۰۱	۱/۷۹
اجرای۱۵	-۵/۲۸	-۲/۴۹	۱/۷۹
اجرای۳۱	-۴/۷۶	-۲/۳۵	۱/۷۹
اجرای۸۲	-۴/۱۲	-۲/۰۲	۱/۷۹
اجرای۹۵	-۳/۹۳	-۱/۵۲	۱/۷۹

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

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 MDبیان داشته که شبیه سازی دینامیک مولکولی می‌تواند برای تشخیص و بررسی ساختار یک پروتئین به عنوان یک مدل در غشاء به صورت درست یا نادرست

به کار رود و اینکه مدل پروتئین می‌تواند به عنوان یک ساختار با ثبات در طول شبیه سازی 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 شبیه سازی دینامیک مولکولی می‌تواند به عنوان یک ابزار بسیار قوی و با ارزش برای بررسی غشاء، فرایندهای غشایی و ساختارهای بیولوژی پروتئین‌در 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 شبیه سازی کاهش یافته و این کاهش شیب بیانگر کیفیت بهتر در شبیه سازی 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 *SAFR0032 Bacillus pumilus*از ۵ نانوثانیه تا ۳۰ نانوثانیه، ۰/۳۷ نانومتر می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از 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 نشده 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 داده-های خروجی gromacs به این نتیجه رسیدیم که دومین‌های تراغشایی همولیزین به خوبی در داخل غشاء قرارگرفته و این پروتئین ساختار دوم خود را در طول شبیه سازی 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 گلایسین۱۵۲ که در هسته‌ی آبگریز همولیزین *SAFR0032 Bacillus pumilus* قرار دارد نزدیک‌تر می‌باشد و بهترین شکل فضایی به‌دست آمده از اتصالات مولکولی برای همولیزین با کمترین انرژی اتصال ۱۱/۷۲- $kcalmol^{-1}$ بوده است. انرژی‌های تخمین زده شده با اتوداک شامل انرژی‌های

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) از فواید اتصال مولکولی 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 کلسترول با پروتئین همولیزین در گلیسین۱۵۲ و گروه هیدروکسیل بر روی کربن شماره ۳ کلسترول پیوند هیدروژنی ایجاد می‌شود همچنین ۳ ایزولوسین ۱۵۱، گلیسین ۱۵۲ و لوسین ۱۴۹ تماس نزدیکی با کلسترول برقرار کرده‌اندکه 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 الکتروستاتیک 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 کلسترول و جایگزین کردن آنها با اسید آمینه‌هایی که پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد در ثبات برقراری پیوند میان همولیزین و کلسترول به شدت تاثیر داشته تا حدی که حداقل میزان انرژی همولیزین در اتصال با کلسترول به شدت کاهش یافته به طوری که از $kcalmol^{-1}$ ۱۱/۷۲- برای قوی‌ترین اتصال که با اسیدآمینه پرولین جایگزین گردیده به $kcalmol^{-1}$ ۵/۸٤- 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 و میانکنش آن با دیگر ماکرومولکول‌ها تاثیر می‌گذارد Zaaijeret 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

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 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.

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 Arcanobacteriumpyogenes 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. subtili*s 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 satisfactionof 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.