



تولیات دامی

دوره ۱۷ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۴

صفحه‌های ۱۸-۹

بررسی ساختار ژن TLR4 در دو سویه از طیور تجاری لاین آرین و بومی آذربایجان غربی

ثنا فرهادی^۱، علی‌اکبر مسعودی^{۲*}، رسول واعظ ترشیزی^۳

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۰۵

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۴

چکیده

در این مطالعه، ساختار ژن TLR4 به عنوان گیرنده اصلی در شناسایی لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی در دو سویه از طیور تجاری لاین آرین و بومی آذربایجان غربی بررسی و بیان آن در برخی از اندام‌های اصلی مطالعه شد. از ۱۲۰ قطعه پرند خون‌گیری و DNA کل آنها استخراج شد. با طراحی چهار جفت آغازگر اختصاصی، کل ژن TLR4 در چهار قطعه از پرندگان هر سویه توالی‌یابی شد. تأثیرات تغییرات اسید آمینه‌ای بر عملکرد پروتئین با نرم‌افزار PANTHER بررسی شد. بررسی بیان ژن با روش RT-PCR نیمه کمی پس از استخراج RNA از بافت‌های کبد، طحال، و ریه انجام گرفت و سپس تصاویر حاصل از الکتروفورز با نرم‌افزار JImage پردازش و داده‌های حاصل از آن با نرم‌افزار آماری MINITAB تجزیه شد. نتایج تحقیق حاضر، سه SNP جدید (C2246A، A1832G، T1147C) را نشان داد. بررسی‌های عملکرد پروتئینی نشان داد که همه این تغییرات تک‌نوکلئوتیدی در پروتئین مزبور اختلال ایجاد می‌کنند. بیان ژن TLR4 در سویه آرین مقادیر بالاتری را در مقایسه با سویه بومی نشان داد ولی دو سویه تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. با توجه به اهمیت بالای این ژن در سیستم ایمنی ذاتی و مشخص شدن تغییرات نوکلئوتیدی جدید مؤثر بر ساختار پروتئین حاصل، این ژن می‌تواند به عنوان کاندیدی مرتبط با مقاومت ژنتیکی در جمعیت پرندگان مدنظر قرار بگیرد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، ژن TLR4، ساختار پروتئین، مرغ.

مقدمه

در بیماری‌های باکتریایی گرم منفی همچون سالمونلوز، پاستورلوز، و کلی‌باسیلوز به‌علت پخش عامل بیماری، خسارات اقتصادی سنگینی در صنعت پرورش طیور به وجود می‌آید. از طرف دیگر، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل ایجاد مقاومت به باکتری‌های بیماری‌زا با نگرانی‌هایی همراه است (۲۳)، بنابراین انتخاب پرنده‌گانی با سابقه ژنتیکی برتر می‌تواند در بهبود تولید مؤثر باشد. لیپوپلی‌ساکاریدها که از اجزای اصلی غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی هستند، از بهترین الگوهای پاتوژنی هستند که انواعی از پاسخ‌های محرک ایمنی شامل سایتوکین‌های پیش‌التهابی اینترلوکین ۱۲ را تحریک می‌کنند (۱۲). TLR4 (Toll-Like Receptors-4) هم‌گیرنده‌ای منحصر به فرد در بین گیرنده‌های شبه تول (TLRs) است که لیگاند لیپوپلی‌ساکاریدی را می‌شناسد. تفاوت ژنتیکی در این گیرنده می‌تواند با ایجاد تفاوت در مقاومت در برابر پاتوژن‌های گوناگون منجر به کاهش پاسخ سایتوکین‌ها و افزایش استعداد ابتلا به عفونت با باکتری‌های گرم منفی شود (۲۴).

سیستم ایمنی ذاتی از شباهت زیادی بین پستانداران، حشرات، و گیاهان برخوردار است. این سیستم به‌شدت در طی تکامل حفاظت شده است (۱۵). TLRs یکی از اعضای اصلی سیستم ایمنی ذاتی و رابط سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند که الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها (PAMP) را شناسایی می‌کنند و در برقراری هموستازی ایمنی و دفاع علیه عفونت‌ها نقش کلیدی دارند (۴ و ۸). تاکنون ۱۳ نوع TLRs در پستانداران شناسایی شده است

که هر TLR به یک محصول میکروبی مشخص متصل شده است و توالی‌های مولکولی خاصی از عوامل بیماری‌زا را تشخیص می‌دهند و در شروع پاسخ‌های ایمنی بدن به پاتوژن‌های میکروبی نقش محوری دارند (۱۹). لیگاند‌هایی که با TLRs گوناگون شناسایی می‌شوند از نظر ساختاری متفاوت و گوناگون هستند و شامل محصولات تمام رده‌های میکروارگانیسم‌ها هستند. این گیرنده‌ها توزیع متفاوتی در سلول‌ها دارند. از این خانواده TLR1، TLR2، TLR4، TLR6 و TLR7 در سطح سلول بیان می‌شوند، در حالی که TLR3، TLR7، TLR8 و TLR9 در ساختار داخل سلولی یافت شده‌اند (۶). از شناخته‌شده‌ترین این گیرنده‌ها TLR4 است که به‌عنوان گیرنده اصلی در شناسایی لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کند (۱۰). ژن TLR4 در پرنده‌گان روی کروموزوم ۱۷ قرار گرفته و دارای سه اگزون و دو اینترون است. مطالعات متعددی روی چندشکلی‌های اگزون سوم TLR4 انجام شده است (۱۶ و ۱۸) که بیشترین تنوع ژنتیکی بین TLR4 در پستانداران گوناگون، در حوزه خارج سلولی غنی از تکرارهای لوسین (LRR) رخ داده است (۲۰). دو مورد از این چندشکلی‌ها (D299G, T399I) که در حوزه خارج سلولی ژن TLR4 واقع شده است، با تغییر در قدرت اتصال این گیرنده به لیگاند، باعث اختلال در سیگنال‌های فرستاده‌شده از طریق گیرنده TLR4 می‌شود (۵). اغلب چندشکلی‌های این منطقه در تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها مؤثر هستند. از آنجاکه تغییر باز در حوزه خارج سلولی ژن TLR4 ممکن است بر بیان یا نحوه انتقال این گیرنده به سطح سلول مؤثر باشد، تفاوت در پاسخ‌دهی پرنده‌گان دارای TLR4 جهش‌یافته ممکن است به‌دلیل افزایش بیان این گیرنده‌ها باشد (۵). ژن TLR4 در اغلب بافت‌ها بیان دارد ولی سطح بیان آن در اندام‌های ایمنی مانند شش، تیموس، غده‌های لنفی، کبد، و طحال بیشتر از سایر اندام‌ها است (۱۷). هنگام

1. Pathogen Associated Molecular Pattern

تولیدات دائمی

پرورش و اصلاح نژاد مرغ لاین آرین واقع در بابل کنار و پرندگان بومی از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان غربی، به مرغداری دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انتقال و پرورش داده شدند. پس از خون‌گیری، استخراج DNA از ۱۲۰ قطعه پرنده (۵۳ مرغ تجاری آرین و ۶۷ مرغ بومی ارومیه) به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (۱۳) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA حاصل با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر ژل آگارز بررسی شد. سپس به منظور طراحی آغازگر برای ژن TLR4 ابتدا توالی مرتبط به آن در طیور از سایت NCBI با شماره دستیابی (NM_001030693.1) دریافت شد. آغازگرها با نرم افزار Oligo (نسخه 7.0) طراحی و اختصاصی بودن جایگاه اتصال آن‌ها در ژنوم طیور با BLAST تأیید شد. باتوجه به اندازه ناحیه کدکننده ژن (۲۵۲۵ جفت باز)، چهار جفت آغازگر برای تکثیر ناحیه کدکننده این ژن طراحی شد (جدول ۱).

چالش پرندگان با باکتری‌های گرم منفی، سطح بیان ژن TLR4، اغلب، در بافت‌های کبد و طحال و ریه افزایش می‌یابد، بنابراین این بافت‌ها به عنوان بافت‌های حیاتی در بررسی بیان ژن فوق مدنظر قرار می‌گیرند (۹ و ۱۴).

باتوجه به اهمیت ژن‌های خانواده TLR در سیستم ایمنی ذاتی، بررسی چندشکلی ژن TLR4 که به عنوان مهم‌ترین عضو شناخته شده این دسته از ژن‌هاست، می‌تواند در پیدا کردن پرندگانی با مقاومت ژنتیکی بالاتر در جمعیت کمک کند. هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی ساختاری ژن TLR4 در دو سویه از طیور تجاری لاین آرین و بومی آذربایجان غربی است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش که برای شناسایی ساختار ژن TLR4 و در راستای تحقیق قبلی (۱) انجام شده است، از پرندگان سنگین وزن لاین گوشتی آرین به عنوان سویه تجاری و مرغ بومی ارومیه استفاده شد. پرندگان سویه آرین از ایستگاه

جدول ۱. توالی‌های آغازگر استفاده شده برای تکثیر و بررسی بیان ژن TLR4

نام آغازگر	توالی (۳' → ۵')	دمای اتصال (°C)	طول محصول تکثیری (bp)
TLR-Forward1	TGAGGAGCAGGCGTGGTGAAG	۶۴	۶۷۷
TLR-Reverse1	CCTCAGGGCATCAAGGTCTCC		
TLR-Forward2	CCACATCCATACAATAGAAGA	۵۹	۸۹۶
TLR-Reverse2	CACTCAAATCTACAACCTCCA		
TLR-Forward3	TTGAGAGTGCTTCGTATTACC	۶۱	۱۰۲۱
TLR-Reverse3	CTTGGTCTTTGCTGGAATGGA		
TLR-Forward4	ACTACTCATTGGTGCTGCTCA	۶۱	۹۶۲
TLR-Reverse4	GTTCAAAGCCAATAGTTCTGG		
GAPDH-Forward	ACACCGATACAACACCACGCA	۶۰	۲۸۸
GAPDH-Reverse	GTATTCAAGTGCCGATGGGT		

تولیدات دامی

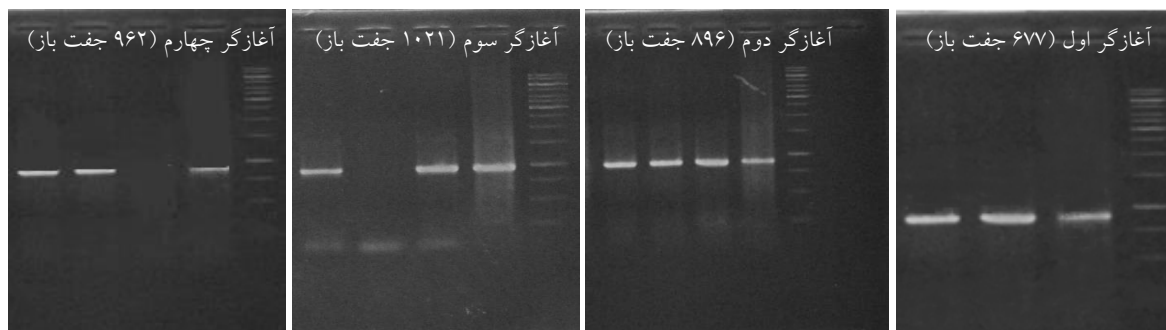
به آن تبدیل شد و در ادامه بخش‌هایی از توالی که نقاط تغییر داشتند و اسید آمینه را نیز تغییر داده بودند، شناسایی و به نرم‌افزار فوق معرفی شدند. در نهایت میزان تأثیر حاصل از تغییر تک‌نوکلئوتیدی بر عملکرد پروتئین TLR4 مشخص شد.

همچنین به منظور بررسی بیان ژن TLR4، پس از استخراج RNA (با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناژن) از بافت‌های کبد، ریه، و طحال، غلظت نمونه‌های استخراج‌شده از هر سه بافت، با کمک اسپکتروفتومتر تعیین شد و غلظت نمونه‌ها یکسان شدند. در مرحله بعد با آغازگرهای اختصاصی ژن GAPDH، نمونه‌ها بهینه شدند و براساس شدت باندها، نمونه‌های cDNA برای بررسی بیان ژن TLR4 نرمال شدند (جدول ۱). بیان ژن TLR4 با آغازگر دوم روی بافت‌ها بررسی شد. به این صورت که محصولات حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی برای هر سه نمونه بافت با سه تکرار برای هر دو گروه آراین و بومی به دست آمد و باندهای حاصل، در ژل آگارز زیر نور ماوراءبنفش مشخص شدند (شکل ۲). پس از گرفتن تصاویر ژل‌ها، باندهای حاصل با نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۴۶) پردازش و داده‌های حاصل تجزیه شدند.

به منظور آماده‌سازی محصولات PCR، چرخه‌های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و دوره سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در بازه دمای ۶۰-۶۴ برای جفت آغازگرهای متفاوت به مدت ۴۰ ثانیه، و طول‌سازی قطعه موردنظر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه با تکرار ۳۵ چرخه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد (شکل ۱).

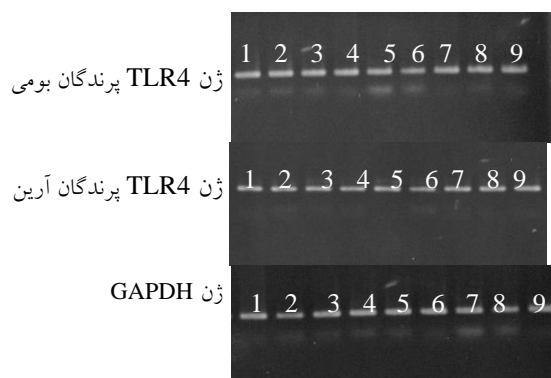
محصولات حاصل از تکثیر سه پرنده به صورت تصادفی و یک نمونه ترکیبی از بقیه پرنده‌ها از هر سویه برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند. سپس تمامی توالی‌های حاصل از تعیین توالی با نرم‌افزارهای MEGA5 و ClustalW (نسخه ۲/۱) (۲۲) زیر یکدیگر هم‌ردیف و مرتب شدند و نواحی دارای حذف، اضافه، جابجایی یا جانشینی مشخص شدند.

بررسی تأثیرات احتمالی تغییرات اسیدآمینه‌ای بر عملکرد پروتئین با نرم‌افزار PANTHER بررسی شد (۲۱). به‌طور خلاصه، ابتدا توالی حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR برای هر سویه جداگانه به توالی اسیدآمینه‌ای مربوط



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن TLR4 در ژل آگارز ۱/۵ درصد در مقیاسه با مقیاس (GeneRuler 0.5-10 kb DNA Ladder)

تولیدات دامی



شکل ۲. نمونه‌های آنالیز بیان ژن TLR4 مربوط به سه تکرار از پرندگان بومی و آرین (اعداد یک تا سه مربوط به محصول PCR نمونه بافت کبد، چهار تا شش محصول PCR نمونه بافت طحال، هفت تا نه محصول PCR نمونه بافت ریه، با الکتروفورس ژل آگارز یک درصد

ایجاد تفاوت در پاسخ ایمنی ذاتی به طیف مشخصی از باکتری‌های گرم منفی می‌شوند (۱۱).

تکثیر و تعیین توالی ژن TLR4 در دو گروه پرندگان استفاده‌شده در این آزمایش و هم‌ردیفی آن‌ها، شش تغییر جابه‌جایی و یا جانشینی A834G، T1147C، G1455C، A1832G، C2246A، T2487G را در آگزون سوم نشان داد. از بین شش تغییر مشاهده‌شده در این تحقیق، سه مورد از آن‌ها در NCBI به ثبت رسیده است (جدول ۲). بنابراین تغییرات جانشینی T1147C، A1832G و جابه‌جایی C2246A جدید بود و در تحقیق حاضر مشاهده شد (شکل ۳).

اثر احتمالی تغییرات تک‌نوکلئوتیدی بر عملکرد پروتئین با نرم‌افزار PANTHER بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه داده‌ها، میزان اثرگذاری تغییر اسیدآمین به عملکرد پروتئینی مورد نظر را نشان داد (جدول ۳). مقادیر مربوط به جانشینی در موقعیت خاص حفاظت‌شده (subPSEC) و احتمال اثر نامطلوب جانشینی ($P_{deleterious}$)، با هم مرتبط هستند. هرچه مقدار جانشینی در موقعیت خاص حفاظت‌شده عدد منفی تری را نشان دهد، به همان نسبت احتمال اثر نامطلوب جانشینی مقدار بیشتری خواهد داشت. به بیان دیگر، هرچه تأثیر نامطلوب دگرگونی اسیدآمین بیشتر باشد، اثر تغییر بر اختلال در عملکرد معمول پروتئین در سیستم بیولوژیکی بدن جاندار

از مدل آماری ۱ برای آنالیز بیان ژن TLR4 استفاده شد:

$$y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + e_{ijk} \quad (1)$$

در این رابطه: y_{ijk} ، k آمین مشاهده از j آمین بافت و i آمین سویه برای مقادیر گوناگون حاصل از پردازش باندها، μ میانگین جمعیت، B_i اثر آمین سویه (در دو سطح)، T_j اثر j آمین بافت (در سه سطح)، و e_{ijk} اثر تصادفی باقیمانده است. داده‌های حاصل با روش GLM و نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۶) آنالیز و میانگین‌ها به کمک روش توکی مقایسه شدند.

نتایج و بحث

TLRs معمولاً بر سطح سلول‌هایی که اولین سد برخورد با آنتی‌ژن هستند، بیان می‌شوند. مهم‌ترین بستر این گیرنده‌ها سلول‌هایی همچون ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، نوتروفیل‌ها، و مونوسیت‌ها هستند (۳). TLRs پستانداران در پاسخ علیه انواع متفاوتی از مولکول‌ها که گونه‌های میکروبی به وجود می‌آورند، شرکت می‌کنند، به عبارت دیگر بیان بالای این ژن در سلول نشان‌دهنده آسیب سلولی است (۲۵). از طرف دیگر، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که چندشکلی ژن TLR4 با مستعدساختن حیوانات به عفونت با باکتری‌های گرم منفی مرتبط است که این چندشکلی‌ها با اختلال در عملکرد گیرنده TLR4 باعث

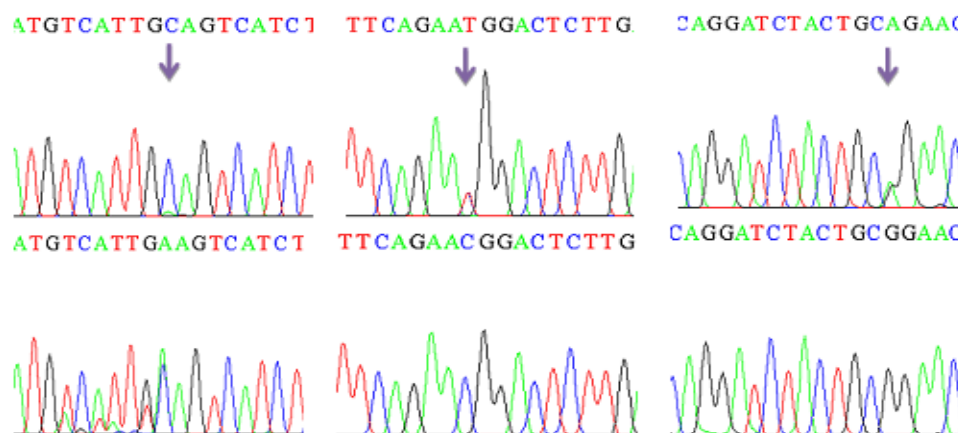
تولیدات دومی

بیشتر خواهد بود. در هر سه تغییر پروتئینی Y۳۸۳H، Q۶۱۱P و A۷۴۹E جانشینی در موقعیت خاص حفاظت شده نزدیک به ۳- و احتمال اثر نامطلوب جانشینی عددی نزدیک به ۰/۵ را نشان می دهند که حاکی از تأثیر معنی دار این تغییرات در ساختار سه بعدی و عملکردی پروتئین است (جدول ۳).

جدول ۲. تغییرات تک نوکلئوتیدی ژن TLR4 در پرندگان مطالعه شده و محل وقوع آن‌ها*

موقعیت روی mRNA	تغییرات آلی	موقعیت پروتئینی	تغییرات اسید آمینه‌ای	عملکرد
۸۳۴	A/G	۲۷۸	N/N[Asn]→[Asn]	Synonymous
۱۱۴۷	T/C	۳۸۳	Y/H [Tyr]→[His]	Missense
۱۴۵۵	G/C	۴۸۵	L/L [Leu]→[Leu]	Synonymous
۱۸۳۲	A/G	۶۱۱	Q/P [Gln]→[Pro]	Missense
۲۲۴۶	C/A	۷۴۹	A/E [Ala]→[Glu]	Missense
۲۴۸۷	T/G	۸۲۹	L/L [Leu]→[Leu]	Synonymous

*: از چپ به راست، در ستون اول، موقعیت تغییرات آلی روی mRNA و در ستون دوم تغییرات بازی توسط خط کسر نمایش داده شده که باز سمت چپ کسر به راست آن تغییر یافته است. در ستون‌های سوم و چهارم موقعیت پروتئینی و تغییر اسید آمینه به دو صورت علامت اختصاری تک حرف و سه حرفی نشان داده شده است. ستون پنجم، نوع اثر تغییرات (خنثی و یا تغییر یک اسید آمینه) در پروتئین حاصل را نشان می دهد.



شکل ۳. به ترتیب از سمت چپ به راست جابه‌جایی باز C به A برای جایگاه ۲۲۴۶، جانشینی باز T به C برای جایگاه ۱۱۴۷، و جابه‌جایی باز A به G برای جایگاه ۱۸۳۲

جدول ۳. بررسی اثر تغییر اسید آمینه بر عملکرد پروتئین با نرم افزار PANTHER

جایگزینی	احتمال اثر نامطلوب جانشینی	جانشینی در موقعیت خاص حفاظت شده
Y۳۸۳H	۰/۲۹۷	-۲/۱۵
Q۶۱۱P	۰/۴۶۷	-۲/۸۷
A۷۴۹E	۰/۴۸۶	-۲/۹۵

نمایه‌های احتمال اثر نامطلوب جانشینی و جانشینی در موقعیت خاص حفاظت شده نشان‌دهنده میزان اثرگذاری تغییر اسید آمینه‌ای بر فعالیت پتیدی هستند.

تولیدات دامی

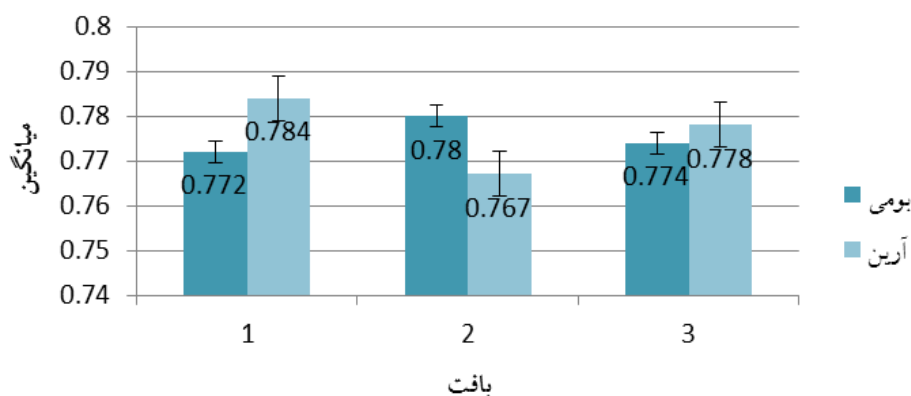
است که بی‌تردید موجب تأثیرات بسزایی در ساختار پروتئینی ژن TLR4 در پرندگان آرین خواهد بود. باتوجه به مقادیر دو معیار Pdeleterious و subPSEC تأثیرات سوء این تغییرات اسیدآمینه‌ای در ساختار پروتئین حاصل، بسیار محتمل است (جدول ۳). جانشینی اسیدآمینه گلوتامیک به جای آلانین در جایگاه ۷۴۹ بیشترین تأثیر را در ساختار پروتئین دارد (جدول ۳). همچنین باتوجه به اینکه این تغییر در حوزه خارج سلولی پروتئین TLR4 است، می‌تواند عملکرد پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد؛ زیرا انتقال پیام در TLRs از طریق این حوزه صورت می‌گیرد (۷).

همه این چندشکلی‌ها روی آگزون سوم این ژن واقع شده‌اند و باتوجه به میزان مخرب بودن این تغییرات، می‌توانند حوزه TIR ژن TLR4 را دچار تغییر کنند و با تغییر در میزان تمایل این گیرنده به لیگاند باعث اختلال در سیگنال‌های فرستاده‌شده از طریق گیرنده TLR4 شوند (جدول ۳). حوزه TIR، با قراردادن حوزه‌های سیتوپلاسمی کنار هم، آنها را به هم نزدیک می‌کند و موجب تسهیل در فراخوانی و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی متفاوت می‌شود (۷).

با پردازش تصاویر حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با نرم‌افزار Image J مقادیر کمی بیان ژن تعیین شد. سویه آرین مقادیر بالاتری از بیان ژن TLR4 را در بافت‌های کبد و ریه در مقایسه با سویه بومی داشت، ولی تفاوت معنی‌داری بین دو سویه از نظر بیان ژن TLR4 در بافت‌های بررسی‌شده، مشاهده نشد. در توافق با این امر، طبق دیگر گزارش‌ها، بیان ژن TLR4 در سه لاین ژنتیکی متفاوت در بافت طحال و سکوم پرندگان تفاوت معنی‌داری ندارند (۲). از طرف دیگر، باتوجه به اینکه محرک فعالیت TLRs، باکتری‌های گرم منفی است، احتمالاً عدم چالش پرندگان در این تحقیق با باکتری‌های گرم منفی از دلایل عدم تفاوت در بیان ژن TLR4 در پرندگان دوسویه تجاری آرین و بومی ارومیه است.

جانشینی باز تیمین با سیتوزین در جایگاه ۱۱۴۷ (T1147C) اسیدآمینه آبگریز تیروزین را با اسیدآمینه آب‌دوست هیستیدین جایگزین می‌کند. باتوجه به اینکه یکی از خصوصیات مهم اسیدهای آمینه که نقش مهمی در تاشدن پروتئین دارند خصوصیت آبگریزی آنهاست، این تغییر می‌تواند حائز اهمیت باشد. مقادیر دونمایه مربوط به این تغییر اسیدآمینه‌ای در نتایج حاضر نیز می‌تواند با تأثیر جایگزینی اسیدآمینه هیستیدین مطابقت داشته باشد (جدول ۳). جانشینی مشاهده‌شده در باز شماره ۱۸۳۲ (A1832G) فقط در گروه آرین مشاهده شد که باعث تغییر آدنین به گوانین می‌شود. نتیجه این تغییر، جانشینی اسیدآمینه پرولین به جای گلوتامین است. پرولین از اسیدهای آمینه ویژه و یک ترکیب منحصربه‌فرد در ساختمان پروتئین‌هاست، چون در آن عامل آمین متصل به کربن آلفا با زنجیره کناری به صورت حلقه درآمده است و آنرا از بقیه اسیدهای آمینه مستثنا می‌کند. به علت اینکه زنجیره جانبی در پرولین خیلی غیرفعال است، قادر نیست همه آرایش‌های فضایی گوناگون را به خود بگیرد و به دلیل عدم پذیرش آرایش‌های فضایی متفاوت به‌ندرت قادر است در جایگاه‌های فعال و اتصال‌شونده قرار بگیرد، در مقابل گلوتامین در مکان‌های اتصال‌شونده و فعال پروتئین به‌وفور یافت می‌شود. این تغییر احتمالاً می‌تواند ساختار پروتئین TLR4 را در گروه آرین تغییر دهد. جایگزینی باز سیتوزین با آدنین در جایگاه ۲۲۴۶ (C2246A) نیز فقط در گروه آرین مشاهده شد که اسیدآمینه غیرقطبی آلانین را که کم‌تحرک‌ترین اسیدآمینه و مخفی‌تر از بقیه اسیدهای آمینه در ساختار پروتئین است را با اسیدگلوتامیک که اسیدآمینه‌ای قطبی و باردار است و معمولاً در سطح پروتئین قرار می‌گیرد و به فراوانی در جایگاه‌های فعال پروتئین حضور دارد، جانشین می‌کند. این دو تغییر نوکلئوتیدی باعث جایگزینی اسیدآمینه با ویژگی‌های متضاد از نظر قطبیت و نحوه قرارگیری در ساختمان پروتئین شده

تولیدات دامی



شکل ۴. سطح بیان در بافت‌های کبد (۱)، طحال (۲)، ریه (۳) در دو گروه بومی و آرین

بیان ژنی یکسان از ژن TLR4 در بافت‌های گوناگون حیاتی پرندگان نشان می‌دهد که تغییر بیان این ژن می‌تواند به‌عنوان الگوی ژنتیکی در درگیری یا عدم درگیری پرندگان به عفونت باکتریایی در مزارع تجاری به‌کار برده شود.

منابع

۱. مقصودی ع، واعظ ترشیزی ر، مسعودی ع ا و کریمی ترشیزی م ا (۱۳۹۲) دوشکلی جنسی در پاسخ ایمنی سلولی و خونی دوسویه از طیور تجاری لاین آرین و بومی آذربایجان غربی. علوم دامی ایران. ۴۴(۴): ۳۷۴-۳۶۷.
2. Abasht B, Kaiser MG, Vander PJ and Lamont SJ (2009) Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with Salmonella Entericaserovar Enteritidis. Poultry Science. 88: 744-749.
3. Akira Sh, Uematsu S and Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell. 124(24): 783-801.
4. Akira Sh (2004) Toll receptor families: structure and function. Seminars in Immunology. 16: 1-2.

تفاوت میزان بیان ژن TLR4 در بافت‌های گوناگون یک‌سویه معنی‌دار نبود (شکل ۴). نتیجه حاصل با نتایج سایر مطالعات در طیور یکسان بود و بررسی بیان ژن TLR4 در بافت‌های ریه و کبد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۹). محرک بیان برای ژن TLR4 لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی است که معمولاً بررسی بیان ژن فوق در مطالعات به‌صورت گروه‌های سالم و چالش‌شده با باکتری گرم منفی (معمولاً سالمونلا) مدنظر قرار می‌گیرد. هنگام عفونت با باکتری‌های گرم منفی همچون سالمونلا / اینتریتیدیس، لیپوپلی ساکارید منبع عمده التهاب و TLR4 واسطه‌ای بسیار مهم برای تأثیرات لیپوپلی ساکارید است. به‌منظور فعال‌شدن TLR4، در ابتدا لیپوپلی ساکارید به پروتئین محلول متصل‌شونده به آن در خون یا مایعات خارج سلولی متصل می‌شود و سپس این مجموعه باعث تسهیل در انتقال لیپوپلی ساکارید به سطح سلول‌های پاسخ‌دهنده می‌شود.

باتوجه به اهمیت زیاد این ژن در سیستم ایمنی ذاتی و مشخص‌شدن تغییرات نوکلئوتیدی جدید مؤثر بر ساختار پروتئین حاصل، بررسی این تغییرات در جمعیت می‌تواند در مطالعات بعدی برای دستیابی به مارکر ژنتیکی مرتبط با مقاومت ژنتیکی پرندگان مدنظر قرار گیرد. همچنین الگوی

تولیدات دامی

5. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN and Jones M (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*. 25(2): 187-91.
6. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C and Garraud O (2005) Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and Cell Biology*. 83(2): 196-8.
7. Horng T and Medzhitov R (2001) Drosophila MyD88 is an adapter in the TOLL signaling pathway. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 98: 12654-12658.
8. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM and Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86(6): 973-83.
9. Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Morgan K and Malo D (2003) Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella entericaserovar Typhimurium* infection in chickens. *Infection Immunity*. 71(3): 1116-1124.
10. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S and Fukase K (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *Clinical Investigation*. 105(4): 497-504.
11. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S and Lai MM (2006) Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *Virology*. 80(2): 866-874.
12. Marques JT and Williams BR (2005) Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nature Biotechnology*. 23(11): 1399-1405.
13. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3): 1215.
14. Muhammad I, Victoria JP and Adrian LS (2005) Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 104(2005): 117-127.
15. Mushegian A and Medzhitov R (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Cell Biology*. 155: 705-10.
16. Noreen M, Shah MA, Mall SM, Choudhary S, Hussain T and Ahmed I (2012) TLR4 polymorphisms and disease susceptibility. *Inflammation Research*. 61(3): 177-88.
17. Pan ZY, Chen Z, Liu L, Cao YZ, Xie KZ, Yang JS, Huang XG, Wu SL and Bao WB (2011) Differentiation of Porcine TLR4 Gene Expression in Piglets of Different Ages. *Animal and Veterinary Advances*. 10(17): 2312-2316.
18. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E and Arditì M (2006) Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure and signaling. *Immunology*. 177(1): 322-32.
19. Sabroe I, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH, Vogel SN and Dower S (2003) Toll-like receptors in health and disease: Complex questions remain. *Immunology*. 171: 1630-1635.
20. Smirnova I, Poltorak A, Chan EKL, McBride C and Beutler B (2000) Phylogenetic variation and polymorphism at the Toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biology*. 1: 1-10.

21. Thomas P and Kejariwal A (2004) Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: Evolutionary evidence for differences in molecular effects. PNAS. 101: 15398-15403.
22. Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673-80.
23. Tollefson L, Fedorka PJ and Angulo FJ (1999) Public health aspects of antibiotic resistance monitoring in the USA. Acta Veterinaria Scandinavica. 92: 67-75.
24. Werling D and Jungi TW (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology. 91: 1-12.
25. Wigley P, Hulme SD, Bumstead N and Barrow PA (2002) In vivo and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. Microbes and Infection. 4: 1111-1120.