

## تجزیه و تحلیل توالی‌های غیرترجمه شونده خانواده عوامل رونویسی bZIP در جو

### UTR Analysis of bZIP Transcription Factor Family in Barley

فرزان قانع گل محمدی<sup>۱</sup>، زهرا سادات شبر<sup>۲\*</sup>، احسان پورعابد<sup>۱</sup> و فرخ قناطر<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۷

#### چکیده

خانواده bZIP یکی از گسترده‌ترین عوامل رونویسی در گیاهان است که در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد. تنظیم بیان ژن در مرحله ترجمه بر اساس خصوصیات مولکول mRNA تعیین می‌شود که یکی از مهم‌ترین آن‌ها نواحی غیرترجمه شونده (UTR) هستند. در این مطالعه ویژگی‌های نواحی غیرترجمه شونده خانواده bZIP در گیاه جو (شامل ۷۸ عضو) و اثر آن‌ها بر رونویسی و ترجمه، بر اساس روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، میانگین طول ناحیه 5'-UTR کمتر و محتوای GC آن بیشتر از ناحیه 3'-UTR بود. زمینه کدون آغاز برای موقعیت +۴ در ۴۹/۲۳٪ از اعضا توسط گوانین و موقعیت -۳ در ۵۶/۷۰٪ توسط نوکلئوتیدهای پورینی اشغال شده بود. در مجموع ۱۸ نوع عناصر فعال سیس موثر در تنش‌های غیرزیستی به دست آمد که عوامل رونویسی تنظیم شونده توسط اسید جیبرلیک بیش‌ترین فراوانی را داشتند. ریبوزوم برای رسیدن به کدون آغاز ۵۰ عضو باید انرژی بیش از ۵۰ Kcal/mol صرف کند، اگرچه ۲۳ عضو دارای نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم (IRES) بودند. یک توالی هدف sRNA در توالی‌های 5'-UTR (*HvbZIP4*) و هم‌چنین 3'-UTR (*HvbZIP44*) مشاهده شد. ۲۲۵ عدد توالی چهارچوب باز خواندنی (با حداقل طول ۱۲ نوکلئوتید) در بالادست ناحیه رمزکننده اصلی مشاهده شد. شباهت قابل توجهی بین توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست (چهارچوب +۳) در *HvbZIP24* و یک پروتئین بالادست در *Theobroma cacao* (XM\_007017561.1) مشاهده شد. به‌طور کلی، مولکول‌های mRNA اعضا این خانواده دارای ساختارهای متفاوت تنظیمی بودند، این امر راه‌حلی طبیعی برای کنترل دقیق میزان تولید این نوع پروتئین‌های تنظیمی است.

واژه‌های کلیدی: عامل رونویسی، خانواده bZIP، توالی غیرترجمه شونده، جو

۱ و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموختگان کارشناسی‌ارشد و استادیار، گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج  
۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه مهندسی کامپیوتر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان، بهبهان

Email: shobbar@abrii.ac.ir

\* نویسنده مسوول

## مقدمه

عوامل رونویسی نقش مهمی در تنظیم تمامی فرآیندهای زندگی یک گیاه دارند لیو و همکاران (Liu et al., 2012). در میان خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی یوکاریوتیک، خانواده basic Leucine Zipper (bZIP) یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین خانواده‌ها است وئو و همکاران؛ نیچه‌اوان و همکاران (Wei et al., 2012; Nijhawan et al., 2008). اعضا این خانواده در فرآیندهای مختلفی از جمله پاسخ به محرک‌های زیستی یا غیرزیستی، بلوغ بذر، جنین‌زایی، مسیرهای انتقال سیگنال در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها، نمو گل و سیستم‌های آوندی نقش دارند جکوبی و همکاران؛ وئو و همکاران، 2012؛ آلوز و همکاران (Jakoby et al., 2002; Alves et al., 2013). این خانواده براساس ناحیه بازی لازم برای اتصال به DNA و ناحیه زیپ لوسین مورد نیاز برای دیمیریزاسیون شناخته می‌شود (لیو و همکاران، 2012). ناحیه بازی یک توالی بسیار حفاظت شده نیچه‌اوان و همکاران (2008) شامل ۱۸ اسید آمینه با موتیف ثابت N-x7-R/K-x9 است که در گیاهان به هسته ACGT متصل می‌شود (وئو و همکاران، 2012). اتصال به DNA به صورت همودایمر و یا هتروداایمر (اتصال به سایر پروتئین‌های این خانواده) صورت می‌گیرد. اعضا این خانواده تاکنون در گیاهان مختلفی از جمله آرابیدوپسیس جکوبی و همکاران (2002)، برنج نیچه‌اوان و همکاران (2008)، ذرت وئو و همکاران (2012)؛ انگور لیو و همکاران (Liu et al., 2014) و جو پورعابد و همکاران (Pourabed et al., 2014) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این میان خانواده bZIP در گیاه جو دارای ۷۸ عضو (شامل ۱۳۰ ترانسکریپت و بدون در نظر گرفتن ۱۱ اعضای با درجه اطمینان پایین) است (پورعابد و همکاران، 2014).

پیشرفت‌های گسترده‌ای که در کشف ساز و کارهای مختلف تنظیم بیان ژن حاصل شده، باعث افزایش درک ما در مورد این فرآیندهای بسیار پیچیده شده است موریس و گبال (Morris and Geballe, 2000). بر این اساس کنترل بیان ژن در سطوح مختلف، امری ضروری برای تمامی اشکال حیات است داولری و همکاران؛ کالوو و همکاران؛ آروجو و همکاران (Davuluri et al., 2000; Calvo et al., 2009; Araujo et al., 2012). در میان سازوکارهای مختلف تنظیم بیان ژن، آغاز ترجمه یک مرحله مهم محسوب می‌شود. در واقع این مرحله به‌طور ویژه سلول را قادر می‌سازد تا میزان تولید پروتئین را در پاسخ به محرک‌های داخلی و خارجی و بدون سنتز mRNA جدید کنترل کند دوور؛ مدنباچ و همکاران (Dever 2002; Medenbach et al., 2011).

به‌عبارت دیگر مولکول‌های mRNA یوکاریوتی با توجه به خصوصیات توالی آن‌ها، دارای درجات مختلفی از ترجمه هستند کوچتوو و همکاران (Kochetov et al., 2002) و وجود سطوح مشابهی از مولکول‌های mRNA لزوماً منجر به سنتز مقادیر مشابهی از پروتئین نمی‌شود چاترجی و پال؛ رحمانی و همکاران (Chatterjee and Pal, 2009; Rahmani et al., 2009).

نواحی غیرترجمه شونده شامل حد فاصل بین انتهای 5'-گوانین تا نقطه آغاز ترجمه (5'-UTR) و همچنین نقطه پایان ترجمه تا انتهای مولکول mRNA (3'-UTR) هستند. ناحیه 5'-UTR حاوی عناصر فعال سیس است که در مراحل رونویسی جوردن و همکاران (Jordan et al., 2003) و ترجمه موثر هستند. کارآیی ترجمه مولکول‌های mRNA یوکاریوتی به ویژگی‌های ساختاری ناحیه غیرترجمه شونده، وابسته است میگنون و همکاران؛ چوربانوو و همکاران (Mignone et al., 2005; Churbanov et al., 2002). این نواحی از طریق انتخاب محل شروع ترجمه، تأثیر بر خاتمه ترجمه‌گری و ویکنز (Gray and Wickens, 1998)، تعیین میزان پایداری مولکول mRNA میگنون و همکاران (2002)، ایجاد توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست توالی چهارچوب باز خواندنی اصلی میگنون و همکاران، 2002؛ نفسی و گالاکان؛ کالوو و همکاران (Neafsey and Galagan, 2007; Calvo et al., 2009)، اثر متقابل با زیرواحدهای ریبوزومی کوچتوو و همکاران (2002) و غیره بر میزان کارآیی ترجمه موثر هستند.

مطالعات مختلفی با استفاده از روش‌های آماری و تجربی برای آشکارسازی خصوصیات نواحی غیرترجمه شونده انجام گرفته است (چوربانوو و همکاران، 2005) اما ساز و کارهای تنظیم رونویسی براساس این توالی‌ها به‌طور کامل مشخص نیست (داولری و همکاران، 2000). یکی از روش‌های شناسایی جزئیات این سازوکارها، استفاده از روش‌های محاسباتی براساس تجزیه و تحلیل نواحی غیرترجمه شونده است. این مطالعه تلاشی برای درک اثر نواحی غیرترجمه شونده اعضا خانواده bZIP در گیاه جو پورعابد و همکاران (2014) بر مراحل رونویسی و ترجمه مولکول‌های mRNA این خانواده، براساس روش‌های بیوانفورماتیکی است.

## مواد و روش‌ها

## ۱. جداسازی توالی‌های غیرترجمه شونده

نواحی غیرترجمه شونده برای هر یک از اعضا (در صورت وجود) بر اساس اطلاعات پروژه توالی‌یابی ژنوم جو (Hordeum

#### ۴. محاسبه انرژی آزاد ساختار ثانویه، تعیین نواحی ورود داخلی برای ریبوزوم و توالی‌های هدف مولکول‌های sRNA

محاسبه انرژی آزاد ساختار ثانویه توالی‌های 5'-UTR با استفاده از ابزار تحت وب Mfold زوکر (Zuker, 2003)، براساس تنظیمات پیش‌فرض و در دمای ۲۵°C انجام شد. ابزار Mfold براساس ترکیب روش برنامه‌نویسی پویا و محاسبات ترمودینامیک، پایدارترین ساختار دوم مولکول‌های RNA کوچک را با حداقل انرژی پیش‌بینی می‌کند (ژیانگ، 2006). همچنین وجود نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم با استفاده از ابزار UTRScan در پایگاه UTRdb گریلو و همکاران (Grillo et al., 2010) و توالی‌های هدف sRNA با استفاده از پایگاه psRNATarget مورد بررسی قرار گرفتند (Dai and Zhao, 20011). روابط رگرسیونی و همبستگی بین اجزا مختلف نیز با استفاده از SAS 9.1.3 به‌دست آمد.

#### نتایج و بحث

##### ۱. ویژگی‌های توالی‌های نواحی غیرترجمه شونده

بیشتر مولکول‌های mRNA اعضا این خانواده (۹۴/۶۱ درصد) هم توالی 5'-UTR و هم توالی 3'-UTR را داشتند، به این قرار که از ۱۳۰ ترانسکرپت این خانواده فقط ۰/۷۶ درصد فاقد توالی 5'-UTR (تنها توالی HvbZIP32) و ۴/۶۱ درصد فاقد توالی 3'-UTR (شامل HvbZIP8.1، HvbZIP29، HvbZIP37.1، HvbZIP47.2، HvbZIP73.1 و HvbZIP76.4) بودند. در میان این اعضا طول توالی‌های 5'-UTR از یک نوکلئوتید در HvbZIP35 تا ۲۴۶۸ نوکلئوتید در HvbZIP51.2 و طول توالی‌های 3'-UTR نیز از یک نوکلئوتید در HvbZIP20.1 تا ۵۱۵۶ نوکلئوتید در HvbZIP50.1 و HvbZIP50.2 متغیر بود. به‌طور کلی متوسط طول توالی‌های 3'-UTR از توالی‌های 5'-UTR بیشتر بود (جدول ۱).

(vulgare) از پایگاه داده Ensembl Plants به‌دست آمد. محدوده ناحیه رمزکننده برای توالی‌هایی فاقد گزارش ناحیه رمزکننده کامل، با استفاده از ابزار پیش‌بینی چهارچوب باز خواندنی در پایگاه NCBI تعیین شد. در این ابزار پس از بارگذاری توالی مورد نظر، محدوده ناحیه رمزکننده در شش چهارچوب قابل دسترس است که در نهایت بلندترین ناحیه رمزکننده، حاوی دمین bZIP انتخاب شد.

##### ۲. بررسی ویژگی‌های نواحی غیرترجمه شونده، تعیین زمینه کدون آغاز و پایان

طول و محتوای نوکلئوتیدی در توالی‌های 3'-UTR و 5'-UTR و همچنین تعداد کدون آغاز بالادست و توالی‌های چهارچوب باز خواندنی بالادست (در سه چهارچوب مثبت) با حداقل طول ۱۲، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نوکلئوتید (براساس ابزار پیش‌بینی چهارچوب باز خواندنی در پایگاه NCBI) برای توالی‌های 5'-UTR با استفاده از جعبه‌ابزار بیوانفورماتیک در محیط MATLAB 2012a، به‌دست آمد. زمینه کدون آغاز و پایان در فاصله ۱۰- تا ۱۰+ (درحالی‌که A در ATG، +۱ و همچنین T در T(A/G)(A/G)، +۱ در نظر گرفته شد) بررسی شد.

##### ۳. شناسایی عناصر فعال سیس

شناسایی، تجزیه و تحلیل عناصر فعال سیس در ناحیه 5'-UTR به منظور یافتن نواحی اتصال عوامل رونویسی موثر در تنش-های غیرزیستی، در پایگاه داده PlantCARE انجام شد/سکوت و همکاران (Lescot et al., 2013). در این حالت جستجو بر اساس انطباق توالی مورد نظر با الگوهای توافقی عناصر تنظیمی که به‌صورت آزمایشگاهی تعیین شده‌اند، به‌دست می‌آید ژیانگ (Xiong, 2006).

جدول ۱: طول و محتوای نوکلئوتیدی توالی‌های UTR در اعضای خانواده HvbZIP

Table 1: UTR length and nucleotide content of HvbZIP members

محدوده	میانگین طول (nt)	درصد تیمین	درصد گوانین	درصد سیتوزین	درصد آدنین
Region	Length mean (nt)	T (%)	G (%)	C (%)	A (%)
5'-UTR	342.17	20.90	26.72	32.39	20.00
3'-UTR	598.64	30.67	23.56	20.93	24.80

از طرف دیگر افزایش طول ناحیه 3'-UTR سبب بهبود کارایی خاتمه ترجمه می‌شود.

ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های تنظیمی مانند عوامل رونویسی عموماً مولکول‌های mRNA با 5'-UTR بلند و غنی از

افزایش طول ناحیه 5'-UTR سبب تشکیل ساختارهای ثانویه پایدار و در نتیجه کاهش میزان کارایی ترجمه مولکول mRNA می‌شود و گرزین و همکاران (Wegrzyn et al., 2008)،

۳۴/۱۰ درصد اعضا دارای نوکلئوتید مناسب در هر دو موقعیت، ۳۶/۴۲ درصد دارای نوکلئوتید مناسب در یکی از دو موقعیت ۲۷/۹۰ و ۱۴/۷۲ درصد در ۴G+ و ۲۱/۷۰ درصد در ۳P- و درصد فاقد نوکلئوتید مناسب در موقعیت‌های مذکور بودند.

### ۳. تجزیه و تحلیل عناصر فعال سیس موثر بر رونویسی

در مجموع، ۱۸ نوع (۲۰۸ جایگاه) عناصر فعال سیس مرتبط با تنش‌های غیرزیستی در ۱۲۹ ناحیه غیرترجمه شونده از اعضا خانواده bZIP به دست آمد (جدول ۲). شایان ذکر است که عناصر شناسایی شده با عملکردهای گزارش شده برای عوامل رونویسی bZIP همخوانی داشته و بیشتر آن‌ها در تنش‌های غیرزیستی و نمو بذر دخالت دارند. در این بین عوامل رونویسی تنظیم‌شونده توسط اسید جیبرلیک (HvGAMYB) بیش‌ترین فراوانی (۴۹ جایگاه) را داشتند. GAMYB به‌عنوان یک عامل رونویسی در پاسخ به اسید جیبرلیک در سلول‌های آلتورون غلات بیان می‌شود. این عنصر در بذر جو نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن طی نمو آندوسپرم و جوانه‌زنی دارد گولبر و همکاران (Gubler *et al.*, 1999). طبق گزارشات قبلی، بیان بسیاری از ژن‌های ذخیره‌ای بذر در غلات مبتنی بر فعالیت عوامل رونویسی bZIP است سیگ و همکاران؛ لیو و همکاران، 2012 (Singh *et al.*, 2002).

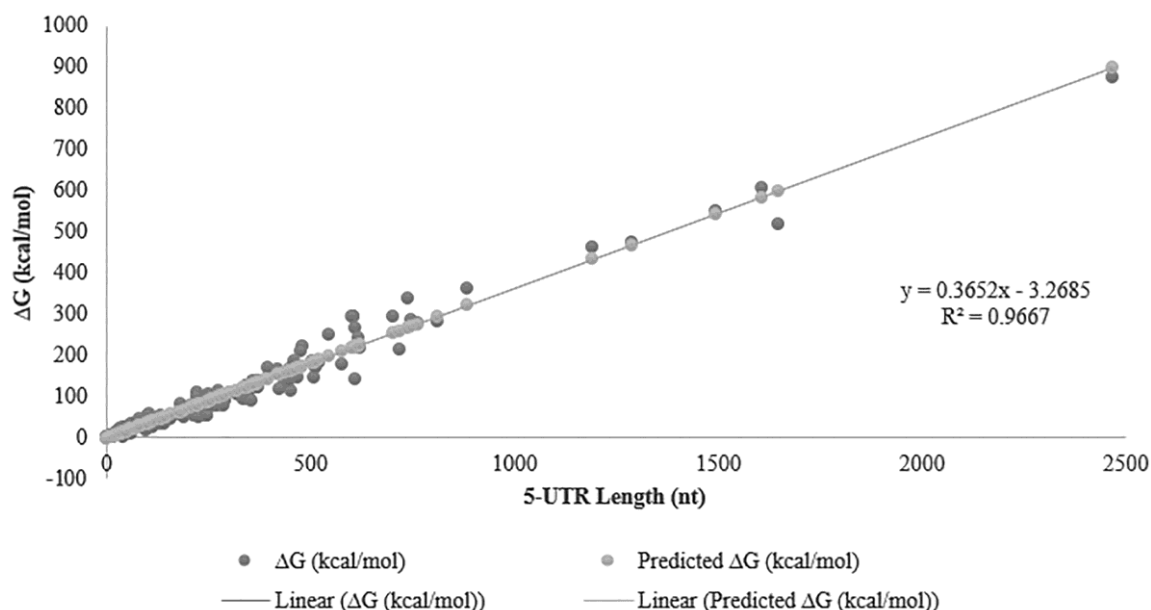
### ۴. ساختارهای ثانویه در ناحیه 5'-UTR

ساختارهای ثانویه ترکیبی از ساختارهای سنجاق سری هستند که در نتیجه جفت شدن نوکلئوتیدهای مکمل رشته RNA ایجاد می‌شوند. پایداری این ساختارها به عوامل مختلف از جمله طول توالی وابسته است که براساس انرژی آزاد ( $\Delta G$ ) و در واحد کیلوکالری بر مول (Kcal/mol) اندازه‌گیری می‌شود (وگرزین و همکاران، 2008). به‌طور معمول با افزایش طول توالی، میزان انرژی لازم برای شکستن ساختار ثانویه افزایش می‌یابد. بر این اساس همبستگی مثبت (۰/۹۸۳) و بسیار معنی‌داری ( $\alpha < 0.01$ ) بین انرژی ساختار ثانویه و طول 5'-UTR مشاهده شد (براساس معادله تطابقی  $y = 0.3652X - 3.2685$ ) (شکل ۱).

GC تولید می‌کنند (دالری و همکاران، 2000). این ویژگی راه حلی طبیعی برای محدود کردن سنتز پروتئین‌هایی است که تولید بیش از حد آن‌ها در سلول مضر است چوربانوو و همکاران، 2005؛ رینگنر و کروگ؛ میهایلوویچ و همکاران (Ringner and Krogh, 2005; Mihailovich *et al.*, 2007). محتوای GC در توالی‌های 5'-UTR (۵۹/۱۱٪) بیشتر از توالی‌های 3'-UTR (۴۴/۴۹٪) بود (جدول ۱). بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی نوکلئوتیدی در توالی‌های 3'-UTR به ترتیب مربوط به نوکلئوتید T (۳۰/۶۷٪) و C (۲۰/۹۳٪) بود که در توالی‌های 5'-UTR برعکس این امر مشاهده شد (جدول ۱). به‌طور کلی در توالی‌های 3'-UTR محتوای بالاتری از T و مقدار کمی از C یافت می‌شود (نفسی و گلاگان، 2007). این امر ممکن است راه حلی برای ناپایداری مجموعه RNA-DNA در مراحل پایانی رونویسی و جدا شدن مولکول mRNA باشد.

### ۲. اثر زمینه کدون آغاز و پایان

توانایی شناسایی کدون ATG به‌عنوان نقطه آغاز ترجمه توسط ریبوزوم موجودات یوکاریوتی به شدت به زمینه آن وابسته است. بنابراین بررسی توالی زمینه کدون آغاز برای تعیین نقش هر موقعیت طی ترجمه، می‌تواند بیانگر خصوصیات ویژه ناحیه آغاز ترجمه باشد اسپوسیتو و همکاران؛ رنگان و همکاران (Esposito *et al.*, 2001; Rangan *et al.*, 2008). اگرچه اهمیت نوکلئوتیدهای اطراف کدون آغازی در موقعیت‌های مختلف از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است ولی مهم‌ترین موقعیت‌ها در نزدیکی کدون ATG موقعیت‌های ۳- و ۴+ هستند. اجزای زیر واحدهای ریبوزوم یوکاریوتیک در شناسایی نوکلئوتیدهای این دو موقعیت دخالت دارند چای-پی و همکاران (Chia-Pei *et al.*, 2010) که معمولاً موقعیت ۳- توسط یک نوکلئوتید پورینی و ۴+ توسط یک گوانین اشغال شده است (دوور، 2002؛ میگنون و همکاران، 2002؛ چوربانوو و همکاران، 2005). در اعضا این خانواده موقعیت ۴+ در ۴۹/۲۳٪ از اعضا توسط گوانین و موقعیت ۳- نیز در بیشتر توالی‌ها (۵۶/۷۰٪) توسط نوکلئوتیدهای پورینی (۲۲/۰۵٪ و ۳۴/۶۵٪ به ترتیب برای A و G) اشغال شده بود. در میان توالی‌های 5'-UTR مورد بررسی،



شکل ۱: رابطه رگرسیونی تغییرات انرژی ساختار ثانویه در مقایسه با طول 5'-UTR در اعضای خانواده *HvbZIP*  
 Fig. 1: Regression relation of secondary structure energy compare with 5'-UTR length of *HvbZIP* members

جدول ۲: عناصر *Cis*-acting پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزیستی در ناحیه 5'-UTR اعضا خانواده *HvbZIP*

Table 2: Abiotic stress responsive *cis*-acting elements found in 5'-UTR region of *HvbZIP* members

توالی Sequence	فراوانی Frequency	عنصر سیس <i>Cis</i> -element
NNYAACSRHM	49	GAmyb
AGCAGC	23	ANAERO2CONSENSUS
GAGAGAGAGAGAGAGA	20	GAGA8HVBKN3
CCTTTT	18	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A
TGACT	17	WBOXHVIS01
RYCGAC	17	CBFHV
TTTGACY	12	WBOXPCWRKY1
TATTCT	9	-10PEHVPSBD
CCGAAA	8	LTRE1HVBLT49
ACCGACA	6	LTREATLTI78
GTCGAC	5	CRTDREHVCBF2
TAACAAA	5	MYBGHV
TCATCAC	4	ANAERO3CONSENSUS
TATCCAT	4	AMYBOX2
TTTTTTCC	4	PYRIMIDINEBOXHVEPB1
AAACAAA	3	ANAERO1CONSENSUS
TAACARA	3	AMYBOX1
TGTAAG	1	-300CORE

آغاز ترجمه در این توالی‌ها کاهش پیدا می‌کند (دوور، 2002؛ میهایلوویچ و همکاران، 2007؛ آروجو و همکاران، 2012). ۱۵ ترانسکرپت (۱۳ عضو) نیز انرژی آزاد بین ۳۰ تا ۳۰ Kcal/mol ۵۰ نشان دادند که طول آن‌ها بین ۶۱ تا ۲۲۷ نوکلئوتید بود. ریبوزوم برای رسیدن به کدون آغاز قادر نیست انرژی بیش از ۵۰ Kcal/mol را برای شکستن ساختارهای ثانویه در 5'-UTR، تأمین کند (دوور، 2002؛ میهایلوویچ و همکاران، 2007؛ آروجو و همکاران، 2012). بیشتر توالی‌های 5'-UTR اعضا این خانواده (۸۳ ترانسکرپت در ۵۰ عضو) ساختارهای ثانویه‌ای ایجاد

به‌طور کلی ریبوزوم، بسته به محل این ساختارها، به راحتی قادر به شکستن ساختارهای ثانویه‌ای با انرژی آزاد کمتر از ۳۰ Kcal/mol است (دوور، 2002؛ میهایلوویچ و همکاران، 2007؛ آروجو و همکاران، 2012). در اعضا این خانواده تنها ۳۱ ترانسکرپت (۲۳ عضو)، انرژی آزاد ساختار ثانویه کمتر از ۳۰ Kcal/mol داشتند. طول این دسته بین ۱-۱۱۵ نوکلئوتید متغیر بود. ساختارهای سنجاق سری با انرژی آزاد بین ۳۰ تا ۵۰ Kcal/mol نیز سبب ایجاد اختلال در اتصال زیرواحد کوچک ریبوزوم به mRNA می‌شوند، در نتیجه میزان کارایی

انتهای ۵' است، توانایی آغاز ترجمه براساس نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم و مستقل از کلاهدک انتهای ۵' نوعی مزیت محسوب می‌شود چاپل و همکاران (Chappell et al., 2000). ۲۳ عضو (۲۸ ترانسکرپت) دارای نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم بودند. همان‌طور که در بخش ۲ نتایج اشاره شد، ۳۶ ترانسکرپت فاقد زمینه مناسب برای کدون آغاز اصلی هستند که در این میان، ۹ ترانسکرپت (شامل *HvbZIP5*, *HvbZIP14.1*, *HvbZIP17.1*, *HvbZIP17.2*, *HvbZIP21.1*, *HvbZIP33*, *HvbZIP40.2*, *HvbZIP51.2* و *HvbZIP77.3*) حاوی نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم هستند.

می‌کنند که انرژی مورد نیاز برای شکستن آن‌ها بیش از ۵۰ Kcal/mol است. متوسط طول توالی‌های این دسته بیشتر از دو گروه دیگر (۱۰۳ تا ۲۴۶۸ نوکلئوتید) بود.

### ۵. نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم

زیر واحد ۴۰S ریبوزومی می‌تواند مستقل از کلاهدک انتهای ۵'، به قطعات کوچکی از مولکول mRNA در ناحیه 5'-UTR متصل شود، این قطعات را نواحی داخلی برای ورود ریبوزوم می‌گویند دوور، ۲۰۰۲؛ توریول و همکاران؛ میهایلوویچ و همکاران، ۲۰۰۷؛ چاترجی و پال، ۲۰۰۹ (Touriol et al., 2003). از آنجا که ترجمه مولکول‌های mRNA یوکاریوتی وابسته به کلاهدک

جدول ۳: توالی‌های هدف sRNA در توالی‌های UTR اعضای خانواده *HvbZIP*

Table 3: sRNA targeting in UTR region of *HvbZIP* members

هم‌ریفی Alignment	بازدارندگی Inhibition	UPE	E	شماره دستیابی miRNA accession	توالی هدف Target sequence	محدوده Region
miRNA 20 ACAGCACGAGCAGCAGCAGC 1 Target 188 CGUCGUCGUCGUCGUCGUCG 207	Cleavage	14.015	3	hvu-miR6214	<i>HvbZIP4.1</i>	
miRNA 20 ACAGCACGAGCAGCAGCAGC 1 Target 188 CGUCGUCGUCGUCGUCGUCG 207	Cleavage	14.015	3	hvu-miR6214	<i>HvbZIP4.2</i>	5'-UTR
miRNA 20 ACAGCACGAGCAGCAGCAGC 1 Target 188 CGUCGUCGUCGUCGUCGUCG 207	Cleavage	14.015	3	hvu-miR6214	<i>HvbZIP4.3</i>	
miRNA 21 GCAGGGUAUUAUUAUUCUACA 1 Target 67 CGUCCCAUAAUACAAGGACGU 87	Translation	17.138	3	hvu-miR1120	<i>HvbZIP44</i>	3'-UTR

E: میزان شباهت توالی miRNA به توالی هدف (۵-۰؛ عدد کمتر = شباهت بیشتر)؛ UPE: انرژی لازم برای شکستن توالی ساختار

ثانویه اطراف توالی هدف (۱۰۰-۰؛ عدد کمتر = سهولت بیشتر)

E: Maximum expectation: range: 0-5, less is better; UPE: Target accessibility - allowed maximum energy to unpair the target site: range: 0-100, less is better

(*HvbZIP4.1*, *HvbZIP4.2* و *HvbZIP4.3*) و یک توالی هدف نیز در 3'-UTR (*HvbZIP44*) مشاهده شد (جدول ۳). از طرف دیگر با توجه به محدودیت‌های روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص مولکول‌های هدف، روش‌های بیوانفورماتیکی بسیار مفید هستند (جونز-رودز و همکاران، ۲۰۰۶). در همین راستا می‌توان به همولوژی میان hvu-miR1120 که براساس روش‌های محاسباتی به‌دست آمده با tae-miR1120 و osa-miR818e که به‌صورت آزمایشگاهی بررسی شده‌اند، اشاره نمود.

### ۶. تجزیه و تحلیل توالی‌های هدف مولکول‌های sRNA

مولکول‌های sRNA، به‌عنوان یکی از ابزارهای تنظیم بیان ژن در مرحله رونویسی و پس از آن شناخته می‌شوند رینهارت و همکاران؛ جونز-رودز و همکاران (Reinhart et al., 2002; Jones-Rhoades et al., 2006). این مولکول‌ها در گیاهان به توالی‌های حفاظت شده‌ای در مولکول‌های mRNA هدف متصل می‌شوند. این امر امکان تشخیص مولکول‌های هدف را با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، به‌صورت قابل اطمینانی افزایش می‌دهد (جونز-رودز و همکاران، ۲۰۰۶). در میان اعضا این خانواده، سه توالی هدف sRNA در توالی‌های 5'-UTR

توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست در یک مولکول mRNA به‌طور غیرمعمولی نادر است پارک و همکاران ( Park *et al.*, 2006). همچنین در این مطالعه تنها در ۹ ترانسکرپت *HvbZIP39.2*, *HvbZIP39.1*, *HvbZIP12*, *HvbZIP7*, *HvbZIP46.4*, *HvbZIP51.2*, *HvbZIP70.2*, *HvbZIP76.2* و *HvbZIP77.2* به ترتیب ۱۰، ۷، ۱۶، ۱۲، ۱۰، ۳۶، ۱۵، ۶ و ۷ عدد چهارچوب باز خواندنی بالادست به دست آمد. وجود حتی یک توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست، کارآیی ترجمه را به صورت منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد (نفسی و گلاگان، 2007). بنابراین احتمالاً ریبوزوم برای رسیدن به ناحیه رمزکننده اصلی توالی‌های فوق در نقاط نامناسبی درگیر می‌شود. این امر سبب کاهش میزان کارآیی ترجمه ناحیه رمزکننده اصلی می‌شود.

#### ۸. بررسی پروتئین‌های بالادست

پروتئین‌های بالادست، پروتئین‌هایی هستند که در نتیجه ترجمه توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست تولید می‌شوند. این نوع پپتیدها عمدتاً کوچک و ناپایدار بوده و به سرعت تجزیه می‌شوند، این امر سبب کاهش شناسایی این نوع پروتئین‌ها به روش‌های تجربی می‌گردد (کرتو و همکاران، 2006). بر همین اساس با وجود این که تعداد قابل توجهی چهارچوب باز خواندنی بالادست از توالی‌های مورد بررسی، به دست آمد ولی تنها چند پروتئین مشابه یافت شد. پروتئین حاصل از ترجمه توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست در چهارچوب +۱ از *HvbZIP78.1* (با طول ۵۷ اسید آمینه) شباهت قابل توجهی با پروتئین حاصل از ترجمه AK374647.1 از جو داشت. همچنین توالی پپتیدی حاصل از ترجمه چهارچوب باز خواندنی بالادست در چهارچوب +۳ از *HvbZIP24* (با طول ۴۱ اسید آمینه) شباهت زیادی (۹۳ درصد) به یک پروتئین بالادست در *Theobroma cacao* (XP\_007017623.1) (Motamayor *et al.*, 2013) داشت. تنها یک دمین MFMR در پروتئین بالادست (چهارچوب +۱) از *HvbZIP21.1* با طول ۵۰ اسید آمینه، مشاهده شد. به نظر می‌رسد این دمین در میان کنش پروتئین-پروتئین دخالت دارد، البته در اعضا خانواده bZIP، مکانی‌یابی هسته را برعهده دارد سیبریلی و همکاران (Siberil *et al.*, 2001).

با وجود عوامل متعدد که در اعضا این خانواده برای جلوگیری از ترجمه ناحیه رمزکننده اصلی وجود دارد، ولی سلول همچنان قادر به تولید پروتئین‌های مورد نظر از طرق مختلف و براساس سازوکارهای متفاوت است. از جمله وجود

#### ۷. کدون آغاز بالادست و توالی‌های چهارچوب باز خواندنی بالادست

توالی‌های چهارچوب باز خواندنی بالادست و کدون‌های آغاز بالادست از عناصر اصلی مؤثر بر ترجمه در توالی‌های 5'-UTR هستند. کدون آغاز بالادست، یک کدون بدون کدون پایان است که در بالادست ناحیه رمزکننده اصلی قرار دارد (آروجو و همکاران، 2012). بسته به نوع موجود مورد مطالعه ۵۳-۱۵٪ از توالی‌های 5'-UTR دارای کدون آغاز بالادست هستند (Rogozin *et al.*, 2001; Crowe و همکاران؛ کرتو و همکاران (et al., 2006). در مجموع ۴۱۹ کدون آغاز بالادست در ۴۹ عضو (۷۴ ترانسکرپت) مشاهده شد که در ۴۰ عضو (۵۸ ترانسکرپت)، این کدون‌ها به یک کدون پایان ختم می‌شود. بنابراین ۹ عضو (۱۶ ترانسکرپت یا ۱۲/۴۰ درصد) حاوی کدون آغاز بالادست هستند. به‌طور معمول با افزایش طول توالی، امکان یافتن یک کدون مفروض نیز افزایش پیدا می‌کند. بر این اساس تعداد کدون آغاز بالادست و طول نواحی غیرترجمه شونده همبستگی مثبت (۰/۸۲۶) و بسیار معنی‌داری ( $\alpha < 0.01$ ) را براساس معادله تطبیقی  $y = 0.016x - 2.42$  نشان دادند. به‌طور کلی وجود کدون آغاز بالادست سبب کاهش کارآیی ترجمه در نواحی پایین دست می‌شود. در واقع این کدون سبب درگیر شدن ریبوزوم در نقاط نامناسب شده و مانع از رسیدن آن به کدون آغاز اصلی می‌شود (چوربانوو و همکاران، 2005). توالی *HvbZIP51-2* بیش‌ترین تعداد کدون آغاز بالادست (۶۵ عدد) را داشت.

چهارچوب باز خواندنی بالادست در واقع یک توالی با کدون آغاز و پایان در بالادست ناحیه چهارچوب باز خواندنی اصلی است (میگنون و همکاران، 2002؛ رحمانی و همکاران، 2009؛ آروجو و همکاران، 2012). در اعضا این خانواده برای هر سه چهارچوب مثبت تمامی ترانسکرپت‌ها و با حداقل طول ۱۲، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نوکلئوتید به ترتیب ۲۲۵، ۱۲۶، ۶۴ و ۶ عدد چهارچوب باز خواندنی بالادست مشاهده شد. در توالی‌هایی با حداقل طول ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ نوکلئوتید، *HvbZIP51.2* دارای بیش‌ترین تعداد چهارچوب باز خواندنی بالادست (به ترتیب ۳۶، ۲۵ و ۱۵ عدد) بود ولی چهارچوب باز خواندنی بالادست با بیش از ۳۰۰ نوکلئوتید طول فقط در ۶ ترانسکرپت (*HvbZIP7*، *HvbZIP12*، *HvbZIP21.1*، *HvbZIP21.2*، *HvbZIP57* و *HvbZIP70.2*) مشاهده شد. با وجود شیوع توالی‌های چهارچوب باز خواندنی بالادست در مولکول mRNA (۴۴/۹۶٪) در این مطالعه با در نظر گرفتن حداقل ۱۲ نوکلئوتید طول توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست، به‌طور مشخص وجود ۵

فراهم می‌کند. وجود چنین وضعیتی در مولکول‌های mRNA خانواده bZIP به ماهیت تنظیمی این خانواده مرتبط است. با این وجود، باید توجه داشت که فقط تعداد اندکی از عناصر تنظیمی پس از رونویسی شناسایی شده است (آروجو و همکاران (2012) و بهترین روش شناسایی این عوامل استفاده از ترکیب تجربیات آزمایشگاهی و مطالعات محاسباتی است.

توالی هدف برای sRNAها که در صورت لزوم قادر به حذف توالی چهارچوب باز خواندنی بالادست یا 5'-UTR هستند (چوربانوو و همکاران، 2005). البته تنوع و گستردگی عوامل تنظیمی در ساختار مولکول mRNA اعضا این خانواده امکان کنترل سریع و دقیق میزان تولید این نوع عوامل را در هر وضعیتی برای سلول و در پاسخ به تغییرات ناگهانی شرایط،

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۱-۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.