

## مطالعه مولکولی، تکاملی و طبقه‌بندی ژن‌های خانواده پروتئین‌های ۷۰ کیلودالتونی شوک گرمایی (Hsp70) در گاو

علی‌اکبر مسعودی<sup>۱\*</sup>، میثاق مریدی<sup>۲</sup>، جواد احمدپناه<sup>۳</sup>، رسول واعظ ترشیزی<sup>۴</sup> و حمیدرضا سیدآبادی<sup>۵</sup>  
۱، ۲، ۳، ۴، استادیار، دانشجویان کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
۵، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، تهران  
(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۵)

### چکیده

پروتئین‌های شوک گرمایی (Hsp) به علت ارتباط با صفات مهم اقتصادی در دام‌ها از قبیل مقاومت به تنش گرمایی و ورم پستان دارای اهمیت هستند. در تحقیق حاضر برای آگاهی از روند تکاملی و بررسی ساختار مولکولی ژن‌های خانواده پروتئین‌های ۷۰ کیلودالتونی (Hsp70)، توالی ژنومی آنها در گاو و موجودات دیگر از بانک اطلاعاتی NCBI به دست آمده و مرتب شدند. سپس محاسبه درصد جایگزینی نوکلئوتیدها با یکدیگر، با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و ترسیم درخت فیلوژنی و تکامل مولکولی به روش neighbor-joining انجام شد. نتایج مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که ژن‌های این خانواده دارای پراکندگی متعدد کروموزومی هستند، که به وجود آورنده نسخه‌های زیادی جهت تظاهر ژنی مورد نیاز برای بروز صفات مرتبط می‌باشند. از طرفی درصد جایگزینی بازهای پیریمیدینی در این خانواده ژنی بسیار بیشتر از میزان جایگزینی بازهای پورینی به پیریمیدین و یا پورین می‌باشد. نسبت‌های  $d_N/d_S$  بیان‌کننده انتخاب خالص و تثبیت آنها در طی تکامل ژن‌های این خانواده می‌باشد. نتایج فیلوژنی نشان می‌دهد که پروتئین‌های خانواده Hsp70 با توجه به مسیر تکاملی خود عمدتاً به دو دسته مجزا تقسیم می‌شوند. در دسته اول پروتئین‌های b و Hsp70 و در دسته دوم دیگر توالی‌های پروتئینی Hsp70 در شاخه‌های متعددی قرار گرفته‌اند.

### واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، انتخاب، توالی، گاو، Hsp70.

#### مقدمه

پروتئین‌های شوک گرمایی<sup>۱</sup> بر اساس وزن مولکولی خود به گروه‌های متعدد با وظایف بیولوژی متفاوت، نظیر Hsp60، Hsp70، Hsp90، Hsp104 و Hsp110 تقسیم‌بندی می‌شوند (Feder & Hofmann, 1999; Schlesinger, 1990). این پروتئین‌ها با افزایش بیان خود باعث حفاظت و نگهداری پروتئین‌های دیگر در طول زمان ساخته شدن و همچنین در شرایط تنش‌زای

محیطی شده و به عنوان مولکول‌های انتقال دهنده پروتئین<sup>۲</sup> عمل می‌کنند (Schlesinger, 1990). Hspها همچنین با ایجاد پیوندهای خارج سلولی، خصوصاً Hsp70 باعث اتصال آنتی‌ژن‌ها و حضور آنها در سیستم ایمنی می‌شوند (Nishikawa et al., 2008). علاوه بر این، بین ژن‌های Hsp70 و ژن‌های کلاس سوم پروتئین‌های مؤثر در سیستم ایمنی<sup>۳</sup> اثرات متقابلی نیز

2. Chaperone

3. Major Histocompatibility Complex

1. Heat Shock Protein

وجود دارد که بیان یکدیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Rehman et al., 2009; Walter et al., 1994). در این میان اهمیت Hsp70 در افزایش وزن و مقاومت به بیماری‌های عفونی (Liew et al., 2003)، رشد و نمو جنین (Neuer et al., 2000) و افزایش مقاومت ژنتیکی حیوانات در دوران بارداری و تولید (Yaniz et al., 2009) (Al-Aqil & Zulkifli, 2009) مشخص شده است.

خانواده ژنی Hsp70 دارای تنوع ژنتیکی و عملکردی متفاوتی می‌باشند که این تنوع در نتیجه اشتقاق این ژن‌ها در روند تکامل ایجاد شده است. به عنوان مثال، وقوع تغییرات نوکلئوتیدی مختلف در یکی از اعضاء این خانواده ژنی باعث ایجاد مقاومت ژنتیکی در برابر گرما در گاوهای براهمن نسبت به نژادهای اروپایی شده است و این تفاوت‌ها در سیر تکامل ژنتیکی این نژادها تفرق پیدا کرده‌اند (Lamb et al., 2009). از طرفی بعلاوه تنوع عملکرد این دستجات ژنی، مطالعه آنها در دام و طیور گسترده بوده و وظایف گوناگونی از این ژن‌ها ارائه شده است. برای مثال، گزارش شده است که وقوع جهش‌هایی در ژن Hsp70 باعث بروز دیستروفی عضلانی دیافراگم در گاوهای هلشتاین شده است (Sugimoto et al., 2003). همچنین وقوع تغییری در لوکوس ۱۶۲۳ ژن Hsp70 در روند تکامل آن در گاوهای هلشتاین چین، منجر به کاهش شمار سلول‌های بدنی<sup>۱</sup> در این دام‌ها و مقاومت بیشتر این دام‌ها به ورم پستان شده است (Wei-Jie et al., 2009). همچنین وقوع تغییرات در نواحی بالادست ژن Hsp70 در طیور گوشتی، که منجر به ایجاد آلل مرتبط با مقاومت گرمایی می‌شود، نیز گزارش شده است (Mazzi et al., 2003). بیان زیاد ژن Hsp70 در شرایط دمایی بالا در گاو میش باعث القاء مقاومت به این شرایط سخت دمایی و حفظ حیات سلول می‌شود که این افزایش بیان خصوصاً در لئفوسیت‌ها، که مستقیماً با سیستم ایمنی بدن در ارتباط هستند، دیده می‌شود. مقدار Hsp70 تولید شده در لئفوسیت‌ها به میزان استرس وارد شده و طول مدت استرس بستگی دارد، که این مسئله قدرت بالای سازگاری گاو میش‌ها در این شرایط محیطی را نشان می‌دهد (Patir &

وجود دارد که بیان یکدیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Rehman et al., 2009; Walter et al., 1994). در این میان اهمیت Hsp70 در افزایش وزن و مقاومت به بیماری‌های عفونی (Liew et al., 2003)، رشد و نمو جنین (Neuer et al., 2000) و افزایش مقاومت ژنتیکی حیوانات در دوران بارداری و تولید (Yaniz et al., 2009) (Al-Aqil & Zulkifli, 2009) مشخص شده است.

خانواده ژنی Hsp70 دارای تنوع ژنتیکی و عملکردی متفاوتی می‌باشند که این تنوع در نتیجه اشتقاق این ژن‌ها در روند تکامل ایجاد شده است. به عنوان مثال، وقوع تغییرات نوکلئوتیدی مختلف در یکی از اعضاء این خانواده ژنی باعث ایجاد مقاومت ژنتیکی در برابر گرما در گاوهای براهمن نسبت به نژادهای اروپایی شده است و این تفاوت‌ها در سیر تکامل ژنتیکی این نژادها تفرق پیدا کرده‌اند (Lamb et al., 2009). از طرفی بعلاوه تنوع عملکرد این دستجات ژنی، مطالعه آنها در دام و طیور گسترده بوده و وظایف گوناگونی از این ژن‌ها ارائه شده است. برای مثال، گزارش شده است که وقوع جهش‌هایی در ژن Hsp70 باعث بروز دیستروفی عضلانی دیافراگم در گاوهای هلشتاین شده است (Sugimoto et al., 2003). همچنین وقوع تغییری در لوکوس ۱۶۲۳ ژن Hsp70 در روند تکامل آن در گاوهای هلشتاین چین، منجر به کاهش شمار سلول‌های بدنی<sup>۱</sup> در این دام‌ها و مقاومت بیشتر این دام‌ها به ورم پستان شده است (Wei-Jie et al., 2009). همچنین وقوع تغییرات در نواحی بالادست ژن Hsp70 در طیور گوشتی، که منجر به ایجاد آلل مرتبط با مقاومت گرمایی می‌شود، نیز گزارش شده است (Mazzi et al., 2003). بیان زیاد ژن Hsp70 در شرایط دمایی بالا در گاو میش باعث القاء مقاومت به این شرایط سخت دمایی و حفظ حیات سلول می‌شود که این افزایش بیان خصوصاً در لئفوسیت‌ها، که مستقیماً با سیستم ایمنی بدن در ارتباط هستند، دیده می‌شود. مقدار Hsp70 تولید شده در لئفوسیت‌ها به میزان استرس وارد شده و طول مدت استرس بستگی دارد، که این مسئله قدرت بالای سازگاری گاو میش‌ها در این شرایط محیطی را نشان می‌دهد (Patir &

## مواد و روش‌ها

### شناسایی، ویرایش و برآورد پارامترهای ژنتیکی توالی‌های مختلف Hsp70

با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک، که شامل استفاده از BLAST<sup>۲</sup> در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم بود، توالی ژن‌های خانواده Hsp70 در گاو مشخص شد (شماره‌های شناسایی از جدول ۱). برای پیدا کردن توالی این ژن‌ها در موجودات دیگر و مقایسه این توالی‌ها با توالی‌های به دست آمده از گاو، اطلاعات مربوط به توالی خانواده Hsp70 برای سگ، انسان، موش و موش صحرایی نیز با استفاده از روش فوق به دست آمد. مقایسه بین ژن‌های خانواده Hsp70 در توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 (Tamura et al., 2007) انجام شد. برای بررسی نرمال بودن این ژن‌ها و محاسبه برخی از پارامترهای ژنتیکی از قبیل تعداد کل جهش‌های رخ داده، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاههای Indel<sup>۳</sup> و تنوع آنها از نرم‌افزار DnaSP (Librado and Rozas, 2009)، استفاده شد.

### ارزیابی توالی‌ها، آنالیز فیلوژنی و تعیین مسیر تکاملی ژن‌ها

توالی پروتئینی هر کدام از اعضاء خانواده‌های ژنی با

2. Basic Local Alignment Search Tool

3. Insertion/Deletion

1. Somatic Cell Score

واریانس مقادیر  $d_N$  و  $d_S$  از روابط ۴ و ۵ محاسبه شدند (Nei & Kumar, 2000):

$$V(d_N) = \frac{P_N * (1 - P_N)}{\left[ \left(1 - \frac{4}{3} P_N\right)^2 S \right]} \quad (4)$$

$$V(d_S) = \frac{P_S * (1 - P_S)}{\left[ \left(1 - \frac{4}{3} P_S\right)^2 S \right]} \quad (5)$$

در این روابط؛  $N$ ، تعداد جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه در یک توالی و  $S$ ، تعداد جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه در یک توالی هستند.

معنی‌دار بودن نسبت فوق با استفاده از آزمون فیشر<sup>۷</sup> در سطح احتمال ۰/۰۵ محاسبه گردید. همچنین دسته‌بندی این توالی‌ها براساس انواع Hsp70های موجود و انواع شاخه‌های موجود در هر Hsp70 صورت گرفت.

**شناسایی بخش‌های مختلف پروتئینی<sup>۸</sup> خانواده ژنی Hsp70**

بخش‌های مختلف پروتئینی که نقش‌های عملکردی برای پروتئین‌های خانواده Hsp70 دارند در توالی‌های ژنی مورد مطالعه تقریباً مشابه هستند. بخش‌های مختلف پروتئینی Hsp70ها با مقایسه توالی cDNA ژن Hsp70a1a و دسته‌های ژنی آنها در حیوانات مختلف به دست آمدند.

## نتایج و بحث

### توالی‌های خانواده ژنی Hsp70

همان‌طور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر گردید، توالی‌های Hsp70 گاو و موجودات دیگر به دست آمد. مشخصات کلی توالی‌های Hsp70 گاو در جدول ۱ ارائه شده است. بطوری‌که ملاحظه می‌شود، این خانواده ژنی به اعضاء متعدد ژنی تقسیم‌بندی می‌شوند. این تعداد نشان می‌دهد که این توالی‌ها در گاو دارای پراکندگی زیاد می‌باشند. چنین پراکندگی در سایر موجودات نیز مشاهده شده است. بر خلاف گزارش Grosz et al. (1992) که فقط ۳ عضو برای این دسته ژنی پیش‌بینی شده بود، بررسی بانک‌های اطلاعاتی بیولوژی نشان

استفاده از توالی نوکلئوتیدی آنها و بوسیله نرم‌افزار MEGA4 به دست آمدند. جهت مقایسه توالی‌ها، آنالیز فیلوژنی و ترسیم درخت فیلوژنی از نواحی کدکننده از نرم‌افزارهای فوق استفاده شد. ترسیم درخت فیلوژنی با روش NJ<sup>۱</sup> و با استفاده از رابطه ۱ انجام گرفت:

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k) \quad (1)$$

در این رابطه؛  $d(i, j)$ : فاصله بین شاخه  $i$  و  $j$ ؛  $k$ : شاخه  $k$  ام درخت،  $r$ : تعداد کل شاخه‌ها و  $Q(i, j)$ : مقدار عددی شاخه‌های  $i$  و  $j$  می‌باشند. مقادیر  $Q$  برای ترسیم ماتریسی به کار می‌رود که در این ماتریس تمامی شاخه‌ها آورده شده و کوچکترین عددی که نشان‌دهنده شباهت بالای دو شاخه می‌باشد، انتخاب و در یک انشعب از درخت فیلوژنی به کار می‌روند. ارزش‌های Bootstrap با استفاده از ۱۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمده‌اند. در این مطالعه از حداکثر درست‌نمایی<sup>۲</sup>، که برای به دست آوردن نرخ جانمایی<sup>۳</sup> به جایگزینی<sup>۴</sup> نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی برای ژن‌های پستانداران بکار برده می‌شود، استفاده گردید (Tamura et al., 2007).

جهت بررسی روند انتخاب در طول تکامل برای ژن‌های خانواده Hsp70 نیز از بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند  $d_N$  نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند  $d_S$  (۶)  $(d_N/d_S)$ ، استفاده گردید. این مقادیر با استفاده از روابط ۲ و ۳ محاسبه شدند (Nei & Kumar, 2000):

$$d_N = -\frac{3}{4} \ln\left(1 - \frac{4}{3} P_N\right) \quad (2)$$

$$d_S = -\frac{3}{4} \ln\left(1 - \frac{4}{3} P_S\right) \quad (3)$$

در این روابط؛  $P_N$ ، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و  $P_S$ ، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند.

1. Neighbor-Joining
2. Maximum Composite Likelihood
3. Transition
4. Transversion
5. Nonsynonymous
6. Synonymous

7. Fisher's Exact Test of Neutrality

8. Domain

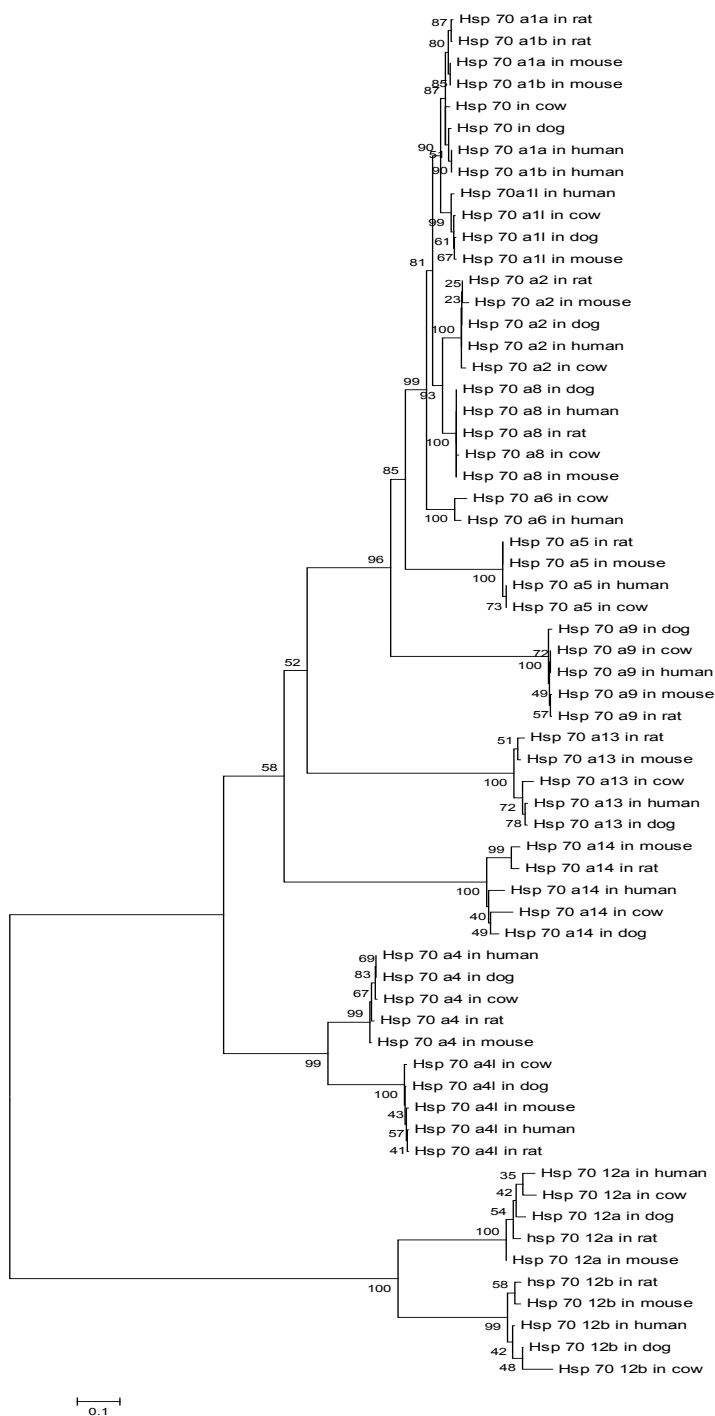
تک اگزونی معمولاً در بیشتر گونه‌های حیوانی دیده می‌شود. توالی ژن‌های Hsp70 a4، Hsp70 a1، Hsp70 a9 و Hsp70 a14 در همه موجودات در بر گیرنده تعداد زیادی اگزون می‌باشد. از طرفی اغلب ژن‌های Hsp70 12a و Hsp70 12b در همه موجودات مورد بررسی دارای تعداد زیادی اگزون هستند، که نشان‌دهنده تغییرات متعددی است که در طول تکامل باعث تبدیل نواحی دیگر ژنی به نواحی کد کننده شده است. این تغییر ساختار ژنی می‌تواند باعث عملکرد جدیدی در این ژن‌ها شود که با اضافه شدن دومین‌های خاص همراه می‌باشد. طول نواحی ژنومی ژن‌های خانواده Hsp70 از ۱/۳ تا ۷/۵ کیلو باز متغیر بوده و غالباً کدکننده اسیدآمینو متیونین در آغاز زنجیره و اسیدآمینو آسپارتیک در انتهای زنجیره می‌باشد. مقایسه نواحی کدکننده توالی‌های به دست آمده بین موجودات نشان داد که این دسته ژنی جزء ژن‌های اورتولوگ هستند که از منشأ اولیه یکسانی منشعب شده‌اند (شکل ۱). مقایسات توالی‌ها با یکدیگر نشان می‌دهد که بیشترین شباهت توالی بین Hsp70 a1a و Hsp70 a1b در انسان (۹۹/۷۴ درصد) و کمترین شباهت توالی بین Hsp70 a13 و Hsp70 12b در موش صحرایی (۴۱/۹۱ درصد) بود. این در حالی است که حداکثر شباهت بین اعضاء خانواده ژنی برای انسان (۵۴/۴۶ درصد) و کمترین شباهت برای سگ (۵۰/۱۷ درصد) بود و این مقدار برای اعضاء این خانواده ژنی در گاو ۵۲/۱۲ درصد محاسبه شد.

می‌دهد که حداقل ۱۳ عضو از خانواده ژنی Hsp70 در گاو وجود دارد. ژن‌های این خانواده در سراسر ژنوم پراکنده شده و روی کروموزوم‌های متعددی قرار گرفته‌اند. متعدد بودن نسخه‌های ژنی می‌تواند به علت تنوع وظایف بیولوژیک این خانواده ژنی باشد و بنابراین می‌تواند جبران تظاهر ژنی مورد نیاز برای بروز صفت خاص را فراهم آورد (Tavaria et al., 1996). از طرفی شواهد نشان می‌دهند که برخی از اعضاء خانواده ژن‌های Hsp70 در انسان درون ژن‌های MHC قرار گرفته‌اند که به صورت جایگاه‌های ژنی دو نسخه شده<sup>۱</sup> می‌باشند (Rehman et al., 2009; Walter et al., 1994). این هم‌جواری با دستجات ژنی فوق باعث مرتبط شدن برخی از عناصر کنترل ژنی در این دو دسته ژن‌ها شده و وظایف مشابه با دسته ژن‌های MHC را داشته باشند (Nishikawa et al., 2008). این پراکندگی و هم‌جواری با ژن‌های مختلف دیگر نشان‌دهنده تعامل این دسته ژنی با ژن‌های دیگر می‌باشد، چرا که در انتقال مواد ژنتیکی به نتاج، ژن‌های مختلف هم‌جوار توأماً به صورت پیوسته منتقل می‌شوند و احتمال وقوع نوترکیبی بین این دستجات مرتبط بسیار اندک است. همچنین نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که این خانواده‌های ژنی از توالی‌های تک اگزونی و یا به عبارتی فاقد اینترون تا توالی‌های دارای ۱۸ اگزون تشکیل شده‌اند. توالی‌های

1. Duplicated

جدول ۱- مشخصات توالی‌های بررسی شده خانواده ژنی Hsp70 در گاو

ژن	شماره شناسایی	کروموزم	شروع ژن	پایان ژن	اندازه ژن (bp)	رشته	تعداد اگزون
Hsp 70a2	L10428.1	۱۰	۷۸۸۷۸۸۱۶	۷۸۸۸۰۱۲۶	۱۳۱۰	+	۱
Hsp 70	NM_174550.1	۲۳	۲۳۴۳۸۲۵۶	۲۳۴۴۰۳۳۵	۲۰۷۹	+	۱
Hsp 70 a6	XM_589747.3	۳	۸۷۴۸۷۱۱	۸۷۵۰۹۲۰	۲۲۰۹	-	۱
Hsp 70 12a	XM_591176.4	۲۶	۳۷۴۶۶۰۰۰	۳۷۵۴۱۸۷۸	۷۵۸۷۸	-	۱۴
Hsp 70 12b	NM_001102027.1	۱۳	۵۲۰۱۴۲۳۷	۵۲۰۳۱۲۰۲	۱۶۹۶۵	-	۱۱
Hsp 70 a11	NM_001167895.1	۲۳	۲۷۳۲۶۶۲۴	۲۷۳۳۰۶۰۸	۳۹۸۴	+	۱
Hsp 70 a4	NM_001114192.2	۷	۴۴۳۲۴۵۳۴	۴۴۳۷۸۵۵۰	۵۴۰۱۶	+	۱۸
Hsp 70 a5	NM_001075148.1	۱۱	۹۹۵۴۳۱۲۲	۹۹۵۴۷۲۸۱	۴۱۵۹	-	۷
Hsp 70 a13	NM_001038505.1	۱	۲۲۵۵۱۴۴۴	۲۲۵۶۱۵۵۷	۱۰۱۱۳	+	۵
Hsp 70 a41	XM_865774.3	۱۷	۳۱۶۶۰۸۲۳	۳۱۷۱۷۵۶۶	۵۶۷۴۳	-	۱۸
Hsp 70 a14	NM_0010466388.1	۱۳	۲۹۱۲۸۱۰۸	۲۹۱۵۲۷۰۷	۲۴۵۹۹	+	۱۲
Hsp 70 a8	NM_174345.3	۱۵	۳۲۳۴۸۱۵۰	۳۲۳۵۲۵۷۸	۴۴۲۸	-	۸
Hsp 70 a9	NM_001034524.1	۷	۴۹۲۰۹۹۰۴	۴۹۲۲۵۲۰۴	۱۵۳۰۰	-	۱۷



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک پروتئین‌های خانواده ژنی Hsp70 در گاو و ارتباط آن با دیگر موجودات (۱/۰، نرخ جایگزینی اسیدهای آمینه در هر جایگاه)

جایگاه‌های Indel در این خانواده ژنی ۱۳ مورد بود که به میزان کمتری سبب تغییر ساختارهای پروتئینی در مقایسه با ژن‌های با طول بیشتر شده است. جایگاه‌های Indel دارای عملکردی مهم در هر ژن بوده و به صورت همبسته و گروهی عمل می‌کنند، از سویی این جایگاه‌ها

نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای ژنتیکی نشان می‌دهد که تعداد کل جهش‌هایی که در طول تکامل این ژن‌ها رخ داده ۱۳۵۹ جهش بوده که توزیع آنها در طول ژنوم متفاوت است. این مقادیر برای بازهای پیریمیدین نسبت به بازهای پورینی بیشتر بوده است. تعداد

بررسی وجود نوع انتخاب در مسیر تکاملی خانواده‌های ژنی در جوامع حیوانی می‌باشد. اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر مساوی یک باشد انتخاب خنثی را در روند تکاملی ژن‌ها نشان می‌دهد (Li & Huang, 2007). بررسی نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده وقوع انتخاب خالص در طی تکامل ژن‌های این خانواده می‌باشد (جدول ۲). این نوع انتخاب سبب تثبیت عملکرد این ژن‌ها در طی روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آنها می‌شود. انتخاب خالص سبب وقوع تغییرات در جایگاه‌هایی می‌شود که هیچ تغییری در توالی پروتئینی ژن‌ها حاصل نمی‌کند، اما از طرفی سبب مساعد شدن شرایط برای انتخاب مثبت در مراحل بعدی تکامل می‌شود. پائین بودن نرخ جانشینی به جایگزینی نوکلئوتیدی و وجود بخش‌های پروتئینی حفاظت شده از دلایل وقوع این نوع انتخاب در تکامل این خانواده ژنی می‌باشد. در صورت حذف نواحی پروتئینی حفاظت شده، دقت برآورد انتخاب افزایش می‌یابد (Phuphuakrat & Auewarakul, 2003; Ngandu et al., 2008).

درصد جایگانی نوکلئوتیدهای خانواده ژنی Hsp70 در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی این نتایج نشان می‌دهد که بیشترین نرخ جانشینی مربوط به میزان جانشینی بازهای پیریمیدینی، یعنی تبدیل تیمین به سیتوزین به میزان ۱۵ درصد، و سیتوزین به تیمین به میزان ۱۲/۴۸ درصد می‌باشد. متوسط نرخ جانشینی بازهای پورین ۱۱/۶۳۵ درصد می‌باشد. از طرفی متوسط میزان جایگزینی بازهای پیریمیدین به پورین ۶/۷۳ درصد و پورین به پیریمیدین ۵/۵۸۵ درصد می‌باشد. این میزان جایگانی نوکلئوتیدی با تغییرات موجود در توالی‌های ژنومی، که بیشترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی را جانشینی بازهای پیریمیدین گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. تبدیل نوکلئوتید سیتوزین به تیمین در نواحی مختلف ژنی به خصوص نواحی CpG، که نوکلئوتید سیتوزین در معرض متیله شدن بوده و متعاقباً باعث تبدیل نوکلئوتید گوانین به آدنین در زنجیره مقابل شده، می‌تواند علت این تغییرات باشد (Vignal et al., 2002; Picoult-Newberg et al., 1999).

به بررسی و مطالعه این‌گونه پروتئین‌های ناپایدار در محیط‌های *in vitro* کمک می‌کنند (Shortle & Sondek, 1995).

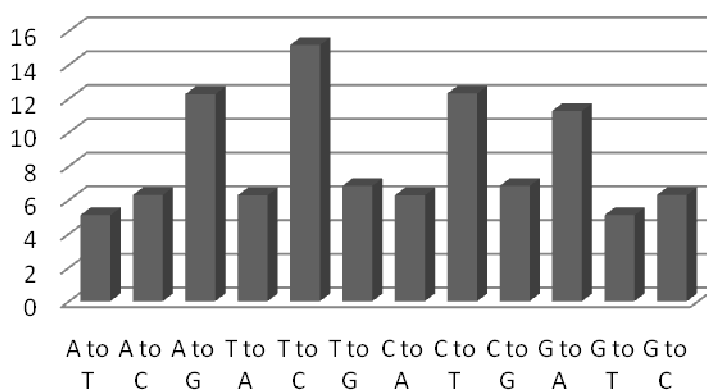
### طبقه‌بندی و تکامل ژنی Hsp70ها

روابط تکاملی توالی‌های پروتئینی خانواده Hsp70 و ترسیم درخت فیلوژنی در شکل ۱ نشان داده شده است. مقادیر بالای Bootstrap که در محل انشعاب شاخه‌ها در درخت مشخص شده است، نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی از اعتماد بالایی برخوردار می‌باشد. با ملاحظه شکل ۱ مشخص می‌شود که پروتئین‌های خانواده Hsp70 با توجه به مسیر تکاملی خود عمدتاً به دو دسته مجزا تقسیم می‌شوند. در دسته اول Hsp70 12a و Hsp70 12b قرار گرفته‌اند. توالی‌های Hsp70 12b در گاو با توالی‌های مشابه در سگ و توالی ژن Hsp70 12a در گاو با توالی مشابه انسان در یک زیر شاخه قرار گرفته‌اند و فاصله بسیار اندکی را با دیگر موجودات دارند. دسته دوم که بیشتر ژن‌های این خانواده را در بر می‌گیرد، به شاخه‌های متعددی تقسیم شده‌اند. در اولین شاخه این دسته به ترتیب Hsp70 a4 و Hsp70 a4l تشکیل دو زیرشاخه خواهری را می‌دهند که فاصله محسوسی بین توالی‌های گاو و دیگر موجودات در این زیر شاخه‌ها دیده نمی‌شود. در شاخه دیگر از این دسته Hsp70 a14 قرار گرفته است. در این شاخه، موش و موش صحرایی در یک زیر شاخه و گاو و سگ به همراه انسان در زیر شاخه‌ای دیگر قرار می‌گیرند. در زیر شاخه دیگر Hsp70 a13 قرار دارد که Hsp70 a13 گاو در زیر شاخه‌ای با فاصله‌ای نزدیک با مشابه خود در سگ و انسان قرار دارد. Hsp70 a9 در شاخه‌ای که با توالی‌های دیگر Hsp70ها قرار گرفته است، یک گروه را تشکیل می‌دهند. Hsp70 a5 هم یک زیر شاخه جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهد که در آن گاو و انسان در یک زیر شاخه و در فاصله‌ای اندکی با موجودات دیگر دیده می‌شوند. بقیه خانواده ژنی Hsp70 در شاخه‌ای مجزایی قرار گرفته‌اند که با تفاوت‌های اندکی نسبت به هم آرایش یافته‌اند. در اغلب این زیر شاخه‌ها توالی‌های ژنی مربوط به گاو شباهت بیشتری را نسبت به انسان نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که منجر به تغییر توالی‌های پروتئینی شود، یک روش ساده برای

جدول ۲- نتایج بررسی روند انتخاب ژن‌های خانواده Hsp70 در طول تکامل

d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub>	d <sub>S</sub> (SE)	d <sub>N</sub> (SE)	p <sub>S</sub>	p <sub>N</sub>	دسته‌های ژنی
۰/۵۲	۰/۰۹۸۱(۰/۰۲)	۰/۰۵۱(۰/۰۴)	۰/۰۹۲	۰/۰۴۹	Hsp70 a1a
*Na	*Na (۰/۱۱)	۰/۰۴۸(۰/۰۴)	۰/۹۰۳	۰/۰۴۶	Hsp70 a1b
۰/۴۴	۰/۲۲(۰/۰۴)	۰/۰۹۸(۰/۰۶)	۰/۱۹۱	۰/۰۹۲	Hsp70 12a
۰/۳۳	۰/۵۱(۰/۰۴)	۰/۱۷۱(۰/۰۶)	۰/۲۳۵	۰/۱۵۳	Hsp70 12b
۰/۱۳	۰/۱۶۹(۰/۰۳)	۰/۰۲۲(۰/۲۷)	۰/۱۵۲	۰/۰۲۲	Hsp70 a2
۰/۴۳	۰/۲۴(۰/۰۲)	۰/۰۷۴(۰/۰۴)	۰/۱۵۴	۰/۰۷۱	Hsp70 a4
۰/۱۷	۰/۱۴۱(۰/۰۲)	۰/۰۲۴(۰/۰۴)	۰/۱۲۹	۰/۰۲۴	Hsp70 a5
۰/۳۸	۰/۲(۰/۰۳)	۰/۰۷۷(۰/۰۴)	۰/۱۸۱	۰/۰۷۳	Hsp70 a11
۰/۵۳	۰/۲۷(۰/۰۳)	۰/۱۴۳(۰/۰۵)	۰/۲۲۷	۰/۱۳	Hsp70 a13
۰/۷۷	۰/۳۰۲(۰/۰۳)	۰/۲۳۳(۰/۰۵)	۰/۲۱۶	۰/۱۷۶	Hsp 70 a6
۰/۵۹	۰/۲۹۱ (۰/۰۳)	۰/۱۷۱ (۰/۰۵)	۰/۲۴۱	۰/۱۵۳	Hsp 70 a14
۰/۴۲	۰/۲۱۱ (۰/۰۲۵)	۰/۰۸۸ (۰/۰۴)	۰/۱۸۴	۰/۱۲۱	Hsp 70 a4l
۰/۰۱	۰/۲۱۱ (۰/۰۳)	۰/۰۰۳ (۰/۰۴)	۰/۱۸۴	۰/۰۰۳	Hsp 70 a8
۰/۲۱	۰/۱۹۳ (۰/۰۳)	۰/۰۴۲ (۰/۰۴)	۰/۱۷۱	۰/۰۴۲	Hsp 70 a9

\*: Not applicable



شکل ۲- درصد جابجایی نوکلئوتیدهای خانواده ژنی Hsp70 در توالی‌های مختلف

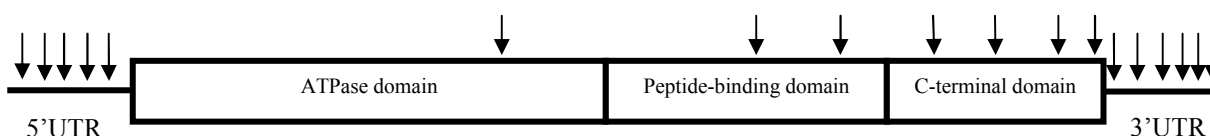
### بخش‌های پروتئینی Hsp70

بخش‌های پروتئینی، نتیجه ترجمه توالی‌های حفاظت شده بر روی ژن هستند که هر کدام وظیفه خاصی در پروتئین تولید شده از آن ژن را بر عهده دارند. جهت اطلاع از عملکرد یک ژن، شناسایی بخش‌های مختلف پروتئینی که توسط آن ژن کد می‌شود ضروری است. بخش‌های مختلف پروتئینی خانواده ژنی Hsp70 در شکل ۳ نشان داده شده است. خانواده ژنی Hsp70 عمدتاً شامل سه بخش پروتئینی با نام‌های ATPase domain با طول ۳۸۰ اسید آمینه در انتهای آمین و دو بخش Peptide-binding domain با ۱۵۹ اسید آمینه و C-terminal domain با ۹۸ اسید آمینه در انتهای

کربوکسیل هستند. این قسمت‌ها با توجه به انواع مختلف زیر گروه‌ها از حدود نوکلئوتید ۲۴۴ شروع شده و تا حدود نوکلئوتید ۲۱۶۹ ادامه دارد. بررسی شباهت بین ژن‌های خانواده Hsp70 در گاو، سگ، انسان، موش و موش صحرائی وجود مناطق متعددی را نشان می‌دهد که به طور کامل حفاظت شده بودند. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیشترین تغییرات نوکلئوتیدی در قسمت‌های ابتدایی و انتهایی ژن رخ داده است. این تغییرات نشان می‌دهد که این مناطق مستعد تغییرات بیشتری در طول تکامل بوده‌اند. بیشتر بخش‌های این مناطق در بر گیرنده نواحی بالادست و پایین دست غیر قابل ترجمه ژنی بوده که مشابه با

شونده به ATP از قبیل هیستیدین کینازها، DNA جیراز B، توپوایزومرازها و Hsp90 یافت شده و وظایف مختلف و مهم بیولوژیکی از قبیل بسته‌بندی پروتئین‌ها، اتصال به پروتئین‌های دیگر و انتقال آنها و تکثیر پروتئین‌های عفونی را به عهده دارند، فشار انتخاب در جهت عدم تغییر توالی‌هایی که این بخش را کد می‌کنند اعمال شده است (Loovers et al., 2007; Hwang et al., 2010).

یافته‌های دیگر (Salisbury et al., 2003) تغییرات زیادی را در طول تکامل داشته‌اند. تأثیر کمتر این مناطق در تولید پروتئین‌های مورد نیاز برای فعالیت‌های مختلف سلول می‌تواند علت بالای این تغییرات باشد. بخش زیادی از توالی‌ها، کدکننده بخش ATPase پروتئین Hsp70 می‌باشد که در طول تکامل تغییرات کمتری را شاهد بوده و بسیار حفاظت شده است. از آنجایی که این ساختار در اغلب پروتئین‌های متصل



شکل ۳- بخش‌های مختلف پروتئینی Hsp70 کد شده به وسیله قسمت‌های مختلف ژنی (پیکان‌ها نشان‌دهنده تغییرات نوکلئوتیدی در ساختار ژن‌های این خانواده می‌باشند)

که در تکامل دسته‌های مختلف این خانواده ژنی انتخاب خاص صورت گرفته است که نشانه ضروری بودن عملکرد این ژن‌ها و تثبیت این وظیفه در طول تکامل بوده است. از آنجایی که آگاهی از مسیر تکاملی این‌گونه ژن‌ها نقش کلیدی در فهم وظایف بیولوژیکی آنها خواهد داشت، این خانواده ژنی بعنوان یک دسته ژنی با ارزش در مطالعات تکاملی و عملکردی حیوانات مزرعه‌ای خصوصاً گاو می‌تواند مد نظر قرار گیرد.

#### نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که خانواده ژنی Hsp70 در گاو از اعضاء مختلف با پراکندگی کروموزومی و وظایف بیولوژیکی متعددی تشکیل شده است که از یک توالی اولیه منشعب شده‌اند. همچنین مشخص شد که بیشترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی، جانشینی بازهای پیریمیدین که در قسمت‌های ابتدایی و انتهایی ژن رخ داده است می‌باشد. از طرفی، این تحقیق مشخص کرد

#### REFERENCES

1. Al-Aqil, A. & Zulkifli, I. (2009). Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. *Journal of Poultry Science*, 88, 1358-1364.
2. Feder, M. E. & Hofmann, G. E. (1999). Heat Shock Proteins, Molecular Chaperones and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-82.
3. Grosz, M. D., Womack, J. E. & Skow, L. C. (1992). Syntenic conservation of HSP70 genes in cattle and humans. *Genomics*, 14, 863-868.
4. Hwang, C. Y., Holl, J., Rajan, D., Lee, Y., Kim, S., Um, M., Kwon, K. S. & Song, B. (2010). Hsp70 interacts with the retroviral restriction factor TRIM5alpha and assists the folding of TRIM5alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 10: 7827-37.
5. Lamb, M., Okimoto, R., Brown, M. & Rosenkrans, C. (2009). Associations between Cattle Breed and Heat Shock Protein 70 Gene. *University of Arkansas Division of Agriculture*, 58, 205-206.
6. Li, Y. & Huang, J. F. (2007). Identification and Molecular Evolution of Cow CENP-A Gene Family. *Journal of Mammalian Genome*, 19, 139-143.
7. Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
8. Liew, P. K., Zulkifli, I., Hair-Bejo, M., Omar, A. R. & Israf, D. A. (2003). Effects of Early age Feed Restriction and Heat Conditioning on Heat Shock Protein 70 Expression, Resistance to Infectious Bursal Disease, and Growth in Male Broiler Chickens Subjected to Heat Stress. *Journal of Poultry Science*, 82, 1879-1885.
9. Loovers, H. M., Guinan, E. & Jones, G. W. (2007). Importance of the Hsp70 ATPase Domain in Yeast



- Prion Propagation. *Journal of Genetics*, 175, 621-630.
10. Mazzi, M., Carmen, A., Ferro, A. J., Ines, T., Ferro, M., José, M., Savino, V., Augusto, D., Coelho, A. & Macari, M. (2003). Polymorphism analysis of the Hsp70 stress Gene in Broiler Chickens (*Gallus gallus*) of Different Breeds. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 26, 275-281.
  11. Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. (pp. 51-72)
  12. Neuer, A., Spandorfer, D. S., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z. & Witkin, S. (2000). The Role of Heat Shock Proteins in Reproduction. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 6, 149-159.
  13. Ngandu, N., Scheffler, K., Moore, P., Woodman, Z., Martin, D. & Seoighe, C. (2008). Extensive purifying selection acting on synonymous sites in HIV-1 Group M sequences. *Virology Journal*, 5, 160-171.
  14. Nishikawa, M., Takemoto, S. & Takakura, Y. (2008). Heat Shock Protein Derivatives for Delivery of Antigens to Antigen Presenting Cells (Mini review). *International Journal of Pharmaceutics*, 354, 23-27.
  15. Patir, H. & Upadhyay, R. C. (2009). Purification, characterization and expression kinetics of heat shock protein 70 from *Bubalus bubalis* (Article in press). *Journal of Research in Veterinary Science*, 88, 258-262.
  16. Picoult-Newberg, L., Ideker, T. E., Pohl, M. G., Taylor, S. L., Donaldson, M. A., Nickerson, D. A. & Boyce-Jacino, M. (1999). Mining SNPs from EST Databases. *Journal of Genome Research*, 9, 167-174.
  17. Phuphuakrat, A. & Auewarakul, P. (2003). Heterogeneity of HIV-1 Rev response element. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19, 569-574.
  18. Rehman, S. U., Sameer, A. S., Zahoor, I., Syeed, N., Nanda, M. S., Hafiz, A., Shah, Z. A. & Siddiqi, M. A. (2009). Polymorphic analysis of MHC linked Heat Shock Protein 70 genes: Their susceptibility and prognostic implication in Kangri cancer cases of Kashmiri population. *Indian Journal of Human Genetics*, 15, 65-71.
  19. Salisbury, B. A., Pungliya, M., Choi, J. Y., Jiang, R., Jenny Sun, X. & Stephens, J. C. (2003). SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutation Research*, 526, 53-61.
  20. Schlesinger, J. M. (1990). Heat Shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 12111-12114.
  21. Shortlea, D. & Sondek, J. (1995). The Emerging Role of Insertions and Deletions in Protein Engineering. *Journal of Current Opinion in Biotechnology*, 6, 387-393.
  22. Sugimoto, M., Furuoka, H. & Sugimoto, Y. (2003). Deletion of one of the Duplicated Hsp70 Genes Causes Hereditary Myopathy of Diaphragmatic Muscles in Holstein-Friesian Cattle. *Journal of Animal Genetics*, 34, 191-197.
  23. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
  24. Tavaría, M., Gabriele, T., Kola, I. & Anderson, R. L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell stress and chaperones*, 1, 23-28.
  25. Vignal, A., Milan, D., San-Cristobal, M. & Eggen, A. (2002). A Review on SNP and other Types of Molecular Markers and their use in animal Genetics. *Journal of Genetic Selection and Evolution*, 34, 275-305.
  26. Walter, L., Rauh, F. & Gunther, E. (1994). Comparative Analysis Of The Tree Major Histocompatibility Complex-Linked Heat Shock Protein 70 (hsp70) Genes of the Rat (abstract). *Journal of Immuno Genetics*, 40, 325-330.
  27. Wei-Jie, C., Qiu-Ling, L., Chang-Fa, W., Hong-Mei, W., Jian-Bin, L., Yan-Ming, S. & Ji-Feng, Z. (2009). Genetic Polymorphism of HSP70-1 Gene and its Correlation with Resistance to Mastitis in Chinese Holstein. *Journal of Hereditas (Beijing)*, 31, 169-174.
  28. Yaniz, J. L., Lopez-Gatius, F., Almeria, S., Carretero, T., Garcia-Ispuerto, I., Serrano, B., Smith, R. F., Dobson, H. & Santolaria, P. (2009). Dynamics of heat shock protein 70 concentrations in peripheral blood lymphocyte lysates during pregnancy in lactating Holstein-Friesian cows. *Journal of Theriogenology*, 72, 1041-1046.