تولیدات دامی
دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷
صفحه‌های ۲۲۴-۲۱۳

بررسی چندشکلی ژن‌های *Wnt*10a و *Wnt*10b در گوسفند آمیخته افشاری بروlامرینو

سمیه زمانی‌افشار[۱]، طاهر هرکی‌نژاد[۲*]، عباس بهاری[۳]، محمد حسین شهیر[۴]

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳. استادیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۵/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۶/۰۵/۱۷

چکیده

انتخاب دام‌های زنده دارای حداقل چربی لاشه در جهت اصلاح گله‌های داشتی به افزایش تولید گوشت کشور کمک می‌کند. اعضای خانواده ژن Wnt از عوامل مؤثر در تمایز سلول‌های چربی هستند. این پژوهش به‌منظور بررسی ارتباط چندشکلی ژن‌های Wnt10a و Wnt10b با صفات لاشه در ۹۶ رأس گوسفند آمیخته افشاری- بروlامرینو انجام شد. از نمونه خون گوسفندان آمیخته به‌روش فنول کلروفرم DNA استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه‌های ۶۶۳ جفت‌بازی از اگزون سوم و قسمتی از اینترون دوم ژن Wnt10a و ۵۱۲ جفت‌بازی از اگزون سوم ژن Wnt10b انجام شد. یک چندشکلی و سه تک‌شکلی (مشاهده آللی متفاوت از توالی رفرنس) در جایگاه ژن Wnt10a مشاهده شد اما تفاوتی بین نمونه‌ها برای ژن Wnt10b وجود نداشت. یک تک‌شکلی در ناحیه اینترون و یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی و دو تک‌شکلی در ناحیه اگزون درژن Wnt10a مشاهده شد که یکی از این تک-شکلی‌ها در کدون ۱۳۹بود. پس از هضم با آنزیم برشی *Hpa*II در کدون ۱۳۹، مشخص شد که تمامی افراد در مقایسه با توالی رفرنس دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت هستند. این SNP علاوه بر گوسفندان آمیخته در تعدادی از گوسفندان افشاری (دنبه‌دار) و زل (بدون دنبه) نیز بررسی شد و مجدداً همان نتایج مشاهده شد. براساس نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد در این جایگاه از ژن در نژادهای مورد بررسی آلل اصلی G باشد.

کلیدواژه‌ها: تغییر تک‌نوکلئوتیدی، چندشکلی، ژن Wnt، صفات لاشه، گوسفند افشاری.

* نویسنده مسئول
Email: taher.harkinezhad@znu.ac.ir

مقدمه

یکی از اهداف اصلاح نژاد گوسفند افزایش کیفیت لاشه بوده که تحت تأثیر ترکیبات لاشه و نسبت‌های بافتی (نسبت گوشت به استخوان و گوشت به چربی) میزباشد [۱۷]. اگرچه مقداری ذخیره چربی در بدن ضروری است، اما با توجه به این که میزان انرژی مورد نیاز برای ذخیره هر گرم چربی ۲/۱۱ مرتبه بیشتر از ذخیره همان میزان پروتئین است و چربی از لحاظ قیمت، بهای چندانی ندارد بنابراین ذخیره چربی اضافی مطلوب نبوده و بازده تولید را کاهش می‌دهد [۷].

گوسفند افشاری به دلیل خصوصیات ویژه از جمله چندقلوزایی (۱۵ الی۳۰ درصد)، سرعت رشد بالا، پایین بودن ضریب تبدیل و مقاومت نسبتاً خوب درمقابل امراض انگلی داخلی و خارجی یکی از بهترین نژادهای گوسفندایرانی محسوب می‌شود [۱۲].

در آزمایشی به‌منظور بررسی جهش ژن در موش، پس از آلوده کردن موش به تومور سرطان پستان، پروتئینی شناسایی شد که به مقدار زیادی حفاظت شده بود و بعدها int1 نام گرفت [۱٤]. پژوهشگران در سال ۱۹۸۷ همولوگ یکسان آن پروتئین را در مگس سرکه کشف کردند که البته در مگس سرکه به‌نام بدون بال شناخته شده است (WG)، یک جهش در ژن WG مگس سرکه ملانوگاستر شناسایی شد که این جهش موجب ایجاد یک اختلال و از دست دادن بال آن شد که نشان‌دهنده ارتباط فیزیولوژیکی بین این ژن و توسعه و تکامل در مگس سرکه است [۲]. در نهایت در سال ۱۹۹۱ یک نام‌گذاری جدید برای WG/INT-1 و ژن‌های مربوط به خانواده لیگاند Wnt انجام شد و Int و Wg با هم ادغام شدند و به‌صورت خانواده Wingless/Int تغییر نام داد و Int1 تبدیل به Wnt1 شد [۱٤].

تا به حال ۱۹ ژن در خانواده ژنی Wnt شناسایی شده است که این خانواده ژنی دستورالعمل لازم برای ساخت پروتئین‌های مشابه‌ای را در مسیر سیگنال‌دهی شیمیایی تعیین سرنوشت و شکل‌دهی سلول و جنین را فراهم می‌کنند. اعضای خانواده Wnt گلیکوپروتئین‌هایی ترشح می‌کنند که نقش کلیدی در رشد برعهده دارند. بعضی از پروتئین‌های Wnt در سلول‌ها و بافت‌های خاصی مثل استخوان، چربی و ... نقش دارند. این خانواده ژنی در مهره‌داران و بی‌مهرگان شناسایی شده است، اما تعداد لیگاندهای آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی در هر دو گونه متفاوت است [۱۱].

مسیرهای سیگنال‌دهی Wnt مسیرهایی بسیار تکامل‌یافته و حفاظت‌شده‌ای بوده و در بسیاری از گونه‌ها از جمله مگس میوه تا انسان شبیه هم هستند [۱٤]. سیگنال‌دهی Wnt به دو دسته متعارف و نامتعارف تقسیم می‌شوند و تفاوت بین این گروه‌ها در این است که در مسیر متعارف پروتئین بتاکاتنین نقش دارد، درحالی‌که مسیر نامتعارف مستقل از آن عمل می‌کند [۱۵]. اعضای خانواده ژن Wnt در تمایز سلول چربی نقش دارند [٤]. سلول‌های چربی، استئوبلاست‌ها، میوسیت‌ها و سلول‌های غضروفی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز پیدا می‌کنند. تمایز سلول چربی به‌عنوان آدیپوژنزیز شناخته‌شده و شامل دو مرحله تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پیش‌ساز چربی و تمایز نهایی می‌باشد [٦]. یکی از اعضای خانواده ژن Wnt، لیگاند Wnt10b بوده که در مسیر سیگنال‌دهی متعارف فعال می‌شود. این مسیر برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در دوران جنینی و در افراد بالغ ایفای نقش می‌کند. هر دو مسیر سیگنال‌دهی متعارف و نامتعارف می‌توانند در پیش‌ساز چربی فعال شوند و اعضای خانواده ژن Wnt در نحوه شکل‌گیری و تمایز سلول چربی عملکرد متفاوتی دارند مثلا برخی از اعضای این خانواده ژنی که در مسیر نامتعارف عمل می‌کنند مانند Wnt5a و Wnt4 منجر به تمایز و توسعه

بافت چربی می‌شود [۱۶]. اما برخی دیگر از جمله Wnt10b که یک تنظیم‌گر سرنوشت سلول‌های بنیادی است، در مراحل تمایز سلول‌های چربی، این لیگاند مسیر سیگنال‌دهی متعارف Wnt را فعال کرده و به‌وسیله مهار بیان C/EBP و PPARγ پیش‌ساز چربی را در حالت تمایز نیافته نگه داشته و از توسعه بافت چربی ممانعت کرده و موجب توسعه بافت استخوان می‌شود. علاوه بر این لیگاند، Wnt6 و Wnt10a نیز به‌عنوان مهارکننده‌های بافت چربی هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی شناخته شده‌اند [٤].

بیان اجباری Wnt10a و Wnt6 مانند Wnt10b موجب تثبیت بتاکاتنین شده و توسعه بافت چربی را مهار می‌کند، هم‌چنین Wnt10a تا حدی مشابه با Wnt10b موجب توسعه بافت استخوان می‌شود. در طول فرآیند تمایز چربی بیان این ژن‌ها به‌طور چشم‌گیری کاهش پیدا می‌کند [٤]. در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن Wnt10a و صفات رشد ٤٣٥ گاو ماده سه نژاد مختلف با استفاده از تعیین توالی DNA و با روش PCR–RFLP دو SNP از نوع هم‌معنی (g.3980G>T، g.4711G>C) در ناحیه اگزون ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با وزن، طول و ارتفاع بدن داشتند [۱۸]. حال آن‌که در بررسی که در زمینه بیان و ارتباط چندشکلی ژن *Wnt*10b با چربی پشت خوک صورت گرفت و یک SNP در ناحیه 3′–UTR شناسایی شد که با ضخامت چربی پشت در شانه، کفل و آخرین دنده در سطح احتمال ٥٪ معنی‌دار بود [۸].

در مطالعه‌ای، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های رایج ژن *Wnt*10b و تجمع چربی در نمونه‌ای از زنان کره‌ای بررسی شد. در تحقیق ذکرشده توالی‌یابی مستقیم از DNA ژنومیک ٤٥ نفر، شش تغییر تک‌نوکلئوتیدی مشترک شناسایی شد. در میان شش SNP، تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs833840) به‌طور قابل‌توجهی با چربی شکمی و چربی زیر پوستی در سطح احتمال یک درصد ارتباط داشت [۹]. در مطالعه‌ای که در افرادی که چاقی زودهنگام داشتند صورت گرفت، مشاهده شد که یک جهش هتروزیگوت (C256Y) از نوع دگرمعنی در ژن *Wnt*10b منجر به اختلال در فعالیت این ژن و مسیر سیگنال‌دهی متعارف شده و در نتیجه توسعه بافت چربی مهار نمی‌شود. قابل توجه است که این جهش در همه بستگان این افراد که آنها نیز چاقی زودهنگام داشتند نیز مشاهده شد، به‌طوری‌که این جهش در افراد شاهد یافت نشد. این یافته‌ها دلالت بر اهمیت بالقوه ژن *Wnt*10b به‌عنوان یک تنظیم‌کننده تمایز بافت چربی دارد و همچنین نشان میدهد که Wnt10b ممکن است به‌عنوان یک تک‌ژنی یا چندژنی بالقوه در افرادی باشد که به صورت ارثی چاق می‌شوند [٥].

هدف از این مطالعه بررسی اگزون سوم ژن‌های *Wnt*10b و *Wnt*10a در بره‌های آمیخته افشاری–برولامرینو و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات لاشه بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۹٦ راس بره نر گله اصلاح نژاد گوسفندان آمیخته افشاری- برولامرینو نسل دوم (۷٥ درصد افشاری و ۲٥ درصد برولامرینو) موجود در مزرعه آموزشی- پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان خون‌گیری شد. از حیوانات مورد استفاده، شجره کاملی در دسترس بود. DNA به‌روش فنول‌کلروفرم از نمونه خون این دام‌ها استخراج شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از نانودراپ استفاده شد. پرایمرهای موردنظر با استفاده از نرم‌افزارهای CLC و Primer3 برای ناحیه اگزون سوم ژن *Wnt*10b با طول ٥۱۲ جفت باز، برای بخشی از اینترون دو و اگزون سوم ژن *Wnt*10a با طول ٦٦۳ جفت‌باز و همچنین برای بخشی از اگزون سوم ژن *Wnt*10a با طول ۳٥٦ جفت‌باز طراحی شد (جدول ۱).

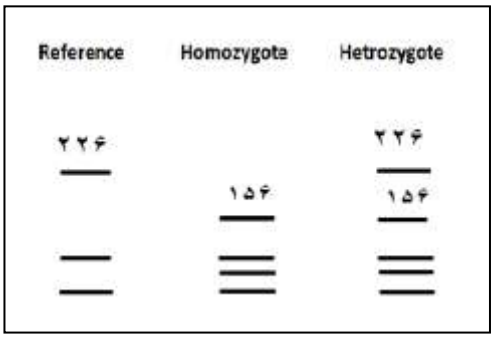
جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *Wnt*10b و *Wnt*10a

نام ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگر	Tm	طول قطعه حاصل
*Wnt*10b	رفت	5 -TTCCTTTGGCCTCCTTACTC-3	۵۶٫۸۳	۵۱۲bp
	برگشت	5- TGCTGTGCCCTCTCAAATC -3	۵۷٫۷۵	۵۱۲bp
*Wnt*10a	رفت	5 -TTCTGCCCCTCTCTATGTCC -3	۵۹٫۲٤	٦٦۳bp
	برگشت	5- AAGCACACACAACGACAAGC -3	۵۹٫۹۵	٦٦۳bp
*Wnt*10a	رفت	5 -TTCTGCCCCTCTCTATGTCC -3	۵۹٫۲٤	۳۵٦bp
	برگشت	5- GGAACTCCGTGGCTCAGG -3	٦۱٫۸۲	۳۵٦bp

شماره دو مربوط به بخشی از اینترون دو و اگزون سه ژن *Wnt*10a با طول ٦٦۳ جفت بازی و شماره سه بخشی از اگزون سوم ژن *Wnt*10a با طول ۳۵٦ جفت‌باز است.

شرایط دمایی PCR برای تکثیر ناحیه مورد نظر ژن *Wnt*10b شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت پنج دقیقه با دمای ºC ۹۵ و ۳۰ چرخه شامل سه مرحله: مدت زمان ٤۰ ثانیه با دمای ºC ۹۵، دمای اتصال [(ºC ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه برای قطعه ۵۱۲ جفت بازی از اگزون شماره سه ژن *Wnt*10b)، (ºC ۵۹ به‌مدت ۳۰ ثانیه برای قطعه ٦٦۳ جفت بازی از ژن *Wnt*10a)، (ºC ٦۱ به‌مدت ۲۵ ثانیه برای قطعه ۳۵٦ جفت بازی از ژن *Wnt*10a)] و مدت زمان ٤۰ ثانیه با دمای ºC ۷۲ و یک چرخه گسترش نهایی ºC ۷۲ به‌مدت پنج دقیقه اعمال شد. پس از انجام واکنش PCR برای تمامی نمونه‌ها و مشاهده باند مناسب روی ژل آگارز یک و نیم درصد مقدار یکسانی از هر کدام از نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های یک و نیم میلی‌لیتری ریخته و سپس محصولات PCR مربوط به ژن *Wnt*10b برای توالی‌یابی ارسال شد. باتوجه به این در مورد ژن *Wnt*10b چندشکلی مشاهده نشد و نگرانی ازاین‌که باصرف هزینه زیاد برای توالی‌یابی تغییری مشاهده نشود این بار تصمیم گرفته شد با توجه به این که ژنوتیپ‌هایی با فراوانی بیش از پنج درصد برای به‌دست آوردن ارتباط آللی با صفات لاشه لازم بود در مورد ژن *Wnt*10a تعداد ٤۰ نمونه از محصولات PCR مربوط به قطعه ٦٦۳ جفت بازی از این ژن به صورت تصادفی جهت توالی‌یابی ارسال گردید. با بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی وجود یا عدم وجود تغییر تک نوکلئوتیدی شناسایی شد. به‌منظور بررسی تغییر نوکلئوتید ٤۱۵ (rs425354815) کدون ۱۳۹ که تنها جهش دگرمعنی در ناحیه اگزون بود، در تمامی ۹٦ نمونه مربوط به ژن *Wnt*10a از روش PCR-RFLP استفاده شد.آنزیم برشی *Hpa*II از لحاظ در دسترس بودن و محل برش انتخاب شد. این آنزیم حالت جهش‌یافته (CCGG) را برش می‌دهد. با توجه به این‌که در طول قطعه انتخابی ناحیه چهار نوکلئوتیدی CCGG در فواصل کوتاه تکرار شده است و ازدیاد قطعات حاصل از هضم آنزیمی در توالی ٦٦۳ جفت بازی موجب کاهش دقت در نتایج می‌شد؛ به منظور افزایش دقت در نتایج، مجدداً آغازگر پایین‌دست طراحی شد (جدول ۱) و در نهایت قطعه ٦٦۳ جفت‌بازی کوتاه‌تر شده و یک قطعه ۳۵٦ جفت بازی حاصل شد. با استفاده از آنزیم *Hpa*II حداکثر پنج قطعه از هضم آنزیمی ایجاد می‌شد. با توجه به شکل ۱، پس از هضم آنزیمی قطعه ۳۵٦ جفت‌بازی ژن *Wnt*10a انتظار می‌رود که در افراد نوع وحشی (رفرنس) قطعه ۲۲٦ جفت بازی و در افراد هموزیگوت قطعه ۱۵٦ جفت باز و در افراد هتروزیگوت دو قطعه ۲۲٦ و ۱۵٦ جفت بازی نمایش داده شود. قطعات ۹۰ و ٤۰ جفت باز در هر سه فرد وجود دارد که در قسمت پایین شکل دیده

می‌شود. قطعه ۷۰ جفت بازی در افراد با آلل نوع وحشی دیده نخواهد شد (شکل ۱).



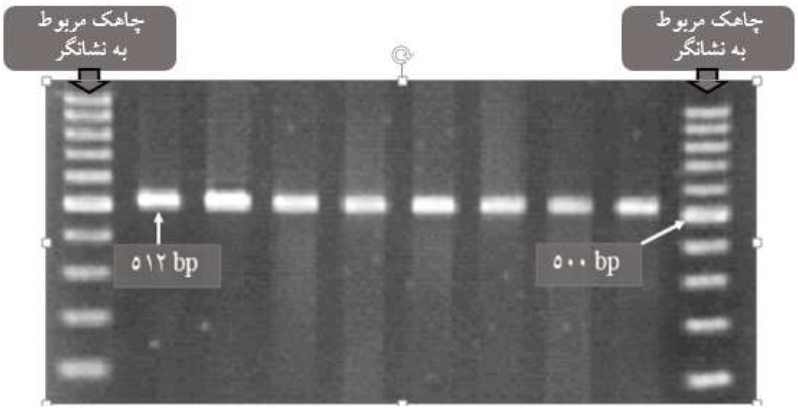
شکل ۱. باندهای مورد انتظار از هضم آنزیمی ناحیه ٤١٥ کدون (rs425354815) قطعه ٣٥٦ جفت بازی ژن *Wnt*10a در نمونه‌های رفرنس، هموزیگوت و هتروزیگوت

هضم آنزیمی فرآورده‌های PCR با توجه به مواد لازم و مدت زمان ارائه‌شده کاتالوگ در دو مرحله عملکرد آنزیم به‌مدت ١٤ ساعت و در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و مرحله غیرفعال‌سازی آنزیم به مدت ٣٠ دقیقه و در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه انکوباتور انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR و نیز نتایج هضم آنزیمی به‌ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز یک و نیم و دو و نیم درصد استفاده شد. برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول به‌همراه سه میکرولیتر بافر در هر یک از چاهک‌ها بارگذاری شد و در کنار چاهک‌های محصولات، در یک چاهک نشانگر DNA ۱۰۰ جفت باز نیز بارگذاری شد. باندهای مربوطه روی ژل آگارز با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تصویر ژل‌ها با کمک دستگاه ژل داک آتاژاپن (Atta, Japan) و استفاده از نور UV ثبت شد.

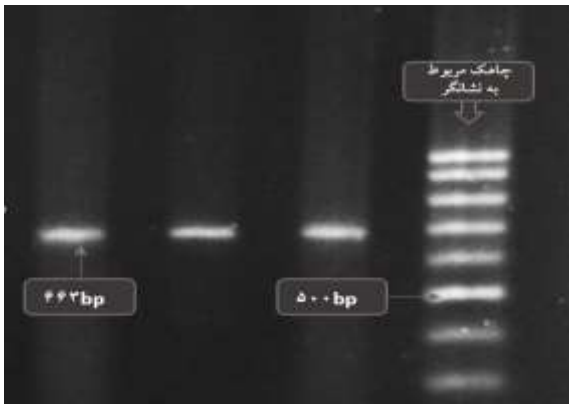
نتایج و بحث

باندهای حاصل ازالکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن *Wnt*10b را در تعدادی از نمونه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به طول قطعه تکثیرشده (٥١٢ جفت باز)، باند به‌دست‌آمده بین دو باند ٥٠٠ و ٦٠٠ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی قرار گرفت.

شکل سه باندهای حاصل ازالکتروفورزمحصولات PCR مربوط به ژن *Wnt*10a را در تعدادی از نمونه‌ها نشان می‌دهد. باتوجه به طول قطعه تکثیر شده (٦٦٣ جفت باز)، باند به‌دست‌آمده بین دو باند ٦٠٠ و٧٠٠ نشانگر مولکولی قرار گرفت.



شکل ۲. الکتروفورز فرآورده‌های PCR، مربوط به ژن *Wnt*10b روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی



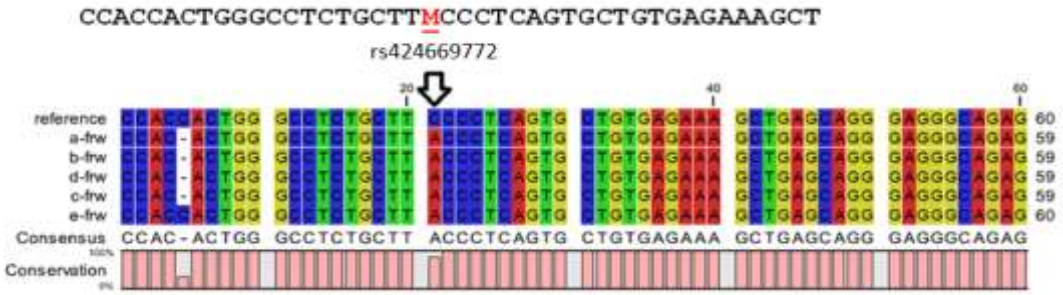
شکل ۳. الکتروفورز فرآورده‌های PCR مربوط به ژن Wnt10a روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی

پس از هم‌ردیف‌سازی نتایج توالی‌یابی ژن Wnt10b با توالی رفرنس موجود در سایت Ensemble، هیچ‌گونه تغییر تک نوکلئوتیدی در این ناحیه مشاهده نشد و در تمامی افراد توالی‌ها با هم یکسان بودند. در ابتدا ژن Wnt به‌عنوان یک ژن با توالی بسیار حفاظت‌شده و مسیر سیگنال‌دهی Wnt به‌عنوان مسیرهایی بسیار تکامل یافته و حفاظت‌شده معرفی شدند که در بسیاری از گونه‌ها از جمله مگس میوه تا انسان شبیه هم هستند [٤]. نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی ژن Wnt10b در موجودات مختلف، بیانگر وجود توالی‌های حفاظت‌شده در قسمت‌های عمده‌ای از این ژن بود که همانند نتیجه حاصل از ژن Wnt10b، احتمال وجود تغییر در این نواحی کاهش می‌یابد. بنابراین یکسان بودن توالی‌ها ممکن است به دلیل تعداد نسبتاً کم دام‌های مورد بررسی و یا به‌دلیل وجود حفاظت بالای این نواحی باشد.

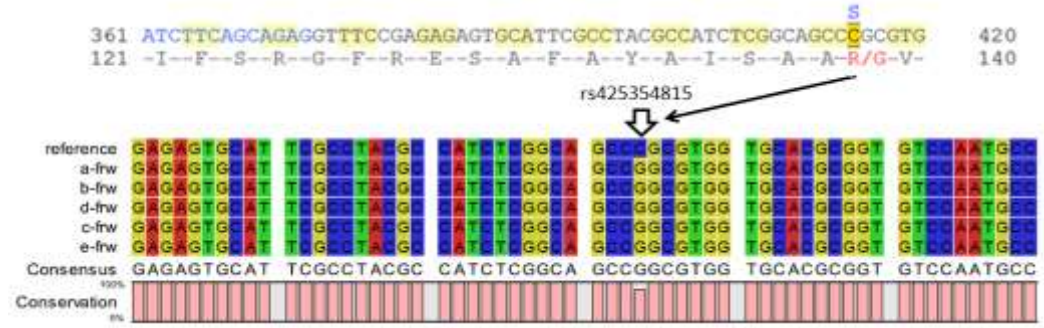
نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به‌دست‌آمده ژن Wnt10a با هم‌دیگر و با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعات زیستی ژن با شماره دستیابی XM_004004935.3، وجود یک تک‌شکلی (آللی متفاوت از رفرنس) در ناحیه اینترون دوم و یک تغییر تک نوکلئوتیدی و دو تک‌شکلی در ناحیه اگزون سوم را نشان داد در ناحیه اینترون دوم در توالی رفرنس این ژن، نوکلئوتید سیتوزین قرار دارد اما در تمامی نمونه‌های مورد بررسی به صورت تک شکل آدنین (rs424669772) مشاهده شد (شکل ٤). در ناحیه اگزون سوم در توالی رفرنس در نوکلئوتید ٤١٥ (rs425354815) کدون ١٣٩ آلل اصلی سیتوزین است و اسیدآمینه آرژنین تولید می‌شود اما در تمامی نمونه‌های مورد بررسی آلل اصلی گوانین بود که منجر به تولیداسیدآمینه گلیسین می‌شود (شکل ٥). در نوکلئوتید ٦٢٧ کدون ٢٠٩ در تمامی نمونه‌ها تک‌شکلی گوانین (rs403987034) مشاهده شد درحالی‌که در توالی رفرنس نوکلئوتیدآدنین قرار دارد، با این حال هر دو مورد اسیدآمینه یکسانی را تولید می‌کنند. در نوکلئوتید ٦٣٣ کدون ٢١١ نیز تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs415178599) سیتوزین به تیمین (Y) مشاهده شد که این تغییر منجر به تغییر اسیدآمینه نمی‌شود (شکل٦)، لازم به ذکر است که این چند شکلی‌ها قبلاً در پایگاه‌های اطلاعات زیستی در مورد گوسفند گزارش و با شماره‌های ذکر شده ثبت شده‌اند.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی (شکل ٧) نشان داد که تمامی افراد هموزیگوت از نوع GG بودند که با توجه به آنچه در پایگاه‌های اطلاعات زیستی آمده است افراد هموزیگوت جهش یافته محسوب می‌شوند. به‌منظور اطمینان از نتایج، این آزمایش روی تعدادی گوسفند افشاری که مربوط به گله‌های دیگر بود نیز انجام شد و همین نتایج حاصل شد. به‌علاوه مشخص شد که این آلل، آلل معمول (وحشی= غیرموتانت) در این نژاد است. اما از طرفی چون این ژن بر تمایز، توسعه و شکل‌گیری بدن نقش دارد، برای روشن‌تر شدن تأثیر این ژن در گوسفند، این تغییر در گوسفند زل (بدون دنبه) هم مورد بررسی قرار گرفت و همان نتایج قبلی مشاهده شد. در بررسی دیگر تغییرات نوکلئوتیدی، نوکلئوتید ٦٢٧ ژن *Wnt10a* نیز در تمام نمونه‌های مورد بررسی تنها الل G مشاهده گردید و تمام افراد ژنوتیپ GG داشتند. حال این‌که در توالی رفرنس این

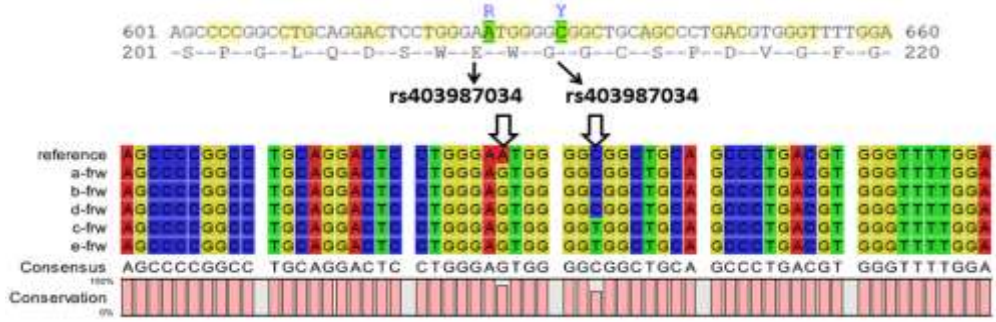
جایگاه نوکلئوتید A قرار دارد. اما در نوکلئوتید ٦٣٣ این ژن دو نوع الل C و T مشاهده شد که فراوانی الل C برابر ٠/٨ و فروانی الل دیگر ٠/٢ بود. در این جایگاه جمعیت مورد بررسی در تعادل هاردی- واینبرگ نبود. در این مطالعه هیچ کدام از نمونه‌ها ژنوتیپ هتروزیگوت نشان ندادند هر چند هتروزیگوسیتی مورد انتظار ٣٢ درصد محاسبه شد و این ممکن است به دلیل تعداد محدود نمونه‌ها باشد. البته با توجه به اینکه این تغییر نوکلئوتیدی یک تغییر هم‌معنی است و منجر به تغییر اسید آمینه نمی‌شود، لذا بررسی بیشتری در این ارتباط انجام نگرفت.



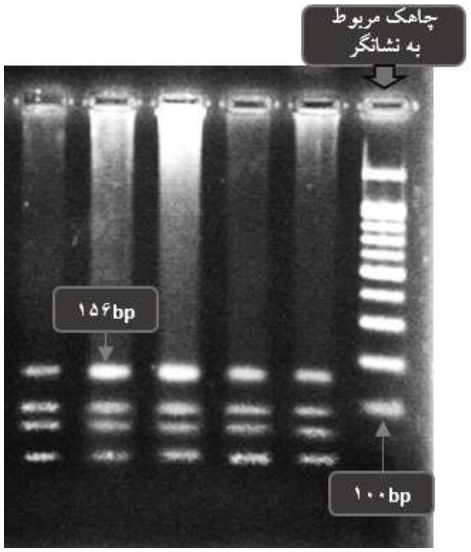
شکل ٤. تک‌شکلی (rs424669772) در ناحیه اینترون دوم ژن Wnt10a؛ در توالی رفرنس این نوکلئوتید C است در حالی‌که در نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه نوکلئوتید A مشاهده شد.



شکل ٥.تک‌شکلی مشاهده شده در نوکلئوتید ٤١٥ (rs425354815) کدون ١٣٩ سیتوزین به گوانین (S)ژن Wnt10a و تغییرات اسیدهای آمینه مربوطه (براساس رفرنس اسیدآمینه آرژنین تولید می‌شود ولی در تمامی نمونه‌های مورد بررسی اسیدآمینه گلیسین تولید می‌شود).



شکل ٦. تک‌شکلی در نوکئوتید ٦٢٧ (rs403987034) تغییرآدنین به گوانین (R) در کدون ٢٠٩ و تغییر تک‌نوکلئوتیدی در نوکئوتید ٦٣٣ (rs415178599) تغییرسیتوزین به تیمین (Y) ژن Wnt10a، هیچکدام از تغییرات باعث تغییر اسیدآمینه مربوطه نمی‌شوند.



شکل ۷. الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی مربوط به نژاد زل، افشاری و آمیخته افشاری_ برلامرینو روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، نشانگر ملکولی ۱۰۰ جفت‌بازی در سمت راست بارگذاری شده است و بقیه چاهک‌ها نمونه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهند.

با هم‌ردیف‌سازی توالی ژنی و پروتئینی این دو لیگاند در موجودات مختلف مشاهده شد که ژن Wnt10b تا حدود زیادی حالتی حفاظت‌شده دارد، هرچند وقتی مقایسه بین گونه‌ای مطرح است نواحی متغیری هم مشاهده می‌شود. اما در این گونه بخصوص این حفظ توالی شدت بیشتری به خود می‌گیرد. در مورد پارالوگ این ژن یعنی *Wnt*10a نیز این حالت صادق است هرچند در این ژن تغییرات بیشتری مشاهده می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها برای حفظ سلامت و حیات موجود زنده ضروری می‌باشند. بنابراین در طی زمان کمتر دچار تغییر شده و یا این که بدون تغییر مانده‌اند. در مطالعه‌ای که در آن پیامدهای بلندمدت سیگنال‌دهی Wnt و بیان ژن *Wnt*10b در عضلات اسکلتی رات‌های فربه تغذیه‌شده با رژیم غذایی پر چرب را مورد بررسی قرار داده‌اند، نشان داد بیان بیش از حد این ژن موجب کاهش مداوم وزن بدن، کاهش چربی عضلانی و ذخیره‌ای، کاهش هایپرانسولینیمی (Hyperinsulinemia) و سطوح تری‌گلیسیرید پلاسما و بهبود هموستاز گلوکز در این حیوانات نسبت به گروه شاهد می‌شود. علاوه بر این اثر طولانی‌مدت بیان Wnt10b موجب تراکم مواد معدنی استخوان شده بود [۱].

با بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های مسیر سیگنال‌دهی Wnt با صفات لاشه مرغ کراس کرنیش و سیلکی (Silkie)۵۸ چندشکلی در ۲٤ ژن با حداقل یک صفت لاشه ارتباط داشت. علاوه بر این، هر دو تغییر تک‌نوکلئوتیدی (Wnt9a) rs15865526 و rs14066777 (MAPK9) با اندازه دور ساق پا و وزن بال مرتبط بود. ژن‌هایی Wnt3a با درصد وزن عضله سینه بر وزن لاشه، Wnt11 با درصد وزن ران بر وزن لاشه، Wnt9a با طول ساق پا مرتبط بودند. بنابراین سیگنال‌دهی Wnt نقش عمده‌ای در تنظیم خصوصیات لاشه برای صفات تولیدی این نژاد ایفا می‌کند. البته دو SNP انتخابی در ژن Wnt10a ارتباطی با صفات لاشه نداشتند [۱۰]. در مطالعه حاضر SNP انتخابی در ژن Wnt10a در بین دام‌های مورد بررسی متفاوت نبود و به‌عبارت دیگر همه دام‌ها ژنوتیپ یکسانی داشتند و بنابراین بررسی ارتباط آلل‌ها با صفات لاشه مقدور نگردید.

در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن *Wnt*10a و صفات رشد ٤۳۵ گاو ماده سه نژاد مختلف با استفاده از تعیین توالی DNA و با روش PCR–RFLP دو SNP از نوع هم‌معنی (g.4711G>C ،g.3980G>T) در ناحیه اگزون با وزن، طول و ارتفاع بدن ارتباط داشتند [۱۸]. حال آن‌که در بررسی که در زمینه بیان و ارتباط چندشکلی ژن *Wnt*10b با چربی پشت خوک صورت گرفت و یک SNP در ناحیه 3′–UTR شناسایی شد که با ضخامت چربی پشت در شانه، کفل و آخرین دنده مرتبط بود [۸].

در مطالعه‌ای، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های رایج ژن

*Wnt*10b و تجمع چربی در یک نمونه شامل ۱۰۲۹ زن کره‌ای بررسی شد. در این تحقیق توالی‌یابی مستقیم از DNA ژنومیک ٤٥ نفر، شش تغییر تک‌نوکلئوتیدی مشترک شناسایی شد. در میان شش SNP، تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs833840) به‌طور قابل‌توجهی با چربی شکمی و چربی زیر پوستی ارتباط داشت [۹]. با مطالعه ۹٦ فرد زیر ۱۰ سال (با چاقی شدید زودهنگام) در انگلستان و ۱۱۵ فرد چاق ایتالیایی، گزارش شد که در افرادی که چاقی زودهنگام داشتند یک جهش هتروزیگوت (C256Y) از نوع دگرمعنی در ژن *Wnt*10b منجر به اختلال در فعالیت این ژن و مسیر سیگنال‌دهی متعارف شده و در نتیجه توسعه بافت چربی مهار نمی‌شود. قابل توجه است که این جهش در همه بستگان این افراد که آن‌ها نیز چاق بودند مشاهده شد. این یافته‌ها دلالت بر اهمیت بالقوه ژن *Wnt*10b به‌عنوان یک تنظیم‌کننده تمایز بافت چربی دارد و همچنین نشان می‌دهد که *Wnt*10b ممکن است به‌عنوان یک تک ژنی یا چندژنی بالقوه در افرادی باشد که به‌صورت ارثی چاق می‌شوند [٥].

جهش دگرمعنی خواص اسیدآمینه‌ای را تغییر داده و پروتئین‌های کدکننده ساختاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در تعداد زیادی از مطالعات انجام‌شده در چند دهه گذشته به‌وضوح نشان داده است که SNPهای هم‌معنی در توالی کدکننده تغییری ایجاد نمی‌کنندو در نتیجه انتظار نمی‌رود که موجب تغییر بیان و عملکرد پروتئین شوند. بااین حال شواهدی ارائه شده است که نشان می‌دهد SNPهای هم‌معنی هم می‌توانند بیان پروتئین را با تغییر و یا افزایش ثبات mRNA تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین در نتیجه سنتز پروتئین محصولی با همان توالی اسیدآمینه‌ای اما با خواص ساختاری و عملکردی متفاوت ایجاد شود [۱۳ و ۳].

در این مطالعه برای بررسی ژن *Wnt*10a با بررسی نتایج توالی‌یابی و PCR-RFLP تعداد سه حالت تک‌شکل و یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی مشاهده شد که یک تک‌شکلی در ناحیه نوکلئوتید ٤١٥ (rs425354815) یعنی کدون ۱۳۹ در نمونه‌های مورد بررسی منجر به تولید اسیدآمینه گلیسین و براساس توالی رفرنس اسیدآمینه آرژنین تولید می‌شود. قابل ذکر است که به‌منظور بررسی بیشتر این تک‌شکلی تعدادی از گوسفندان افشاری گله‌های مختلف نیز مورد مطالعه قرار گرفت و همین نتایج مشاهده شد که ممکن است با توجه به این‌که توالی رفرنس سایت‌های Ensemble و NCBI براساس توالی گوسفندان خارجی است، تفاوت ژنوتیپ گوسفندان ایرانی با نژادهای خارجی دلیل این مغایرت باشد. اما از طرفی چون این ژن بر تمایز، توسعه و شکل‌گیری بدن نقش دارد، برای روشن‌تر شدن تأثیر این ژن در گوسفند بررسی تمامی توالی ژن و شناسایی آلل‌های احتمالی در گوسفندان دنبه‌دار و بدون دنبه و یا کوچک جثه و بزرگ جثه لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. پس از هم‌ردیف‌سازی نتایج توالی‌یابی ژن *Wnt*10b با توالی رفرنس موجود در سایت Ensemble مشاهده شد که هیچ‌گونه تغییر تک‌نوکلئوتیدی در این ناحیه وجود نداشته و در تمامی افراد توالی‌ها با هم یکسان هستند که ممکن است به‌دلیل وجود حفاظت بالای این نواحی باشد.

با بررسی نتایج توالی‌یابی و آنالیز آن‌ها برای اگزون سوم ژن *Wnt*10b مشخص شد که هیچ گونه چندشکلی در این ناحیه در تمامی دام‌های مورد بررسی وجود نداشت که ممکن است به دلیل حفاظت شدگی بالای این نواحی باشد. نتایج حاصل از بررسی قسمتی از اینترون دوم و اگزون سوم ژن *Wnt*10a تعداد یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی در اگزون و تعداد سه تک‌شکلی (یک مورد در اینترون و دو مورد در اگزون) نسبت به رفرنس مشاهده شد. تک‌شکلی در نوکلئوتید ٤١٥(rs425354815) یعنی کدون ۱۳۹ در همه نمونه‌های مورد بررسی منجر به تولید اسیدآمینه گلیسین می‌شد. این تک‌شکلی در همه افراد مورد بررسی در نژادهای افشاری،

افشاری- برولامرینو و زل همگی از نوع جهش‌یافته هموزیگوت (GG) بود. این تک‌شکلی ممکن است به‌دلیل تفاوت بین ژنوتیپ نژادهای دام‌های ایرانی و خارجی باشد. با توجه به نقش بالقوه این ژن در تمایز سلولی، الگودهی محوری، تکثیر و مهاجرت سلولی و ... ممکن است این تفاوت در ژنوتیپ‌ها منجر به تفاوت فنوتیپی هم شود که بررسی بیشتری را می‌طلبد.

منابع

1. Aslanidi G, Kroutov V, Philipsberg G, Lamb K, Campbell-Thompson M, Walter GA, Kurenov S, Ignacio Aguirre J, Keller P, Hankenson K, Macdougald OA and Zolotukhin S (2007) Ectopic expression of Wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.
2. Baarsma HA, Königshoff M and Gosens R (2013) The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. Pharmacology and Therapeutics 138: 66–83.
3. Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN and Trembath RC (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. Human Molecular Genetics. 13(20): 2361-8.
4. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G and MacDougald OA (2012) Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β-catenin-dependent mechanism. Bone. 50(2): 477-89.
5. Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O'Rahilly S and Vettor R (2006) WNT10B mutations in human obesity. Diabetologia. 49(4): 678–684.
6. Cristancho AG and Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. Molecular Cell Biology. 12: 722-734.
7. Iraq-Nezamabadi M (2010) The association of thyroglobulin gene polymorphism and Concentration of thyroid hormones with carcass traits in Afshari sheep. Universityof Zanjan. Master's Dissertation. (in Persian)
8. He X, Gao H, Liu C, Fan B and Liu B (2011) Cloning, chromosomal localization, expression profile and association analysis of the porcine WNT10B gene with backfat thickness. Molecular Biology Reports. 38(5): 3095-9.
9. Kim IC, Cha MH, Kim DM, Lee H, Moon JS, Choi SM, Kim KS and Yoon Y (2011) A functional promoter polymorphism -607G>C of WNT10B is associated with abdominal fat in Korean female subjects.The Journal of Nutritional Biochemistry. 22(3): 252-8.
10. Lu Y, Chen SR, Liu WB, Hou ZC, Xu GY and Yang N (2012) Polymorphisms in Wnt signaling pathway genes are significantly associated with chicken carcass traits. Poultry Science. 91(6): 1299-307.
11. Mikels AJ and Nusse R (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene. 25(57): 7461-7468.
12. Mousazadeh L, Shadparvar AA, ESkandarinasab MP (2011) Estimation of economic values for production and reproduction traits of Afshari sheep in rural system. Journal of Animal Science Research. 22(2): 35-44. (in Persian).
13. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W and Diatchenko L (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. Science. 314(5807): 1930-3.
14. Nusse R and Varmus H (2012) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. The European Molecular Biology Organization Journal. 12: 2670-2684.
15. Rao T and Kühl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: A prelude for more. Circulation Research. 106: 1798-1806.
16. Van Camp JK, Zegers D, Verhulst SL, Van Hoorenbeeck K, Massa G, Verrijken A, Desager KN, Van Gaal LF, Van Hul W and Beckers S (2013) Mutation analysis of WNT10B in obese children, adolescents and adults. Endocrine. 44(1): 107-13.

17. Williams JL (2008) Genetic control of meat quality traits. In: Toldra (ed.). Meat Biotechnology. PP: 21-61.
18. Zhao J, Zhang C, Fang X, Zhang H, Liu X, Li J, Liu Y, Yang D and Chen H (2012) Polymorphisms of the bovine WNT10B gene and their associations with growth traits. Research in Veterinary Science. 93(3): 1301-6.

Animal Production
(*College of Abouraihan – University of Tehran*)

Vol. 20 ■ No. 2 ■ Summer 2018

Investigation of *Wnt10a* and *Wnt10b* genes polymorphism in Afshari × Booroola Merino crossbred sheep

Somayeh Zamani Afshar[1], Taher harkinezhad[2*], Abas Bahari[3], Mohamad Hossein Shahir[2]

1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjn, Iran.
2. Associated professor, department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjn, Iran.
3. Assistant professor, Institute of Modern biological Techniques, University of Zanjan, Zanjn, Iran.
4. Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjn, Iran.

Received: January 22, 2017 Accepted: August 8, 2017

Abstract

Selection of live animals with minimum carcass fat in animal breeding programs will lead to increase in meat production at national level. The ligands of Wnt genes are of the effective factors in adipocyte cell differentiation. This study was aimed to assess the association between polymorphisms in Wnt10a and Wnt10b genes and carcass traits in 96 Afshari – Booroola Merino male lambs. In this study, DNA was extracted from blood samples using phenol-chloroform extraction method and polymerase chain reaction was performed for amplification a 663 bp fragment of exon III and a part of the second intron of Wnt10a gene and a 512 bp fragment of exon III Wnt10b gene. The results showed a polymorphism and three monomorphisms (a different allele compared to reference sequence of the gene) in the Wnt10a gene but all the sequences of the Wnt10b fragment were the same in studied region of the gene. Results of the sequencing lead to identification of four single nucleotide changes in Wnt10a gene in the studied area when compared to the reference sequence. One of the monomorphisms was in the intron and among other three nucleotide changes identified in exon III one was a missense in codon 139. After digestion with restriction enzymes *Hpa*II at this codon, it was observed that all sampled lambs had mutant homozygous genotype compared to the reference sequence. This site was also evaluated in a number of Afshari (fat-tailed) and Zell (with the least fat tail) but again the same results were observed. Therefore, it seems that in this position the G is the wild type allele in the studied population.

Keywords: Afshari sheep, carcass traits, polymorphism, SNP, Wnt gene.

Corresponding author: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir