

شناسایی، همسانه‌سازی و آنالیز بیوانفورماتیکی ژن کدکننده پروتئین NIa و ویروس موزاییک نواری گندم (WSMV)

سمانه باقری¹، براتعلی فاخری²، علی محمد احدی^{3*}، عباسعلی امام‌جمعه⁴

1. دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

2. استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

3. دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

4. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/4/12 - تاریخ پذیرش: 1398/9/10)

Identification, cloning and bioinformatics analysis of the gene encoding NIa protein of wheat streak mosaic virus (WSMV)

Samaneh Bagheri¹, Barat-Ali Fakheri², Ali Mohammad Ahadi^{3*}, Abbasali Emamjomeh⁴

1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3. Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

4. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

(Received: Jul. 3, 2019 - Accepted: Dec. 1, 2019)

Abstract

Wheat streak mosaic virus (WSMV) is one of the most important wheat infectious which its prevalence is increasing in Iran. NIa protein as a key protein in WSMV, plays important roles in viral replication and proteolytic digestion of viral polyprotein. Considering the critical role of NIa protein in viral infection, isolation, sequencing and determination of secondary and tertiary structure of this protein were the objectives of the present study. Also, the amino acids present in the NIa protein active site, which can be used as the targets for design and development of new antiviral agents, were investigated. In this study, the gene encoding NIa protein was isolated from WSMV and its sequencing was done followed by cloning in pEST prokaryotic vector. The resulted nucleotide sequence was deposited in NCBI database with accession number MK335432. Investigation of physical and chemical properties showed that NIa protein is including 426 amino acids, 48.8 kD molecular weight and 8.81 PI. Prediction of secondary structure of NIa protein revealed that 53.29% of its structure composed of irregular loops, which was justified by the structural disorder of this protein. The results of the active site investigation of NIa protein based on homologous sequences alignment and three-dimensional structure of the protein showed a highly conserved site which was included of histidine, aspartic acid and cysteine amino acids.

Keywords: Active site, Cloning, NIa protein, Viral infection, Wheat.

چکیده

ویروس موزاییک نواری گندم از مهم‌ترین آلودگی‌های گندم محسوب می‌شود که شیوع آن در ایران نیز رو به افزایش است. پروتئین NIa یکی از انواع پروتئین‌های حیاتی موجود در این ویروس است که دارای وظایف مهمی در همانندسازی، تکثیر و هضم پروتئولیتیک پلی پروتئین ویروسی می‌باشد. با توجه به نقش حیاتی پروتئین NIa در آلودگی ویروسی، هدف از مطالعه حاضر جداسازی، تعیین توالی و بررسی دقیق ساختار دوم و سوم این پروتئین بود. همچنین، آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال پروتئین NIa که می‌تواند به‌عنوان هدفی جهت طراحی و توسعه عوامل ضد ویروسی جدید استفاده شوند، مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، توالی ژنی کدکننده پروتئین NIa از ویروس موزاییک نواری گندم (WSMV) ایزوله میمه، جداسازی و پس از همسانه‌سازی در ناقل پروکاریوتی pEST تعیین توالی شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی MK335432 ثبت گردید. بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین NIa نشان داد که این پروتئین دارای 426 آمینواسید، وزن مولکولی 48/8 kD و نقطه ایزوالکتریک برابر با 8/81 می‌باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین NIa نشان داد که 53/29٪ از ساختار آن از لوپ‌های نامنظم تشکیل شده است، که این امر توجیهی برای وجود بی‌نظمی در ساختار این پروتئین بود. نتایج حاصل از بررسی جایگاه فعال پروتئین NIa براساس هم‌ردیفی توالی‌های همولوگ و همچنین ساختار سه‌بعدی پروتئین نشان داد که این جایگاه بسیار حفاظت شده و شامل سه آمینواسید هیستیدین، آسپارتیک اسید و سیستئین بود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی ویروسی، پروتئین NIa، جایگاه فعال، گندم، همسانه‌سازی.

در ایران وجود داشته‌اند. با این حال، با توجه به تغییر الگوی زراعی در سال‌های اخیر، بستر مناسب‌تری جهت گسترش ویروس و ناقلین آن فراهم آمده است. به همین دلیل در مزارع گندم ایران، شیوع بیماری و افزایش خسارات ناشی از این ویروس به مراتب بیش از گذشته مشاهده می‌شود و امکان تشدید آن در آینده نیز وجود دارد (Khadivar and Nasrollah, 2009).

ژنوم ویروس WSMV شامل یک مولکول RNA تک رشته‌ای و دارای 9348 نوکلئوتید می‌باشد که منجر به کدگذاری پلی‌پروتئینی با وزن مولکولی 340 تا 370 کیلودالتون و طول 3035 آمینواسید خواهد شد. این پلی‌پروتئین به واسطه سه پروتئین P1، HC-Pro، و NIa⁴ کدشده توسط ویروس پردازش شده و به 10 پروتئین بالغ تبدیل می‌شود (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). پروتئین‌های حاصل شامل P1، HC-Pro، P3، CP، NIb، NIa، 6K2، CI، 6K1، PIPO می‌باشند (Singh *et al.*, 2018). پروتئین NIa، یک سیستم تعیین کننده در ژنوم ویروس است. این پروتئین از دو دمین⁵ (VPg) در انتهای آمینی و پروتئاز (Pro) در انتهای کربوکسیلی پروتئین تشکیل شده است (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). پروتئین NIa به‌عنوان یک پروتئین چند کاره در فرایندهای مولکولی نسخه‌برداری و ترجمه ژنوم ویروس، انتقال و به‌کارگیری فاکتور شروع ترجمه میزبان (eIF4E) ایفای نقش می‌کند (Mertinez *et al.*, 2016). این پروتئین به‌عنوان یکی از مهمترین پروتئین‌های ویروس WSMV لحاظ شده، که با هضم دیگر پروتئین‌های ویروسی، منجر به ایجاد 10 پروتئین فعال می‌شوند. دمین VPg پروتئین NIa، از نقش کلیدی در همانندسازی و تکثیر ویروس و

مقدمه

عوامل بیماری‌زای گیاهی منجر به از بین رفتن 10 تا 16 درصد از تولید محصولات در سطح جهانی می‌شوند. بیش از 700 نوع از این عوامل شناخته شده است که می‌توانند منجر به آسیب جدی به گیاهان آلوده شوند (Trebeck *et al.*, 2015). در این میان، شیوع آلودگی‌های ویروسی دارای اهمیت زیادی می‌باشد. بیماری‌های ویروسی، یک چالش اساسی برای کشاورزی قرن بیست و یک محسوب می‌شود که منجر به اثرات ناخواسته‌ای بر تولید غذا و اکوسیستم‌های طبیعی خواهند شد (Jones and Naidu, 2019).

بیماری‌های ویروسی، یکی از مهمترین موانع تولید گندم به‌شمار می‌روند (Teferi, 2015). از مهم‌ترین آلودگی‌های ویروسی در گندم، ویروس موزاییک نواری گندم¹ (WSMV) می‌باشد. ویروس WSMV متعلق به خانواده *Potyviridae* بوده و آلودگی زودهنگام به این ویروس منجر به کاهش شدید محصول خواهد شد. اغلب جوانه‌های آلوده به ویروس WSMV در زمان کمی از بین‌رفته و گیاهان آلوده به این ویروس دارای بذرهایی کوچک‌تری می‌باشند (Singh *et al.*, 2018). آلودگی ویروس WSMV منجر به کاهش زیست‌توده² ریشه و کارایی استفاده از آب می‌شود. این موضوع باعث ایجاد خطرات جدی در مناطق با محدودیت دسترسی به آب خواهد شد. کلروز و نکروز برگ و همچنین کاهش ظرفیت فتوسنتز گیاه از علائم آلودگی به این ویروس به‌شمار می‌روند (Hadi *et al.*, 2011). ناقل شناخته شده ویروس WSMV، کنه حلقوی گندم³ (WCM) می‌باشد که از آفات مهم محصولات کشاورزی است (Singh *et al.*, 2018). به‌نظر می‌رسد که این ویروس و ناقل آن از دیرباز

4. Nuclear Inclusion a
5. Domain

1. Wheat streak mosaic virus
2. Biomass
3. Wheat curl mite

ژاپن و با استفاده از آغازگرهای تصادفی 6 نوکلئوتیدی¹ ساخته شد.

همسانه‌سازی ژن *Nia* در ناقل pEST

یک جفت آغازگر اختصاصی (آغازگر رفت: 5'-TACCGTCGCATGAAGCGTAGT-3' و آغازگر برگشت:

5'-AGCCTTGAAGTTCTCCCCACAG-3') براساس توالی ژن *Nia* ویروس موزاییک نواری گندم (به شماره دسترسی AF511619.2) و با استفاده از نرم‌افزار Generunner طراحی شدند تا ناحیه حاوی توالی کدکننده ژن *Nia* به طول 1353 bp با روش PCR تکثیر شود. ترکیب واکنش 25 میکرولیتری حاوی 1 واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، 15 نانوگرم cDNA، 2/5 میکرولیتر بافر PCR (10X)، 0/75 میکرولیتر $MgCl_2$ (50 میلی‌مولار)، 0/5 میکرولیتر dNTP (10 میلی‌مولار)، 1 میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (10 پیکومولار) بود. واکنش PCR در 35 چرخه و هر چرخه شامل 45 ثانیه دمای واسرشتگی 94 درجه، 45 ثانیه دمای اتصال پرایمر 59 درجه و 90 ثانیه دمای تکثیر 72 درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR فوق به کمک روش الکتروفورز جداسازی شد و با استفاده از دستورالعمل کیت Zymoclean (شرکت Zymo Research، آلمان) از ژل خالص‌سازی شد تا در مراحل بعد جهت تکثیر اختصاصی ناحیه ORF ژن *Nia* به‌عنوان الگو استفاده شود.

همسانه‌سازی در ناقل pEST [O56] انجام شد. پلاسمید pEST، مشتقی از پلاسمید pET-23d (+)، شرکت Novagen، آلمان بود که نشانگرهای T7 و His به ترتیب از انتهای آمینی و کربوکسیلی آن حذف و نشانگر TST (Twin-strep-tag) به

تعیین اختصاصیت ژنوتیپ میزبان برخوردار است (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). ضمن این‌که فعالیت پروتئولیتیک موجود در ویروس WSMV، عموماً مربوط به دُمین پروتئاز پروتئین *Nia* است. این دُمین مسئول پردازش دو سوم از پلی پروتئین ویروسی در موقعیت‌های سیس و ترانس می‌باشد. *Nia-Pro* دارای فعالیت تنظیمی در ویروس بوده و به‌واسطه اتصال کووالانسی با RNA ویروسی، بر تکثیر و همانندسازی ویروس نیز مؤثر است (Riechmann *et al.*, 1992).

از آنجایی‌که پروتئین *Nia* دارای نقشی حیاتی در تکثیر و بیماری‌زایی ویروس WSMV می‌باشد، در مطالعه حاضر، جداسازی، تعیین توالی و بررسی ساختاری این پروتئین مدنظر قرار گرفت و به این منظور ویروس WSMV ایزوله میمه انتخاب شد. همچنین مطالعه ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و ساختار دوم و سوم پروتئین *Nia* از دیگر اهداف این تحقیق بود. علاوه بر این، آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال این پروتئین نیز بر اساس ساختار سه بعدی آن و همچنین هم‌ترازی توالی‌های همولوگ، تعیین شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های گندم مشکوک به آلودگی ویروس WSMV، دارای علائمی شامل کلروز برگ‌ها، از مزارع شهرستان میمه استان اصفهان جمع‌آوری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل ویروس موزاییک نواری گندم با استفاده از روش لیتیوم کلراید استخراج گردید (Rubio-Pina and Zapata-Perez, 2011). cDNA نیز با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت TAKARA

1. Random hexamer

بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، استخراج پلاسمید با استفاده از دستورالعمل کیت Miniprep (شرکت Thermo Fisher، آلمان) صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های نوترکیب، جهت ارزیابی به کمک روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1٪ در کنار نشانگر 1 کیلوبازی و پلاسمید خالص هضم نشده به‌عنوان کنترل، با ولتاژ 60 ولت بارگذاری شدند. با توجه به اینکه جهت اتصال پلاسمید و ژن *Nia*، از روش Gibson assembly استفاده شد، قطعه مورد نظر در جهت مطلوب در پلاسمید قرار گرفت، در نهایت جهت تأیید ادغام ژن مورد نظر در پلاسمید، توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب حاصل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Nia* انجام شد.

بررسی ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی پروتئین Nia
 خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین Nia از قبیل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک^۲ و اتم‌های سازنده آن توسط وب سرور ProtParam در سایت Expasy (Gasteiger *et al.*, 2005) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پایداری و نیمه‌عمر پروتئین در میزبان‌های مختلف بررسی شد.

بررسی ساختار دوم و سوم و آنالیز ساختاری پروتئین Nia

بررسی و پیشگویی ساختار دوم پروتئین Nia با استفاده از وب‌سرورهای PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) و PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) انجام شد. از آنجایی که ساختار سه‌بعدی همولوگی برای پروتئین Nia در دیتابیس پروتئین (PDB) یافت نشد، روش‌های مبتنی بر همولوژی جهت پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی این پروتئین کارآمد نبود. بنابراین، جهت پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین

انتهای کربوکسیلی آن اضافه شده بود. این وکتور به طول 1848 جفت باز و حاوی پروموتور و ترمیناتور T7 و دو جایگاه برش آنزیم *BsaI* می‌باشد. همچنین، نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین به این وکتور افزوده شده بود.

به‌منظور همسانه‌سازی، محصولات PCR حاوی ژن *Nia* حاصل از مرحله قبل، به‌کمک آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با نرم‌افزار NEBuilder assembly tool (<https://nebuilder.neb.com/>; New England Biolabs) مجدداً تکثیر شدند. این آغازگرها حاوی ناحیه همپوشان 24 نوکلئوتیدی با وکتور pEST (آغازگر رفت: 5'-actttaagaaggagatatacatgGGCAAAGCA GCACGCAAC-3' و آغازگر برگشت: 5'-gaattgaggatgactccatgcgctTTGCCAGCTA ACCAAGTCG-3') بودند. ناحیه همپوشان با وکتور در انتهای 5' هر آغازگر اضافه شده و توالی ژن هدف در انتهای 3' آغازگرها قرار گرفت. هضم پلاسمید pEST با آنزیم *BsaI* HF انجام شد و اتصال قطعه مورد نظر به پلاسمید با استفاده از دستورالعمل کیت Gibson assembly (شرکت New England Biolabs) صورت گرفت (Bordat *et al.*, 2015). در این روش، قطعات ژن تکثیر شده و پلاسمید برش یافته که دارای نواحی انتهایی همپوشان بودند، به مدت 1 ساعت و در دمای 50 درجه سانتیگراد همراه با مسترمیکس^۱ Gibson assembly (حاوی آنزیم‌های 5'-اگزونوکلاز، DNA پلی‌مراز و لیگاز) انکوبه شده و اتصال ژن *Nia* به پلاسمید انجام شد.

ترانسفورماسیون پلاسمیدهای نوترکیب در باکتری *E. coli* سویه DH5 α و با روش الکتروپوریشن انجام شد. به دنبال رشد کلونی‌های نوترکیب روی محیط انتخابی حاوی 100 میکروگرم

2. PI

1. Master mix

و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، منجر به تکثیر قطعه‌ای شامل ژن *Nia* به طول 1353 جفت باز شد (شکل 1-A). همسانه‌سازی محصولات PCR حاوی ژن *Nia* در ناقل pEST انجام شد. الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب استخراج‌شده در کنار پلاسمید خالص هضم نشده به‌عنوان کنترل نشان داد که ژن *Nia* با جهت صحیح (با توجه به استفاده از روش Gibson assembly) در ناقل مربوطه همسانه‌سازی شده است. همان‌گونه که در شکل 1-B نشان داده شده است پلاسمید نوترکیب دارای قطعه موردنظر، از اندازه بزرگ‌تری در مقایسه با پلاسمید خالص هضم‌نشده برخوردار بود. روش Gibson assembly، یک روش کارآمد جهت اتصال قطعات با اندازه‌های مختلف و بدون نیاز به ایجاد جایگاه برش در ژن هدف می‌باشد. همچنین، با استفاده از این روش، اتصال قطعه موردنظر در جهت مطلوب به پلاسمید صورت می‌گیرد (Bordat *et al.*, 2015). نتایج توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Nia*، تولید سازه صحیح pEST-*Nia* را تأیید کرد. لازم به‌ذکر است ساخت این سازه، به‌منظور بیان، خالص‌سازی و بررسی عملکرد پروتئین *Nia* در مطالعات بعدی انجام شد.

توالی نوکلئوتیدی ژن *Nia* مربوط به ویروس موزاییک نواری گندم ایزوله میمه با استفاده از روش‌های بررسی همولوژی BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) تأیید شد و در پایگاه داده GenBank با شماره دسترسی MK335432 ثبت گردید (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) (MK335432). نتایج این بخش نشان داد که توالی حاصل دارای حداقل 8/73 درصد تفاوت در سطح DNA، با دیگر ایزوله‌های ثبت‌شده در پایگاه داده GenBank (از جمله ایزوله ایران، سعادت شهر با شماره دسترسی EU91414918) بود.

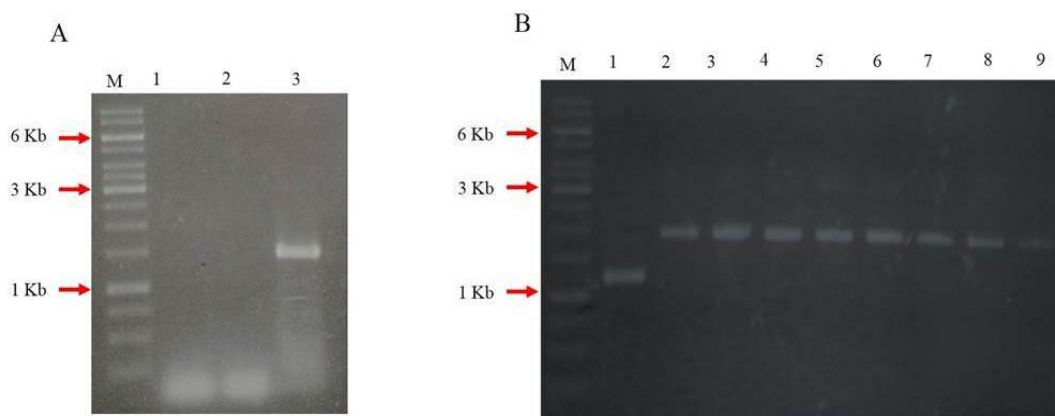
Nia از روش بندکشی¹ و وب‌سرور I-TASSER (Roy *et al.*, 2000) استفاده شد. پروتئین مدل‌سازی شده از نظر انرژی توسط وب‌سرور ModRefiner (Dong and Zhang, 2011) بهینه‌سازی شد و جهت نمایش شکل سه‌بعدی پروتئین از نرم‌افزار YASARA استفاده شد. مقایسه کیفیت و پارامترهای ساختاری پروتئین مدل‌شده قبل و پس از بهینه‌سازی انرژی، به واسطه رسم نمودار رامچاندرا و توسط وب‌سرور PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) انجام شد. پیش‌بینی مکان اتصال پروتئین با لیگاند و جایگاه فعال آن، با استفاده از وب‌سرورهای I-TASSER و COACH و به واسطه مقایسه پروتئین *Nia* با پروتئین‌های موجود در پایگاه داده BioLip صورت گرفت. بررسی جایگاه فعال دمین پروتئین *Nia* به واسطه هم‌ردیفی چندگانه توالی پروتئین *Nia* ویروس موزاییک نواری گندم ایزوله میمه، ایران با چندین ایزوله دیگر از مناطق مختلف و به کمک نرم‌افزار CLC Main Workbench انجام شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر پس از تکثیر و همسانه‌سازی ژن *Nia* ویروس WSMV متعلق به مزارع گندم منطقه میمه اصفهان، تعیین توالی و بررسی ساختاری پروتئین مربوطه انجام شد و به کمک نرم‌افزارها و سرورهای مختلف به تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و همچنین شناسایی اسیدهای آمینه مهم در عملکرد این پروتئین پرداخته شد.

جداسازی و همسانه‌سازی ژن *Nia* واکنش PCR بر روی cDNA حاصل از بافت برگ‌های گندم آلوده به ویروس موزاییک نواری گندم

1. Threading



شکل 1. بررسی مولکولی ژن کدکننده *Nia* جداسازی شده از ویروس موزاییک نواری گندم ایزوله میمه. (A) الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه *Nia* بر روی ژل آگارز 1 درصد. چاهک (M) نشانگر وزن مولکولی 1 Kb، چاهک 1 و 2 کنترل منفی، چاهک 3 محصول PCR حاوی ژن *Nia* دارای وزن مولکولی 1353 جفت‌باز. (B) الکتروفورز پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده حاوی قطعه *Nia*. چاهک (M) نشانگر وزن مولکولی 1 Kb، چاهک 1 پلاسمید خالص هضم نشده به‌عنوان کنترل، چاهک‌های 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8 و 9 پلاسمیدهای pEST نو ترکیب حاوی ژن *Nia*.

شده و دارای وزن مولکولی 48/87 کیلوالتون می‌باشد. براساس الگوریتم‌های ProParam، PI این پروتئین 8/81 بود. نقطه ایزوالکتریک، نقطه ای از pH است که در آن بار الکتریکی برابر با صفر است. اطلاع از نقطه ایزوالکتریک یک پروتئین جهت انتخاب روش مناسب برای خالص‌سازی پروتئین و الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ بسیار مفید است (Ziarani *et al.*, 2017). پروتئینی که شاخص ناپایداری آن کمتر از 40 باشد، به‌عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته می‌شود (Darabi *et al.*, 2017). شاخص ناپایداری پروتئین *Nia* محاسبه شده در سرور ProtParam برابر با 32/34 بود، که این پروتئین را در دسته پروتئین‌های پایدار قرار می‌دهد. نیمه‌عمر پروتئین *Nia* در صورتی که ناحیه انتهایی آمینی¹ آن گلیسین باشد نیز در میزبان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نیمه‌عمر پروتئین عبارت است از مدت زمانی که طول می‌کشد تا نصف مقدار پروتئین بعد از سنتز در داخل سلول ناپدید شود (Ghazi and Haddadi, 2018). نیمه‌عمر این

این تفاوت در سطح پروتئین نیز به 1 درصد رسید که قابل چشم‌پوشی نبوده و لزوم مطالعات ساختاری بیشتری را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل، ویروس مطالعه شده در تحقیق حاضر احتمالاً ایزوله جدیدی را معرفی می‌نماید. این‌گونه تغییرات و به‌عبارت دیگر پلی‌مورفیسم‌های ژنی می‌تواند به‌واسطه دو امر مهم توجه شود: (1) سیر جهش‌هایی هدفمند که احتمالاً به سازش‌پذیری ویروس با شرایط محیطی و آب‌وهوایی برمی‌گردد و (2) تغییراتی که باید در ناقل آن و به شکل دقیق‌تر در گیرنده‌های دهانی کنه حلقوی گندم در منطقه مورد مطالعه، جستجو کرد. بنابراین، تغییرات ژنتیکی و به‌تبع آن پروتئینی، می‌توانند منجر به افزایش احتمال آلودگی به ویروس در مناطقی شوند که هنوز گزارشی مبنی بر آلودگی در آن‌ها داده نشده است (Nigam *et al.*, 2019). این امر، لزوم مطالعه بیشتر در زمینه تکامل همراستای ناقل و عامل بیماری‌زا را در برنامه‌های مبارزه با آفات نشان می‌دهد.

تعیین ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی پروتئین *Nia*
بررسی ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی پروتئین *Nia* نشان داد که این پروتئین از 426 آمینواسید تشکیل

1. N-terminal

بی‌نظمی یکی از ویژگی‌های معمول در ساختار انواع زیادی از پروتئین‌ها می‌باشد (Radivojac *et al.*, 2007). این ویژگی در میان پروتئین‌های درگیر در تنظیم رونویسی و انتقال سیگنال نیز وجود دارد (Rantalainen *et al.*, 2008).

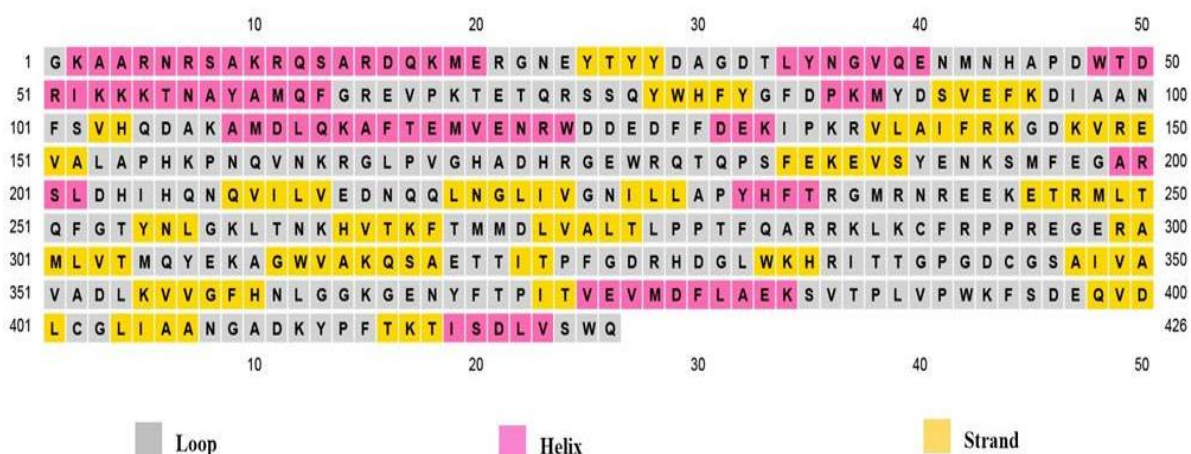
پروتئین‌های دارای ساختار بی‌نظم قادر به تشکیل ساختار سه بعدی منحصربه‌فرد در شرایط فیزیولوژیک نیستند (Charon *et al.*, 2017). بنابراین به دلیل وجود این بی‌نظمی‌ها در ساختار دمین VPg، ساختار سه‌بعدی از این دمین در پایگاه داده پروتئینی (PDB) وجود نداشت. بر همین اساس، روش‌های مدل‌سازی مبتنی بر همولوژی جهت مدل‌سازی پروتئین NIa مناسب نبود و از سرور I-TASSER جهت مدل‌سازی پروتئین استفاده شد. وب‌سرور I-TASSER تعداد 10 الگوی دارای بیشترین میزان Z-Score را شناسایی کرد. هم‌ترازی با یک $Z\text{-score} > 1$ به معنای یک هم‌ترازی خوب می‌باشد (جدول 3). در نهایت، این وب‌سرور براساس الگوهای شناسایی‌شده 5 مدل برای پروتئین NIa پیشنهاد نمود که بهترین مدل براساس C-score و TM score انتخاب شد (شکل 3).

پروتئین در سلول‌های پستانداران و در شرایط این‌ویتر 30 ساعت، در سلول‌های مخمر در شرایط این‌ویوو، بیش از 20 ساعت و در سلول‌های *E. coli* در شرایط این‌ویوو، بیش از 10 ساعت برآورد شد. در صورتی که بتوان نیمه عمر نسبتاً بالای این پروتئین را به سایر پروتئین‌های ویروس تعمیم داد، این نتیجه حاصل خواهد شد که ویروس مورد مطالعه می‌تواند با شرایط بسیار متنوع آب‌وهوایی، بقای خود را تضمین نماید.

مطالعه ساختاری پروتئین NIa

نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین در شکل 2 نشان داده شده است. این ساختار دارای 17/84٪ آلفا هلیکس، 28/87٪ صفحات بتا و 53/29٪ لوپ بود.

لوپ‌ها در مناطقی از پروتئین ایجاد می‌شوند که پروتئین در این مناطق دارای بی‌نظمی ذاتی می‌باشد. حضور 53/29٪ لوپ در ساختار پروتئین NIa توجیهی برای وجود بی‌نظمی در ساختار این پروتئین است (Malkov *et al.*, 2005). ساختار طبیعی دمین VPg در خانواده *Potyvirus* دارای بی‌نظمی فراوانی می‌باشد.



شکل 2. ساختار دوم پیش‌بینی‌شده پروتئین NIa

1. Disordered proteins
2. Protein Data Bank

می‌باشد (Satheshkumar *et al.*, 2005). همچنین یافته‌های حاصل از پیش‌بینی‌های ساختاری نشان داده‌اند که میزان بی‌نظمی‌های ساختاری در دمین VPg در ویروس Y سیب‌زمینی^۲ می‌تواند بیش از 70 درصد باشد (Hafren and Makinen, 2008). بنابراین، به نظر می‌رسد که بی‌نظمی ساختاری یک ویژگی مشترک در میان تمام دمین‌های VPg پروتئین NIa موجود در خانواده *Potyviridae* است (Rantalainen *et al.*, 2008).

ارزیابی کیفیت پروتئین مدل‌سازی شده

میزان انرژی پروتئین با استفاده از وب‌سرور ModRefiner از -116808 kJ/mol به -146679 kJ/mol کاهش یافت. نتایج بررسی کیفیت پروتئین NIa قبل و پس از بهینه‌سازی انرژی، به واسطه رسم نمودار رامچاندرا^۳ و به ترتیب در شکل‌های 4-A و 4-B نشان داده شده است. نمودار رامچاندرا^۳ یک روش بسیار پرکاربرد جهت پلات زوایای چرخشی پروتئین و ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی^۳ ساختار مدل‌سازی شده می‌باشد. این نمودار با محاسبه درصد آمینواسیدهای قرار گرفته در نواحی مطلوب و مجاز و غیرمجاز، کیفیت مدل ورودی را تعیین می‌کند (Gadhe *et al.*, 2015).

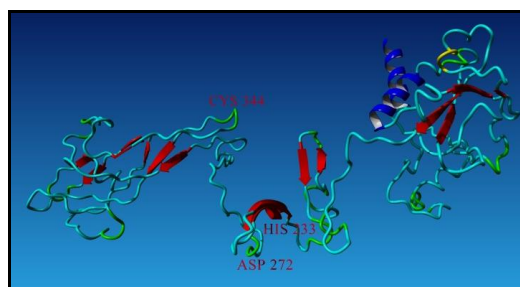
مطابق نتایج حاصل از این مطالعه، پروتئین مدل‌سازی شده قبل از بهینه‌سازی انرژی دارای مجموعاً 97/7٪ آمینواسید در مناطق مطلوب و مجاز و 2/3٪ آمینواسید در مناطق غیرمجاز بود. در حالی که، بهینه‌سازی انرژی منجر به افزایش مناطق مطلوب و مجاز آمینواسیدی پروتئین تا میزان 99/3٪ (76/7 درصد مناطق مطلوب و 22/6 مناطق مجاز) و کاهش مناطق غیرمجاز آمینواسیدی آن تا میزان 0/7٪ شد. مناطق غیرمجاز پروتئین مدل‌سازی شده پس از

جدول 3. الگوهای شناسایی شده توسط وب‌سرور

ITASSER جهت مدل‌سازی پروتئین NIa

شماره دسترسی الگو PDB	بافت	همپوشانی	Z-Score*
1q31A	0.22	0.52	1.54
3jc8Q	0.11	0.86	1.26
1q31A	0.22	0.50	2.68
4qs4A	0.06	0.95	1.57
1lvmA	0.23	0.52	1.67
4uxeA	0.07	0.84	1.52
1q31	0.22	0.51	2.36
1q31	0.23	0.52	1.98
1q31A	0.22	0.51	2.29
1q31	0.23	0.50	4.31

* شاخص Z-Score نشان‌دهنده سطح اطمینان الگوهای شناسایی شده بوده و میزان $Z\text{-Score} > 1$ قابل قبول می‌باشد.



شکل 3. ساختار سه بعدی پروتئین NIa مدل‌سازی شده توسط وب‌سرور ITASSER. آمینواسیدهای هیستیدین (233)، آسپارتیک‌اسید (272) و سیستئین (344) نشان‌دهنده آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال دمین پروتئین این پروتئین می‌باشند.

بی‌نظمی ذاتی در ساختار پروتئین‌ها یک توضیح احتمالی برای کم بودن تعداد ساختارهای پروتئینی در مقایسه با تعداد زیاد کاربرد آنها است. ویروس‌ها دارای تعدادی محدودی پروتئین می‌باشند. پردازش پلی پروتئین‌های ویروسی و تغییرات پس از ترجمه یک راهکار عالی جهت گسترش ساختارهای پروتئینی در ویروس‌ها است. با توجه به مشاهدات Satheshkumar *et al.* (2005)، بی‌نظمی ذاتی در دمین VPg ویروس موزاییک سزبانی^۱ دارای نقش مهمی در هضم پروتئولیتیک پلی پروتئین ویروسی

2. Potato Y virus
3. Stereochemistry

1. Sesbania mosaic virus

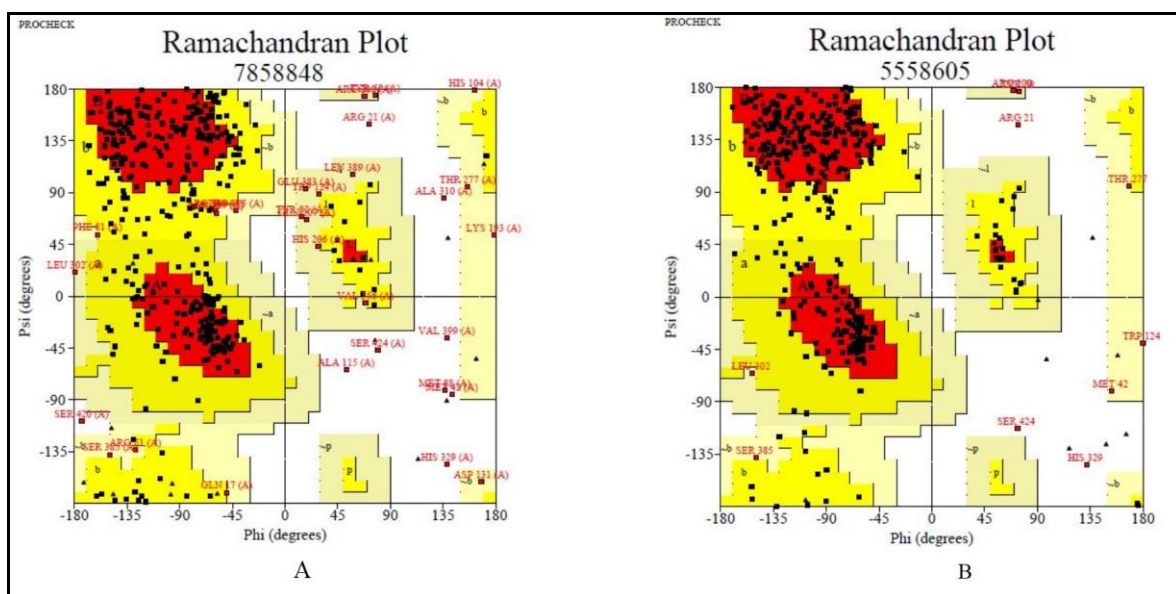
دمین در موقعیت‌های آمینواسیدی 272، 233 و 344 پروتئین N1a قرار دارد (Adams *et al.*, 2005). به منظور بررسی و مقایسه جایگاه فعال دمین پروتئاز پروتئین N1a، از هم‌ردیفی توالی‌های این پروتئین در ایزوله‌های مناطق مختلف جغرافیایی استفاده شد. نتایج در این بخش (شکل 5) نشان داد که آمینواسیدهای موجود در این جایگاه شامل هیستیدین در موقعیت 233، آسپارتیک‌اسید در موقعیت 272 و سیستئین در موقعیت 344 بود.

آمینواسیدهای موجود در این جایگاه به میزان زیادی حفاظت شده بودند و تنها تفاوت مشاهده شده مربوط به ایزوله اتریش بود که در موقعیت 272 دارای آمینواسید گلايسين به جای آسپارتیک‌اسید بود. با توجه به مشاهدات Hosseini and Saidi (2019)، تغییرات توالی در موتیف‌های کاملاً حفاظت‌شده، هنگام شکل‌گیری گونه‌های جدید ایجاد می‌شود. با این حال، مطابق یافته‌های Guo *et al.* (2011)، دمین پروتئاز در اغلب ویروس‌های موجود در خانواده *Potyviridae* حفاظت شده است، که این گزارش‌ها نتایج تحقیق حاضر را نیز تأیید می‌نمایند.

بهینه‌سازی انرژی، شامل آمینواسیدهای آرژنین در موقعیت 21، سرین در موقعیت 424 (در انتهای کربوکسیلی پروتئین) و هیستیدین در موقعیت 329 بود که هیچ‌کدام از این آمینواسیدها در جایگاه اتصال پروتئین با لیگاند قرار نداشت. بنابراین، بهینه‌سازی انرژی منجر به بهبود کیفیت پروتئین مدل‌سازی شده در مطالعه حاضر شد. بهینه‌سازی انرژی یک مرحله مهم در مدل‌سازی پروتئین‌ها می‌باشد. کاهش انرژی ساختارهای پروتئینی مدل‌سازی شده، منجر به ایجاد ساختارهایی با پایداری بیشتر می‌گردد (Gadhe *et al.*, 2015).

بررسی جایگاه فعال دمین پروتئاز پروتئین N1a بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های همولوگ

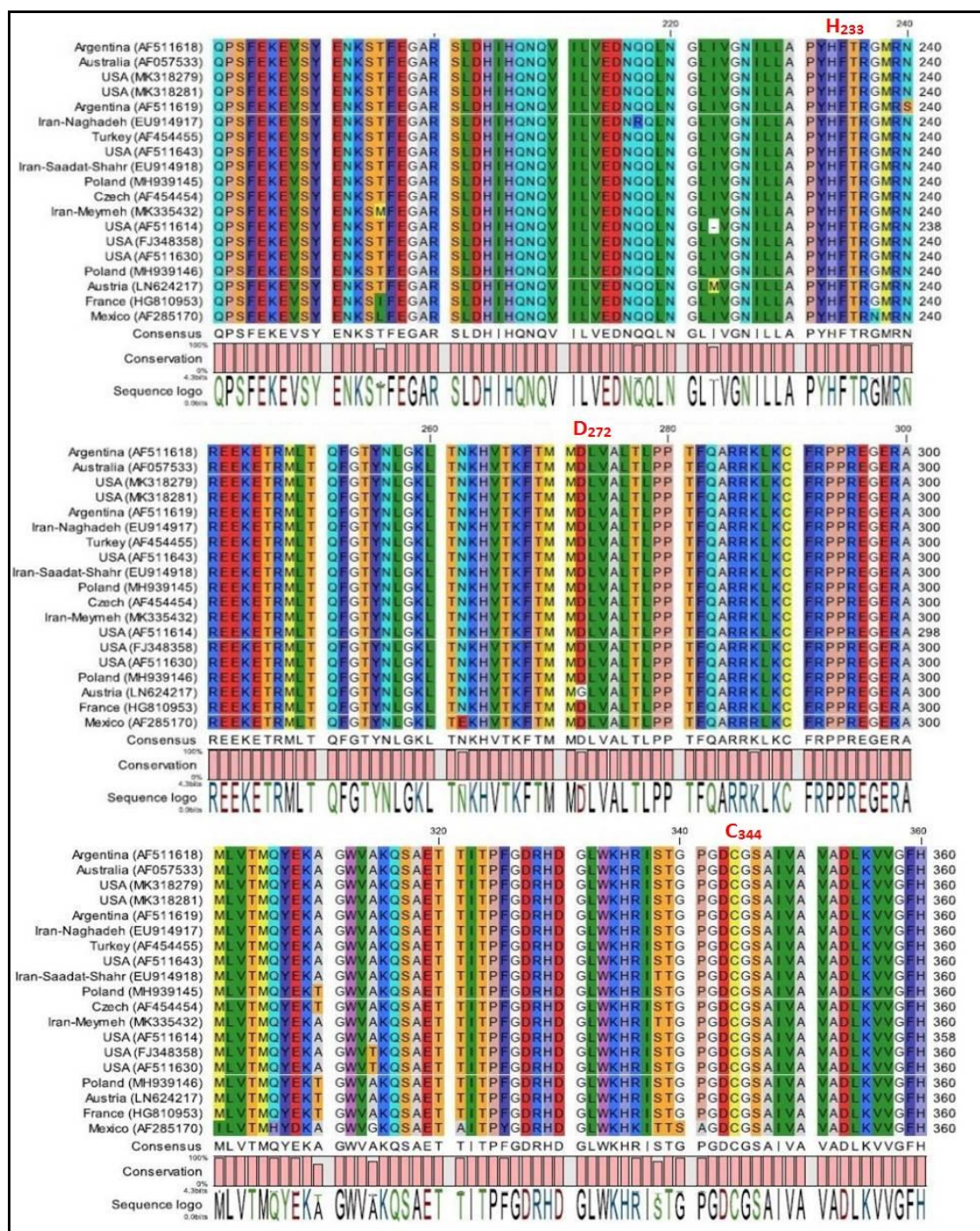
پروتئازهای ایجادشده توسط ویروس‌های گیاهی عموماً در دو گروه سرین پروتئازها و سیستئین پروتئازها قرار می‌گیرند (Mann and Sanfacon, 2019). دمین پروتئاز پروتئین N1a دارای موتیف‌های ساختاری مشابه سرین پروتئازهای یوکاریوت‌ها است، درحالی‌که دارای یک آمینواسید سیستئین در جایگاه فعال خود می‌باشد. بنابراین، این پروتئازها در گروه سیستئین پروتئازها قرار می‌گیرند. جایگاه فعال این



شکل 4. ارزیابی کیفیت پروتئین N1a مدل‌سازی شده. (A) نمودار رامانچاندرا پروتئین N1a مدل‌سازی شده قبل و (B) پس از بهینه‌سازی انرژی

جداسازی دو دمین Pro و VPg در پروتئین NIa می‌شود (Adams *et al.*, 2005). دمین پروتئاز پروتئین NIa، به میزان زیادی در بیوتکنولوژی و جهت حذف نشانگرها از پروتئین‌های نو ترکیب استفاده می‌شود (Jebasingh *et al.*, 2012).

آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال پروتئین NIa و نقش آن در تکثیر ویروسی مشابه پروتئیناز موجود در Picornavirus است (Mathur *et al.*, 2012). این دمین، علاوه بر پردازش پلی‌پپتید ویروسی، دارای فعالیت خودبرشی نیز بوده و منجر به



شکل 5. مقایسه جایگاه فعال (His 233, Asp 272, Cys 344) دمین پروتئاز پروتئین NIa در ایزوله‌های مناطق مختلف جغرافیایی

توالی قرار گرفت. نتایج حاصل از تعیین ساختار دوم و سوم این پروتئین، حضور 53/29% لوپ و بی‌نظمی فراوانی را در ساختار آن نشان داد. این بی‌نظمی یک ویژگی مشترک در میان تمام پروتئین‌های NIa موجود در خانواده *Potyviridae* بود. مقایسه جایگاه فعال پروتئین NIa در میان توالی‌های همولوگ، نشان داد که این جایگاه شامل سه آمینواسید حفاظت‌شده هیستیدین (233)، آسپارتیک اسید (272) و سیستئین (344) بود. این نتایج در توافق با نتایج حاصل از پیشگویی جایگاه اتصال پروتئین با لیگاند، براساس ساختار سوم آن بود. در نهایت، با توجه به حفاظت‌شدگی ناحیه عملکردی یا جایگاه فعال پروتئین NIa، می‌توان با هدف قراردادن این جایگاه در سطح مولکولی (با استفاده از ترکیبات ضد ویروسی جدید) به توسعه روش‌های کنترل بیماری ویروسی موزاییک نواری گندم کمک کرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه‌های زابل و شهرکرد که از تحقیق حاضر حمایت کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

بررسی جایگاه فعال پروتئین براساس ساختار سه بعدی آن

جایگاه آمینواسیدهای درگیر در اتصال با لیگاند توسط سرور I-TASSER و به‌واسطه مقایسه پروتئین مدل‌سازی‌شده با پروتئین‌های موجود در پایگاه داده BioLip پیشگویی شد. این جایگاه در پروتئین مدل‌سازی‌شده شامل سه آمینواسید هیستیدین در موقعیت 233، آسپارتیک اسید در موقعیت 272 و سیستئین در موقعیت 344 بود. این آمینواسیدها مربوط به جایگاه فعال دمین پروتئاز پروتئین NIa می‌باشند (Adams *et al.*, 2005). جنبه‌های مختلفی از ویروس‌ها مانند استراتژی‌های تکثیر، نسخه‌برداری معکوس و ترجمه، اهداف بالقوه‌ای جهت هدف قرار دادن آن‌ها به‌واسطه ترکیبات ضد ویروسی است. درحالی‌که تعدادی از ویروس‌ها وابسته به پلی‌مرازها، پروتئازها و دیگر آنزیم‌های حیاتی میزبان هستند، تعدادی از آن‌ها دارای آنزیم‌های کدشده ویروسی می‌باشند و ممانعت این‌گونه آنزیم‌ها، استراتژی کلیدی برای ممانعت از آلودگی‌های ویروسی می‌باشد (Mishra *et al.*, 2013).

در این مطالعه توالی کامل ژن *Nia* ویروس WSMV ایزوله ایرانی میمه برای اولین بار، تعیین و همسانه‌سازی شد و مورد بررسی دقیق ساختاری و

REFERENCES

- Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage site in the family Potyviridae. *Mol. Plant. Pathol.* 6: 471-487.
- Bordat A, Houvenaghel MC, German-Retana S (2015) Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virol. J.* doi: 10.1186/s12985-015-0315-3
- Charon J, Barra A, Walter J, Millot P, Moury B, Michon T (2017) First experimental assessment of protein intrinsic disorder involvement in an RNA virus natural adaptive process. *Mol. Biol. Evol.* 35: 38-49.
- Darabi M, Seddigh S, Abarshahr M (2017) Structural, functional and phylogenetic studies of cytochrome P450 enzyme in seed plants by bioinformatics tools. *Caryologia.* 70: 62-76.
- Dong X, Zhang Y (2011) Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys. J.* 101: 2525-2534.

- Gadhe CG, Balupuri A, Cho SJ (2015) In-silico characterization of binding mode of CCR8 inhibitor: homology modeling, docking and membrane based MD simulation study. *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 33: 2492-510.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker a, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools in the *ExPASy* server. *The Proteomics Protocol Handbook.* 571-607.
- Ghazi Y, Haddadi F (2018) Bioinformatics analysis of IFN receptor protein to counteract the effect of VP35 antagonist protein of Ebola virus. *Gen. Eng. BSA.* 2: 37-52.
- Guo B, Lin J, Ye K (2011) Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *J. Biol. Chem.* 24: 21937-21943.
- Hadi BA, Lengham MAC, Osborne L, Tilmon KJ (2011) Wheat streak mosaic virus on wheat: Biology and management. *J. Integr. Pest. Manag.* 2: J1-J5.
- Hafren A, Makinen K (2008) Purification of viral genome-linked protein VPg from potato virus A-infected plants reveals several post-translationally modified forms of the protein. *J. Gen. Virol.* 89: 1509-1518.
- Hosseini M, Saidi A (2019) Phylogenetic and structural study of plant polyamine oxidases. *Crop Biotech.* 8: 19-36.
- Jebasingh T, Pandaranayaka E, Mahalakshmi A, Yadunandam A, Krishnaswamy S, Usha R (2012) Expression, purification and molecular modeling of the NIa protease of Cardamom mosaic virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 31: 602-11.
- Jones R, Naidu RA (2019) Global dimensions of plant virus diseases: current status and future perspectives. *Annu. Rev. Virol.* 6: 20-23.
- Khadivar R, Nasrollah Nezhad S (2009) Serological and molecular tracking of Wheat streak mosaic virus in cereal fields of Guilan province. *J. Crop. Prod. Res.* 16: 137-148.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* 26: 283-291.
- Malkov S, Zivkovic MV, Beljanski MV, Zanic SD (2005) Correlation of amino acids with secondary structure types: connection with amino acid structure. *arXiv preprint q-bio/0505046*
- Mann K, Sanfacon H (2019) Expanding repertoire of plant positive-strand RNA virus proteases. *Virus.* doi: 10.3390/v11010066
- Martinez F, Rodrigo G, Aragonés V, Ruiz M, Lodewijk I, Fernandez U, Elena S, Daros JA (2016) Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. *BMC. Genomics.* doi: 10.1186/s12864-016-2394-y
- Mathur C, Jimsheena VK, Banerjee S, Makinen K, Gowda LR, Savithri HS (2012) Functional regulation of PVBV nuclear inclusion protein-a protease activity upon interaction with viral protein genome-linked and phosphorylation. *Virol.* 422: 254-264.
- McGuffin L, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinform.* 16: 404-405.
- Mishra KP, Sharma N, Diwaker D, Ganju L, Singh SB (2013) Plant derived antivirals: A potential source of drug development. *J. Virol. Antiviral Res.* doi: org/10.4172/2324-8955.1000109
- Nigam D, Latourrette K, Souza P, Garcia-Ruiz H (2019) Genome-wide variation in potyviruses. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.01439
- Radivojac P, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Obradovic Z, Uversky VN, Dunker AK (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophys. J.* 92: 1439-1456.
- Rantalainen KI, Uversky VN, Permi P,

- Kalkkinen N, Dunker AK, Makinen K (2008) Potato virus A genome-linked protein VPg is an intrinsically disordered molten globule-like protein with a hydrophobic core. *Viol.* 377: 280-288.
- Riechmann JL, Cervera MT, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The PredictProtein server. *Nucleic. Acids. Res.* 32: 321-326.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2000) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5: 725-738.
- Rubio-Pina JA, Zapata-Perez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electron. J. Biotechn.* 14: 1-8.
- Satheshkumar PS, Gayathri P, Prasad K, Savithri HS (2005) Natively unfolded VPg is essential for Sesbania mosaic virus serine protease activity. *J. Biol. Chem.* 280: 30291-30300.
- Singh K, Wegulo SN, Skoracka A, Kundu JK (2018) Wheat streak mosaic virus: a century old virus with rising importance worldwide. *Mol. Plant. Pathol.* doi: 10.1111/mpp.12683
- Teferi TA (2015) Wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) epidemics and host plant response in South Tigray, Ethiopia. *Int. J. Plant. Pathol.* 6: 21-28.
- Trebick P, Nancarrow N, Cole E, Bosque-Perez NA, Constable FE, Freeman AJ, Rodoni B, Yen A, Luck J, Fitzgerald G (2015) Virus disease in wheat predicted to increase with a changing climate. *Glob. Change. Biol.* 21:3511-3519.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus. Res.* 74: 157-175.
- Ziarani MF, Tohidfar M, Aminfar Z (2017) Bioinformatic analysis of Acyl Carrier Protein (ACP) in eukaryotes and prokaryotes. *Crop. Biotech.* 17: 15-29.