ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹٦
صفحه ۳٦٤ - ۳۵۷

وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *BMP15* در کروموزوم X فعال و غیر فعال در گوسفند

BMP15 gene promoter methylation status in the active and inactive X chromosome in sheep

لیلا دانش مقدم[۱]، طاهر هرکی نژاد[*۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

Daneshmoghadam L[1], Harkinezhad T[*1]

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۵/۱۷)

چکیده

پروتئین مورفوژنیک استخوان 15 (BMP15) یکی از ژن‌هایی است که با میزان باروری در گوسفند ارتباط دارد. این ژن بر روی کروموزوم X قرار دارد. در جنس ماده یکی از کروموزم‌های X به‌دلیل جبران دوز در مقایسه با جنس نر که تنها یک کروموزوم X دارد، غیرفعال می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *BMP15* روی کروموزوم X غیرفعال صورت گرفت. برای این منظور، نمونه‌های تخمدان از ۲۲ میش غیر باردار، و هشت میش باردار تهیه شد. DNA و RNA از فولیکول و بافت تخمدان استخراج شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای DNA تیمار شده با بیسولفیت و نوع تیمارنشده، وضعیت متیلاسیون سیتوزین در ناحیه پروموتر بررسی و بیان این ژن در گروه باردار و غیرباردار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروموتر *BMP15* حتی در کروموزوم غیرفعال متیله نبوده و بر خلاف بسیاری از ژن‌ها در این کروموزوم از متیلاسیون فرارمی‌کند. این موضوع نشان می‌دهد که علیرغم غیرفعال شدن یکی از کروموزومهای X هردو الل این ژن در افراد هموزیگوت موتانت فعال بوده و از این لحاظ مانند ژن‌هایی که بر روی کروموزوم‌های اتوزوم قرار دارند عمل می‌کند. بیان ژن در مراحل مختلف فیزیولوژیکی (آبستن و غیر آبستن) نیز این مطلب را تایید می‌کند. نتایج نشان داد که میزان بیان mRNA ژن در میان گروه‌های باردار و غیر باردار تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌نظر می‌رسد غیرفعال کردن دائمی یکی از آلل‌های جهش‌یافته از *BMP15* در اوایل زندگی حیوانات می‌تواند باعث شود که افراد هموزیگوت جهش‌یافته نیز به‌طور طبیعی بارور باشند.

واژه‌های کلیدی

اپی ژنتیک
باروری
تولیدمثل
گوسفند
متیلاسیون

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

مقدمه

چندین ژن به‌عنوان ژن‌های کنترل‌کننده رشد فولیکول و نرخ تخمک‌گذاری در پستانداران شناسایی شده‌اند که از بین آن‌ها، سه ژن با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پروتئین مورفوژنیک استخوان 15 (BMP15)، گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان IB (BMP IB) و فاکتور تمایز رشد (GDF9) که همه آن‌ها اعضای خانواده بزرگ فاکتور رشد تغییرشکل‌دهنده بتا (TGFβ)[1] هستند و از لحاظ عملکردی با هم ارتباط نزدیکی دارند و بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکول و نرخ تخمک‌گذاری در پستانداران را تحت تاثیر قرارمی‌دهند. ژن *BMP15* نقش کلیدی در تنظیم بسیاری از فرایندها در سلول‌های گرانولوزا و درصد تخمک‌گذاری ایفا می‌کند. این ژن روی کروموزوم X قرار دارد و شامل دو اگزون می‌باشد که توسط یک اینترون جدا شده‌اند. هشت جهش شناخته شده در ژن *BMP15* در گوسفند وجود دارد که با چندقلوزایی یا ناباروری در ارتباط است (Persani et al. 2014). پنج آلل جهش‌یافته از آن‌ها شناخته شده‌اند (*fecXG, fecXH, fecXB, FecXL, fecXI*) که همه این آلل‌ها باعث افزایش تخمک‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت می‌شوند، اما افراد هموزیگوت این جهش‌ها، حیوانات نابارور هستند (Hanrahan et al. 2004; Davis 2005). این ژن در بافت بیضه حیوانات نر نیز بیان می‌شود (Nicholls et al. 2009). با این وجود، بیان این ژن در بافت ذکر شده در برخی حیوانات از جمله در بیضه خوک مشاهده نشده‌است (Wan et al. 2015). امروزه، به دلیل افزایش تقاضا برای گوشت و همچنین بهبود بهره‌وری تولید، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه چندقلوزایی در گوسفند توجه پرورش‌دهندگان در سراسر جهان را به خود جلب کرده است. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده که چندقلوزایی در گوسفند می‌تواند تحت تاثیر تک ژن‌های با اثر عمده که ژن‌های باروری (*Fec*) نامیده می‌شوند قرار گیرد (Hanrahan et al. 2004). اما از میان ژن‌های شناخته شده مؤثر بر چندقلوزایی، *BMP15* و *GDF9* تنها در حالت هتروزیگوت باعث چندقلوزایی می‌شوند، در حالی‌که حیوانات جهش‌یافته هموزیگوت عقیم هستند (Otsuka et al. 2011). بدیهی است تغییرات فنوتیپی تخمدان ناشی از تغییر در توالی ژن *BMP15* در گونه‌های مختلف رخ می‌دهد. *BMP15*، همان‌طور که قبلا ذکر شد، بر روی کروموزوم X قرار دارد، در حالی‌که جهت جبران دوز بیان ژن‌های قرار گرفته بر روی کروموزوم‌های جنسی بین جنس نر و ماده، یکی از کروموزوم‌های X در جنس ماده غیرفعال است و عمده ژن‌های آن بیان نمی‌شوند. با این حال، در هر دو ژن *BMP15* و *GDF9* افراد هموزیگوت جهش یافته، میش‌های نابارور هستند. بنابراین از این نظر، *BMP15* و *GDF9* (واقع بر کروموزوم ۵ در گوسفند) دارای فنوتیپ فیزیولوژیکی مشابهی هستند. اگر یک آلل *BMP15* به‌دلیل غیرفعال بودن کروموزوم‌های X غیرفعال باشد، نمی‌تواند در فنوتیپ تاثیرگذار باشد، در نتیجه حیوانات هموزیگوت نباید عقیم باشند. غیر فعال‌سازی کروموزوم X یک برنامه توسعه‌ای تشکیل کروماتین است که در طول رشد اولیه جنینی در پستانداران آغاز می شود و در طول عمر تقسیم سلولی در سلول‌های سوماتیک حفظ می‌شود (Minkovsky et al. 2014). گزارش شده‌است که غیر فعال‌سازی کروموزوم X با تغییر الگوی متیلاسیون DNA، به خصوص در جزایر CpG همراه است (Sharp et al. 2011). لازم به ذکر است که به‌طور کلی متیلاسیون باعث کاهش یا توقف بیان ژن می‌شود. متیلاسیون که یکی از سازوکارهای اپی ژنتیک است که هم در سطح هیستون‌ها و هم در سطح DNA عمل کرده و بر بیان ژن‌ها تاثیر می‌گذارد. اگر چه، به‌طور کلی میزان متیلاسیون در هر دو کروموزوم X فعال و غیرفعال مشابه است (Bernardino et al. 1996). اما به احتمال زیاد جزایر CpG بر روی کروموزوم غیرفعال، متیله و روی کروموزوم فعال، غیرمتیله (Hellman and Chess 2007) می‌باشند. با این حال، امروزه می‌دانیم که چند ژن بر روی کروموزوم X از غیرفعال شدن فرار می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *BMP 15* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای جمع‌آوری نمونه، بلافاصله پس از کشتار، بافت تخمدان از اندام تناسلی ۲۲ گوسفند غیرباردار و هشت گوسفند باردار (بنا به برخی از دلایل ذبح دام ضروری بود) افشاری در کشتارگاه دام زنجان، جدا شده و تحت شرایط کنترل شده به آزمایشگاه منتقل

[1] Transforming Growth Factor beta

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

شد. انتخاب این دو گروه به‌دلیل متفاوت بودن فعالیت تخمدان‌ها در آن شرایط فیزیولوژیک مختلف بود. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA و DNA در ۸۰- درجه سانتی‌گراد (°C) نگهداری شدند. DNA از نمونه‌های تخمدان با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج شد. RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNA، (شرکت سیناکلون؛ CinaPure RNA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای حذف هر گونه آلودگی ممکن DNA باقیمانده، نمونه RNA با یک واحد از DNase (Vivantis Inc®, Malaysia) تیمار شد. cDNA در یک واکنش ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت آماده‌سازی cDNA مربوطه با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده (Vivantis Inc®, Malaysia) سنتز شد. در اولین گام مخلوط RNA-آغازگر شامل دو میکرولیتر RNA (۱۸۷ng/µl)، یک میکرولیتر Oligo d(T)، یک میکرولیتر dNTPs mix ۱۰ میلی‌مولار و شش میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (تا حجم ۱۰ میکرولیتر) آماده شد. در مرحله‌ی دوم، ابتدا مخلوط سنتز cDNA شامل دو میکرولیتر M-۱۰ X Buffer، MuLV، نیم میکرولیتر M-MuLV Reverse Transcriptase و ۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (تا حجم ۱۰ میکرولیتر) تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن به هر تیوب حاوی مخلوط RNA-primer حاصل از مرحله‌ی اول اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Reverse Transcriptase) انکوبه شدند. برای غیرفعال کردن آنزیم نمونه‌ها در°C ۸۵ به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. پس از سنتز، نمونه‌های cDNA در °C ۲۰- نگهداری شدند.

در مرحله تیمار DNA با سدیم بیسولفیت از روش مرسوم (Pappas et al. 2013) با اندکی تغییر به شرح زیر استفاده شد، تیمار با انکوباسیون ۹ میکرولیتر DNA در °C ۹۷ به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی DNA آغاز شد. نمونه‌ها بلافاصله روی یخ قرار داده شد و به هر تیوپ دو میکرولیتر هیدروکسید سدیم (6.3 مولار) اضافه شد. نمونه‌ها در°C ۳۹ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس، ۵۲۰ میکرولیتر از سدیم بیسولفیت سه مولار و ۱۵ میکرولیتر از هیدروکینون ۱۰ میلی‌مولار به نمونه اضافه شد. سطح مخلوط واکنش با ۲۰ میلی‌لیتر از روغن معدنی پوشیده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در°C ۵۵ انکوبه شدند و سپس DNA با کیت High pure PCR templet preparation kit (Roche) استخراج شد. پس از این مرحله، سه میکرولیتر هیدروکسید سدیم (۳ مولار) به هر نمونه اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در °C ۴۰ انکوبه شد. در نهایت DNA، با استفاده از استات آمونیوم ۳ مولار رسوب داده و با استفاده از اتانول خالص شد.

بیان ژن *BMP15* به‌عنوان تغییر در سطح نسبی میزان mRNA با استفاده از Real time PCR و با SYBRGreen به‌عنوان گزارش دهنده فلورسانس و سیستم تشخیص روتورژن[1] ۳۰۰۰ (Corbett Research® Australia) ارزیابی شد. ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد که شامل سه میکرولیتر cDNA و ۱۷ میکرولیتر مخلوط qPCR شامل یک واحد DNA پلیمراز HotTaq، آغازگرهای پیشرو و برگشتی (۱۰pmol/µl) ، یک دهم میکرولیتر بافر 1X qPCR، دو دهم میکرولیتر ($MgCl_2$, 2.5 mM) و dNTPs (۲۰۰ میلی‌مولار) بود.

برنامه زمانی مورد استفاده به‌ترتیب زیر است: مرحله واسرشتگی اولیه و فعال‌سازی آنزیم پلیمراز به مدت ۱۵ دقیقه با دمای °C ۹۵، ۴۵ چرخه °C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال °C ۵۸ به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله توسعه °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه. به‌عنوان نمونه کنترل منفی آب‌مقطر بدون cDNA در تمام آزمایشات استفاده شد و هیچ محصولی تولید نکرد. روش ΔΔCt مقایسه‌ای برای محاسبه میزان بیان ژن *BMP15* با در نظر گرفتن میزان بیان *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی، استفاده شد.

در این مطالعه، وجود چندشکلی در پروموتر ژن *BMP15* (NM_001114767.1) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای یک قطعه 581 جفت‌بازی و با توالی‌یابی محصولات PCR در هر دو جهت مورد بررسی قرار گرفت. متیلاسیون قسمت پروموتور توسط PCR حساس به متیلاسیون با استفاده از آغازگرهای ویژه برای قطعه‌ای به اندازه 232 جفت‌باز برای ناحیه متیله (DNA تیمار نشده) و یک جفت آغازگر برای همان منطقه برای DNA تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Rotorgen 3000

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مطالعه مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی		Tm(°C)[1]	اندازه محصول(جفت باز)
BMPexp[2]	Sence	AGCTGACGCAAGTGGACACC	54.1	150
	Anti-sence	GCTACCCGGTTTGGTCTCAG	55.5	
BMP 15[3]	Sense	TTTCTGGCACTTATGCTCAG	58.4	581
	Anti sense	GAAAAGCTTGGTGTTCAGCA	56.4	
BMP 15[3]	Sense	TTTCTGGCACTTATGCTCAG	58.4	232
	Anti sense	AGCCCTAGCCTGCTCTGCT	62	
BMP 15[4]	Sense	AGATTTTTGGTATTTATGTTTAG	56	232
	Anti sense	CAACCCTAACCTACTCTACT	58	
GAPDH[2]	Sense	CACTGCCACCCAGAAGACTG	64	196
	Anti sense	GGTCAGATCCACAACGGACA	62	

۱- دمای ذوب بر حسب درجه سانتی‌گراد

۲- برای بررسی بیان ژن (Real time PCR)

۳- برای DNA معمولی و متیله شده

٤- برای DNA تیمار شده با بیسولفیت سدیم

اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ میلی مولار KCl، ۲۰ میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید (pH= 8.3)، دو میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۱ درصد توئین ۲۰، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۱٦ پیکومول از هر آغازگر (جدول ۱)، ۰/۸ واحد Taq پلیمراز و ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام شد. پس از واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه یک دقیقه‌ای برای هر کدام از درجه حرارت‌های ۹۵°C، ۵۵-۵۲ °C و ۷۲°C، با گسترش نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از آن محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید شناسایی شدند. خالص‌سازی محصولات PCR بر روی ژل آگارز با استفاده از روش استخراج فنل-کلروفرم انجام شد و توالی‌یابی در ABI 3730XL DNA Analyzer (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد.

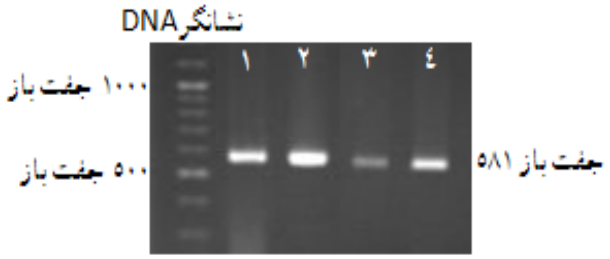
نتایج

در این مطالعه، وجود چندشکلی در پروموتر ژن *BMP15* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای یک قطعه ۵۸۱ جفت‌بازی مورد بررسی قرار گرفت. محصولات PCR ناحیه پروموتر که روی ژل آگارز یک و نیم درصد بارگذاری شده بود قطعه‌ای بالاتر از باند ۵۰۰ و نزدیک به ٦۰۰ جفت باز نشانگر DNA را نشان داد (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی نشان داد که قطعه تکثیر یافته شامل ۵۸۱ جفت باز و همان قطعه مورد نظر بوده و با توالی مرجع موجود در وب سایت‌های بیولوژیکی مشابه است. تطبیق تمام توالی‌ها چندشکلی در این منطقه در میان نمونه‌ها نشان نداد. بیان *BMP 15* در میان میش‌های باردار بالاتر از میش‌های غیر باردار بود (شکل ۲)، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. به‌منظور بررسی متیلاسیون پروموتر با استفاده ازPCR حساس به متیلاسیون، محصولات تکثیری دو جفت آغازگر یعنی محصولات آغازگرهای DNA تیمار نشده و آغازگر DNA تیمار شده با بیسولفیت، مقایسه شدند. DNA تیمار نشده تنها زمانی محصولات PCR تولید کرد که آغازگرهای ویژه نوع تیمار نشده مورد استفاده قرار گرفت و DNA تیمار شده (با بیسولفیت سدیم) فقط با آغازگرهای مرتبط تکثیر شد در حالی‌که با آغازگر عادی برای DNA تیمار نشده محصولی تولید ننمود (شکل ۳). DNA تیمار شده با بی‌سولفیت‌سدیم تنها با آغازگرهای اختصاصی (شکل ۳) تکثیر شد. نوع DNA تیمار نشده هیچ محصولی را با این آغازگر تولید نکرد. این نشان می‌دهد که در DNA تیمار شده توسط بیسولفیت سدیم نوکلئوتیدهای C به‌طور

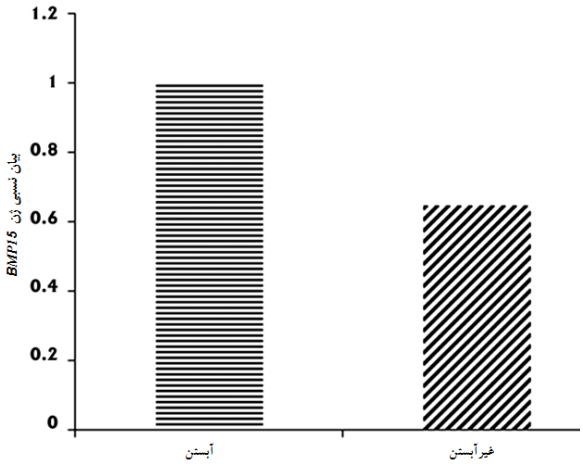
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

کامل به T تبدیل شده‌اند. به‌عبارت دیگر نشان می‌دهد که نوکلئوتیدهای C دراین ناحیه متیله نبوده‌اند.

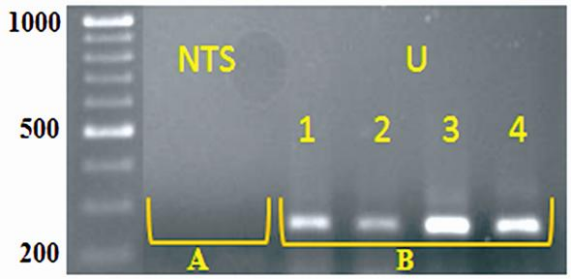
تعیین توالی نیز نشان داد که تمامی سیتوزین‌ها به تیمین تبدیل شده‌اند (شکل ٤). لذا هیچ یک از سیتوزین‌ها متیله نبوده‌اند، و این بدان معنی است که پروموتر *BMP15* حتی در کروموزوم X غیرفعال نیز از متیلاسیون فرار می‌کند زیرا در مطالعه ما هیچ‌گونه هتروزیگوسیتی از این نوکلئوتید در توالی‌ها مشاهده نشد. هنگامی‌که نوکلئوتید C در یک کروموزوم متیله اما بر روی کروموزوم دیگر غیر متیله باشد پس از تیمار با سدیم بیسولفیت نوکلئوتیدهای C غیرمتیله بدون تغییر باقی خواهند ماند، اما سیتوزین غیرمتیله به T تبدیل خواهند شد و در توالی هتروزیگوت C / T مشاهده خواهد شد.



شکل ۱- محصولات PCR ناحیه پروموتر ژن *BMP15* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و باند ۵۸۱ جفت باز مورد انتظار مشاهده شد. چاهک اول نشانگر DNA (۱۰۰bp) و بقیه ازچاهک یک تا چهار قطعه تکثیر شده می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه نسبی بیان *BMP15* بین میش‌های باردار و غیر باردار؛ بیان این ژن در میش باردار بالاتر از میش‌های غیرباردار بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (میش‌های غیرآبستن به عنوان شاهد در مقایسه دو گروه در نظر گرفته شدند).



شکل ۳- محصولات PCR آغازگرهای اختصاصی برای DNA تیمار شده با بیسولفیت سدیم؛ از چپ به راست. اولین چاهک نشانگر DNA (۱۰۰bp)، در دو چاهک اول DNA (A) تیمار نشده هیچ محصولی را با این آغازگر تولید نکرد. چاهک شماره ۱ تا ٤ DNA (B) تیمار شده با بیسولفیت، که تولید محصول ۲۳۲ bp دارد.

بحث

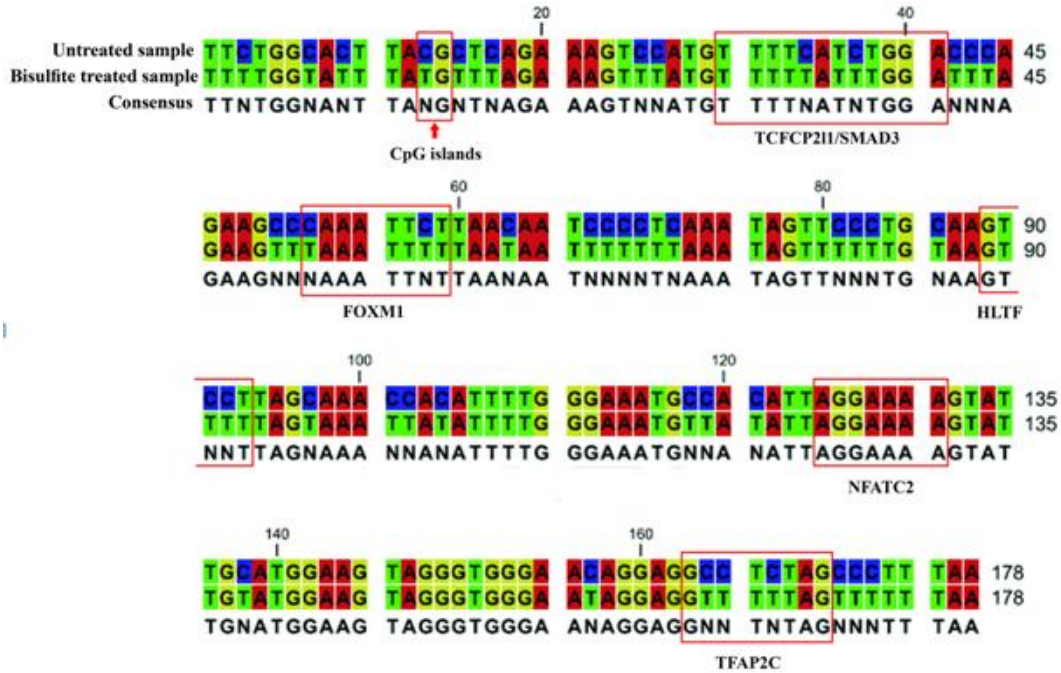
نتایج حاصل ازتوالی‌یابی نشان داد توالی‌های نواحی تکثیر یافته (۵۸۱ جفت‌باز) کاملا مشابه و بدون تفاوت با توالی مرجع گوسفند در پایگاه داده‌های بیولوژیکی هستند. به‌نظر می‌رسد، پروموتر این ژن حفاظت شده باشد که شباهت بالای میان گونه‌های نزدیک به هم را نشان می‌دهد. با این حال، در مطالعه ما اندازه نمونه‌ها برای دستیابی به چنین نتیجه‌ای محدود بود. برای مشاهده تغییرات مربوطه مخصوصا الل‌هایی که فراوانی پائینی دارند نیاز به اندازه بزرگ نمونه است. اما در مطالعه حاضر به‌دلیل اینکه هدف شناسائی الل‌های مختلف این ژن نبود تعداد بالای نمونه نیاز نبود. شباهت توالی این ژن در گوسفند و بز والی کشمیر حدود ۹۸ درصد گزارش شده‌است (Shabir et al. 2012). با توجه به حفاظت پروموتر ژن در داخل گونه‌ها و گونه‌های نزدیک، به‌نظر می‌رسد که بخش‌های تنظیمی بسیار محافظت شده بوده که برای عملکرد ثابت آن ضروری است. گزارش شده‌است که مناطقی از ژن در گونه‌های تک تخمک‌گذار بیش از حیوانات چند تخمک‌گذار حفاظت شده هستند (Monestier et al. 2014). در گونه‌های مختلف عناصر تنظیمی پروموتر تقریبا بین نوکلئوتیدهای ۳۵۷- تا٤٦٠- از کدون آغاز واقع شده‌اند (Wan et al. 2015). برخی از این عناصر حاوی نوکلئوتید C در شکل ٤ نشان داده شده‌اند.

بیان *BMP 15* mRNA در میش باردار بیشتر از میش غیر باردار بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲). با توجه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

به اثرات متعدد *BMP15*، بیان مداوم این ژن ممکن است برای فعالیت تولیدمثلی طبیعی و اثرات مختلف ژن که از طریق گیرنده‌های آن در سلول‌های هدف کنترل می‌شود مورد نیاز باشد. به احتمال زیاد، بیان مستمر این ژن در تخمدان نه تنها برای رشد فولیکول و تخمک‌گذاری، بلکه برای حفظ جنین در میش لازم است. گزارش شده‌است که اثرات این ژن، تحریک رشد و بلوغ فولیکول‌ها، تنظیم عملکرد سلول گرانولوزا، جلوگیری از مرگ سلولی سلول‌های گرانولوزا و تحریک رقابت بلوغ فولیکولی می‌باشد. همچنین مشخص شده‌است که *BMP15* دارای یک اثر هم‌افزایی با *GDF9* می‌باشد (Persani et al. 2014). گزارش‌ها نشان داده است که بیان این ژن با بلوغ تخمک و کیفیت جنین در انسان در ارتباط است (Li et al. 2014). یکی از اهداف این مطالعه ارزیابی بیان آلل‌های مختلف *BMP15* بود، اما، هیچ چندشکلی درپروموتر این ژن مشاهده نشد. با این حال، برای بررسی این موضوع به تعداد نمونه بیش‌تری نیاز است. بهرحال، Shabir and Ganai (2012) در تعداد نمونه ۸۵ راس گوسفند در این ژن پلی‌مورفیسم مشاهده کردند.

اثر *BMP15* بر بیان برخی از ژن‌های دیگر و برخی از اثرات آن‌ها بر تخمدان مشخص شده‌است (Chang et al. 2014; Fenwick et al. 2013)، اما همه مکانیسم‌های تاثیر آن به‌طور کامل شناخته نشده اند. در مطالعه انجام شده توسط Bessa et al. (2013) تفاوت معنی‌داری در بیان *BMP15* در مراحل مختلف فولیکولی در گاو گزارش شده‌است. در حالی‌که Pramod et al. (2013) نشان داده‌اند که در بز سیاه بنگال و Sirohi بیان این ژن در فولیکول‌های کوچک بیشتر از فولیکول‌های بزرگ است. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که این ژن بیان ژن‌های دیگر مرتبط با تولید مثل را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bessa et al. 2013; Chang et al. 2014; Fenwick et al. 2013). در زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک بیان این ژن کاهش می‌یابد (Wei et al. 2014). نتایج این تحقیق و گزارش‌های حاصل از مطالعات دیگران نشان می‌دهد که برای روشن شدن نقش توامان *BMP15* در تولیدمثل اطلاعات بیشتری در مورد این ژن همراه با بیان هم‌زمان دیگر ژن‌ها در تخمدان، مورد نیاز است.



شکل ٤- تطابق توالی محصول PCR در DNA تیمار نشده (توالی بالایی) و در DNA تیمار شده با بیسولفیت‌سدیم (توالی پایینی)؛ در توالی پایین همه سیتوزین‌ها از جمله توالی‌های مهم مناطق، TFAP2C، HLTF، FOXM1، TCFCP2L1 / SMAD3 و جزیره CPG، با تیمار با سدیم بیسولفیت به تیمین تبدیل شده‌است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

Chang et al. (2013) نشان دادند که در رده‌های سلولی گرانولوزای انسان، ALK3 گیرنده اصلی فیزیولوژیکی برای *BMP15* بوده و *BMPR I* (*ALK6*) هیچ‌گونه نقشی ندارد. در حالی‌که در گوسفند مشاهده شده‌است که ژن *BMPR-IB* (*ALK6*) نقشی کلیدی دارد چون آلل جهش‌یافته آن نقش عمده‌ای در ایجاد چندقلوزایی ایفا می‌کند. هم‌چنین در انسان نشان داده شده‌است که *BMP15* باعث کاهش پروژسترون می‌شود (Chang et al. 2013). درمطالعه حاضر، انتظار بر این بود بیان این ژن در حیوانات باردار کمتر باشد، اما، میش‌های باردار سطح بالاتری از بیان mRNA ژن را بروز دادند هر چند تفاوت آماری بین دو گروه معنی‌دار نبود. به‌طور مشابهی، Li et al. (2014) گزارش کردند بیان mRNA ژن‌های *GDF9* و *BMP15* در نمونه‌های انسانی افراد باردار بیش‌تر از افراد غیرباردار بوده است که آن‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند. Sudiman et al. (2014) نشان دادند که پروتئین *BMP15*، به‌ویژه نوع پروپروتئین آن برای توسعه بلاستوسیست لازم است. امروزه مشخص شده‌است که برخی از ژن‌ها از غیر فعال شدن (متیلاسیون) روی کروموزوم X غیرفعال (Cotton et al. 2015) فرار می‌کنند، اما تحقیقات کمی در مورد *BMP15* انجام شده‌است. در انسان و موش این ژن بر روی بازوی P کروموزوم X واقع شده‌است (Dube et al. 1998). در حالی‌که در گوسفند بر روی بازوی q واقع شده‌است (Farhadi et al. 2013) و نقش آن در فنوتیپ مانند ژن‌های (به‌عنوان مثال *GDF9*) است که بر روی کروموزوم‌های اتوزوم واقع شده‌اند. باور عمومی بر این است که ژن‌های بیش‌تری بر روی بازوی q نسبت به بازوی P از غیرفعال شدن در امان می‌مانند. بنابراین، از این منظر نیز احتمال زیادی وجود دارد که *BMP15* از غیرفعال شدن بر روی کروموزوم X غیرفعال در گوسفند در امان بماند. اما، بر اساس اطلاعاتی که تا کنون برای نویسندگان این مقاله در دسترس بوده است، هیچ‌گونه گزارشی که این موضوع را از دیدگاه مولکولی مورد بررسی قرار داده باشد، وجود ندارد. بهرحال، هنوز در موش و انسان نیز مشخص نشده‌است که آیا مشابه همین موضوع بر روی کروموزوم X غیر فعال اتفاق می‌افتد یا خیر. مطالعات نشان داده است که غیر فعال شدن کروموزوم X به‌خصوص در مناطق پروموتور با متیلاسیون همراه است (Sharp et al. 2011). بهرحال، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که جزایر CpG در اطراف توالی عوامل رونویسی (به‌عنوان مثال TFAP2C) که نقش کلیدی در کنترل بیان ژن دارند، متیله نشده‌است (شکل ٤). این موضوع نشان می‌دهد آلل‌های *BMP15* در هر دو کروموزوم X در رونویسی و در نتیجه تولیدمثل شرکت دارند، هم‌چنین می‌توان از نحوه دخالت آنها در تعیین فنوتیپ نیز این را استنباط کرد. به این ترتیب، اگر یکی از آلل‌های *BMP15* در کروموزوم غیرفعال، متیله باشد و آلل دیگر در کروموزوم فعال غیرمتیله، C در جزایر CpG باید پس از تیمار با بیسولفیت سدیم به‌عنوان هتروزیگوت (C/T) دیده شود. اما، با توجه به نتایج بدست آمده، این مناطق از توالی DNA تیمار شده با بیسولفیت سدیم، هموزیگوت بوده و C به T تبدیل شده بود. این نشان می‌دهد که این ژن از متیلاسیون در کروموزوم X غیرفعال در امان می‌ماند. در این رابطه، فنوتیپ ژن *BMP15* مانند ژن *GDF9* است که بر روی کروموزوم اتوزوم واقع شده‌است.

در کل، نتایج این پژوهش نشان داد که *BMP15* از متیلاسیون در کروموزوم X غیرفعال در گوسفند در امان می‌ماند. به همین دلیل افراد هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته در میزان بیان ژن متفاوت بوده و این منجر به فنوتیپ متفاوت در آن‌ها می‌شود. بنابراین، *BMP15* مانند پارالوگش (*GDF9*) رونویسی شده و افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت جهش‌یافته این ژن، حیوانات باروری هستند که میزان تخمک‌گذاری بالاتری دارند در حالی‌که میش‌های هموزیگوت الل موتانت، عقیم می‌باشند.

منابع

Bernardino J, Lamoliatte E, Lombard M, Niveleau A, Malfoy B, Dutrillaux B and Bourgeois CA (1996) DNA methylation of the X chromosomes of the human female: an in situ semi-quantitative analysis. Chromosoma 104: 528-535.

Bessa IR, Nishimura RC, Franco MM and Dode MA (2013) Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. Reproduction in Domestic Animals 48: 781-789.

Chang HM, Cheng JC, Klausen C and Leung PC (2013) *BMP15* suppresses progesterone production by down-regulating *StAR* via *ALK3* in human granulosa cells. Molecular Endocrinology 27: 2093-2104.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]

Chang HM, Cheng JC, Taylor E and Leung PC (2014) Oocyte-derived *BMP15* but not *GDF9* down-regulates connexin43 expression and decreases gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells. Molecular Human Reproduction 20: 373-383.

Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS and Brown CJ (2015) Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. Human Molecular Genetics 24: 1528-1539.

Davis GH (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genetics Selection Evolution 37 Suppl 1 S11-S23.

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ and Matzuk MM (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. Molecular Endocrinology 12: 1809-1817.

Farhadi A, Genualdo V, Perucatti A, Hafezian SH, Rahimi-Mianji G, De LL, Parma P, Iannuzzi L and Iannuzzi A (2013) Comparative *FISH* mapping of *BMPR1B*, *BMP15* and *GDF9* fecundity genes on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. Journal of Genetics 92: 595-597.

Fenwick MA, Mora JM, Mansour YT, Baithun C, Franks S and Hardy K (2013) Investigations of *TGF-beta* signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. Endocrinology 154: 3423-3436.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R and Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries). Biology of Reproduction 70: 900-909.

Hellman A and Chess A (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. Science 315: 1141-1143.

Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX and Yang DZ (2014) Increased *GDF9* and *BMP15* mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. Reproductive Biology and Endocrinology 12: 81.

Minkovsky A, Sahakyan A, Rankin-Gee E, Bonora G, Patel S and Plath K (2014) The Mbd1-Atf7ip-Setdb1 pathway contributes to the maintenance of X chromosome inactivation. Epigenetics.Chromatin 7: 12.

Monestier O, Servin B, Auclair S, Bourquard T, Poupon A, Pascal G and Fabre S 2014. Evolutionary Origin of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth and Differentiation Factor 9 and Differential Selective Pressure Between Mono- and Poly-Ovulating Species. Biology of Reproduction 4:83.

Nicholls PK, Harrison CA, Gilchrist RB, Farnworth PG and Stanton PG (2009) Growth differentiation factor 9 is a germ cell regulator of Sertoli cell function. Endocrinology 150: 2481-2490.

Otsuka F, McTavish KJ, and Shimasaki S (2011) Integral role of *GDF-9* and *BMP-15* in ovarian function. Molecular Reproduction and Development 78: 9-21.

Pappas J J, Toulouse A and Bradley WEC 2013. The bisulfite genomic sequencing protocol. Advances in Lung Cancer 2: 21-25.

Persani L, Rossetti R, Di PE, Cacciatore C and Fabre S (2014) The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. Human Reproduction Update 1-15.

Pramod RK, Sharma SK, Singhi A, Pan S and Mitra A (2013) Differential ovarian morphometry and follicular expression of *BMP15*, *GDF9* and *BMPR1B* influence the prolificacy in goat. Reproduction in Domestic Animals 48: 803-809.

Shabir M and Ganai TA (2012) Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of *BMP 15* gene in Corriedale and local Kashmir valley sheep (Ovis aries). Gene 499: 231-235.

Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y and Antonarakis SE (2011) DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. Genome Research 21: 1592-1600.

Sudiman J, Sutton-McDowall ML, Ritter LJ, White MA, Mottershead DG, Thompson JG and Gilchrist RB (2014) Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. PLoS One 9: 103563.

Wan Q, Wang Y and Wang H (2015) Identification and Analysis of Regulatory Elements in Porcine Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Promoter. International Journal of Molecular Sciences 16: 25759-25772.

Wei LN, Huang R, Li LL, Fang C, Li Y and Liang XY 2014. Reduced and delayed expression of *GDF9* and *BMP15* in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. The Journal of Assisted Reproduction and Genetics 31: 1483-1490.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.4.8]