

## بررسی تغییرات ساختاری و فیلوژنتیک ناحیه DQA از MHC کلاس II گاو

• محمد مهدی رنجبر

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• سعید عطائی کچویی (نویسنده مسئول)

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• محمد حسن متدین

استادیار بخش تحقیق و تولید سرم‌های درمانی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۵-۳۱

Email: s.ataei@rvsri.ac.ir



### چکیده

پروتئین BoLA-DQA، ناحیه‌ای با چندشکلی بسیار بالا در کلاس MHC-II است که نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی، حساسیت و مقاومت به بیماری‌ها، واکسیناسیون و فاکتورهای تولیدی ایفا می‌کند. در این مقاله جنبه‌های تغییرپذیری ساختاری و فیلوژنتیک لوکوس BoLA-DQA شناسایی شد. توالی پروتئینی آلل‌های BoLA-DQA از پایگاه داده‌ها استخراج گردید. پلات تغییرپذیری برای ۶۰ آلل با استفاده از روش آنترابی پلات شانون از روی هم‌ردیفی توالی با الگوریتم ClustalW<sub>2</sub> ترسیم و نواحی بسیار متغیر (HVRs) بررسی شد. سپس با همولوژی مدلینگ تحت تدابیر ویژه ساختار سوم پروتئین به دست آمده، بهینه‌سازی انرژی و اعتبار سنجی مدل انجام شد. نهایتاً فیلوژنی، گروه‌بندی آللی و تخمین واگرایی تکاملی با استفاده از روش حداکثر درست‌فمائی انجام گرفت. جهت جستجوی مکاشفه‌ای درخت اولیه، الگوریتم‌های Neighbor-Joining و BioNJ برای ماتریکس فاصله جفتی با مدل JTT به کار برده شد. هفت ناحیه HVR و تعدادی نواحی نیمه متغیر در آنالیز تغییرپذیری به دست آمد که متغیرترین ناحیه آمینواسیدی ۹۳-۹۰ بود. این HVRها در همه تحت ساختارها پس از همولوژی مدلینگ پروتئین BoLA-DQA (با اعتبار ۹۷/۵) قابل مشاهده بود. همچنین در آنالیز فیلوژنی، آلل‌ها در پنج خوشه گروه‌بندی گردید. ارزیابی تکاملی درخت نشان داد که رده‌های آللی قدیمی‌تر ۲۱۰۳\* و ۲۶۰۲\* و جدیدتر احتمالاً آلل ۱۲۰۴\*، ۲۰۳۰۲\* و ۲۲۰۷\* می‌باشند. دستاوردهای مطالعه حاضر می‌تواند امر طراحی واکسن علیه بیماری‌های عفونی را تسهیل و از طریق پیش بینی فاکتورهای تولید بالا در گاو باعث تسهیل انتخاب شود.

کلمات کلیدی: BoLA-DQA، گاو، MHC، تغییرات، فیلوژنی

- Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 34-42

### Study of structural variations and phylogeny of DQA from MHC class II in cattle

By: Ranjbar, M. M., Assistant Professor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran.; Ataei Kachoei, S., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. and Matin, M. H., Assistant Professor, Department of Therapeutic Sera, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran Iran.

Received: 2016-06-18 Accepted: 2016-08-21

Email: s.ataei@rvrsi.ac.ir

BoLA-DQA protein is a highly polymorphic region in MHC class II and plays a key role in immune responses, resistance and susceptibility to infectious diseases, vaccination and production factors. Compared with other species, there are little data on molecular characteristics, structure, phylogeny and evolution of BoLA-DQA. In the present study, some aspects of these subjects and propose practical points based on findings about variations, structure and phylogeny of this locus in cattle was studied. Protein sequences of BoLA-DQA alleles were retrieved from databases. Variation was evaluated by Shannon entropy plot based on alignment of sequences with ClustalW2 algorithm, and Highly Variable Regions (HVRs) were analyzed. Then, tertiary structure of protein by homology modeling approach under certain circumstances, energy minimization and model validation were achieved. Finally, phylogeny, allelic grouping and estimation of evolutionary divergence were done using Maximum Likelihood method. For heuristic search of initial tree, Neighbor-Joining and BioNJ were used for pairwise distance matrix by JTT model and then, Logs with better Likelihood were appointed. Seven HVRs and some semi-variable regions in variation analysis were obtained. The highest variable region was amino acids 90-93. These HVRs were seen in all substructures after homology modeling of BoLA-DQA protein (with 97.5 validity). Besides, alleles were grouped into five clusters by phylogenetic analysis. Evolutionary analysis of tree showed that more ancient alleles were \*2103 and \*2602, and probable newer alleles were \*1204, \*0302 and \*2207. Present study helps in designing effective vaccines against infectious diseases and animal breeding in easy prediction of production factors in cattle.

**Key words:** BoLA-DQA, Cattle, MHC, Variation, Phylogeny

### مقدمه

جهت تحریک پاسخ ایمنی اکتسابی به وسیله آنتی‌ژن می‌بایست این آنتی‌ژن‌های پروتئینی در سلول تکه‌تکه شوند و قطعات به دست آمده به سلول‌های عرضه‌کننده مناسب (APC=Antigen Presenting Cells) متصل شوند (۲۲). این گیرنده‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن گلیکوپروتئین‌هایی هستند که به وسیله ژن‌هایی که در خوشه‌های بزرگ‌ژنی کمپلکس سازگاری نسجی (MHC) جای دارند، کد می‌شوند. قطعات آنتی‌ژن‌ها تنها پس از اتصال به مولکول MHC قادرند سیستم ایمنی را تحریک کنند و این آنتی‌ژن‌های متصل شده به MHC سپس به پذیرنده آنتی‌ژن سلول T متصل می‌شوند. چون مولکول‌های MHC به عنوان گیرنده اختصاصی آنتی‌ژن عمل می‌کنند، ژن‌های MHC تعیین می‌کنند که کدام آنتی‌ژن می‌تواند سیستم ایمنی اختصاصی را تحریک کند (۶)، از این رو MHC

خوشه‌هایی از ژن‌های سازماندهی شده است که عرضه آنتی‌ژن را کنترل می‌کند و لذا حساسیت و مقاومت حیوانات به بیماری‌های عفونی یا بیماری‌های خود ایمن را تعیین می‌کند. MHC واجد سه دسته جایگاه ژنتیکی است (۲۲). جایگاه ژنتیکی دسته II، مولکول‌های MHC کلاس II را رمز می‌کنند. بر اساس روش نام‌گذاری MHC مهره‌داران، به MHC گاو نام BoLA (Bovine Leukocyte Antigen) اطلاق می‌شود. در طی ۱۰ سال گذشته، ابزار زیست‌شناسی مولکولی جهت مشخص نمودن تعداد ژن‌های MHC، توالی و ساختمان آن‌ها در تعدادی از گونه‌های نشخوارکننده به کار گرفته شده است (۱۸).

در میان جایگاه‌های BoLA، جایگاه کلاس II بیش از بقیه مورد تشریح و بررسی قرار گرفته است. ساختار کلی MHC انسان، در گاو محافظت شده است (۶). وقتی BoLA با HLA مقایسه می‌شود، به نظر می‌رسد

جایگاه ژن‌های دیگر ترجیحاً فراوانی بیش از حد انتظار می‌یابند و انتخاب طبیعی از پیوستگی آلل‌ها که منجر به ایجاد هتروداایمرهای مهم می‌شود، حمایت می‌کند (۲۴). یکی دیگر از عواملی که فراوانی ژن‌های MHC را در گونه‌های اهلی تحت تاثیر قرار می‌دهد، انتخاب مصنوعی است. در گونه گاو به علت پیوستگی ژن‌های مهم در تولید با ژن‌های MHC، انتخاب بر اساس ویژگی‌های تولید، فراوانی MHC را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۴). همچنین مطالعات گوناگون ارتباط بین آلل‌های BoLA را با مقاومت و حساسیت به بیماری‌های عفونی و صفات تولیدی نشان داده‌اند (۵، ۱۹)، و از این رو اهمیت و نقش این مولکول‌ها روز به روز مورد توجه بیشتری قرار می‌گیرد.

از آنجا که تا به حال مطالعه‌ای بر روی خصوصیات تغییرپذیری، ساختاری، فیلوژنی و تکامل مولکول DQa که نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی، واکسیناسیون و صفات تولیدی دارد، انجام نشده است، ما در مطالعه حاضر به این مهم پرداخته‌ایم.

## روش کار

### بازایی توالی‌های پروتئینی/نوکلوئیدی و طبقه‌بندی آن‌ها

توالی‌های پروتئینی دومین DQa از MHC کلاس II در گاو از پایگاه‌های مرجع NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) UniProtKB/ (http://www.expasy.org/uniprot) Swiss-prot (Immuno Polymor- IPD) و (www.expasy.org/uniprot) phism Database استخراج گردید. سپس توالی‌های استخراج شده منظم گردید و نواحی متغییر در طول توالی انتخاب شد.

### هم‌ردیفی توالی‌ها و بررسی تغییرپذیری و حفاظت‌شدگی

توالی‌های پروتئینی شصت آلل به دست آمده از پایگاه‌های داده مر بوط به گاو با استفاده از الگوریتم ClustalW<sub>2</sub> سرور T-coffee هم‌ردیف شد و با استفاده از برنامه BioEdit ۷,۷,۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه، توالی‌ها پیرایش و ترمیم شد و هم طول گردید. سپس تغییرپذیری (تنوع) و حفاظت‌شدگی اسیدآمینه‌های توالی‌های آلل‌ها با روش آنالیز شانون (Shannon entropy plot) مورد بررسی قرار گرفت. جهت نمایش نواحی تغییرات در ساختار سه بعدی پروتئین T از امکانات برنامه Chimera UCSF متعلق به کشور استرالیا استفاده شد.

### پیشگویی نمایش ساختار فضایی DQa با روش مدل‌سازی همسان (Homology modeling)

از ابزار BLASTP ((Basic Local Alignment Search Tool) ویژه پایگاه بانک ژن بر علیه پایگاه مرجع پروتئین (PDB-Protein Data Bank) جهت انتخاب بهترین الگو (توالی همولوگوس) و طراحی ساختار سه بعدی (۳D) آلل ۰۱۰۱\* به روش مدل‌سازی همسان (هومولوژی مدلینگ) استفاده گردید. در انتخاب الگو معیارهایی نظیر حد تمایز (resolution) پایین‌تر از سه انگستروم مربوط به کریستالوگرافی اشعه ایکس، R-value پایین‌تر از ۰/۳، شباهت بالای ۶۰ درصد الگو با توالی مورد مطالعه و E-value پایین اعمال شد. همچنین توالی مورد هدف (توالی آلل) و الگوی انتخاب شده بایستی واجد هم‌ردیفی ساختاری مناسبی با ارزش‌های RMSD (Root-mean-square deviation) پایین باشند. به کارگیری این

برخی نواحی به خوبی محافظت شده و برخی دیگر تفاوت‌های زیادی دارند و موجب تنوع در آرایش جایگاه‌ها و تعداد آن‌ها در بین گونه‌ها شده است. به طور کلی نواحی دسته II و III در گونه‌های مختلف مشابه هستند و احتمالاً از یک ریشه مشترک مشتق شده‌اند. ساختار ژن‌های دسته II گاو به علت وجود وارونگی منحصراً ساختاری، از ژن‌های دسته II سایر گونه‌ها متفاوت است. این وارونگی ژن‌های دسته II گاو را به دو دسته IIa و IIb تقسیم کرده است (۲۲). ژن‌های کلاس IIa شامل جایگاه‌های DR و DQ می‌باشد که بلافاصله بعد از وارونگی قرار دارند. ژن‌های IIb شامل ژن‌های متعددی است. آرایش ژن‌های کلاسیک دسته II به ترتیب شامل ژن‌های DO، DM، DP و DR می‌باشد. سه ژن DR، DQ و DP ژن‌های کلاسیک اصلی هستند و عمل اصلی عرضه آنتی‌ژن را بر عهده دارند. در درون هرکدام از این جایگاه‌ها، ژن‌های کدکننده زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  را با A و B نامگذاری می‌کنند (۲۲). ما در این مطالعه به ارزیابی DQa می‌پردازیم.

پلی‌مرفیسم به معنای حضور تعداد بیشتر اشکال متغیر ژنتیکی، نسبت به تعداد مورد انتظار در یک مقطع زمانی است. منشا پلی‌مرفیسم به پیش از پدیده‌های اختصاصی شدن بر می‌گردد (۱). در واقع پلی‌مرفیسم و تغییرپذیری کنونی مولکول MHC ناشی از روند تکامل طولانی پر از تغییرات است که به انسان و حیوان توان بهتر و بیشتر پاسخ ایمنی نسبت به عوامل خارجی القا می‌کند. اما آنچه موجب تنوع مولکولی می‌شود جایگزینی است. دلایل زیادی برای توجیه پدیده پلی‌مرفیسم ژن‌های MHC وجود دارد. بیشترین عامل محتمل برای تنوع زیاد جایگاه MHC خصوصاً در انسان انتخاب طبیعی است (۸).

ژن‌های MHC فشار محافظه کارانه انتخابی دارند، یعنی در یک یاخته و در یک جایگاه معین هر دو آلل ظهور می‌یابند. افراد هتروزوگوت از نظر MHC نسبت به افراد خالص در برابر انواع بیشتری از پاتوژن‌ها مقاومت هستند (۲۲).

پدیده تکامل همزمان پاتوژن-میزبان نسبت به مزیت ناخالصی (heterozygotic advantage) نقش بیشتری در ایجاد پلی‌مرفیسم دارد. دلیل این عامل آنست که در جمعیت، بیشتر آلل‌ها تعداد پاتوژن‌های تقریباً یکسانی را عرضه می‌کنند و به ندرت یک آلل MHC تعداد آنتی‌ژن بیشتری نسبت به دیگر آلل‌ها ارائه می‌دهد (۸). در مزیت ناخالصی فراوانی عرضه آنتی‌ژن بیشتر است و این تفاوت فراوانی، مانع تکامل پلی‌مرفیسم با درجه بالا می‌شود. در واقع حضور آلل‌های متنوع MHC نیاز به تفاوت کمتر فراوانی ارائه آنتی‌ژن توسط آلل‌ها دارد و در صورتی تعداد آلل‌های MHC در حضور مزیت ناخالصی افزایش می‌یابد که توزیع یکنواخت فراوانی عرضه پاتوژن وجود داشته باشد (۱). با افزایش اندازه جمعیت، اثر پدیده تکامل همزمان پاتوژن-میزبان در ایجاد تنوع بالا می‌رود. این در حالی است که مزیت ناخالصی حتی در جمعیت‌های بزرگ نمی‌تواند به تنهایی پلی‌مرفیسم زیادی ایجاد کند (۸). عوامل دیگری نظیر جدایی جغرافیایی و اجتماعی و فشار انتخابی به سبب عفونت شدید، میزان تنوع جمعیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸). طی این فرضیه، پلی‌مرفیسم ژن‌های MHC موجب زنده ماندن، به علت کاهش خطر اپیدمی عفونت‌های خطرناک می‌شود (۲۴).

لازم به ذکر است که آلل‌های MHC به علت پیوستگی با آلل‌های

قرار گرفت. ساختار رشته‌های موازی ناهم‌سوی بتا با کمک رشته‌های آلفا یک پاکت اتصالی را تشکیل داده‌اند که در مدل نمایش سطحی (Surface representation) مشخص شده است.

جهت درک بهتر و عمیق‌تر این تغییرپذیری و حفاظت شدگی، از ساختار سه‌بعدی کمک گرفته شد. نواحی با تغییرپذیری بالا نقش چشم‌گیری در اتصال به آنتی‌ژن در آلل‌های BoLA-DQA گاو بازی می‌کنند و بیشترین تفاوت آلل‌ها با یکدیگر در این نواحی است (شکل ۲). این نواحی در هر دو ساختار صفحه‌های بتا و آلفا هلیکس دیده می‌شوند. پیش‌بینی می‌شود اپی‌توپ آنتی‌ژنی بعد از قرارگیری در پاکت، مهم‌ترین و سرنوشت‌سازترین اتصالات را با نواحی قرمز رنگ، و برخی نواحی با تغییرپذیری کمتر برقرار می‌کنند. این نواحی در آلل‌ها با یکدیگر متفاوتند. نواحی دیگر بیشتر نقش داربستی را ایفا می‌کنند. همچنین با توجه به نتایج حاصله، هر دو ساختار آلفا و بتا در اتصال با پپتید آنتی‌ژنیک نقش بازی می‌کنند.

#### سنجش اعتبار و ارزیابی مدل پیشگویی شده

پس از اتمام مرحله همولوژی مدلینگ و شبیه‌سازی، اعتبار سنجی مدل پیشگویی شده گامی ضروری است. لذا، کیفیت استریوکیماکال و دقت مدل پیشگویی شده به وسیله نقشه رامچاندران (Ramachandran plot) مورد ارزیابی قرار گرفت. پلات‌های دویبعی جفتی  $\phi$  و  $\psi$  (زاویای پیچش یا دی‌هیدرال) محاسبه شده برای همه اسید آمینه‌ها و به ویژه پرولین و گلاستین، به ارزیابی مدل پیشگویی شده کمک می‌کنند. ستون فقرات فضایی ساختار مدل‌سازی شده با تحلیل زاویای پیچشی  $\phi$  ( $\phi$ ) و  $\psi$  ( $\psi$ ) با استفاده از سرور Rampage مورد ارزیابی قرار گرفته است. این سرور پلات‌های  $\phi/\psi$  را برای گلاستین (Gly)، پرولین (Pro) و سایر اسیدهای آمینه را نمایش می‌دهد. پلات به سه بخش منطقه مطلوب (favored region)، مجاز (allowed) و غیر مجاز (outlier) تقسیم می‌شود. نقشه تحلیل رامچاندران حاکی از این امر بود که درصد اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب، مجاز و غیر مجاز به ترتیب ۹۵ درصد (۷۶ آمینواسید)، ۲/۵ درصد (۲) و ۲/۵ درصد (۲) است. از حاصل جمع درصد آمینو اسیدهای ناحیه مطلوب و مجاز عدد ۹۷/۵ درصد حاصل می‌شود. لذا مدل پیشنهاد شده برای ساختار سه بعدی آلل ۰۱۰۱\* بسیار مناسب است.

#### آنالیز فیلوژنی و تکاملی آلل‌های DQA

بررسی فیلوژنی بر اساس شباهت توالی نشان می‌دهد آلل‌های DQA را می‌توان در پنج گروه (خوشه) تقسیم‌بندی کرد (شکل ۳). بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین گروه، به ترتیب یک و دو می‌باشد. این گروه‌بندی در ارزیابی ایمونوژنتیک گله‌ها به منظور مطالعات اصلاح نژاد و قابلیت‌های واکنش‌یون راهگشا می‌باشد و از سوی دیگر امکان طبقه‌بندی آلل‌های احتمالی جدید که در مطالعات به دست می‌آید را فراهم می‌کند. در ارزیابی تکاملی با به کارگیری روش حداکثر درست‌نمایی مشخص شد که به لحاظ تکاملی، قدیمی‌ترین آلل BoLA-DQA احتمالاً آلل ۲۱۰۳\* و سپس ۲۶۰۲\* می‌باشد. همچنین قدیمی‌ترین گروه از نظر تکاملی گروه سه می‌باشد (شکل ۳). از سوی دیگر جدیدترین آلل‌ها در مخزن آلی

نکات سبب افزایش اعتبار و اطمینان‌پذیری مدل‌سازی می‌شود. بعد از هم‌ردیفی، نزدیک‌ترین توالی پیدا شده به این توالی با توالی مورد تحلیل در این مطالعه مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و از برنامه Modeller نسخه ۹۷۸ جهت ساخت ساختار سه‌بعدی و فضایی از روی الگو استفاده گردید. جهت نمایش ساختار سه‌بعدی پروتئین امکانات برنامه Chimera UCSF به کار گرفته شد. همچنین ساختار با برنامه SPDB viewer مورد بهینه‌سازی انرژی (Energy minimization) قرار گرفت.

#### سنجش اعتبار (validation) و کیفیت مدل فضایی ترسیم شده

ارزیابی کیفیت مدل مرحله‌ای حساس در مدل‌سازی همسان است. به منظور سنجش اعتبار ساختار مدل ترسیم شده، از نقشه رامچاندران (Ramachandran plot)، جهت ارزیابی، تخمین کیفیت و دقت شیمی فضایی پروتئین مدل‌سازی شده از برنامه سرور RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) استفاده شد.

#### ارزیابی فیلوژنتیک و تکاملی

جهت رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار MEGA<sup>v</sup> و از روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood-ML) که از بهترین روش‌های ترسیم درخت می‌باشد، استفاده شد.

از سوی دیگر بر اساس آنالیزهای اولیه از بین ۵۶ روش مختلف مدل‌های جایگزینی آمینواسیدی، روش (Jones-Taylor-Thornton (JTT انتخاب گردید. برای اطمینان از اعتبار و تکرارپذیری درخت‌های رسم شده از تکرارپذیری (Boot Strap)، ۱۰۰۰ استفاده گردید. سپس خوشه‌بندی و بررسی خصوصیات تکاملی صورت گرفت.

#### نتایج

##### بررسی نواحی تغییرپذیر و حفاظت شده آلل‌های BoLA-DQA

نقشه تغییرات آمینواسیدی با استفاده از نقشه آنتروپی شانون در طول ۶۰ آلل مشاهده شده در پروتئین BoLA-DQA گاو، در شکل ۱ نشان داده شده است. شایان توجه است که جهت ترسیم نقشه تغییرپذیری و تنوع، توالی‌ها مورد هم‌طول‌سازی، پیرایش و تصحیح‌های مورد نیاز قرار گرفت، از این رو آمینواسید ۱ در نقشه معادل آمینواسید ۲۹ در پروتئین کامل است. نتایج بیانگر وجود هفت ناحیه با تغییر پذیری بالا (Hyper variable regions (HVRs)) در ارزیابی نقشه آنتروپی شانون است، که به صورت نواحی بالای حد آستانه یک گزارش شده‌اند. اسیدهای آمینه شماره ۹۰ تا ۹۳ در نقشه به عنوان متغیرترین ناحیه در توالی BoLA-DQA گاو شناخته شد.

##### پیشگویی ساختار سوم با روش مدل‌سازی همسان و نمایش سه بعدی (۳D، فضایی)

##### پروتئین

پس از انجام فرآیند مدل‌سازی همسان و شبیه‌سازی ساختار سه‌بعدی آلل ۰۱۰۱\* از BoLA-DQA، با استفاده از امکانات برنامه Chimera UCSF، این پروتئین تصویرسازی شد. در این ساختار پیشگویی شده، نواحی آلفا هلیکس، صفحات بتا و کوئل‌ها نشان داده شده است (شکل ۲). سپس مدل پروتئینی پیشگویی شده از نماهای مختلف مورد ارزیابی

DQA احتمالا آل‌های \*۰۳۰۲، \*۱۲۰۴ و \*۲۲۰۷ می‌باشند.

### بحث

ناحیه ژنی BoLA-DQ در ابتدا در گاو با استفاده از نشانگرهای انسانی و کلونینگ و تکنیک ساترن بلات مشخص گردید. بعدها نشان داده شد که BoLA تنوع بیشتری را در ژنهای DQ نسبت به HLA بروز می‌دهد. عملکرد DQ در گاو با انسان متفاوت است، گرچه شباهت توالی نوکلئوتیدها و ساختار ژنی DQ انسان و گاو بالاست. در انسان ژنهای چندگانه DQ شناسایی شده‌اند، درحالی‌که فقط یک نوع مولکول DQ بیان می‌شود (۳، ۶). در موش، خوک و رت ژن DQ یک کپی منفرد دارد. همچنین در گاو تنوع قابل ملاحظه‌ای در تعداد جایگاه ژنهای DQ وجود دارد (۳). بسیاری از هاپلوتایپ‌های گاو ژن تکراری DQ را دارند و هر دو ژن نیز بیان می‌شوند (۲۳).

مقایسه توالی ژنهای DQ گوسفند و گاو حاکی از شباهت بسیار بالای DQ در این دو گونه است. هر جایگاه ژنی DQ در گاو و گوسفند شامل یک ژن DQA برای کدکردن زنجیره  $\alpha$  و یک ژن DQB برای کدکردن زنجیره  $\beta$  مولکول DQ است، که انتها به انتهای یکدیگر قرار گرفته‌اند (۱۲).

برای شناسایی ژن DQA گاو از نشانگرهای DQA انسان استفاده شده است. ژن DQA در انسان شامل پنج اگزون است. برای شناسایی ژن مربوطه در گاو، از کلون‌های AB<sub>1</sub> و W<sub>1</sub> استفاده شده است. اگزون دو، سه و چهار ژنهای این کلون تعیین توالی شد و مشاهده شد اگزون سه و چهار BoLA-DQA شباهت خود را در سطح بالا با HLA-DQA حفظ کرده‌اند. بیشترین تشابهات در اگزون سه محافظت شده است. این در حالیست که اگزون دو تفاوت بیشتری با ژن DQA انسان نشان می‌دهد (۷۳ درصد شباهت) در مورد توالی اینترون‌های DQA گاو می‌توان اظهار داشت که در سطح بالای حفاظت شده‌اند. اینترون دو این ژن حدود ۴۴۷ جفت باز طول دارد که دقیقاً با اینترون دو انسان برابر است. در حالی‌که اینترون سه با طول ۲۳۷ جفت باز حدود ۱۱۱ جفت باز از اینترون سه انسان کوتاه‌تر است (۲۳).

موروکا و همکاران برای تکثیر ژنی از DQ که کدکننده زنجیره  $\alpha$  بود، از کلون‌های cDNA استفاده کردند. کلون محصولی با ۲۵۵ اسیدآمینو را کد کرد که شامل یک پپتید پیام (Signal peptide) با ۲۳ اسیدآمینو و یک پلی‌پپتید بالغ ۲۳۲ اسیدآمینو‌ای بود (۱۵). با مقایسه توالی اسیدآمینو‌ها و تحلیل سلسله تبار ژنتیکی، وجود یک ژن A<sub>2</sub> در ناحیه DQ مشخص شد و نشان داده شد که ژن رمز شده توسط کلون، بیشتر شبیه ژن DQA<sub>2</sub> گوسفند است. این در حالیست که BoLA-DQA<sub>1</sub> بیشتر به Ovar-DQA<sub>1</sub> شباهت داشت تا BoLA-DQA<sub>2</sub>. از این رو حضور دو ژن A در ناحیه DQA که همچون گوسفند هر دو کاربردی می‌باشند، تأیید شد (۱۷). پیش از این در مطالعه‌ای از کلون A<sub>5</sub> برای مطالعه جایگاه ژنهای DQ استفاده شده بود که توالی ژنهای رمز شده در کلون A<sub>5</sub> با DQA<sub>2</sub> گوسفند شباهت داشت (۱۷). هاپلوتایپ‌های گاو معمولاً یک جایگاه ژن منفرد DQA<sub>1</sub> و یا دو جایگاه ژن شامل DQA<sub>1</sub> و DQA<sub>2</sub> و یا دو جایگاه ژن DQA<sub>2</sub> دارند. تفاوت در توالی آل‌های دو جایگاه ژن DQA<sub>2</sub>، وجود جایگاه ژنی دیگری مبنی بر DQA<sub>2</sub> را به اثبات رساند (۴). جایگاه ژنهای DQA<sub>2</sub> و

DQA<sub>2</sub> مشابه هم هستند و احتمالاً DQA<sub>2</sub> از DQA<sub>2</sub> منشأ می‌گیرد (۱۲). این حد از پلی‌مرفیسم منجر به بکارگیری روش‌های مختلف تایپینگ ژنهای DQA شده است. در مطالعه‌ای از نشانگرهای اگزون دو، سه و cDNA برای RFLP ژنهای DQ استفاده گردید. نشانگرهای اگزون دو DQA<sub>5</sub> و اگزون دو W<sub>1</sub> متفاوت است. لذا پترن کلی معین شده با هر دو نوع نشانگر متفاوت می‌باشد. به طور کلی ۳۱ پترن RFLP برای ژنهای DQA مشخص گردید. اما تعیین توالی ژنهای DQA در گاوهای نژادهای مختلف، حدود چهل و شش آل برای ژنهای DQA گزارش کرد (۱۲). بعدها در سال ۲۰۰۶، تاکشیمیا و آیدا روش تایپینگ بر اساس توالی را برای تایپینگ DQA<sub>1</sub> به کار گرفتند که روش بسیار سریع با دقت بالا بود. با این روش اگزون دو DQA<sub>1</sub> که ۳۵۵ جفت باز طول دارد، تنوعی در حدود ۱۵ آل (فقط برای جایگاه DQA<sub>1</sub>) نشان داد (۲۰).

مولکول‌های DQ گاو نسبت به انسان تنوع بیشتری نشان می‌دهند. بسیاری از هاپلوتایپ‌های گاوهای هلستاین ژن DQ تکراری دارند که موجب افزایش گوناگونی مولکول‌های DQA و DQB به علت جفت شدن بین هاپلوتایپی (Inter haplotype pairing) و درون هاپلوتایپی می‌شود. در جفت شدن بین هاپلوتایپی، محصول ژنی DQA و DQB که به وسیله کروموزوم‌های متفاوت کد می‌شوند، جفت می‌شود. جفت شدن داخل هاپلوتایپی نیز به جفت شدن محصولات ژنی DQA و DQB که داخل یک کروموزوم قرار دارند اطلاق می‌شود که می‌تواند بین دو ژن DQA و DQB یک جایگاه ژنی و یا بین ژنهای دو جایگاه ژنی اتفاق افتد (Nonadjacent pairing and adjacent pairing) (۹).

مطالعات نشان داده است که زوج شدن بین هاپلوتایپی و داخل هاپلوتایپی موجب رمز شدن یک مولکول DQ موثر می‌شود (۲۹). در دوهاپلوتایپ گاو که ژن DQ تکراری داشته‌اند (D H<sub>2</sub>H/DH<sub>1</sub>F<sub>8</sub>) جفت شدن بین هاپلوتایپی آل‌های DQA<sub>2</sub>b و DQB<sub>1</sub>a موجب عرضه پپتید آناپلازما شده است. این در حالی است که حیوانات هموزیگوت به علت ممکن نبودن جفت شدن بین هاپلوتایپی آل‌های DQA و DQB این پپتید را نمی‌توانند ارائه دهند. بنابراین مولکول‌های BOLA-DQ به شرط ایجاد هتروداپیم‌های اصلی می‌توانند مانند مولکول‌های DR در ارائه پاتوژن عمل کنند، لذا متفاوت از HLA-DQ می‌باشند. زیرا اکثریت کلون‌های سلول T انسان محدود به DR بوده‌اند (۹). با این وجود مولکول‌های HLA-DQ نیز پپتیدهای پاتوژن‌های مختلف را می‌تواند ارائه دهد و با برخی بیماری‌های وابسته به ایمنی در انسان ارتباط دارند، ولی تنوع آن‌ها کمتر از مولکول‌های DQ گاو است (۹).

مولکول‌های MHC دسته Ia و II تنوع گسترده‌ای دارند. این تنوع برای اتصال به آنتی‌ژن‌های گوناگون لازم است. در انسان جایگاه‌های HLA-DRB<sub>1</sub> و HLA-B نسبت به جایگاه‌های دیگر تنوع بیشتری دارند. تنوع ژن‌ها به علت اثر در بیان آن‌ها و عملکرد پروتئین‌ها در حساسیت و مقاومت به بیماری است (۱۰).

در پروتئین‌های طبیعی میزان جایگزینی خاموش یا مشابه Silent or Synonymous)) معمولاً خیلی بیشتر از جایگزینی‌های تبدیلی یا غیر مشابه Replacement or non-synonymous)) است. زیرا بیشتر جایگزینی‌های تبدیلی یا غیر مشابه مخاطره‌آمیز بوده و طی روند انتخاب طبیعی حذف می‌شوند اما در ردیف‌هایی از مولکول MHC که ناحیه اتصال به پپتید را

phia, Saunders-Elsevier, 107-136.

2. Andersson, L. R. 1988. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics*. 27: 110-120.
3. Annette Gelhaus, B. F. 1999. Evidence for an additional cattle DQA locus, BoLA-DQA5. *Immunogenetics*. 49: 321-327.
4. Ballingall, K.T. 2004. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. *Immunogenetics*. 55: 748-755.
5. Behl, J.D. 2007. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Kankrej Cattle (*Bos indicus*). *Dairy science*. 90: 2997-3-1.
6. Behl, J.D., Verma, N.K., Tyagi, N., Mishra, P., Behl, R., Joshi, B.K., 2012. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. *ISRN Veterinary Science*.
7. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 28: 235-242.
8. Borghans, JA., Beltman, JB., De Boer, RJ. 2004. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 55(11):732-9.
9. Brown, J. N. 2005. Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4+ T-lymphocyte responses. *Immunogenetics*. 57: 750-762.
10. Eveline, M., Ibeagha-Awemu, P. K. 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*. 19: 226-245.
11. García-Boronat, M., Diez-Rivero, CM., Reinherz, Reche, PA. 2008 PVS: A web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Research*. 36:W35-W41.
12. Gelhaus, A., Wippen, C. 1995. Sequence polymorphism of BoLA-DQA. *Immunogenetics*. 42: 296-298.
13. Gerner, W., Denyer, M.S., Takamatsu, H.H., Wileman, T.E., Wiesmüller, K.H. 2006. Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine. *Virus Research*. 121: 223-228.
14. Martí-Renom, MA., Stuart, AC., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics Biomolecular Structure*. 29:291-325.
15. Morooka, A., Asahina, M., Kohda, C., Tajima, S., Niimi, M., Nishino, Y., Sugiyama, M., Aida, Y. 1995. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*. 6, 212(1):110-7.

در مولکول‌های دسته Ia و II رمز می‌کنند، میزان جایگزینی غیر مشابه از میزان جایگزینی‌های مشابه بیشتر است و انتخاب طبیعی از این تنوع اسید آمینه حمایت می‌نماید. در واقع به طور انتخابی پلی مرفیسم MHC بقا یافته است (۲۲). لزوم اتصال مناسب آنتی‌ژن به مولکول‌های MHC عامل محدودکننده در مقاومت نسبت به بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. لذا افزایش تعداد مولکول‌های مختلف MHC (به علت تنوع ژن‌های مربوطه) موجب افزایش تعداد پپتیدهای قابل اتصال و به دنبال آن افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های احتمالی می‌شود.

عملکرد پروتئین مبتنی بر ساختار سوم آن است، از این رو داشتن اطلاعات در مورد ساختار سوم پروتئین آلل BoLA جهت فهم نحوه عمل آن ضروری بوده و در کنار آن به توسعه واکنش‌ها و ارزیابی مجازی نقش این آلل در حساسیت و مقاومت به آنتی‌ژن‌های عوامل بیماری‌زا کمک می‌کند (۱۶). مدل سازی ساختار پروتئین نقش مهمی را در بیوانفورماتیک ساختاری جهت فهم و ترسیم مدل سه بعدی پروتئین هدف مبتنی بر الگو بازی می‌کند (۱۴). تعیین ساختار واقعی سه بعدی پروتئین نیاز به استفاده از روش‌هایی نظیر کریستالوگرافی اشعه ایکس و NMR (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) و غیره دارد. این روش‌ها زمان‌بر و بسیار گران می‌باشند و در عین احتمال موفقیت آن‌ها نیز قابل پیش‌بینی حتمی نیست. روش‌های محاسبه‌ای نظیر مدل‌سازی همسان قادرند فاصله میان انبوه اطلاعات توالی پروتئینی و اطلاعات ساختاری را کاهش دهند و مشکل زمان و هزینه را مرتفع کنند (۷).

ساختار سه‌بعدی مولکول MHC کلاس I و II در انسان و موش با کریستالوگرافی اشعه ایکس (X-ray Crystallography) به روشنی مشخص شده است (۶). اما در مورد ساختارها و عملکردهای این مولکول‌ها در حیوانات اطلاعات کمی در دسترس است (۲۱). از آنجایی که ساختار سه بعدی پروتئینی این آلل در PDB (Protein Data Bank) در دسترس نبوده و مطالعه چشم‌گیری هم بر روی این آلل مهم انجام نشده (۲۱)، لذا نتایج این مطالعه می‌تواند در ارزیابی ساختار دوم و سوم این مولکول ارزشمند باشد.

در نهایت اطلاعات حاصل از این مقاله می‌تواند در تحقیقات بررسی واکنش‌های پروتئین-پروتئین و ارزیابی مجازی حساسیت و مقاوت به بیماری‌ها و طراحی واکنش‌های نوین به واسطه کمک به تحت تاثیر قرار گرفتن سلول‌های Th (۱۱، ۱۳) متمرکز واقع شود. همچنین پنجره‌ای را در ارزیابی ارتباط آلل‌های گاو با سایر آلل‌ها در دام‌های بزرگ باز کرده، و راهکارهایی را در اصلاح نژاد دام عرضه می‌دارد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان لازم می‌دانند از حمایت‌های موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی برای تامین امکانات این مطالعه تشکر نمایند.

### منابع مورد استفاده

1. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai S. 2015. Major histocompatibility complex molecules and antigen presentation to T lymphocytes. *Cellular and molecular immunology*, 8th Edition, USA Philadel-

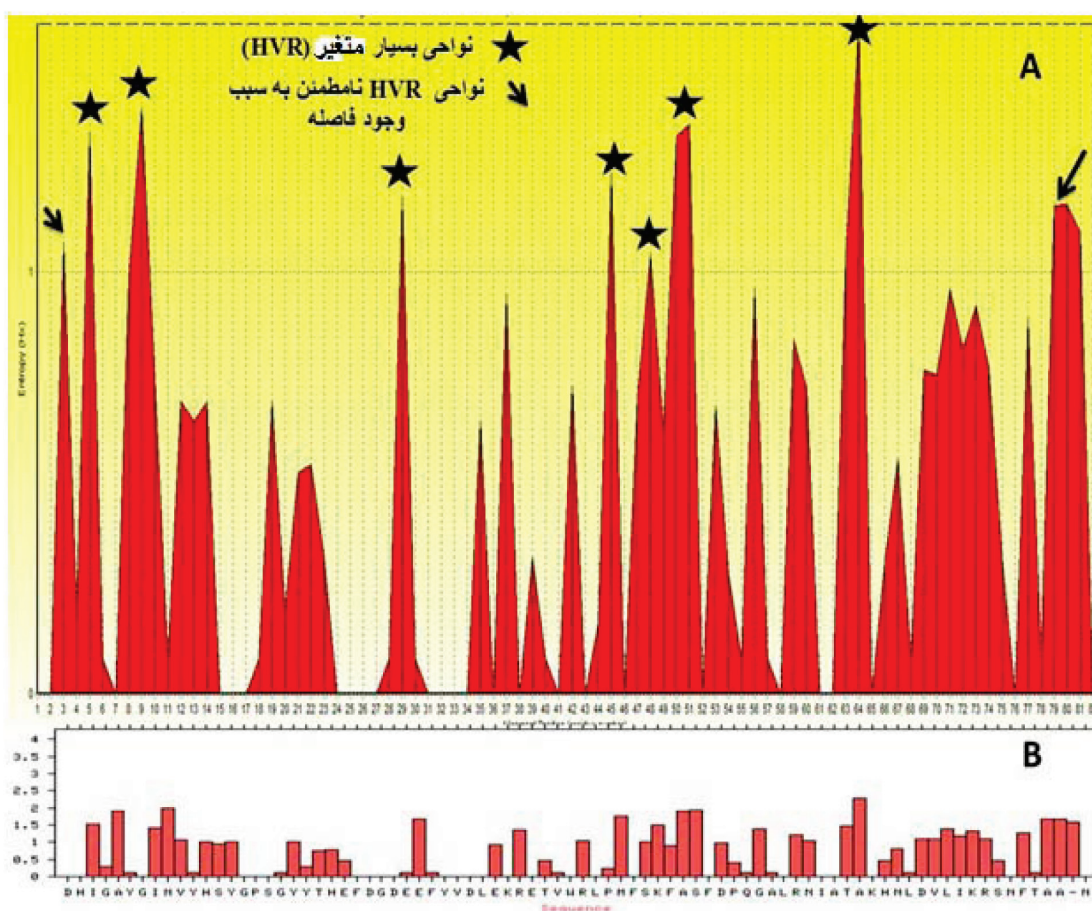
16. Paital, B., Kumar, S., Farmer, R., Tripathy, NK., Chainy, GBN. 2011. In silico prediction and characterization of 3D structure and binding properties of catalase from the commercially important crab, *Scylla serrata*. *Interdisciplinary Sciences. Computational Life Science*. 3(2):110-20.

17. Pia, M., Untalan, J. H. 2007. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Veterinary parasitology*. 145: 190-195.

18. Ranjbar, M.M., Nikbakht, G., GhadrmanMashhadi, A.R., Dabbaghyan, M., 2016. Study of BuLA-DRB3 polymorphism in Khuzestan river buffaloes. *Journal of Veterinary Research*. 71,1:33-40.

19. Rupp, R. A., 2007. Association of Bovine Leukocyte Antigen(BoLA)DRB3.2 with Immune Response, mastitis and production and type traits. *Dairy science*. 90: 1029-1039.

20. Takeshima, S., Aida, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Ani-*



شکل ۱- تغییرپذیری و تنوع اسید آمینه ای در ژن DQa از MHC کلاس II گاو با روش آنتروپی شانون. رسم نقشه آنتروپی شانون به صورت شماره آمینواسید (A) و توالی آمینواسیدی (B) نمایش داده شده است. در نقشه شانون، نواحی بالای آستانه یک به عنوان نواحی با تغییر پذیری بالا در نظر گرفته شده است. شایان توجه است که جهت ترسیم نقشه تغییرپذیری و تنوع، توالی ها مورد هم طول سازی قرار گرفته اند، از این رو آمینواسید یک در نقشه معادل آمینواسید ۲۹ در پروتئین کامل است.

102-112.

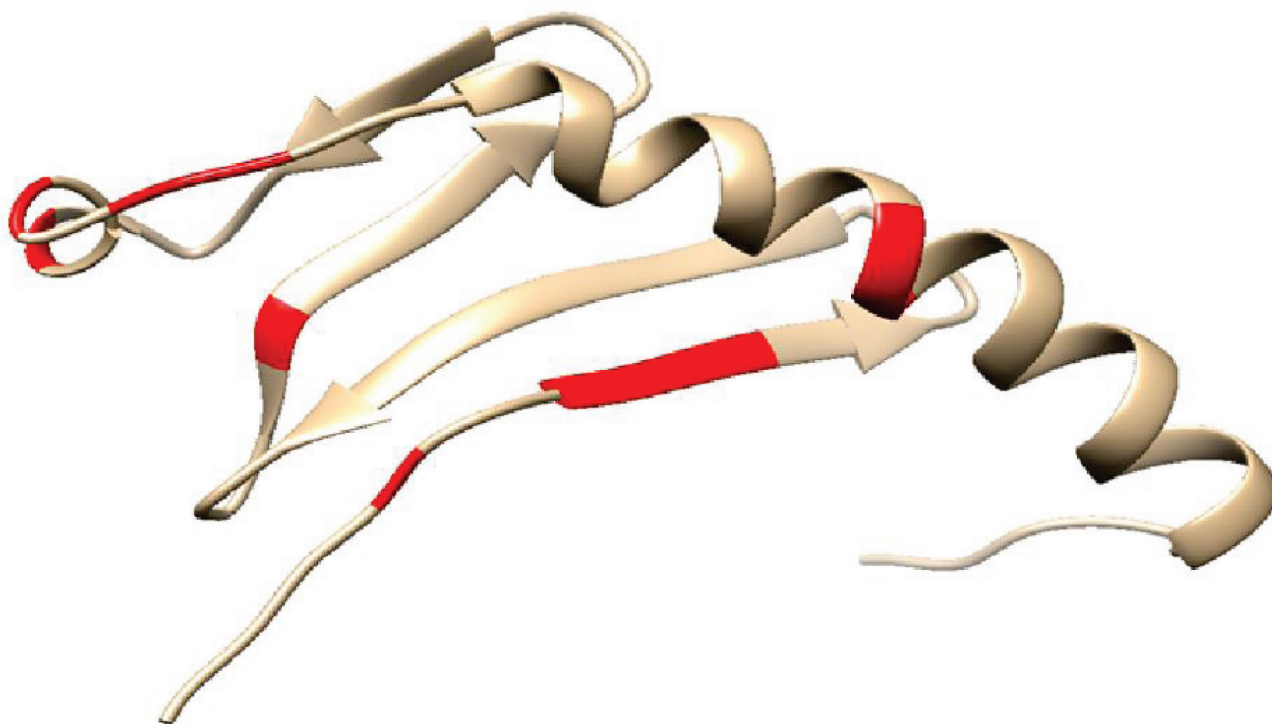
23. Van der Poel, J. 1990. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DQA, and DYA. *Immunogenetics*. 31: 29-36.

24. Xu, a., van Eijk, M.J., Park, C., Lewin, H.A. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus. *Journal of Immunology*. 151(12): 6977-85.

*mal Science Journal*. 77(2): 138-50.

21. Takeshima, S-N., Matsumoto, Y., Aida, Y. 2009. Short communication: Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *Journal of dairy science*. 92(6):2965-70.

22. Tizard, I.R., 2013. Major Histocompatibility Complex. *Veterinary Immunology*, 9th ed. USA, Philadelphia, Saunders-Elsevier,



شکل ۲- نمایش ساختار سه بعدی آلل \*۱۰۱۰ از DQA-BoLA با استفاده از نرم افزار کایمرا. نواحی با تغییر پذیری بالا به رنگ قرمز نمایش داده شده است. از ساختارهای 3p16.1.A و 1uvq.1.A با حدود ۱۷ درصد تشابه به توالی آلل \*۱۰۱۰ از DQA-BoLA به عنوان الگو استفاده شده است.



