آنالیز ناحیه پروموتوری ژن H6H در گیاه *Brassica rapa* در شرایط *in silico*

احد هدایتی[۱]، پریناز جعفرپور[۱*]، مهدی محسنی آذر[۱]، پرستو همتی اصل[۱]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[*]نویسنده مسئول: parinazjaffarpour.94@gmail.com

چکیده

تروپان آلکالوئیدهایی مانند آتروپین و اسکوپولامین به دلیل اثر آنتی کولینرژیک، کاربردهای وسیعی در درمان بیماری‌هایی مانند آسم و تشنج دارند. ژن H6H یکی از ژن‌های مهم درگیر در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها می‌باشد. آنالیز ناحیه پروموتوری و افزایش اطلاعات در زمینه نحوه بیان شدن این ژن و یافتن عوامل مؤثر در افزایش یا کاهش بیان این ژن برای درک صحیح از مکانیسم و نحوه کار آن بسیار مفید خواهد بود. در این تحقیق توالی ناحیه پروموتوری این ژن در گیاه *Brassica rapa* برای یافتن سیس المنت‌ها (Cis-Elements) و موتیف های مربوط به عوامل رونویسی[۱] و یافتن تفاوت بین آن‌ها به‌صورت *in silico* مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نور یکی از عواملی است که باعث فعال شدن پروموتور این ژن می‌شود و تولید متابولیت ثانویه همچون آسکوپولامین را تحریک می‌کند. این پروموتور همچنین دارای موتیف های مانند MBS و HSE و ARE وTC-rich repeats بود که به ترتیب تحت تأثیر تنش‌های خشکی، گرما و تنش غیرهوازی و تنش‌های محیطی باعث تغییر میزان بیان این ژن می شوند. CGTCA-motif و TGACG-motif از عناصر تنظیمی می‌باشند که در پاسخ به هورمون متیل جاسمونات نقش دارند. متیل جاسمونات یکی از هورمون‌های مهم در گیاه می‌باشد که برای مقابله با تنش‌های زنده مفید است. موتیف O2-site در پاسخ به پروتئین zein می‌باشد و همچنین موتیف GARE-motif تحت تأثیر هورمون جیبرلین روی بیان ژن H6H تأثیر می‌گذارد.

کلمات کلیدی: **بیوانفورماتیک، ژن H6H، پروموتور، هورمون**

مقدمه

گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) گیاهی علفی از تیره Solanaceae بوده که در نواحی مختلف پراکنش داشته و به لحاظ داشتن تروپان آلکالوئیدها، از دیرباز در طب سنتی مورد توجه بوده است (Khatamsaz, 1998). بنابراین، محققان سعی در افزایش تولید این متابولیت‌های ثانویه با ارزش در مقیاس تجاری دارند. آتروپین و آسکوپولامین به‌طور عمده در سلول‌های ریشه جوان سنتز و به بخش‌های هوایی منتقل می‌شوند. در مسیر سنتز تروپان آلکالوئیدها در این گیاه ژن‌های زیادی تأثیر دارند که باعث تبدیل ترکیبات مختلف در طی این مسیر توسط آنزیم‌ها می‌شوند که از مهم‌ترین این آنزیم‌ها می‌توان به پوترسین N-متیل ترانسفراز (PMT) و هیوسیامین β-6 هیدروکسیلاز (H6H) اشاره کرد که آنزیم H6H باعث تبدیل هیوسیامین به آسکوپولامین می‌شود و به دلیل این‌که آسکوپولامین ارزش دارویی بالاتری از هیوسیامین دارد افزایش فعالیت این آنزیم بسیار مهم می‌باشد (Guoyin *et al.* 2008). عوامل متعددی از جمله محرک‌های زنده و غیر زنده می‌تواند بر روی میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها تأثیر گذاشته و باعث افزایش تولید ترکیبات دارویی شوند. از این محرک‌ها می‌توان به شرایط آب هوایی مثل نور و درجه حرارت، تنش‌های شوری، خشکی، غرقابی و اشعه ماورای بنفش و همچنین عوامل بیماری‌زا اشاره کرد. اما نکته مهم این می‌باشد که تأثیر این عوامل بر روی ژن‌های مختلف یکسان و مثبت نبوده و باید تک‌تک ژن‌ها از نظر تأثیرپذیری از

[1] -Transcription Factor

این عوامل مورد بررسی قرار گیرند. ناحیه پروموتوری یک ژن ناحیه ایست که برای شروع رونویسی از ژن لازم است. برای شروع رونویسی ابتدا باید مجموعه پیش آغاز که شامل تجمع RNA polymerase و عوامل رونویسی می‌باشد به وجود بیاید. در کنار این پروموتورها، توالی تنظیمی دیگری وجود دارد که افزاینده[۲]نام دارند و کمک می‌کنند تا رونویسی ژن کنترل شود تا میزان رونویسی کم یا زیاد شود. از انجاییکه ناحیه پروموتوری ژن H6H در گیاه بذر البنج و خیلی از گیاهان دیگر توالی یابی نشده است لذا از ناحیه پروموتوری ارتولوگ این ژن در گیاه *Brassica rapa* که توالی آن موجود است استفاده گردید. آنالیز ناحیه پروموتور این ژن در گونه *Brassica rapa* برای یافتن عوامل مؤثر بر افزایش یا کاهش بیان این ژن حائز اهمیت می‌باشد. در ارتباط با نحوه تنظیم بیان ژن H6H و عوامل مؤثر در آن تاکنون گزارشی وجود نداشته است. در تحقیق حاضر ناحیه پروموتوری ژن H6H در گیاه *Brassica rapa* مطالعه و موتیف‌های موجود در توالی پروموتور آن و عوامل تأثیرگذار در میزان بیان آن با استفاده از آنالیزهای *in silico* بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

برای یافتن توالی پروموتور H6H از بانک اطلاعاتی *Phytozome* به آدرس www.phytozom.com استفاده شد. ازآنجاکه توالی پروموتوری H6H بذرالبنج شناسایی نشده است، توالی پروموتوری H6H در گیاه *Brassica rapa* ارزیابی شد . ۲۰۰۰ نوکلئوتید از توالی ناحیه پروموتور انتخاب شد و در سایت PLANTCARE به آدرس (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) جهت جستجوی موتیف ها و cis-element های موجود در این توالی‌ها وارد شد. سپس برای آنالیزهای آماری و رسم نمودارها از نرم افزار excel استفاده گردید. نام موتیف، عملکرد موتیف و توالی آن در هر گیاه در جدول شماره۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات توالی و عملکرد موتیف‌های گیاه *Brassica rapa*

نام موتیف	توالی موتیف	عملکرد موتیف	تعداد موتیف
A-box	CCGTCC	ایزومر سیس عناصر تنظیمی	۱
AAGAA-motif	gGTAAAGAAA	-	۱
ACE	AAAACGTTTA	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به نور	۱
AE-box	AGAAACAT	درگیر در پاسخ به نورDNAبخشی از یک ماژول	۱
	TGGTTT	از عناصر تنظیم‌کننده برای القای بی‌هوازی در مواقع ضروری	۲
ATC-motif	AGTAATCT	درگیر در پاسخ به نورDNAبخشی از یک ماژول	۱
ATCT-motif	AATCTAATCT	درگیر در پاسخ به نورDNAبخشی از یک ماژول	۲
Box 4	ATTAAT	درگیر در پاسخ به نورDNAبخشی از یک ماژول	۱
Box I	TTTCAAA	عناصر تنظیمی نور	۲
CAAT-box	CAAT	سیس المنت‌های متداول در پروموتر و مناطق افزاینده	۳۸
CCGTCC-box	CCGTCC	عناصر درگیر در بیان عملکردهای خاص مریستم	۱

[2] Enhancer

CGTCA-motif	CGTCA	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به هورمون متیل جاسمونات	۵
G-box	CACGAC	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به نور	۲
GARE-motif	TCTGTTG	عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به هورمون جیبرلین	۲
HSE	AAAAAATTTC	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به تنش حرارتی	۱
I-box	cCATATCCAAT	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به نور	۱
MBS	TAACTG	MYB جایگاه اتصال درگیر در تنش خشک‌سالی	۱
MRE	AACCTAA	MYB جایگاه اتصال درگیر در نور	۲
O2-site	GATGATGTGG	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به متابولیسم زئین	۱
Skn-1_motif	GTCAT	عناصر تنظیم‌کننده درگیر در بیوسنتز آندوسپرم	۵
TATA-box	TTTTA	از عناصر پروموتر در اطراف هسته برای شروع رونویسی	۵۶
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در به تنش‌های دفاعی پاسخ	۱
TCT-motif	TCTTAC	عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به نور	۱
TGACG-motif	TGACG	ایزومر سیس از عناصر تنظیم‌کننده درگیر در پاسخ به هورمون متیل جاسمونات	۵
Unnamed__2	AACCTAACCT		۱

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آنالیز عناصر تنظیمی پروموتور ژن H6H در گونه‌ی *Brassica rapa* نشان داد که بیشتر این عناصر تنظیمی از نوع پاسخ دهنده به نور بودند (حدود ۱۰درصد). در نتیجه بیان ژن H6H در اثر محرک نور تحت تأثیر قرارگرفته و بیان آن تغییر می‌کند. این موضوع نشان می‌دهد که می‌توان از نور به‌عنوان یک نوع القا کننده برای افزایش بیان ژن به‌تنهایی یا در ترکیب با القاکننده‌های دیگر برای تغییر بیان استفاده گردد. CGTCA-motif و TGACG-motif از عناصر تنظیمی می‌باشند که در پاسخ به هورمون متیل جاسمونات نقش دارند. در تحقیقی که رجبی و همکاران انجام دادند، برای تولید متابولیت ثانویه هایپرسین در گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum*) به محیط کشت MS متیل جاسمونات اضافه کردند و نتایج افزایش چشمگیری را در میزان این متابولیت ثانویه نشان داد. بنابراین استفاده از متیل جاسمونات به‌عنوان محرکی برای تولید متابولیت ثانویه هیوسیامین6-β هیدروکسیلاز (H6H) مؤثر خواهد بود. موتیف O2-site در پاسخ به هورمون zein نقش دارد و همچنین موتیف GARE-motif تحت تأثیر هورمون جیبرلین می‌باشد. موتیف های MBS، HSE، ARE وTC-rich repeats به ترتیب در شرایط تنش‌های خشکی، گرما و تنش غیرهوازی و تنش‌های محیطی نقش دارند و باعث تغییر بیان می‌شوند. شناخت عناصر تنظیمی موجود در پروموتورها، در انتخاب محرک مناسب جهت تولید متابولیت ثانویه مورد نظر در گیاه مؤثر می‌باشد و باعث صرفه‌جویی در وقت و هزینه برای آزمون مواد و محرک‌های مختلف برای افزایش بیان ژن می‌شود. طبق نتایج این پژوهش می‌توان

به‌صورت ترکیبی از محرک‌هایی مانند نور و تنش‌های محیطی و هورمون متیل جاسمونات برای افزایش بیان ژن H6H استفاده کرد.

منابع

Dill, A.,Thomas, S.G., J. Hu., Steber, C.M. and Sun, T. P. 2004. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. Plant Cell 16:1392-1405.

Goodstein, D. M., Shu, Sh., Howson, R., Neupane, R. D., Hayes, J., Fazo, T., Mitros, W., Dirks, U., Hellsten, N. and Putnam, D. S. 2004. A comparative platform for green plant genomics.

Guoyin, K,. Ang, Z,. Yingying, G,. Li Li, L,. Xiuqin, L,. Cong, L. and Jianbo, X. 2012. Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase I and hyoscyamine-6b-hydroxylase. Mol. BioSyst., 8, 2883–2890

Khatamsaz, M. 1998. Flora of Iran (Solanaceae No. 24). Research Institute of Forests and Rangeland Press, Tehran, 116p

Lescot, M., Dhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y. and Van, Y. 2000. Plant CARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences . Jan 1;30(1):325-327.

In Silico Analysis of the Promoter Region of H6H Gene in the Plant *Brassica rapa*

Hedayati Ahad, Jaffarpour Parinaz,Mohseniazar Mahdi,Hemmati Asl Parastoo
*Horticultural Sciences Department, Urmia University, Urmia, Iran.
*Corresponding Author: parinazjaffarpour.94@gmail.com

Abstract

Tropane alkaloids such as atropine and scopolamine have wide application in the treatment of diseases such as asthma and antispasmodic due to anticholinergic agents. H6H gene is one of the important genes involved in the biosynthesis pathways of tropane alkaloids .Analysis of the promoter region and gain information about expression of this gene and identify factors that increase or decrease its expression is necessary for understanding the mechanism . In this study, the sequence of the promoter region of the H6H gene in *Brassica rapa* to find cis-elements (Cis-Elements) and motifs of transcription factors (Transcription Factor) and find the differences between them were analyzed *in silico*. The result show that light is one factor that activates this gene promoter and stimulated secondary metabolites production such as scopolamine. This promoter also contains motifs such as MBS, ARE HSE and TC-rich repeats that under drought, heat and anaerobic stress (Respectively) and environmental stress cause change in the expression of this gene. CGTCA-motif and TGACG-motif are regulatory elements that play a role in response to the methyl jasmonate hormones. Methyl jasmonate one of the most important hormone in the plant that is useful for contrast against biotic stresses. O2-site motif in response to zein protein is effective and also GARE-motif under the influence of gibberellin hormone is effective on expression of H6H gene.

***Keywords*: Bioinformatics, H6H Gene, Promoter, Tropan alkaloids**