

## تغییرات پروتئوم یونجه در برابر تنش ناشی از تغذیه شته‌خالداری یونجه

### *Therioaphis trifolii* Monell به کمک تکنیک الکتروفورز دوبعدی

مهدی کاکایی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۷

تاریخ تصویب: ۹۶/۱۲/۱۱

#### چکیده

شته‌خالداری یونجه با نام علمی *Therioaphis trifolii* از جمله آفات مهم یونجه می‌باشد. به منظور بررسی پاسخ پروتئوم یونجه نسبت به تغذیه این شته، نمونه برداری از یونجه (ژنوتیپ همدانی) تحت تغذیه و شاهد صورت گرفت. تجزیه و تحلیل پروتئوم بافت برگ، ۲۰۸ لکه پروتئینی قابل تشخیص در رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی، شناسایی نمود. از این میان بر اساس آزمون t 16 لکه در سطح احتمال یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار (p < 0.01) بودند. لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار، بر اساس نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی در بانک‌های اطلاعاتی مورد جستجو قرار گرفته و پروتئین‌های احتمالی پاسخ‌دهنده به شرایط تنش آفت شناسایی شدند. دسته‌بندی پروتئین‌های مورد شناسایی بر اساس گروه‌های عملکردی نشان داد که بیشترین مقدار بیان در پروتئین‌هایی بوده که نسبت به تنش تغییر بیان داشته‌اند. دی‌سولفیدایزومراز، آلدهیددهیدروژناز، پروتئین‌های شوک حرارتی، پلی‌فنل‌اکسیداز و پروکسی‌ردوکسین از جمله این پروتئین‌ها بودند. این موضوع نشان از تکاپوی گیاه یونجه در سطح بیان پروتئین‌ها برای ایجاد مقاومت در برابر آفت شته‌خالداری دارد.

**واژه‌های کلیدی:** الکتروفورز دوبعدی، شته‌خالداری، یونجه.

#### مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از محصولات اصلی و مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای محسوب می‌شود که دارای مقدار قابل توجهی پروتئین، کلسیم، فسفر و ویتامین آ و دی می‌باشد (Nuernberg et al., 1992; Walton, 1983). آفات متعدد و زیادی به این گیاه آسیب وارد می‌کنند (تکلوزاده و همکاران، ۱۳۹۲). در میان آفات یونجه، شته‌ها دارای اهمیت هستند و به نظر می‌رسد خسارت آنها هم‌سطح سایر آفات، نظیر سرخرطومی برگ یونجه، باشد و می‌توانند در کاهش محصول یونجه نقش مهمی داشته باشند (رسولیان، ۱۳۶۸). یونجه میزبان اصلی آفت شته‌خالداری (*Therioaphis trifolii* Monell (Homoptera: Aphididae))، می‌باشد، هر چند روی گیاهان دیگر، از جمله شبدر، نیز مشاهده می‌گردد. گیاهان آلوده ابتدا زرد شده، سپس در اثر تداوم آلودگی و خسارت وارده به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. در هر صورت اگر جمعیت شته از ۲۰ عدد در هر ساقه تجاوز نماید، باید علیه آن مبارزه صورت گیرد (خانجانی، ۱۳۸۸). دیکسون (Dixon 1973)، اظهار نمود شته‌ها هنگام تغذیه مقداری شیره نباتی را از گیاه می‌مکنند. این حشرات با خوردن شیره نباتی، مواد پروتئینی گیاه را کاهش می‌دهند و مواد قندی را به صورت عسلک دفع می‌کنند.

۱. استادیار دانشگاه پیام‌نور، بخش مهندسی کشاورزی (اصلاح نباتات و ژنتیک)

\* نویسنده مسئول: (Mehdikakaei37@gmail.com & M\_Kakaei@pnu.ac.ir)

نمایند. این عمل سبب می‌شود عملیات فتوسنتز نیز در گیاه مختل گردد و در نتیجه وزن محصول و پروتئین یونجه کاهش پیدا کند. در واقع عسلک باعث به هم چسبیدن برگ‌ها و ایجاد آلودگی‌های قارچی در سطح برگ‌ها و گیاه می‌شود. بنابر اظهار روندلف (Rondolph 1957)، شته‌خالداری یونجه هنگام تغذیه از شیرۀ نباتی، توکسینی به داخل گیاه وارد می‌کند که سبب ریزش برگ‌ها می‌شود و در نتیجه میزان محصول کاهش می‌یابد. شته‌خالداری یونجه واکنش‌های سمی سختی را در بوته‌های حساس یونجه به علت کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها که از قسمت‌های پایین گیاه شروع می‌شود، ایجاد می‌نماید. این آفت تهدیدی جدی برای مزارع تازه کشت شده است؛ چرا که فراوانی فصلی آن از مرداد تا مهرماه در حداکثر مقدار است. از طرف دیگر، احتمال از بین بردن مزارع تازه کشت شده حتی در وارسته‌های مقاوم وجود دارد (کاکایی و مظاهری‌لقب، ۱۳۹۴).

شناخت و استفاده از توانایی دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی دارای اهمیت است. مظاهری‌لقب و باقری (۱۳۸۵) در بررسی ساپونین‌های استخراجی از گیاهچه‌های چهار رقم یونجه و تأثیر تغذیه شته‌خالداری یونجه روی این ارقام، ابراز داشتند که ساپونین‌ها در ایجاد مقاومت این ارقام نسبت به شته‌خالداری یونجه نمی‌توانند نقشی داشته باشند. این موضوع نقش متابولیت‌های اولیه‌ای همچون پروتئین‌ها را برای ارزیابی، بارزتر می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای روی گیاه یونجه، Silva و همکاران (۲۰۰۶)، برخی ارقام مقاوم و حساس یونجه را از دیدگاه سازوکار آنتی‌بیوز نسبت به شته‌خالداری یونجه مطالعه کردند.

الکتروفورز دوبعدی ژل پلی‌اکریل‌آمید (2D-PAGE) یک ابزار پروتئومیکسی مفید است که در آن پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric Point) در بُعد اول و پس از آن بر اساس وزن ملکولی آنها در بُعد دوم جدا می‌شوند و به طور گسترده‌ای به مطالعه عملکرد سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی موجودات زنده می‌پردازد (Natarajan *et al.*, 2013). امروزه با گسترش تکنیک‌هایی چون ژل الکتروفورز دوبعدی امکان آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر گردیده است. پروتئومیکس دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل پروتئین‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند (Gygi *et al.*, 2000). در واقع پروتئومیکس یک روش کارآمد برای بررسی تغییرات پروفایل پروتئینی ناشی از تنش‌های مختلف می‌باشد (Natarajan *et al.*, 2013). الکتروفورز دوبعدی در خصوص مطالعات تنش، هم به صورت زنده و هم به صورت غیرزنده، در گیاهان مختلف، از جمله برنج (سلطانی و حسینی‌سالکده ۱۳۹۲)، گیاه آلوروپوس (نصیری و همکاران ۱۳۹۱)، جو بهاره (ولی‌زاده کامران و همکاران ۱۳۹۴) و یونجه (کاکایی ۱۳۹۴)، مورد مطالعه قرار گرفته است. در خصوص این موضوع، Li و همکاران (۲۰۱۳) پاسخ پروتئوم یونجه به تنش گرمایی را مطالعه کردند و ابراز داشتند که نتایج تجزیه و تحلیل پروتئومیکس درک بهتری از اساس ملکولی پاسخ پروتئوم یونجه به تنش یونجه در اختیار قرار می‌دهد و پروتئین‌هایی با نقش متابولیسم، انرژی، سنتز، ذخیره‌ای، انتقال‌دهنده و ساختار سلولی را شناسایی کردند. کاکایی (۱۳۹۴) در مطالعه پاسخ پروتئوم برخی از ژنوتیپ‌های یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه نشان داد، گیاه در برابر این

آفت پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش را نسبت به سایر پروتئین‌ها بیشتر بیان کرده و باعث ایجاد نوعی مقاومت در گیاه شده است. تعدادی از پروتئین‌ها نیز مرتبط با فتوسنتز بودند. همچنین تغییر بیان متفاوتی در هر کدام از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت به مرحله شاهد دیده شد که نشان‌دهنده پاسخ گیاه در سطح بیان پروتئین‌ها نسبت به تنش ناشی از سرخرطومی برگ یونجه بوده است.

هدف از این مطالعه، بررسی پاسخ گیاه یونجه به تنش ناشی از تغذیه شته‌خالداری یونجه از نظر بیان پروتئین‌ها و بررسی عملکردی این پروتئین‌ها به منظور بهبود و ایجاد مقاومت به آفت مذکور در برنامه‌های اصلاحی آتی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی و مطالعه ارتباط بیان پروتئین‌ها در شرایط تنش ناشی از تغذیه شته‌خالداری یونجه و شاهد، ژنوتیپ همدانی مورد استفاده قرار گرفت. برای ایجاد آسیب و تنش توسط شته‌خالداری یونجه از قفس‌های چوبی با دیواره توری به ابعاد  $60 \times 40 \times 60$  (ارتفاع  $\times$  عرض  $\times$  طول) سانتی‌متر در هوای آزاد استفاده شد و داخل هر قفس یک گلدان یونجه قرار گرفت، به گونه‌ای که سه گلدان به مثابه سه تکرار به دور از آلودگی نگهداری شد و سه گلدان تحت تیمار (آلوده) به کمک ۲۵ شته‌خالداری یونجه آلوده گردید. گلدان‌ها در طول مدت رویش هر سه روز یک بار آبیاری شدند و تا مرحله رشد نهایی و نمونه‌گیری نهایی برای جلوگیری از آلودگی با سایر آفات زیر قفس باقی ماندند. بافت‌های سبز قسمت‌های هوایی گیاه یونجه در مرحله تنش و شاهد به‌طور هم‌زمان برداشت و بلافاصله در ازت مایع پودر شد و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی درون فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  - درجه سلسیوس قرار گرفت. برای استخراج پروتئین از بافت برگ روش‌های مختلفی تست گردید که در نهایت روش (Damerval *et al.*, 1986) با اندکی تغییر به عنوان مناسب‌ترین روش تشخیص داده شد و در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور محاسبه و تعیین غلظت پروتئین‌های استخراج شده، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. مقادیر  $200$  میلی‌گرم از پودر حاصل از مرحله تنش و شاهد بصورت جداگانه، به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل شد. مقدار پنج برابر حجم نمونه گیاهی از محلول استخراج تری کلرواستیک اسید ده درصد و استون به پودر حاصله اضافه و بافت له شده چندین بار ورتکس گردید. سپس به مدت یک ساعت در  $20^{\circ}\text{C}$  - درجه سلسیوس قرار گرفت. نمونه‌های پروتئینی به میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار منتقل و در دمای سانتریفیوژ (چهار درجه سلسیوس) به مدت  $20$  دقیقه با دور  $13000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن مایع رویی به رسوب باقی‌مانده در میکروتیوب، محلول شستشو ( $50$  میلی‌لیتر استون به علاوه  $15$  گرم DTT) اضافه گردید. سپس میکروتیوب‌های حاوی پروتئین به مدت  $20$  دقیقه در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - درجه سلسیوس قرار گرفتند تا پروتئین‌های موجود در میکروتیوب (که مجدد سانتریفیوژ شده‌اند) به طور کامل رسوب کنند. نهایتاً نمونه‌های پروتئینی در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  - خشک شد. در

این تحقیق استریپ‌هایی با pH خطی ۷-۴ مورد استفاده قرار گرفتند. برای متورم نمودن ژل‌ها، میزان ۳۶۰ میکرولیتر از محلول آب‌دهی مجدد (اوره ۱۲ گرم، چپس ۰/۵ گرم، آبی برموفنل بلو به میزان چند کریستال و آب دیونیزه ۲۵ میلی‌لیتر با حجم نهایی ۳۰ میلی‌لیتر) که حاوی ۰/۸ میلی‌گرم پروتئین بود، به داخل شیار موجود در سینی متورم‌سازی قرار گرفت. IPG Buffer و DTT قبل از استفاده به محلول استوک متورم‌سازی اضافه شدند و ژل نواری روی محلول حاوی پروتئین قرار گرفت. برای هر نمونه، سه تکرار بیولوژیکی از نمونه‌های پروتئینی توسط 2D-PAGE در نظر گرفته شد. پس از آماده‌شدن دستگاه، ژل متورم‌شده در محل مربوطه در تانک الکتروفورز دستگاه مولتی‌فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس (Amersham Bioscience) قرار گرفت و برنامه آن به صورت گرادینت تنظیم گردید. برای الکتروفورز یک ژل نواری ۱۸ سانتی‌متری با دامنه pH ۴ تا ۷، به‌طور متوسط، نیاز به ۵۷ هزار ولت ساعت بود که در این مطالعه این انرژی طی شش مرحله تأمین گردید. پس از اتمام مراحل بعد اول (IEF) و تفکیک پروتئین‌ها بر حسب بار الکتریکی، لازم است تا اثر بار به نوعی خنثی و پروتئین‌ها فقط بر حسب وزن ملکولی در بعد دوم الکتروفورز تفکیک شوند. به همین منظور، نوار IPG بعد اول طی دو مرحله در محلول متعادل‌کننده SDS-PAGE قرار داده شد. برای هر نوار ۱۰ میلی‌لیتر محلول متعادل‌سازی (شامل گلیسرول ۳۰ درصد، اوره ۶ مولار، تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷، SDS ۴ درصد، DTT یک درصد، برموفنول بلو ۰/۰۲ درصد) از فریزر بیرون آورده شد و به دمای اتاق رسید. نوارهای IPG در محلول متعادل‌سازی اول که حاوی DTT یک درصد بود، گذاشته شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محلول اول کاملاً دور ریخته شد و نوارها با آب مقطر دوبار تقطیر شسته شدند. بعد از این مرحله، نوارها در محلول دوم حاوی یدواستامید پنج درصد وزنی/حجمی به جای DTT، نهاده و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. برای تفکیک پروتئین‌ها از نظر وزن مولکولی، استریپ‌ها در تانک الکتروفورز به صورت عمودی گذاشته شدند. ژل‌ها پس از آماده‌شدن با دستگاه اسکنر مدل Image Scanner III ساخت شرکت فارماسیا با فرمت Tiff/اسکن و ذخیره گردیدند. مقایسات برای ژل‌های به‌دست آمده در مرحله تنش زیستی ناشی از شته‌خالداری یونجه و شاهد انجام گرفت. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌های پروتئینی بیان شده از نرم‌افزار Image master 2D platinum of Melanie 6.2 (Gene Bio, Geneva, Switzerland) استفاده شد. درصد حجمی هر لکه پروتئینی توسط نرم‌افزار محاسبه گردید. برای شناسایی لکه‌هایی که بین دو تیمار (تنش و شاهد) تفاوت معنی‌دار نشان دادند، از آزمون آماری t-student استفاده شد. همچنین به منظور تعیین میزان کاهش یا افزایش بیان پروتئین‌ها در شرایط تنش و شاهد میانگین درصد حجمی هر لکه در مرحله تنش به میانگین درصد حجمی همان لکه در مرحله شاهد تقسیم و به عنوان شاخص تغییرات بیان پروتئین در نظر گرفته شد. همچنین میزان وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک لکه‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار مذکور به دست آمد و سپس با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی از جمله سایت uniprot و

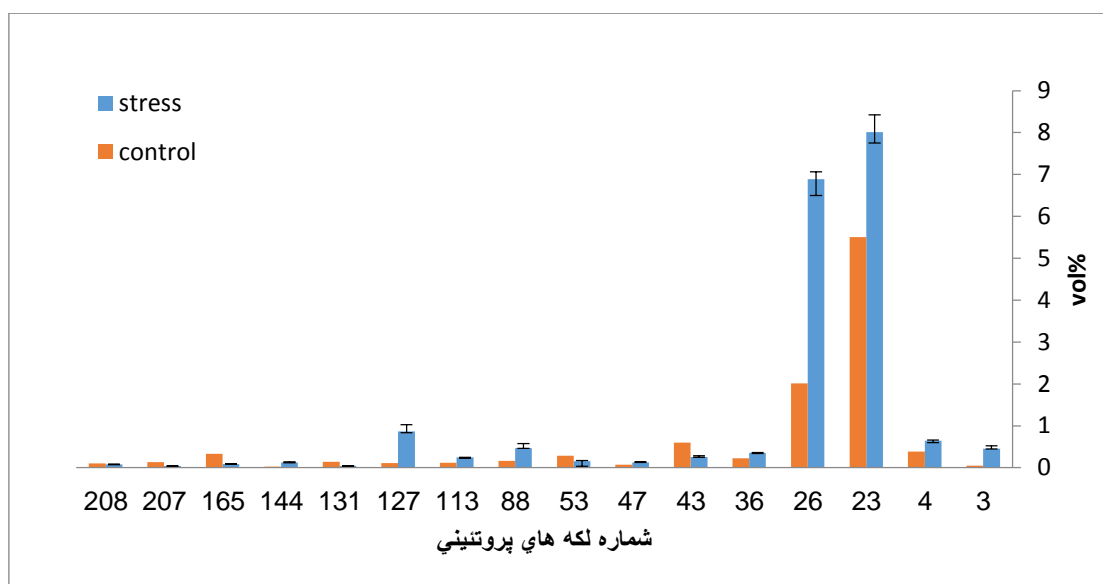
NCBI و گزارشات مشابه مورد شناسایی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

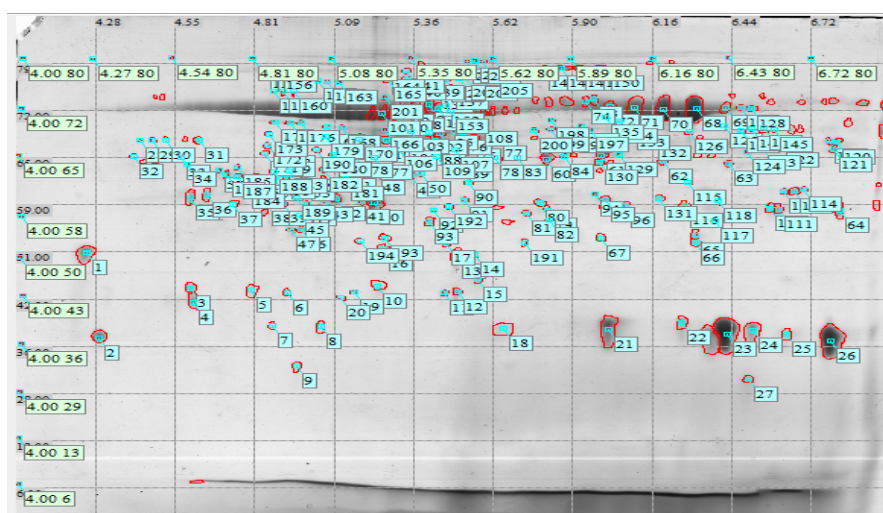
تجزیه و تحلیل الکتروفورز دوبعدی بافت‌های هوایی یونجه (ژنوتیپ همدانی)، در دو سطح شاهد و تحت تنش آفت شته خالدار با استفاده از نرم‌افزار Image master 2D platinum of Melanie 6.2 Melani 6.2. منجر به شناسایی ۲۰۸ لکه پروتئینی تکرارپذیر در ژل‌ها گردید. به‌طور کلی از این تعداد لکه پروتئینی شناخته شده، تعداد ۱۶ لکه دارای تغییرات بیانی معنی‌دار بودند. لکه‌های پروتئینی ۳، ۴، ۲۳، ۲۶، ۳۶، ۴۷، ۸۸، ۱۱۳، ۱۳۱، ۱۴۴، ۱۶۵، ۲۰۷ و ۲۰۸ با افزایش بیان و لکه‌های ۴۳، ۵۳ و ۱۲۷ با کاهش بیان، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گزارش شدند (جدول ۱). جدول ۲، لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار و شناسایی شده با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی را نشان می‌دهد. شکل ۱ میانگین درصد حجمی (درصد حجمی  $\pm$ ) و خطای استاندارد لکه‌های مورد شناسایی احتمالی در دو شرایط تنش آفت و شاهد را نشان می‌دهد. اشکال دو، سه و چهار به ترتیب الگوی پروتئوم بافت برگی ژنوتیپ همدانی یونجه در نرم‌افزار، الگوی پروتئوم در مرحله شاهد و الگوی پروتئوم در مرحله پاسخ به تنش ناشی از تغذیه شته خالدار یونجه (مرحله تنش) را نشان می‌دهد.

جدول ۱: لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار در ژنوتیپ همدانی یونجه نسبت به تنش ناشی از تغذیه شته خالدار یونجه در مقایسه با شاهد

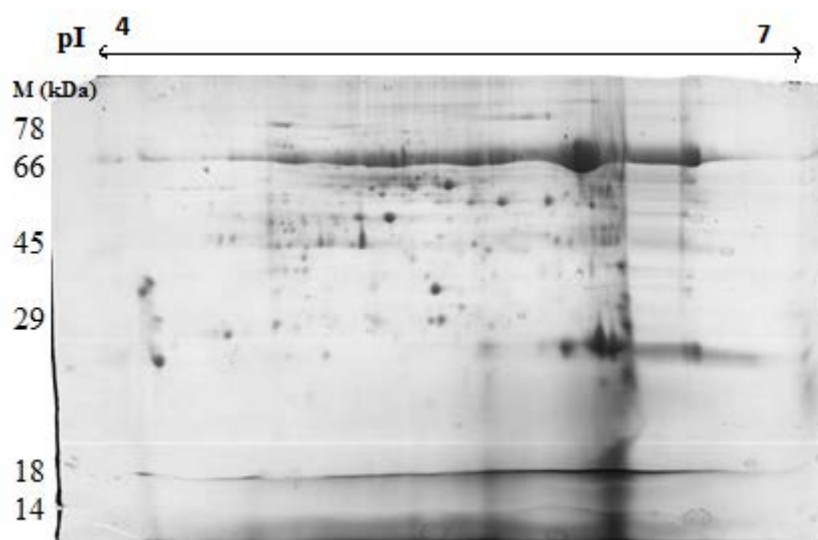
Landmark	Match ID	میانگین $\pm$ Vol% (خطای استاندارد)		T-test	Fold chain (IF)	نوع بیان
		مرحله شاهد	مرحله تنش			
۳	۱۹۹۹	۰/۰۵ $\pm$ ۰/۰۱۱	۰/۴۵ $\pm$ ۰/۰۷۰	۰/۰۰۴۹	۸/۷۲	افزایشی
۴	۱۸۲۷	۰/۳۸ $\pm$ ۰/۰۵۲	۰/۶۴ $\pm$ ۰/۰۱۲	۰/۰۰۸۴	۱/۶۶	افزایشی
۲۳	۱۸۲۸	۵/۵۰ $\pm$ ۰/۲۶۶	۸/۰۱ $\pm$ ۰/۴۱۰	۰/۰۰۶۸	۱/۴۵	افزایشی
۲۶	۱۸۳۰	۲/۰۱ $\pm$ ۰/۳۹۶	۶/۸۹ $\pm$ ۰/۱۷۶	۰/۰۰۰۳	۳/۴۲	افزایشی
۳۶	۱۹۰۹	۰/۲۲ $\pm$ ۰/۰۲۲	۰/۳۵ $\pm$ ۰/۰۰۷	۰/۰۰۴۴	۱/۵۵	افزایشی
۴۳	۱۸۷۸	۰/۶۰ $\pm$ ۰/۰۱۴	۰/۲۵ $\pm$ ۰/۰۳۲	۰/۰۰۰۶	۰/۴۲	کاهشی
۴۷	۲۰۱۰	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱۲	۰/۰۱۲۰	۱/۸۵	افزایشی
۵۳	۱۸۸۲	۰/۲۸ $\pm$ ۰/۱۲۶	۰/۱۵ $\pm$ ۰/۰۲۴	۰/۰۰۷۹	۰/۵۲	کاهشی
۸۸	۱۷۹۹	۰/۱۶ $\pm$ ۰/۰۰۲	۰/۴۶ $\pm$ ۰/۱۱۳	۰/۰۵۳۶	۴/۱۲	افزایشی
۱۱۳	۱۸۱۴	۰/۱۱ $\pm$ ۰/۰۲۰	۰/۲۴ $\pm$ ۰/۰۰۲	۰/۰۰۳۰	۲/۱۳	افزایشی
۱۲۷	۲۰۳۵	۰/۱۰ $\pm$ ۰/۰۳۰	۰/۸۶ $\pm$ ۰/۱۶۹	۰/۰۱۱۵	۸/۰۸	افزایشی
۱۳۱	۱۸۴۴	۰/۱۴ $\pm$ ۰/۰۱۵	۰/۰۴ $\pm$ ۰/۰۰۷	۰/۰۰۴۸	۰/۳۱	کاهشی
۱۴۴	۲۰۴۴	۰/۰۲ $\pm$ ۰/۰۱۱	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۲۰	۰/۰۱۵۴	۴/۲۷	افزایشی
۱۶۵	۲۰۱۷	۰/۰۳ $\pm$ ۰/۰۰۱	۰/۰۹ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۸	۲/۷۲	افزایشی
۲۰۷	۲۰۲۰	۰/۰۱ $\pm$ ۰/۰۰۳	۰/۰۳ $\pm$ ۰/۰۰۱	۰/۰۰۱۳	۳/۰۴	افزایشی
۲۰۸	۲۰۲۱	۰/۰۱ $\pm$ ۰/۰۰۳	۰/۰۷ $\pm$ ۰/۰۰۹	۰/۰۰۲۷	۷/۸	افزایشی



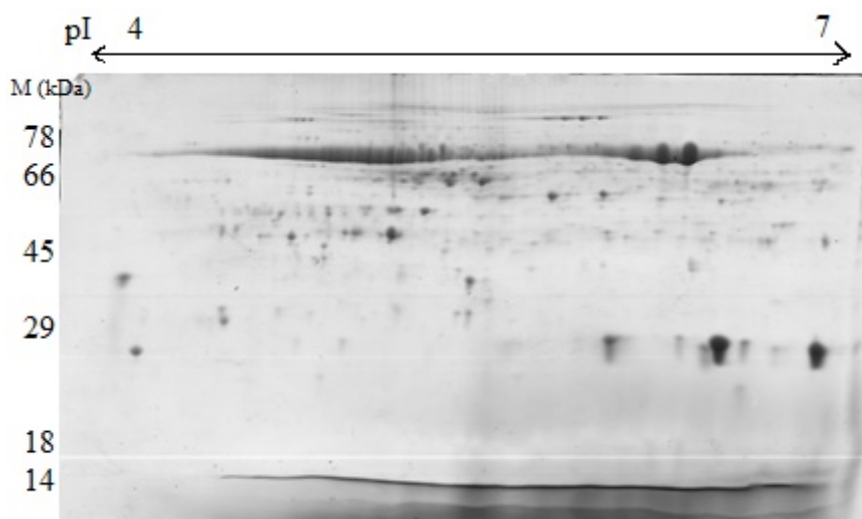
شکل ۱: میانگین درصد حجمی و خطای استاندارد لکه‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار



شکل ۲: الگوی پروتئوم ژنوتیپ همدانی یونجه در نرم‌افزار



شکل ۳: الگوی پروتئوم یونجه در ژنوتیپ همدانی طی مرحله شاهد



شکل ۴: الگوی پروتئوم بافت برگ ژنوتیپ همدانی در مرحله تنش (تغذیه) ناشی از شته خالدار یونجه

جدول ۲: مشخصات پروتئین‌های مورد شناسایی قرار گرفته در ژنوتیپ همدانی

Landmark	Name	pI	MW (kDa)	Organism	Function	Reference
3	Plastoglobulin-1*	4.61	40	<i>Pisum sativum</i>	Protein destination and storage	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011
4	Plastoglobulin-1	4.61	40	<i>Pisum sativum</i>	Protein destination and storage	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011
23	Oxygen- evolving enhancer protein 1	6.25	35.1	<i>Pisum sativum- Triticum aestivum</i>	Energy	Xu <i>et al.</i> , 2006- Blodner <i>et al.</i> , 2007- Faghani <i>et al.</i> , 2015
26	Gamma- glutamyl hydrolase	6.08	37.8	<i>Glycin max</i>	Cytoskeleton	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
36	Protein disulfide isomerase	4.95	57.05	<i>Oryza sativae</i>	Stress response	Hashimoto and Komatsu., 2007
43	Rubisco binding protein	5.06	61.78	<i>Vitis vinifera- Gossypium herbaceum</i>	protein synthesis, folding, transport and degradation	Di Carli <i>et al.</i> , 2011- Deeba <i>et al.</i> , 2012
47	Protein disulfide isomerase Precursor	4.93	55.95	<i>V. vinifera</i>	Stress response	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
53	Putative rubisco subunit binding- protein alpha	4.85	62.5	<i>Trifolium pratense</i>	Protein destination and storage	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011
88	Aldehyde dehydrogenase	5.8	68	<i>Pisum sativum</i>	Stress response	Castillejo <i>et al.</i> , 2012
113	HSP organizing protein	6.1	64.8	<i>Dactylis glomerata</i>	Stress response	Castillejo <i>et al.</i> , 2012
127	Polyphenol oxidase	6.27	67.7	<i>V. vinifera</i>	Stress response	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
131	Rubisco large subunit	6.30	62.1	<i>Akania bidwillii- Gossypium herbaceum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Energy	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011- Ashraf and Harris, 2013
144	Polyphenol oxidase	6.39	67.7	<i>V. vinifera</i>	Stress response	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
165	Proxiredoxin (PRX 5)	5.15	73.09	<i>V. vinifera</i>	Stress response	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
207	70 kDa heat shock protein	5.22	75.4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Stress response	Chen <i>et al.</i> , 2009
208	70 kDa heat shock protein	5.22	75.4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Stress response	Chen <i>et al.</i> , 2009

\* شناسایی لکه‌های پروتئینی بر اساس مشابهت نسبی با منابع ذکر شده، معرفی شده‌اند.



بدین اساس، لکه‌های شماره سه و چهار نیز به‌طور احتمالی پروتئینی به نام پلاستوگلوبولین شناسایی شدند (Aranjuelo *et al.*, 2011) که در فتوسنتز نقش دارد (Cunningham *et al.*, 2010) و در مرحله تحت تغذیه نسبت به مرحله شاهد، دچار افزایش بیان شده است.

لکه شماره ۲۳ احتمالاً پروتئینی به نام پروتئین مؤثر در تولید اکسیژن است (Di Carli *et al.*, 2011). کمپلکس تجزیه‌کننده آب شامل پروتئین OEE و یک آنزیم اکسیدکننده آب طی واکنش نوری فتوسنتز است. این کمپلکس در فتوسیستم II و حدواسط غشای لومن به وسیله چهار پروتئین هسته‌ای احاطه شده است (Yano *et al.*, 2015). پروتئین‌های OEE شامل سه زیرواحد OEE1 (33 kDa)، OEE2 (23 kDa) و OEE3 (16 kDa) می‌باشند. این پروتئین‌ها توسط ژنوم هسته کد می‌شوند و در سطح غشای داخلی تیلاکوئیدی کلروپلاست قرار می‌گیرند. در مطالعه‌ای که توسط عباسی و کوماتسو (۲۰۰۴) روی گیاه برنج انجام گرفت، مشاهده شد که بیان OEE2 در ساعات اولیه تنش (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش) در برگ برنج افزایش می‌یابد؛ اما پس از گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد. این روند در لکه شماره ۲۳ به صورت افزایشی مشاهده شد.

لکه شماره ۲۶ پروتئینی به نام گاماگلوتامیل هیدرولاز می‌باشد که دارای افزایش بیان است و باعث تسریع در واکنش شیمیایی هیدرولیز پیوند گاماگلوتامیل می‌شود.

لکه شماره ۴۳ با وزن ملکولی ۶۱/۷۸ و نقطه ایزوالکتریک ۵/۰۶ احتمالاً پروتئینی به نام Rubisco binding protein می‌باشد که با توجه به نقش آنزیم روبیسکو در فتوسنتز و کاهش مقدار این پروتئین نسبت به مرحله شاهد، اثر تنش ناشی از تغذیه شته‌خالداری یونجه بر روی گیاه مشخص می‌گردد. به عبارت دیگر، کاهش پروتئین مذکور ناشی از کاهش فتوسنتز در گیاه بوده که در اثر تغذیه شته‌خالداری یونجه صورت گرفته است.

لکه شماره ۴۷ احتمالاً پروتئینی بنام دی‌سولفیدایزومراز است. روند تغییرات این پروتئین افزایشی بوده است. پروتئین دی‌سولفیدایزومراز یک آنزیم ضروری برای دستیابی به ساختار درست سه‌بعدی از پروتئین می‌باشد و در واقع اجازه می‌دهد که آرایش صحیح پیوندهای دی‌سولفیدی در مکان‌هایی که به‌طور کامل پیچ‌خوردگی دارند، ایجاد گردد. پروتئین دی‌سولفیدایزومراز (PDI) یک پروتئین در شبکه آندوپلاسمی یوکاریوت‌ها می‌باشد. در واقع پروتئینی شناخته شده برای تسهیل تاخوردگی پروتئین‌ها است و بنابراین در تنش نقش دارد (Gruber *et al.*, 2006). بر این اساس، علت افزایشی بودن این پروتئین با توجه به نقش آن در مقاومت به تنش مشخص می‌گردد.

لکه شماره ۵۳ به احتمال زیاد پروتئینی به نام Putative Rubisco subunit binding-protein alpha subunit است (Aranjuelo *et al.*, 2011). روبیسکو فراوان‌ترین پروتئین در برگ و فراوان‌ترین پروتئین بر روی کره زمین است. این آنزیم

معمولاً از دو زیرواحد پروتئین به نام‌های زنجیره‌ی بزرگ و زنجیره‌ی کوچک تشکیل شده است. ژن زنجیره بزرگ بخشی از مولکول DNA کلروپلاست در گیاهان است (Dhingra *et al.*, 2004). همان‌طور که ذکر شد، این پروتئین در فتوسنتز نقش دارد و با توجه به اثر شته‌خالداری روی کاهش فتوسنتز، دچار کاهش بیان شده است.

لکه شماره ۸۸ پروتئینی به نام آلدهیددهیدروژناز است (Di Carli *et al.*, 2011). آلدهیددهیدروژناز گروهی از آنزیم‌ها هستند که باعث تسریع در اکسیداسیون آلدهیدها می‌شوند. روند تغییرات این پروتئین افزایشی بوده و با نتایج کاکایی (۱۳۹۴)، در مطالعه تأثیر تغذیه‌ای آفت سرخرطومی روی یونجه همسو بوده است.

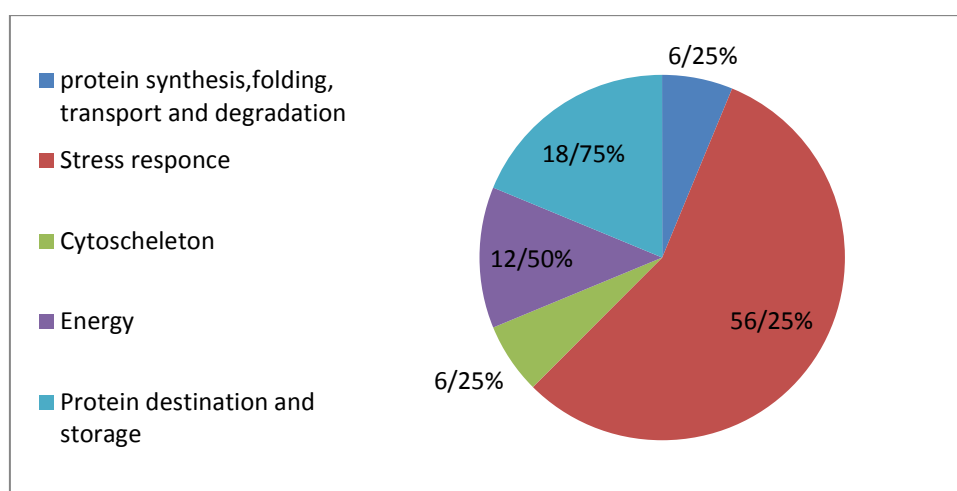
لکه‌های شماره ۱۱۳، ۲۰۷ و ۲۰۸ پروتئین‌های شوک حرارتی شناخته شدند. پروتئین‌های شوک حرارتی بخش مهمی از ابزارهای سلولی بوده که در تاخوردگی‌های اولیه و مجدد پروتئین‌ها کمک کرده است و باعث محافظت هسته سلول‌ها و غشای لپیدی در مقابل آسیب می‌شوند. این پروتئین‌ها از سلول در برابر تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند (Hooper *et al.*, 2005) و در ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش نقش دارند و هم برای عملکرد و هم بقای سلول بعد از تنش‌ها، حیاتی و مهم می‌باشند (Wang *et al.*, 2004). همبستگی مثبت بین مقاومت به تنش و سطح بیان HSPها گزارش شده است (Wang *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر، به‌طور کلی روند تغییرات این پروتئین‌ها افزایشی بوده است. به عبارت دیگر، بین مقاومت به تنش و سطح بیان HSPها یک همبستگی مثبت دیده می‌شود که با اظهارات و نتایج محققان دیگر (Wang *et al.*, 2004؛ Ndimba *et al.*, 2010؛ Xu *et al.*, 2006؛ کاکایی، ۱۳۹۴؛ فاتحی، ۱۳۸۹) مطابقت دارد. لکه شماره ۱۴۴ و ۱۲۷ مربوط به آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز می‌باشد (Di Carli *et al.*, 2011). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی هستند که در اکسیداسیون فنل‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی در طول حمله بیمارگرها، تغذیه حشرات، زخم، تنش‌های محیطی و هورمون‌ها مثل اتیلن و سالیسیک اسید در گیاه نقش مهمی دارند (Flott *et al.*, 1989؛ Kerby & Somerville, 1989؛ Zinovieva و همکاران، ۱۹۹۳). فعال شدن سازوکارهای دفاعی در گیاهان و همچنین بازدارنده‌های فعالیت نماتدهای انگل گیاهی را در ارتباط متقابل میزبان-نماتد مورد بررسی قرار داده و ثابت کردند که افزایش مقدار فیتوآلکسین، کاهش تعداد گال و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز را سبب می‌شوند. محمدی و کاظمی در سال (۲۰۰۲) نیز در بررسی دیگری میزان مقاومت ارقام مختلف گندم به قارچ *Fusarium graminearum* و القای مقاومت فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز را سنجیدند. از جمله آثار دیگر این آنزیم‌ها، تغییراتی در ترکیبات پروتئینی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی است که باعث مقاوم‌سازی آن در مقابل آفت، بیماری‌ها و سایر تنش‌ها می‌گردد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بیان لکه پروتئینی مذکور به صورت افزایشی و با مطالعات Sarry و همکاران (۲۰۰۴) و Di Carli و همکاران (۲۰۱۱) هم‌سو بوده است.

لکه شماره ۱۳۱ به احتمال زیاد پروتئینی به نام زیر واحد بزرگ روبیسکو است (Aranjuelo *et al.*, 2011). این پروتئین

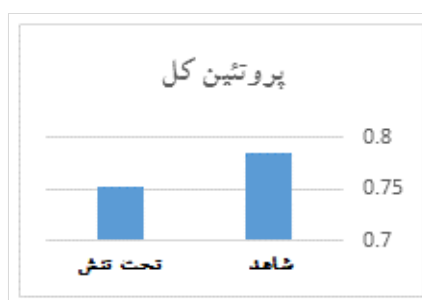
یک پروتئین فتوسنتزی است که سطح بیان آن با افزایش تنش کاهش پیدا می‌کند. کاهش فعالیت زیرواحد بزرگ روبیسکو باعث محدود شدن تثبیت CO<sub>2</sub> و نقص تنظیم آنزیم‌هایی می‌شود که وابسته به چرخه کالوین هستند. همین امر سبب انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها می‌شود و پروتئین‌هایی که مسئول حفاظت از گیاه در برابر زیان‌های فتواکسیداتیو هستند، کاهش می‌یابند. روند تغییرات این پروتئین نیز به صورت کاهشی بوده که کاملاً قابل انتظار است.

لکه شماره ۱۶۵ پروتئینی به نام پروکسی ردوکسین شناسایی شد (Di Carli *et al.*, 2011). پروکسی ردوکسین‌ها یک خانواده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند که سطح پراکسید سیتوکین واسطه را کنترل می‌کنند. فراوانی نسبی این آنزیم‌ها اهمیت فیزیولوژیک آنها را مشخص می‌کند (Rhee *et al.*, 2005). روند تغییرات این پروتئین افزایشی بوده است. این افزایش را می‌توان بخشی از پاسخ عمومی گیاه به شرایط تنش بیان کرد در واقع، گیاه با بیان بیشتر این پروتئین نوعی مقاومت در برابر آفت شته خالدار را در خود به وجود آورده است. افزایش در بیان این آنزیم در مطالعات Wang و همکاران (۲۰۰۴) در خزه *Physcomitrella patens* نیز مشاهده شده است. شکل پنج فراوانی نسبی گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش ناشی از آفت شته خالدار یونجه را نشان می‌دهد. بر این اساس پروتئین‌ها مربوط به سنتز و انتقال ۶/۲۵ درصد، Cytoskeleton ۶/۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد پروتئین‌ها مربوط به انرژی، ۱۸/۷۵ درصد مربوط به پروتئین‌های ذخیره‌ای و ۵۶/۲۵ درصد مربوط به تنش می‌باشد.

شکل ۶ پروتئین کل نمونه‌های تحت تنش و شاهد را نشان می‌دهد. همان طوری که ملاحظه می‌گردد، نمونه تحت تنش دارای میزان پروتئین کل (۰/۷۵۳ mg/ml) کمتری نسبت به نمونه شاهد (۰/۷۸۵ mg/ml) می‌باشد.



شکل ۵: فراوانی نسبی گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش ناشی از آفت شته خالدار یونجه



شکل ۶: پروتئین کل نمونه‌های تحت تنش و شاهد مورد مطالعه

## سپاسگزاری

از کلیه عزیزانی که در اتمام این گزارش نویسنده را یاری نمودند، به‌ویژه مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، قدردانی می‌گردد.

## منابع

- تکلو زاده، م.، تکلو زاده، ح. م.، حسینی پور، ا. و سرافرازی، ع. (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی شته‌خالداری یونجه (Hom., Therioaphis trifolii (Monell) (Aphididae) با استفاده از روش RAPD-PCR. فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، ۵ (۱): ۱۹-۱۱.
- خانجانی، م. (۱۳۸۸) آفات گیاهان زراعی ایران (حشرات و کنه‌ها). انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. چاپ پنجم صفحه ۵۷.
- رسولیان، غ. (۱۳۶۸) بررسی کاهش محصول و پروتئین یونجه توسط شته سبز نخود فرنگی و شته‌خالداری یونجه در کرج. مجله علوم کشاورزی ایران، ۲۰ (۲۰۱): ۲۶-۲۱.
- سلطانی، ن. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۹۲) بررسی پروتئوم پیام‌رسانی خشکی در ریشه برنج. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۵ (۲): ۱۰۰-۸۷.
- فاتحی، ف. (۱۳۸۹) بررسی پاسخ به شوری طولانی مدت در جنس هوردوم (*Hordeum*) با استفاده از پروتئومیکس. پایان نامه دکترای تخصصی. دانشگاه تهران، ایران - تهران.
- کاکایی، م. (۱۳۹۴) غربال و شناسایی عوامل مقاومت و حساسیت یونجه (*Medicago sativa* L.) نسبت به سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.) با زیست‌سنجی و پروتئومیکس. رساله دوره دکتری دانشگاه بوعلی سینا.
- کاکایی، م. و مظاهری‌لقب، ح. ا. (۱۳۹۴) بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات ساپونینی استخراجی از برگ چغندر قند (*Beta*

- vulgaris* L.) روی شته‌خالداری یونجه (*Therioaphis maculata* Buckten). چغندرقد، ۳۱ (۲): ۱۸۹-۱۹۹.
- مظاهری‌لقب، ح. ا. و باقری، ع. (۱۳۸۵) بررسی ساپونین‌های استخراجی از گیاهچه‌های چهار رقم یونجه (*Medicago sativa* L.) و تأثیر تغذیه شته‌خالداری یونجه (*Therioaphis maculata* Buckten) بر روی این ارقام. مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۹ (۲): ۱۴۶-۱۵۶.
- نصیری، ن.، نعمت‌زاده، ق.، عسگری، ح. و شکری، ا. (۱۳۹۱) مطالعه پاسخ پروتئوم برگ گیاه آلوروپوس لیتورالیس در شرایط تنش شوری. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-ملکولی. دوره دوم، شماره هشتم، صفحه ۳۵-۲۷.
- ولی‌زاده کامران، ر.، تورچی، م.، مقدم، م. و محمدی، ح. (۱۳۹۴) بررسی الگوی پروتئومی جو بهاره (*Hordeum vulgare*) تحت تنش سرمای کوتاه مدت. مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره ۱، صفحه ۷۸-۶۷.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Christophe, J., Avicé, J.C. and Nogue, S. (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62 (1): 111-123.
- Ashraf, M. and Harris, P.J.C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51: 163-190.
- Blodner, C., Majcherczyk, A., Kues, U. and Polle, A. (2007) Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiology*, 27: 1423-1431.
- Castillejo, M., Fernandez-Aparicio, M. and Rubiales, D. (2012) Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany*, 63 (1): 107-119.
- Chen, P., Ding, W., Bowes, C. and Brown, D. (2009) A Fully Unsupervised Word Sense Disambiguation Method Using Dependency Knowledge. *Human Language Technologies: The 2009 annual Conference of the North American Chapter of the ACL*, pp 28-36.
- Cunningham, F.X.Jr., Tice, A.B., Pham, C., and Gantt, E. (2010) Inactivation of genes encoding plastoglobuli-like proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a light-sensitive phenotype. *Journal of Bacteriology*, 192: 1700-1709.
- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. (1986) The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54.
- Deeba, F., Pandey, A.K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y.K., Shirke, P.A. and Pandey, V. (2012) Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53: 6-18.
- Dhingra, A., Portis, A.R. and Daniell, H. (2004) Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants.

- National Academy of Sciences, U.S.A. 101: 6315-20.
- Di Carli, M., Zamboni, A., Enrico, Pe. M., Pezzotti, M., Lilley, S., Benevento, E. and Desiderio, A. (2011) Two-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) Analysis of Grape Berry Proteome during Post harvest Withering. *Journal of Proteome Research*, 10 (1): 429-446.
- Dixon, A.F. (1973) *Biology of aphids*. The Institute of Biology Studies. No 44. Edward Arnold Ltd London: 52.
- Faghani, E., Gharechahi, J., Komatsu, S., Mirzaei, M., Khavarinejad, R.A., Najafi, F., Farsad, L.K. and Salekdeh, G.H. (2015) Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal Proteom*, 114: 1-15.
- Flott, B. E., Moerschbacher, B. M. and Reisener, H. (1989) Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist*, 111: 413-421.
- Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J.L. and Craik, D.J. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(8): 455-64.
- Gygi, S.P., Rist, B. and Aebersold, R. (2000) Measuring Gene Expression by Quantitative Proteome Analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(4): 396-401.
- Hashimoto, M. and Komatsu, S. (2007) Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*, 7: 1293-1302.
- Hooper, P.L. and Hooper, J.J. (2005) Loss of defense against stress: Diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technology & Therapeutic*, 7: 204-208.
- Kerby, K. and Somerville, S. (1989) Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35: 323-337.
- Li, W., Wei, Z., Qiao, Z., Wu, Z., Cheng, L. and Wang, Y. (2013) Proteomics Analysis of Alfalfa Response to Heat Stress. *PLoS ONE* 8(12): e82725. Doi: 10.1371/journal.pone.0082725
- Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162: 491-498.
- Natarajan, S.S., Krishnan, H.B., Khan, F., Chen, X, Garrett, W.M. and Lakshman, D. (2013) Analysis of Soybean Embryonic Axis Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 9: 309-332.
- Natarajan, S.S., Pastor-Corrales, M.A., Khan, F.H. and Garrett, W.M. (2013) Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 9: 424-437.
- Ndimba, B.N., Thomas, L.A. and Ngara, R. (2010) Sorghum 2-Dimensional Proteome Profiles and Analysis of HSP70 Expression Under Salinity Stress. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 44: 768- 775.
- Nuernberg, N.J., Milan, P.A. and Silveira, C.A.M. (1992) *Cultivo, Manejo e Utilização da alfalfa*. Manual de Producao de Alfalfa (ed. N.J. Nuernberg), pp. 15J21. EPAGRI, Florianopolis.

- Rondolph, N.M. (1957) Control of the spotted alfalfa aphid on alfalfa. *Journal of Economic Entomology*, 50 (2): 124-126.
- Sarry, J.E., Sommerer, N., Sauvage, F.X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., et al. (2004) Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics*, 4: 201-215.
- Silva, R.R., Muniz, R., Pestreich, L., et al. (2006) Efficacy and duration of effect of extended-release dexamethylphenidate vs placebo in school children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. In press.
- Walton, P.D. (1983) *Production and Management of Cultivated Forages*. Reston Publishing Company, Inc., Reston, Virginia.
- Wang, J.T.L., Shan, H., Shasha, D. and Piel, W.H. (2004) Tree Rank: A similarity measure for nearest neighbor searching in phylogenetic databases. In *Proceedings of the 15th International Conference on Scientific and Statistical Database Management*, 171-180.
- Xu, F., Wang, J., Chen, S., Qin, W., Yu, Z., Zhao, H., Xing, X. and Li, H. (2006) Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 53-58.
- Yano, J., Kern, J., Yachandra, V.K., Nilsson, H., Koroidov, S. and Messinger, J. (2015) Chapter 2, Section 2 Geometric and Electronic Structure of the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> Cluster. In Peter M.H. Kroneck and Martha E. Sosa Torres. *Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases*. *Metal Ions in Life Sciences*. 15. Springer. pp. 13-43.
- Zinovieva, R.D., Tomarev, S.I. and Piatigorsky, J. (1993) Aldehyde dehydrogenase-derived crystallins of squid and octopus: Specialization for lens expression. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 11449-11455.