دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم دامی و شیلات
گروه علوم دامی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام

موضوع:

ارتباط چند شکلی ژن‌های CYP19 و ERα با برخی صفات تولیدی و تولید مثلی در گاوهای نژاد هلشتاین

پژوهش و نگارش:

فهیمه محمدنژاد سنگدهی

استاد راهنما:

پروفسور قدرت رحیمی میانجی

استاد مشاور:

دکتر زربخت انصاری پیرسرائی

بهمن ۱۳۹۱

سپاسگزاری

حمد و سپاس خدای را، آن نخستین بی پیشین و آن آخرین بی پسین را، خداوندی که دیده بینایان از دیدارش قاصر آید و اندیشه واصفان از نعت او فروماند. پروردگاری که نور شناخش را به قلب ما تابانید و دروازه بی پایان دانش به پروردگاریش را بر ما گشود و از هلاکت در ورطه انکار و شک بازمان داشت.

بر خود وظیفه می دانم که به رسم ادب و احترام، زحمات و ارشادات یکایک عزیزانی را که به نحوی در تکمیل این پایان نامه مرا یاری نمودند، ارج نهاده و مراتب تشکر و قدردانی خویش را از الطاف و مهربانی های آن ها ابراز نمایم.

صمیمانه ترین تقدیرها را تقدیم به خانواده عزیز و مهربانم می کنم که همواره حامی و مشوقم بوده اند و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی ام بدون دعای خیر و برکت وجودشان غیر ممکن بود.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای پروفسور قدرت رحیمی که با نظرات گهربار خود راهگشای اینجانب بوده اند کمال تشکر را دارم. همنشینی و شاگردی ایشان از بزرگترین افتخارات زندگی من می باشد.

از استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر زربخت انصاری که همواره از راهنمایی های ارزشمند و حمایت های بی شائبه ایشان بهره برده ام تشکر و قدردانی می نمایم.

از همه عزیزانی که در به انجام رساندن پایان نامه یاریم کردند، به ویژه جناب آقای دکتر روح الله عبدالله پور که با پیشنهادات و راهنمایی های ارزنده شان بر غنای علمی این پژوهش افزودند، صمیمانه قدردانی می کنم.

از تمامی دوستان، هم کلاسی ها، هم اتاقی ها و همه کسانی که در طول تحصیل افتخار آشنایی و مصاحبت با آن ها را داشتم، به پاس محبت های بی دریغشان سپاسگزارم.

تقدیم به

آنان که تمام امروزهای من تجسم دیروزهای از دست رفته شان است.

پدرم و مادرم

آنان که فروغ نگاهشان و گرمی کلامشان سرمایه های جاودانی زندگی من است.

بوسه قدردانی ام بر دستان پرمهرشان جاریست که

کمترین سپاس من خواهد بود...

چکیده

استروژن مهمترین هورمون موثر بر رشد، تمایز و عملکرد بافت‌های تولید مثلی مانند تخمدان، رحم، واژن و پستان می‌باشد. با توجه به نقش مهم استروژن در تنظیم فرایندهای تولید مثلی، آنزیم‌های تولید کننده استروژن و نیز گیرنده‌های استروژن که عملکرد آن را واسطه گری می‌کنند، به عنوان مارکرهای احتمالی هم برای صفات تولیدی و هم برای صفات عملکردی در حیوانات اهلی به حساب می آیند. هدف از این مطالعه شناسایی چند شکلی‌های موجود در ناحیه '۵ ژن‌های CYP19 و ERα، تعیین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و نیز بررسی ارتباط آن‌ها با برخی صفات تولیدی و تولید مثلی در گاوهای نژاد هلشتاین بوده است. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش نمکی بهینه یافته و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) برای تکثیر قطعات ۲۸۸ و ۳۴۰ جفت بازی به ترتیب از ناحیه پروموتور ژن‌های CYP19 و ERα با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. شناسایی فرم‌های مختلف آللی در ژن CYP19 با استفاده از آنزیم PvuII و الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز انجام شد و ۳۰۴ حیوان برای این جایگاه تعیین ژنوتیپ شدند. سه ژنوتیپ AA، AB و BB با فراوانی‌های هر یک به ترتیب ۰/۸۳۲۲، ۰/۱۶۴۵ و ۰/۰۰۳۳ در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. فراوانی آلل‌های A و B نیز به ترتیب برابر با ۰/۹۱۴۵ و ۰/۰۸۵۵ برآورد شد. برای ژن ERα، ۲۷۳ حیوان با استفاده از آنزیم SnaBI و الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل اکریل آمید تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی به دست آمده برای ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به ترتیب ۰/۹۲۶۷، ۰/۰۶۹۶ و ۰/۰۰۳۷ و برای آلل‌های A و G به ترتیب ۰/۹۶۱۵ و ۰/۰۳۸۵ بود. بررسی اثر چند شکلی‌ها بر صفات تولیدی و تولید مثلی گاو با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. نتایج نشان دادکه اثر جایگاه ERα/SnaBI بر صفات فاصله گوساله زایی، سن اولین زایش، مقدار و درصد چربی شیر معنی دار بود. این صفات در گروه افراد دارای ژنوتیپ AG مطلوب تر بودند که احتمالا نشان دهنده برتری آلل G نسبت به آلل A می‌باشد. اثر جایگاه CYP19/PvuII نیز تنها بر تعداد کمی از صفات مورد مطالعه، شامل طول آبستنی، مقدار چربی و مقدار پروتئین شیر معنی دار بود. افراد دارای ژنوتیپ AB چربی و پروتئین بیشتری در شیر تولید کردند، ولی دوره آبستنی طولانی تری داشتند. هیچ ارتباط معنی داری بین این چند شکلی‌ها و صفات مورد مطالعه دیگر مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: CYP19، ERα، چند شکلی، گاو هلشتاین، صفات تولیدی، صفات تولید مثلی.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول (مقدمه)

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم (بررسی منابع)

۲-۱- تولید مثل ۵

۲-۲- استروژن ۵

۲-۳- آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز ۷

۲-۳-۱- ساختار پروتئینی آنزیم آروماتاز ۸

۲-۳-۲- ژن CYP19 ..... ۹

۲-۳-۳- بیان ژن CYP19 در بافت‌های مختلف ۱۱

۲-۳-۴- پروموتورهای چندگانه و تنظیم بیان ژن CYP19 ..... ۱۲

۲-۳-۵- چند شکلی‌های موجود در ژن CYP19 گاو ۱۳

۲-۴- گیرنده‌های استروژن ۱۴

۲-۴-۱- ساختار پروتئینی گیرنده‌های استروژن ۱۵

۲-۴-۱-۱- مکانیسم عمل گیرنده‌های استروژن ۱۶

۲-۴-۱-۲- تفاوت گیرنده‌های α و β ۱۷

۲-۴-۲- بیان گیرنده‌های استروژن ۱۸

۲-۴-۲-۱- بیان ER در بافت‌های تولید مثلی ۱۸

۲-۴-۲-۲- بیان ER در بافت‌های غیر تولید مثلی ۱۹

۲-۴-۳- ژن گیرنده استروژن α ۲۰

۲-۴-۴- تنظیم بیان ژن ERα ۲۱

۲-۴-۵- چند شکلی در ژن ERα ۲۳

۲-۴-۵-۱- چند شکلی در ژن ERα گاو ۲۴

فصل سوم (مواد و روش‌ها)

۳-۱- جمع آوری نمونه‌های خون ۲۷

۳-۲- استخراج DNA ۲۷

۳-۲-۱- بافرها و محلول‌های مورد استفاده در استخراج DNA ۲۷
۳-۲-۲- مراحل استخراج DNA از نمونه‌های خون ۲۹
۳-۲-۳- ذخیره DNA ۳۰
۳-۲-۴- تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA ۳۰
۳-۲-۴-۱- تعیین کمیت وکیفیت DNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۳۱
۳-۲-۴-۲- تعیین کمیت وکیفیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ۳۲
۳-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) ۳۳
۳-۳-۱- پروتکل و مواد مورد استفاده در PCR ۳۳
۳-۳-۲- چرخه‌های حرارتی PCR ۳۵
۳-۴- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۳۶
۳-۵- هضم آنزیمی محصولات PCR ۳۶
۳-۶- الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی ۳۷
۳-۶-۱- بررسی با ژل آگارز ۳۷
۳-۶-۲- بررسی با ژل پلی اکریل آمید ۳۷
۳-۶-۲-۱- تهیه ژل پلی اکریل آمید و اجرای الکتروفورز ۳۷
۳-۶-۲-۲- رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره ۳۹
۳-۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۴۰
۳-۷-۱- برآورد فراوانی‌های ژنوتیپی وآللی ۴۰
۳-۷-۲- بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی و صفات مورد مطالعه ۴۱
۳-۷-۲-۱- تجزیه و تحلیل اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفات تولید مثلی ۴۱
۳-۷-۲-۲- تجزیه و تحلیل اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفات تولیدی ۴۳

فصل چهارم (نتایج)

۴-۱- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۵
۴-۲- شناسایی چند شکلی در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه ۴۵
۴-۲-۱- شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنی CYP19 ..... ۴۵
۴-۲-۲- شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنی ERα ۴۶
۴-۳- برآورد فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی ۴۸
۴-۳-۱- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مربوط به جایگاه ژنی CYP19 ..... ۴۸
۴-۳-۲- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مربوط به جایگاه ژنی ERα ۴۹

۴-۴- تجزیه و تحلیل اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفات تولید مثلی ۵۰
۴-۴-۱- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت روزهای باز ۵۱
۴-۴-۲- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت فاصله گوساله زایی ۵۲
۴-۴-۳- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت روزهای خشک ۵۳
۴-۴-۴- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت سن اولین زایش ۵۴
۴-۴-۵- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی ۵۵
۴-۴-۶- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت طول آبستنی ۵۶
۴-۴-۷- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت وزن تولد گوساله ۵۷
۴-۴-۸- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت سهولت زایش ۵۸
۴-۵- تجزیه و تحلیل اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفات تولیدی ۵۹
۴-۵-۱- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت تولید شیر ۶۱
۴-۵-۲- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت درصد چربی شیر ۶۱
۴-۵-۳- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت تولید چربی شیر ۶۲
۴-۵-۴- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت درصد پروتئین شیر ۶۳
۴-۵-۵- بررسی اثر ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی بر صفت تولید پروتئین شیر ۶۳

فصل پنجم (بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها)

۵-۱- بحث ۶۶
۵-۱-۱- جایگاه ژنی CYP19 ..... ۶۶
۵-۱-۲- جایگاه ژنی ERα ۷۰
۵-۲- نتیجه گیری ۷۴
۵-۳- پیشنهادها ۷۶

منابع ۷۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- مواد تشکیل دهنده بافر جدا کننده ۲۷

جدول ۳-۲- مواد تشکیل دهنده بافر لیز کننده ۲۸

جدول ۳-۳- مواد تشکیل دهنده یک لیتر بافر TBE(10X) ۳۱

جدول ۳-۴- توالی آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα ۳۳

جدول ۳-۵- مواد لازم برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ۳۴

جدول۳-۶- درجه حرارت و زمان بهینه شده در مراحل مختلف واکنش PCR برای ژن CYP19 ..... ۳۵

جدول۳-۷- درجه حرارت و زمان بهینه شده در مراحل مختلف واکنش PCR برای ژن ERα ۳۵

جدول ۳-۸- مواد مورد نیاز برای هضم آنزیمی محصولات PCR ۳۶

جدول ۳-۹- مواد لازم برای تهیه ژل پلی اکریل آمید ۳۷

جدول ۳-۱۰- مواد لازم برای تهیه محلول تثبیت کننده ۳۸

جدول ۳-۱۱- مواد لازم برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی ۳۹

جدول ۳-۱۲- مواد لازم برای تهیه محلول ظاهرسازی ۳۹

جدول ۴-۱- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جایگاه ژنی CYP19 ..... ۴۸

جدول ۴-۲- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جایگاه ژنی ERα ۴۹

جدول ۴-۳- توصیف آماری صفات تولید مثلی ۵۰

جدول ۴-۴- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت روزهای باز ۵۱

جدول ۴-۵- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنیCYP19 و ERα برای صفت روزهای باز ۵۱

جدول ۴-۶- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت فاصله گوساله زایی ۵۲

جدول ۴-۷- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت فاصله گوساله زایی ۵۲

جدول ۴-۸- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت روزهای خشک ۵۳

جدول ۴-۹- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت روزهای خشک ۵۳

جدول ۴-۱۰- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت سن اولین زایش ۵۴

جدول ۴-۱۱- میانگین و انحراف استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت سن اولین زایش ۵۴
جدول ۴-۱۲- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی ۵۵
جدول ۴-۱۳- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت تعداد تلقیح به ازای آبستنی ۵۵
جدول ۴-۱۴- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت طول آبستنی ۵۶
جدول ۴-۱۵- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت طول آبستنی ۵۶
جدول ۴-۱۶- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت وزن تولد گوساله ۵۷
جدول ۴-۱۷- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت وزن تولد گوساله ۵۷
جدول ۴-۱۸- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفت سهولت زایش ۵۸
جدول ۴-۱۹- توصیف آماری صفات تولیدی ۵۹
جدول ۴-۲۰- نتیجه آزمون معنی داری اثر عوامل مورد بررسی بر صفات تولیدی ۶۰
جدول ۴-۲۱- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت تولید شیر بر حسب کیلوگرم ۶۱
جدول ۴-۲۲- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت درصد چربی شیر ۶۲
جدول ۴-۲۳- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت تولید چربی شیر بر حسب کیلوگرم ۶۲
جدول ۴-۲۴- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت درصد پروتئین شیر ۶۳
جدول ۴-۲۵- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد مربوط به ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه‌های ژنی CYP19 و ERα برای صفت تولید پروتئین شیر بر حسب کیلوگرم ۶۴

فهرست نگاره‌ها

عنوان **صفحه**

نگاره ۲-۱- تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها توسط آنزیم آروماتاز ۸

نگاره ۲-۲- ساختار ژن CYP19 گاو و چهار واریته رونوشت از این ژن ۱۰

نگاره ۲-۳- ساختار ژنومی ناحیه پروموتور ژن ERα انسان ۲۱

نگاره ۴-۱- نمونه‌ای از DNA استخراج شده ۴۵

نگاره ۴-۲- محصولات PCR مربوط به ژن CYP19 ..... ۴۵

نگاره ۴-۳- محصولات هضم آنزیمی جایگاه CYP19/PvuII ۴۶

نگاره ۴-۴- محصولات PCR مربوط به ژن ERα ۴۷

نگاره ۴-۵- محصولات هضم آنزیمی جایگاه ERα/SnaBI ۴۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

درآمد صنعت پرورش گاو شیری به طور عمده حاصل از صفات تولیدی است. به همین دلیل این صفات در اهداف اصلاح نژاد مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های گذشته مقدار تولید شیر در ۳۰۵ روز معیار اصلی انتخاب در گاو شیری بوده است. با این وجود، سود آوری گاوها تابع تولید شیر در هر زایش، سن زایش اول و فاصله دو زایش می‌باشد (۲).

با توجه به انتخاب دام‌ها برای افزایش تولید شیر، یک روند ژنتیکی منفی در صفات باروری به دلیل همبستگی ژنتیکی نامطلوب بین این صفات و تولید شیر مورد انتظار می‌باشد (۱، ۶ و ۵۵). پژوهش‌های انجام شده، کاهش یک درصدی نرخ آبستنی در اولین تلقیح را در هر سال نشان می‌دهد. عملکرد ضعیف تولید مثلی یکی از مشکلات عمده واحدهای دامپروری می‌باشد. به طوری که مهمترین علل حذف گاوها در شکم‌های اول و دوم، باروری ضعیف، افزایش روزهای باز و کاهش نرخ آبستنی می‌باشد (۱ و ۳).

از آنجا که صفات تولید مثلی در اقتصاد دامداری اهمیت بسزایی دارند، انجام پژوهش‌هایی روی این نوع صفات به ویژه در دام‌های پر تولید کشور، برای رسیدن به نتایج مطلوب‌تر ضروری به نظر می‌رسد (۱). بهبود صفات باروری منجر به کاهش تعداد تلقیح به ازای آبستنی و در نتیجه کاهش هزینه‌های دامپزشکی می‌شود. به این ترتیب هزینه‌های مربوط به جایگزین کردن دام‌ها نیز کاهش می‌یابد. لذا با توجه به همبستگی نامطلوب بین صفات تولیدی و تولید مثلی، در برنامه‌های اصلاح نژادی باید صفات مذکور به طور همزمان مورد توجه قرار گیرند (۲ و ۱۱).

اگرچه اکثر صفات تولید مثلی اصولا تحت تاثیر عملکردهای مدیریتی و دیگر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند، اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی معنی‌داری در باروری گاوهای ماده وجود دارد که در این صورت پیشرفت در عملکرد تولید مثلی، از راه برنامه‌های انتخاب ژنتیکی نیز امکان پذیر خواهد بود (۸۲). راهکارهای ژنتیکی که می‌توان برای بهبود عملکرد تولید مثلی پیشنهاد داد عبارتند از: شاخص انتخاب، انتخاب داخل نژادی، بهبود تداوم شیردهی، آمیخته‌گری و انتخاب ژنومیکس (۱).

به دلیل وراثت پذیری کم صفات تولید مثلی، استفاده از روش‌های سنتی اصلاح نژاد برای بهبود این صفات چندان کارآمد نیست. تکنیک انتخاب به کمک نشانگر[1] (MAS) راه حل بسیار مطلوبی برای افزایش پیشرفت ژنتیکی می‌باشد (۶۵ و ۸۶). به ویژه در مورد صفاتی با وراثت‌پذیری کم و یا اندازه‌گیری مشکل، صفات محدود به جنس و صفاتی که در ابتدای زندگی بروز نمی‌کنند، انتخاب به کمک نشانگرها بسیار موفق بوده است (۴۳، ۴۴ و ۶۵).

یکی از روش‌های تشخیص عوامل ژنتیکی مؤثر بر صفات کمی، بررسی چند شکلی ژن کاندیدا به عنوان نشانگر است که محصول آن (مثل هورمون‌ها) در فرایندهای فیزیولوژیک که باعث بیان یک صفت کمی می‌شوند، شرکت می‌کنند (۸۶). تا کنون تعداد کمی نشانگرهای ژنتیکی در ارتباط با صفات تولید مثلی شناخته شده‌اند که می‌توانند در کنار روش‌های انتخاب کلاسیک به کار گرفته شوند. بنابراین جستجو برای چنین نشانگرهایی، هم برای اهداف پژوهشی و هم برای اهداف کاربردی ضروری است (۶۵).

در همه پستانداران، چرخه تولید مثلی جنس ماده اساسا توسط استروژن تنظیم می‌شود (۲۷ و ۶۵). استروژن مهمترین هورمون موثر بر رشد، تمایز و عملکرد بافت‌های تولید مثلی مانند تخمدان، رحم، واژن و غده‌های پستانی می‌باشد (۸۶). بنابراین آنزیم‌های کلیدی در سنتز استروژن و نیز پروتئین‌هایی که عملکرد آن را واسطه‌گری می‌کنند، می‌توانند به عنوان نشانگرهای احتمالی هم برای صفات تولیدی و هم برای صفات تولید مثلی محسوب شوند (۳۱ و ۶۵ و ۶۹). پژوهش حاضر به منظور شناسایی چند شکلی در ژن‌های سیتوکروم P450 آروماتاز و گیرنده استروژن α و ارتباط آن‌ها با برخی صفات تولیدی و تولید مثلی در گاو نژاد هلشتاین انجام شد.

1. Marker assisted selection

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- تولید مثل

بهبود ژنتیکی صفات تولید مثلی در گاوهای شیری برای دست یابی به راندمان بالای تولید شیر ضروری است (۶۵). عملکرد تولید مثلی گاوهای شیری شامل جنبه‌های مختلف بسیاری بوده و حاصل اثرات متقابل و پیچیده ژنتیک و محیط می‌باشد (۱). انتخاب یک روش مناسب برای مدیریت تولید مثل و فاکتورهای موثر بر آن یکی از سخت‌ترین جنبه‌های کار پرورش و اصلاح نژاد می‌باشد (۶۵).

تلاش برای رسیدن به اهداف تولید مثلی با رسیدن به حداکثر تولید شیر در هر روز از عمر تولیدی دام، کاهش هزینه‌های تغذیه و مدیریت و نیز افزایش تعداد گوساله‌های متولد شده از هر گاو همراه است. عملکرد تولید مثلی نامناسب از مهم ترین علل کاهش تولید در گله‌های شیری می‌باشد. عوامل متعددی از پیشرفت عملکرد تولید مثلی جلوگیری می‌کنند. ناباروری ممکن است به دلیل مرگ زودرس رویان، بیماری-های تخمدانی، تشخیص نادرست فحلی و غیره رخ دهد (۶۵ و ۸۵).

از آن جایی که تولید مثل و تولید ارتباط بسیار نزدیکی دارند، بنابراین همه فرآیندهای فیزیولوژیک و نیز هورمون‌هایی که صفات مربوط به باروری را کنترل می‌کنند، شیردهی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند. یکی از این هورمون‌های وسیع الطیف استروژن می‌باشد (۴۲). اثرهای بیولوژیک استروژن در بافت‌های مختلف بدن پستانداران برای فرایندهای فیزیولوژیک متعدد ضروری است (۲۵).

۲-۲- استروژن

استروژن یک هورمون استروئیدی جنسی است که برای کارایی تولید مثلی و بروز صفات ثانویه جنس ماده ضروری است. پارامترهای مختلف باروری، شامل شکل‌گیری و رشد فولیکول‌ها، بلوغ تخمک‌ها، رشد و تمایز سلول‌های اندومتر و نگهداری آبستنی تحت تاثیر استروژن صورت می‌گیرد (۲۷). این هورمون نقش اصلی را در فیزیولوژی طبیعی پس از تولد و نیز بیماری شناسی اندام‌های تولید مثلی جنس ماده ایفا می‌کند (۶۹).

تولید چرخه‌ای استروژن، عامل کلیدی در تنظیم دقیق فرآیندهای تولید مثلی، از تکامل فولیکول تا لقاح، جایگزینی رویان و تکامل آن است. این وضعیت چرخه‌ای هورمون‌های استروییدی جنسی، حاصل از تغییرات چرخه‌ای گونادوتروپین‌های هیپوفیز و همچنین بازتابی از تغییر حساسیت هیپوفیز به GnRH[1] و احتمالاً تغییرات پالسی تولید GnRH از هیپوتالاموس است (۵۸).

استروژن رشد پیوسته‌ی مایومتریوم رحم را در طول آبستنی تحریک می‌کند و آن را برای نقش مهمش در حفظ جنین آماده می‌کند. استروژن همراه با ریلاکسین باعث شل شدن لیگامنت‌های لگن می‌شود و نیز باعث افزایش آزادسازی پروستاگلندین‌ها ($PGF_{2\alpha}$) و افزایش گیرنده‌های اکسی توسین در رحم می‌شود که هر دوی این‌ها نقش مهمی در انقباضات رحم در هنگام زایمان دارند (۴۶، ۵۴ و ۸۴).

استروژن در جنس ماده و قبل از بلوغ، همراه با پروژسترون، کورتیزول، پرولاکتین، هورمون رشد و فاکتورهای رشد مثل IGF-I[2]، به تکثیر سلول‌ها و انشعاب مجاری شیری پستان کمک می‌کند (۴۶)، در طول بلوغ، رشد و بلوغ اسکلتی و بافت‌های ضمیمه تولید مثلی را تحریک می‌کند و در دوران آبستنی باعث تکامل آلویول‌ها می‌شود (۸۶).

سیگنال استروژن برای اسپرم سازی و همچنین بروز رفتارهای جفت‌گیری در جنس نر لازم است (۲۷ و ۴۷). نقص در گیرنده استروژن در لوله تولید مثلی موش‌های نر، باعث عدم بازجذب مایع لومینال در بیضه و اپیدیدیمیس شده، نقص در عملکرد اسپرم و کاهش معنی‌دار وزن بیضه و ناباروری را به همراه دارد (۲۴).

استروژن فزون بر تنظیم فعالیت‌های تولید مثلی، اثرهای فیزیولوژیک مختلفی بر سیستم اعصاب مرکزی، سیستم ایمنی، سیستم قلبی عروقی، متابولیسم چربی و استخوان و همچنین ایجاد سرطان دارد (۲۷ و ۶۳). در بافت‌های غیر گنادی و نیز بافت‌های سرطانی وابسته به استروژن، مثل سرطان پستان، رحم و پروستات، استروژن به عنوان یک فاکتور پاراکراین یا حتی اینتراکراین عمل می‌کند (۶۳).

1. Gonadotropin Releasing Hormone
2. Insulin- Like Growth Factor-I

آنزیم کلیدی در تولید استروژن، سیتوکروم P450 آروماتاز[1] است (۷۷). این آنزیم باعث آروماتیزاسیون آندروژن‌ها به استروژن‌ها می‌شود (۳۰). سلول‌های گرانولوزای تخمدان و جفت، منشا اصلی هورمون‌های استروژنی هستند (۷۴). مهمترین هورمون استروژنی از نظر کمی و فیزیولوژیک، ۱۷- بتا استرادیول است. استرون و استریول از دیگر هورمون‌های استروژنی مهم هستند (۲۷).

۲-۳- آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز

تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها توسط کمپلکس آنزیمی p450 آروماتاز کاتالیز می‌شود. این کمپلکس آنزیمی از دو پروتئین فلاووپروتئین ردوکتاز میکروزومی و هموگلیکوپروتئین (سیتوکروم P450 آروماتاز) تشکیل شده است (۶۵). آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز عضوی میکروزومی از ابرخانواده سیتوکروم P450 (به اختصار CYP) و تنها عضو خانواده ۱۹ (CYP19A1) می‌باشد (۶۳).

ابرخانواده سیتوکروم P450 گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم‌ها را شامل می‌شود که در متابولیسم کلسترول، هورمون‌های استروئیدی و سایر لیپیدها و حتی داروها نقش دارند. آنزیم‌های CYP پروتئین‌هایی دارای گروه هم هستند که واکنش‌های مونواکسیژناسیون را کاتالیز می‌کنند. موقعیت سلولی این آنزیم‌ها غشای داخلی میتوکندری و یا شبکه اندوپلاسمی می‌باشد ولی اغلب بخشی از زنجیره انتقال الکترون را تشکیل می‌دهند (۱۴).

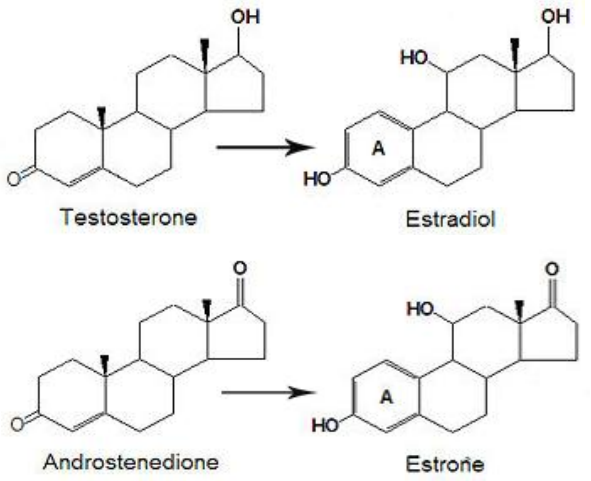
بر خلاف بسیاری از آنزیم‌های CYP که چندین سوبسترا را متابولیزه می‌کنند، آنزیم آروماتاز یک جایگاه فعال ویژه برای آندروژن دارد (۲۲). این آنزیم در بسیاری از بافت‌ها از جمله تخمدان، جفت، بیضه، مغز، غده‌های آدرنال و بافت چربی یافت می‌شود (۳۱ و ۷۹).

1. Cytochrome P450 aromatase

۲-۳-۱- ساختار پروتئینی آنزیم آروماتاز

آنزیم آروماتاز از یک گروه هم و یک زنجیره پلی پپتیدی (در انسان به طول ۵۰۳ آمینو اسید) تشکیل شده است. ساختار آروماتاز انسان شامل ۱۲ مارپیچ آلفای اصلی و ده زنجیره بتا که در یک صفحه اصلی و سه صفحه فرعی توزیع شده‌اند، می‌باشد. صفحه بتای اصلی متشکل از چهار زنجیره است که از نزدیکی انتهای آمینی آغاز می‌شود. هر یک از صفحات بتای فرعی شامل دو زنجیره غیر موازی می‌باشند که در سرتاسر زنجیره پلی پپتیدی پراکنده شده‌اند. آمینو اسیدهای آرژنین ۱۱۵، تریپتوفان ۱۴۱، آرژنین ۱۴۵، آرژنین ۳۷۵ و آرژنین ۴۳۵ با گروه هم پیوند کوئوردینانسی تشکیل می‌دهند (۲۲).

جایگاه فعال آنزیم آروماتاز دارای یک هِم است که در وسط آن یون آهن وجود دارد. یون آهن به وسیله زنجیره جانبی آمینو اسید سیستئین به زنجیره پلی پپتیدی متصل می‌شود (۵۱). آنزیم آروماتاز از راه اکسیداسیون و سپس حذف گروه متیل ۱۹، باعث تغییر شکل حلقه A آندروژن‌ها به وضعیت آروماتیک می‌شود و به این ترتیب، همان طور که در نگاره ۲-۱ نشان داده شده است، تستوسترون و اندروستین‌دایون را به ترتیب به استرادیول و استرون تبدیل می‌کند (۲۲).



نگاره ۲-۱- تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها توسط آنزیم آروماتاز

۲-۳-۲- ژن CYP19

آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز توسط ژن CYP19 کد می‌شود (۶۲). ویژگی بارز این ژن، استفاده از پروموتورهای مختلف در بیان اختصاصی بافت‌ها، با مکانیسم آلترنیتیو اسپلایسینگ[1] است (۳۳ و ۷۹). این مکانیسم باعث می‌شود که در بافت‌های مختلف، رونوشت‌هایی با نواحی غیر قابل ترجمه '۵[2] (5'UTRs) متفاوت تولید شود. وجود نواحی پروموتور مختلف و در نتیجه اگزون‌های اول آلترنیتیو[3]، الگوی پیچیده بیان ژن CYP19 را توضیح می‌دهد (۳۳ و ۶۳ و ۷۴).

نخستین بار در انسان مشخص شد که بیان ژن CYP19 توسط نواحی پروموتور مختلف تنظیم می‌شود (۳۶). این ژن در انسان روی کروموزوم شماره ۱۵ واقع شده است و ناحیه‌ای به طول ۱۲۳ کیلو جفت باز را در بر می‌گیرد (۳۴). ناحیه کد کننده این ژن شامل ۹ اگزون است که از اگزون II شروع می‌شود. در بالادست اگزون II شش ناحیه پروموتور وجود دارد که این پروموتورها متناظر با اگزون‌های اول آلترنیتیو می‌باشند و هر یک در بافت ویژه‌ای فعال هستند (۶۳). برای مثال پروموتور دیستال I.1 در جفت فعال است و باعث تولید رونوشت‌هایی می‌شود که ناحیه '۵ آنها شامل اگزون I.1 است. فعال‌ترین پروموتور در گنادها (تخمدان‌ها و بیضه‌ها) و نیز بافت‌های سرطانی پستان و رحم پروموتور پروگزیمال II است. در سلول‌های چربی و استئوبلاست‌ها نیز بیان ژن CYP19 توسط پروموتور I.4 تنظیم می‌شود (۴۹). همه اگزون‌های اول غیر قابل ترجمه به یک جایگاه پذیرنده اتصال[4] مشترک در اگزون II متصل می‌شوند (۶۳).

ژن CYP19 گاو روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ در موقعیت q2.6 قرار دارد (۶۵). طول کامل این ژن ۱۲۵ کیلو جفت باز است، به طوری که اگزون‌های کد کننده II تا X، ۳۶ کیلو جفت باز و توالی‌های تنظیمی که اگزون‌های غیر کد کننده (1.1، 1.2a، 1.2b، 1.3، 1.4 و 1.5) و پروموتورهای متناظر آنها را شامل می‌شوند، ۸۹ کیلو جفت باز را پوشش می‌دهند. نگاره ۲-۲ ساختار ژن CYP19 گاو را نشان می‌دهد (۷۴).

1. Alternative splicing
2. 5' Untranslated Regions
3. Alternative first exons
4. Splicing acceptor site