

بررسی بیان ژن های خانواده تیروزیناز (TYR، TYRP1 و DCT) و ژن MATP در بافت پوست کوسفندان لری

بختیاری

محسن رحمانی^۱، مصطفی محقق دولت آبادی^۲ و جواد حبیبی زاد^۳

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۲. دانشیار گروه علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۳. استادیار گروه علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

نویسنده مسئول: مصطفی محقق دولت آبادی

ایمیل: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Expression analysis of tyrosinase family genes (TYR, TYRP1 and DCT) and MATP gene in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep

Mohsen Rahmani¹, Mustafa Muhaghegh Dolatabady^{2*}, Javad Habibi zad³

1. MSc graduate of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran
2. Associate professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran
3. Assistant professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran

بررسی بیان ژن های خانواده تیروزیناز (TYR، TYRP1 و DCT) و ژن MATP در بافت

پوست گوسفندان لری بختیاری

چکیده

به منظور بررسی تاثیر بیان ژن های خانواده تیروزیناز (TYR، TYRP1 و DCT) و ژن MATP بر روی ایجاد لکه های پوستی در گوسفند نژاد لری بختیاری، از مجموع تعداد ۱۴ رأس گوسفند با رنگ پوشش سفید که دارای لکه های تیره روی پوشش خود بودند، نمونه پوست از هر دو بخش سفید و تیره تهیه و RNA کل استخراج شد. همچنین، پس از تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، cDNA برای هر نمونه سنتز گردید. جهت تکثیر قطعه هایی از ژن های هدف و مرجع، آغازگرهای لازم بر اساس توالی های mRNA موجود در GenBank و نرم افزار Primer3plus طراحی شدند. برای ارزیابی بیان ژن های هدف، بیان آنها با ژن های مرجع β -actin و GAPDH نرمالیزه شدند. بر اساس تجزیه و تحلیل داده ها، تفاوت معنی داری در بیان ژن های DCT و MATP در بافت لکه دار پوست در مقایسه با بخش سفید پوست مشاهده نشد، بطوری که میزان بیان ژن های DCT و MATP در قسمت لکه دار پوست نسبت به بخش سفید پوست به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۷۱ بود. در بین ژن های هدف و در کل نمونه های بررسی شده از دو بخش سفید و لکه دار پوست، ژن DCT، با میانگین چرخه آستانه ۳۵/۷۸، دارای میزان بیان کمتری نسبت به ژن MATP، با میانگین چرخه آستانه ۳۱/۶۸، بود. بیان ژن های TYR و TYRP1 در هیچ یک از نمونه ها از هر دو بخش پوست مشاهده نشد. بر اساس نتایج این پژوهش، سطح بیان ژن های DCT، TYR، TYRP1 و MATP نمی تواند نقش موثری در تنظیم رنگ پوشش و ایجاد لکه های سیاه در بافت پوست گوسفندان لری-

بختیاری داشته باشد و به نظر می‌رسد ژن‌ها یا عوامل دیگری باعث ایجاد لکه سیاه در این نژاد بوده که شناسایی آنها نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پوست، رنگ پوشش، گوسفند

مقدمه

در حیوانات اهلی، تنوع رنگ پوشش تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد. در محیط طبیعی، رنگ پوشش تیره/قهوه‌ای ترجیح داده می‌شود، در حالی که برای مقاصد اقتصادی، پوشش‌های کم‌رنگ (یعنی سفید و زرد) مطلوب هستند. گونه‌های وحشی معمولاً از نظر فنوتیپ دارای پوشش یکنواختی هستند و رنگ‌ها و الگوهای خاص گونه را نشان می‌دهند. در مقابل، حیوانات اهلی نسبت به اجداد وحشی خود تنوع رنگی بیشتری دارند. بنابراین، نژادهای اهلی ترجیحاً به عنوان مناسب‌ترین مدل حیوانی برای بررسی تنوع رنگ پوشش استفاده می‌شوند (Cieslak و همکاران، ۲۰۱۱). تنوع رنگ ناشی از حضور و فعالیت بیوشیمیایی ملانوسیت‌ها، سلول‌های مشتق شده از اکتودرم هستند که ویژگی آنها تولید ملانین‌ها می‌باشد (Solano, ۲۰۱۴). رنگدانه‌های ملانین، به یوملانین‌ها (فنوتیپ سیاه/قهوه‌ای، رنگدانه‌دار) و فتوملانین‌ها (قرمز/زرد، فنوتیپ غیر رنگدانه) تقسیم می‌شوند. در رشد جنینی، ملانوبلاست‌ها از تاج عصبی به وجود آمده و در یک چارچوب زمانی خاص به پوست مهاجرت می‌کنند، سپس به اشکال بالغ ملانوسیت تبدیل می‌شوند (Parichy و همکاران، ۲۰۰۶). در طی شش ماه از رشد جنین، تعداد ملانوسیت‌ها مشخص می‌شود (Costin and Hearing, ۲۰۰۷). اگر ملانوبلاست‌ها نتوانند به قسمت‌های خاصی از پوست برسند، فاقد سلول‌های رنگدانه خواهند بود و این به صورت لکه‌های سفید بیان می‌شود. این فرآیند می‌تواند بیانگر دلیل سفید رنگ بودن قسمت‌هایی از بدن حیوان باشد که دورتر از تاج عصبی (مانند پیشانی، پاها، شکم) هستند (Koseniuk و همکاران، ۲۰۱۸).

برای سالیان متمادی، نژادها تنها بر اساس فنوتیپ طبقه‌بندی می‌شدند و فنوتیپ‌های مرتبط با رنگ پوشش را می‌توان به دو نوع اصلی تقسیم کرد: فنوتیپ‌های طرح‌دار و بدون طرح که با وجود یوملانی (قهوه‌ای و سیاه) و فئوملانی (قرمز یا زرد) مشخص می‌شوند. رنگ پوشش نژادی، معمولاً تنها صفتی است که در انتخاب مورفولوژیکی برای شناسایی نژادها استفاده می‌شود (Hubbard و همکاران، ۲۰۱۰). برای اولین بار، مطالعه جامع الگوی توارث رنگ پوشش در گوسفند بر روی بره‌هایی مورد بررسی قرار گرفت که از تلاقی‌های برگشتی بین هفت قوچ رنگی و ۱۶۶ میش سفید کامل به وجود آمده بودند (Renieri و همکاران، ۲۰۰۸). بر اساس نتایج به دست آمده، هیچ رابطه‌ای بین رنگ پوشش (سفید، سیاه یا قهوه‌ای) و توزیع رنگدانه (لکه‌های یکنواخت یا منظم) از یک طرف و جنسیت افراد از طرف دیگر یافت نشد. علاوه بر این، غالبیت فنوتیپ سفید کامل بر سیاه و قهوه‌ای و همچنین، رنگ سیاه بر قهوه‌ای شناسایی شد (Renieri و همکاران، ۲۰۰۸). مهم‌ترین جایگاه‌های ژنی مسئول رنگ پوشش در حیوانات مزرعه، ژن پروتئین سیگنال‌دهی آگوتی ۱ (ASIP) و ژن گیرنده ملانوکورتین-۱ (MC1R) هستند بطوری که حضور رنگدانه‌های یوملانی یا فئوملانی تحت کنترل ژنتیکی این دو ژن می‌باشند (Bultman و همکاران، ۱۹۹۲، Robbins و همکاران، ۱۹۹۳). حضور تعداد آلل‌های متغیر جایگاه‌های ژنی MC1R و ASIP در نژادهای مختلف تایید شده است. علاوه بر این دو ژن، یکی شناخته‌شده‌ترین گروه ژن‌های درگیر در رنگ پوشش گوسفند، ژن‌های خانواده تیروزیناز (TYR، TYRP1 و TYRP2 که تحت عنوان DCT نیز شناخته می‌شود) هستند که نقش مهمی در تنظیم فرآیند ملانوزنر بعهدہ دارند (Yamaguchi et al., 2007). همچنین، ژن SLC45A2، (که تحت عنوان MATP نیز شناخته می‌شود)، کدکننده پروتئین مرتبط با حمل و نقل است که در طبقه‌بندی وزیکول‌های ملانوسیت و در تنظیم سنتز ملانین فعالیت دارد (Newton و همکاران، ۲۰۰۱).

¹ Agouti signaling protein (ASIP)

² Melanocortin 1 receptor (MC1R)

در ایران، گوسفند نژاد لری بختیاری یکی از نژادهای مهم گوسفند از نظر کاربرد پشم آن در صنایع نساجی و قالیبافی می باشد. گوسفندان این نژاد اغلب دارای پشم و پوستی به رنگ سفید و یا کرم رنگ هستند که در برخی از گوسفندان، رنگ های قهوه ای روشن و یا تیره هم دیده می شود. علاوه بر این، برخی از گوسفندان این نژاد دارای لکه هایی به رنگ قهوه ای تیره و یا روشن، و در مواردی کم لکه سیاه بر روی پوست و پشم خود هستند، که وجود این لکه ها کیفیت پشم استحصالی را کاهش می دهد (Saadat Nouri & Siah Mansour, ۱۹۸۹). از آنجایی که ژن های TYR، TYRP1، DCT و MATP نقش مهمی در تنظیم فرآیند ملانوزنر در پستانداران بعهده دارند، هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان این ژن های خانواده تیروزیناز (TYR، TYRP1 و DCT) و ژن MATP در بافت پوست (بخش های سفید و لکه دار) گوسفندان نژاد لری بختیاری می باشد.

مواد و روش ها

در این تحقیق، نمونه پوست از مجموع تعداد ۱۴ راس گوسفند نر با سن حدود یکسال از نژاد لری بختیاری تهیه گردید. در این مرحله، گوسفندان دارای لکه تیره بر روی پوشش خود قبل از کشتار علامت گذاری شدند و فرآیند نمونه برداری بلافاصله پس از کشتار انجام شد، به طوری که از هر گوسفند، یک نمونه از قسمت سفید و نمونه ای از قسمت لکه های موجود در پوست آن برداشته شد. نمونه ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده و به تانک ازت منتقل گردید. جهت استخراج RNA از نمونه های تهیه شده از کیت استخراج Total RNA (شرکت آزما ژن) استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. سپس نمونه های RNA استخراج شده، جهت حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، در معرض هضم آنزیم DNase I قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد و کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شدند. جهت تکثیر قطعه هایی از ژن های

هدف و مرجع، آغازگرهای لازم با استفاده از توالی‌های mRNA موجود در GenBank و نرم افزار Primer3plus، و بر اساس پارامترهای پیشنهادی Thornton and Basu (۲۰۱۱) طراحی شدند که ویژگی‌های آنها در جدول ۱ آمده است. در این تحقیق، از دو ژن β -actin و GAPDH به عنوان ژن‌های مرجع استفاده شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌ها طی واکنش Real Time PCR در دستگاه Bio Rad مدل CFX 96 و با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین بر پایه روش استاندارد نسبی صورت گرفت. برای واکنش Real Time PCR از مستر میکس سایبرگرین شرکت امپلیکون فراهم شده توسط شرکت آژماژن استفاده شد. بدین منظور، برای هر نمونه در هر میکروتیوب مقدار ۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA سنتز شده (۵۰ نانوگرم) و ۲ میکرولیتر آب عاری از DNase اضافه شد که در کل حجم نهایی هر واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. همچنین، برای هر ژن از نمونه کنترل منفی (NTC: no template control) در ۲ تکرار جهت بررسی وجود آلودگی DNA استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای ژن‌های هدف و مرجع

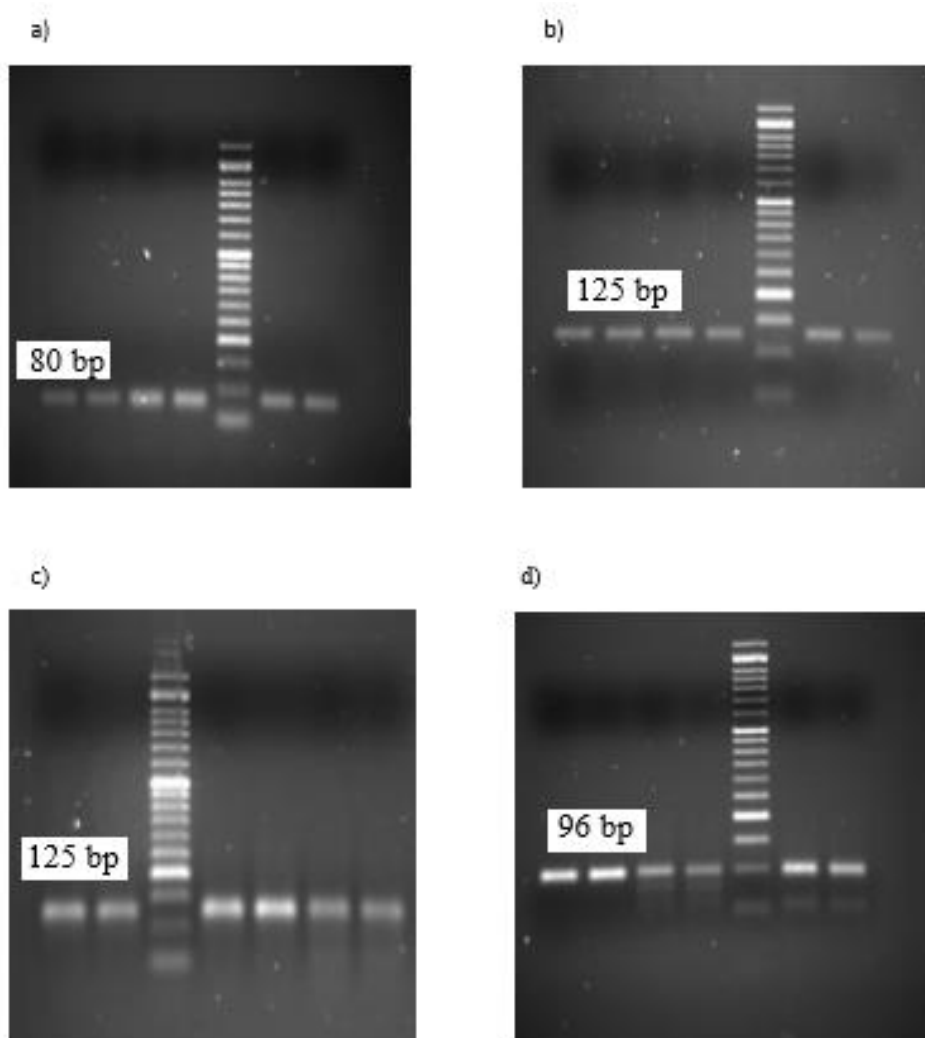
ژن	توالی	طول قطعه	شماره دسترسی
<i>TYR</i>	F: 5'-GGAAGTTGTAAGTTTGGATTTTCGGG-3' R: 5'-GTCTGGGCTGGTGGTATGTTT-3'	144	EU760772.1
<i>TYRP1</i>	F: 5'-GCTTTGAGGAATGGCGTGTGTT-3' R: 5'-ATGTGGGTAGTGGTGGCTGTG-3'	141	EU760770.1
<i>DCT</i>	F: 5'-CCTCGCAAAGTACACTCCACAC-3' R: 5'-GCCACACAAAGAAATCGTAAATGCT-3'	125	NM_001130024.1
<i>MATP</i>	F: 5'-ATTGGCTGTTGCTTTGTGGCT-3' R: 5'-GTGTCTGAGGTTAGGGACTGTGT-3'	80	XM_004017064.4
β -actin	F: 5'-CAATGTGGCCGAGGACTTTGAC-3' R: 5'-CTTAGAGAGAAGGAGGGTGGCTTT-3'	125	NM_001009784.3

همچنین، برای کاهش خطا برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه شامل دمای ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ °C به مدت ۳۰ الی ۴۰ ثانیه (بسته به نوع آغازگر) بود که دو مرحله‌ی آخر ۴۰ چرخه تکرار شدند. تجزیه و تحلیل منحنی ذوب، بلافاصله پس از آخرین چرخه تکثیر، شروع شد که در این فرآیند دما از ۶۰ °C به ۹۵ °C با افزایش ۰/۵ درجه سانتی گراد در هر مرحله، افزایش یافت. در این تحقیق، از برنامه BestKeeper جهت بررسی آمار توصیفی داده‌ها مبتنی بر Ct‌های بدست آمده استفاده شد. همچنین، برای مقایسه تفاوت بیان ژن‌ها در دو بخش سفید و تیره پوست از برنامه REST,2009,V2.0.13 استفاده گردید. این نرم افزار بیان ژن‌ها را در تیمارهای مختلف نسبت به تیمار کنترل محاسبه می‌کند (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۲).

نتایج

محصولات تکثیر هر ژن پس از واکنش Real-Time PCR، به منظور اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی، بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. طول قطعات تکثیر شده از ژن‌های هدف و مرجع همراه با نشانگر ۵۰ جفت باز در شکل ۱ آمده است. همان طوری که در این شکل مشاهده می‌شود اندازه قطعات تکثیر شده برای ژن‌های DCT، GAPDH و β -Actin، MATP به ترتیب ۸۰، ۱۲۵، ۱۲۵ و ۹۶ جفت باز است. لازم به ذکر است بیان قابل ملاحظه‌ای از ژن‌های TYR و TYRP1 در هیچ یک از نمونه‌ها از هر دو بخش پوست مشاهده نشد. البته در برخی از نمونه‌ها از هر دو گروه، بیان بسیار ناچیزی از این دو ژن مشاهده شد که به دلیل بالا بودن مقادیر Ct (بزرگتر از ۳۸)، قابل تجزیه و تحلیل آماری نبوده و حذف شدند.

داده‌های توصیفی حاصل از نرم افزار BestKeeper برای مقادیر Ct ژن های هدف و مرجع در جدول ۲ آمده است. یکی از مهمترین اطلاعات این جدول مقادیر انحراف معیار برای داده‌های Ct هر ژن است بطوری که ژن β -Actin با انحراف معیار ۰/۶۷ دارای پایدارتین بیان در نمونه‌های پوست بوده در حالی که ژن GAPDH (ژن مرجع دوم) با انحراف معیار ۱/۲۹ دارای پایداری کمتری نسبت به ژن β -Actin در نمونه‌های پوست دارد.



شکل ۱ - قطعات تکثیر شده از ژن‌های مورد مطالعه همراه با نشانگر ۵۰ جفت باز. (a) ژن DCT با طول ۸۰ جفت باز، (b) ژن MATP با طول ۱۲۵ جفت باز، (c) ژن β -Actin با طول ۱۲۵ جفت باز و (d) ژن GAPDH با طول ۹۶ جفت باز

به‌طور کلی، در ژن‌های مرجع، هر چه پایداری ژن در نمونه‌های کنترل و تیمار بیشتر باشد، ژن مناسب‌تری برای نرمال کردن داده‌های بیانی محسوب می‌شود. با توجه به بالا بودن انحراف معیار ژن مرجع GAPDH، در تجزیه و تحلیل داده‌ها، در مرحله اول از ژن β -Actin به عنوان تنها ژن مرجع و در مرحله دوم، از هر ۲ ژن β -Actin و GAPDH به عنوان ژن‌های مرجع استفاده شدند که تاثیری در نتایج از نظر معنی‌داری مشاهده نشد. البته، استفاده از دو ژن مرجع در تجزیه و تحلیل آماری، منجر به بهبود ناچیزی در مقدار p ژن‌های بیان شده گردید. از اینرو نتایج استفاده از ۲ ژن مرجع در مقاله گزارش شده است.

از آنجایی که مقدار چرخه آستانه (Ct) رابطه معکوسی با سطح بیان نسبی ژن در بافت مورد نظر دارد، در بین ژن‌های هدف، ژن DCT با میانگین چرخه آستانه ۳۵/۷۸ دارای میزان بیان کمتری نسبت به ژن MATP با میانگین چرخه آستانه ۳۱/۶۸ در نمونه‌های پوست گوسفند نژاد لری بختیاری بودند. در این پژوهش از داده‌های Ct حاصل از Real-Time PCR با فرض راندمان برابر برای ژن‌های مختلف (برای همه ژن‌ها راندمان ۲ در نظر گرفته شد) جهت تجزیه و تحلیل با نرم افزار REST استفاده شد.

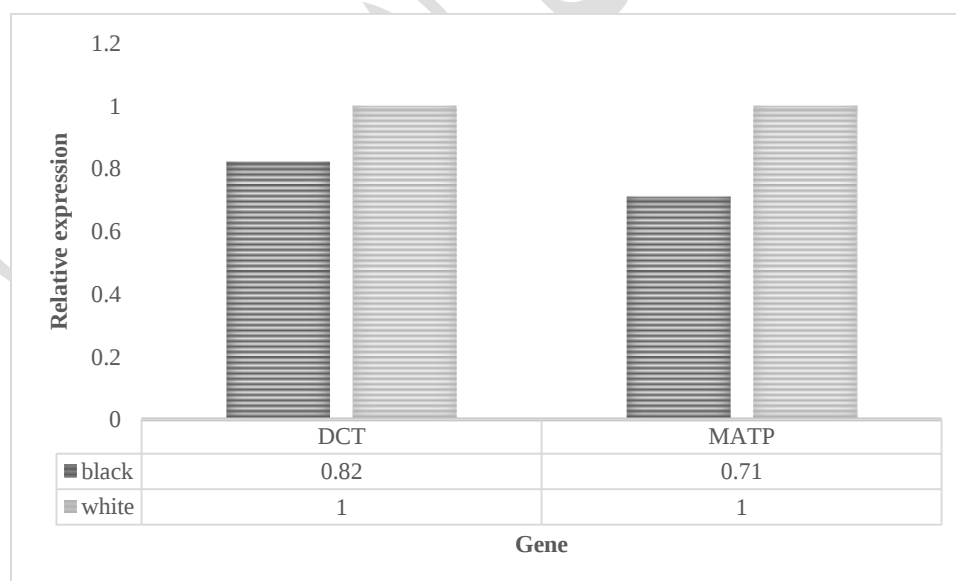
جدول ۲- آمار توصیفی مقادیر Ct برای میزان بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوست در گوسفند لری بختیاری

	MATP	DCT	GAPDH	β -Actin
n	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸
Mean	۳۱/۶۸	۳۵/۷۸	۳۵/۹۶	۲۹/۸۲
Min	۲۶/۵۵	۲۸/۴۰	۳۲/۱۷	۲۷/۱۸
Max	۳۷/۶۷	۴۰/۴۲	۳۹/۶۳	۳۱/۰۱
SD	۲/۵۴	۲/۱۵	۱/۲۹	۰/۶۷
CV	۷/۷۳	۶/۰۲	۳/۵۹	۲/۲۴

نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های DCT و MATP در بافت لکه‌دار پوست نسبت به بافت سفید پوست تفاوت معنی‌داری نداشت بطوری که مقدار p برای مقایسه بیان ژن‌های DCT و MATP در قسمت لکه‌دار پوست نسبت به بخش سفید پوست به ترتیب ۰/۸۱ و ۰/۶۵ بود. میزان بیان ژن‌های DCT و MATP در قسمت لکه‌دار پوست نسبت به بخش سفید پوست به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۷۱ برابر بود (شکل ۲).

بحث

رنگ پوشش یکی از مهمترین صفاتی است که می‌تواند بر راندمان اقتصادی پرورش گوسفند تاثیر گذار باشد. به‌طور کلی، این صفت تحت تاثیر تعداد زیادی ژن است که نقش تعیین‌کننده‌ای بر حضور، توزیع و فعالیت‌های بیوشیمیایی سلول‌های ملانوسیت دارند (Bennett and Lamoreux, ۲۰۰۳). این سلول‌های تخصصی با سنتز یوملانی‌ها و فئوملانی‌ها، به ترتیب رنگ‌های سیاه/قهوه‌ای و قرمز/زرد پوشش را تعیین می‌کنند. دو ژن اصلی MC1R و ASIP مقدار نسبی این دو نوع ملانین را در پوست و مو کنترل می‌کنند (Searle, ۱۹۶۸).



شکل ۲- مقایسه بیان ژن‌های DCT و MATP در بخش لکه‌دار پوست نسبت به بخش سفید بافت پوست در گوسفند لری بختیاری

علاوه بر این، خانواده ژن تیروزیناز (TYR، TYRP1 و DCT)، که گروه مهمی از ژن‌های مرتبط به هم هستند فرآیند ملانوزنر را تنظیم می‌کنند. TYR، TYRP1 و DCT در مرحله III رشد ملانوزوم عمل می‌کنند. هنگامی که فعالیت TYR بالا باشد، یوملانی‌ن سنتز می‌شود. در مقابل، فئوملانی‌ن زمانی سنتز می‌شود که فعالیت TYR کاهش یابد.

علاوه بر پروتئین‌های ذکر شده، پروتئین MATP، که یک پروتئین مرتبط با حمل و نقل است در طبقه بندی وزیکول‌های ملانوسیت و در تنظیم سنتز ملانی‌ن فعالیت دارد (Newton و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین، پروتئین‌های کدگذاری شده توسط این ژن در پردازش و انتقال TYR، TYRP1 و DCT در سلول‌ها نقش دارند (Inagaki و همکاران، ۲۰۰۶).

در این مطالعه، بیان چهار ژن TYR، TYRP1، DCT و MATP، که از اجزای غشای ملانوزومی بوده و نقش مهمی در سنتز و انتقال ملانی‌ن دارند، در بخش‌های سفید و لکه‌دار بافت پوست در گوسفند نژاد لری بختیاری به روش Real-time PCR بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیان ۲ ژن TYR و TYRP1 در هیچ یک از نمونه‌های پوست مشاهده نشد، در حالی که ژن‌های DCT و MATP علیرغم بیان در هر دو نوع نمونه پوست (لکه‌دار و سفید)، تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در مطالعات بسیاری، نقش بیان ژن‌های موثر بر رنگ پوشش و پوست در انسان و دام‌های اهلی بررسی شده‌اند. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳، نشان داد که تعداد ۲۲۳۵ ژن شناخته شده در پوست سفید و سیاه گوسفند بیان می‌شوند (Fan و همکاران، ۱۹۹۷). از این تعداد، ۸۴۵ ژن با بیان متفاوت شناسایی شدند، که بیان ۷۳۸ ژن در پوست سیاه گوسفند در مقایسه با پوست سفید گوسفند کاهش یافته بود (≥ 2 برابر)، در حالی که بیان تعداد ۱۰۷ ژن روندی افزایشی نشان دادند (≤ 2 برابر). از ۱۰۷ ژن با افزایش بیان، ۱۶ ژن به طور انحصاری در پوست سیاه گوسفند بیان شدند (شامل ۲ ژن با بیان بسیار بالا). در میان ژن‌های موثر در رنگ پوشش که بیان

بیشتری را در پوست سیاه گوسفند نشان دادند، TYRP1 بالاترین بیان را در پوست سیاه گوسفند در مقایسه با پوست سفید گوسفند نشان داد و به دنبال آن ژن‌های TYR، MLPH، MATP و Si قرار گرفتند (Fan و همکاران، ۱۹۹۷). در مطالعه حاضر، عدم بیان ۲ ژن TYR و TYRP1 می‌تواند به دلیل پوشش سفید غالب در نژاد لری بختیاری باشد که بیان بالای ژن ASIP نسبت به MC1R در مطالعه Moradi و همکاران (۲۰۲۴) نیز می‌تواند تایید کننده این نتیجه باشد. سطح بیان ژن TYR در گوسفندان چینی گروه‌های خاکستری فیروزه‌ای و سیاه بیشتر از گروه سفید بود (Yao و همکاران، ۲۰۱۹)، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های قهوه‌ای روشن و سفید نشان نداد. با این حال، بیان ژن DCT صرفاً، در گوسفندان گروه خاکستری فیروزه‌ای مشاهده شده بود که مطابق با مطالعات روی راسو و خرگوش‌ها بود (Yao و همکاران، ۲۰۱۹، Song و همکاران، ۲۰۱۷). بیان ژن DCT در پوست بز قهوه‌ای (قهوه‌ای در مقابل سفید، قهوه‌ای در مقابل خاکستری) به طور قابل توجهی افزایش نشان داد در حالی که تفاوت معنی‌داری در بیان DCT بین نمونه‌های پوست خاکستری و سفید مشاهده نشد (Peng و همکاران، ۲۰۱۸). سطح بیان ژن MATP در گوسفندان گروه‌های خاکستری و سیاه فیروزه‌ای با افزایش همراه بود (Yao و همکاران، ۲۰۱۹). که با مطالعات روی گوسفند هان دم کوچک مطابقت داشت (Wang و همکاران، ۲۰۱۶). سطح بیان MC1R در پوست سیاه با موهای سفید و موهای قهوه‌ای در گوسفند قزاقستانی به طور قابل توجهی متفاوت بود، در حالی که بیان ژن ASIP با موهای مختلف ارتباط نداشت (Li و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه مطالعه‌ی دیگری بر روی گوسفند زالدا، نتایج متناقضی در بررسی تفاوت بیان ژن ASIP در گوسفندان با پوشش سیاه رنگ و سفید مشاهده شد بطوری سطح بیان ASIP در گوسفند نژاد زالدا با رنگ پوشش سیاه به طور قابل توجهی کمتر از سطوح ارزیابی شده در پوشش سفید رنگ بود (Royo و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای که در گوسفند کوریدال انجام شد، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های ASIP، MC1R و C-KIT بین پوست سفید و لکه‌های سیاه مشاهده نشد. از سوی

دیگر، بسیاری از ژن‌ها مانند C-FOS، KLF4 و UFC1، بیان متفاوتی را در لکه‌های سیاه از خود نشان دادند که بیانگر نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد لکه‌های سیاه در پوست گوسفند کوریدال باشد (Penagaricano و همکاران، ۲۰۱۲). در گوسفند نژاد تبتی نیز تفاوت در بیان برخی ژن‌ها در پوشش سیاه و سفید مشاهده شده است. بیان نسبی ژن MITF در بافت پوست سیاه رنگ این گوسفندان به طور قابل توجهی بیشتر از پوشش سفید گزارش شده است (Han و همکاران، ۲۰۱۵). در گوسفند نژاد Changthangi با پوشش سیاه ژن‌های مرتبط با ملانوزن شامل TYR، MLANA، PMEL، MATP، DCT، TYRP1 و OCA2 بیان بالاتری را نشان دادند. این یافته‌ها نقش ملانین را در رنگ پوشش سیاه حیوانات و محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش در ارتفاعات تایید می‌کند (Vasu و همکاران، ۲۰۲۴). بطور کلی، استفاده از تکنیک RNA-seq جهت بررسی ژن‌های بیان شده در هر دو بخش سفید و لکه دار پوست در نژاد لری بختیاری می‌تواند درک اولیه‌ای نسبت به تفاوت ژن‌های بیان شده ارایه کند و سپس، استفاده از تکنیک Real-time PCR می‌تواند نتایج آن را تایید کند.

علاوه بر بیان ژن، جهش در ژن‌های درگیر در رنگ پوشش با تنوع رنگ پوشش در بسیاری از دام‌های اهلی مانند گوسفند، بز و سایر حیوانات اهلی و انسان مرتبط است. داده‌های توالی یابی کل ژنوم در گوسفندان فاقد رنگ پشم سفید، تعداد ۳۶۵ ژن کاندید را شناسایی کرد که در میان آنها، ژن‌های RCOR1، GATA1، GMDS، PDE4B، SLC36A1، MAPK4 و PPP3CA با تشکیل پشم غیرسفید مرتبط بودند (Zhang و همکاران، ۲۰۲۳). گوسفند با ژنوتیپ GG نسبت به گوسفندان دارای ژنوتیپ‌های GA و AA در ژن DCT، دارای فعالیت تیروزیناز، محتوای ملانین و نسبت کل ملانین یوملانین به طور قابل توجهی کمتر است (Deng و همکاران، ۲۰۰۹). ارتباط معنی‌داری بین آلل‌ها در داخل یا نزدیک ژن‌های ASIP، ITCH، AHCY و RALY در کروموزوم شماره ۱۳ و رنگ‌های پوشش سیاه و قهوه‌ای و ژن‌های KIT و PDGFRA روی کروموزوم شماره ۶ برای رنگ پوشش سفید در بز مرخز

یافت شد (Nazari-Ghadikolaie و همکاران، ۲۰۱۸). همچنین، جهش His214Asn در TYR ممکن است تغییراتی در رنگ شکلاتی و ساختار ملانوزوم در مرغ ایجاد کند (Ko و همکاران، ۲۰۱۲). در یک مطالعه انسانی تعداد ۹۶۰ چندشکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ۲۹ ژن مختلف دخیل در تنظیم جنبه‌های مختلف رنگدانه پوست، مانند سنتز ملانین (TYR، TYRP1 و DCT)، انتقال تیروزین (OCA2)، سیگنال‌دهی ملانوتنیک (PRKAR2B)، توسعه ملانوسیت (FGF2، EDN3 و CTNNB1)، شناسایی شدند. جایگاه و عملکرد ژن‌های مربوط به چندشکلی‌های شناسایی شده در این مطالعه نشان داد که ژن‌های TYR، TYRP1 و DCT مستقیماً در سنتز ملانین نقش دارند. علاوه بر این، TYR آنزیمی است که مرحله اول را در طول سنتز ملانین کاتالیز می‌کند و یکی از عوامل کلیدی تعیین کننده رنگدانه پوست است (Saternus و همکاران، ۲۰۱۵). اگرچه اطلاعات کمی در مورد تأثیر این SNP ها بر روی رنگدانه های پوست وجود دارد، اما چندشکلی که در ژن TYR (rs1393350) قرار دارد، گزارش شده است که بر رنگدانه پوست و حساسیت به خورشید تأثیر می‌گذارد (Nan و همکاران، ۲۰۰۹). یافته‌های تحقیقاتی نشان می‌دهد که ژن‌های مختلف ممکن است مسئول فنوتیپ‌های رنگدانه‌ای تیره و روشن پوست در انسان باشند. بر این اساس، چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن MATP با پوست روشن‌تر در اروپایی‌ها ارتباط دارد، اما با پوست روشن در آسیای شرقی ارتباط ندارد (Lamason و همکاران، ۲۰۰۵). پشتیبانی اضافی برای این نکته از تحقیقی حاصل شد که DCT را به عنوان کاندیدای ژن رنگدانه برای انتخاب مثبت فقط در چینی‌ها شناسایی کرد (Norton و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر این، بر اساس یافته‌های علمی، در حالی که ASIP و OCA2 ممکن است نقش مشترکی در شکل دادن رنگدانه‌های روشن و تیره داشته باشند، ژن‌هایی مانند SLC24A5، MATP و TYR ممکن است نقش غالب در تکامل پوست روشن در اروپایی‌ها، نه در شرق آسیا، داشته باشند. این نتایج شواهد قانع‌کننده‌ای ارائه می‌دهد که پوست روشن به طور مستقل در جمعیت اروپا و آسیای شرقی تکامل یافته است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش (عدم بیان ژن های TYR و TYRP در نمونه ها و همچنین، فقدان تفاوت معنی دار در بیان ژن های DCT و MATP در بخش لکه دار و سفید پوست) به نظر می رسد که میزان بیان ژن های DCT، TYR، TYRP1 و MATP نمی تواند نقش موثری در ایجاد لکه های سیاه پوستی در گوسفند نژاد لری بختیاری داشته باشد. این نتایج نشان می دهد که ایجاد لکه های تیره در پوست گوسفندان لری بختیاری در کنترل ژن های بررسی شده در این مطالعه نبوده و ژن ها و یا عوامل دیگری می توانند در ایجاد این لکه ها نقش داشته باشند که شناسایی آنها نیازمند مطالعات بیشتری است.

References

- Bennett, D.C. and Lamoreux, M.L. (2003). The color loci of mice—a genetic century. *Pigment Cell Research*, 16: 333-344. doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00067.x.
- Bultman, S. J., Michaud, E. J. and Woychik, R. P. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus, *Cell*, 71: 1195–1204. doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80067-4.
- Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M., and Ludwig, A. (2011). Colours of domestication, *Biological Reviews*, 86: 885–899. doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
- Costin, G. E. and Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 1: 976–994. doi.org/10.1096/fj.06-6649rev.
- Deng, W., Tan, Y., Wang, X., Xi, D., He, Y., Yang, S., Mao, H. and Gao, S. (2009). Molecular cloning, sequence characteristics, and polymorphism analyses of the tyrosinase-related protein 2/DOPachrome tautomerase gene of black-boned sheep (*Ovis aries*). *Genome*, 52: 1001-1011. doi.org/10.1139/G09-078.
- Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J. and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385: 165-168. doi.org/10.1038/385165a0.
- Han, J. L., Min ,Y., Guo, T. T., Yue, Y. J., Liu, J. B., Niu, C. E., Wang, C. F. and Yang, B. H. (2015). Molecular characterization of two candidate genes associated with coat color in Tibetan sheep (*Ovis arise*). *Journal of Integrative Agriculture*, 14: 1390-1397. doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60928-X.
- Hubbard, J. K., Uy, J. A. C., Hauber, M. E., Hoekstra, H. E. and Safran, R. J. (2010). Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function, *Trends Genetics*, 26: 231–239. doi.org/10.1016/j.tig.2010.02.002.
- Inagaki, K., Suzuki, T., Ito, S., Suzuki, N., Adachi, K., Okuyama, T., Nakata, Y., Shimizu, H., Matsuura, H. and Oono, T. 2006. Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene and their phenotypes. *Pigment Cell Research*, 19: 451-453. doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00332.x.
- Ko, J. M., Yang, J. A., Jeong, S. Y. and Kim, H. J. (2012). Mutation spectrum of the TYR and SLC45A2 genes in patients with oculocutaneous albinism. *Molecular Medicine Reports*, 5: 943-948. doi.org/10.3892/mmr.2012.764.
- Koseniuk, A., Ropka-Molik, K., Rubiś, D. and Smołucha, G. (2018). Genetic background of coat colour in sheep. *Archives Animal Breeding*, 61(2): 173-178. doi.org/10.5194/aab-61-173-2018.
- Lamason, R. L., Mohideen, M. A. P., Mest, J. R., Wong, A. C., Norton, H. L., Aros, M. C., Jurynec, M. J., Mao, X., Humphreville, V. R. and Humbert, J. E. (2005). SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, 310: 1782-1786. doi.org/10.1126/science.1116238.
- Li, H. T., Zeng, X. C., Zhang, W. X., Zhao, H. X., Hui, W. Q., Liu, G., Luo, Y., Ban, Q., Zhao, Z. S. and Jia, B. (2013). Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 44(3): 366-75. <https://www.xmsyxb.com/EN/Y2013/V44/I3/366>

- Moradi, K., Mustafa Muhaghegh Dolatabady, M. and Habibizad, J. (2024). Expression analysis of candidate genes in white and black spots of skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. *Iranian Journal of Animal Science research*. (In press). doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166
- Nan, H., Kraft, P., Hunter, D.J. and Han, J. (2009). Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *International Journal of Cancer*, 125: 909-917. doi.org/10.1002/ijc.24327.
- Nazari-Ghadikolaei, A., Mehrabani-Yeganeh, H., Miarei-Aashtiani, S. R., Staiger, E. A., Rashidi, A., Huson, H. J. (2018). Genome-wide association studies identify candidate genes for coat color and mohair traits in the Iranian Markhoz goat. *Frontiers in Genetics*, 9: 105. doi.org/10.3389/fgene.2018.00105.
- Newton, J., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A. and Brilliant, M.H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *The American Journal of Human Genetics*, 69: 981-988. doi.org/10.1086/324340
- Norton, H. L., Kittles, R. A., Parra, E., McKeigue, P., Mao, X., Cheng, K., Canfield, V. A., Bradley, D. G., McEvoy, B. and Shriver, M. D. (2007). Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 710-722. doi.org/10.1093/molbev/msl203.
- Parichy, D. M., Reedy, M. V. and Erickson, C. A. (2006). Regulation of melanoblast migration and differentiation. *The Pigmentary System and its disorders*, 2nd Edn., Oxford University Press, Oxford, 108-127. doi.org/10.1002/9780470987100.ch5.
- Peñagaricano, F., Zorrilla, P., Naya, H., Robello, C. and Urioste, J. I. (2012). Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep. *Journal of Applied Genetics*, 53: 99-10. doi.org/10.1007/s13353-011-0066-9.
- Peng, Y., Wang, Y., Wang, R., Geng, L., Ma, R., Zhang, C., Liu, Z., Gong, Y., Li, J. and Li, X. (2018). Exploring differentially expressed genes associated with coat color in goat skin using RNA-seq. *Canadian Journal of Animal Science*, 99: 357-366. doi.org/10.1139/cjas-2018-0026.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30: e36-e36. doi.org/10.1093/nar/30.9.e36.
- Renieri, C., Valbonesi, A., La Manna, V., Antonini, M., and Lauvergne, J. J. (2008). Inheritance of coat colour in Merino sheep, *Small Ruminant Research*, 74: 23-29. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.03.001.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli- Rehffuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G., and Cone, R. D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 72: 827-834, 1993. doi.org/10.1016/0092-8674(93)90572-8.
- Royo, L.J., Alvarez, I., Arranz, J., Fernández, I., Rodríguez, A., Pérez-Pardal, L. and Goyache, F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal Genetics*, 39: 290-293. doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x.
- Saadat Nouri, M. and Siah Mansour, P. (1989). Principles of maintenance and raising sheep. Fourth edition, Tehran, Farhang Publications. (In Persian).

- Saternus, R., Pilz, S., Gräber, S., Kleber, M., März, W., Vogt, T. and Reichrath, J. (2015). A closer look at evolution: Variants (SNPs) of genes involved in skin pigmentation, including EXOC2, TYR, TYRP1, and DCT, are associated with 25 (OH) D serum concentration. *Endocrinology*, 156: 39-47. doi.org/10.1210/en.2014-1238.
- Searle, A. G. (1968). Comparative genetics of coat colour in mammals. Comparative genetics of coat colour in mammals. London: Logos Press Ltd. in association with Elek Books Ltd. Distributed by Academic Press, New York and London.
- Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 1-28. doi.org/10.1155/2014/498276.
- Song, X., Xu, C., Liu, Z., Yue, Z., Liu, L., Yang, T., Cong, B. and Yang, F. (2017). Comparative transcriptome analysis of mink (*Neovison vison*) skin reveals the key genes involved in the melanogenesis of black and white coat colour. *Scientific Reports*, 7: 1-11. doi.org/10.1038/s41598-017-12754-0.
- Thornton, B. and Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2): 145-154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461.
- Vasu, M., Ahlawat, S., Chhabra, P., Sharma, U., Arora, R., Sharma, R., Mir, M. A. and Singh, M. K. (2024). Genetic insights into fiber quality, coat color and adaptation in Changthangi and Muzzafarnagri sheep: A comparative skin transcriptome analysis. *Gene*, 891:147826. doi.org/10.1016/j.gene.2023.147826.
- Wang, H., Xue, L., Li, Y., Zhao, B., Chen, T., Liu, Y., Chang, L. and Wang, J. (2016). Distribution and expression of SLC45A2 in the skin of sheep with different coat colors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 54: 143-150. doi.org/10.5603/FHC.a2016.0015
- Yamaguchi, Y., Brenner, M. and Hearing, V. J. (2007). The regulation of skin pigmentation. *Journal of biological chemistry*, 282: 27557-27561. doi.org/10.1074/jbc.R700026200.
- Yao, L., Bao, A., Hong, W., Hou, C., Zhang, Z., Liang, X. and Aniwashi, J. (2019). Transcriptome profiling analysis reveals key genes of different coat color in sheep skin. *Peer Journal*, 7: e8077. doi.org/10.7717/peerj.8077.
- Zhang, W., Jin, M., Lu, Z., Li, T., Wang, H., Yuan, Z. and Wei, C. (2023). Whole genome resequencing reveals selection signals related to wool color in sheep. *Animals*, 13(20): 3265. doi.org/10.3390/ani13203265.

Expression analysis of tyrosinase family (TYR, TYRP1 and DCT) and MATP genes in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep

Abstract

The effect of mRNA levels in tyrosinase family genes (TYR, TYRP1 and DCT) and MATP gene on the development of skin spots were investigated in Lori Bakhtiari sheep. For this purpose, the skin samples were collected from both white and dark parts of 14 white-haired Lori-Bakhtiari sheep with black spots and total RNA was extracted. In addition, after determining the quality and quantity of extracted RNA, cDNA was synthesized for each sample. To amplify fragments of the target and reference genes, the necessary primers were designed based on the mRNA sequences available in GenBank and Primer3plus software. To evaluate the expression of the target genes, their expression was normalized with β -actin and GAPDH as reference genes. The result showed mRNA levels of DCT and MATP genes were not significantly different in spotted skin tissue compared to white skin tissue. In the spotted part, the expression levels of DCT and MATP genes were 0.82 and 0.71, respectively, compared to the white part of the skin tissue. Among the target genes, the DCT gene with an average threshold cycle (Ct) of 35.78 had a lower expression level than the MATP gene with an average Ct of 31.68 in skin samples of Lori-Bakhtiari sheep. The expression of TYR and TYRP1 genes were not detected in any of the samples from both parts of the skin. The results of this study showed that the expression level of DCT, TYR, TYRP1 and MATP genes can not play an effective role in regulating the coat color and creating black spots in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep. Therefore, it appears that other genes or factors are responsible for black spots in Lori-Bakhtiari sheep, and further studies are required to identify them.

Keywords: gene expression, skin, coat color, sheep