

## التنبؤ بقابلية توليد الحساسية لسُموم Cry المنتجة من البكتريا *Bacillus thuringiensis* بإستعمال وسائل المعلوماتية الحيوية

زهرة محمود الخفاجي      زينب هاتف عباس الركابي      علي عماد محمد منير

معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الإستلام 2011/6/6      القبول 2011/9/6

### الخلاصة

توفر المعلوماتية الحيوية الكثير من الوسائل للدراسات الحيوية ومنها دراسة القابلية على توليد الحساسية. أُستعملت في الدراسة الحالية وسائل المعلوماتية الحيوية للبحث عن قابلية السُموم Cry المنتجة من البكتريا *Bacillus thuringiensis* والمستعملة جيناتها في هندسة النباتات لمقاومة الحشرات على توليد الحساسية. تم الحصول على 513 توالي لبروتينات Cry مختلفة من موقع NCBI مسجلة بشكل رسمي. أخضعت البروتينات لعدة برامج حاسوب لدراسة بعض المواصفات منها عدد الحوامض الأمينية، الوزن الجزيئي و PI وصافي الشحنة على البروتين وقابلية هضم البروتينات بالببسين عند رقم هيدروجين pH (1.2 و >2.0). وكذلك حساب كراهية البروتينات للماء ثم أُخضعت لبرامج حدس الحساسية مثل Allermatch<sup>TM</sup> المستعمل من قبل المنظمات المختصة FAO/WHO. أوضحت النتائج إختلاف البروتينات في عدد الحوامض الامينية المكونة لها والتي تمتد من 78 حامض أميني (وزن جزيئي 8587.42 دالتون) الى بروتين يحوي على 1825 حامض أميني (وزن جزيئي 251932 دالتون) وتراوحت pI بين 4.36 الى 10.16 وكانت العلاقة طردية بين pI وصافي شحنة البروتين. أشارت برامج التنبؤ بالحساسية مثل Allermatch<sup>TM</sup> (المعتمد من قبل منظمة الصحة العالمية) الى ان 0.78% (4 من 513) من البروتينات تحوي على حواتم مشابهة للمحسسات الموثقة التي ترتبط الى IgE في حين كان المؤشر الآخر وهو تشابه أكثر من 35% من قطع مكونة من 80 حامض أميني قد أشار الى أن 3.72% (19 من 513) من البروتينات تشابه المحسسات. أما إستعمال موقع AllergenOline الذي يختلف قليلاً عن البرنامج أعلاه فلم يسجل أي تشابه مع المحسسات وكذلك أستعمال البرنامج AlgPred المتخصص بالبحث عن الحواتم التي ترتبط الى IgE فقد أعطت نتائج سالبة أيضاً.

## PREDICTION OF ALLERGENICITY OF CRY PROTEINS PRODUCED BY BACILLUS THURINGIENSIS USING BIOINFORMATIC TOOLS

Zahra M. Al-Khafaji

Zainib H. A. Al-Rikabi

Ali I. M. Moner

Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

Received 6/6/2011

Accepted 6/9/2011

### ABSTRACT

Bioinformatics performs a lot of tools for biological studies, among those prediction of allergenicity. The study carried out to predict allergenicity of Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* which their genes are used in production of plants resist to insects. Five hundreds and eleven Cry protein sequences were downloaded from NCBI. The proteins subjected to investigation of their composition of amino acids and molecular weights, estimation of pI and net charge, pepsin digestion at pH 1.2 and >2.0 and estimation of hydrophobicity. Results revealed that proteins are greatly different in their number of amino acids which ranged from 78-1825 residues and MW 8587.42-251932.0 Dalton. The pI was 4.36-10.16 and was proportional to the net charge of proteins. Using Allermatch™ program recommended by FAO/WHO, output pointed to similarity of 0.78% (4 out of 513) of protein to those of IgE epitopes of documented allergens. Similarity >35% over 80 amino acids window revealed that 3.72% (19 out of 513) of Cry proteins similar to known allergens. Using Allergen online website which is slightly different from Allermatch™ showed no similarity with allergens (included in its databases). Using specialized program for IgE epitopes i.e; AlgPred revealed no similarity as well.

---

Key Words: Bioinformatic tools, Cry toxins, Allergenicity, Allergy prediction, *In silico* studies.

## المقدمة

أحتدم النزاع بين المؤيديين لانتاج المحاصيل المهندسة وراثياً والمعارضيين لذلك وكل له أسبابه، ولكن إجتياح إنتاج الاغذية المهندسة وراثياً كانت له الغلبة في الاخر وبدأ عام 1996 بحوالي 1.6 مليون هكتار من الاراضي الزراعية ليصل الى 134 مليون هكتار عام 2009 (1)،(2). في عام 2010 كان هناك 15.4 مليون فلاح يزرعون المحاصيل المهندسة وراثياً على مساحة 148 مليون هكتار في 29 بلد وتمثل 81% من فول الصويا و 64% قطن، 29% ذرة و 23% بذور زيتية(2). وتتعدد الاغراض التي من أجلها تهندس النباتات وغيرها من الاحياء، وفي المحصلة تروم الى الحصول على صفات جيدة ففي النباتات بصورة خاصة تهدف الى زيادة مقاومتها للحشرات وتحمل مبيدات الادغال ومرات أخرى زيادة القيمة الغذائية لها(2)،(3). وهندسة المحاصيل يمكن أن تؤدي إلى أخطار قد تكون غير مقصودة منها إندماج بعض البروتينات مؤدية الى إعطاء بروتينات جديدة غير معروفة الصفات (4)، كما إن الوسائل المستعملة في الهندسة مثل النواقل والممهدات Promoters وخاصة 35S العائد الى فيروس التبقع في القرنابيط يمكن ان يحفز الفيروسات غير الفعالة وبذا يمكن ان تدخل مجرى الدم أو أعضاء الجسم(5). وقد أشارت العديد من الدراسات الى أن إطعام الحيوانات المحاصيل المهندسة وراثياً يمكن أن يؤدي الى مخاطر كبيرة منها تعطيل بعض أنزيمات البنكرياس وبالتالي بقاء مثل هذه البروتينات لمدة أطول و زيادة مدة التأثير (6)، كما سجلت حالات تأثير في تكاثر الحيوانات إذ غيرت من النطف وتطور الاجنة وموتها، وسجلت وفيات للحيوانات وصلت في بعض المناطق الى 25% بعد 5-7 أيام من الاطعام لحيوانات مختلفة (6). فطريق الهندسة الوراثية طريق مختصر للتحسين وذلك بإدخال جين أوعدة جينات الى النباتات للحصول على الصفات المرغوبة في حين أن الطريق الطبيعي بالتزاوج يحتاج الى التكامل الجنسي وإدخال آلاف الجينات ثم يتم إنتقاء الأفضل (2). ولكن الطريقة الاولى قد تكون محفوفة بالمخاطر كما ذكر أعلاه، فهي يمكن أن تؤدي الى إدخال المحسسات Allergens أو تغير من مستوى المحسسات في الكائن المهندس وراثياً إذا كان من الكائنات الحاوية على المحسسات كما أنها يمكن أن تغير من الصفات الفيزيائية والبروتينات وبالتالي تزيد من تأثيرها سواءً من الناحية السمية أو الحساسية أو تحديد القيمة الغذائية والنظر في إحتمالية سريان الجينات (3)،(7)،(8). ومن الجدير بالذكر إن الحساسية تصيب 15 - 20% من الشعوب في المدن الصناعية (7) وللاسباب المذكورة انبرت منظمات حماية المستهلك والمتمثلة بمنظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة FAO من خلال لجنة Codex لوضع التشريعات اللازمة، فضلاً عن المؤسسة الاوربية EFSA (European Food Safety Authority)، وأسفرت الجهود الى تأسيس WAO (World Allergy Organization) (9) لتكون متخصصة بجوانب الحساسية و تشمل في مقدمتها تفاعلات الحساسية في تقريرها الصادر لعام 2011-2012، والتشريعات التي وضعت من قبل المنظمات المختلفة تختلف بعض الشيء عن بعضها كما في حالة منظمة FDA التي تعرف الاغذية على إنها آمنة GRAS (Generally recognized as safe) هي تلك المنتجة والمستعملة قبل عام 1958 في حين أن

Hous (History of safe use) تعرفها بشكل مختلف (2)، وعلى العموم فإن معظم هذه المنظمات أنفقت على إستعمال وسائل المعلوماتية الحيوية Bioinformatics لتكون نتائجها بمثابة خارطة طريق لما تحتاجه إجراءات السلامة فيما بعد ذلك (10) وتوفر وسائل الانترنت إمكانات كبيرة للمسح عن البروتينات المهندسة وراثياً للكشف عن المناطق التي تثير التحسس (3)، وذلك لان وسائل المعلوماتية الحيوية يمكن إن تساعد في تحديد العديد من الخطوات (11). وإحتاجت هذه الخطوات الى وضع قواعد بيانات Databases خاصة بها فضلاً عن قواعد البروتينات العامة الموجودة أصلاً، وتختلف قواعد البيانات في محتوياتها وترتيبها للمعلومات وهذا يحتاج الى تعاون عالمي في مختلف مجالات إعداد قواعد البيانات (7)،(9)،(10)،(12)،(13)،(14)،(15)،(16). وأسهمت في الدراسة الحالية تحديد قابلية سموم البكتريا *Bacillus thuringiensis* المعروفة Cry toxins والتي تستعمل بكثرة في هندسة المحاصيل لحد المقاومة ضد مختلف الحشرات (3) على توليد الحساسية بأستعمال وسائل المعلوماتية الحيوية (البرامج الخاصة بتحديد الحساسية) وفق تعليمات FAO/WHO لعامي 2001 و 2003 والتي لا يزال العمل بها قائماً (10)،(11).

### المواد وطرق العمل

تم الحصول على تواليات البروتينات Protein sequences لسموم Cry المختلفة من الموقع (National Center for Biotechnology Information) NCBI وإعتماد تسميات سموم Cry المحددة برقم تسجيل Accession Number (Acc. No.) في المركز، والتي تضم تواليات بدأ تسجيلها منذ عام 1985 الى 2011. درست بعض الصفات الفيزيو - كيميائية للسموم بإستعمالات مختلفة مثل تحديد نقطة التعادل الكهربائي pI وكراهيتها للماء Hydrophobicity وقد أختيرت لهذه 15 بروتين بشكل عشوائي، فضلاً عن أستعمال برامج لتحديد قابلية الهضم بالببسين لبروتينات Cry وتحديد الأوزان الجزيئية. والجدول (1) يوضح المواقع والبرامج المستعملة.

أدخلت التواليات برامج مختلفة منها Allermatch<sup>TM</sup> الموصى به من قبل FAO/WHO بمؤشرات الاصلية Default parameters. وكذلك إستعمل الموقعين AllergenOnline و AlgPred لتحديد مؤشرات الحساسية فيها والتي تشمل التشابه العام للسموم مع المحسسات المعروفة المدرجة في قواعد البيانات التي ترتبط بها كل من البرامج المذكورة. فضلاً عن البحث عن التشابه بنسبة 35% لدومينات Domains بطول 80 حامض أميني وكذلك البحث عن قطيقات مستقيمة Linear motifs التي تمثل حوائم الارتباط Binding epitopes مع الاجسام المضادة IgE.

جدول (1): المواقع والبرامج المستعملة في الدراسة.

موقع الانترنت	الموقع أو البرنامج المستعمل والغرض منه
<a href="http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html">http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html</a>	موقع إرتباط للـ NCBI للحصول على قائمة بسموم البكتريا
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein</a>	موقع NCBI المتخصص بالبروتينات للحصول على التواليات السمووم
<a href="http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html">http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html</a>	PROTEIN CALCULATOR v3.3 لدراسة بعض مواصفات البروتين
<a href="http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp">http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp</a>	دراسة كراهية الماء Hydrophobicity
<a href="http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=HCA">http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=HCA</a>	موقع Mobyle Pasteur الفرنسي لدراسة كراهية الماء (17)
دراسة هضم البروتينات بأنزيمات مختلفة	
<a href="http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/">http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/</a>	Web Cutter -1
<a href="http://db.systemsbioogy.net:8080/proteomicsToolkit/proteinDigest.html">http://db.systemsbioogy.net:8080/proteomicsToolkit/proteinDigest.html</a>	2 - برنامج Protein Digest
<a href="http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/">http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/</a>	3 - ExPASy / PeptideCutter
<a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#job::digest.p24">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#job::digest.p24</a>	4 - Mobyle Pasteur / هضم البروتينات
<a href="http://www.allermatch.org/allermatch.py/form">http://www.allermatch.org/allermatch.py/form</a>	برنامج Allermatch™ للتنبؤ بقابلية توليد الحساسية (10)، (16)
<a href="http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml">http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml</a>	موقع AllergenOnline (18)
<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/submission.html">http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/submission.html</a>	(19) AlgPred

### النتائج والمناقشة

أستعملت آخر إصدارات التسمية لسموم البكتريا *Bacillus thuringiensis* وكان المتوفر منها 507 بروتين بأرقام تسجيل Accession Numbers إمتد تسجيلها من عام 1985 الى عام 2011، فضلاً عن ستة سموم أخرى لم تدرج في قواعد NCBI لاسباب مختلفة وهي 40KDa (رقم تسجيل البروتين 142726 ) و CryTDK (رقم تسجيل البروتين 1054636) و CryC35 (رقم تسجيل البروتين 1658869) و CryC53 (رقم تسجيل البروتين 1434920) و Pzimed (رقم تسجيل البروتين 1765908). تم الحصول على التواليات بصيغة FASTA لغرض إستعمالها في البرامج المختلفة.

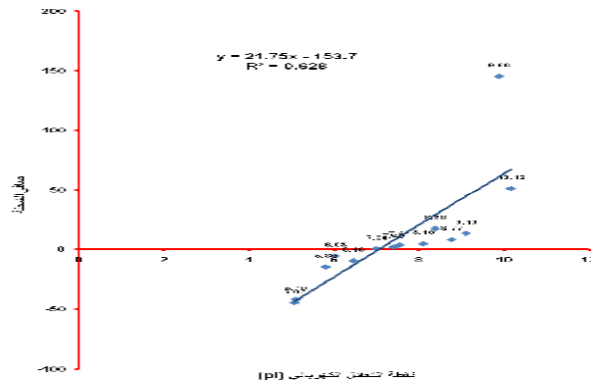
المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون  
فضلاً عن الحصول على صيغة GenPept المفصلة للتأكد من أن البروتينات تمثل الجزء الناضج من  
البروتين بدون ببتيدات الإشارة Signal peptide وفق التوصيات المعتمدة (10)، وكذلك لتحديد عدد الحوامض  
الامينية لكل بروتين التي كانت تختلف بشكل كبير وكان أصغر بروتين مسجل يحوي على 78 حامض أميني وهو  
السم Cry11Aa2 (رقم التسجيل AAA22611)، وأكبر بروتين يحوي على 1825 حامض أميني وهو البروتين  
Cry20-like (رقم التسجيل GQ14433).

#### المواصفات العامة لبروتينات السموم

- الوزن الجزيئي وهذه الصفة بطبيعة الحال تختلف وفقاً لعدد الحوامض الامينية، فأقل وزن جزيئي سجل  
للسم Cry11Aa2 المذكور أعلاه وبلغ 8587.4189 دالتون، وأكبر وزن جزيئي للسم Cry20-like  
وبلغ 251932.328 دالتون.

والتعرف على صفات البروتين يمكن أن يزيد من التعرف على البروتينات المحسنة وغير المحسنة عند دراستها  
بالحاسوب *In Silico* (7).

- نقطة التعادل الكهربائي وصافي شحنة البروتين وهي صفات تعتمد على نوعية الحوامض الامينية المكونة  
للبروتينات وتراوح بين 4.36 للبروتين Cry1H-like المكون من 140 حامض أميني (رقم التسجيل  
AAF01213) وأعلى نقطة سجلت كانت 10.16 للبروتين Cry3Bb3 المكون من 430 حامض أميني  
(رقم التسجيل I15475). وهذه الصفة لها علاقة طردية بصافي الشحنة التي سجلت عند رقم هيدروجيني  
pH متعادل، وقد تم إختبار 15 بروتين بشكل عشوائي لدراسة العلاقة بين الصفتين كما موضح في  
الشكل (1).



شكل(1): علاقة نقطة التعادل الكهربائي pI بصافي الشحنة عند رقم هيدروجيني pH متعادل لخمس عشرة بروتين.

المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون

ونظراً لوجود عمليات حيوية عدة تشارك في أظهار الحساسية كان لابد من دراسة مواصفات البروتينات المختلفة فضلاً عن تحديد وجود الحواتم Epitopes الخاصة (20)، فبشكل عام تكون المحسسات الهوائية Aeroallergens (حوالي 80% منها) حامضية والمعدل العام لنقاط تعادلها الكهربائية حوالي  $5.7 \pm 0.15$  وذات شحنة سالبة، في حين إن غير المحسسات يكون 20% منها حامضية ومعدل نقاط تعادلها الكهربائي حوالي  $7.6 \pm 0.16$  أي إنها قاعدية وذات شحنة موجبة، أما المحسسات الغذائية فقد أشارت الدراسات الى إن حوالي 88% هي حامضية ومعدل نقاط التعادل الكهربائي لها 5.8 (7). أما صافي الشحنة للبروتينات في محلول مائي متعادل الشحنة فيكون للمحسسات أكثر سالبية مقارنة بغير المحسسات (10)، وبشكل عام تتوزع القيم بين 7-4.4 وأكثر البروتينات الواقعة ضمن هذا المدى لها قابلية للارتباط بـ IGE الذي تمثل أحد أوجه الحساسية (21)، وتؤثر الصفات مثل pI وصافي الشحنة وكذلك Electrostatic potential (Ep) والتي تحسب من تواليات البروتينات (7) في تحديد كون البروتينات محسسة أو غير محسسة. وهذا له علاقة وثيقة بتأثير الخلايا المناعية فمثلاً الخلايا التائية T.cells تميز مولدات المناعة Immunogenes اعتماداً على الشحنة (22). وكذلك فإن البروتينات الحامضية ذات الشحنة السالبة تقبض (uptake) بشكل أفضل من قبل الخلايا Macrophages والخلايا الشجرية Dendritic Cells كما أثبت ذلك عند تحوير Ovalbumin لزيادة شحنته السالبة السطحية مما أدى الى زيادة مستضدية Antigenicity وقبضه من قبل الخلايا الشجرية (7). وكذلك تؤثر الشحنة السالبة عند رقم هيدروجيني معين في ارتباط وقبض المستضدات من قبل الخلايا (Antigen Presenting Cells) APC (23) وغيرها من الخلايا مثل تلك الموجودة على سطوح التراكيب داخل الرئة (24). ولكن الإطلاق المذكور أعلاه لا يكون شاملاً إذ إن هناك نسبة من المحسسات تصل الى أقل من 10% تكون لها شحنات موجبة وتميل أن تكون متعادلة الى قاعدية التفاعل (7) وهذا ما يشير الى تعدد أوجه تفاعلات الحساسية، ومن هنا يتضح إن الصفات الفيزيائية للبروتينات لها علاقة وثيقة بالحساسية وتؤثر فيها لذلك كان من الأفضل حذس الحساسية اعتماداً على تركيب البروتين خاصة عندما تكون pI أكبر من 7.8).

#### • صفة كراهية البروتينات للماء Hydrophobicity

أسفرت دراسة هذه الصفة لسوموم Cry المستعملة في الدراسة الى الاختلاف في هذه الصفة بين البروتينات فقد سجلت أوطاً نسبة 54% للبروتين المكون من 79 حامض أميني المعروف بـ Cry4Ba-like (رقم التسجيل ABC47686) وأعلى نسبة 69% للبروتين Cry45Aa المكون من 275 حامض أميني (رقم التسجيل BAD22577). تختلف كراهية البروتينات للماء وفقاً للحوامض الأمينية الداخلة فيها فمثلاً الحوامض الأمينية الكارهة للماء مثل الكلايسين والالنين والكالين واللوسين والايزوليوسين تدفن الى الداخل وذلك لان السلاسل الجانبية لها R-groups لا تكون أوامر هيدروجينية، و تعرف الكراهية في بعض الأحيان على إنها ميل الثمالات Residues للإنطمار داخل البروتين وليس على السطح (25)، (26).

وعادة تستعمل قيم الكراهية في إعداد ورسم كشاف الكراهية Hydrophobic Index والذي يشير الى الكراهية النسبية بين الحوامض الأمينية، فالقيم الموجبة والعالية تشير الى كراهية ماء عالية (25). وتشارك كراهية الماء في ثبوت البروتينات خاصة الصغيرة منها ويمكن أن تشارك بنسبة 60% من البروتينات التي يصل عدد ثمالاتها بين 36-534 في حين تشارك الأواصر الهيدروجينية بحوالي 40% من الثباتية (17)، والبروتينات الكروية تثبت عادة بالتدخلات الكارهة للماء ويلعب الحامض الأميني السستئين Cysteine الدور الأساس في ذلك نظراً لتكوينه الجسور الكبريتيدية الثنائية S=S لذلك يصنف على إن له أعلى كراهية للماء بأستعمال المقاييس المختلفة لقياس كراهية الماء (17)، (26). في حين تكون الحوامض الأمينية المحبة للماء لها قيم سالبة على سطح البروتين وبمواجهة البيئة المائية المحيطة (25).

وتعتمد العديد من البرامج لحدس المستضدية والحساسية وتحديد الحوائم الخاصة بهذه الصفات ولكن نسبة كبيرة من هذه البرامج لا تعطي نتائج مضبوطة (3) في حين تربط برامج أخرى نسب محبة الماء/كراهية الماء لامتداد محدد في حدس المستضدية، وبرامج أخرى تأخذ بنظر الاعتبار التراكيب الثانوية للبروتينات مثل الحلزونات والصفائح واللفات Turns وحركة قطع البروتين في الحسبان، وهناك برامج أخرى تستعمل الصفات المذكورة آنفاً بشكل مجتمعة (27). ويستعمل البعض النسب هذه في توصيف بعض المحسسات (28).

أستعمل الهضم بالببسين Pepsin أكثر من برنامج (مواد وطرق العمل) لتحديد قابلية سموم Cry على الثبوت تجاه الهضم بالانزيم عند الرقم الهيدروجيني 1.3 pH ورقم هيدروجيني أقل من 2 كما توصي الجهات المختصة FAO /WHO (10) وكانت نتائج برامج الحاسوب تشير الى أن كل البروتينات تقطع الى قطع اعتماداً على مواقع فلق الانزيم للبروتين (بشكل نظري) لذلك فأن دراسة هذه الصفة بأستعمال برامج حاسوب تكون غير مجدية وقد تم إستعمال بروتينات ثابتة تجاه الببسين (بالتجارب المختبرية) ولكن تطبيق البرامج أشار الى غير ذلك. وتعد صفة الثبوت للهضم من الصفات الموصى بها من قبل الجهات المختصة عند البحث عن المحسسات، فالأخيرة والغذائية منها تكون عادة ثابتة للهضم للببسين وتقاوم الطبخ عند أرقام هيدروجينية منخفضة كما هو الحال في CryIAb المقاوم للهضم ويمكن أن يمر من قناة الهضم للإنسان أو الحيوان ليخرج مع الفضلات (29) وهذا يعتمد على الكائن ففي إستعمال السم نفسه وجد أنه في الأبقار يمكن أن يهضم 90% منه في 8 ساعات ويبقى 10% فقط بعد 48 ساعة (30)، وكذلك الحال مع البروتينات أخرى مثل Cry34Ab1، Cry35Ab1 (8). وعلى العموم فأن عملية الهضم تأخذ وقتاً وتتم تحت ظروف محددة أوصت بها الجهات المسؤولة وأن يتم إجراء الفحص بطريقة عملية وليست نظرية، ومن جهة أخرى فليست كل البروتينات الثابتة تولد الحساسية (12)، (13) وكذلك فأن كل البروتينات التي تعاني من التفكك قد لا تكون نتيجتها قطعية وتحتاج الى فحوص أخرى.

#### • حدس الحساسية ببرامج الحاسوب *In Silico Prediction*

أستعملت ثلاث برامج خاصة بحدس قابلية البروتينات على توليد الحساسية



المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون  
 - برنامج Allermatch<sup>TM</sup> وهو البرنامج الموصى بأستعماله من قبل الجهات المختصة (FAO/WHO) (10) ويستخدم لثلاثة أغراض الأولى يتم فيها إجراء عمليات إصطفاف Alignment عام بإعتماد خيارات البرنامج الاصلية Default Parameters وقواعد البيانات (WHO/IUIS International unit of IUIS Immunological Societies) والقواعد أدمجت أكثر من قاعدة متخصصة بالمحسسات والتي شذبت بشكل جيد وأحتوت على المحسسات التي لها 100% تماثل (15) بعد إزالة ببتيديات الاشارة منها والبرنامج المكتوب بلغة Python وبالمؤشرات الاصلية مثل ktup=2 والمصفوفة B10SUM50 وجزء فتح الفجوة -10  
 Gap penalty ومد الفجوة 2-، ويستعمل برنامج FASTA (10) الذي يصف التواليات من بداية البروتين الى نهايته في حين أن BLASTp يوفر أصطفافات موضعية بين التواليات لذلك يكون أقل تفصيلاً (8)، وفي الحقيقة فإن التشابه العام أقل من أهمية البحث عن مناطق محددة لها تراكيب متشابهة (13)، وفي هذه الدراسة تم تسجيل تشابه معظم البروتينات المفحوصة مع المحسسات بنسبة تزيد عن 30% وبذلك فإن هذه النسب تقع تقريباً ضمن منطقة الغبش Tiwilight وفق الحسابات الاحصائية والتي لا تكون ذات ثقة عالية (32) ويجب أن تعطى بعض الاهتمام إذ أن غياب التشابه الكامل لا يعني عدم إثارة الحساسية (12).

والخطوة الاخرى من البرنامج هي البحث عن توال متجاور من 6-8 حوامض أمينية والتي تمثل جزءاً من توال قد تصل الى 9 حوامض أمينية التي يرتبط اليها IgE (8) وقد أستعمل في هذه الدراسة 8 حوامض أمينية بدلاً من 6 حوامض أمينية وذلك لتقليل النتائج الموجبة الكاذبة (32) وأسفرت النتائج عن وجود بعض السموم التي لها حاتمة واحدة مماثلة للمحسسات وهي الموضحة في الجدول (2).

جدول (2): السموم الحاوية على حوامض مشابهة للمحسسات التي ترتبط الي IgE (Allermatch<sup>TM</sup>)

الموصفات					اسم السم ورقم التسجيل
%الكراهية الماء	صافي الشحنة	pI	الوزن الجزيئي(دالتون)	عدد الحوامض الاميني	
60	- 37.3	5.33	137378.9	1215	Cry1Ka1 AAB00376
61	- 31.3	5.71	151197.03	1344	Cry43Aa1 BAD15301
61	- 31.3	5.71	150885.66	1340	Cry43Aa2 BAD95474
62	- 23.1	5.97	149745.84	1332	Cry43Ba1 BAD15303

إن تحديد هذه الامتدادات القصيرة ينقصها الأخذ بنظر الإعتبار الصفات الأخرى (7)، ولذلك يجب أن يؤخذ التشابه التركيبي بين البروتينات والمحسسات ذات التراكيب المتشابهة ولذا توصي الجهات المختصة بأن يستعمل

المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون  
 تماثل لحوامض أمينية بنسبة 35% أو أكثر في قطع مكونة من 80 حامض أميني للبروتينات المراد فحصها مع  
 بروتينات قواعد البيانات، و تشير المصادر الى أن التماثل بنسبة 35% يكون منطقي باعتباره حد أدنى للتماثل بين  
 بروتينات العائلة الواحدة ويمكن أن تمثل حجم قطعة مماثلة لدومينات منفصلة في التركيب الرباعي للبروتين (8).  
 وقد وجد إن عدداً من بروتينات Cry لها تشابه مع محسسات قواعد البيانات التي يعتمد عليها البرنامج وهي  
 المذكورة في الجدول (3).

إن مثل هذا التشابه يمكن أن يعطي نتائج حول الأغذية المهندسة وراثياً المطلقة للأسواق(10). ويشترط البعض  
 وجود تماثل 50% لكل 80 حامض أميني (33) ومن الجدير بالذكر أن البروتينات المسجلة في هذا الفحص لم  
 يسجل لها نتيجة موجبة عند استعمال إمتداد من 8 حوامض أمينية متجاورة. ومجمل نتائج برنامج  
 Allermatch<sup>TM</sup> تشير إلى وجوب إجراء الفحوص التكميلية مثل استعمال فحوص وخز الجلد والتفاعلات مع  
 مصول 5 أشخاص مصابين بالحساسية ولو أن البعض يشير إلى وجوب استعمال 15 شخصاً بدلاً من 5،  
 فضلاً عن مراجعة المراجع الطبية حول هذه البروتينات (10)، ويفضل استعمال مؤشر الغرابة Foreignness أي  
 عدم التشابه مقارنة بالبروتينات البشرية، إذ أن قلة التشابه بين بروتينات الإنسان يمكن أن يرشح أن يكون البروتين  
 محسس، وهو توجه قابل للتطبيق مع كل تراكيب البروتينات المهندسة وراثياً والبروتينات المحسنة ولكن هذه قد  
 تعطي نتائج سالبة كاذبة لان بروتينات الإنسان يمكن أن يحتوي على حواتم مفردة Ige بدون أن يثير الحساسية،  
 إذ إن وجود حاتمة واحدة لا يمكن أن تثير الحساسية ويمكن أن تستعمل في علاج الحساسية (3)،(34). وبالرغم  
 من إن قوانين المنظمات المعنية مثل Codex التي تعد قانوناً ملزماً في هذا المجال إلا أن هناك بعض النواحي  
 التي يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار هي إن بعض سموم Cry قد لا تثير الحساسية سواء باستعمال طرق الحاسوب  
 أو التجارب المخبرية إلا إنها تعمل كمساعد Adjuvant لتعزيز الاستجابات المناعية كما في البروتين Cry1Ab  
 (35)، كما أن قرارات FAO/WHO تكون بعض الأحيان غير قابلة للتطبيق في تقييم الأغذية إذ يحصل بعض  
 الأحيان خفض للحساسية نتيجة لتقليل فعالية الجينات (12)، فضلاً عن أن البرنامج المعتمد (Allermatch<sup>TM</sup>)  
 يمكن أن يعطي نتائج سالبة كاذبة خاصة إذا كانت التواليات قصيرة، فمثلاً أستعمال حوالي 28 حامض أميني يمكن  
 أن يكون التشابه 100% (10)، فضلاً عن أن البرنامج يعالج البروتينات فقط ولكن من جهة ثانية فليست كل  
 المحسسات بروتينية إذ وجد أن Glycan يمكن أن يرتبط ب Ige في البروتينات السكرية Glycoprotiens (3)  
 (15)، كما أن هناك بعض الفعاليات التي لها علاقة بالحساسية مثل الارتباط بالدهون (7) وفي عام 2006 أشير  
 بصراحة إلى إن الوسائل الموجودة تحتاج إلى تطوير أكثر وإن قواعد السماح بإطلاق النباتات المهندسة وراثياً يجب  
 أن يشك فيها وتعديل الإجراءات الخاصة بها(35).

جدول(3): سموم Cry المشابه بنسبة أكثر من 35% للمحسسات بأستعمال نافذة مكونة من 80 حامض أميني  
 (Allermatch<sup>TM</sup>)

المواصفات					اسم السم ورقم
عدد الحوامض	الوزن الجزيئي(دالتون)	PI	صافي	%الكراهية	

الماء	الشحنة			الاميني	التسجيل
60	-42.4	5.15	132867.95	1044	Cry1Cb2 AAG35409
57	-41.3	4.86	73158.85	646	Cry1Cb3 ACD50894
61	-37.4	5.25	132481.2	1165	Cry1Da1 CAA38099
61	-37.4	5.25	132481.20	1165	Cry1Da2 I76415
59	-43.6	5.11	132982.1	1173	Cry1Dc1 ABK35074
60	-36.9	5.37	133350.6	1174	Cry1Fb1 CAA80235
60	-33.9	5.45	132338.3	1168	Cry1Fb2 BAA25298
60	-36.9	5.36	132285.19	1169	Cry1Fb3 AAF21767
60	-37.9	5.34	132342.2	1168	Cry1Fb4 AAC10641
60	-36.9	5.37	133350.6	1174	Cry1Fb5 AAO13295
60	-38.9	5.31	132193.04	1168	Cry1Fb6 ACD50892
60	-38.9	5.32	133222.3	1174	Cry1Fb7 ACD50893
60	-41.6	5.22	132980.5	1172	Cry1Ha1 CAA80236
61	3.5	7.87	70837.15	633	Cry2Aa6 CAA10672
59	-31.1	5.37	129599.9	1138	Cry7Ab9 ADD92572
62	-11.7	5.61	88142.7	803	Cry13Aa1 AAA22356
61	-8.5	5.91	75432.4	666	Cry40Ba1 BAC77648
60	-0.4	6.88	29235.3	260	Cyt2Aa2 AF472606
60	-1.4	6.65	29236.3	260	Cyt2Aa3 EU835185

وفي هذه الدراسة أستعمل موقع آخر لحدس حساسية بروتينات Cry وهو Online Allergen وهو موقع خاص بجامعة نبراسكا الامريكية وأستعمل منه الاصدار 11 لعام 2011 والذي يعتمد المؤشرات الثلاث المذكورة اعلاه وهي ايجاد التشابه العام، ومدى التشابه لقطع مكونة من 80 حامض أميني وكذلك تماثل 6-8 من الحوامض

المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون

الامينية المتجاورة ولكن هناك بعض الاختلافات في قواعد البيانات التي لاتدخل فيها المحسسات غير الموثقة putative allergens (18) ويستعمل قاعدة البيانات المتخصصة IuIs (السالفه الذكر). وأشارات

مخرجات Outputs للبرنامج الى أن هناك 152 بروتين يكون لها تشابه أقل من 30% وهذه تقع ضمن منطقة الغبش التي لاتؤخذ بشكل جاد في الاعتبار (32) في حين أظهر 20 بروتيناً تشابهاً تجاوز 30% أي أنه يقع ضمن منطقه Safe zone و أن التشابه يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار. كما أظهرت المخرجات أن هناك 8 بروتينات تحوي قطيقات Motifs مكونه من 6 حوامض أمينية متجاورة، وأن هناك 10 بروتينات كان فيها التشابه يصل الى 35% لامتداد مكونه من 80 حامض أميني، وعند الكشف عن المتشابهات من المحسسات كانت تابعة لبروتينات مختلفه للدوده *Ascaris suum* و *Ascarislumbricoides*.

ونظراً لان الحساسية الغذائية في معظمها أستجابات يتوسطها IgE لمكونات الغذاء و هي إحدى التفاعلات الكثيرة التي يطلق عليها التحسس للأغذية (6)،(7)،(10) لذلك اقترح البعض أستعمال طريقة البحث عن المواقع المتخصصة بالارتباط ب IgE (2)، لذلك أستعمل البرنامج AlgPred المتخصص في الكشف عن هذه الصفة (19) ويعتمد التوجه على أستعمال البرنامج MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) و MAST (Motif Alignment and Search Tool) وأستعمال برنامج BLAST لصف البروتينات لإيجاد ARPs (Allergen representative peptides) وإيجاد تحديد مواقع IgE فضلاً عن إستعمال توجه هجين من إيجاد قطيقات الارتباط لا IgE مع ARPs. وقد أسفرت النتائج على أن البروتينات المستعملة (toxins) أعطت نتائج سالبة عند أستعمال المؤشرات ماعدا عند أستعمال SUM للحوامض الأمينية أو البيبتيدات الثنائية و إن كانت لا تتفق بشكل كبير. و ربما كان الهدف من أستعمال هذا البرنامج هو البحث عن مواقع الارتباط الى IgE و كذلك البحث عن MEME/MAST motif ولكنها أعطت نتائج سالبة؛ وهو لا يتفق مع النتائج السابقة بشكل كبير جداً، كما أن البرنامج لا يحقق القيود التي فرضتها Codex حول تشابه يصل الى اكثر من 35% لامتداد 80 حامض أميني و الاخذ بنظر الاعتبار (ولو لمدى بسيط) التشابه العام (10). تحوي الاغذية الطبيعية على المحسسات وتصل نسبتها 1:100,000 من البروتينات، وتشكل الحساسية الغذائية جزءاً ضئيلاً من تفاعلات الحساسية التي تكون متعدده الخطى، والحساسية الغذائية في معظمها يشارك بينها IgE أي إنها من النوع الاول و تكون من النوع الآني، كما أن حدس حاتمته واحدة الارتباط الى IgE لايعني أن المادة محسسه لان تفعيل IgE يحتاج في الاقل لوجود 2 أو أكثر من الحواتم، و تؤثر أمراض الحساسيه في فئات مختلفة من المجتمع في مقدمتها الاطفال (3)،(11)،(12)،(28)، كما أن المحسسات يمكن أن تأتي من سموم Cry بشكل مباشر أي دون هندسة المحاصيل و تثير الحساسيه كما في أستعمال الاغذية العضوية Organic foods التي لايسمح فيها بدخول المواد المهندسة وراثياً (12).

وكذلك عند تعرض الفلاحين للمبيدات الحيوية، أو الذين يتعاملون مع القطن المحور وراثياً Bt cotton و كذلك عند أستنشاق حبوب طلع Bt cotton والتي تؤدي الى إضطرابات أخرى فضلاً عن أعراض الحساسية(6) وبطبيعة الحال يكون تركيز البروتينات في المحاصيل المهندسة أعلى الآف المرات الذي يصل الى المستهلك من ذاك الذي

يصل بالرش، ومن المفروض أن تمثل تاريخاً آمناً للاستعمال ويتم التعبير عنها بمستويات واطئة تصل 10-500 جزء بالمليون أي أقل من 0.2% من البروتينات الكلية لبعض النباتات (2)،(6). ومن جهة ثانية فالملاحظ أن الهندسة الوراثية يمكن ان تؤدي الى إدخال المحسسات للحياة المهندسة أو تزيد من مستوى المحسسات فيما إذا كان النبات يحوي على المحسسات أصلاً (3). وقد وفرت وسائل الانترنت إمكانات لمسح البروتينات المهندسة للكشف عن قابليتها لتوليد الحساسية ومعظم البرامج الموجودة تتعامل مع البروتينات ويمكن الارتباط الى IgE بأن يشمل الاجزاء السكرية كما ذكر سلفاً (3) و قد أجري مسح على 22 برنامج لتحديد الحواتم الصحيحة و تبين انه 50-60% فقط هي التي تحدد الصحيح و بدأ يكون أداء البرامج بعيد عن الكمال بشكل عام (3)،(10). و يعود جزء كبير من عدم الكمال هذا الى قواعد البيانات التي تستند على البرامج، وقد تمت محاولة تحسين قواعد البيانات بواسطة إزالة المكررات والتعريف بالمحسسات الحقيقية و المحسسات النظرية Isoallergens، لأن معظم عمليات المقارنة للبروتينات الجديدة تتم مع محسسات معروفة ولكن عمليات التحوير الوراثي يمكن أن تؤدي الى إنتاج محسسات جديدة غير مدرجة لذلك إحتاجت العملية الى تعاون عالمي لإنشاء قواعد موحدة تدام بصورة مستمرة وتدخل اليها المحسسات التي يمكن أن تنشأ من التغييرات الوراثية وتحديد الحد الفاصل cutoff للتشابه وإن كانت بعض القواعد مثل تلك المستعملة في Allermatch<sup>TM</sup> فتح باباً للمحسسات غير المسجلة تحت مدخل Orphan entry ولكن مع هذا تحتاج القواعد الموجودة أوالتي يزمع إنشاؤها أن تعرض لفحص إحصائي مثل إستعمال Jack-knife لتحديد صلاحيتها(6)،(7)،(10)،(12)،(13)،(15)،(16)، وقد تقوم بمثل هذه المهام منظمات أنشأت تحت ضغط تزايد أمراض الحساسية مثل WAO التي أصدرت كتابها الابيض لعام 2011-2012 السالفة الذكر، والتي يمكن أن تساعد في إنشاء بني تحتية للمعلوماتية الحيوية الخاصة بالحساسية (9). وفي الوقت الحاضر فإن بعض الاغذية المهندسة وراثياً طُرحت للاسواق بدون دراستها بشكل مفصل وقد تم سحب بعضها مثل منتجات فول الصويا، وفي الاسواق يوجد الرز المهندس وراثياً GE rice الذي يحتوي على CryIac وإحتمال يحتوي على بروتين مدمج CryIab/CryIac التي لها الفعالية لتحفيز الاستجابات المناعية ويؤثر في صحة اللبائن على المدى الطويل (12).

ومن التوصيات التي يمكن أن تخلص لها الدراسة الحالية والتي تتفق في معظمها مع توجيهات Codex هو إعتداد نتائج المعلوماتية الحيوية كنتائج أولية للاستمرار في تحديد الحساسية (10)، دراسة سمية البروتينات التي يمكن أن تنتج من الهندسة الوراثية مثل قياس تشوه النطف أو حث النوى الصغيرة أو غيرها من المؤشرات الخلوية فضلاً عن إجراء الفحوص التكميلية مثل فحوص الجلد أو فحص الخلل الغذائي المزدوج Double-blind

المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون

placebo-controlled food challenges وان كان الفحص الاخير يثير بعض التحفظات الاجتماعية الا أنه يعد من الفحوص الجيدة (8)،(10) فضلاً عن إجراء فحوص الكيموحيوية المتعددة (2)،(8) وفي هذا المجال يمكن توجيه الجهود لإعطاء نتائج أفضل مثل إستعمال نتائج البروتينات وتحميصها أكثر عندما تكون مشابهة لاكثر من محسس. وتضيف المناطق الممسوحة مثل إستعمال بروتينات ذوات الفلقة أو الفلقتين أو بروتينات الفطريات أو غيرها من المصادر كخلفية للبحث والابتعاد عن العموم وإجراء فحوص المحصول على مجاميع الاشخاص الذين لديهم حساسية لمجاميع المحاصيل (2)،(3)،(8)،(12)، وفي الوقت الحاضر يلاحظ أن الجهات المختصة FAO/WHO تحاول تجميع المعلومات وتنسيقها لإيجاد التوافق بينها (2). والملاحظ أن بعض الجهات تشير الى وجوب تعليم المنتجات الحاوية على 0.9 % من مشتقات المحاصيل المحورة وراثياً (5). وفي واقع الامر فإن السماح للاغذية المهندسة للاطلاق يجب أن يستغرق 8-12 سنة، أما المهندسة لغير أغراض التغذية فتحتاج الى 4 سنوات لإطلاقها الى البيئة و هذه التشريعات تعتمد على البلد و لا يوجد نظام عالمي شامل (2)، وتحتاج عمليات الهندسة الوراثية الى فحص النبات كاملاً وليس جزءاً محدداً منه فالذرة يستفيد الانسان من بذورها وكذلك القطن ولكن ما يتبقى من النبات يستعمل علفاً للحيوانات وفضلاً عن ذلك تحتاج عملية التصريح بالاطلاق الى الاسواق الى مراقبة بعد التسويق لمعرفة التأثيرات طويلة الامد (2)،(12).

ومثل ما وفرت المعلوماتية الحيوية جانباً هاماً للكشف عن الحساسية فأنها توفر إمكانية إستغلالها في مجالات علاجية مثل إزالة التحسس Destensitization بأستعمال Anti-IgE Antibodies أو إستعمال توجهات أخرى (15).

## REFERENCE

- 1- James, C.(2001). Global review of commercialized transgenic Crops. Ithaca, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application. No.26- 2002.
- 2- Goodman, R. E. and Tettch, A. O.(2011). Suggested improvements for the allergenicity assessments of genetically modified plant used in foods. *Current Allergy Asthma Report*, DOI 10:1007/511882- 011- 0195- 6. pp1-18.
- 3- Kleter, G. A. and Peijnenburg, A. A. (2002). Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE- binding linear epitopes of allergens. *BMC Structural Biology.*, 2: pp8-18.
- 4- Freese, F. and Schubert, D. (2004). Safety testing and regulation of genetically engineered modified food. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 21:pp 299-325.
- 5- Ujhelyi, G. (2009). Studying the Contamination of the Glyphosate – Tolerant Soybean from Soy Cantaining Food Products and the Risk of Its Translocation

- المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون  
into the Organism Using PCR Method. Ph. D. Thesis Central Food Research  
Institute. Budapest.
- 6- Nordlee, J. A.; Taylor, S. L.; Townsend, J. A.; Thomas L. A. and Bush, R. K. (1996). Identification of Brazil-nut allergen in transgenic Soyabeans. *The New England Journal of Medicine*, 334: pp 688-692.
  - 7- Singh, S., Taneja, B., Salvi, S. and Agrawal, A.(2009). Physical properties of intact proteins may predict allergenicity or lack thereof. *PLoS ONE*. 4: e6273. e6277.
  - 8- Kleter, G. A. and Peijnenburg, A. A.(2004). Prediction of the potential allergenicity of novel proteins. In "Allergy Matters: New Approaches to Allergy Prevention and Management" Eds., H. J. Wichers, F. J. Savelkoul, L. J. Gilissen. Ch10 pp87-95. Springer.
  - 9- Pawankar, R.; Canonica, G. W.; Holgate, S. T. and Lockey, R. F.2011. WAO White Book on Allergy 2011-2012. World Allerg Organization.
  - 10- Fiers, M. W.; Kleter, G. A.; Peijnenburg, A. A.; Nijland, H.; Nap, J. P. and Ham, R.C. (2006). In silico Prediction of Potential Allergenicity of Proteins According to the FAO/WHO guidelines with the help of Allermatchtm. Eds. L. Glissen, It. Wichers, H. Savelkoul and R. Bogers. Wageningen UR Forntis Series Vol.10, ch12 pp107-120.
  - 11- Kleter, G. and Peijnenburg, A. (2002). Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presines of short amino acid sequence identical to potential, IgE- binding linear epitopes of allergens. *BMC Structural Biology*. 2: pp1-14.
  - 12- Grossman, M. (2009). Protecting health, environment and agriculture: Authorisation of genetically modified crops and food in the United States and the European Union. *Deakin Law Review*; 14: pp257-304.
  - 13- Ivanciuc, O.; Garcia, T.; Torres, M.; Schein, C. and Braun, W. (2009). Characteristic motifs for families of allergenic proteins. *Molecular Immunology*., 46:pp 559-568.
  - 14- Schonbach, C.; Kowalski- Saunders, P. and Brusica, V. (2000). Data warehousing in molecular biology. *Briefings in Bioinformatics*., 1:pp190-198.
  - 15- Brusica, V.; Millot, M.; Petrovsky, N.; Gendel, M.; Gigonzac, O. and Stelman, S. J. (2003). Allergen databases. *Allergy*., 58: pp1093-1100.
  - 16- Fiers, M.W.; Kleter, G.A.; Nijland, M.; Peijnenbury, A. A.; Mop, J. P and Ham, R. C. (2004). Allermatchtm, a web tool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex. *BMC Bioinformatics*., 5: pp133- 138.
  - 17- Pace, C. N.; Fu, H.; Fryar, K. L. ; Landua, J. ; Trevino, S. R.; Shirley, B. A.; Hendricks, M. M.; Imura, S.; Gajiwala, K.; Scholtz, J. M. and Grimsley, G. R.(2011). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 408: pp514-528.
  - 18- Thomas, K.; Bannon, G.; Hefle, S.; Herouet, C.; Holsapple, M., Ladics, G.; MacIntosh, S. and Privalle, L. (2005). *In silico* methods for evaluating human allergenicity of novel proteins: International Bioinformatics Workshop Meeting Report: Mallorca, Spain, February 23- 24, Tox Sciences.

- المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011) زهرة محمود الخفاجي وآخرون
- 19- Saha, S. and Raghava, G. P.(2006). AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acid Research.*, 34: w202- w209.
  - 20- Lin, H. H. ; Han, L. Y.; Zhang, H. L.; Zheng, C. J. and Chen, Y. Z. (2006). Predication of the functional class of metal – binding proteins from sequence derived physicochemical properties by support vector machine approach. *Journal of Lipid Research*, 47:pp 824 – 831.
  - 21- Hoz, F. and Carreira, J.(1986). Identification of main allergens from Dermatophagoides farina and their properties under native and dissociating conditions. *Interational Archive of Allergy and Applied Immunology.*,79:pp 238-245.
  - 22- Teitelbaum, D.; Webb, C.; Rauch, H.; Karniely, Y. and Arnon, R.(1975). Inverse relationship between net electric charge on the antigen and that on the sensitized cell in cellular immune response; demonstration with basic encephalitogen of the brain. *Journal of Experimental Medicine*, 42:pp 701-708.
  - 23- Ojala, J. R.; Pikkarainen, T.; Tuuttila, A.; Sandolova, T. and Tryggvason, K.(2007). Crystal structure of the Cysteine – rich domain of scavenger receptor MARCO reveals the presence of basic and acidic cluster that both contribute to ligand recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 282: pp16654- 16666.
  - 24- Willoughby, D. A. (1994). Asthma increase Lancet., 344: 413.
  - 25- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002). Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York.
  - 26- Tanford, C. (1980). The Hydrophobic Effect. Wiley, New York.
  - 27- Jameson, B. A. and Wolf, H. (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinant. *CABIOS*, 4: pp 181 -186.
  - 28- Furmonaviciene, R.; Sutton, B. J.; Glaser, F.; Laughton, C. A.; Jones, N.; Sewell, H. F. and Shakib, F. (2005). An attempt to define allergen- specific molecular surface features: a bioinformatic approach. *Bioinformatic.*, 21:pp 4201- 4204.
  - 29- Chowdhury, E. H.; Kuribara, H; Hino, A.; Sultana, P.; Mikami, O.; Shimada, N.; Guruge, K. S.; Saito, M. and Nakajima, Y.(2003). Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Btl. *Journal Animal Science*, 81:pp 2546- 2551.
  - 30- Wiedemann, S.; Lutz, B.; Kurtz, H.; Schawrz, F. J. and Albrecht, C. (2006). In situ studies on the time- dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. *Journal of Animal Science*, 84: pp135-144.
  - 31- Ofori-Anti, A.O.; Ariyaratna, H. and Chen, L. (2008). Establishing objective detection limits for the pepsin digestion assay used in the assessment of genetically modified foods. *Regul. Toxicology and phamacology.*, 52: pp94-103.
  
  - 32- Xiong, J. (2006). Essential Bioinformatics. Cambridge University press: UK.
  - 33- Goodman, R. E. (2008). Performing IgE serum testing due to bioinformatics matches in the allergenicity assessment of GM crops. *Food Chemistry and Toxicology.*, 46: pp524- 534.



زهرة محمود الخفاجي وآخرون

المجلة العراقية للتقانات الحياتية 10(2): 186-202 (2011)

34- Lehrer, S. B.; Ayuso, R. and Resse, G. (2002). Current understanding of food allergens. Annual N.Y. *Academic of Science.*, 964:pp 69- 85.

35- Friends of the Earth. (2006). Could Gm foods Cause allergies?. Report, February, 2006.