مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۳۹-۳۱

توصیف پروتئین‌های محافظت شده فرضی از *Xanthomonas citri* subsp. *citri*، با فعالیت محرک تولید اتیلن درگیاه آرابیدوپسیس

Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from Proteome of *Xanthomonas citri subsp. citri,* with Ethylene Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*

وحید فلاح‌زاده ممقانی

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Assistant Prof. of Plant Protection Dept. Agriculture Fac.
Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fallahzadeh@azaruniv.edu

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۱)

چکیده

در پژوهش‌های پیشین از بخش خالص شده پروتئوم باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) که قابلیت محرک تولید اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس را داشت، حدود ۶۰ پروتئین مختلف شناسایی شدند که از بین آنها هشت پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده بودند. هدف از انجام این پژوهش توصیف این پروتئین‌ها توسط ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف می‌باشد. همه پروتئین‌های مورد بررسی دارای جرم مولکولی متوسطی بودند. پروتئین NP_640497.1 با ۴۳/۸۴ کیلودالتون دارای بیشترین جرم مولکولی بود. نقطه ایزوالکتریک (pI) محاسبه شده برای پروتئین‌ها بین ۵/۳۴ تا ۹/۵ متغییر بود. نوع خانواده‌های پروتئینی و دمین‌های پروتئین‌ها توسط ابزار پایگاه اطلاعاتی دمین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro تعیین شد. از بین موارد مورد بررسی در پروتئین NP_640912.1 دمین HTH (Helix-turn-Helix)، از بخش مرکزی پروتئین NP_640497.1، دمین Enoyl_reductase، از پروتئین NP_641576.1 دو موتیف متصل شونده به یون کلسیم (EF-hand, calcium binding motif) و در پروتئین NP_643454.1 دمین 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase از بالاخانواده Hot_dog شناسایی شد. سرور COACH برای پیش‌بینی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت و ساختار سه بعدی آنها توسط سرور Phyre 2 مدل سازی شد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در شناخت بهتر باکتری *Xcc* و همچنین شناسایی پروتئین‌هایی با خاصیت الیسیتوری از این باکتری به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

زانتوموناس

بیوانفورماتیک

شانکر مرکبات

محرک

پروتئین

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

مقدمه

باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri (Xcc)* که عامل بیماری شانکر مرکبات است، یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی می‌باشد که تمام مرکبات مهم را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سالانه خسارت سنگینی به تولید کنندگان مرکبات در دنیا و از جمله ایران وارد می‌کند (Montakhabi et al. 1389). منشاء این بیماری ژاپن و جنوب شرقی آسیا است و به غیر از اروپا به تمام قاره‌هایی که در آنها مرکبات تولید می‌شوند انتشار یافته است (Agrios, 2005).

در مناطقی که بیماری بومی نمی‌باشد، ممکن است با از بین بردن اینوکلوم از طریق نابود کردن درختان آلوده بتوان بیماری را ریشه‌کن کرد (Agrios, 2005). در صورتی که بیماری به صورت بومی درآید، بیماری را می‌توان تنها با روش‌هایی مثل کاشت درختان مقاوم و سالم، بهداشت مزرعه و استفاده از سموم مسی تا حدی کنترل کرد. هرچند هیچکدام از این اقدامات منجر به کنترل موفق و موثر این بیماری نمی‌شود (Agrios, 2005; Moreira *et al.*, 2010). در سال‌های اخیر یافته‌های نوین در علم بیماری‌شناسی گیاهی مولکولی و به طور کلی زیست شناسی سلولی و مولکولی دریچه‌های نوینی را به روی پژوهشگران گشوده است و با به کارگیری این یافته‌ها از یک سو گیاهان تراریخته‌ای با مقاومت بیشتر نسبت به بیماریهای گیاهی معرفی شده است و از سوی دیگر روش‌هایی برای اختلال فرآیند بیماریزایی عوامل بیماریزای گیاهی معرفی شده است (Collinge *et al.*, 2010; Chen et al., 2013). استفاده از شیوه‌های نوین در کنترل بیماریهای گیاهی هنوز در ابتدای راه است و برای پیشرفت و توسعه هر چه بیشتر این علوم نیاز به اطلاعات وسیعی در خصوص ژنوم و پروتئوم گیاهان و همچنین عوامل بیماریزای گیاهی می‌باشد.

ژنوم کامل باکتری *Xcc* برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ توالی‌یابی گردید و بعد از آن ژنهای کد کننده پروتئین‌ها در آن شناخته شده و در NCBI ثبت شدند (da Silva *et al.*, 2002). با وجود اینکه تعداد زیادی از این ژن‌ها و پروتئین‌های مربوطه به طور کامل توصیف شده‌اند، اما هنوز هم تعدادی از ژنها و پروتئین‌های مربوط به آن‌ها به صورت ناشناخته باقی مانده‌اند. این پروتئین‌ها به اصطلاح پروتئین‌های فرضی (Hypothetical proteins) نامیده می‌شوند. شناسایی و توصیف عملکرد این پروتئین‌ها در باکتری *Xcc* می‌تواند کمک زیادی به شناخت هر چه بیشتر خصوصیات سلولی و مولکولی این بیمارگر مهم بکند.

در پژوهش‌های پیشین مشخص شد که عصاره سلولی حاصل از گونه‌های مختلف جنس زانتوموناس فعالیت محرکی (Elicitor activity) شدیدی بر روی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا دارند و بعد از تیمار برگ‌های گیاه با مقادیر بسیار ناچیز عصاره سلولی باکتری‌های زانتوموناس تولید اتیلن گیاه به شدت افزایش می‌یابد (Jehle *et al.*, 2013; Fallahzadeh 2012). با خالص سازی عصاره فعال و بررسی بخش فعال بدست آمده از کروماتوگرافی تبادل آنیونی لیستی از ۶۰ پروتئین مختلف شناسایی و توالی‌یابی شدند (Fallahzadeh, 2016). از بین ۶۰ پروتئین شناسایی شده هشت پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده مشخص شدند. هدف از پژوهش حاضر توصیف این پروتئین‌ها با ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

توالی‌های پروتئینی مورد استفاده: توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در این پژوهش حاصل خالص‌سازی و توالی یابی بخشی از پروتئوم باکتری *Xcc* می‌باشد که خاصیت محرک تولید اتیلن گیاه را داشت. این پروتئین‌ها با روش کروماتوگرافی آنیونی خالص‌سازی شده و با دستگاه طیف سنجی جرمی متوالی توالی یابی شده بودند (Fallahzadeh, 2016). در این بررسی ۶۰ پروتئین از عصاره مورد بررسی بدست آمد که از بین آنها ۸ پروتئین به عنوان پروتئین فرضی محافظت شده شناسایی شدند.

توصیف خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها: به منظور توصیف فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های مورد بررسی از سرور پروتپارام اسکپازی (http://us.expasy.org/tools/protparam) استفاده شد. با استفاده از این سرور وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک نظری (theoretical isoelectric point)، تعداد کل اسیدهای آمینه مثبت و منفی، شاخص بی ثباتی (Guruprasad *et*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

al., 1990)، شاخص آلیفاتیک (Ikai, 1980) و متوسط هیدروپاتی کل (grand average hydropathy-GRAVY) (Kyte and Doolittle, 1982) پروتئین‌ها محاسبه گردید.

تعیین نوع دمین‌های (Domains) محافظت شده: نوع دمین‌های محافظت شده پروتئین‌ها با استفاده ابزار پایگاه اطلاعاتی دمین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro (http://www.ebi.ac.uk/interpro) تعیین شد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd). نتایج حاصل از هر دو ابزار با همدیگر مقایسه شد و مناسب‌ترین نتیجه گزارش شد.

تخمین جایگاه سلولی و پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌ها: برای تخمین جایگاه سلولی پروتئین‌ها از سرور Cell-PLoc 2.0 استفاده شد. این سرور از ابزارهای مختلفی برای تخمین جایگاه سلولی پروتئین‌ها در موجودات مختلف تشکیل شده است که از بین آنها Gneg-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gneg-multi) به صورت ویژه برای باکتری‌های گرم منفی طراحی شده است. تعیین پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌ها توسط سرور DISULFIND (http://disulfind.dsi.unifi.it) صورت گرفت.

تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها و جایگاه اتصال لیگاند در آنها: برای تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها از Phyre 2 استفاده شد (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index). برای تخمین جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها از سرور COACH (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COACH) استفاده شد.

نتایج و بحث

توصیف خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند برای شناخت بهتر پروتئین‌ها و شناسایی آنها بسیار سودمند باشد. با توجه به جدول ۱ می‌توان مشاهده کرد که همه پروتئین‌های مورد بررسی در این تحقیق دارای جرم مولکولی متوسطی هستند و تفاوت زیادی با همدیگر ندارند. با این حال از بین پروتئین‌های مورد بررسی پروتئین NP_640497.1 با ۴۳/۸۴ کیلودالتون دارای بیشتر جرم مولکولی است.

نقطه ایزوالکتریک (pI) محاسبه شده برای پروتئین‌ها از ۵/۳۴ تا ۹/۵ متغییر بود. نقطه ایزوالکتریک pHی است که در آن یک آمینواسید و یا پروتئین بار خود را از دست می‌دهد و بنابراین در میدان الکتریکی با جریان مستقیم قادر به حرکت نمی‌باشد. اطلاع از نقطه ایزوالکتریک یک پروتئین می‌تواند برای انتخاب و بهینه سازی روش‌های مورد استفاده برای خالص سازی پروتئین اعم از کروماتوگرافی تبادل یونی و الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ بسیار مفید باشد.

شاخص بی‌ثباتی محاسبه شده برای پروتئین‌های مورد بررسی بین ۲۲/۵۹ تا ۴۴/۴۷ بود. بررسی‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌هایی که شاخص بی‌ثباتی آنها کوچک‌تر از ۴۰ باشند با ثبات و در غیر اینصورت بی‌ثبات خواهند بود. بنابراین بر اساس این تخمین می‌توان گفت که از بین پروتئین‌های مورد بررسی پروتئین‌های NP_643454.1 و NP_641190.1 بی‌ثبات محسوب می‌شوند.

شاخص دیگری که در این بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت شاخص آلیفاتیک (Aliphatic Index-AI) بود (جدول ۱). این شاخص در واقع عبارت است از حجم نسبی پروتئین که با زنجیره‌های آلیفاتیک اشغال شده‌اند (A، V، I، و L) و به عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئین‌های گلوبول مانند محسوب می‌شود و به همین دلیل در باکتری‌های مقاوم به گرما پروتئین‌ها دارای شاخص آلیفاتیک بالایی می‌باشند (Akai, 1998). پروتئین‌هایی با شاخص آلیفاتیک بسیار بالا (بالاتر از ۱۰۰) ممکن است در دامنه دمایی بسیار بالایی از خود ثبات نشان دهند. در بررسی حاضر شاخص آلیفاتیک اکثر پروتئین‌های مورد بررسی بین ۱۰۰-۸۰ بود و تنها در مورد NP_641576.1 ۴۸/۳۴ اندازه‌گیری شد.

متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY) محاسبه شده برای پروتئین‌ها در این بررسی بین ۰/۱۸۱- تا ۰/۹۸۷- بود. عدد GRAVY از تقسیم مجموع هیدروپاتی محاسبه شده برای تمام اسیدهای آمینه در پروتئین بر تعداد کل اسیدهای آمینه آن پروتئین بدست می‌آید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

جدول ۱- تعیین خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها با استفاده از سرور پروتپارام اسکپازی

Table 1- Determination of physicochemical properties of proteins by Expasy's Protparam server.

پروتئین‌ها	NA	MW	pI	PR	NR	Gravy	AI	II
NP_640650.1	157	17.85	7.82	24	23	-0.334	89.49	35.17
NP_638186.1	257	27.39	7.91	36	35	-0.450	84.94	37.21
NP_640912.1	154	17.1135	9.51	22	19	-0.395	93.44	22.59
NP_640497.1	402	43.84	5.34	45	55	-0.181	87.19	26.53
NP_641576.1	199	21.41	9.15	35	32	-0.987	48.34	23.24
NP_643454.1	152	17.43	5.44	19	22	-0.245	84.08	44.47
NP_641190.1	212	23.73	7.79	20	19	-0.505	86.93	42.70
NP_644577.1	222	24.06	5.88	24	28	-0.245	100.41	35.33

NA: تعداد اسیدهای آمینه، MW: جرم مولکولی، pI: نقطه ایزوالکتریک، PR: تعداد اسیدهای آمینه با بار مثبت،
NR: تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی، Gravy: متوسط هیدروپاتی کل، AI: شاخص آلیفاتیک، II: شاخص بی ثباتی

در صورتی که GRAVY محاسبه شده برای یک پروتئین منفی باشد بدین معنی است که آن پروتئین غیر قطبی است و در صورت مثبت بودن آن قطبی محسوب می‌شود (Kyte and Doolittle, 1982). بنابراین با توجه به اعداد محاسبه شده در جدول ۱ می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تمامی پروتئین‌های مورد بررسی غیر قطبی محسوب می‌شوند.

تعیین نوع خانواده‌های پروتئینی و دمین‌های (Domains) محافظت شده

نوع خانواده‌های پروتئینی در پروتئین‌های مورد بررسی و دمین-های موجود در آنها توسط ابزار پایگاه اطلاعاتی دمین‌های محافظت شده CDD-Blast و Interpro تعیین شد (جدول ۲). از بین موارد مورد بررسی پروتئین NP_640650.1 دارای دو دمین محافظت شده DUF1456 (از بالا خانواده DUF1456) و YehS (از خانواده YehS) می‌باشد. پروتئین‌های بالا خانواده DUF1456، شامل پروتئین‌هایی محافظت شده در باکتری‌ها هستند که از حدود ۱۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و عملکرد خاصی برای آنها شناخته نشده است. در پروتئین NP_638186.1 دمین PspA (پروتئین شوک فازی A) شناسایی شد (جدول ۲). پروتئین‌های شوک فازی در حالت عادی غلظت بسیار پایینی در داخل سلول باکتری دارند و غیر قابل شناسایی هستند اما بعد از حمله فاژهای رشته‌ای سنتز آنها تحریک شده و غلظت آنها افزایش می‌یابد (Brissette *et al.*, 1990). علاوه بر این تنش‌های گرما، اتانول و فشار اسمزی نیز منجر به تحریک سنتز این پروتئین می‌شوند.

پروتئین NP_640912.1 دارای دمین HTH (Helix-turn-Helix) می‌باشد. بیشتر اعضای این بالاخانواده جزء پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند. دمین شناسایی شده در پروتئین NP_640912.1 شباهت زیادی به PadR دارد که در تنظیم منفی متابولیسم فنولیک اسید نقش دارد (Fibriansah *et al.*, 2012).

به دلیل بزرگ بودن پروتئین NP_640497.1، تعداد بیشتری از دمین‌ها شناسایی شد. در بخش مرکزی این پروتئین دمین Enoyl_reductase قرار دارد که در واقع ناحیه کاتالیک آنزیم ترنس-۲- انویل-کوآنزیم A (Trans-2-enoyl-CoA reductase-TER) است. این خانواده از ردوکتازها حامل سایتهای کاتالیتیکی از آنزیم هستند که حاوی موتیف‌های محافظت شده YNThhhFxK، و YShAPxR می‌باشند. این آنزیم از طریق مسیری غیر معمول احیاء کروتونیل کوآنزیم آ (Crotonyl-CoA)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

را به بوتیریل کوآنزیم آ (Butyryl-CoA) کاتالیز می‌کند که در مجموع این مسیر در سنتز اسیدهای چرب نقش دارد (Hu et al., 2013). از آنجایی که این آنزیم از NADH به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند، در انتهای N این پروتئین دمین متصل شونده به NADH با توالی محافظت شده GA/CSpGYG (p هر اسید آمینه قطبی می‌تواند باشد) نیز شناسایی شد. علاوه بر این در انتهای C این پروتئین دمین متصل شونده FAD شناسایی شد که دارای توالی محافظت شده FGFxxxxxDY می‌باشد.

در پروتئین NP_641576.1 دو موتیف متصل شونده به یون کلسیم (EF-hand, calcium binding motif) شناسایی شد. این نوع موتیف از مارپیچ-لوپ-مارپیچ تشکیل شده است و شکل فضایی آن شبیه وضعیت قرارگیری انگشتان شست و اشاره دست انسان است. در توالی بیشتر پروتئین‌های متصل شونده به پروتئین دو موتیف از این نوع مشاهده می‌شود. اتصال یون کلسیم به این پروتئین‌ها منجر به تغییر ساختار فضایی آنها شده و آنها را فعال یا غیر فعال می‌کند (Denessiouk *et al.*, 2014). تعداد زیادی از پروتئین‌های متصل شونده به یون کلسیم در پروکاریوتها وجود دارد که نقش‌های تنظیمی متنوعی در بیان ژن‌های مختلف پروکاریوتی دارند (Zhao *et al.*, 2010; Bylsma *et al.*, 1992).

در پروتئین NP_643454.1 دمین 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase از بالاخانواده Hot_dog شناسایی شد. این دمین در آنزیم‌هایی از پروکاریوت‌ها مشاهده می‌شود که فعالیت تیواسترازی دارند و 4-hydroxybenzoyl-CoA را هیدرولیز کرده و از آن 4-hydroxybenzoyl و CoA ایجاد می‌کنند (Song *et al.*, 2012). ساختار سه بعدی این آنزیم در استرین CBS-3 از باکتری *Pseudomonas* sp. شناسایی و مشخص شده است که از ۵ تا ۶ صفحه بتا تشکیل شده است که در کنار یک مارپیچ آلفای طویل قرار می‌گیرد.

تخمین جایگاه سلولی و پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌ها

برای تشریح عملکردهایی از پروتئین که در فرایندهای مختلف سلولی دخیل می‌باشند، تعیین جایگاه زیر سلولی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. با بررسی‌هایی که در ابزار Cell-PLoc 2.0 صورت گرفت مشخص شد که بیشتر پروتئین‌های مورد بررسی مرتبط با غشاء داخلی باکتری هستند. از بین پروتئین‌های مورد بررسی، پروتئین NP_640497.1 و NP_640650.1 هم سیتوپلاسمی بوده و همچنین مرتبط با غشاء داخلی باکتری هستند. تنها در مورد NP_641576.1 جایگاه پروتئین در پری-پلاسم باکتری تعیین گردید. علاوه بر این، با بررسی‌هایی که در سرور DISULFIND صورت گرفت هیچگونه باند دی سولفیدی در هیچکدام از پروتئین‌های مورد بررسی شناسایی نشد. این نتایج نشان دهنده این است که این پروتئین‌ها از لحاظ دمایی بی ثبات هستند. علاوه بر این، پل‌های دی‌سولفیدی نقش مهمی در تثبیت فرایندهای تا شدن بسیاری از پروتئین‌ها دارند.

جدول ۲- تعیین جایگاه سلولی پروتئین‌ها با Cell-PLoc 2.0

Table 2- Localization of cellular location of proteins by Cell-PLoc 2.0

پروتئین	جایگاه سلولی
NP_640650.1	غشای داخلی و سیتوپلاسم
NP_638186.1	غشای داخلی
NP_640912.1	غشای داخلی
NP_640497.1	غشای داخلی و سیتوپلاسم
NP_641576.1	پری پلاسم
NP_643454.1	سیتوپلاسم
NP_641190.1	غشای داخلی
NP_644577.1	غشای داخلی

تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها و جایگاه اتصال لیگاند در آنها

برای تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها از Phyre2 استفاده شد (شکل ۱). مدل سازی در این سرور با همتراز سازی (alignment) مدل‌های مخفی مارکو (hidden Markov models) صورت می‌گیرد که دقت همتراز سازی خود را به صورت معنی-داری افزایش می‌دهد (Soding, 2005; Jefferys, 2010). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_638186.1، دو مارپیچ به هم پیچیده (Coiled-coil) دیده می‌شود (شکل ۱، B) که ساختار معمول مشاهده شده در دمین‌های PspA است. در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_640912.1، چندین مارپیچ آلفا با چندین دور قابل مشاهده است که مربوط به دمین متصل شونده به DNA است (شکل ۱، C). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_640497.1 صفحات بتای احاطه شده در بین مارپیچ‌های آلفا قابل مشاهده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

است که دمین متصل شونده به کوفاکتور می‌باشد (شکل ۱، D). علاوه بر این دمین قسمت پایینی که دارای دو صفحه بتا است نیز دمین متصل شونده به سوبسترا محسوب می‌شود (Hu *et al.*, 2013). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_6401576.1، موتیف‌های ماپیچ–دور–مارپیچ قابل مشاهده است که مربوط به موتیف‌های متصل شونده به کلسیم هستند. در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_643454.1، چهار صفحه بتا به صورت موازی هم قرار گرفته‌اند که با دورها و مارپیچ‌های آلفای کوچک به هم وصل شده‌اند و در کنار آنها یک مارپیچ آلفای نسبتاً بلند دیده می‌شود (شکل ۱، F). این دمین که مربوط به آنزیم 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase می‌باشد در چند باکتری دیگر نیز گزارش شده و ساختار آن شناخته شده است (Song et al., 2012). در مدل ارائه شده برای پروتئین NP_641190.1 سه مارپیچ آلفای نسبتاً طویل و دو مارپیچ کوتاه دیده می‌شود که با دورهایی به هم وصل شده‌اند (شکل ۱، G).

سرور COACH برای پیش بینی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. این سرور از طریق دو روش TM-SITE و S-SITE و به صورت مقایسه‌ای جایگاه اتصال پروتئین‌ها به لیگاند مربوطه را تخمین می‌زند. در این دو روش الگوهایی از پایگاه اطلاعاتی عملکرد پروتئین BioLip برای تخمین مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این بررسی نوع لیگاند احتمالی متصل شونده به پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه درگیر در این اتصال معرفی شد (جدول ۳). همانطور که در نتایج حاصل از جستجوی دمین‌ها در CDD-Blast اشاره شد، اطلاع زیادی در خصوص عملکرد این پروتئین بدست نیامد و عملکرد دمین‌های ذکر شده نیز ناشناخته می‌باشند. اما شاید بتوان نتایج حاصل از COACH را برای پی بردن به عملکرد این پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. لیگاند معرفی شده برای این پروتئین با درجه اطمینان تخمین ۰/۱، AE8 معرفی شد (جدول ۳).

جدول ۳- تخمین ناحیه اتصال لیگاند در پروتئین‌ها توسط سرور COACH

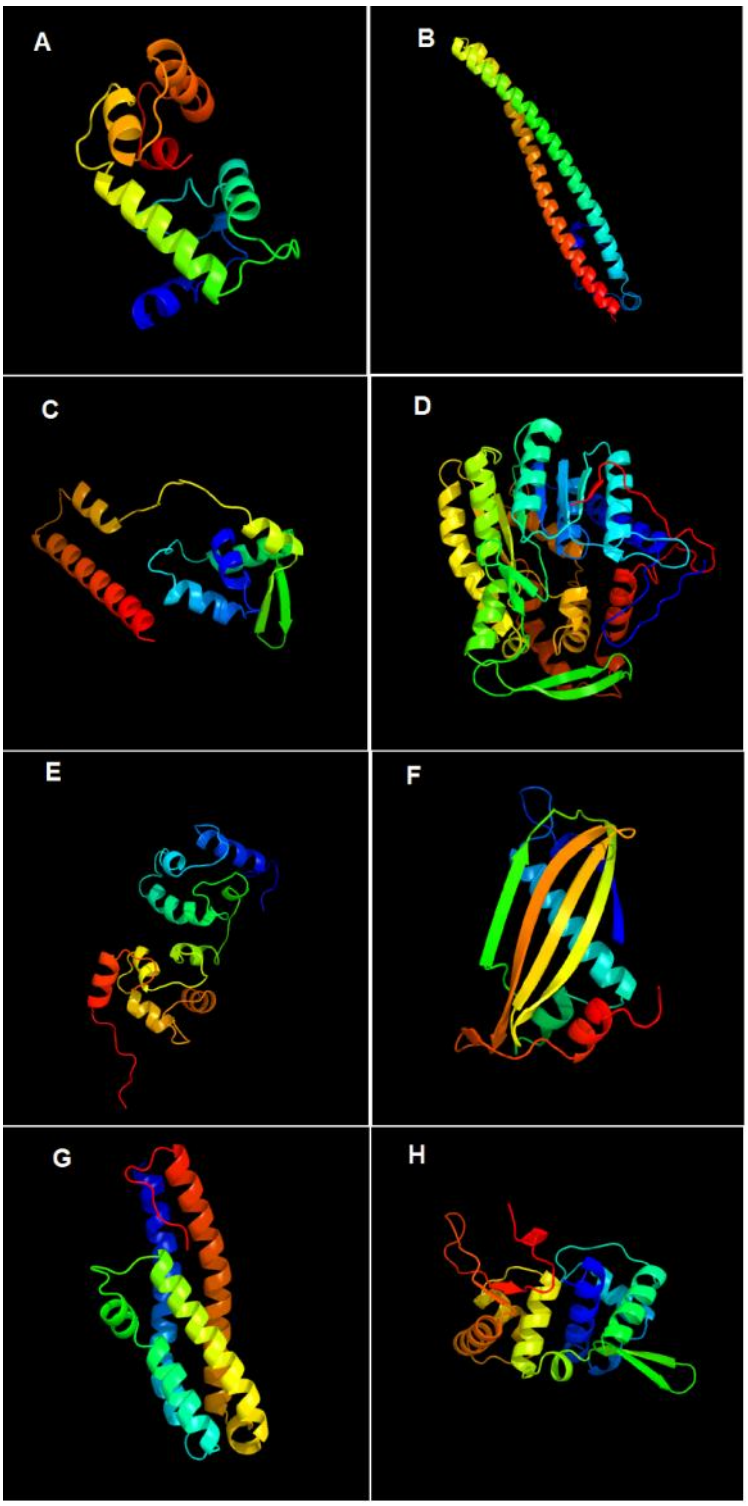
Table 3. Prediction of ligand binding site in proteins by COACH server.

پروتئین	اسم لیگاند	اسیدهای آمینه درگیر Binding Residues	درجه اطمینان تخمین* C-score of prediction
NP_640650.1	AE8	۳۷، ۴۱، ۴۴، ۵۶	۰/۱
	اسید نوکلئیک	۷، ۱۳، ۳۶، ۳۷، ۵۳، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۶۴، ۶۷، ۶۸، ۷۰	۰/۰۸
NP_638186.1	پپتید	۳۵، ۳۹، ۷۳، ۹۱، ۹۴، ۹۵، ۱۵۳	۰/۰۳
NP_640912.1	اسید نوکلئیک	۲۵، ۲۶، ۲۷، ۴۵، ۴۹، ۵۳، ۶۳، ۶۹، ۷۰	۰/۳۳
	اسید نوکلئیک	۶، ۱۱، ۱۲، ۴۴، ۴۶، ۴۷، ۵۰، ۵۱	۰/۱
NP_640497.1	NADH	۴۸، ۵۰، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۷۳، ۷۴، ۷۵، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۳، ۱۳۹، ۱۴۰، ۱۴۱، ۱۴۲، ۲۲۵، ۲۲۶، ۲۴۵، ۲۷۱، ۲۷۲، ۲۷۳، ۲۷۴، ۲۷۶، ۲۷۸، ۲۷۹	۰/۹۵
	AEW	۱۴۱، ۲۲۶، ۲۳۲، ۲۳۶، ۲۷۳، ۲۸۴، ۲۸۵	۰/۳
NP_641576.1	کلسیم	۱۳۱، ۱۵۳، ۱۵۵، ۱۵۷، ۱۵۹، ۱۶۴	۰/۳۲
	کلسیم	۱۲۵، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۳۱، ۱۳۶	۰/۱۶
NP_643454.1	Phenacyl coenzyme A	۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۷۷، ۷۸، ۷۹، ۸۰، ۱۱۳	۰/۶
NP_641190.1	FADH2	۵۷، ۶۸، ۷۱	۰/۰۶
NP_644577.1	اسید نوکلئیک	۹۵، ۹۷، ۹۸، ۱۳۰، ۱۳۱، ۱۳۵، ۱۳۸، ۱۵۴، ۱۵۵، ۱۵۶	۰/۰۹

* درجه اطمینان تخمین، عددی بین ۰ تا ۱ می تواند باشد که هر چه به یک نزدیکتر باشد دقت تخمین نیز بالاتر است

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]



شکل ۱- تخمین ساختار ثانویه پروتئین‌ها با استفاده از سرور Phyre 2. A. NP_640650.1، B. NP_638186.1، C. NP_640912.1، D. NP_640497.1، E. NP_6401576.1، F. NP_643454.1، G. NP_641190.1، H. NP_644577.1.

Fig 1- Prediction of three-dimensional proteins by Phyre 2 server. A. NP_640650.1, B. NP_638186.1, C. NP_640912.1, D. NP_640497.1, E. NP_6401576.1, F. NP_643454.1, G. NP_641190.1, H. NP_644577.1.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

با مراجعه به بانک اطلاعاتی پروتئین (RCSB PBD) مشخص شد که AE8 مولکولی است که به عنوان بازدارنده آنزیم توپوایزومراز در باکتری‌ها عمل می‌کند. بنابراین می‌توان این احتمال را مطرح کرد که NP_64065.1 نوعی توپوایزومراز در زانتوموناس می‌باشد. در پروتئین NP_640912.1 دو جایگاه اتصال به DNA شناسایی شد. این نتایج مطابق با نتایج حاصل از CDD-Blast است که در آن دمین‌های متصل شونده به DNA شناسایی شد. این نوع پروتئین‌ها با اتصال به DNA در تنظیم بیان ژنها نقش دارند (Fibriansah *et al.*, 2012).

منابع

Benning MM, Wesenberg G, Liu R, Taylor KL, Dunaway-Mariano D, Holden HM. 1998. The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. Strain CBS-3 Journal of Biological Chemistry 273: 33572–33579.

Brissette JL, Russel M, Weiner L, Model P. 1990. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. PNAS 87(3):862-6.

Bylsma N, Drakenberg T, Andersson I, Leadlay PF, Forsén S. 1992. Prokaryotic calcium-binding protein of the calmodulin superfamily Calcium binding to a *Saccharopolyspora erythraea* 20 kDa protein. FEBS letters 299(1): 44-47.

Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. 2013. Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. International Journal of Molecular Science 14(9): 17477–17500.

Collinge DB, Jørgensen HJ, Lund OS, Lyngkjaer MF. 2010. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. Annual Review of Phytopathology 48:269-91.

da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417 (6887): 459-463

Denessiouk K, Permyakov S, Denesyuk A, Permyakov E, Johnson MS. 2014. Two structural motifs within canonical EF-hand calcium-binding domains identify five different classes of calcium buffers and sensors. PLoS ONE 9(10): e109287. doi:10.1371/journal.pone.0109287

Duan YP, Castañeda A, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. Molecular Plant–Microbe Interactions 12: 556–60.

Dunger G, Arabolaza A. L, Gottigb N, Orellano EG Ottado J. 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. Plant Pathology 54: 781–788.

Fallahzadeh-Mamaghani V. 2012. Iteraction of *Xanthomonas axonopodis* elicitor with the receptor like protein from *Arabidopsis thaliana* and its role in the induction of plant resistance. Doctorial thesis, University of Tehran. (In persian)

Fallahzadeh-Mamaghani V. 2016. Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp**.** *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana.* Genetic Engineering and Biosafety Journal 4(2) 113-123.

Fibriansah G, Kovács ÁT, Pool TJ, Boonstra M, Kuipers OP, Thunnissen A-MWH. 2012. Crystal Structures of Two Transcriptional Regulators from *Bacillus cereus* Define the Conserved Structural Features of a PadR Subfamily. PLoS ONE 7(11): e48015. doi:10.1371/journal.pone.0048015

Gill SC, von Hippel PH. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical Biochemistry 182: 319-326.

Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering 4: 155-161.

Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering 4:155-161.

Hu K, Zhao M, Zhang T, Zha M, Zhong C, Jiang Y, Ding J. 2013. Structures of trans-2-enoyl-CoA reductases from *Clostridium acetobutylicum* and *Treponema denticola*: insights into the substrate specificity and the catalytic mechanism. Biochemistry Journal 449: 79–89

Ikai A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. Journal of Biochemistry 88: 1895-1898.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

Jefferys BR, Kelley LA and Sternberg MJE. 2010. Protein Folding Requires Crowd Control in a Simulated Cell. Journal of Molecular Biology 397(5): 1329-1338.

Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G. 2013. The receptor-like protein ReMAX of *Arabidopsis thaliana* detects the novel MAMP emax from *Xanthomonas*. 25: 2330-2340.

Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydro pathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157: 105-132.

Lenz LL1, Dere B, Bevan MJ. 1996. Identification of an H2-M3-restricted Listeria epitope: implications for antigen presentation by M3. Immunity 5(1): 63-72.

Montakhabi M, Rahimian H, Jafarpour B. 1389. Investigation of possible biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, by epiphytic antagonistic bacteria in vitro condition. Plant protection Journal. 24(4): 368-376. (In Farsi with English Abstract).

Moreira LM, Almeida JNF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. BMC Genomics 11: 238.

Söding J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. Bioinformatics 21: 951-960. doi:10.1093/bioinformatics/bti125.

Song F, Thoden JB, Zhuang Z, Latham J, Trujillo M, Holden HM, Dunaway-Mariano D. 2012. The catalytic mechanism of the hotdog-fold enzyme superfamily 4-Hydroxybenzoyl CoA-Thioesterase from *Arthrobacter* sp. Strain SU+. Biochemistry 51(35): 7000–7016.

Stall R.E. Seymour CP. 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. Plant Disease 67: 581-585.

Zhao X1, Pang H, Wang S, Zhou W, Yang K, Bartlam M. 2010. Structural basis for prokaryotic calcium-mediated regulation by a *Streptomyces coelicolor* calcium binding protein. Protein Cell. 1(8):771-9.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol5, Number1, Spring and summer 2016, Bi-seasonal

Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from Proteome of *Xanthomonas citri subsp. citri*, with Ethylene Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

Assistant Prof. of Plant Protection Dept. Agriculture Fac. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: fallahzadeh@azaruniv.edu

A B S T R A C T

In previous work we showed that a purified extract of the proteome of bacterium *Xcc* that was able to induce ethylene production on *Arabidopsis*. Among the approximately 60 different putative proteins in the extract, eight were identified as conserved hypothetical proteins. The aim of this study is to use different bioinformatics tools to characterize these proteins. All of the investigated proteins ranged in size between 17.11 and 43.84 kilo Daltons with Protein NP_640497.1 being the largest. Calculated isoelectric points (pI) for proteins varied between 5.34 and 9.5. The type of protein families and domains of proteins was determined by conserved domain database (CDD-Blast) and Interpro. Among the investigated proteins, proteins NP_640912.1 had a HTH domain (Helix-turn-Helix); the central part of protein NP_640497 contained an Enoyl reductase domain; protein NP_641576.1 contained two calcium binding motifs (EF-hand, calcium binding motif); and protein NP_643454.1 contained a 4-hydroxybenzoyl-CoA thiesterase motif from the Hot dog superfamily. COACH server was used for predication of ligand binding sites of proteins and their three dimensional structure was modeled by Phyre 2 server. Results from this research can be used for better understanding of Xcc and also identification of proteins with elicitor activity from this bacterium.

Key Words

Xanthomonas, Bioinformatics, Citrus canker, Elicitor, Protein

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.5.0]