

رابطه‌ی اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR با ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرنوس

هادی آتشی^۱، محمد مرادی شهربابک^{۲*}، حسن مهربانی یگانه^۲، سید رضا میرایی آشتیانی^۲ و قدرت الله رحیمی میانجی^۳
۱، دانش آموخته گروه علوم دامی دانشگاه تهران و استادیار دانشگاه شیراز، ۲، اعضای هیات علمی گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳، عضو هیات علمی گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۲۷)

چکیده

در این تحقیق، رابطه‌ی بین اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR با ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرنوس و فایتوهمانگوتین بررسی شد. واحدهای آزمایشی شامل ۸۶ گوساله‌ی هلشتاین، ۱۵۵ گوساله‌ی دورگ (F2) هلشتاین و شاروله، ۶۰ گوساله‌ی (R1) حاصل از آمیزش حیوانات نر هلشتاین- شاروله با حیوانات ماده هلشتاین و ۴۶ گوساله‌ی (R1) حاصل از آمیزش حیوانات ماده هلشتاین- شاروله با حیوانات نر شاروله بودند. حیوانات در هنگام آزمایش هم‌سن و غیرآبستن (تلیسه‌ها) بودند. برای تعیین ژنوتیپ حیوانات در جایگاه BoLA-DRB3، روش توالی‌یابی مستقیم استفاده شد، و برای تعیین توالی اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR از اطلاعات توالی اسیدهای آمینه‌ی ملکول BoLA-DR، ارایه شده در آخرین کارگاه آموزشی BoLA استفاده شد. از یک مدل خطی مختلط برای ارزیابی اثر اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR بر صفات مورد مطالعه، استفاده شد. نتایج نشان داد اسیدهای آمینه موجود در جایگاه ۲۸ام ملکول BoLA-DR بر شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرنوس تاثیر دارد ($P < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: BoLA-DR، استافیلوکوکوس آرنوس، ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، ورم پستان

مقدمه

نژاد دام به دنبال یافتن راهکارهای نوین و کارآمدتر برای کنترل بیماری‌ها هستند. مطالعات نشان داده‌اند که صفت پاسخ به واکسیناسیون و مقاومت به بیماری‌ها دارای واریانس ژنتیکی است (Glass 2004). ملکول‌های مجموعه‌ی اصلی سازگار بافتی (MHC^1) نقش کلیدی در ایجاد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارند و توسط ژن‌های با همین نام در ژنوم رمزدهی می‌شوند. گزارش شده

بیماری‌های دامی خسارات زیادی به صنعت پرورش حیوانات اهلی تحمیل می‌کنند، و اثرات نامطلوبی بر آسایش حیوانات دارند. استراتژی‌های کنونی کنترل بیماری‌های دامی شامل جداسازی و قرنطینه کردن افراد یا گروه‌های حساس، درمان بیمارها، رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون است (Axford & Owen 1991). با این حال، بسیاری از بیماری‌ها با روش‌های یاد شده قابل کنترل نیستند. متخصصین پرورش و اصلاح

1. Major histocompatibility complex

که ژن‌های MHC بین ۱۰ تا ۵۰ درصد از پراکنش مشاهده شده در پاسخ‌های ایمنی را باعث می‌شوند (Glass 2004). مجموعه‌ی اصلی سازگار بافتی دارای تعداد زیادی ژن، و ژن دروغین است. ژن‌های MHC در پستانداران در سه کلاس متمایز I، II و III دسته‌بندی می‌شوند. ژن‌های کلاس I و II ملکول‌هایی را رمزدهی می‌کنند که در ایجاد و تنظیم پاسخ ایمنی نقش دارند. این ملکول‌ها از طریق ارائه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T ایفای نقش می‌کنند. ملکول‌های MHC کلاس I در ارایه‌ی پپتیدهای با طول تقریبی ۹ اسید آمینه به سلول‌های لنفوسیتی CD8+ نقش دارند. ملکول‌های MHC کلاس II پپتیدهای طویل‌تر و با طول ۱۴-۳۴ اسید آمینه را به لنفوسیت‌های CD4+ عرضه می‌کنند (Chicz et al., 1993). پپتیدهای ارایه شده توسط ملکول‌های کلاس II، غالباً از منابع آگزوزن، و پپتیدهای ارایه شده توسط ملکول‌های کلاس I از منابع آندوزن مشتق می‌شوند (Engelhard 1994). هر حیوان تنها تعداد محدودی پروتیین MHC دارد و این دسته محدود از پروتیین‌ها باید قادر به ارایه‌ی پپتیدهای مشتق شده از تمام یا بیشتر عوامل بیماری‌زا به سلول‌های T باشند (Stern & Wilay 1994). ژن‌های MHC به میزان بسیار زیادی چند شکل هستند و بیشتر چند شکلی‌ها در جایگاه پیوند ملکول با پاتوژن یا قطعات پپتیدی حاصل از هضم پاتوژن‌ها، قرار دارند. ظرفیت پیوند ملکول‌های MHC با پاتوژن‌ها، به طور مستقیم با میزان چند شکلی ژن‌های MHC مرتبط است. مجموعه‌ی MHC در گاو به $BoLA^1$ موسوم است. اگزوزن دوم ژن BoLA-DRB3، جایگاه اتصال پپتیدی زنجیره بتا از ملکول BoLA-DR را رمزدهی می‌کند و به میزان زیادی چند شکل است (Schaschl et al., 2004). آل‌های ژن BoLA-DRB3 با مقاومت به سرطان خون (Xu et al., 1993)، درماتوفیلوزیس (Maillard et al., 1996; Maillard et al., 1998)، ورم پستان (Starkenbourg et al., 1997)، ورم پستان (Kulberg et al., 2007)، و پارامترهای ایمنی (Dietz et al., 2007; Rupp et al., 1997) وابسته است. علی‌رغم وجود ارتباط‌های معنی‌دار بین برخی از آل‌های ژن

بیماری ایجاد می‌کنند (Lechler 1994). عمل گزینشی ملکول‌های MHC در پیوند با پپتیدها، توسط خصوصیات بیوشیمیایی پاکت‌های موجود در جایگاه پیوند آنتی‌ژن ملکول‌های مذکور تعیین می‌شود. جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR شامل تعدادی پاکت کوچک است. گزارش شده است پاکت‌های P1، P4، P6، P7، و P9 توسط اگزوزن دوم ژن BoLA-DRB3 رمز می‌شوند و دارای نقش حیاتی در اتصال ملکول BoLA-DR به پپتیدهای پاتوژنی و ارایه‌ی آنها به سلول‌های T می‌باشند. میزان پاسخ ایمنی یک فرد علیه یک آنتی‌ژن ویژه، به میزان زیادی توسط این پاکت‌ها تعیین می‌شود. آرایش و نوع اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پاکت‌های مذکور در پروتیین‌های رمز شده توسط آل‌های مختلف ژن BoLA-DRB3 متفاوت است (Engelhard 1994; Sharif et al., 2000). ورم پستان خسارات زیادی به صنعت پرورش گاو شیری تحمیل می‌کند و آسایش حیوانات را به میزان زیادی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bergonier & Berthelot 2003). این بیماری توسط تعداد زیادی عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود. از مهمترین عوامل بیماری‌زا ایجاد کننده‌ی ورم پستان تحت‌بالینی می‌توان به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرتوس اشاره کرد. استافیلوکوکوس آرتوس باعث افزایش تعداد سلول‌های بدنی شیر می‌شود. این باکتری قادر است توسط مکانیسم‌هایی مانند توانایی بقا و ازدیاد در سلول‌های فاگوسیتوز کننده در پستان دوام داشته باشند (Sandholm & Mattila 1986). استافیلوکوکوس آرتوس

این روش مبتنی بر سنجش تیمیدین نشاندار شده، $^3\text{H-Tyridine}$ است. استفاده از تیمیدین نشاندار شده با هیدروژن رادیواکتیو (^3H)، روشی برای اندازه‌گیری میزان ساخته شدن DNA است. این ماده در گامه‌ی S از چرخه‌ی تقسیم سلولی به DNA می‌چسبد و شاخصی برای اندازه‌گیری ازدیاد سلولی محسوب می‌شود. در این روش، ابتدا نمونه‌های خون با ۱۰ میلی‌لیتر HBSS^۲ (Sigma Ltd., Poole, UK) رقیق شدند، سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محلول قندی Histopaque1077 (Sigma) به هر نمونه اضافه شد و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، در دور ۷۰۰g سانتریفوژ شدند. بخش بالایی هر نمونه جدا شد و سلول‌های خون که در ته لوله رسوب کرده بودند در محلول HBSS مخلوط و شستشو شدند. عمل شستشو سه بار دیگر تکرار شد. در پایان، بخش بالایی هر لوله جدا شد و سلول‌های خون شسته شده که در ته لوله رسوب کرده بودند در محیط کشت (Eagles (BME, Gibco Life Technologies) (Sigma) کشت داده شدند.

یک میلی‌لیتر از محلول فوق (4×10^6 سلول)، به همراه یک میلی‌لیتر از محلول حاوی سویه‌ی NCTC13047 باکتری استافیلوکوکوس آرتوس (2×10^8 باکتری)، یا محلول حاوی فایتوهمگلوتنین (۵ میکروگرم به ازای یک میلی‌لیتر)، یا محلول عاری از هر گونه محرک ایمنی (کنترل)، و چهل میکرولیتر از سرم گرما دیده مخلوط شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۴ روز کشت داده شدند. در روز چهارم، با استفاده از برداشت کننده‌ی سلولی Filtermat 196TM (Canberra Packard) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق جدا شد و به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (BibbySterilin, Staffordshire, UK) منتقل شد. یک میکروکوری (μCi) از $^3\text{H-Tyridine}$ (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Amersham, UK) به هر خانه (چاهک) اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه، با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۶ ساعت انکوباسیون شدند. سلول‌های برداشت شده برای حذف $^3\text{H-Tyridine}$ استفاده نشده در ساختمان DNA.

به عنوان شایع‌ترین عامل بیماری ورم پستان تحت‌بالینی شناخته شده است.

به عنوان مثال، برآورد شده است که بسته به نژاد و منطقه جغرافیایی، در هر زمان بین ۷ تا ۴۰ درصد از گاوهای یک گله به باکتری استافیلوکوکوس آرتوس آلوده هستند (Fox & Gay 1993). واکنش‌های زیادی برای کنترل ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس آرتوس استفاده می‌شوند، ولی تاکنون موفقیت چندانی نداشته‌اند. یک روش داخل آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ازدیادسلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس توسط Fitzpatrick و همکاران (۱۹۹۹) ارائه، و توسط Young و همکاران (۲۰۰۵) تکمیل شد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد گاوهایی که ازدیادسلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیشتری دارند، در برابر استافیلوکوکوس آرتوس مقاومت بیشتری دارند (Fitzpatrick et al., 1999). هدف این تحقیق، بررسی رابطه‌ی بین توالی اسیده‌های آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR، با ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس و فایتوهمگلوتنین^۱ (PHA) بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

این آزمایش در موسسه‌ی رزلین وابسته به دانشکده دامپزشکی دانشگاه ادینبورو انجام شد. در این پژوهش، ۸۶ راس گوساله‌ی نژاد هلشتاین، ۱۵۵ گوساله‌ی دورگ (F₂) هلشتاین و شاروله، ۶۰ گوساله‌ی (R₁) حاصل از آمیزش حیوانات نر هلشتاین- شاروله با حیوانات ماده هلشتاین و ۴۶ گوساله‌ی (R₁) حاصل از آمیزش حیوانات ماده هلشتاین- شاروله با حیوانات نر شاروله استفاده شد. حیوانات در هنگام آزمایش هم‌سن و غیر آبستن (تلیسه‌ها) بودند.

آزمون اندازه‌گیری سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

روش اندازه‌گیری سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی توسط Young و همکاران (۲۰۰۵) تشریح شده است.

2. Hanks' balanced salt solution without calcium or magnesium

1. Phytohemagglutinin

PCR انجام شدند. این واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ترکیبات زیر انجام شدند. ۰/۵ میکرولیتر BigDye® v 3.1 terminator، یک میکرولیتر Big Dye® Buffer، ۰/۵ میکرولیتر^۱ DMSO، ۲/۵ پیکومول پرایمر DRB3REV یا DRB3FRW به طور جداگانه و دو میکرولیتر محصول PCR خالص شده. برنامه‌ی استفاده شده در واکنش توالی‌یابی به شکل زیر بود: واسرشت سازی DNA، سه دقیقه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتیگراد، سپس ۳۰ چرخه: سی ثانیه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتیگراد، بیست ثانیه در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد و چهار دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد. محصولات حاصل از واکنش‌های توالی‌یابی با استفاده از روش مبتنی بر ETDA و اتانول شستشو داده شدند. توالی‌یابی با دستگاه توالی‌یاب DNA 3730xl (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

تعیین ژنوتیپ حیوانات و شناسایی توالی اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR پس از آنالیز محصولات حاصل از واکنش‌های توالی‌یابی در دستگاه توالی‌یاب، با استفاده از نرم‌افزار فنچ تی وی^۲ مطلوبیت نتایج بررسی شد و با روش چشمی اشتباهات احتمالی شناخته شد.

در نرم‌افزار بایوایدیت^۳ ویرایش‌های لازم صورت گرفت و ژنوتیپ هر حیوان با نرم‌افزار تحت لینوکس هاپلوفایندر^۴ <http://www.bioinformatics.roslin.ac.uk/haplofinder> (r/haplofinder.py) تعیین شد. برای شناسایی اسیدهای آمینه‌ی تشکیل دهنده‌ی جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR، داده‌های حاصل از توالی‌یابی آلل‌های ژن BoLA-DRB3 و داده‌های مربوط به توالی اسیدهای آمینه ملکول BoLA-DR ارزیابی شده در آخرین کارگاه آموزشی

BoLA (BoLA) <http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/drb3> (exon 2 peptide.html)، استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

برای بررسی رابطه‌ی بین اسیدهای آمینه‌ی جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR، با ازدیادسلول‌های

شستشو داده شدند و سپس ۲۰ میکرولیتر Scintillation fluid به هر نمونه اضافه شد. با استفاده از TopcountMicroplateScintillation and Luminescence Counter (Canberra Packard) تعداد تیمیدین‌های نشاندار شده در DNAهای سلول‌های تکثیر شده اندازه‌گیری شد. نتایج به شکل تعداد ³H-Tymidine به ازای هر دقیقه، یا به شکل شاخص تحریک (تعداد تیمیدین‌های نشاندار شده DNAهای سلول‌های تکثیر شده در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتئوس یا فایتوماگلوتنین به تعداد تیمیدین‌های نشاندار شده در DNAهای سلول‌های تکثیر شده در حالت کنترل) بیان شد.

تعیین آلل‌های ژن BoLA-DRB3 با استفاده از روش مبتنی بر توالی‌یابی

برای تکثیر یک قطعه‌ی ۲۸۱ جفت بازی در اگزون دوم ژن BoLA-DRB3 پرایمرهای DRB3FRW و DRB3REV به ترتیب با توالی‌های 5'-CGC TCC TGT GA(C/T) CAG ATC TAT CC-3' و 5'-CAC TGT GA(C/T) CAG ATC TAT CC-3' (Baxter et al., 2010) واکنش‌های PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۱۵ پیکومولار از هر کدام از پرایمرها و ۰/۲۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراس (Roche Applied Science) انجام شد. برنامه‌ی استفاده شده در واکنش‌های PCR به شکل زیر بود: واسرشت سازی اولیه‌ی DNA، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ چرخه: تک رشته‌ای شدن DNA سی ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد، اتصال آغازگرها به DNA تک رشته‌ای سی ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتیگراد، تکثیر DNA به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد. در پایان یک چرخه‌ی تکمیل بسط به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد بود. پیش از انجام واکنش‌های توالی‌یابی، لازم است محصولات PCR، از آنزیم، پرایمر، dNTP و نمک-های PCR باقیمانده پاک شوند، بدین منظور از کیت خالص‌سازی محصول PCR (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) استفاده شد. واکنش‌های توالی‌یابی با استفاده از کیت BigDye® v 3.1 (Applied Biosystems, UK) و پرایمرهای استفاده شده در مرحله

1. Dimethylsulfoxide
2. FinchTv
3. BioEdit
4. Haplofinder

پیوند پپتیدی ملکول BoLA-DR، e_{ijkm} : باقیمانده با توزیع نرمال و میانگین صفر.

نتایج و بحث

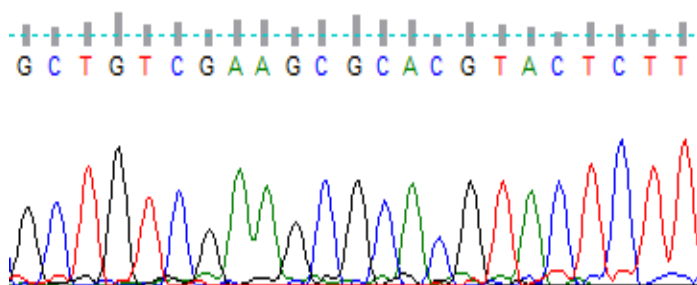
کنترل کیفیت محصول واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد (نگاره‌ی ۱). کیفیت نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار فنچ تی وی بررسی شد (نگاره‌ی ۲). پس از تعیین ژنوتیپ حیوانات در جایگاه BoLA-DRB3، با استفاده از روش توالی‌یابی مستقیم، برای تعیین توالی اسیدهای آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR از اطلاعات توالی اسیدهای آمینه‌ی ملکول BoLA-DR، ارایه شده در آخرین کارگاه آموزشی BoLA استفاده شد (شکل ۳).

تک‌هسته‌ای خون محیطی، مدل خطی مختلط زیر استفاده شد (PROC MIXED; SAS).

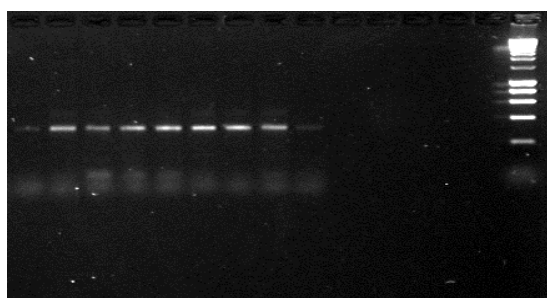
$$y_{ijkm} = \mu + GG_i + Sex_j + Sire_k + \sum b_1 AA_{ijkl} + e_{ijkm}$$

y_{ijkm} : متغیر وابسته، μ : میانگین کل، GG_i : اثر ثابت

آمین گروه ژنتیکی (هلشتاین خالص، تلاقی عقب گرد گاوهای ماده هلشتاین با F_1 حاصل گاوهای ماده هلشتاین و نر شاروله، تلاقی عقب گرد گاوهای نر شاروله با ماده‌های حاصل از گاوهای ماده هلشتاین و نر شاروله، F_2 حاصل از حیوانات آمیخته هلشتاین و شاروله، Sex_j : اثر ثابت ژامین جنس، $Sire_k$: اثر تصادفی k آمین گاو نر، b_1 : ضریب تابعیت متغیر وابسته از تعداد نسخه‌های آمین اسید آمینه، AA: تعداد نسخه (۰، ۱ یا ۲) اسید آمینه ام موجود در پاکت‌های تشکیل دهنده‌ی جایگاه



شکل ۱- محصول واکنش PCR بارگذاری



شکل ۲- محصول حاصل از توالی‌یابی در نرم‌افزار فنچ تی وی شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد

BoLA-DRB3*0101 EYKSECHFFNGTERVRFLLDRYYTNGEETVRFDSWDGGEFRAVTELGRRQDAE
 BoLA-DRB3*0201 EYSTSECHFFNGTERVRFLLDRYFHNGEFVRFDSWDGGEYRAVTELGRRPDAE
 BoLA-DRB3*0301 EYCKSECHFFNGTERVRFLLERSFYNGEEFVRFDSWDGGEYRAVTELGRRPDAK

شکل ۳- اسیدهای آمینه شماره یک تا شماره‌ی پنجاه و یک پپتیدهای رمز شده توسط سه آلل از ژن BoLA-DRB3

پاکت‌های بررسی شده، چند شکلی نشان دادند (جدول ۱). ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به فایتوهمگلوتنین ($1/38 \pm 9/23$) نسبت به

اسیدهای آمینه‌ی تشکیل دهنده‌ی پاکت‌های جایگاه اتصال پپتیدی در ملکول‌های BoLA-DR در جدول ۱ نشان داده شده است. نوع اسیدهای آمینه در تمام

نر نسبت به حیوانات ماده بیشتر بود ($P < 0.05$). همچنین در حیوانات نژاد هلشتاین کمترین ازدیاد سلولی مشاهده شد ($P < 0.05$).

استافیلوکوکوس آرئوس ($1/63 \pm 1/87$) دارای میانگین بیشتر اما انحراف معیار کمتر بود. جنس و گروه ژنتیکی بر میزان ازدیاد سلولی تاثیر داشتند ($P < 0.05$). میانگین ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حیوانات

جدول ۱- اسیدهای آمینه‌ی تشکیل دهنده‌ی پاکت‌های ملکول BoLA-DR رمز شده توسط آلل‌های BoLA-DRB3¹

Allele ^r	Pocket 1 82 ² ,86,89	Pocket 4 13,70,71,74,78	Pocket 6 11	Pocket 7 28,30,47,61,67,71	Pocket 9 9,37,57,60,61
*0101	N, M, F	S, E, K, E, V	S	D, Y, F, W, F, K	E, T, D, Y, W
*0201	N, V, F	S, R, A, A, Y	S	D, Y, Y, W, I, A	E, F, D, Y, W
*0401	N, V, F	G, R, E, A, Y	H	D, Y, Y, W, I, E	E, Y, D, Y, W
*0501	N, V, F	S, R, K, N, Y	H	D, Y, Y, W, I, K	E, Y, D, Y, W
*0601	N, G, F	R, R, K, E, V	C	D, C, F, L, I, K	E, F, V, H, L
*0701	N, V, F	R, E, R, E, V	C	D, C, F, W, F, R	E, F, V, Q, W
*0801	N, V, F	S, D, E, S, Y	A	D, Y, F, L, F, E	E, L, S, H, L
*0901	N, G, F	S, R, K, N, V	S	E, S, Y, W, I, K	E, N, D, Y, W
*0902	N, G, F	S, E, R, E, V	S	E, S, Y, W, I, K	E, N, D, Y, W
*1001	N, G, F	S, R, A, A, Y	S	D, Y, Y, C, F, A	E, Y, V, Y, C
*1002	N, G, F	R, R, A, A, Y	Y	D, Y, Y, C, F, A	E, Y, V, Y, C
*1101	N, V, F	G, R, R, E, V	H	D, H, F, W, F, R	Q, Y, S, Y, W
*1201	N, G, F	K, R, A, A, Y	T	N, Y, Y, W, I, A	E, F, D, Y, W
*14011	N, V, F	G, Q, K, E, V	H	D, H, F, W, F, K	Q, F, A, Q, W
*14012	N, V, F	G, Q, K, E, V	H	D, H, F, W, F, K	Q, F, A, Q, W
*1501	N, V, F	S, R, E, Y, Y	S	D, Y, Y, L, T, E	E, F, V, Q, L
*1601	N, G, F	K, E, K, A, Y	T	D, Y, Y, W, F, K	E, F, D, Y, W
*1701	N, G, F	S, R, E, Y, Y	S	H, Y, F, W, I, E	E, Y, D, Y, W
*1801	N, V, F	S, R, E, Y, Y	A	H, Y, Y, W, T, E	E, F, A, Q, V
*2002	N, G, F	R, Q, R, A, Y	C	D, Y, F, W, F, R	E, R, D, Y, W
*2403 ^r	N, G, -	- , E, R, E, V	-	D, Y, F, W, F, R	- , Y, D, Y, W
*2703	N, G, F	R, E, R, E, V	Y	D, C, F, W, F, R	E, T, D, Y, W
*2707	N, V, F	R, E, R, E, V	Y	D, C, F, W, F, R	E, T, D, Y, W
*2801	N, V, F	G, E, R, E, Y	H	D, H, F, W, F, R	Q, F, A, Y, W
*3101	N, V, F	G, Q, K, E, V	Y	D, H, F, W, F, K	E, F, A, H, W
*3201	N, G, F	R, R, E, Y, Y	C	D, Y, F, W, I, E	E, Y, D, Y, W
*20012	N, V, F	R, Q, R, A, Y	C	D, Y, F, W, F, R	E, R, S, Y, W

۱. A: آلانین، C: سیستین، D: اسپارتیک اسید، E: اسید گلوتامیک، F: فنیل آلانین، G: گلیسین، H: هیستیدین، I: ایزولوسین، K: لایزین، L: لوسین، M: متیونین، N: اسپارازین، P: پرولین، Q: گلوتامین، R: آرژینین، S: سرین، T: ترونین، V: والین، W: تریپتوفان، Y: تیروزین.
۲. شماره جایگاه اسید آمینه زنجیره‌ی بتا از ملکول BoLA-DR تشکیل دهنده‌ی پاکت‌های مختلف جایگاه اتصال پپتیدی.
۳. آلل‌های مختلف ژن BoLA-DRB3 شناسایی شده با روش مبتنی بر توالی‌یابی.
۴. آلل‌هایی که اطلاعات توالی‌یابی آنها بعد از نقطه‌ی شروع، آغاز و قبل از نقطه‌ی پایان، تمام می‌شوند (داده‌های توالی‌یابی ناقص دارند).

۷ ملکول BoLA-DR، به ویژه در حالتی که حاوی اسید آمینه هیستیدین در جایگاه ۲۸ام باشد، با تمایل و شدت کمتری به پپتیدهای مشتق از استافیلوکوکوس آرئوس متصل می‌شوند. همچنین ممکن است پپتید مشتق از استافیلوکوکوس آرئوس با ملکول BoLA-DR اتصال یابد، اما در مرحله ارایه به سلول‌های T، توسط سلول‌های T شناخته نشود. حضور اسید آمینه هیستیدین در جایگاه ۲۸ام ملکول BoLA-DR ممکن است در بار الکتریکی خالص ملکول BoLA-DR تاثیر داشته و باعث جلوگیری از اتصال برخی پپتیدهای پاتوژنی به ملکول BoLA-DR شود.

جایگاه اسید آمینه‌ی ۲۸ بر شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرئوس (میزان ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرئوس بر میزان ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل) تاثیر داشت ($P < 0.05$). اسیدهای آمینه اسید گلوتامیک، اسید اسپارتیک، اسپارازین و هیستیدین در جایگاه ۲۸ام مربوط به پاکت هفتم ملکول BoLA-DR قرار دارند، که از بین آنها، اسید آمینه‌ی هیستیدین باعث کاهش به میزان $(-0/50 \pm 0/26)$ در شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرئوس شد ($P < 0.05$). می‌توان استنباط کرد که پاکت

Baxter و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که اسید آمینه‌ی گلوتامیک اسید و آرژنین در جایگاه ۷۰ به ترتیب با سطوح پایین‌تر و بالاتر IgG1 و IgG2 در پاسخ به ویروس تب برفکی در گاو وابسته هستند. پژوهش‌گران مختلف، رابطه‌ی اسیده‌های آمینه جایگاه اتصال پپتیدی ملکول BoLA-DR را با صفات متفاوتی و در جمعیت‌های متفاوت بررسی کرده‌اند و نتایج پژوهش‌ها نیز تفاوت دارد. دلیل وجود تفاوت در نتایج پژوهش‌های مختلف را می‌توان به صورت زیر بیان کرد. رابطه‌ی یک آلل با صفات مختلف، می‌تواند متفاوت باشد. همچنین مقاومت به یک بیماری توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود که پیوستگی ژن BoLA-DRB3 با سایر ژن‌های موثر بر یک صفت در جمعیت‌های مختلف متفاوت است.

نتیجه‌گیری کلی

اگرچه رابطه‌ی معنی‌دار بین وجود اسید آمینه هیستیدین در جایگاه ۲۸ام از ملکول BoLA-DR با شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرتوس مشاهده شد، مکانیسم بیولوژیکی آن به بررسی بیشتر نیاز دارد. از طرف دیگر، از آنجا که توسعه واکسن‌های موثر علیه بیماری ورم پستان به دلیل تنوع عوامل بیماری‌زای ایجاد کننده بیماری و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی از عوامل ژنتیکی موثر بر مقاومت به بیماری تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده است، اجرای چنین پژوهش‌هایی برای ساخت واکسن موثر علیه بیماری ورم پستان ضروری هستند (Park et al., 2004).

جایگاه‌های اسید آمینه‌ی ۴۷، ۶۷ و ۷۸ بر شاخص تحریک فایتوهمگلوتنین (ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به فایتوهمگلوتنین بر ازدیاد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون در حالت کنترل) تاثیر داشتند ($P < 0.05$). وجود اسیده‌های آمینه تیروزین و فنیل‌آلانین در به ترتیب جایگاه‌های ۷۸ و ۴۷ با افزایش شاخص تحریک فایتوهمگلوتنین وابسته بودند، بطوریکه تیروزین به میزان $0.23 (\pm 0.10)$ و فنیل‌آلانین به میزان $0.263 (\pm 0.10)$ این شاخص را افزایش دادند ($P < 0.05$). وجود اسید آمینه ایزولوسین در جایگاه ۶۷ام بر شاخص تحریک فایتوهمگلوتنین تاثیر داشت ($P < 0.05$). اسیده‌های آمینه موجود در سایر جایگاه‌ها بر صفات مطالعه شده تاثیر نداشتند ($P \geq 0.05$). مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت به لوسمی با اسید آمینه اسید گلوتامیک در جایگاه ۷۰ و آرژنین در جایگاه ۷۱ جایگاه پیوند آنتی‌ژنی زنجیره بتای ملکول BoLA-DR وابسته است (Xu et al., 1993). Maillard و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که وجود اسید گلوتامیک، ایزولوسین، آلانین و تیروزین به ترتیب در جایگاه‌های ۶۶، ۶۷، ۷۴ و ۷۸ با مقاومت به بیماری درماتوفیلوزیس وابسته است. Sharif و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که وجود اسید گلوتامیک در جایگاه ۷۴، آرژنین یا لایزین در جایگاه ۱۳، و آرژنین در جایگاه ۷۱ ملکول BoLA-DR با بیماری ورم پستان ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس‌های غیر آرتوسی رابطه معنی‌دار دارد.

REFERENCES

1. Axford., R.F.E., Owen, J.B. (1991). Breeding for disease resistance in farm animals. CAB International, UK, 3-9.
2. Baxter,R., Craigmile, S.C., Haley, C., Douglasc, A.J., Williams, J.L., Glass, E. J. (2010). BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*, 28, 28-37.
3. Bergonier, D., Berthelot, X. (2003). New advance in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest. Produc.Sci.*, 79, 1-16.
4. Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.C., Strominger, J.L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR molecules. *J Exp Med*, 178, 27-47.
5. Dietz, A.B., Detilleux, J.C., Freeman, A.E., Kelley, D.H., Stabel, J.R.,Kehrl, J.M.E. (1997). Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci*, 80, 400-405.
6. Engelhard, V. H. (1994). Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 12, 181-207.
7. Fitzpatrick, J.L., Logan. K.E., Young, F.J., Stera, M.J., Platt, D.J.,McGuirk, B. J. (1999). Breeding cattle for mastitis resistance. Page 46-53 in proceedings of the British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK. Institute for Animal Health, Compton, UK.

8. Fox, L.K., Gay. J. (1993). Contagious mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9, 475-487.
9. Glass, E. J. (2004). Genetic variation and responses to vaccines. *Anim Health Res Rev*, 52, 197-208.
10. Kulberg, S., Heringstad, B., Guttersrud, O.A., Olsaker, I. (2007). Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cow. *J. Anim. Breed&Genet*, 124, 201-207.
11. Lechler, R., (1994). The roles of class I and class II molecules of the major histocompatibility complex in T cell immunity. In: HLA and disease (ed: Lechler) pp. 69-72. Academic press LTD. London.
12. Maillard, J.C., Chantoi, I., DeRenal, M., Elsen, J.M. (1998). An amino acid motif in BoLA DRB3 locus alleles is a highly significant genetic marker gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of susceptibility to bovine dermatophilosis. Proceeding of the XXVI International Conference on Animal Genetic. Auckland, New Zeland, August, 1998.
13. Maillard, J.C., Maainez, D., Bensaid, A. (1996). An amino acid sequence coded by the exon 2 of the BoLA DRB3 gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of resistance to dermatophilosis in Brahman zebu cattle of Martinique (FWI). *Ann NY Acad Sci*, 791, 185-197.
14. Park, Y.H., Joo, Y.S., Park, J.Y., Moon, J.S., Kim, S.H., Kwon, N.H., Ahn, J.S., Davies, W.C., Davies, C.J. (2004). Characterization of lymphocyte subpopulation and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis resistance and susceptibility cows. *J. Vet. Sci*, 5, 29-39.
15. Rupp, R., Hernandez, A., Mallard, B.A. (2007). Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci*, 90, 1029-1038.
16. Sandholm, M., Mattila, T. (1986). Biochemical aspects of bovine mastitis. *Israel. J. Vet. Med.*, 42, 405, 415.
17. Schaschl, H., Goodman, S.T., Suchentrunk, F. (2004). Sequence analysis of the MHC class II DRB3 alleles in Alpine Chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Developmental & Comparative Immunology*, 28, 265, 277.
18. Sharif, S., Mallard, B.A., Sargeant, J.M. (2000). Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by staphylococcus species. *Vet Immunol Immunopathol*, 76, 231-238.
19. Starckenburg, R.J., Hansen, L.B., Kehrl, J.M.E., Chester- Jones, H. (1997). Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins milk selection and control lines. *J. Dairy Sci*, 80, 3411-3419.
20. Stern, L.J., Wilay, D.C. (1994). Analysis peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure.*, 2, 245-251.
21. Xu, A., van Eijk, M.J.T., Park, C., Lewin, H.A. (1993). Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukaemia virus. *J. Immunol.*, 151, 6977-6985.
22. Young, F.J., Woolliams, J.A., Williams, J.L., Glass, E.J., O'Neill, R.G., Fitzpatrick, J.L. (2005). In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation in a Crossbred Cattle Population. *J. Dairy Sci*, 88, 2643-26.