

آنالیز بیوانفورماتیکی و شناسایی پلی‌مورفیسم‌های جدید نوکلئوتیدی اگزون شماره ۲ ژن MHC-DRB1 در گوسفندان نژاد بومی قزل

رحمان حاجی‌علیزاده ولیلو^{۱*}، سید عباس رافت^۲، آرش جوانمرد^۳ و ابوالفضل بزرگری^۴

۱، ۲، ۳) به ترتیب دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴) دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

شماره صفحات

۵۹-۷۲

*نویسنده مسئول: Hajjalizadeh20@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱

چکیده

هدف از این مطالعه شناسایی پلی‌مورفیسم‌های جدید نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۲ ژن MHC-DRB1 است که با ایجاد مقاومت ژنتیکی نسبت به نماتدهای دستگاه گوارشی در گوسفندان نژاد بومی قزل ایرانی در ارتباط است. در این تحقیق از ۱۰۰ بره‌ی نر ۴ تا ۶ ماهه نژاد بومی قزل استفاده شده بود که به‌طور تصادفی از میان ۵ گله مردمی در سطح استان آذربایجان-شرقی انتخاب شده بودند و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتیدی مقدماتی و ارتباط آن‌ها با تعداد تخم‌انگل شمارش شده در مدفوع، بررسی شد. متعاقباً، ۴ نمونه محصول PCR از بره‌های هر گله (یک نمونه از هر گله) به‌طور تصادفی انتخاب و توالی‌یابی شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در بانک ژن NCBI برای نژادهای مختلف از سراسر جهان، مقایسه شدند. در نتایج حاصل از بررسی هم‌ردیفی‌ها، ۹ پلی‌مورفیسم جدید (۲ جهش حذفی، ۵ جهش جایگزینی و ۲ جهش اضافه شدن نوکلئوتید) در توالی‌های اگزون شماره ۲ ژن MHC-DRB1 در نژاد قزل شناسایی شد. وجود این پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتیدی جدید باعث تغییر توالی‌های آمینواسیدی شده و در نتیجه منجر به ایجاد تغییرات در ساختار شکاف اتصال پپتیدهای بیگانه در پروتئین هتروداایمریک DR موجود در غشاء سلول‌های ارائه‌کننده‌ی آنتی‌ژن‌ها می‌شود به‌طور کلی احتمالاً وجود پلی‌مورفیسم‌های جدید در اگزون شماره ۲ این ژن باعث تغییر ساختار پروتئین مربوط به آن شده و این موضوع نیز باعث افزایش اعتبار ارتباط بین پلی‌مورفیسم شناسایی شده و صفت مورد بررسی می‌شود.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم نوکلئوتیدی جدید، ژن MHC-DRB1، نماتدهای دستگاه گوارش و گوسفند نژاد بومی قزل ایرانی.

مقدمه

نتایج ارزیابی ژنتیکی پاسخ‌های ایمنی در زمینه‌ی بروز حساسیت و یا مقاومت نسبت به پاتوژن‌ها در گوسفند کم‌تر تحقیق شده است. پرورش گوسفند وابسته به مرتع بوده و این حیوان، چرا از علوفه کوتاه را به علوفه بلند و خشبی ترجیح می‌دهد. بنابراین تقریباً ۱۰۰ درصد از دام‌هایی که چرا می‌دارند در معرض عفونت و آلودگی به لارو نماتدهای دستگاه گوارشی هستند (Sharon, 2003). در مبارزه با نماتدهای دستگاه گوارش استفاده از داروهای ضدانگل مرسوم بوده، اما با گذر زمان و کاربری طولانی مدت و بی‌رویه از این داروها، منجر به بروز مقاومت ژنتیکی در انگل‌ها و ایجاد سویه‌های مقاوم انگلی نسبت به داروهای ضدانگل در دام‌ها شده و همچنین باعث آلودگی مراتع و از همه مهم‌تر، بحث امنیت غذایی و تأثیر این داروها بر سلامت انسان می‌باشد (Hazelby *et al*, 1994). برای مقابله با این مشکل، یک راه کار ساده و ارزان استفاده از تنوع داخل نژادی و شناسایی، انتخاب و پرورش دام‌های مقاوم به انگل (به‌عنوان والدین نسل بعد) با استفاده از نشانگرهای مولکولی در اولویت محورهای تحقیقاتی بوده است، چراکه استفاده از صفات فنوتیپی زمان‌بر بوده و مقرون به صرفه نمی‌باشد و همچنین برای اجرای این روش بایستی به‌طور متوالی رکوردگیری از نسل‌های مختلف و از خویشاوندی‌های مختلف صورت گیرد که این کار نیز باعث افزایش فاصله نسلی و کاهش میزان پاسخ به انتخاب می‌شود (Matika *et al*, 2011). لوکوس MHC-DR یکی از لوکوس‌های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی^۱ بر روی کروموزوم شماره‌ی ۲۰ بوده و پروتئین‌های هتروداایمریک ($DR\alpha$ و $DR\beta$ ، که هریک از این پروتئین‌ها نیز شامل دومین‌های $\alpha 1, \alpha 2$ و $\beta 1, \beta 2$ می‌باشند) موجود در غشاء سلول‌های B و سلول‌های ارائه‌کننده‌ی آنتی‌ژن‌ها (ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های لانگرهانس) را کد می‌کنند و در ایجاد پاسخ ایمنی نقش دارد و آگزون شماره‌ی ۲ ژن MHC-DRB1 نیز قسمتی از شکاف اتصال پپتیدهای بیگانه (دومین $\beta 1$) را کد می‌کند که هنگام اتصال پپتیدهای بیگانه و آنتی‌ژن‌ها به این شکاف می‌تواند توسط سلول‌های $CD4^+ T$ شناسایی شوند (Schook & Lamont, 1996). تا به امروز در مطالعات مختلف انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان که در آنها پلی‌مورفیسم آگزون شماره‌ی ۲ ژن MHC-DRB1 در نژادهای مختلف گوسفند با استفاده از تکنیک‌های مختلف بررسی شده، به این نتیجه رسیده‌اند که آگزون شماره‌ی ۲ این ژن بشدت پلی‌مورفیک بوده (Nikbakht *et al*, 2009; Jamshidi *et al*, 2012; Nikbakht *et al*, 2013; Sohrabi *et al*, 2011; Konnai *et al*, 2003; Gruszczyńska *et al*, 2005) و ثابت شده که وجود پلی‌مورفیسم در این ژن با ایجاد مقاومت به انگل‌های داخلی مختلف و نماتدهای دستگاه گوارش، صفات رشد و ایجاد مقاومت نسبت به سایر بیماری‌ها در نژادهای مختلف نیز مرتبط است (Hajjalizadeh Valilou *et al*, 2015; Figueroa *et al*, 2011; Schwaiger *et al*, 1995; Shen *et al*, 2005).

¹ - MHC: Major Histocompatibility complex

گوسفند نژاد (2014; Ashrafi et al, 2014; Gruszczynska et al, 2005; Larruskain et al, 2012; Li et al, 2011). قزل یکی از ۲۷ نوع اکوتیپ گوسفند در ایران با جثه بزرگ، دنبه‌دار، پشم رنگین و ضخیم بوده و بطور غالب در اکثر مناطق شمال غرب کشور توسط دامداران پرورش داده می‌شود (Tavakolian, 2000; Mason, 1996). در پژوهش قبلی انجام شده توسط محقق (Hajjalizadeh Valilou et al, 2015) به دلیل وجود محدودیت‌ها در شناسایی سایر جهش‌های تک نوکلئوتیدی در طول توالی اگزون شماره ۲ این ژن، انگیزه‌ای برای انجام تحقیق حاضر صورت گرفت تا سایر جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های جدید و مختص این نژاد گوسفند ایرانی مورد بررسی قرار گیرد. هدف از این مطالعه شناسایی پلی‌مورفیسم‌های جدید در اگزون شماره ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* است که با ایجاد مقاومت ژنتیکی نسبت به نماتدهای دستگاه گوارشی در گوسفندان نژاد قزل ایرانی در ارتباط است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۰۰ بره‌ی ۳ تا ۶ ماهه نژاد بومی قزل استفاده شد که بطور تصادفی از میان ۵ گله مردمی مرتع‌رو در سطح استان آذربایجان شرقی انتخاب شده بودند. در مطالعات قبلی محقق بر روی همین بره‌ها، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP پلی‌مورفیسم‌های مقدماتی و ارتباط آن‌ها با تعداد تخم‌انگل مورد مطالعه قرار گرفته بود (حاجی‌علیزاده و لیلو و همکاران ۲۰۱۵). در تحقیق حاضر نیز از بین ۵ گله مورد مطالعه ۴ نمونه محصول PCR از بره‌های هر گله (یک نمونه از هر گله) بطور تصادفی انتخاب شده و توسط شرکت Bioneer کره توالی‌یابی شدند. افزوده‌سازی اگزون شماره ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* با استفاده از دو پرایمر گزارش شده توسط آمیلز و همکاران در سال ۱۹۹۵ که بترتیب دارای توالی نوکلئوتیدی F: 5-TAT CCC GTC و R: 5-TCG CCG CTG CAC ACT GAA ACT CTC-3 بودند (توالی‌های پرایمری قابل اتصال به توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به اگزون شماره ۲ در گوسفند بوده که بطور نمونه یکی از آن‌ها دارای شماره‌ی دسترسی LN735537 می‌باشد) و با استفاده از محصول PCR Master Mix ساخت شرکت سیناژن و توسط دستگاه ترموسایکلر (مارک Biometra مدل 3.26 ساخت کشور آلمان) انجام شد. برای تهیه محصول PCR با حجم ۲۶ μL بمقدار ۵۰-۱۰۰ ng از DNA الگو، ۱۲/۵ μL آب و ۱۲/۵ μL از محصول PCR Master Mix با غلظت ۱x استفاده شد که این محصول حاوی mM/μL Taq DNA polymerase: ۵U/μL و dNTPs: ۱۰mM/μL، MgCl₂: ۲۵ بود؛ واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ به مدت ۴ دقیقه، و سپس انجام هر یک از مراحل واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۶۱ درجه و به مدت ۵۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۱ دقیقه، به تعداد ۳۵ چرخه و در نهایت نیز انجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۵ دقیقه (Amills et al, 1995). محصولات PCR توسط الکتروفورز افقی و ترانس تغییر ولتاژ PAC1000 (ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا) در ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۹۰ Vol به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شده و توسط دستگاه ژل داکيومنت عکسبرداری شدند. هضم آنزیمی محصولات PCR نیز توسط ۱۰ واحد

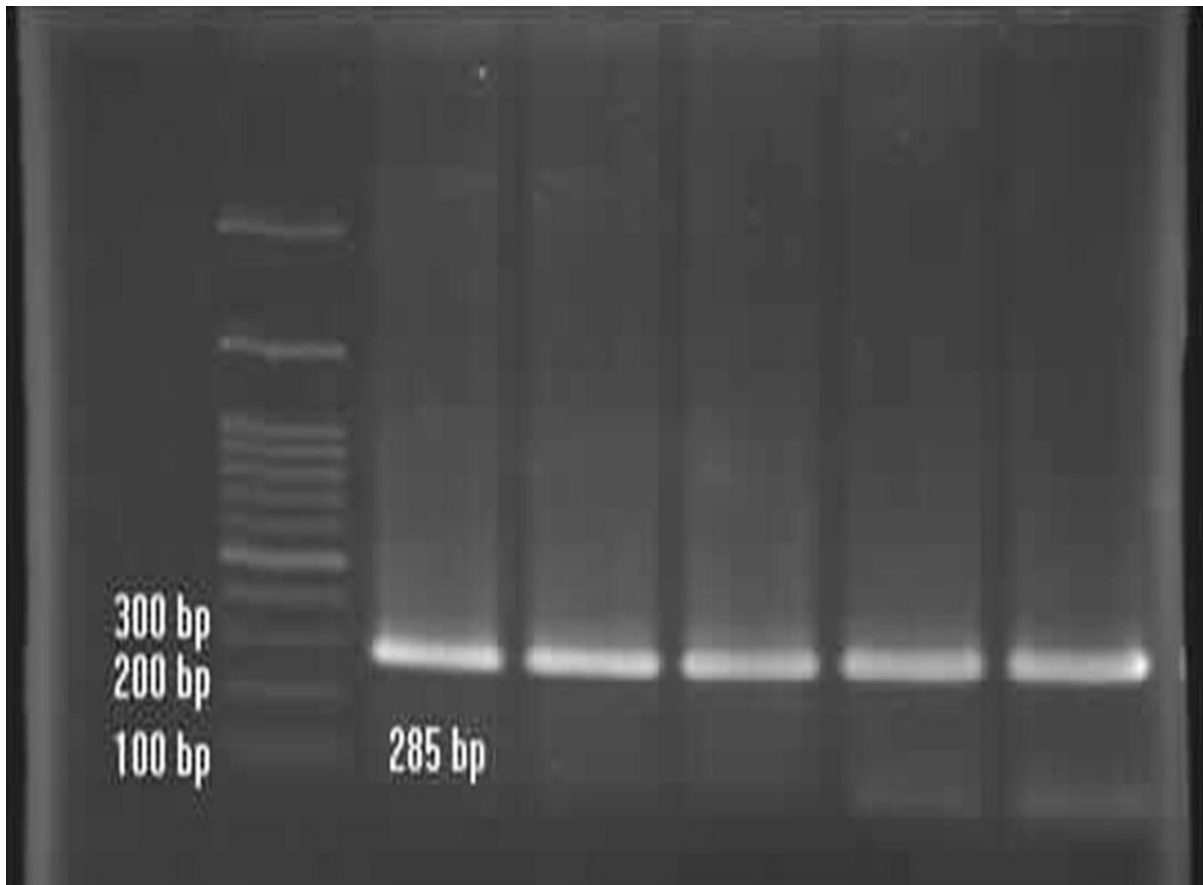
از هریک از آنزیم‌های *TaqI* و *PstI* (محصول شرکت Thermo Scientific) و به‌ترتیب در دماهای ۳۷ و ۶۵°C و به‌مدت ۱۲ ساعت انجام شد. مشخصات هریک از آنزیم‌ها در جدول ۳ آورده شده است. محصولات هضم شده توسط آنزیم‌ها (آل‌های تولید شده) با استفاده از الکتروفورز افقی و ژل آگاروز ۲ و ۳٪ بمدت ۱ ساعت در ولتاژ ۹۰ Vol از هم جدا شدند. اندازه محصولات PCR و اندازه آل‌های تولید شده توسط هضم با آنزیم‌ها نیز براساس DNA سایز مارکر ۱۰۰bp تعیین شدند. ژل‌ها نیز توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و عکسبرداری شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی (توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده برای هر نمونه محصول PCR) با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده (توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده برای اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar* DRB1) در بانک ژن NCBI برای نژادهای مختلفی از سراسر جهان، (با استفاده از نرم‌افزار آنلاین NCBI Nucleotide Blast) مقایسه شدند. برای انجام بررسی‌های فواصل تکاملی و روابط فیلوژنتیکی از نرم‌افزارهای MEGA5 version 5.05 (تامورا) و همکاران (۲۰۱۱) و Finch TV Free version 1.4.0 و نرم‌افزار آنلاین MAFFT-a multiple sequence alignment استفاده شد. درخت و روابط فیلوژنتیکی و فواصل تکاملی نیز با استفاده از مدل Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987;) و با ۱۰۰۰ boot strap (Schaschl et al, 2004) رسم شدند (Singh et al, 2012; Tamura et al, 2011). ساختار سه بعدی پروتئین حاصل از اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar* MHC-DRB1 نیز با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ارائه شده توسط دانشگاه میشیگان کشور ایالات متحده آمریکا؛ *I-TASSER: Protein structure and function prediction* از روی توالی اسید آمینه‌ای ترجمه شده از روی توالی‌های نوکلئوتیدی برای یکی از نمونه‌های توالی‌یابی شده پیش‌بینی شد.

نتایج و بحث

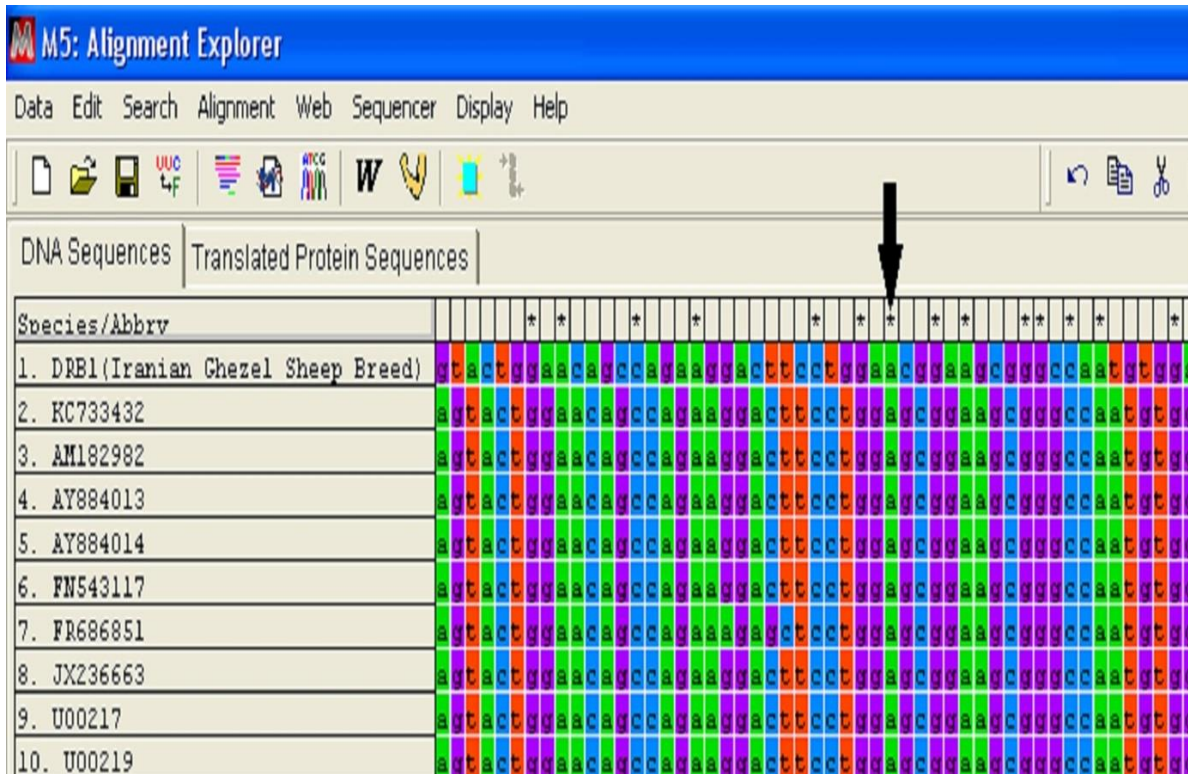
در این مطالعه افزوده‌سازی اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar* MHC-DRB1 با طول باند ۲۸۵bp بخوبی و بدون وجود هیچ باند غیراختصاصی انجام شده بود (شکل-۱). در این مطالعه هضم آنزیمی با آنزیم *PstI* منجر به تولید باندهای به طول ۲۴۱ و ۴۴bp شده و هضم آنزیمی با آنزیم *TaqI* نیز منجر به تولید باندهایی به طول ۱۶۳ و ۱۲۲ جفت‌باز شد. با انجام هضم آنزیمی توسط آنزیم *PstI* فقط دو نوع ژنوتیپ A1A1 و A1A2 مشاهده شد و متعاقب آن نیز با آنزیم *TaqI* نیز فقط دو نوع ژنوتیپ B1B1 و B2B2 مشاهده شد که ژنوتیپ B2B2 نیز تنها در یک بره مشاهده شد و در آنالیزهای آماری نیز دخالت داده نشد. تصاویر مربوط به ژنوتیپ‌های مشاهده شده در شکل ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌های A1A1 و A1A2 در جمعیت مورد بررسی به‌ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۲۷ بوده و همچنین فراوانی آل‌های A1 و A2 نیز به‌ترتیب ۰/۸۶۵ و ۰/۱۳۵ بوده است. در نتایج حاصل از بررسی همدردی‌ها، ۹ پلی‌مورفیسم جدید (۲ جهش حذفی، ۵ جهش جایگزینی و ۲ جهش اضافه شدن نوکلئوتید) در توالی‌های اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar* MHC-DRB1 (در هر ۴ نمونه محصول PCR توالی‌یابی شده) شناسایی شد. در شکل‌های ۳ تا ۷ به ترتیب تمامی پلی‌مورفیسم‌های جدید شناسایی شده نشان داده شده‌اند. با توجه به این شکل‌ها در شکل ۳،

¹- National Center for Biotechnology Information

نوکلئوتید A حذف شده و همچنین در همین نمونه در شکل ۴ نیز نوکلئوتید G در اثر جهش جایگزینی همجنس تبدیل به نوکلئوتید A شده و همینطور در نمونه‌ی دیگری که در شکل شماره ۵ نشان داده شده نوکلئوتید A نیز به G تغییر کرده و نوکلئوتید C نیز در این نمونه اضافه شده است. در شکل ۶ و در نمونه دیگری نیز نوکلئوتید A حذف شده و در نهایت در نمونه چهارم و در شکل ۷ نیز نوکلئوتیدهای T و C طی جهش‌های جایگزینی همجنس به نوکلئوتیدهای C و T تغییر کرده و همچنین نوکلئوتید A نیز طی جهش جایگزینی ناهمجنسی به نوکلئوتید C تغییر کرده و همینطور در این نمونه نیز نوکلئوتید C به توالی نوکلئوتیدی اضافه شده است. روابط تکاملی و درخت فیلوژنتیک بین گوسفندان قزل ایرانی و سایر نژادهای اهلی دنیا (براساس شماره‌ی دسترسی آنها) در شکل ۸ آورده شده است. پلی‌مورفیسم‌های جدید شناسایی شده در تمامی نمونه‌ها باعث تغییر توالی اسیدآمینهای پروتئین مربوطه (زنجیره‌ی β شکاف اتصال پپتیدهای بیگانه) می‌شود. ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین حاصل از توالی نوکلئوتیدی غیرموتانت و موتانت اگزون شماره‌ی ۲ ژن Ovar MHC-DRB1 در شکل ۹ نشان داده شده است.

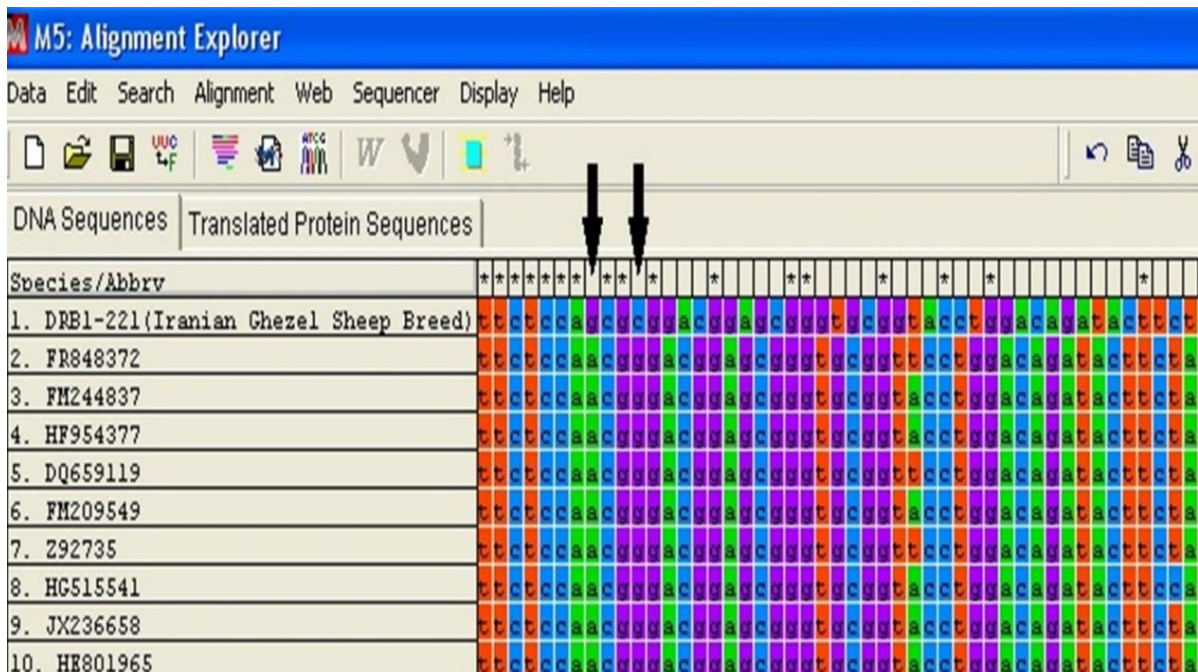


شکل ۱- نتایج محصول PCR
Figure 1, PCR product results



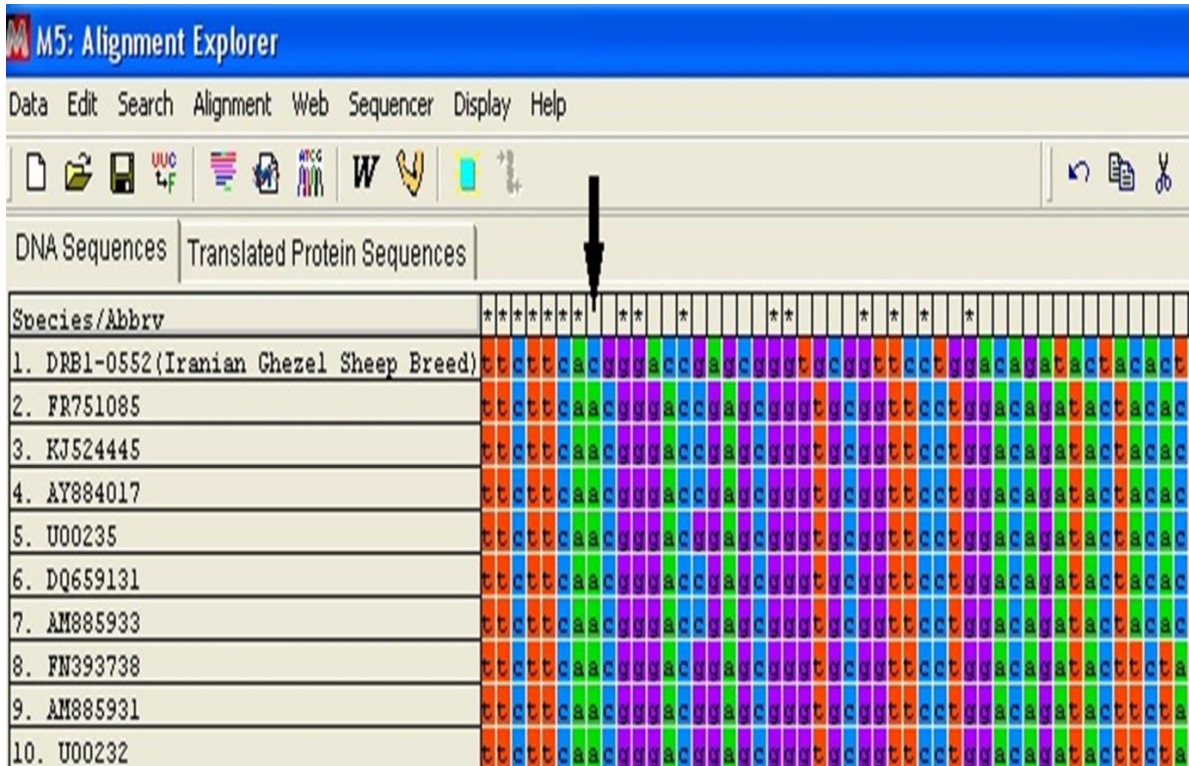
شکل ۴- وقوع جهش جایگزینی و تبدیل نوکلئوتید G به نوکلئوتید A

Figure 4. Replacement mutation occurrence and nucleotide G substitute to nucleotide A

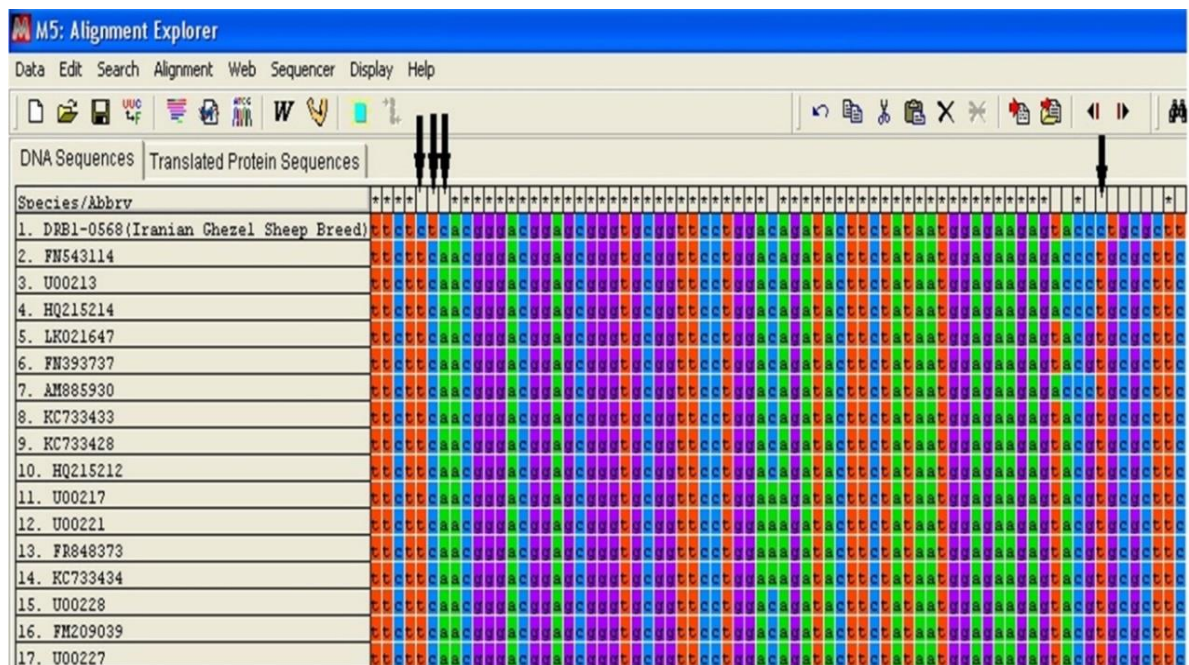


شکل ۵- وقوع جهش جایگزینی همجنس و تبدیل نوکلئوتید A به نوکلئوتید G و اضافه شدن نوکلئوتید C به توالی

Figure 5. Replacement mutation occurrence and nucleotide A substitute to nucleotide G and inserted of the nucleotide C

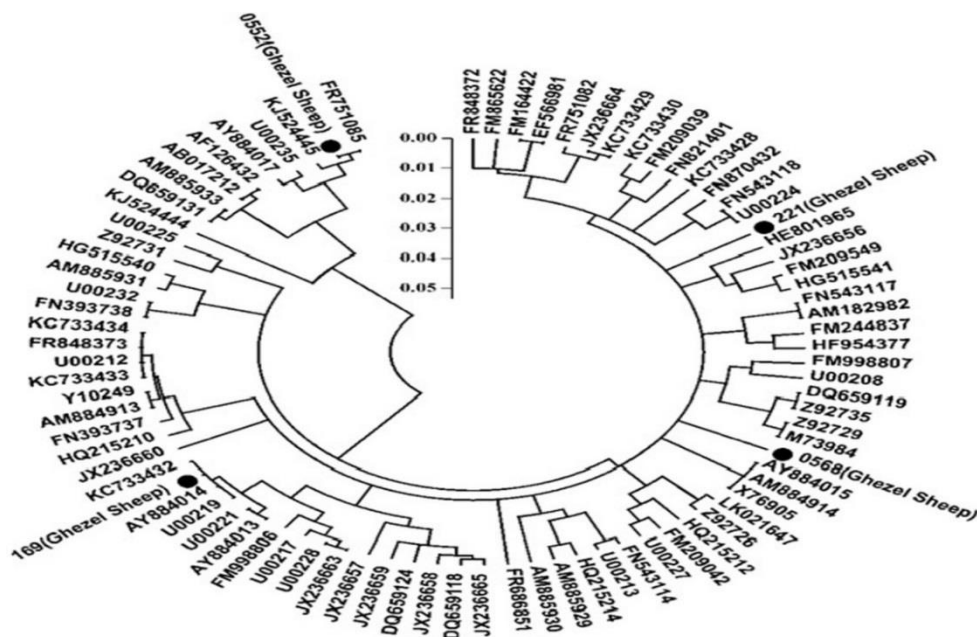


شکل ۶- حذف شدن نوکلئوتید A از توالی
Figure 6. A nucleotide deletion from the sequence



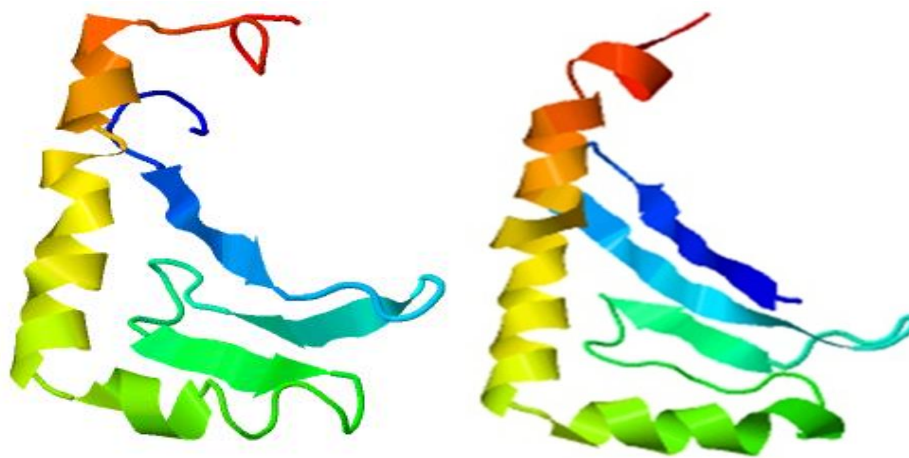
شکل ۷- وقوع جهش جایگزینی همجنس و تبدیل نوکلئوتید T و C به نوکلئوتید C و T، همچنین وقوع جهش جایگزینی ناهمجنس و تبدیل نوکلئوتید A به نوکلئوتید C و اضافه شدن نوکلئوتید C به توالی

Figure 7. The Replacement occurrence of uniform mutation and the substitute of nucleotide T and C to nucleotide C and T, as well as the occurrence of non-uniform replacement mutation and the substitute of nucleotide A to nucleotide C and the insertion of nucleotide C to the sequence



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک و روابط تکاملی بین گوسفند نژاد قزل (علامت سیاه رنگ) ایرانی و سایر گوسفندان اهلی دنیا از نظر میزان شباهت در توالی نوکلئوتیدی اگزون شماره ۲ ژن MHC-DRB1

Figure 8. Phylogenetic tree and evolutionary relationships among the Ghezel (black sign) and other domestic ovine sheep of similarity in the MHC-DRB1 gene exon number 2 nucleotide sequences



شکل ۹- ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین حاصل از توالی نوکلئوتیدی غیر جهشی (راست) و جهش یافته (چپ) اگزون شماره ۲ ژن *Ovar* MHC-DRB1

Figure 9. The predicted 3D structures for the protein product of the gene *Ovar* MHC-DRB1 sequence nucleotide from the non-mutant (right hand side) and mutant (left hand side)

ژن *Ovar* MHC-DRB1 دارای ۵ اگزون و ۵ اینترون بوده و طول توالی آن ۱۱۹۷۹ جفت‌باز است (Ballingall *et al.*, 2008)، این ژن تنوع بالایی دارد و عمدتاً بالاترین میزان پلی‌مورفیسمی نیز در اگزون شماره ۲ آن متمرکز شده است. بنابراین وجود پلی‌مورفیسمی بالا در اگزون شماره ۲ این ژن، پروتئین‌های حاصل از آن را در اتصال به آنتی‌ژن‌های پپتیدی خاصی

متمایز می‌کند (شوگ و لامونت ۱۹۹۶). نتایج آنالیز مولکولی تحقیق حاضر نشان داد که اندازه محصول PCR حاصل از افزوده-سازی اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* و همینطور طول آلل‌ها و تعداد آلل مشاهده شده در نتیجه هضم با هر دو آنزیم (*TaqI* و *PstI*) نیز با نتایج به‌دست آمده در مقاله منبع مطابقت دارد (Amills *et al*, 1995). همچنین مشابه با نتایج مندرج در مقاله منبع، وجود جهش در جایگاه برش آنزیم‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر نیز مسلماً باعث ایجاد تغییر در توالی اسید آمینه‌ای (تبدیل اسید آمینه Phe و Tyr به Val و یا Cys) پروتئین مربوطه شده است. با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با به‌کارگیری آنزیم‌های مختلف، پلی‌مورفیسم اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* در نژادهای ایرانی و خارجی همچون افشاری، زل، شال، سنگسری، ماکویی، سافوک بررسی شده و تقریباً در تمامی این مطالعات به این نتیجه رسیده‌اند که اگزون شماره‌ی ۲ این ژن دارای تنوع بالا می‌باشد (Ashrafi *et al*, 2014; Jamshidi *et al*, 2011; Konnai *et al*, 2013; Nikbakht *et al*, 2011; Sohrabi *et al*, 2013). چراکه این ژن به‌شدت پلی‌مورفیک بوده و بالاترین میزان پلی‌مورفیسمی نیز مربوط به اگزون شماره‌ی ۲ این ژن می‌باشد و وجود این پلی‌مورفیسمی بالا در توالی مربوط به اگزون شماره‌ی ۲ با اتصال و ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا و پپتیدهای بیگانه همراه است (Konnai *et al*, 2003; Schook & Lamont, 1996). همچنین پژوهش‌های مختلف نشان داده که این ژن نقش مهمی در ایجاد مقاومت نسبت به انگل‌های داخلی مختلف بازی می‌کند، به‌طوری‌که در تحقیق انجام شده توسط Li *et al* (2011) در چین که با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با انجام هضم آنزیمی توسط پنج آنزیم مختلف (*HinII* و *MvaI*, *HaeIII*, *SacI*, *SacII*) ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده در اگزون شماره‌ی ۲ ژن *MHC-DRB1* و بیماری انگلی کیست هیداتیدوزیس را در سه نژاد قزاق (Kazakh)، دولانگ (Duolang) و مرینوس چینی بررسی کرده و متوجه شدند که ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده در اگزون شماره‌ی ۲ این ژن (در گوسفندان سالم) دارای رابطه معنی‌داری با مقاومت نسبت به این بیماری انگلی می‌باشند ($P < 0.01$). در تحقیق مشابه دیگر که توسط شن و همکاران (۲۰۱۴) در چین انجام شد، با استفاده از PCR-RFLP و با بکاربردن همین آنزیم‌ها برای بار دوم پلی‌مورفیسم اگزون شماره‌ی ۲ ژن *MHC-DRB1* را در گوسفندان مرینوس چینی بررسی کرده و این‌بار ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده را با بیماری انگلی اکینوкокوس کیستی (Cystic Echinococcosis) بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده در اگزون شماره‌ی ۲ این ژن در گوسفندان سالم رابطه معنی‌داری ($P < 0.05$) با فنوتیپ مقاومت نسبت به این بیماری انگلی دارد. تحقیق حاضر نیز با شناسایی سایر جهش‌های موجود در طول توالی اگزون شماره‌ی ۲ این ژن (که با محدودیت‌هایی موجود در انجام تکنیک PCR-RFLP قابل شناسایی نبودند)، نتایج بدست آمده توسط این محققان را تأیید کرده و نشان می‌دهد که ژن *MHC-DRB1* و اگزون شماره‌ی ۲ در نژاد قزل نیز به‌شدت پلی‌مورفیک بوده و نقش مهمی را در سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت و یا حساسیت به انگل‌های داخلی و سایر بیماری‌ها بازی می‌کند. در مطالعات مختلفی که با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با بکارگیری

آنزیم‌های مختلف به بررسی پلی‌مورفیسم‌های مختلف در اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* در نژادهای ایرانی و خارجی پرداخته شده است فقط با اتکاء به تکنیک PCR-RFLP پلی‌مورفیسم‌های موجود در جایگاه برش یک آنزیم خاص بررسی شده و سایر جهش‌های محتمل موجود در طول توالی نیز با احتمال خیلی زیاد دور از چشم مانده و قابل شناسایی با آنزیم بکار رفته نبوده است. در تحقیق حاضر نیز علاوه بر بررسی تنوع موجود در جایگاه برش دو آنزیم *PstI* و *TaqI* سایر جهش‌های محتمل موجود در طول توالی اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* که ممکن است توسط آنزیم‌های بکار رفته قابل شناسایی نبوده باشد نیز با انجام توالی‌یابی شناسایی شده است و صحت وجود پلی‌مورفیسمی بالا را در این ژن را تأیید می‌کند. در مطالعات مختلف انجام شده در سراسر جهان ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌ها و جهش‌های موجود در اگزون شماره‌ی ۲ ژن *MHC-DRB1* و مقاومت به برخی از بیماری‌ها و انگل‌های داخلی مختلف در نژادهای مختلف دنیا شناسایی شده است (Hajjalizadeh Valilou *et al*, 2015; Figueroa *et al*, 2011; Larruskain *et al*, 2012; Sayers *et al*, 2005;) (Schwaiger *et al*, 1995). شناخت پلی‌مورفیسم‌های جدید در نژادهای بومی احتمال پیدا کردن ارتباط بین این جهش‌های و تنوع موجود در صفت بررسی را افزایش خواهد داد، چراکه پلی‌مورفیسم‌های جدید مختص ساختار ژنتیکی نژاد مورد بررسی بوده و ارتباط بین یک پلی‌مورفیسم و صفت مورد بررسی زمانی اعتبار بالایی خواهد داشت که جهش‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در منطقه‌ی اگزون بوده و با ایجاد تغییر در کدون اسید آمینه‌ی مربوطه بیشترین تأثیر را روی ساختار فضایی پروتئین گذاشته و در نتیجه موجب تغییر عملکرد مورد انتظار آن شود.

نتیجه‌گیری

اگزون شماره‌ی ۲ ژن *Ovar MHC-DRB1* در گوسفندان نژاد قزل ایرانی نیز بشدت پلی‌مورفیک بوده و وجود پلی‌مورفیسم‌های جدید باعث تغییر ساختار پروتئین مربوط به آن شده و این موضوع نیز باعث افزایش اعتبار ارتباط بین پلی‌مورفیسم شناسایی شده و صفت مورد بررسی می‌شود. چراکه جهش‌های جدید شناسایی شده در منطقه اگزون بوده و این ناحیه نیز کد و یا ترجمه شونده به پروتئین است و در نتیجه بروز هر جهش در واقع شکل فضایی پروتئین حاصل را تغییر می‌دهد و بطور کلی احتمالاً تغییر در شکل فضایی و کنفورماسیون منجر به تغییر در عملکرد و وظیفه پروتئین می‌شود و سیستم ایمنی بر حسب این تغییر عکس‌العمل متفاوتی را در برابر انگل‌ها نشان می‌دهد.

منابع

- Amills, M., Francino, O. and Sanchez, A. (1995). Nested PCR allows the characterization of *TaqI* and *PstI* RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 48: 313–321.
- Ashrafi, F., Hashemi, A., Mardani, K. and Darvishzadeh. (2014). Study on genetic variability in MHC-DRB1 second exon in Makuie sheep breed population. *Genetika*. 46:269–275.
- Ballingall, K. T., Fardoe, K. And McKeever, D. J. (2008). Genomic organization and allelic diversity

within coding and non-coding regions of the *Ovar-DRB1* locus. *Immunogenetics*. 60:95–103.

Charon, KM. (2003). Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Journal of Animal Science Papers and Reports*. 22: 135–139.

Figueroa Castillo, JA., Mendez Mendina, RD., Berruecos Villalbos, JM., Gayosso Vazquez, A., Ulloa Arvizu, R., Acosta Rodriguez, R., Perez Ramirez, H. and Alonso Morales, RA. (2011). Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, and blood packed cell volume and blood eosinophilia in Peibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 177: 339–344.

Gruszczyńska, J., Brokowska, K., Charon, KM. And Swiderek, WP. (2005). Restriction fragment length polymorphism of exon 2 *Ovar-DRB1* gene in Polish Heath Sheep and Polish Lowland Sheep. *Journal of Applied Genetics*. 46: 311–314.

Gruszczyńska, J., Charon, KM., Kitlinska, J. and Szydlowski, M. (2000). The influence of *OLA-DRB1* (MHC class II) gene polymorphism on lamb body weight and weight gain in Polish Heath Sheep. *Journal of Applied Genetics*. 41: 101–112.

Hajjalizadeh Valilou, R., Rafat, SA., Notter, DR., Shojda, D., Moghaddam, Gh. and Nematollahi, A. (2015). Fecal egg counts for gastrointestinal nematodes are associated with a polymorphism in the *MHC-DRB1* gene in the Iranian Ghezel sheep breed. *Journal of Frontiers in Genetics*. 6: 1–11.

Hazelby, CA., Probert, AJ. and Rowlands, DAPT. (1994). Anthelmintic resistance in nematodes causing parasitic gastroenteritis of sheep in the UK. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 17: 245–252.

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>: MAFFT-a multiple sequence alignment.

<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>: TASSER: Protein structure and function prediction

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>: NCBI nucleotide Blast.

Jamshidi, R., Nikbakht Brujeni, Gh., Derakhshandeh, A. and Talebnia, R. (2011). Exon 2 *Ovar-DRB1* gene polymorphism in the Iranian Sangsari sheep. *International Journal of Veterinary Research*. 5: 59–62.

Konnai, S., Nagaoka, Y., Takesima, S., Onuma, M. and Aida, Y. (2003). Technical note: DNA typing for ovine MHC *DRB1* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Journal of Dairy Science*. 86: 3362–3365.

Larruskain, A., Minguijón, E., Garcia Etxebarria, K., Arostegui, I., Moreno, B., Juste, RA. and Jugo, BM. (2012). Amino acid signatures in the *Ovar-DRB1* peptide-binding pockets are associated with Ovine Pulmonary Adenocarcinoma susceptibility/resistance. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*. 428: 463–468.

Li, RY., Hui, WQ., Jia, B., Shi, GQ., Zhao, ZS., Shen, H., Peng, Q., Lv, LM., Zhou, QW. and Li, HT. (2011). The relationship between *MHC-DRB1* gene second exon polymorphism and hydatidosis resistance of Chinese merino (Sinkiang Junken type), Kazakh and Duolang sheep. *Journal of Parasite*. 18: 163–169.

Mason, IL. (1996). *A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties*. Fourth Edition. CAB International. UK. Pp 273.

Matika, O., Pong Wong, R., Wooliams, JA. And Bishop, SC. (2011). Confirmation of two quantitative trait loci regions for nematode resistance in commercial British terminal sire breeds. *Animal*. 5: 1149–1156.

Nikbakht Boroujeni, Gh., Emam, M., Mahmoud Zadeh, H., Hamed Monfared, E. and Talebnia Jahromi, R. (2009). Typing of *Ovar-DRB1* second exon with PCR-RFLP technique in Iranian Shaul sheep. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 10: 250–254.

Nikbakht, Gh., Rezaii, H., Stear, M.J., Talebi, M.A. and Mahmoudzadeh, H. (2012). Allelic

polymorphism in the second exon of *Ovar*-DRB1 in fat-tailed sheep. *The Veterinary Journal*. 192: 547–549.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406–425.

Sayers, G., Good, B. and Hanrahan, J.P. (2005). Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Parasitology*. 131: 403–409.

Schaschl, H., Goodman, S.J. and Suchentrunk, F. (2004). Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 265–277.

Schook, L.B. and Lamont, S.J. (1996). The major histocompatibility complex region of domestic animal species. CRC Press. US.

Schwaiger, F.W., Gostomski, D., Stear, M.J., Duncan, J.L., Mckellar, Q.A., Epplen, J.T. and Buitcamp, J. (1995). An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *International Journal for Parasitology*. 25: 815–822.

Shen, H., Han, G., Jia, B., Jiang, S. and Du, Y. (2014). MHC-DRB1/DQB1 Gene Polymorphism and Its Association with Resistance/Susceptibility to Cystic Echinococcosis in Chinese Merino Sheep. *Journal of Parasitology Research*. 2014: 1–7.

Singh, P.K., Singh, S.V., Singh, M.K., Saxena, V.K., Singh, A.V. and Sohal, J.S. (2012). Genetic analysis of MHC Class II *DRB* gene in an endangered Jamunapari breed of goats. *Indian Journal of Biotechnology*. 11: 220–223.

Sohrabi, M., Molaee, V., Osfoori, R., Nikmard, M. and Eskandari Nasab, M.P. (2013). DRB1 Gene Patterns of Two Iranian Sheep Breeds. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 3: 561–565.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 678–687..
Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.

Tavakolian, J. (2000). An Introduction to Genetic Resources of Native Farm Animals in Iran. Animal Science Genetic Research Institute Press, Tehran, Iran.

Bioinformatics analysis and identification of novel nucleotide polymorphisms of second exon of *Ovar* MHC-DRB1 gene in indigenous Ghezel sheep breed

R. Hajializadeh Valilou^{1*}, S.A. Rafat², A. Javanmard³ and A. Barzegari⁴

1, 2 &3) M.Sc. degree graduated student, Professor and Associate Professor of Genetic and Animal Breeding, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

4) Ph.d candidate of Medicine Biotechnology Department of Biotechnology, Medicine University Tabriz, Tabriz, Iran.

Correspondence Author: Hajializadeh20@gmail.com

Received: 2021/08/23

Accepted: 2021/11/15

Abstract

The object of this study was to identify the novel nucleotide polymorphisms in the second exon of MHC-DRB1 gene that has association with genetic resistance to gastrointestinal nematodes in Iranian indigenous Ghezel sheep breed. In this investigation 100 indigenous Ghezel sheep breed male lambs in 4 to 6 months age were used that were randomly chosen from five different flocks in all over the East Azerbaijan province. In these lambs, the preliminarily nucleotide polymorphisms were identified using the PCR-RFLP technique and the relationship between these polymorphisms and fecal egg counts were investigated and also in present study four samples of PCR product randomly selected from each five flock's lambs (one sample from each flock) and were sequenced subsequently. The nucleotide sequencing results of the PCR products were aligned with other registered nucleotide sequence in NCBI (National Center for Biotechnology Information) gene bank for second exon of *Ovar*-DRB1 gene in various sheep breeds of world. In the results of alignments, nine novel polymorphisms (two deletions, five substitutions and two insertions) were identified in the second exon of MHC-DRB1 gene sequences of Ghezel sheep breeds. Existence of these nucleotide polymorphisms were caused to substitution of all the amino acid sequence and consequently lead to changes in the structure of foreign peptide binding cleft in the DR heterodimeric proteins in the membrane of antigen presenting cells. Existence of novel polymorphisms in the second exon of *Ovar* MHC-DRB1 gene has led to changes in protein structure and increased the validity of observed association between identified polymorphism and studied trait.

Keywords: Novel nucleotide polymorphism, *Ovar* MHC-DRB1 gene, Gastrointestinal nematodes, Iranian indigenous Ghezel shee.