جستجوی توالی(های) شبه Tash در ژنوم تیلریاهای گوسفندی ایران

حمیدرضا موسویان[۱]*، حمیدرضا حدادزاده[۲]، پروانه خضرائی‌نیا[۱]، بهرام کاظمی[۳]، مژگان بنده‌پور[۳]، مهدی نام‌آوری[٤]، آمنه کوچکی[۳]

چکیده

تیلریا لستو کاردی و تیلریا اوویس از مهمترین عوامل تیلریوز گوسفندی در ایران هستند اما شدت علائم ایجاد شده، و میزان مرگ و میر در این دو نوع تیلریا کاملا با یکدیگر تفاوت دارد. تیلریا لستو کاردی باعث ایجاد یک بیماری کشنده در گوسفندان علی الخصوص بره‌ها در مناطق مختلف ایران شده اما تیلریا اوویس تنها باعث یک بیماری تحت بالینی و غیرکشنده در گوسفندان می شود. با وجود اهمیت بالای تیلریا لستوکاردی، شناخت کمی در مورد پاتوژنز بیماری و پروتئین‌های پاتوژن این انگل وجود دارد. بالغ بر پنجاه پروتئین پاتوژن در تیلریلا آنولاتا و پاروا شناخته شده که در مراحل مختلف انگل علی الخصوص شیزونت بیان شده و مسئول ایجاد علائم بیماری هستند. یکی از مهمترین خانواده های پروتئین پاتوژن در تیلریا آنولاتا خانواده Tash(Theileria annulata schizont), بوده که شامل گروه هتروژنی از پروتئین‌ها می باشد که در مرحله شیزونت بیان می شوند و به داخل سلول میزبان (لنفوسیت) ترشح میشوند. در این مطالعه تعداد زیادی پرایمرهای تصادفی براساس ژنوم این خانواده طراحی شد و به جستجوی توالی(های) نوکلئوتیدی مشابه در تیلریا لستوکاردی و اوویس پرداخته شد. یک قطعه حدود ٤۲۰ bp در تیلریا لستوکاردی جدا و پس از تعیین توالی مشخص شد که شباهت بالایی به ژن TashHN در تیلریا آنولاتا دارد. این اولین گزارش از یک توالی در ژنوم تیلریا لستوکاردی می‌باشد که به نظر می رسد در پاتوژنیسیته تیلریوز بدخیم در گوسفند نقش دارد.

واژگان کلیدی: تیلریا لستوکاردی، تیلریا اوویس، توالی (های) شبه Tash

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۲۳

مقدمه

گونه‌های تیلریا انواعی از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی را در نواحی حاره و تحت حاره آلوده می‌کنند. دو گونه تیلریا لستوکاردی و تیلریا اوویس باعث ایجاد تیلریوز گوسفند در برخی نقاط دنیا از جمله ایران می‌شوند(۱۰). تیلریا لستوکاردی و گونه‌های تیلریا در شمال چین باعث ایجاد بیماری شدید و کشنده در گوسفند می‌شوند(۱٦). اما تیلریا اوویس و تیلریا سپاراتا باعث ایجاد بیماری تحت بالینی و غیر کشنده در نشخوارکنندگان کوچک می‌شوند(۱). علی‌رغم مطالعات فراوان صورت گرفته برای تیلریاهای گاوی تحقیقات موجود در زمینه تیلریای گوسفند از جمله تیلریا لستوکاردی که اهمیت اقتصادی فراوان در گوسفند دارد کمتر می‌باشد و اطلاعات کافی و واضحی در مورد بیماری زایی این انگل وجود ندارد. به نظر می‌رسد علت اصلی بیماری زایی انگل‌هایی چون تیلریا پاروا و آنولاتا ناشی از مرحله شیزونتی این انگل‌هاست که باعث ایجاد القا یک فنوتیپ شبه دگرگونی در سلول های هسته دار میزبان می شود (۵) و سلول‌های آلوده دچار یک پرولیفراسیون شدید پلی کلونال می‌شوند که این پرولیفراسیون پلی کلونال و تغییر ماهیت سلولی را علت تورم غدد لنفاوی، ساپرس ایمنی(۱۷)، ایجاد بیماری شدید و مرگ دانسته‌اند(۱۸). در بین مراحل مختلف انگلی مشخص شده است که مهمترین مرحله بیماری‌زایی، مرحله شیزونتی بوده بطوریکه پس از تمایز شیزونت به مروزوئیت و یا حذف شیزونت توسط دارو شدت و علائم بالینی بیماری کاهش می‌یابد(۱۵و ۱٤). مطالعات انجام شده بر روی شیزونت تیلریا آنولاتا و پاروا نشان داده است که پروتئین‌های متفاوتی در مرحله شیزونتی بیان شده که به داخل سلول میزبان (لنفوسیت) ترشح شده و بر انواعی از سیگنال‌های داخل سلولی تاثیر گذاشته که حاصل این بر هم کنش تغییر فنوتیپ سلولی و القا پرولیفراسیون سلولی و حفاظت سلول از مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد. از مهمترین پروتئین‌های پاتوژن شناخته شده در مورد تیلریا پاروا و آنولاتا می‌توان به پروتئین‌های چاپرون،

۱*. گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران Hrmoosavian@ut.ac.ir
۲. گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه سلولی- مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
٤. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شیراز، ایران

هلیکازهای DEAD-box RNA، فالسیلیزین، اسیکلوفیلین، ایزومرهای دی سولفید، پروهیبیتین و خانواده بزرگ Tash (Theileria annulata schizont) اشاره نمود (۱۸). پروتئین‌های Tash شامل یک دسته مهم از پروتئین‌های آسیب رسان در تیلریا آنولاتا بوده که پس از تولید و ترشح از انگل وارد هسته سلول میزبان می‌شوند. از مهمترین اعضاء این خانواده می‌توان به پروتئین‌های Tash AT و TashHN در تیلریا آنولاتا اشاره نمود(۲۱). پروتئین‌های Tash AT حاوی قلاب AT بوده که این قلاب متشکل از یک پلی پپتید ۱۰-۸ آمینواسیدی است و حاوی بنیان‌های لیزین، آرژینین، پرولین و گلایسین در موقعیت‌های بسیار حفظ شده می‌باشد و به قسمتی از DNA میزبان که غنی ازنوکلئوتیدهای آدنین و تیمین بوده متصل می‌شوند. بنابراین پروتئین‌های Tash AT دسته‌ای از پروتئین‌های ترشحی انگل بوده که وارد هسته سلول میزبان می‌شوند و پس از اتصال به DNA میزبان به عنوان فاکتورهایی برای رونویسی ژن‌های انگل یا میزبان عمل کرده و یا حتی باعث تنظیم رونویسی می‌شود(۱۹و ۳). دسته دیگری از این خانواده، پروتئین Tash HN است که در مرحله ماکروشیزونت بیان می‌شود و از تمایز انگل به مروزوئیت جلوگیری می‌کند(۲۰). به طور کلی از این دسته پروتئین‌های ترشحی انگلی که وارد هسته سلول میزبان می‌شوند بیست عدد در پاروا و هفده عدد در آنولاتا شناخته شده که در مجموع این ۳۷ پروتئین، ۸ پروتئین در تیلریا آنولاتا با ۸ پروتئین در تیلریا پاروا معادل یکدیگر هستند زیرا شباهت زیادی در سطح پروتئین و نسبتا در سطح ژنومی دارند. از مهمترین این پروتئین‌های معادل می‌توان به Tash AT2 و Tash HN در تیلریا آنولاتا نام برد، که به ترتیب معادل TP01_0602 و TP01_0603 در تیلریا پاروا هستند(۱۸). این پروتئین‌ها در انگل‌های تیلریا آنولاتا و پاروا شناخته شده‌اند و مشخص شده که در پاتوژنز انگل و تغییر فنوتیپ سلول میزبان نقش دارند. با توجه به بیماری‌زایی شدید تیلریا لستوکاردی و نیز شباهت‌های زیادی که بین ساختار و عملکرد این انگل با تیلریا آنولاتا و پاروا وجود دارد(۱۲)، می‌توان فرضیه وجود پروتئین‌های مشابه را در مورد تیلریا لستوکاردی مطرح نمود. از این رو در مطالعه حاضر با طراحی پرایمرهای مختلف از نواحی مختلف ژنوم Tash AT2و Tash HN به جستجوی توالی(های) مشابه در ژنوم تیلریا لستوکاردی و اوویس پرداخته شد.

مواد و روش کار

۱- استخراج DNA از نمونه‌های خون

به منظور تهیه DNA ژنومیک تیلریا لستوکاردی و اوویس، خون‌گیری از گوسفندان از مناطق شمال و جنوب غرب کشور که اندمیک تیلریا اوویس و لستوکاردی هستند انجام شد. با استفاده از کیت استخراج MST, DNA (ساخت ایران)، DNA استخراج و با استفاده از بیوفتومتر اپندورف (ساخت کشور آلمان) مقدار اسید نوکلئیک تخمین زده شد. متوسط غلظت DNA در نمونه های اخذ شده ۴۰ ng/µl بود. DNA تا زمان آنالیزهای بعدی در ۲۰- °C ذخیره شد.

۲- طراحی پرایمر

در مطالعه حاضر از سه گروه پرایمر استفاده شد: (جدول ۱)

۱- ساخت دو جفت پرایمر جهت تشخیص و تایید تیلریا اوویس و تیلریا لستوکاردی از طریق nested-PCR-RFLP با استفاده از روش حیدرپور و همکاران (۱۱).

۲- طراحی و ساخت مجموعه‌ای از پرایمرها با استفاده از ژنوم Tash AT2 و Tash HN تیلریا آنولاتا. در مورد هر یک از ژن‌ها، هر کدام از پرایمرها forward طراحی شده به طور جداگانه با پرایمرهایReverse طراحی شده در واکنش PCR به کار رفت.

۳- یک جفت پرایمر برای ژن کلون -۵ در تیلریا لستوکاردی به عنوان کنترل داخلی PCR. کلون- ۵ در تیلریا لستوکاردی یک پروتئین ایمونوژنیک می‌باشد (٤).

۲-۳- Nested-PCR- RFLP

ردیابی و تایید تیلریا لستوکاردی و اوویس در نمونه ها با استفاده از روش nested-PCR-RFLP انجام شد. به طور خلاصه در این روش ابتدا با استفاده از پرایمرهای خارجی یک قطعه ۱۷۰۰bp مربوط به توالیrRNA 18s اختصاصی تیلریا تکثیر و سپس با استفاده از پرایمرهای داخلی قطعه ی 1400 bp تکثیر شد. جهت تشخیص نوع تیلریا، RFLP با استفاده از آنزیم Hpa II انجام و در نهایت پس از تشخیص اولیه، یک نمونه مثبت تیلریا لستوکاردی و یک نمونه تیلریا اوویس جهت تایید نهایی تعیین توالی شدند.

۲-٤- PCR گرادیانت دمایی

جهت ردیابی توالی مشابه Tash در تیلریا لستوکاردی و اوویس از PCR گرادیانت دمایی استفاده شد. حجم نهایی واکنش µL ۳۰ به صورت µL ۱۵ محلول آماده PCR(Amplicon) ، µL ۱ DNA ژنومیک (حدود ٤۰ نانوگرم) و ۲۰ پیکوگرم از هر پرایمر بود. واکنش PCR در ترموسایکلر اپندورف ساخت کشور آلمان با برنامه زمانبندی ذیل صورت گرفت: ابتدا ۵ دقیقه در °C ۹٤ و سپس ۳۰ سیکل به صورت °C ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنلینگ به مدت ۳۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله نهایی در دمای °C۷۲ به مدت ۵ دقیقه. جهت محاسبه دمای آنلینگ، محدوده دمایی به صورت°C ۵ کمتراز دمای ذوب پرایمر با دمای کمتر تا °C۵ بیشتر از دمای ذوب پرایمر با دمای بیشتر در نظر گرفته شد و سپس گرادیانت دمایی در این محدوده بدست آمده با فواصل °C ۲-۱/۵ انجام شد. جهت مشاهده محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ ورنگ آمیزی با سایبرگرین، از ترانسلومیناتور UV استفاده شد.

۲-۵- کنترل مثبت و منفی:

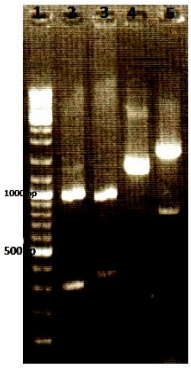
از ژن کلون-۵ که کد کننده یک پروتئین ایمونوژن در تیلریا لستوکاردی است به عنوان کنترل مثبت داخلی واز DNA ژنومیک یک گوسفند سالم که هیچ گونه سابقه قبلی با کنه نداشته به عنوان کنترل منفی واکنش PCR استفاده شد.

جدول ۱ـ توالی‌های استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر فوروارد از ´ ۵ به ´ ۳	توالی پرایمر ریورس از ´ ۵ به ´ ۳	دمای آنلینگ پرایمرها به ترتیب فوروارد و ریورس	رفرانس
پرایمرهای خارجی Nested-PCR	AACCTGGTTGA TCCTGCC AG	AAACCTTGTTAC GACTTCTC	٥٦, ٤٤,٩	(۱۱)
پرایمرهای داخلی Nested-PCR	TGATGTTCGTTT YTACATGG	GGCATTCCTCG TTCACG	٤٨,٤, ٥٤,٥	(۱۱)
پرایمرهای ساخته شده بر اساس TashHN	F1:ATGACCAGAT TAAAGATTGC	R1: CTCTTGAATG AGTTGGTC	٥٥,٦, ٥٢,٤	(۲۱)
		R2: GTGTTCAATT ATGGTGGCTTGTG	, ٥٩,٧	(۲۱)
	F2: GACCAAC TCATTCAAGAC	R3: CTAATCTGGT TTATATGGTCTTC	٥٤, ٥٦	مطالعه حاضر
پرایمرهای ساخته شده براساس TashAT2	CAAAGAGAATGTAAT TACAACAATTATT	AGGTCTTTTTT CAGGTGAAGGT	٥١,٢، ٥٢,٦	مطالعه حاضر
کلون-۵	CCTGATTTTAC ACAGGCAGTAG	CACAGGCA GTAGATCAATC	٥٠,٨, ٥٣,٤	(٤)

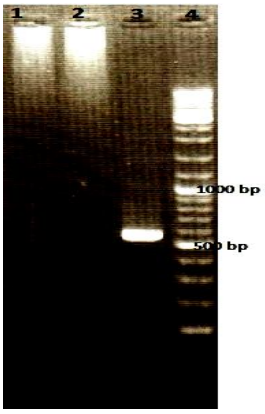
نتایج

نتایج nested-PCR-RFLP از نمونه‌های مثبت تیلریا لستوکاردی و اوویس و نیز کنترل‌های مثبت و منفی مورد استفاده در واکنش‌های PCR به ترتیب در نگاره‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. محصولات PCR جهت تایید نهایی تعیین توالی شدند و نتایج تعیین توالی در بانک ژن با شماره‌های دستیابی JQ737135 و JQ917458 به ترتیب برای تیلریا اوویس و لستوکاردی به ثبت رسیدند. پس از انجام PCR گرادیانت در دماهای مختلف و با استفاده از پرایمرهای متفاوت، فقط یک قطعه حدود ٤٢٠ bp در تیلریا لستوکاردی و نه در تیلریا اوویس تکثیرو ردیابی شد. (نگاره ۳). دمای آنلینگ واکنش فوق ۵۲ °C و پرایمرهای مورد استفاده F2, R3 از ژن TashHN بودند (جدول ۱). باند بدست آمده تعیین توالی شد و با استفاده از نرم افزار Gene runner به پروتئین فرضی ترجمه و توالی‌های مورد نظر در سطح ژنوم و پروتئین توسط برنامه NCBI (BLAST) (Basic Local Alignment Search Tool Biotechnology Information National Center for) با سایر توالی‌های موجود در NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی های بدست آمده دارای شباهت بالایی با ژن Tash HN تیلریا آنولاتا هم در سطح ژنوم و هم در سطح پروتئین بود. (نگاره‌های ٤ و ۵)



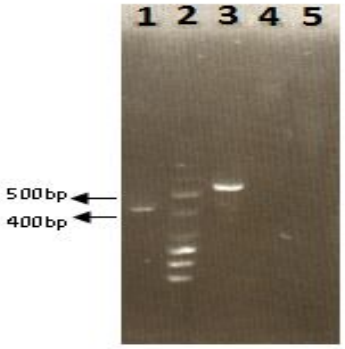
نگاره ۱: نتایج Nested-PCR RFLP

۱- مارکر 100 bp
۲- هضم آنزیمی باند 1400 bp متعلق به تیلریا لستوکاردی توسط آنزیم Hpa II
۳- هضم آنزیمی باند 1400 bp متعلق به تیلریا اوویس توسط آنزیم Hpa II
٤- باند 1400 bp حاصل از مرحله دوم Nested-PCR از ژن 18s rRNA تیلریا
۵- باند 1700 bp حاصل از مرحله اول Nested-PCR از ژن 18s rRNA تیلریا



نگاره ۲: کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شده در واکنش های PCR

۱- کنترل منفی فاقد DNA ژنومیک (آب مقطر) و استفاده از پرایمرهای F2و R3
۲- کنترل منفی حاوی DNA ژنومیک گوسفند سالم بدون سابقه قبلی با کنه و استفاده از پرایمرهای F2و R3
۳- کنترل مثبت حاوی DNA تیلریا لستوکاردی و پرایمرهای اختصاصی برای ژن clone-5 (باند bp ۵۳۰)
٤- مارکر ۱۰۰ bp



نگاره ۳: نتایج مثبت حاصل از PCR با پرایمرهای مختلف طراحی شده بر اساس ژن‌های TashHN و TashAT2

۱- باند حدود ٤٢٠ bp در تیلریا لستوکاردی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از ژن TashHN
۲- مارکر ۱۰۰ bp
۳- کنترل مثبت حاوی DNA تیلریا لستوکاردی و پرایمرهای اختصاصی برای ژن clone-5 (باند bp ۵۳۰)
٤- کنترل منفی حاوی DNA ژنومیک گوسفند سالم بدون سابقه قبلی با کنه و استفاده از پرایمرهای F2و R3
۵- کنترل منفی فاقد DNA ژنومیک (آب مقطر) و استفاده از پرایمرهای F2و R3

```
T.Les  7   CCTCCGGAACGAAGAATTAAAAAACCACAAAGAAGACAAGCTAACATATCAACTCAAGTT  66
           |||| |||||||||||||||||| || || |||||||||||||||||||||||||
TashHN 700  CCTCTGGAACGAAGAATTAAAAAACCCCAGAGGAGACAAGCTAACATATCAACTCAAGTT  759

    67   TATCAGGAAGAACTAGAACCTGAAATTTTTGAACTTGAAATTTCATCAGATAGTGATATG  126
         |||||||||||||||||||||||||||||| | ||||| ||||||| ||||||||
   760  TATCAGGAAGAACTAGAACCTGAAATTTTTGAATTGGAAATATCATCAGACAGTGATATG  819

   127  GATGTTGATGAACCTACTGATTCCCATATACAATCTGATGCTATTACTCAAACTGAAACT  186
         |||||||||||||||| |||||||||||||| ||||| |||||||||||||| ||
   820  GATGTTGATGAACCTACTCATTCCCATATACAATCCGATGCAATTACTCAAACTGAATCT  879

   187  CAACCTTATATACCAACTAATTCTA-CTCAAACTCAAACAGATATTCAA-AAACTAGAAG  244
         ||| |  ||  ||||||||   | ||| | | |||||||||| ||| ||||   |||
   880  CAAACAGATGCACCAACTAAAGAAAGCTCTACC-CAAACAGATATCCAACAAACGC-AAG  937

   245  ATATTGAAACTCAAACAGATA-TACCAACTAGTTCAACTC  283
         |||||||||||||||||| | ||| || | ||||| |||
   938  ATATTGAAACTCAAACAGAAAATACAAA-TGGTTCATCTC  976
```

نگاره ٤: مقایسه توالی نوکلوتیدهای شبه TashHN تیلریا لستوکاردی با توالی TashHN در تیلریا آنولاتا.T.Les = توالی نوکلوتیدی بدست آمده از تیلریا لستوکاردی، Theileria annulata schizont Host Nucleous=TashHN

```
T.Les 1    EAPPERRIKKPQRRQANISTQVYQEELEPEIFELEISSDSDMDVDEPTDSHIQSDAITQT  60
           E P ERRIKKPQRRQANISTQVYQEELEPEIFELEISSDSDMDVDEPT SHIQSDAITQT
TashHN 232  EVPLERRIKKPQRRQANISTQVYQEELEPEIFELEISSDSDMDVDEPTHSHIQSDAITQT  291

    61   ETQPYIPTNSTQTQTDIQKLEDIETQTD  88
         E+Q   PT  + TQTDIQ+ +DIETQT+
   292  ESQTDAPTKESSTQTDIQQTQDIETQTE  319
```

نگاره ٥: مقایسه توالی پروتئین شبه TashHN تیلریا لستوکاردی با توالی TashHN در تیلریا آنولاتا.T.Les = توالی پروتئین بدست آمده از تیلریا لستوکاردی، Theileria annulata schizont Host Nucleous=TashHN

بحث

هدف از این مطالعه بررسی وجود یا عدم وجود توالی(های) مشابه Tash در ژنوم تیلریا لستوکاردی و اوویس که عوامل تیلریوز گوسفندی در ایران می باشند، بود. پروتئین‌های Tash در تیلریا آنولاتا و نیز آنالوگ‌های این پروتئین‌ها در تیلریا پاروا شامل گروه هتروژنی از پروتئین‌ها بوده که در مرحله شیزونت بیان می‌شوند و ارتباط مستقیمی با پاتوژنیسیته انگل دارند. تیلریا آنولاتا در گاو باعث تغییر فنوتیپ سلول های میزبان و القا تکثیر لنفوسیتی می شود. ایجاد این تغییرات در سلول های انگل زده مرتبط با توانایی انگل در تغییر مسیرهای آپوپتوز، تقسیم سلولی وبیان ژن در سلول‌های میزبان است(۱۸). مطالعات بسیار زیادی در مورد عوامل تیلریوز گاوی صورت گرفته و محققان فاکتورهای انگلی مختلفی را در ایجاد این اختلال لنفوپرولیفراتیو شناسایی نموده‌اند(۹و ۸، ۷). در مورد پاتوژنیسیته عوامل تیلریوز گوسفندی اطلاعات کمی در دسترس است. دو تا از عوامل تیلریوز گوسفندی در ایران تیلریا لستوکاردی و اوویس، باعث آلودگی گوسفندان در نقاط مختلف ایران شده(۱۱)، اما شدت وعلائم بالینی حاصل از این دو پاتوژن کاملا با یکدیگر متفاوت است. تیلریا لستوکاردی پاتوژنیسیته بالایی داشته و باعث تیلریوز بدخیم گوسفندی شده(۲)، در حالیکه تیلریا اوویس تنها یک بیماری ملایم و خفیف تحت بالینی در گوسفندان ایجاد می‌کند (۱). علاوه بر تفاوت در قدرت بیماری زایی گونه‌های

مختلف تیلریا، مراحل مختلف انگل در یک میزبان مهره دار نیز از نظر قدرت بیماری زایی با هم متفاوت هستند. به نظر می رسد مهمترین مرحله بیماری زایی انگل و بیان ژن های پاتوژن مرحله شیزونتی انگل است چرا که حضور علائم بالینی و ایجاد پرولیفراسیون لنفوسیتی همزمان با تشکیل شیزونت در سلول‌های میزبان بوده و به دنبال تمایز شیزونت به مروزوئیت و یا حذف شیزونت با دارو از شدت علائم بالینی کاسته می شود. با نگرشی بر مطالعات گذشته که بر روی پروتئین‌های پاتوژن عوامل تیلریوز گاوی صورت گرفته میتوان حداقل ۳ دسته از مولکول های ترشحی پاتوژن انگلی را که در روند بیماری موثر هستند، در نظر گرفت: ۱. برخی از فاکتور های انگلی که پس از تولید و ترشح از انگل بر مسیرهای انتقال پیام در سیتوپلاسم سلول میزبان تاثیر می گذارند (۹و ۸، ۷). ۲. برخی مولکول های انگلی که پس از تولید و ترشح از انگل وارد هسته سلول میزبان میشوند، این پروتئین‌ها حاوی قلابی AT بوده و توانایی اتصال به ژنوم میزبان را داشته طوریکه پس از اتصال به DNA میزبان برخی ژن ها را فعال و از بیان برخی ژن های دیگر جلوگیری به عمل می آورند. از مهمترین این مولکول های انگلی می‌توان به پروتئین‌های Tash AT1,2,3 در تیلریا آنولاتا اشاره نمود (۲۱). ۳. برخی مولکول های پاتوژن انگلی همچون Tash HN که پس از تولید توسط انگل هم در خود انگل و هم در هسته سلول میزبان قابل ردیابی بوده و احتمالا از تمایز شیزونت به مروزوئیت جلوگیری می‌کنند(۲۰). در این مطالعه با طراحی پرایمرهای مختلف به جستجوی توالی های شبه مولکول های دسته ۲ و ۳ در ژنوم تیلریوز گوسفندی پرداخته شد. لازم به ذکر است که برخی عوامل تیلریوز گوسفندی و گاوی در مقایسه با یکدیگر علی الخصوص تیلریا لستوکاردی در گوسفند و تیلریا آنولاتا در گاو از نظر کنه ناقل، آنتی ژنیسیته، ایمنی زایی متقابل قرابت زیادی با هم دارند (۱۳و ۱۲). پس از انجام PCR گرادیانت دمایی تنها یک توالی حدود ٤٢٠bp در ژنوم تیلریا لستوکاردی شناسایی شد و بدنبال تعیین توالی و آنالیز BLAST مشخص شد که این توالی چه در سطح ژن و چه در سطح پروتئین فرضی شباهت بالایی با ژن Tash HN در تیلریا آنولاتا و توالی اورتولوگ آن یعنی ژن TP01_0603 در تیلریا پاروا دارد. بیان Tash HN از قبل از مرحله شیزونتی شروع شده و در زمان تمایز به مروزوئیت بیانش کاهش می یابد (۲۰). مطالعات ایمونوفلورسانس در سلول های حاوی تیلریا آنولاتا نشان داد که این مولکول پس از تولید هم در هسته انگل و هم در هسته سلول میزبان قابل ردیابی است (۲۰). با توجه به الگوی بیان این پروتئین و با توجه به نتایج مطالعات ایمونوفلورسانس احتمالاً این پروتئین نقش مهمی در کاهش قدرت تمایز انگل از مرحله شیزونتی به مروزوئیتی دارد. مسلما افزایش بقا انگل در مرحله شیزونتی که مهمترین مرحله بیماری زایی انگل بوده رابطه مستقیمی با قدرت پاتوژنیسیته انگل دارد. مطالعه حاضر حاکی از وجود توالی مشابه Tash HN در تیلریا لستوکاردی و نه در تیلریا اوویس بود. این نتایج با رفتار انگل در میزبان همخوانی دارد. تیلریا لستوکاردی همانند تیلریا آنولاتا و پاروا انگلی بسیار پاتوژن با مرحله شیزونتی بسیار طولانی است در حالیکه بیماری زایی تیلریا اوویس بسیار پایین و مرحله شیزونتی انگل بسیار کوتاه و گذرا است. طوریکه حتی برخی محققان در وجود مرحله شیزونتی تیلریا اوویس نیز ابراز تردید نموده اند. با توجه به نتایج حاصل احتمالا عدم وجود پروتئین‌های مشابه TashHN در تیلریا اوویس سبب شده تا انگل نتواند مرحله شیزونتی خود را حفظ نموده و متعاقبا تمایز

سریع به سمت مروزوئیت و پیروپلاسما احتمالا از دلایل اصلی کاهش بیماری‌زایی این انگل نسبت به سایر تیلریاهاست.

REFERENCES

1. Alani, A.J., Herbert, I.V. (1988): Pathogenesis of infection with Theileria recondite (Wales) isolated from Haemaphisalis punctata from North Wales. Vet. Parasitol. 4: 293 301.
2. Ali, A.M., Beyer, D., Bakheit, M.A., Kullmann, B., Salih, D.A., Ahmed, J.S., Seitzer, U. (2008): Influence of subculturing on geneexpression in aTheileria lestoquardi-infected cell line. Vaccine. 26: 17-23.
3. Aravind, L., Landsman, D. (1998): AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. Nucleic Acids Res. 26:4413-4421.
4. Bakheit, M.A., Scholzen, T., Ahmed, J.S., Seitzer, U. (2006): Molecular characterization of a Theileria lestoquardi gene encoding for immunogenic protein splice variants. Parasitol. Res. 100: 161–170.
5. Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., Nene, V. (2004): Theileria : intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixidid ticks. Parasitology. 129: 71-83.
6. Dessauge, F., Lizundia, R., Baumgartner, M., Chaussepied, M., Langsley, G. (2005): Taking the Myc is bad for Theileria. Trends. Parasitol. 21: 377–385.
7. Dobbelaere, D., Heussler, V. (1999): Transformation of leukocytes by Theileria parva and Theileria annulata. Ann. Rev. Microbiol. 53: 1–42.
8. Dobbelaere, D.A., Rottenberg, S. (2003): Theileria-induced leukocyte transformation. Curr. Opin. Microbiol. 6: 377–382.
9. Dobbelaere, D.A., Kuenzi, P. (2004): The strategies of the Theileria parasite: a new twist in host-pathogen interactions. Curr. Opin. Immunol. 16: 524–530.
10. Hashemi-Fesharaki, R. (1997): Tick-borne disease of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parassitologia. 39: 115–117.
11. Heidarpour Bami, M., Haddadzadeh, H.R., Kazemi, B., Khazraiinia, P., Bandehpour, M., Aktas, M. (2009): Molecular identification of ovine Theileria species by a new PCR-RFLP Method. Vet. Parasitol. 161: 171-177.
12. Leemans, I., Brown, D., Hooshmand-Rad, P., Kirvar, Erol., Uggla, A. (1999): Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi and Theileria annulata in sheep and cattle: I. In vivo responses. Vet. parasitol. 82: 193-204.
13. McFadden, A.M.J., Rawdon, T.G., Meyer, J., Makin, J., Morley, C.M., Clough, R.R., Tham, K., Müllner, P., Geysen, D. (2011): An outbreak of haemolytic anaemia associated with infection of Theileria orientalis in naïve cattle. N.Z.Vet.J. 59: 79-85.
14. McHardy, N., (1984): Recent advances in the chemotherapy of theileriosis. Prev.Vet. Med. 2: 179–192.
15. Sager, H., Davis, W.C., Dobbelaere, D.A., Jungi, T.W. (1997): Macrophage–parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with Theileria annulata. J. Leukoc. Biol. 61: 459–468.
16. Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan,F.,Ahmed, J.S. (2004): Simultaneously detection and differentiation of Theileria and Babesia parasite infection small ruminants by revers line blotting. Parasitol. Res. 92, 189–196.
17. Shaw, M.k. (2002): Theileria development and host cell invasion. In: world class parasites (ed Dobbelaere, D.A.E. and McKeever, D.J.). Kluwer Academic Publishers; 1-22.
18. Shiels, B., Langsley, G., Weir, W., Pain, A., McKellar, S., Dobbelaere, D. (2006): Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. Int. J. Parasitol. 36: 9–21.
19. Swan, D.G., Phillips, K., Tait, A., Shiels, B.R. (1999): Evidence for localization of a Theileria parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. Mol. Biochem. Parasitol. 101: 117–129.

20. Swan, D.G., Stadler, L., Okan, E., Hoffs, M., Katzer, F., Kinnaird, J., McKellar, S., Shiels, B.R. (2003): TashHN, a Theileria annulata encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. Cell. Microbiol. 5: 947-956.

21. Weir, W., Karagenc, T., Baird, M., Tait, A., Shiels, B. R. (2010): Evolution and diversity of secretome genes in the apicomplexan parasite Theileria annulata. BMC Genomics. 11:42.