

## ارزیابی توان مهارکنندگی ناحیه پروپپتید به عنوان مهارگر کیموتریپسین گوارشی کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) بر اساس مطالعه‌های محاسباتی

سید علی همتی\* و نرگس کرم کیانی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sa.hemmati@scu.ac.ir

### چکیده

کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner آفتی با دامنه میزبانی وسیع است که باعث خسارت اقتصادی شدید روی محصولات کشاورزی در ایران و جهان می‌شود. در سال‌های اخیر، حشره‌کش‌های شیمیایی به عنوان موثرترین روش کنترل این آفت استفاده شده‌اند، که با توجه به اثرات مخرب آن‌ها، اغلب پژوهش‌ها در راستای دستیابی به روشی جایگزین برای کنترل شیمیایی هدایت می‌شوند. یکی از رویکردهای کارآمد برای کنترل آفات، هدف قرار دادن دستگاه گوارش و به‌ویژه مهار آنزیم‌های گوارشی می‌باشد. در این مطالعه، ما از قطع پروپپتید آنزیم کیموتریپسین *H. armigera* به عنوان یک مهارکننده اختصاصی استفاده نمودیم. مدل ساختاری کیموتریپسین حشره از طریق مدل‌سازی همسانی و با استفاده از ساختار کریستالی کیموتریپسین گاوی، *Bos taurus* L. به عنوان ساختار الگو پیش‌بینی شد. کیفیت مدل ساختاری حاصل توسط آنالیزهای مختلف از جمله VERIFY\_3D، PROCHECK، ERRAT و WHAT-IF Z-scores مورد ارزیابی قرار گرفت، که نتایج نشان از کیفیت مطلوب مدل پیشنهادی داشت. علاوه بر این، مطالعات شبیه‌سازی داکینگ مولکولی میان مدل ساختاری پیش‌بینی شده آنزیم و پروپپتید مهارکننده نشان داد که پروپپتید مهارکننده مطلوب‌ترین امتیاز داکینگ و انرژی پیوند کل را در هنگام برقراری میان‌کنش با جایگاه فعال کیموتریپسین کرم غوزه پنبه دارا می‌باشد. با این حال، پروپپتید مهارکننده پتانسیل ضعیفی برای ایجاد میان‌کنش با کیموتریپسین خوک، *Sus scrofa* L. به عنوان نماینده‌ای از پستانداران، از خود بروز داد. نتایج حاصل از این پژوهش، اهمیت مطالعه‌های محاسباتی در طراحی و انتخاب پروپپتیدهای مهارتی مطلوب علیه آنزیم‌های هدف را نشان می‌دهد. چنین مهارکننده‌هایی می‌توانند به عنوان جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل *H. armigera* و یا سایر آفات در آینده پیشنهاد شوند.

**واژه‌های کلیدی:** کرم غوزه پنبه، کیموتریپسین، مدل‌سازی همسانی، پپتید مهارکننده، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

## Evaluation of the inhibitory potential of pro-peptide region as the inhibitor of the digestive chymotrypsin of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), based on *in silico* studies

Seyed Ali Hemmati\* & Narges Karam Kiani

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

\* Corresponding author, E-mail: sa.hemmati@scu.ac.ir

### Abstract

The cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), is a wide host range pest that causes severe economic damages to agricultural crops in Iran and all around the world. During recent years, chemical insecticides have been used as the most effective strategy in control of this pest, but due to their hazardous effects, most of the researches are being conducted to offer an alternative approach for chemical control. In this regard, digestive systems, in particular inhibition of insect digestive enzymes, are considered as a target for pest control. Here, we used the original pro-region of *H. armigera* chymotrypsin

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۷، پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۵

دبیر تخصصی: سعید محرمی‌پور

as a potent and specific inhibitor of the pest enzyme. The structural model of the insect chymotrypsin was predicted based on homology modeling and the crystal structure of *Bos taurus* L. as template. The reliability of the model was assessed using VERIFY\_3D, ERRAT, PROCHECK, WHAT-IF and Z-scores, and the results confirmed that the predicted structural model has an appropriate quality. Moreover, molecular docking simulations between the predicted structural model of enzyme and designed peptide showed that the inhibitor peptide has the most appropriate docking score and total binding energy for interactions with the insect chymotrypsin's active site. However, it showed a weak potential for interaction with *Sus scrofa* L. chymotrypsin, as a representative of the mammalian enzyme. The results of this report indicate the importance of computational studies in design and selection of the favored inhibitor pro-peptides against the target enzymes. Such inhibitors can be further suggested as a replacement of chemical pesticides for controlling of *H. armigera* as well as the other pests in future.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*, Chymotrypsin, Homology modeling, Inhibitor peptide, Molecular docking simulation.

Received: 5 April 2020, Accepted: 15 July 2020

## مقدمه

کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner، آفتی چندخوار با دامنه میزبانی وسیع است که هر ساله خسارات زیادی به محصولات زراعی و باغی در نقاط مختلف جهان وارد می‌کند. لاروهای این آفت با تغذیه از اندام‌های رویشی و زایشی گیاهان میزبان، سبب کاهش رشد اندام‌های زایشی و در نتیجه کاهش میزان تولید محصول می‌شوند (Fitt, 1989; Sudbrink & Grant, 1995). میزبان‌های عمده این آفت شامل پنبه، نخود، لوبیا، بامیه، گوجه‌فرنگی، کنجد، توتون، کنف، ذرت و آفتابگردان می‌باشد (Fitt, 1989; Talekar et al., 2006; Hemati et al., 2012). هزینه‌هایی که هر ساله به منظور کنترل این آفت صرف می‌شود، نقش مهمی در افزایش هزینه‌های تولید و کاهش سود کسب شده توسط کشاورزان دارد. در حال حاضر، روش متداول کنترل این آفت در مزارع کشور متکی بر استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی نظیر ترکیبات حشره‌کش فسفره و پیرتروئیدها است (Dastjerdi et al., 2008). امروزه حشره‌کش‌های شیمیایی سهم زیادی را در کنترل آفات به خود اختصاص داده‌اند، در حالی‌که اثرات جانبی ناشی از سموم بر انسان، حیوانات، محیط زیست و همچنین بروز مقاومت در آفات و باقی‌مانده سموم در غذا از آثار مخرب آفت‌کش‌ها به شمار می‌آیند (Phillips et al., 2000; Karahroodi et al., 2009). نگرانی‌ها نسبت به استفاده از آفت‌کش‌ها موجب شده است که راه‌های جایگزین برای آفت‌کش‌های شیمیایی به منظور کنترل آفات در دستور کار قرار گیرند (Yildirim et al., 2001; Isman, 2006).

ترکیباتی مانند مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی شامل آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز، لکتین‌های به دست آمده از گیاهان و قارچ‌ها و همچنین دلتا-اندوتوکسین باکتری‌ها دارای پتانسیل مناسبی به منظور بکارگیری در کنترل آفات هستند (Franco et al., 2002). جداسازی و شناسایی مهارکننده‌های پروتئینی پروتازها مقدمه بسیاری از مفاهیم بنیادی مرتبط با اثرات متقابل آنزیم-مهارکننده بوده است (Kunitz & Northrop, 1936; Kunitz, 1945). پروتازها (پپتید هیدرولازها، EC 3.4)، آنزیم‌های هیدرولیز کننده پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه، با عمل روی پیوندهای پپتیدی هستند (Terra & Ferreira, 1994). این آنزیم‌ها با تأمین اسیدهای آمینه ضروری نقش مهمی در نشو و نماي حشرات دارند (Mehrabadi et al., 2009; 2012). سرین پروتازها در لوله گوارش بسیاری از حشرات از جمله بال‌پولکداران شناسایی شده‌اند (Houseman et al., 1989)، و ثابت شده که مهارکننده‌های سرین پروتازها، اثرات ضدتغذیه‌ای روی چند گونه از آفات راسته بال‌پولکداران دارند، در حالی‌که روی پستانداران فاقد اثرات مشابه هستند (Shukle & Murdock, 1983; Applebaum, 1985). تریپسین (EC 3.4.21.4) و کیموتریپسین (EC 3.4.21.1) مهم‌ترین سرین پروتازهای موجود در دستگاه گوارش حشرات هستند که به طور عمده موجب شکست بخش کربوکسیلی اسیدهای آمینه‌ی ویژه (تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین توسط کیموتریپسین؛ لایزین و آرژنین

توسط تریپسین) پلی‌پپتیدها می‌شوند؛ در نتیجه می‌توانند به عنوان اهداف اصلی جهت طراحی مهارکننده‌های آنزیمی در نظر گرفته شوند (Walsh & Wilcox, 1970; Ryan, 1990). بیشتر کیموتریپسین‌های حشرات دارای وزن مولکولی در حدود ۲۰ تا ۳۰ کیلو دالتون بوده و اسیدیتهٔ بهینهٔ فعالیت آن‌ها حدود ۸ تا ۱۱ است. کیمو-تریپسین‌ها مانند تریپسین‌ها در بالپولکلداران، اسیدیتهٔ بهینه بالاتری نسبت به دیگر حشرات دارند (Terra & Ferreira, 1994).

در سال‌های اخیر، استفاده از ناحیه پروپیتیدی پروتئازهای حشرات به عنوان روشی هوشمند در مهار این آنزیم‌ها در طراحی گروه جدیدی از مهارکننده‌ها مورد توجه محققان قرار گرفته است (Lazure, 2002). این نواحی پروپیتیدی در پروتئازها دارای دو نقش عمده می‌باشند؛ از یک سو به شکل‌گیری ساختار سه بعدی آنزیم بالغ کمک نموده و از سوی دیگر به عنوان مهارکننده‌های پروتئازی عمل کرده و مانع دسترسی سوبسترا به آنزیم و به دنبال آن مهار فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شوند (Groves et al., 1996). نقش دوم نواحی پروپیتیدی برای طراحی حشره‌کش‌های نوین مورد توجه قرار گرفته است، چرا که این نواحی توانایی مهار پروتئازهای آفات کشاورزی را دارند (Jitonnom et al., 2012).

در مطالعه‌های پیشین، توانایی مهارکنندگی نواحی پروپیتیدی علیه پروتئازهای مختلف در شرایط محاسباتی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، مطالعه‌های ابتدایی روی کرم شاخدار توتون، *Manduca sexta* L. نشان داد که پروپیتید سنتزی مورد آزمایش، توانایی مهار آنزیم تریپسین معده میانی حشره را داشته، در حالی که تأثیری روی فعالیت تریپسین پانکراس خوک، *Sus scrofa* L. از خود بروز نداد (Taylor & Lee, 1997). نتایج این مطالعه در مرحلهٔ نخست فرضیه موجود در خصوص استفاده از نواحی پروپیتیدی به عنوان مهارکننده‌های آنزیمی حشرات آفت را قوت بخشیده و سپس نشان داد که این نوع از مهارکننده‌ها روی تریپسین پستانداران تأثیر چندانی ندارند. همچنین در مطالعه‌ی دیگر، ناحیهٔ پروپیتید نوترکیب پروتئاز گیاه پاپایا، *Carica papaya* L. باعث مهار سرین پروتئازهای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، *Leptinotarsa decemlineata* Say شد (Visal et al., 1998). در پژوهشی روی سوسک لوبیا، *Acanthoscelides obtectus* (Say) نیز نشان داده شد که ناحیه‌ی پروپیتید قادر به مهار سیستمین پروتئاز حشره بوده و در عین حال کاملاً اختصاصی عمل نموده و روی سایر گونه‌های خانواده سخت‌بالپوشان بی‌اثر بود (Silva et al., 2007). علاوه بر این، با شناسایی توالی اسیدآمینئ تریپسینوزن موجود در معدهٔ میانی بید کلم، (*Plutella xylostella* (L.)) فعالیت مهاری ناحیه پروپیتید علیه تریپسین در شرایط *in silico* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این نواحی می‌توانند برای طراحی حشره‌کش‌های انتخابی نوین مورد توجه گیرند، زیرا توانایی مهار پروتئازهای آفت را دارند (Jitonnom et al., 2012). همچنین در پژوهشی دیگر با بررسی ویژگی‌های ساختاری تریپسین معدهٔ میانی شب‌پره هندی، *Plodia interpunctella* Hübner مدل ساختاری با ویژگی‌های مطلوب از آنزیم پیش‌بینی شد. به علاوه، پس از خالص‌سازی آنزیم، محتوای ساختار دوم آن مشابهت قابل توجهی با ساختار پیش‌بینی شده برای تریپسین نشان داد (Hemmati et al., 2017a). در ادامه با بررسی تمایل اتصالی پپتیدهای مهارکننده طراحی شده براساس ناحیه پروپیتید نسبت به تریپسین آفت در شرایط محاسباتی (*in silico*)، مطلوب‌ترین پپتید مهارکننده به منظور سنتز و ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد. در پایان، نتایج نشان از اثرات مهاری مطلوب پپتید سنتزی روی تریپسین تخلیصی و شاخص‌های تغذیه‌ای شب‌پره هندی به ترتیب در شرایط *in vitro* و *in vivo* داشت (Hemmati et al., 2017b). با در نظر گرفتن پتانسیل مهارکنندگی پپتیدهای مختلف پروتئازی می‌توان افق جدیدی را در طراحی و تولید آفت-کش‌های اختصاصی بر مبنای مهارکننده‌های طبیعی و یا سنتزی پیش‌بینی نمود.

اگرچه کیموتریپسین، سرین پروتئاز مهم دیگر دستگاه گوارش حشرات است، اما تاکنون پژوهشی مبنی بر استفاده از ناحیه پروپیتیدی این آنزیم در جهت مهار فعالیت آنزیمی آن در حشرات گزارش نشده است. در این تحقیق، با توجه به نقش قابل توجه آنزیم کیموتریپسین در هضم و رشد حشرات از یک سو و همچنین اهمیت گونه *H. armigera* در ایران از سوی دیگر، آنزیم کیموتریپسین این حشره هدفی مناسب جهت طراحی مهار-کننده‌ای کاملاً اختصاصی براساس ساختار زیموژن آن (کیموتریپسینوژن) در نظر گرفته شد. با انجام این پژوهش، می‌توان با استفاده از روش‌های محاسباتی شامل مدل‌سازی همسانی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی به عنوان یک ابزار جامع برای مطالعه مکانیسم مهار آنزیم و طراحی پپتید مهارکننده با کارایی مطلوب در راستای تولید حشره‌کشی موثر و بدون اثرات سوء بر موجودات غیرهدف گام برداشت.

## مواد و روش‌ها

### تحلیل توالی اسید آمینه‌ای کیموتریپسین

به منظور تعیین میزان مشابهت توالی‌های اسید آمینه کیموتریپسین بین موجودات مختلف از برنامه BlastP (Altschul *et al.*, 1997)، و سرور NCBI استفاده شد. توالی اسیدهای آمینه نیز از بانک‌های اطلاعاتی EMBL و GenBank استخراج شدند. برای هم‌ترازی چندگانه اسیدهای آمینه از برنامه‌های CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) و ESPript نسخه ۲/۲ (Gouet *et al.*, 1999) استفاده شد.

### مدل‌سازی مقایسه‌ای و تحلیل ساختاری

در این پژوهش، به دلیل عدم وجود ساختار کریستاله آنزیم‌های کیموتریپسین در حشرات، در ابتدا با استفاده از توالی اسید آمینه کیموتریپسین کرم غوزه پنبه و از طریق جستجوی توالی‌های دارای ساختار کریستاله پروتئینی (PDB) در بانک اطلاعاتی NCBI و با کمک جستجوگر BlastP، نزدیک‌ترین ساختار کریستاله دارای توالی اسید آمینه‌ای مشابه انتخاب شد. بر این اساس، پروتئین تریپسین گاو اهلی (*B. taurus*) با شناسه کریستالی PDB:1ACB دارای یکسانی (identity) ۳۳/۷۲ درصد با توالی اسید آمینه کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه، برای مدل‌سازی با نرم‌افزار MODELLER نسخه ۹/۲۳ انتخاب و مدل‌های ساختار سوم کیموتریپسین حشره ساخته شد. به علاوه، مدل ساختاری کیموتریپسین خوک، *S. scrofa*، نیز با استفاده از الگوی کیموتریپسینوژن گاو اهلی با شناسه کریستالی PDB: IPYT بدست آمد. در ادامه، کیفیت مدل‌های ساختاری پیش‌بینی شده، با استفاده از چندین برنامه آنالیز ساختاری پروتئین‌ها از جمله ERRAT، PROCHECK، VERIFY\_3D و WHAT-IF ارزیابی و بهترین مدل جهت استفاده در مطالعه‌های بعدی انتخاب شد. برنامه‌ی ERRAT مدل ساختاری پیش‌بینی شده را از طریق رابطه‌ی آماری برهم‌کنش‌های غیرپیوندی بین انواع اتم‌ها مورد اعتبارسنجی قرار می‌دهد (Colovos & Yeates, 1993). برنامه‌ی PROCHECK کیفیت ساختار پروتئین را از طریق آنالیز ژئومتری زنجیره جانبی و ژئومتری کلی مدل با تأکید بر توزیع زوایای Phi/Psi نمودار رامچاندردان بررسی می‌کند (Karthik & Shukla, 2012). برنامه‌ی VERIFY\_3D سازگاری مدل اتمی (ساختار سوم پروتئین) با توالی آمینواسیدی مربوطه (ساختار اول پروتئین) را براساس موقعیت و محیط تعیین کرده و نتایج را با یک ساختار مناسب مقایسه می‌کند (Eisenberg, 1997). در نهایت، برنامه‌ی WHAT-IF کیفیت مدل پیش‌بینی شده را از طریق ارزیابی ثبات و عملکرد آن بررسی می‌نماید (Ingale & Chikhale, 2010).

### طراحی و مدل‌سازی پپتید مهارکننده

با توجه به اینکه با جدا شدن قسمت پروپیتید از آنزیم نابالغ، آنزیم فعالیت خود را آغاز می‌کند، در نتیجه با الگو گرفتن از این فرآیند و با استفاده از قطعه پروپیتید می‌توان به طراحی مهارکننده‌ای موثر برای کنترل آفت اقدام نمود. به دلیل عدم وجود ساختار کریستاله این نوع پپتیدها و همچنین کوتاه بودن توالی آن‌ها، با استفاده از سرور *I-TASSER* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) ساختارهای پیش‌بینی شده این نواحی بدست آمد. از بین مدل‌های پیش‌بینی شده توسط این سرور، بهترین مدل ساختاری براساس فاکتورهای زیر انتخاب شد؛ C-score جهت تخمین کیفیت مدل پیش‌بینی شده با استفاده از سرور *I-TASSER* و همچنین از *TM-score* و *RMSD* به عنوان استانداردهایی برای ارزیابی مشابهت ساختاری بین دو مدل پیش‌بینی شده و مدل طبیعی استفاده شد.

### شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

به منظور شبیه‌سازی میان‌کنش آنزیم-مهارکننده از نرم افزار تحت وب *HADDOCK* استفاده شد (Dominguez *et al.*, 2003; De Vries *et al.*, 2010). شبیه‌سازی داکینگ مولکولی به منظور بررسی توانایی پروپیتید مهارکننده در اتصال به اسیدهای آمینه کلیدی (جایگاه فعال آنزیم) کیموتریپسین انجام می‌شود. ساختارهای ورودی داکینگ شامل مدل ساختاری پیش‌بینی شده پروپیتید به عنوان مهارکننده و مدل ساختاری بهینه‌ی آنزیم کیمو-تریپسین می‌باشد. با کمک مطالعه‌های قبلی در مشخص نمودن جایگاه فعال آنزیم کیموتریپسین، به منظور بررسی میزان توانایی پپتید مهارکننده در اتصال به جایگاه فعال آنزیم کیموتریپسین و پتانسیل پپتید مهارکننده در پوشش ناحیه مذکور، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی از طریق سرور *HADDOCK* انجام شد (Platzer *et al.*, 1972; Perona & Craik, 1997). در این شبیه‌سازی، برای آنزیم کیموتریپسین اسیدهای آمینه کلیدی (جایگاه فعال)، به عنوان اسیدهای آمینه فعال (*Active residues*) در برهمکنش و برای پپتید مهارکننده، تمامی اسیدهای آمینه به عنوان اسیدهای آمینه منفعل (*Passive residues*) لحاظ شدند. ابتدا ۱۰۰۰ کمپلکس ساخته شده و از بین آنها ۲۰۰ کمپلکس دارای بیشترین امتیاز انتخاب و از نظر انرژی بهینه‌سازی شده و در ادامه ساختارهای خروجی این مرحله براساس *RMSD* (قراردادی نرم‌افزار) دسته‌بندی می‌شوند. در نهایت، بهترین کمپلکس با استفاده از معیارهایی چون امتیاز *HADDOCK* (معیار قراردادی نرم‌افزار جهت انتخاب کمپلکس برتر)، جمعیت دسته‌ها و انحراف ریشه میانگین مربعات نسبت به ساختار دارای پائین‌ترین انرژی، انتخاب و بررسی می‌شوند. میزان اختلاف سطوح در دسترس اسیدهای آمینه کلیدی (جایگاه فعال) آنزیم کیموتریپسین موجود در ساختار کمپلکس آنزیم-مهارکننده در حضور و عدم حضور پپتید مهارکننده، توسط جستجوگر *WHAT IF* محاسبه شدند (Rodriguez *et al.*, 1998). مهارکننده‌ای که بتواند به طور مطلوب با اسیدهای آمینه کلیدی جایگاه فعال کیموتریپسین در حین تشکیل کمپلکس برهمکنش دهد، به عنوان مهارکننده‌ای موثر و کارآمد در نظر گرفته می‌شود. همچنین اثرات پپتید مهارکننده بر مدل ساختاری پیش‌بینی شده کیموتریپسین خوکی نیز به عنوان نماینده‌ای از پروتئاز پستانداران بررسی شد. در تمامی مراحل ذکر شده فوق، مدل‌ها و کمپلکس‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار *CHIMERA* نسخه ۱/۱۱ تصویربرداری شدند.

## نتایج و بحث

### آنالیز توالی اسیدهای آمینه کیموتریپسین موجودات مختلف

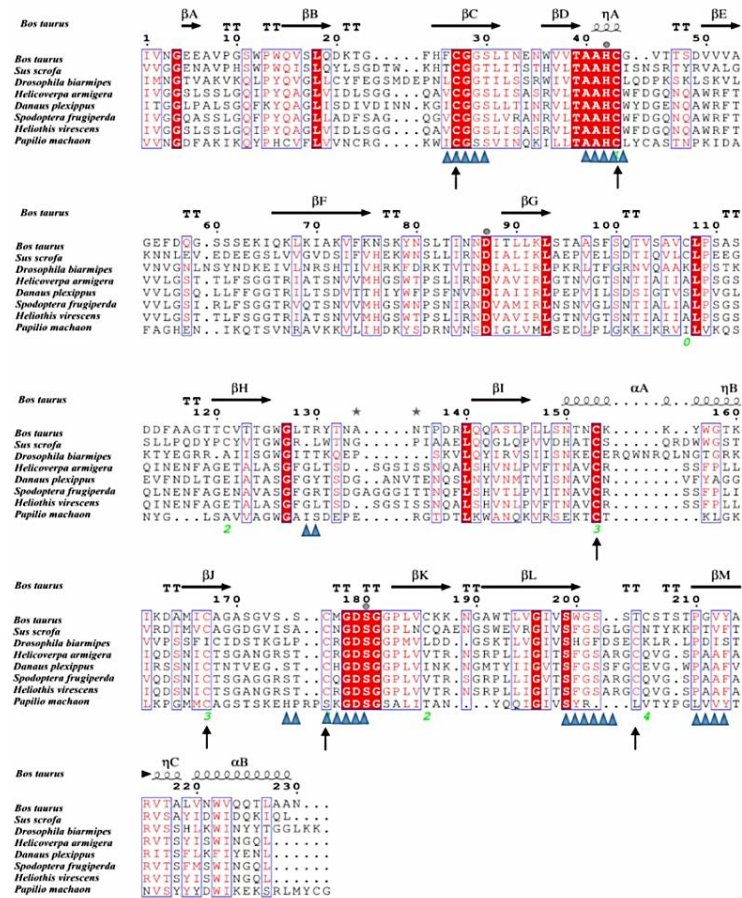
تفاوت میان توالی اسیدهای آمینه کیموتریپسین موجودات مختلف، در کرم غوزه پنبه (به عنوان آفت مورد نظر) با گاو اهلی، *B. taurus* (به عنوان الگو جهت پیش‌بینی ساختار سوم)؛ خوک، *S. scrofa* (به عنوان نماینده‌ای از پستانداران)؛ مگس سرکه، *D. biarmipes* (به عنوان گونه‌ای از راسته متفاوت)؛ و همچنین چندین گونه هم‌راسته مقایسه شد (جدول ۱، شکل ۱a). نتایج نشان داد که میزان درصد یکسانی توالی اسید آمینه‌ای آنزیم کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه با گاو اهلی، خوک و مگس سرکه به ترتیب ۲۷/۸۵، ۲۶/۷۱ و ۲۲/۷۵ درصد و با کیموتریپسین‌های *D. plexippus*، *S. frugiperda* و *H. virescens* به عنوان گونه‌های هم‌راسته خود نیز به ترتیب ۴۹، ۷۸/۷۸، ۴۱/۴۱ و ۱۶/۵ درصد می‌باشد.

جدول ۱- اطلاعات آنزیم‌های کیموتریپسین گوارشی موجودات مختلف مورد استفاده در این مطالعه.

**Table 1.** Information of digestive chymotrypsin enzymes from different organisms used in this study.

	Scientific name	Common name	Family	Accession number	Length of sequence (AA)
1	<i>Helicoverpa armigera</i>	Cotton bollworm	Noctuidae	ADI32883.1	295
2	<i>Danaus plexippus</i>	Monarch butterfly	Nymphalidae	OWR44234.1	297
3	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Fall armyworm	Noctuidae	AAO75039.1	297
4	<i>Heliothis virescens</i>	Tobacco budworm moth	Noctuidae	AFM28258.1	289
5	<i>Papilio machaon</i>	common yellow swallowtail	Papilionidae	KPJ18047.1	232
6	<i>Drosophila biarmipes</i>	Fruit fly	Drosophilidae	XP_016955872.1	268
7	<i>Sus scrofa</i>	Pig	Suidae	AEC11098.1	268
8	<i>Bos taurus</i>	Cattle	Bovidae	XP_003587247.4	300

a)



b)

MKFVALTLLALAAVASARNVHLESDIDLETAWGYLTKFGIPEAEKIRSAEEASSASRIVGSSLSLQIPY  
 QAGLVIDLSSGQAVCGGSLISASRVLTAAHCWFDGQNQAWRFTVVLGSTTLFSGGTIATSNVVMHGSWTPS  
 LIRNDVAVIRLGTNVGTSNTIAIHALPSGSQINENFAGETALASGFLTSDSGSISSNQALSHVNLPLVFNVAICRSS  
 PPLLIQDSNICTSGANGRSTCRGDSGGPLVVTRNSRPLLIGITFSGARGCOVGSPPAAFRVTVSYINGQL

شکل ۱. a، هم‌ترازی چندگانه توالی‌های اسید آمینه‌ای کیموتریپسین *Bos taurus* به عنوان توالی اسید آمینه‌ای مرجع، *Sus scrofa*، *Drosophila biarmipes*، *Helicoverpa armigera*، *Danaus plexippus*، *Spodoptera frugiperda*، *Heliothis virescens* و *Papilio machaon*. جایگاه‌های محتوای ساختار ثانوی پروتئین؛  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ )،  $\beta$ -strand ( $\beta$ )، 310-helix ( $\eta$ ) و turn (T) داده شدند. اسیدهای آمینه مهم عملکردی با دایره‌های خاکستری در قسمت بالا و اسیدهای آمینه جایگاه اتصال با مثلث‌های آبی رنگ در قسمت پایین توالی‌ها نمایش داده شدند. علائم (↑)، موقعیت شش اسید آمینه سیستئین دخیل در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را نشان می‌دهد و b، توالی اسید آمینه‌ای کیموتریپسینوزن معده میانی کرم غوزه پنبه. توالی ناحیه پروپیتید آنزیم به صورت برجسته نشان داده شده است.

**Fig. 1. a.** Multiple sequence alignment of chymotrypsin from *Bos taurus* as a reference amino acid sequence analysis, *Sus scrofa*, *Drosophila biarmipes*, *Helicoverpa armigera*, *Danaus plexippus*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* and *Papilio machaon*. The positions of secondary structure elements;  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ ),  $\beta$ -strand ( $\beta$ ), 310-helix ( $\eta$ ), and turn (T) are shown. Functionally important residues and the amino acids involved in binding sites are shown by gray circles and blue triangle on the top and down of sequences. Arrows (↑) show the position of the six cysteine residues that could form disulfide bridges; and **b.** Amino acid sequences of *Helicoverpa armigera* midgut chymotrypsinogen. The pro-region has been shown in bold.

### آنالیز مدل ساختاری کیموتریپسین

بهترین مدل ساختاری پیش‌بینی شده برای آنزیم کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه و خوک با استفاده از برنامه‌های ارزیابی کیفیت ساختار پروتئین از جمله PROCHECK, ERRAT, Z-score, VERIFY\_3D و WHAT-IF ارزیابی شد (جدول ۲).

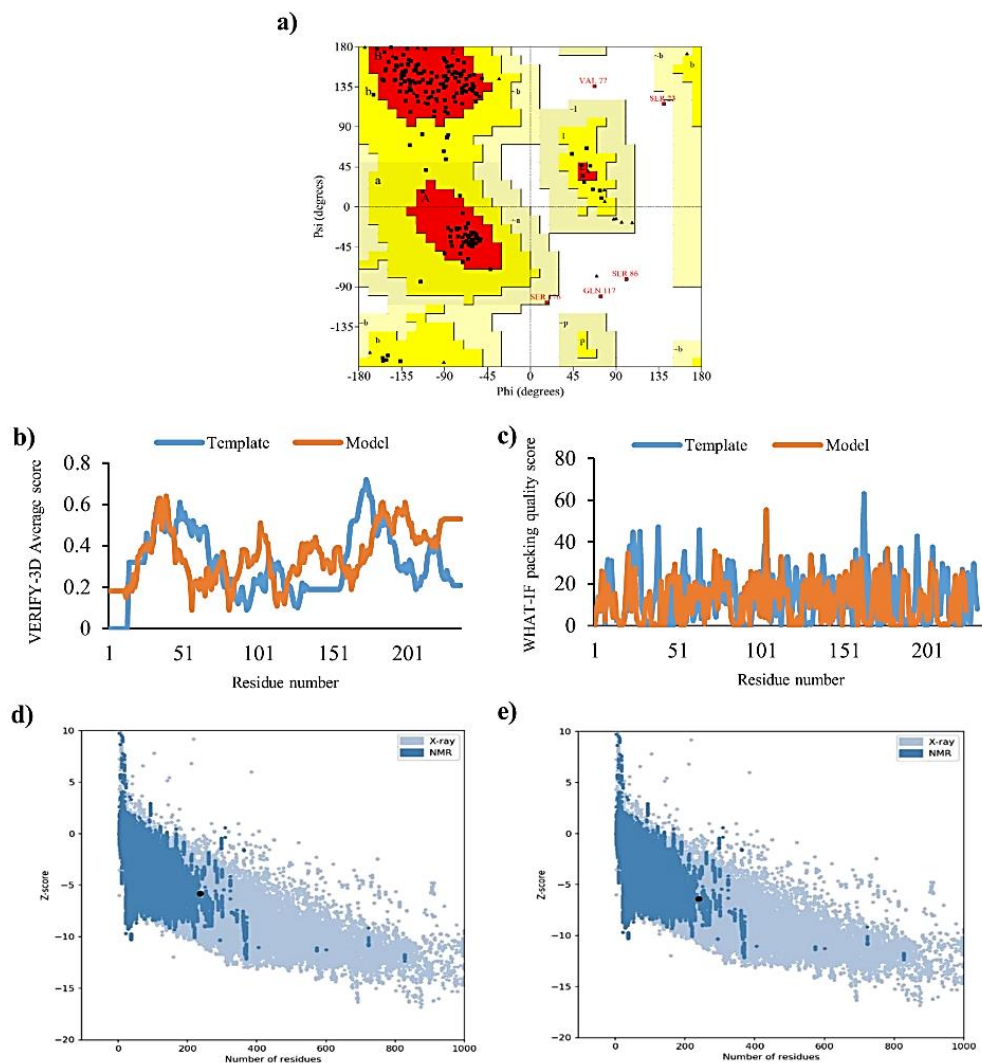
**جدول ۲-** ارزیابی کیفیت مدل‌های ساختار پیش‌بینی شده کیموتریپسین *Helicoverpa armigera* به عنوان آفت هدف، خوک، *Sus scrofa* به عنوان پستاندار و ساختار کریستالوگرافی کیموتریپسین گاو اهلی، *Bos taurus* به عنوان الگو با استفاده از اطلاعات سرور SAVES.

**Table 2.** Evaluation of the quality of predicted structural models of *Helicoverpa armigera* chymotrypsin as the target pest, *Sus scrofa* as mammalian and crystal structure of *Bos taurus* chymotrypsin as template, using quality control software (SAVES server).

Parameters	<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Bos taurus</i>		<i>Sus scrofa</i>
		IACB	IPYT	
VERIFY 3D (%)	87.71	74.69	90.84	95.82
ERRAT (%)	71.05	76.70	59.09	70.99
PROCHECK (%)	84.4	91.00	65.6	80.2
Z-Score	-5.80	-8.03	-5.98	-6.41

ابتدا به منظور دستیابی به نمودار رام‌چاندرا مدل ساختاری پیشنهادی که نمایانگر کیفیت کلی استرئوشیمی مدل ساختاری است، آنالیز PROCHECK مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نمودار رام‌چاندرا نشان‌دهنده این است که ۸۴/۴ درصد باقی مانده در مناطق مطلوب، ۱۳ درصد در مناطق مجاز، ۰/۵ درصد در بخش نیمه مجاز و ۲/۱ درصد در منطقه غیرمجاز می‌باشد (شکل ۲a). حضور درصد بالایی از اسیدهای آمینه در مناطق مطلوب که براساس آنالیز ۱۱۸ ساختار بدست آمده است، نشان‌دهنده این است که مدل طراحی شده از ویژگی فضایی مطلوبی برخوردار است (Laskowski *et al.*, 1993). در ادامه، سازگاری مدل با توالی آن توسط نرم افزار VERIFY\_3D بررسی شد. امتیاز سازگاری بالای صفر در نمودار VERIFY\_3D با محیط‌های زنجیره جانبی قابل قبول مطابقت دارد (Eisenberg, 1997). در مدل ساختاری، همه اسیدهای آمینه دارای امتیاز بالای صفر هستند که نشان‌دهنده سازگاری بالای مدل پیشنهادی با ساختارهای تجربی می‌باشد (شکل ۲b). سرور ERRAT به منظور بررسی کیفیت کلی برهم‌کنش‌های غیریونی در ساختار پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Colovos & Yeates, 1993) که مقدار آن برای مدل ساختاری پیش‌بینی شده و الگو به ترتیب حدود ۷۱/۰۵ و ۷۶/۷۰ درصد تخمین زده شد (جدول ۲). همچنین، کیفیت مدل پیش‌بینی شده از طریق ارزیابی ثبات اسیدهای آمینه مدل نیز توسط آنالیز WHAT-IF مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۲c). نتایج این ارزیابی نشان داد که اسیدهای آمینه مدل پیش‌بینی شده کیموتریپسین کرم غوزه پنبه دارای امتیاز بالای صفر بوده که این نشان از مطلوبیت بالای آن دارد. در نهایت، Z-score که با استفاده از نرم‌افزار تحت وب PROSA بدست می‌آید، و اگرایی میزان کل انرژی مدل ساختاری را با تمرکز بر توزیع انرژی کانفورماسیون‌های تصادفی بدست آمده از پروتئین‌های طبیعی مورد بررسی قرار می‌دهد (Zhang & Skolnick, 1998). بنابراین، Z-score یک مدل ساختاری بیانگر کیفیت کلی مدل طراحی شده است، که به ترتیب معادل ۵/۸۰- و ۶/۴۱- برای مدل ساختاری کیموتریپسین کرم غوزه پنبه و خوک تخمین زده شد (جدول ۲). نتایج آنالیز PROSA نشان داد که مدل‌های ساختاری پیش‌بینی شده از نظر کیفیت دارای قرابت بالایی با ساختارهای حاصل از روش آزمایشگاهی بوده و در مقایسه با روش با دقت بالاتر یعنی NMR نیز در محدوده‌ی ساختارهای نزدیک به ساختارهای طبیعی قرار گرفتند (شکل ۲d, e).

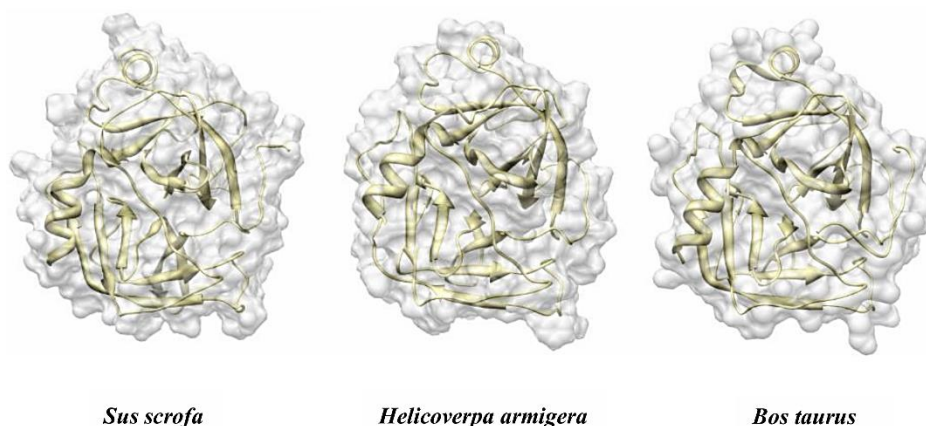




**شکل ۲.** **a**، نمودار رامچاندران؛ **b**، نمودار VERIFY-3D، و **c**، نمودار مدل ساختاری WHAT-IF پیش‌بینی شده کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه و الگوی مورد استفاده. در نمودار نواحی مطلوب (A، B، L)، نقاط مجاز (a، b، l و p) و نقاط غیرمجاز (رنگ قرمز) مشخص شده‌اند. نشان داده شده‌اند. **d**، کیفیت کلی مدل (نقطه سیاه در نمودار) در مدل ساختاری پیش‌بینی شده کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه و **e**، خوک.

**Fig. 2. a.** Ramachandran plot; **b.** VERIFY-3D score, and **c.** WHAT-IF packing quality scores calculated for the cotton bollworm and model. The most favored regions (A, B, and L), allowed regions (a, b, l, and p) and disallowed residues (red color) are marked. **d.** The overall quality (black color) of the cotton bollworm and **e.** *Sus scrofa* predicted structural models of chymotrypsin.

نتایج بدست آمده به وضوح نشان دادند که مدل ساختاری پیش‌بینی شده برای کیموتریپسین معده‌ی میانی کرم غوزه پنبه و خوک از کیفیت مطلوبی برخوردار است (شکل ۳) و می‌توان از آن برای انجام مطالعه‌های شبیه‌سازی داکینگ مولکولی استفاده نمود.



شکل ۳- نمایش فضایی- نواری ساختار سوم کریستاله آنزیم کیموتریپسین *Bos taurus* و مدل‌های ساختاری کیموتریپسین *Helicoverpa armigera* و *Sus scrofa*.

**Fig. 3.** A superimposed representation of the 3D crystal structural model of chymotrypsin from *Bos taurus* and predicted structural models of *Helicoverpa armigera* and *Sus scrofa*.

### آنالیز مدل‌سازی پپتید مهارکننده

بر اساس خروجی سرور I-TASSER، سه مدل ساختاری برای پروپیتید مهارکننده ارائه شد که برپایه معیارهای C-score، TM-score و RMSD، مطلوب‌ترین مدل ساختاری را برای مطالعه‌های بعدی پیشنهاد می‌دهد که در اینجا به ترتیب معادل ۲/۲۶، ۰/۴۵ و ۱/۸ (آنگستروم) تخمین زده شدند. براساس مطالعه‌های قبلی، RMSD بین ۱ و ۲ آنگستروم، بیانگر شباهت بالاتر میان ساختارها و مقدار TM-score بین ۰/۵ و ۱ نشان‌دهنده تاخوردگی (Folding) مشابه آن‌ها می‌باشد (Roy et al., 2010). مقادیر RMSD و TM-score بدست آمده برای مدل ساختاری منتخب پروپیتید مهارکننده نشان از شباهت ساختاری و الگوی تاخوردگی مشابه بین مدل پیش‌بینی شده و ساختار الگو داشت. C-score با کیفیت مدل‌های نهایی رابطه مستقیمی داشته و به طور معمول در محدوده ۵- و ۲ قرار می‌گیرد که مقادیر بالاتر نشانگر یک مدل ساختاری با کیفیت مطلوب می‌باشد. در این مطالعه مقدار این پراسنجه برابر ۲/۲۶- بوده که بیانگر کیفیت مناسب مدل ساختاری پیش‌بینی شده برای پروپیتید مهارکننده می‌باشد.

### شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

در این مطالعه، یک مهارکننده پپتیدی براساس ناحیه پروپیتید ساختار زیموژن کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه با استفاده از روش‌های محاسباتی طراحی شد. مهارکننده‌های آنزیم با اتصال به جایگاه فعال آنزیم سبب ایجاد یک کمپلکس غیرقابل برگشت و به تبع آن غیرفعال شدن آنزیم در حشره مورد نظر می‌شوند (Prasad et al., 2010). شبیه‌سازی داکینگ مولکولی یکی از رایج‌ترین روش‌ها جهت بررسی کمپلکس‌های ساختاری می‌باشد (Leuck & Perkins, 1972). در این مطالعه، برای پیش‌بینی دقیق و هدفمند نحوه میان‌کنش مهارکننده - آنزیم، فرآیند شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی توسط برنامه HADDOCK انجام شد. در این بررسی، تمایل پروپیتید مهارکننده جهت اتصال به اسیدهای آمینه کلیدی کیموتریپسین و نیز توانایی آن در غیرفعال نمودن این اسیدهای آمینه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر شبیه‌سازی، کمپلکسی به‌عنوان کمپلکس برتر انتخاب شد که دارای بالاترین امتیاز HADDOCK و کمترین RMSD نسبت به پایدارترین ساختار شبیه‌سازی شده بوده و متعلق به یکی از پرجمعیت‌ترین دسته‌های منتخب توسط HADDOCK باشد. آنالیز دسته‌های برگزیده (براساس معیارهای امتیاز

RMSD, HADDOCK و جمعیت دسته‌های منتخب) نشان داد که پروپیتید مهارکننده توانایی برقراری میان‌کنش با جایگاه اتصال سوبسترای کیموتریپسین را دارد. این نتایج با تجزیه و تحلیل چهار دسته برتر در مورد هر کمپلکس کیموتریپسین - پروپیتید مهارکننده تأیید شد. همچنین، به منظور ارزیابی پتانسیل پروپیتید مهارکننده در پوشاندن اسیدآمینه‌های کیموتریپسین، اختلاف سطوح در دسترس اسیدهای آمینه کیموتریپسین کمپلکس‌ها در حضور و عدم حضور مهارکننده محاسبه و اسیدهای آمینه دخیل در اتصال به پروپیتید نیز مشخص شدند. اسیدهای آمینه دارای بیشترین تغییرات در سطوح در دسترس، بیشترین نقش را در اتصال به مهارکننده ایفا می‌کنند. نتایج نشان می‌دهد که اغلب اسیدهای آمینه کلیدی (جایگاه فعال) آنزیم در اتصال پروپیتید مهارکننده نقش دارند (شکل ۴). مهارکننده‌های آنزیم معمولاً با مسدود کردن یا تغییر جایگاه فعال آنزیم‌ها، اثر خود را اعمال می‌کنند (Kalman, 1981). نتایج نشان داد که بیشترین تغییرات اختلاف سطوح در دسترس اسیدهای آمینه کیموتریپسین در حضور پروپیتید مهارکننده برابر  $306/895 \text{ \AA}^2$  بوده که نشان دهنده پوشش مناسب اسیدهای آمینه آنزیم توسط این مهارکننده است. انرژی اتصال کیموتریپسین و مهارکننده در برترین ساختار دسته‌های برگزیده این شبیه‌سازی‌ها نیز آنالیز شد. بدین ترتیب نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی نشان داد که انرژی اتصال کل کیموتریپسین - پروپیتید برابر  $-258/299$  کیلو کالری بر مول ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ) بوده که حاکی از تمایل بالای پروپیتید مهارکننده برای اتصال به نواحی عملکردی کیموتریپسین می‌باشد (جدول ۳).

**جدول ۳-** آنالیزهای آماری شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی کلاسترهای منتخب کمپلکس‌های مختلف کیموتریپسین - پروپیتید مهارکننده توسط سرور HADDOCK.

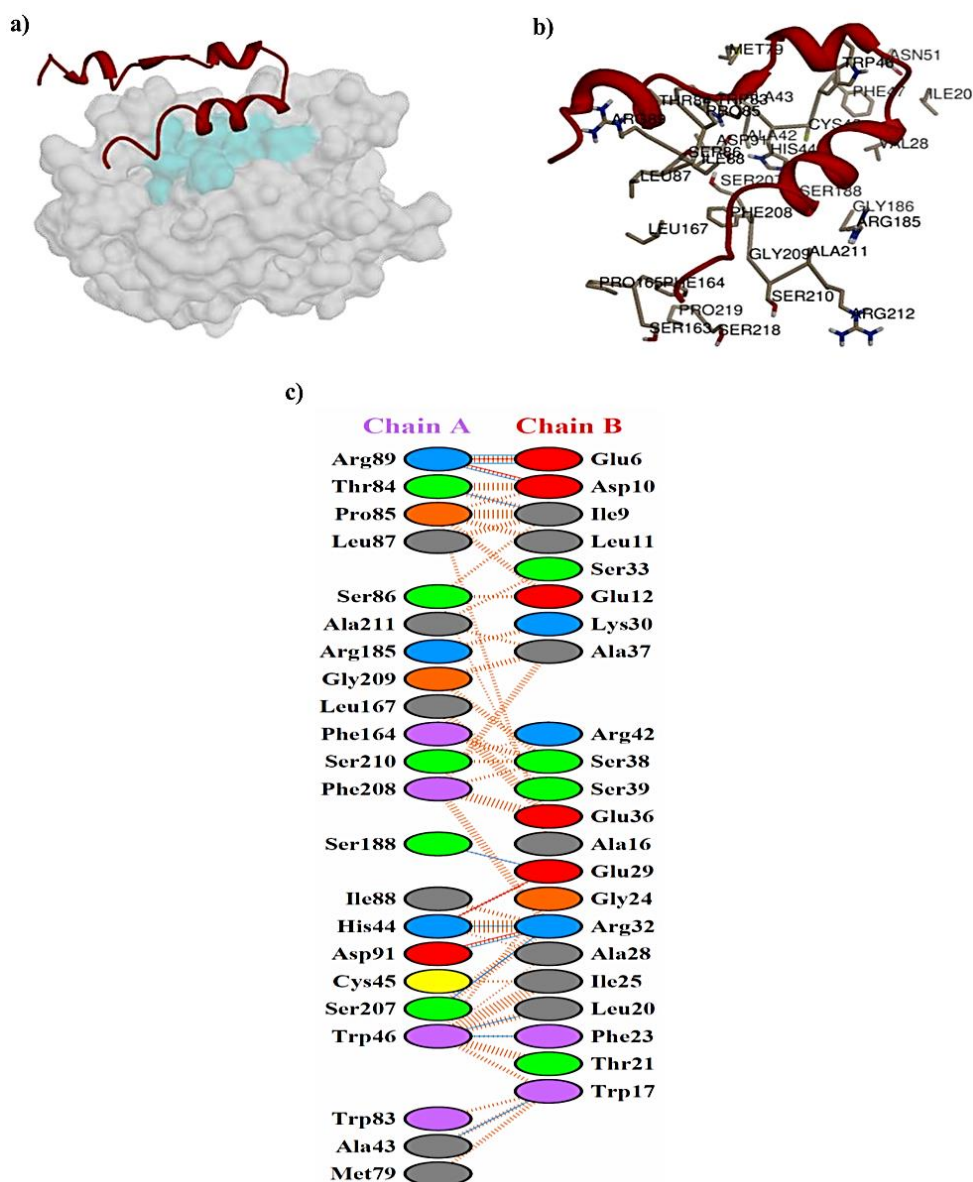
**Table 3.** Statistics analysis of HADDOCK results for top-ranked clusters of different complexes between chymotrypsin – pro-peptide inhibitor.

Statistics analysis	<i>Helicoverpa armigera</i>		<i>Sus scrofa</i>	
(Cluster rank) Complex	92 (1)	44 (1)	137 (2)	108 (2)
HADDOCK score	-127.9	-127.9	-96.9	-96.9
Cluster size	38	38	21	21
RMSD ( $\text{\AA}$ )	0.8	0.8	0.5	0.5
Van der Waals ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	-88.37	-72.68	-94.81	-90.77
Electrostatic ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	-169.86	-206.40	5.58	-37.82
Desolvation ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	-37.56	-29.99	2.56	7.86
Total ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	-258.23	-279.09	-89.23	-128.60
Buried surface area ( $\text{\AA}^2$ )	2393.00	2177.52	2157.93	2157.33
$\Delta$ ASA of active site residues ( $\text{\AA}^2$ )	306.895	302.990	207.747	91.552

نکته مهم و ضروری در استفاده از مهارکننده‌ها در کنترل آفات، ارائه مهارکننده‌ای است که استفاده از آن در محیط زیست کاملاً ایمن باشد. بنابر این، یکی از پرسش‌های مهم در بحث کنترل آفات، چگونگی تاثیر آن بر سلامت سایر جانداران به‌ویژه پستانداران است. برای پاسخ به این سوال، مدل ساختاری آنزیم کیموتریپسین خوک، از طریق مدل‌سازی همسانی ساخته شد و میان‌کنش آن با پروپیتید مهارکننده (موثر بر کیموتریپسین لارو کرم غوزه پنبه) در شرایط مشابه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که انرژی اتصال کیموتریپسین خوکی و پروپیتید مهارکننده بسیار نامطلوب و برابر  $-89/234$  کیلو کالری بر مول ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ) بوده که بیانگر تمایل بسیار ضعیف مهارکننده جهت اتصال به کیموتریپسین خوکی در مقایسه با کیموتریپسین کرم غوزه پنبه بود. بنابراین، می‌توان گفت که مهارکننده طراحی شده قادر است به طور اختصاصی آنزیم کیموتریپسین کرم غوزه پنبه را شناسایی و به آن اتصال یابد، در حالی که توانایی بسیار ضعیف‌تری در اتصال به کیموتریپسین پستانداران دارد. بطور کلی، نتایج

نشان می‌دهند که جایگاه اتصال در کیموتریپسین آفت، محتمل‌ترین و مناسب‌ترین مکان جهت اتصال پروپیتید مهارکننده با تمایل بالا به آنزیم بوده و مهارکننده بطور مؤثری اسیدهای آمینه کلیدی این ناحیه عملکردی را پوشش داده و موجب مهار آن می‌شود (شکل ۴a, b).

به علاوه، اثرات متقابل از جمله پیوندهای هیدروژنی بین پروپیتید مهارکننده و کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه با استفاده از سرور PDBsum مورد بررسی قرار گرفت (de Beer *et al.*, 2014). همان‌طور که در شکل ۴c مشاهده می‌شود، اسیدهای آمینه کیموتریپسین کرم غوزه پنبه شامل Arg89، Thr84، Ser188، His44، Asp91، Ser207 و Trp46 و Ala43 در تشکیل یازده پیوند هیدروژنی نقش دارند. از طرفی، اسید آمینه Arg32 در پروپیتید مهارکننده قادر به برقراری چندین پیوند هیدروژنی با اسیدهای آمینه جایگاه فعال آنزیم کیموتریپسین (Asp91، His44 و Ser207) است که تضمینی بر اتصال قوی میان مهارکننده و آنزیم کیموتریپسین خواهد بود. اثرات متقابل دیگر از جمله پیوندهای واندروالسی نیز مهم هستند، که به فراوانی از طریق اسیدهای آمینه His44، Trp46، Pro85، Asp91، Ser210 و Ala211 برقرار می‌شوند.



**شکل ۴. a**، کمپلکس پروپپتید مهارکننده (قرمز) و آنزیم کیموتریپسین کرم غوزه پنبه (سفید)؛ **b**، برهمکنش بین پپتید مهارکننده و اسید آمینه‌های موجود در جایگاه فعال آنزیم و **c**، پیوندهای هیدروژنی (خطوط آبی رنگ) و اتصالات غیرپیوندی میان پپتید مهارکننده (زنجیره B) و کیموتریپسین (زنجیره A) معده میانی کرم غوزه پنبه.

**Fig. 4. a.** The pro-peptide inhibitor (red)- the cotton bollworm chymotrypsin (white) complex; **b.** The interactions between the inhibitor peptide and the residues involved in the enzyme active site, and **c.** The hydrogen bonds (Blue lines) and non-bonded contacts between inhibitor peptide (chain B) and the cotton bollworm midgut chymotrypsin (Chain A).

به طور کلی، این مطالعه به منظور ارزیابی تمایل و قدرت اتصال ناحیه پروپپتید کیموتریپسین معده میانی کرم غوزه پنبه به عنوان مهارکننده آنزیم، به منظور ارائه رویکردی جدید و جایگزینی برای حشره‌کش‌های شیمیایی انجام شد. در این راستا، شیوه‌های مختلف بیوانفورماتیکی جهت طراحی و شناخت دقیق کیموتریپسین کرم غوزه پنبه در سطح مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. میان‌کنش پروپپتید مهارکننده و سرین پروتئاز دستگاه گوارش

کرم غوزه پنبه، توانایی پروپیتید در مهار کیموتریپسین آفت را تایید نمود. در مقابل، مهارکننده پتانسیل بسیارضعیفی جهت برهمکنش با کیموتریپسین خوکی (به عنوان نمونه‌ای از پستانداران) از خود بروز داد. نتایج این مطالعه، نقش کلیدی رویکردهای محاسباتی (مدل‌سازی همسانی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی) را به عنوان یک ابزار جامع جهت طراحی پپتیدهای مهارکننده با کارایی مطلوب و اثرات اختصاصی بر آنزیم‌های بالغ آفت مورد نظر را بدون اثرات سوء بر موجودات غیرهدف نشان می‌دهد. همچنین، این امکان را برای محققان فراهم می‌سازد تا پیش از انجام کارهای عملی و صرف زمان زیاد و مواد غیرضروری، با انجام چندین روش محاسباتی دقیق و هوشمند نسبتاً آسان و کاملاً ارزان، ابتدا از صحت فرضیه پیشنهادی و بروز هر گونه نتایج مشکوک در روش پیشنهادی اطمینان حاصل نموده و سپس در جهت انجام تست‌های آزمایشگاهی اقدام نماید. یافته‌های این تحقیق می‌تواند گام بلندی در راستای طراحی حشره‌کش‌های بی‌خطر و کارآمد آتی باشد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره گرنت SCU.AP98.39134) تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389–3402
- Applebaum, S. W. (1985) Biochemistry of digestion. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* 4, 279–311
- Colovos, C. & Yeates, T. O. (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2, 1511–1519
- De Beer, T. A. P., Berka, K., Thornton, J. M. & Laskowski, R. A. (2014) PDBsum additions. *Nucleic acids research* 42, 292–296
- De Vries, S. J., van Dijk, M. & Bonvin, A. M. J. J. (2010) The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols* 5, 883–897
- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. J. J. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society* 125, 1731–1737
- Eisenberg, D., Lüthy, R. & Bowie, J. U. (1997) [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. pp. 396–404 in Charles, W., Carter, Jr. & Robert, M. Sweet (Eds) *Methods in Enzymology*. 696 pp. Academic Press.
- Fitt, G. P. (1989) The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology* 34, 17–52
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. & Grossi-de-Sá, M. F. (2002) Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *European Journal of Biochemistry* 269, 397–412

- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. & Metoz, F.** (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305–308
- Groves, M. R., Taylor, M. A. J., Scott, M., Cummings, N. J., Pickersgill, R. W. & Jenkins, J. A.** (1996) The prosequence of procaricain forms an  $\alpha$ -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure* 4, 1193–1203
- Hemati, S. A., Naseri, B., Ganbalani, G. N., Dastjerdi, H. R. & Golizadeh, A.** (2012) Digestive proteolytic and amylolytic activities and feeding responses of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera) on different host plants. *Journal of Economic Entomology* 105, 1439–1446
- Hemmati, S. A., Sajedi, R. H., Moharramipour, S., Taghdir, M., Rahmani, H., Etezad, S. M. & Mehrabadi, M.** (2017a) Biochemical characterization and structural analysis of trypsin from *Plodia interpunctella* midgut: implication of determinants in extremely alkaline pH activity profile. *Physiological Entomology* 42, 307–318
- Hemmati, S. A., Sajedi, R. H., Moharramipour, S., Taghdir, M., Rahmani, H., Etezad, S. M. & Mehrabadi, M.** (2017b) Directed design of peptide inhibitor based on zymogen structure of trypsin to assess of inhibitory and insecticidal effects on *Plodia interpunctella*. *2<sup>nd</sup> International Iranian Peptide Conference & Humboldt-Kolleg, Tehran, Iran*. p. 72
- Houseman, J. G., Philogene, B. J. R. & Downe, A. E. R.** (1989) Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Canadian Journal of Zoology* 67, 864–868
- Ingale, A. G. & Chikhale, N. J.** (2010) Prediction of 3D Structure of Paralytic Insecticidal Toxin (ITX-1) of *Tegenaria agrestis* (Hobo Spider). *Journal Data Mining Genomics Proteomics* 1, 102–104
- Isman, M. B.** (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45–66
- Jitnonom, J., Lomthaisong, K. & Lee, V. S.** (2012) Computational design of peptide inhibitor based on modifications of proregion from *Plutella xylostella* midgut trypsin. *Chemical biology & drug design* 79, 583–593
- Kalman, T. I.** (1981) Enzyme inhibition as a source of new drugs. *Drug Development Research* 4, 311–328
- Karahroodi, Z. R., Moharramipour, S. & Rahbarpour, A.** (2009) Investigated repellency effect of some essential oils of 17 native medicinal plants on adults *Plodia interpunctella*. *American-Eurasian journal of sustainable agriculture* 3, 181–184
- Karthik, M. & Shukla, P.** (2012) *Computational strategies towards improved protein function prophecy of Xylanases from Thermomyces lanuginosus*. 1<sup>st</sup> ed. 44 pp. Springer Science & Business.

- Kunitz, M. J. & Northrop, J. H.** (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *The Journal of general physiology* 19, 991–1007
- Kunitz, M.** (1945) Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101, 668–669
- 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
- Lazure, C.** (2002) The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis. *Current pharmaceutical design* 8, 511–531
- Leuck, D. B. & Perkins, W. D.** (1972) A method of estimating fall armyworm progeny reduction when evaluating control achieved by host-plant resistance. *Journal of Economic Entomology* 65, 482–483
- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Saadati, F. & Ravan, S.** (2009) Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Putton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 12, 79–83
- Mehrabadi, M., Bandani, A. R. & Franco, O. L.** (2012) Plant proteinaceous alpha-amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control. pp. 229-246 in Bandani, A. R. (Ed.) *New Perspectives in Plant Protection*. 246 pp. InTech.
- Perona, J. J. & Craik, C. S.** (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29987–29990
- Phillips, T. W., Berberet, R. C. & Cuperus, G. W.** (2000) Post-harvest integrated pest management. pp. 2690–2701 in Francis, F. J. (Ed.) *Encyclopedia of food science and technology*. 3130 pp. Wiley.
- Platzer, K. E., Momany, F. A. & Scheraga, H. A.** (1972) Conformational energy calculations of enzyme-substrate interactions. II. Computation of the binding energy for substrates in the active site of  $\alpha$ -chymotrypsin. *International journal of peptide and protein research* 4, 201–219
- Prasad, E. R., Dutta- Gupta, A. & Padmasree, K.** (2010) Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 80–88
- Rafiee- Dastjerdi, H., Hejazi, M. J., Nouri- Ganbalani, G. & Saber, M.** (2008) Toxicity of some biorational and conventional insecticides to cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its ectoparasitoid, *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 28, 27–37
- Rodriguez, R., Chinae, G., Lopez, N., Pons, T. & Vriend, G.** (1998) Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics* 14, 523–528



- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5, 725–738
- Ryan, C. A. (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual review of phytopathology* 28, 425–449
- Shukle, R. H. & Murdock, L. L. (1983) Lipoxigenase trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology* 12, 787–791
- Silva, F. B., Monteiro, A. C. S., Del Sarto, R. P., Marra, B. M., Dias, S. C., Figueira, E. L. Z., Oliveira, G. R., Rocha, T. L., Souza, D. S. L., da Silva, M. C. M. & Franco, O. L. (2007) Proregion of *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinase: A novel peptide with enhanced selectivity toward endogenous enzymes. *Peptides* 28, 1292–1298
- Sudbrink, J. D. L. & Grant, J. F. (1995) Wild host plants of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern Tennessee. *Environmental Entomology* 24, 1080–1085
- Talekar, N. S., Opena, R. T. & Hanson, P. (2006) *Helicoverpa armigera* management: A review of AVRDC's research on host plant resistance in tomato. *Crop Protection* 25, 461–467
- Taylor, M. A. J. & Lee, M. J. (1997) Trypsin isolated from the midgut of the Tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235, 606–609
- Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1–62
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680
- Visal, S., Taylor, M. A. J. & Michaud, D. (1998) The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Lett* 434, 401–405
- Walsh, K. A. & Wilcox, P. E. (1970) Serine proteases. *Methods in Enzymology* 19, 31–41
- Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 4083–4089
- Zhang, L. & Skolnick, J. (1998) What should the Z-score of native protein structures be?. *Protein Science* 7, 1201–1207.
-