

# Genome-wide association study to identify genes and biological pathways related to resistance to bovine tuberculosis based on gene set enrichment analysis

## Abstract

Identifying biological pathways and genes associated with diseases is one of the most important goals of breeding programs in dairy cattle. The aim of the present study was to conduct a genome-wide association study (GWAS) to identify the genes and biological pathways related to resistance to bovine tuberculosis based on gene set enrichment analysis. In total, the information of 1355 cows (consisting 685 cases and 670 controls) from 178 herds were used, of which 592 cases and 559 controls (healthy cows) were passed different quality control steps. These animals were genotyped by using Illumina BovineHD 700k BeadChip for 727252 SNP markers. Genome-wide association study (GWAS) was investigated using mixed linear logistic models, and regions of the genome that were associated with bovine tuberculosis at the 0.05 level were used for identifying the candidate genes and biological pathways associated with bovine tuberculosis based on gene set enrichment analysis. The results of this study finally led to the identification of the pathways such as positive regulation of apoptotic process, cell junction organization, negative regulation of cytokine production and regulation of defense response that were significantly associated with bovine tuberculosis. Further investigation of these pathways showed that most of them are related to the immune system, stress and disease resistance. Also, study of function of the genes that were located in these pathways revealed that the direct association of some of these genes, such as *SLC11A1*, *SLC2A2*, and *CD80*, and the indirect association of genes such as *BCL6*, *HSPD1*, *KCNMA1*, *SPPI1*, *CD24*, *MYO1B*, *CCL20*, and *LCP2* with disease resistance and bovine tuberculosis has also been confirmed in previous studies. In general, due to the importance of identifying the genes affecting bovine tuberculosis from a scientific and economic point of view, the results of this study show that resistance to bovine tuberculosis is closely related to biological pathways and candidate genes associated with nervous system, innate immunity, inflammatory response, immune response regulation, cell junctions, and glucose homeostasis.

**Keywords:** *Genome-wide association study (GWAS), Gene set enrichment, Bovine Tuberculosis, Holstein dairy cattle*

پویش پیوستگی ژنومی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با مقاومت به بیماری سل گاوی بر پایه

آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

## چکیده

شناسایی مسیرهای زیستی و ژن‌های مرتبط با بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف برنامه‌های اصلاح‌نژادی در گاو شیری است. پژوهش حاضر به منظور مطالعه پویش پیوستگی ژنومی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با مقاومت به بیماری سل گاوی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی انجام شد. به این منظور از اطلاعات مجموع، ۱۳۵۵ رأس گاو هلشتاین (۶۸۵ حیوان بیمار و ۶۷۰ حیوان شاهد) از ۱۷۸ گله استفاده شد که پس از انجام مراحل مختلف کنترل کیفیت، اطلاعات ژنوتیپی ۵۹۲ نمونه گاو بیمار و ۵۵۹ نمونه گاو سالم در آنالیزهای نهایی استفاده شدند. تعیین ژنوتیپ این حیوانات با استفاده از تراشه‌های ژنومی Illumina BovineHD 700k BeadChip برای ۷۲۷۲۵۲ جایگاه نشانگری SNP انجام شد. پویش پیوستگی ژنومی (GWAS) با استفاده از مدل‌های خطی مختلط لجستیک مورد بررسی قرار گرفت و مناطقی از ژنوم که در سطح ۰/۰۵ با بیماری سل گاوی در ارتباط بودند به منظور شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با مقاومت به بیماری سل گاوی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی استفاده شد. نتایج این تحقیق در نهایت منجر به شناسایی مسیرهایی، از قبیل مسیرهای تنظیم مثبت فرآیند آپوپتوز، سازماندهی اتصالات سلولی، تنظیم منفی تولید سیتوکین و تنظیم پاسخ دفاعی شد

۳۳ که به طور معنی‌داری با بیماری سل گاوی در ارتباط بودند. بررسی این مسیرها نشان داد که اغلب آنها با سیستم ایمنی، کنترل استرس و مقاومت در برابر  
۳۴ بیماری‌ها در ارتباط هستند. همچنین ارزیابی عملکرد ژن‌های موجود در این مسیرها نشان داد که ارتباط مستقیم برخی از این ژن‌ها مانند *SLC11A1*،  
۳۵ *CD80* و *SLC2A2* و غیر مستقیم ژن‌هایی مانند *CCL20*، *MYO1B*، *CD24*، *SPP1*، *KCNMA1*، *HSPD1*، *BCL6* و *LCP2* با مقاومت به  
۳۶ بیماری‌ها و سل گاوی در تحقیقات گذشته نیز تأیید شده است. در مجموع، با توجه به اهمیت شناسایی جایگاه‌های ژنی تأثیرگذار بر سل گاوی از دیدگاه علمی  
۳۷ و اقتصادی، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد مقاومت به بیماری سل گاوی با مسیرهای زیستی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با سیستم عصبی، ایمنی ذاتی، پاسخ  
۳۸ به التهابات، تنظیم پاسخ ایمنی، اتصالات سلولی و هموستازی گلوکز ارتباط نزدیکی دارد.

۳۹ **کلید واژه‌ها:** پویس کل ژنومی، غنی‌سازی مجموعه ژنی، سل گاوی، گاو شیری هلشتاین

## ۴۰ **مقدمه و پیشینه پژوهش**

۴۱ عفونت سل گاوی<sup>۱</sup> (bTB) به عنوان یکی از دغدغه‌های مهم اقتصادی پرورش گاو شیری در بسیاری از کشورهای جهان  
۴۲ محسوب می‌شود. هزینه‌های سالانه برای کنترل این بیماری در انگلیس و ایرلند به ترتیب ۱۹۰ و ۶۳ میلیون یورو گزارش شده است  
۴۳ (Abernethy *et al.*, 2013). این بیماری، پیامدهای جدی در تجارت بین‌المللی و صادرات محصولات دامی از جمله گوشت گاو به  
۴۴ همراه دارد و از طرف دیگر یک نگرانی برای بهداشت عمومی از طریق توسعه بیماری و انتقال به انسان محسوب می‌شود (Allen  
۴۵ *et al.*, 2018). این نگرانی‌ها به ویژه در کشورهای در حال توسعه بیشتر نیز می‌شود چرا که در این مناطق عمدتاً انسان و دام‌ها در  
۴۶ مجاورت یکدیگر زندگی می‌کنند. هر چند عامل پاتوژن بیماری سل گاوی (*Mycobacterium bovis*) با سل انسانی  
۴۷ (*Mycobacterium tuberculosis*) متفاوت است اما در انسان نیز می‌تواند موجب بروز بیماری شود. در مقیاس جهانی، تخمین زده  
۴۸ می‌شود که این پاتوژن باعث ایجاد ۱۵-۱۰٪ موارد ابتلا به سل انسانی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (Michel *et al.*,  
۴۹ 2010) و از نظر تأثیر بر سلامت انسان و اقتصاد در این کشورها چهارمین بیماری مهم دامی محسوب می‌شود (Perry *et al.*,  
۵۰ 2002). شیوع رو به رشد این بیماری در کشورهای مختلف و محدودیت‌های موجود در روش‌های تشخیصی و کنترلی نیاز به تدوین  
۵۱ رویکردهای جدید برای کمک به کنترل این بیماری را ضروری می‌کند.

۵۲ یک روش بالقوه کنترل این بیماری شناسایی حیواناتی است که از نظر ژنتیکی نسبت به bTB مقاوم‌تر هستند (Abernethy  
۵۳ *et al.*, 2013)، زیرا بسیاری از شواهد نشان می‌دهد که ژنتیک میزبان به طور قابل توجهی در کنترل عفونت به بیماری سل تأثیرگذار  
۵۴ می‌باشد و موجودات مختلف در برابر این بیماری طیف وسیعی از پاسخ‌ها را نشان می‌دهند (Perry *et al.*, 2002; Michel *et al.*,  
۵۵ 2010). بطور کلی انتخاب شدید برای افزایش تولید شیر در گاوهای هلشتاین طی دهه‌های اخیر سبب کاهش عملکرد حیوانات در  
۵۶ برابر برخی از صفات از جمله کاهش مقاومت دام و به دنبال آن افزایش بیماری‌هایی نظیر سل گاوی شده است. با وجود پنج دهه

<sup>1</sup> bovine Tuberculosis

۵۷ آزمایش اجباری پوست و کشتار در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله انگلیس و ایرلند هنوز این کشورها درگیر بیماری سل گاوی  
۵۸ می‌باشند (Abernethy *et al.*, 2013). با توسعه ابزارهای ارزیابی ژنومی در طی سال‌های اخیر یکی از روش‌های بالقوه جهت  
۵۹ شناسایی و انتخاب دام‌های مقاوم که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی حیوانات در مقاومت میزبان در  
۶۰ برابر bTB می‌باشد. هدف از این استراتژی این است که گاوهایی که از نظر ژنتیکی نسبت به عفونت به سل گاوی مقاوم هستند را  
۶۱ انتخاب کنند و سایر روش‌های کنترل را نیز توسعه دهند (Alonso-Hearn *et al.*, 2022). انتخاب حیوانات مقاوم در این استراتژی  
۶۲ نیازمند شناسایی مناطقی از ژنوم است که با این صفت در ارتباط می‌باشند.  
۶۳ در سال‌های اخیر مطالعات متعددی برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با مقاومت به بیماری سل گاوی انجام شده است.  
۶۴ چندشکلی در ژن‌های کاندید *SLC11A1* در گاوهای زبو آفریقایی (Kadarmideen *et al.*, 2011)، *TLR1* در هلشتاین چینی  
۶۵ (Sun *et al.*, 2012)، و ژن‌های *IL10RA* و *IL12RB2* در گاوهای بومی ایتالیایی (Mazzone *et al.*, 2023) ارتباط معنی‌داری  
۶۶ را با ابتلا به سل گاوی نشان داده است. عمده تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر بر پایه مطالعه پیوستگی در سطح ژنوم (GWAS)  
۶۷ انجام شده است که در نتیجه آنها ژن‌های کاندیدی متعددی در گاوهای هلشتاین مانند *SLC6A6* (Finlay *et al.*, 2012)، *PTPRT*  
۶۸ و *MYO3B* (Birmingham *et al.*, 2014)، *FKBP5* (Richardson *et al.*, 2016)، *CD80*، *CTSS*، *FCGR1A*، *HFE*،  
۶۹ *IL21R* و *ANO9* (González-Ruiz *et al.*, 2019) و *ERCC4* و *RMI2* (Canive *et al.*, 2022) گزارش شده  
۷۰ است. بنابراین، در مجموع نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد کنترل ژنتیکی مقاومت به بیماری سل در گاوها احتمالاً دارای سازوکار  
۷۱ پیچیده‌ای است و شامل تعداد زیادی مکان ژنی با اثرات متفاوت است.  
۷۲ یکی از مشکلات پژوهش‌های مبتنی بر GWAS در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است  
۷۳ که این عمل باعث می‌شود SNP‌های دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه در نظر گرفته نشوند (محمدی و همکاران، ۱۴۰۱). از طرفی  
۷۴ در مطالعات GWAS به بررسی منفرد نشانگرها پرداخته می‌شود که با توجه به اینکه اکثر نشانگرها فقط با جهش‌های سببی<sup>۱</sup> در عدم  
۷۵ تعادل هستند، ممکن است در جمعیت دیگر این ارتباط متفاوت باشد. لذا تکرارپذیری پایین این تحقیقات می‌تواند در نتیجه عدم حضور  
۷۶ جهش‌های سببی و همچنین فراوانی بسیار کم در بین ژنوتیپ‌ها و توجیه درصد محدودی از واریانس ژنتیکی توسط مجموع جهش‌های  
۷۷ معنی‌دار در مطالعات GWAS باشد (Vischer *et al.*, 2010). یکی از راهکارهای مناسب برای حل این مشکل، انجام مطالعات  
۷۸ پویا کامل ژنوم بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی است. در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک

---

<sup>1</sup> Causal mutations

۷۹ ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و واریانت‌های ژنتیکی در یک دسته یا گروه ژنی که به‌طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی  
۸۰ می‌شود. به عبارتی دیگر، تجزیه و تحلیل پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی با فنوتیپ مورد آزمون قرار می‌گیرد. در این  
۸۱ روش ژن‌هایی مورد بررسی قرار می‌گیرند که به تنهایی اثر آنها بر صفت مورد نظر معنی‌دار نشده و دارای اثرات متوسط هستند، اما اثر  
۸۲ تجمعی آنها روی صفت معنی‌دار می‌شود (عزیزپور و همکاران، ۱۳۹۹). از این روش به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی مناطق ژنومی  
۸۳ مؤثر بر صفت نرخ باروری گاوهای نر (Peñagaricano *et al.*, 2013)، تولید شیر در گاو هلشتاین (عزیزپور و همکاران، ۱۳۹۹)، خلق  
۸۴ و خوی در گاو براهمن (محمدی و همکاران، ۱۴۰۱) و ورم‌پستان در گاو شیری (Brajnik and Ogorevc, 2023) استفاده شده است.  
۸۵ علاوه بر این، اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی است، به عنوان مثال متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم  
۸۶ هیستون، microRNAهای کروماتین و RNAهای بلند غیر کدکننده، با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، و آب و هوا  
۸۷ برای تأثیر بر مشخصات بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh *et al.*, 2016). تعاملات چند سطحی  
۸۸ بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد (Amiri Roudbar *et al.*, 2020). همچنین، شواهد متعددی حاکی از تأثیر  
۸۹ تنوع اپی‌ژنوم بر سلامت و تولید است (Alavi *et al.*, 2022). بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌طور موقت و چند بعدی کنترل می‌شود. تنها  
۹۰ مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله رشد بستگی دارد (Heidarpour *et al.*,  
۹۱ 2011; Khabiri *et al.*, 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت خاص است (Safaei *et al.*, 2023). همچنین  
۹۲ میزان فراورده‌های ژنی که در همان بافت و همچنین سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن ژن را تنظیم می‌کند.  
۹۳ یکی از فعالیت‌های اساسی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات و بررسی آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Bordbar  
۹۴ *et al.*, 2022; Mohammadabadi *et al.* 2024).

۹۵ با توجه به اینکه بر اساس بررسی منابع انجام شده تاکنون تحقیقی در این زمینه برای شناسایی مسیرهای زیستی مرتبط با سل  
۹۶ گاو انجام نشده است، هدف از این تحقیق انجام مطالعات پویش کل ژنومی (GWAS) بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی  
۹۷ جهت شناسایی ژن‌های کاندید و مسیرهای زیستی مرتبط با مقاومت به بیماری سل در گاوهای هلشتاین بود. لذا به عنوان یکی از  
۹۸ اولین مطالعات انجام شده بر پایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی، انتظار می‌رود مسیرهای شناسایی شده در این پژوهش ما  
۹۹ را به سمت ژن‌های مؤثر بر سل در گاوهای هلشتاین هدایت نماید.

۱۰۰

۱۰۱

۱۰۲

۱۰۳

## داده‌ها و اطلاعات مورد نیاز

- ۱۰۴ در این تحقیق از اطلاعات ژنومی مربوط به ۱۳۵۵ رأس گاو هلشتاین شامل ۶۸۵ حیوان بیمار و ۶۷۰ حیوان سالم استفاده شد
- ۱۰۵ که از ۱۷۸ گله در کشور ایرلند جمع‌آوری شده بودند. تشخیص بیماری سل گاوی در حیوانات و گروه‌بندی آنها بر پایه آزمون توبرکولین
- ۱۰۶ مقایسه‌ای داخل جلدی<sup>۱</sup> (SICTT) انجام شده است که جزئیات این آزمون و نحوه جمع‌آوری داده‌ها به ترتیب توسط Abernethy و
- ۱۰۷ همکاران (۲۰۰۶) و Bermingham و همکاران (۲۰۱۴) ارائه شده است. تعیین ژنوتیپ این حیوانات با استفاده از تراشه‌های
- ۱۰۸ ژنومی Illumina BovineHD 700k BeadChip برای ۷۲۷۲۵۲ جایگاه نشانگری SNP انجام شده است. داده‌های ژنوتیپی و
- ۱۰۹ رکوردهای فتوتیپی مورد استفاده در این تحقیق در پایگاه ذخیره‌ای برخط Dryad به آدرس
- ۱۱۰ <https://doi.org/10.5061/dryad.519bm> در دسترس می‌باشد.

۱۱۱

## بررسی کنترل کیفیت داده‌ها

- ۱۱۲ کنترل کیفیت حیوانات و نشانگرهای SNP تعیین ژنوتیپ شده طی دو مرحله انجام شد. ابتدا حیواناتی که دارای نرخ فراخوانی
- ۱۱۳ ژنوتیپی<sup>۲</sup> کمتر از ۹۰٪ و همچنین میانگین امتیاز GC<sup>۳</sup> کمتر از ۰/۶۵ بودند از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. سپس نشانگرهایی
- ۱۱۴ که دارای فراوانی آلل نادر<sup>۴</sup> (MAF) کوچکتر از ۰/۰۵ و همچنین نرخ فراخوانی نشانگری<sup>۵</sup> کمتر از ۹۰٪ بودند حذف شدند
- ۱۱۵ (Bermingham *et al.*, 2014). برای کنترل کیفیت داده‌ها و انجام دو مرحله بالا از نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ استفاده شد
- ۱۱۶ (Purcell *et al.*, 2007). بطوریکه در نهایت اطلاعات ژنوتیپی ۱۱۵۱ حیوان (شامل ۵۹۲ حیوان بیمار و ۵۵۹ حیوان شاهد)، برای
- ۱۱۷ ۶۱۷۰۱۰ جایگاه نشانگری جهت انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۱۱۸

## آنالیزهای آماری پویش پیوستگی در سطح ژنوم (GWAS)

- ۱۱۹ این آنالیز به منظور شناسایی اثرات افزایشی تمام نشانگرهای SNP تأثیرگذار بر مقاومت به بیماری سل در گاوهای هلشتاین
- ۱۲۰ با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. ابتدا برای تعیین اثرات ثابت موثر بر صفت مورد مطالعه یک تجزیه لجستیک اولیه با استفاده از
- ۱۲۱ رویه GLM در محیط R نسخه ۴/۳/۱ انجام شد، تا اثرات ثابت معنی‌دار به عنوان عوامل ثابت در تجزیه و تحلیل‌های پیوستگی در

<sup>1</sup> Single intradermal comparative tuberculin test (SICTT)

<sup>2</sup> Animal call rate

<sup>3</sup> Genotype Call Score

<sup>4</sup> Minor Allele Frequency

<sup>5</sup> SNP Call Rate

۱۲۲ نظر گرفته شوند. اثرات ثابت مورد بررسی شامل سن، گله، فصل، و سال بودند. سپس آنالیزهای پیوستگی ژنومی بین ژنوتیپها و  
۱۲۳ فنوتیپها برای همه نشانگرهای SNP که مراحل کنترل کیفیت را گذارنده بودند، بر پایه مدل‌های لجستیک با استفاده از PLINK  
۱۲۴ نسخه ۱/۹ (Purcell *et al.*, 2007) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مشاهده توزیع معنی‌داری نشانگرها در سطح ژنوم از گراف منهتن  
۱۲۵ استفاده شد. برای ترسیم گراف‌های منهتن که موقعیت ژنومی نشانگرها را در مقابل مقدار p در نظر گرفته شده ترسیم می‌نماید، از  
۱۲۶ نرم‌افزار SNPEVG نسخه ۳/۲ استفاده گردید (Wang *et al.*, 2012).

### ۱۲۷ آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

۱۲۸ آنالیزهای غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی با هدف شناسایی نواحی ژنومی، ژن یا ژن‌های موثر بر عملکرد صفت، تعیین مسیرهای  
۱۲۹ بیولوژیکی و تخصیص عملکرد و خصوصیات بیولوژیکی<sup>۱</sup> به ژن‌ها و ارتباط آن با فنوتیپ، انجام می‌شود (Wang *et al.*, 2015) که به  
۱۳۰ طور کلی مراحل آن عبارتند از (Mooney *et al.*, 2014):

### ۱۳۱ - تخصیص یا ارتباط دادن نشانگرهای SNP به ژن‌های مربوطه

۱۳۲ SNPهایی که سطح معنی‌داری آنها کمتر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم‌افزاری biomaRt2 در محیط R نسخه ۳/۶/۱ با  
۱۳۳ دستور getBM و با استفاده از ژنوم مرجع گاو (*Bos taurus* UMD 3.0) به ژن‌هایی که نشانگر SNP موردنظر در داخل آن ژن و  
۱۳۴ یا 30 kb بالادست یا پایین‌دست آن ژن (Peñagaricano *et al.*, 2013) قرار داشت، ارتباط داده شدند. برای تفسیر بهتر عملکرد  
۱۳۵ ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (<http://www.genecards.org>) و UniProtKB  
۱۳۶ (<http://www.uniprot.org>) استفاده گردید.

### ۱۳۷ - تخصیص ژن‌ها به گروه‌های عملکردی<sup>۲</sup> و مسیرهای بیولوژیکی:

۱۳۸ جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از نرم‌افزار GO2MSIG  
۱۳۹ (<http://www.go2msig.org/cgi-bin/prebuilt.cgi?taxid=9913>) استفاده شد. برنامه GO2MSIG از پنج پایگاه اطلاعاتی  
۱۴۰ شامل هستی‌شناسی ژن (GO, <http://www.geneontology.org>)، مسیر بیوشیمیایی KEGG (<http://www.genome.jp/keg>)،  
۱۴۱ Panther (<http://www.pantherdb.org>)، Metacyc (<http://www.metacyc.org>) و Reactome  
۱۴۲ (<http://www.reactome.org>) جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی استفاده می‌نماید. در این مرحله فرض بر این

<sup>1</sup> GO terms

<sup>2</sup> Functional categories

۱۴۳ است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و  
۱۴۴ مشترک مانند شرکت در سه فرایند هستی‌شناسی شامل فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی را دارند، در نظر گرفته  
۱۴۵ شوند. ژن‌هایی که به این ترتیب به GO یا مسیرهای مشابهی اختصاص داده شدند، به عنوان اعضای از یک مجموعه ژنی می‌باشند  
۱۴۶ که نسبت به یک صفت، مرتبط‌تر هستند.

#### ۱۴۷ - آنالیز ارتباطیابی بین هر GO و فنوتیپ صفت مورد مطالعه:

۱۴۸ ارتباط‌های معنی‌دار مسیرهای عملکردی با صفت مقاومت به بیماری سل گاوی با استفاده از توزیع فوق هندسی و آماره  
۱۴۹ Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. P-value مسیرهای عملکردی با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ که تعداد k ژن  
۱۵۰ معنی‌دار در آن قرار دارد با کمک رابطه زیر محاسبه شد (محمدی و همکاران، ۱۴۰۱):

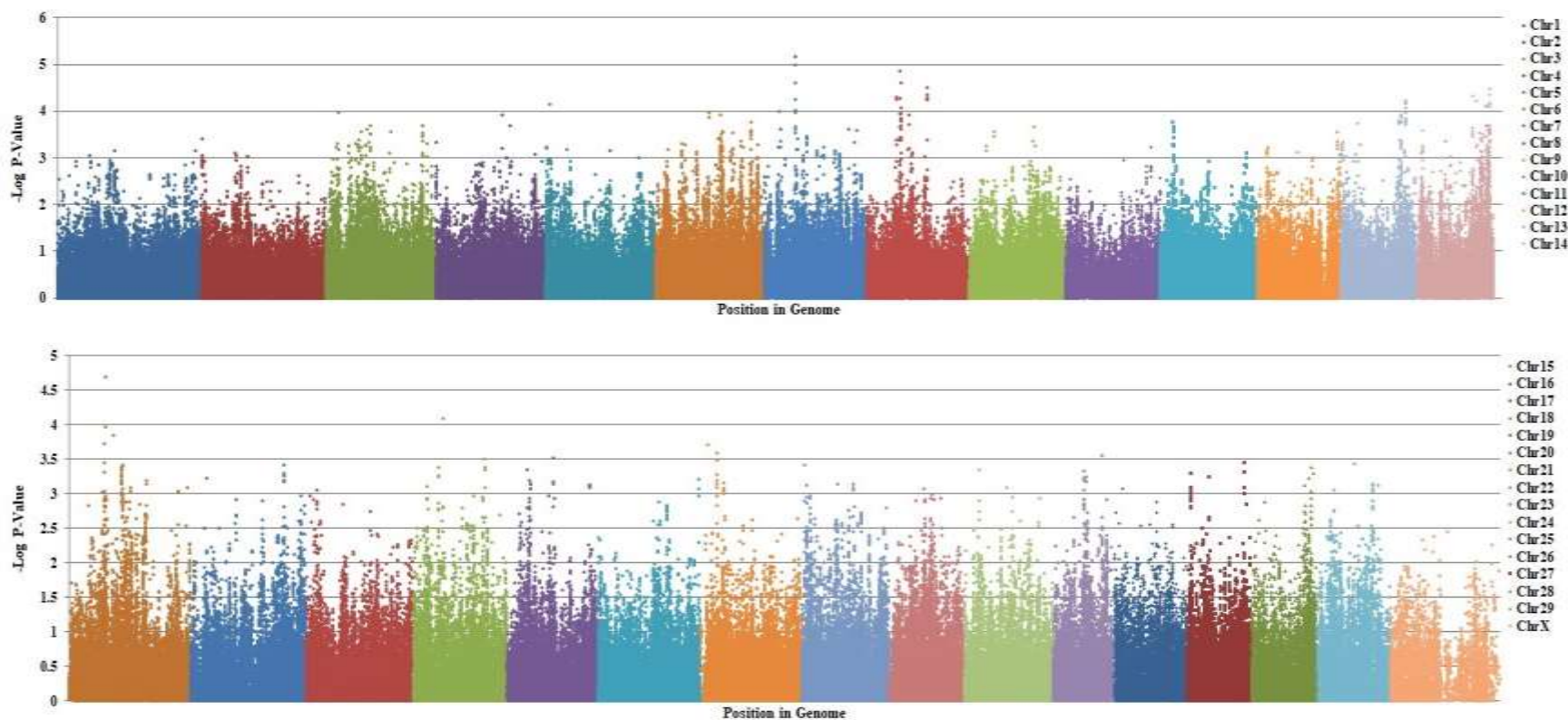
$$P - Value = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{S}{i} \binom{N-S}{m-i}}{\binom{N}{m}}$$

۱۵۲ که در این رابطه k، برابر با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی؛ S، برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت  
۱۵۳ موردبررسی؛ N، برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه تجزیه و تحلیل شدند و m، برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر  
۱۵۴ عملکردی می‌باشد. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم‌افزاری goseq در محیط نرم‌افزار R نسخه ۳/۶/۱ انجام شد.

#### ۱۵۵ یافته‌های پژوهش و بحث

#### ۱۵۶ مطالعه پویش پیوستگی ژنومی (GWAS)

۱۵۷ مطالعه پویش پیوستگی ژنومی جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری سل گاوی انجام و نتایج حاصل بصورت گراف  
۱۵۸ منهتن در شکل ۱ نمایش داده شده است. در این شکل هر چه ارزش p-value هر نشانگر SNP بیشتر باشد نشان‌دهنده ارتباط بیشتر  
۱۵۹ آن نشانگر با بیماری سل گاوی بر اساس مطالعات پویش ژنومی در این تحقیق است. نتایج حاصل نشان داد هرچند معنی‌دارترین  
۱۶۰ نشانگرهای مرتبط با این صفت روی کروموزوم‌های ۷، ۸، ۱۵ و ۱۴ قرار دارند (شکل ۱)، اما بیشترین تعداد نشانگر معنی‌دار در سطح  
۱۶۱ ۰/۰۵ مربوط به کروموزوم‌های ۶ (۲۱۶۱ نشانگر)، ۳ (۱۸۷۸ نشانگر)، ۷ (۱۸۵۶ نشانگر) و ۱ (۱۳۷۷ نشانگر) بودند.



- ۱۶۴ شکل ۱- گراف منهن مطالعه پویس پیوستگی ژنومی (GWAS) برای بیماری سل گاوی: در این گراف روی محور X موقعیت SNPها در کروموزومهای مختلف و روی محور Y ارزشهای منفی  
 ۱۶۵ لگاریتم مربوط به P-Value پیوستگی در سطح ژنوم برای بیماری سل گاوی نمایش داده شده است. نتایج مربوط به ۱۴ کروموزوم روی گراف بالا و بقیه کروموزومها در گراف پایین قابل مشاهده است. در این گراف  
 ۱۶۶ کلیه نشانگرهای SNP که دارای ارزش بالای ۱/۳ و ۲ هستند به ترتیب در سطح معنی داری ۰/۰۵ و ۰/۰۱ با صفت مورد مطالعه در ارتباط می‌باشند.



۱۶۷ آنالیز GWAS بر پایه عدم تعادل پیوستگی<sup>۱</sup> (LD) بین نشانگر SNP و واریانت‌های علی استوار هستند. در این مطالعات به دلیل  
۱۶۸ این که میزان LD بین نشانگرهای SNP و واریانت‌های علی در سطح جمعیت معمولاً کم است و از طرف دیگر سطح معنی‌داری  
۱۶۹ جهت انتخاب و گزارش نشانگرهای مرتبط با صفات با استفاده از آزمون‌های چندگانه (مانند آزمون بنفرونی یا نرخ تشخیص اشتباه<sup>۲</sup>  
۱۷۰ (FDR) بسیار پایین است (Kadarmideen, 2014)، در نتیجه تعداد بسیار کمی نشانگر در نهایت باقی می‌ماند، که می‌تواند بخش  
۱۷۱ کوچکی از کل واریانس ژنتیکی را توجیه و توصیف نماید. این نکته سبب چشم‌پوشی از SNPها و نواحی ژنومی کمتر معنی‌دار، و در  
۱۷۲ نتیجه از دست دادن بعضی از ژن‌های کاندید کلیدی و مسیرهای وابسته می‌شود (Peñagaricano et al., 2013). مطالعات GWAS  
۱۷۳ علاوه بر این که اثر متقابل بین نشانگرها را در نظر نمی‌گیرند، دارای معایبی از قبیل عدم تایید نتایج حاصل از یک جمعیت، در جوامع  
۱۷۴ دیگر تحت عنوان وراثت‌پذیری گمشده می‌باشند (Visscher et al., 2012). در نظر گرفتن اثر بین ژن‌ها در یک مجموعه ژنی به  
۱۷۵ عنوان یکی از راهبردهای مؤثر در جهت کاستن این محدودیت‌ها پیشنهاد شده است (Chen et al., 2016). تئوری غنی‌سازی مجموعه  
۱۷۶ ژنی علاوه بر این که امکان مطالعه نقش ژن‌ها در مسیرهای زیست‌شناسی را فراهم می‌آورد، با تجزیه و تحلیل مجموعه‌ای از ژن‌های  
۱۷۷ مؤثرتر بر تغییر بروز صفات، امکان شناسایی نشانگرهای مؤثر بر بروز صفت با صحت بالاتر را نیز فراهم می‌سازد (Mazzoni et al.,  
۱۷۸ 2017).

### تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

۱۷۹  
۱۸۰ پس از انجام GWAS جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری سل گاوی، کلیه ژن‌های گزارش شده در مناطقی که در  
۱۸۱ سطح  $0.05$  با این صفت در ارتباط بودند ( $-\log P\text{-Value} > 1.3$ ) شناسایی شد و سپس جهت تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های  
۱۸۲ ژنی معنی‌دار مرتبط با بیماری سل مورد استفاده قرار گرفت. قابل ذکر است با توجه به اینکه در این مطالعه تعداد جایگاه‌های نشانگری  
۱۸۳ معنی‌دار در سطح  $0.05$ ، شامل ۲۷۸۸۱ SNP (از مجموع ۶۱۷۰۱۰ جایگاه نشانگری SNP مورد بررسی) بود، تعداد ۱۶۲۶ ژن در  
۱۸۴ داخل یا مجاورت نشانگرهای معنی‌دار شناسایی شدند. در نتیجه تعداد زیادی مسیرهای هستی‌شناسی در سه بخش فرآیندهای  
۱۸۵ بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی شناسایی شدند که پس از بررسی عمکلرد هر کدام از GO Termها، تنها مسیرهایی  
۱۸۶ که با سیستم ایمنی ذاتی، اکتسابی و مقاومت به بیماری مرتبط و معنی‌دار بودند، در جدول ۱ گزارش شدند.

۱۸۷

<sup>1</sup> Linkage Disequilibrium

<sup>2</sup> FDR: False Discovery Rate

کد هستی‌شناسی (GO ID)	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) (GO Term)	کل ژن‌های موجود در مسیر (No. genes in the GO term)	ژن‌های کاندیدای در هر مسیر (Candidate genes in each of the Term)	ارزش P- تصحیح شده (Adjusted p-value)
<b>فرایند زیستی (Biological process)</b>				
GO:0043065	Positive regulation of apoptotic process	31	<i>BCL6*</i> , <i>HSPD1</i> , <i>KCNMA1</i> , <i>BIN1</i> , <i>MPP5</i> , <i>ECT2</i> , <i>FRZB</i> , <i>RHOB</i> , <i>ERBB4</i>	1.21E-05
GO:0034330	Cell junction organization	8	<i>SPPI</i> , <i>IBSP</i> , <i>IFT80</i> , <i>NOG</i> , <i>PSMC2</i> , <i>RRAS2</i> , <i>SEMA7A</i> , <i>TMEM119</i>	1.96E-03
GO:0002839	Positive regulation of immune response to tumor cell	8	<i>BCL6</i> , <i>DNAJB6</i> , <i>WASF2</i> , <i>CORO1C</i> , <i>DOCK2</i> , <i>FLNB</i> , <i>PALLD</i> , <i>XIRP1</i>	2.45E-03
GO:0097194	Execution phase of apoptosis	3	<i>WDPCP</i> , <i>CORO1C</i> , <i>RAC1</i>	4.18E-03
GO:0080134	Regulation of response to stress	56	<i>BCL6</i> , <i>CD24</i> , <i>ATR</i> , <i>CD47</i> , <i>CD86</i> , <i>CD96</i> , <i>POLQ</i> , <i>EPHB1</i>	1.5E-2
GO:0097190	Apoptotic signaling pathway	32	<i>CD24</i> , <i>CFLAR</i> , <i>EPHA2</i> , <i>NCK1</i> , <i>OPAI</i> , <i>PINK1</i> , <i>SKIL</i>	3.0E-2
GO:0001818	Negative regulation of cytokine production	14	<i>BCL6</i> , <i>CD24</i> , <i>CD96</i> , <i>EPHA2</i> , <i>NMI</i> , <i>S100B</i> , <i>TIGIT</i> , <i>APOD</i> , <i>FN1</i> , <i>GHSR</i>	3.0E-2
GO:0032682	Negative regulation of chemokine production	4	<i>EPHA2</i> , <i>S100B</i> , <i>APOD</i> , <i>MUL1</i>	3.2E-2
GO:0032467	Positive regulation of cytokinesis	5	<i>CUL3</i> , <i>DRD3</i> , <i>ECT2</i> , <i>PKP4</i> , <i>TASIR2</i>	3.4E-2
GO:0032465	Regulation of cytokinesis	7	<i>CUL3</i> , <i>DRD3</i> , <i>ECT2</i> , <i>PIK3R4</i> , <i>PKP4</i> , <i>PRPF40A</i> , <i>TASIR2</i>	4.3E-2
GO:0006979	Response to oxidative stress	18	<i>ALS2</i> , <i>ATP13A2</i> , <i>ERCC3</i> , <i>ETV5</i> , <i>NDUFB4</i> , <i>PINK1</i> , <i>APOD</i> , <i>CRYAA</i>	5.0E-2
GO:0042098	T cell proliferation	11	<i>CD24</i> , <i>CD80</i> , <i>CD86</i> , <i>NCK1</i> , <i>SATB1</i> , <i>HES1</i> , <i>IGFBP2</i>	6.7E-2
GO:0031347	Regulation of defense response	28	<i>BCL6</i> , <i>MYO1B</i> , <i>GPR17</i> , <i>AHSG</i> , <i>APOD</i> , <i>CPA3</i> , <i>GHSR</i>	9.2E-2
GO:0070098	Chemokine-mediated signaling pathway	6	<i>CCL20</i> , <i>CXCR1</i> , <i>ACKR4</i> , <i>PADI2</i> , <i>ROBO1</i> , <i>TFF2</i>	9.5E-2

## عملکرد مولکولی

## (Molecular Function)

GO: 0008565	Protein transporter activity	8	<i>SLC11A1, USO1, VPS29, AP1S3, COG2, IPO13, IPO7, KPNA5</i>	4.08E-03
-------------	------------------------------	---	--	----------

## اجزای سلولی

## (Cellular component)

GO: 0005911	Cell-cell junction	9	<i>LCP2, SLC2A2, WASF2, WTIP, CLIC4, MAGI3, NRCAM, PKD2, TENM2</i>	2.05E-03
-------------	--------------------	---	--	----------

## KEGG

## ECM-receptor interaction

۱۹۰ \* ژن‌های کاندیدای مرتبط با مقاومت به بیماری‌ها و بیماری سل گاوی به شکل ایتالیک و پررنگ مشخص شده‌اند.

- ۱۹۱ همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است نتایج تحقیق حاضر بر پایه غنی‌سازی مجموعه ژنی نهایتاً منجر به شناسایی
- ۱۹۲ مسیرهایی شد که ارتباط معنی‌داری با بیماری سل گاوی داشتند. بررسی ژن‌های موجود در هر مسیر نشان داد که برخی از آنها در
- ۱۹۳ تحقیقات قبلی نیز به عنوان ژن کاندیدا برای مقاومت به بیماری‌های مختلف گزارش شده‌اند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم
- ۱۹۴ می‌تواند با بیماری سل در ارتباط باشند. در زیر با جزئیات بیشتر به برخی از این مسیرها و ژن‌های کاندید در هر مسیر اشاره می‌شود.
- ۱۹۵ از مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با بیماری سل می‌توان به مسیر تنظیم مثبت فرآیند آپوپتوز<sup>۱</sup> اشاره کرد که از بین ژن‌های
- ۱۹۶ معنی‌دار در این مسیر، ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های کاندیدای *BCL6*, *HSPD1* و *KCNMA1* در مطالعات قبلی با بیماری‌های
- ۱۹۷ مختلف گزارش شده است. Frie و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای بر روی گاوهای مبتلا به بیماری لوسمی ویروسی گاوی<sup>۲</sup> (BLV)
- ۱۹۸ نشان دادند که میزان بیان ژن کاندیدای *BCL6* با مقاومت حیوانات به این بیماری در ارتباط می‌باشد. این ژن در مجموعه‌های
- ۱۹۹ ژنی مرتبط با مسیرهای متعددی در این تحقیق شناسایی شده است (جدول ۱) که به نظر می‌رسد یکی از ژن‌های کاندیدای مهم
- ۲۰۰ شناسایی شده در این تحقیق می‌باشد. در تحقیقات مختلف دیگری نیز نشان داده شده است که ژن کاندیدای *HSPD1* با ایمنی
- ۲۰۱ ذاتی در گاو و بسیاری از گونه‌های دیگر در ارتباط است (Prohászka and Fust, 2004; Donaldson *et al.*, 2005). از طرفی
- ۲۰۲ Pineda و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که ژن کاندیدای *KCNMA1* در این مسیر، در اختلالات عصبی نقش دارد.
- ۲۰۳ از دیگر مسیرهای هستی‌شناسی معنی‌دار مرتبط با مقاومت به بیماری، مسیر سازماندهی اتصالات سلولی<sup>۳</sup> می‌باشد که از میان
- ۲۰۴ ژن‌های کاندیدای موجود در این مسیر، ژن *SPPI* بیشترین ارتباط را با پاسخ به سیستم ایمنی نشان داده است. Alain و همکاران

<sup>1</sup> Positive regulation of apoptotic process

<sup>2</sup> Bovine leukemia virus

<sup>3</sup> Cell junction organization

- ۲۰۵ (۲۰۰۹) با بررسی گاوهای نر با مقادیر ارزش‌های اصلاحی بالا برای امتیاز سلول‌های بدنی (SCS)، که نشانگر سلامت غدد پستانی
- ۲۰۶ است، چهار چندشکلی در توالی ژنومی *SPP1* گزارش کرد که با مقاومت حیوانات به بیماری ورم‌پستان در ارتباط می‌باشد. در
- ۲۰۷ مطالعه‌ای روی بلدرچین ژاپنی مشخص گردید ژن کاندیدای *SSP1* همراه با ژن *IL26* نقش کلیدی در پاسخ به التهاب داشتند
- ۲۰۸ (Dudemaine et al., 2014).
- ۲۰۹ مسیر تنظیم منفی تولید سیتوکین<sup>۱</sup> یکی دیگر از مسیرهای مرتبط با مقاومت به بیماری بود. از بین ژن‌های معنی‌دار در این
- ۲۱۰ مسیر مرتبط با سیستم ایمنی می‌توان ژن *CD24* را نام برد. در مطالعه با فراتحلیل اثر چندشکلی موجود در ژن کاندیدای *CD24*
- ۲۱۱ با بیماری التهاب روده نشان داده شد که این ژن با پاسخ به التهاب در ارتباط می‌باشد (Huang et al. 2015). در ضمن یکی از
- ۲۱۲ خانواده‌های این ژن به نام *CD80* که در مسیر T cell proliferation تحقیق حاضر نیز مشاهده می‌شود در طی یک مطالعه
- ۲۱۳ GWAS در گاوهای هلشتاین مکزیک به عنوان ژن کاندیدا برای بیماری سل گاوی گزارش شده است (González-Ruiz et al., 2019).
- ۲۱۴
- ۲۱۵ ژن *MYO1B* در مسیر تنظیم پاسخ دفاعی<sup>۲</sup> یکی دیگر از ژن‌های کاندیدایی است که در تحقیقات قبلی به عنوان یکی از
- ۲۱۶ ژن‌های مؤثر بر سیستم ایمنی حیوانات مشاهده شد. Chen و همکاران (۲۰۲۳) با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی موجود در
- ۲۱۷ بافت‌های اپتلیال پستان گاوهای شیری در پاسخ به به اشربشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس چهار سری داده میکروآرایه را با
- ۲۱۸ استفاده از سامانه‌های تلفیقی با هم ترکیب کردند. نتایج آنها نشان داد که ژن *MYO1B* یکی از ژن‌هایی است که در پاسخ به این
- ۲۱۹ عفونت‌ها دارای بیان متفاوت بوده و در مقاومت به این عفونت‌ها در گاو شیری مؤثر می‌باشد. مسیر بیولوژیکی سیگنال‌دهی
- ۲۲۰ میانجی‌گری شده با کموکین<sup>۳</sup> از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با مقاومت به بیماری شناسایی شد. در مطالعه پویش ژنومی با
- ۲۲۱ هدف شناسایی جایگاه‌های ژنی مرتبط با بیماری ورم‌پستان در گاوهای شیری، ژن کاندیدای *CCL20* گزارش شده است (Sharifi et al., 2020).
- ۲۲۲ همچنین در مطالعه‌ی پویش کل ژنومی در گاوهای گوشتی، ژن کاندیدای *CCL20* مرتبط با مقاومت به کنه
- ۲۲۳ گزارش گردید (More et al. 2019).

<sup>1</sup> Negative regulation of cytokine production

<sup>2</sup> Regulation of defense response

<sup>3</sup> Chemokine-mediated signaling pathway

۲۲۴ یکی از مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده در تحقیق حاضر در زیربخش عملکرد بیولوژیکی فعالیت انتقال‌دهنده پروتئین<sup>۱</sup> بود.

۲۲۵ ژن *SLC11A1* در میان ژن‌های معنی‌دار در این مسیر یکی از ژن‌های مهم کاندیدا برای صفت سل گاوی می‌باشد.

۲۲۶ Kadarmideen و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی چندشکلی‌های موجود در این ژن در گاوهای زبو آفریقایی گزارش کردند که این ژن یکی از ژن‌های مؤثر بر سل گاوی در این حیوانات می‌باشد.

۲۲۷

۲۲۸ شاید بتوان مسیر اتصالات بین سلولی<sup>۲</sup> که جزء هستی‌شناسی اجزای سلولی است را یکی از مهمترین مسیرهای مؤثر بر سیستم ایمنی در ارتباط با مقاومت به بیماری دانست. در این مسیر پروتئین‌های واسطه جهت ارتباط دادن اسکلت سلولی یک سلول به اسکلت سلولی سلول مجاور یا یک پروتئین در ماتریکس خارج سلولی از سطح غشای پلاسمایی گسترش می‌یابند. این مسیر دارای چندین *chilled Term* است که همه دارای عملکردهای مهمی در فرآیندهای ارتباط و اتصال سلول به هم و یا به بافت همبند پایه هستند. از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، می‌توان به ژن‌های کاندیدای *LCP2* و *SLC2A2* اشاره نمود. Yang و همکاران (۲۰۲۱) با مطالعه پویس کل ژنومی در گوسفندان نژاد قزاق و سافوک با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با سیستم ایمنی، ژن کاندیدای *LCP2* را به عنوان یکی از ژن‌های کاندیدای اصلی برای این صفت گزارش کردند. همچنین گزارش شده است که بین ژن کاندیدای *LCP2* با بیماری‌های تنفسی در گاو ارتباط معنی‌داری وجود دارد (Scott et al., 2021). ژن کاندیدای *SLC2A2* دارای نقش اساسی در انتقال گلوکز به داخل سلول‌ها و تنظیم هموستازی گلوکز می‌باشد. در مطالعه‌ای ژنومی با هدف بررسی چندشکلی موجود در ژن‌های کاندیدای مرتبط با بیماری توبرکلوزیس گاوی، ارتباط معنی‌داری بین تنوع موجود در ژن کاندیدای *SLC2A2* با بیماری توبرکلوزیس گاوی گزارش شده است (Holder et al., 2020).

۲۳۴

۲۳۵ در مجموع، بر اساس بررسی منابع انجام‌شده، پژوهش حاضر یکی از اولین مطالعات پویس کامل ژنوم برپایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی ژن‌ها و مناطق ژنومی مرتبط با بیماری سل گاوی در گاوهای هلشتاین می‌باشد. به‌طور کلی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش می‌تواند ما را به سمت ژن‌های مؤثر بر این صفت هدایت نماید. در این مقاله عملکرد برخی از ژن‌هایی که در تحقیقات قبلی ارتباط آنها با مقاومت به بیماری‌ها یا پاسخ به عفونت‌ها گزارش شده بود با جزئیات بیشتر بررسی شدند. با این وجود از عملکرد و نقش سایر ژن‌های دیگر نمی‌توان چشم‌پوشی کرد و به نظر می‌رسد با انجام تحقیقات بعدی می‌توان شواهد بیشتری از ارتباط بین این ژن‌ها با سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری سل گاوی بدست آورد. همچنین هرچند در تحقیق حاضر به اطلاعات کامل فنوتیپی و شجره‌ای حیوانات دسترسی وجود نداشت ولی نیاز است در تحقیقات بعدی برای صفات

<sup>1</sup> Protein transporter activity

<sup>2</sup> Cell-cell junctions

۲۴۶ آستانه‌ای، که در واقع مجموعه‌ای از جهش‌ها موجب بروز فنوتیپ سالم و بیمار می‌شوند، اثرات پلی‌ژنیک در مدل در نظر گرفته  
۲۴۷ شوند و از فنوتیپ تصحیح شده در آنالیزهای آماری مربوط به GWAS استفاده شود. از طرف دیگر، از آنجا که به رکوردهای  
۲۴۸ فنوتیپی و اطلاعات ژنوتیپی مرتبط با این صفت در گاوهای بومی کشور نیز دسترسی وجود ندارد، بررسی نتایج تحقیق حاضر در  
۲۴۹ نژادهای بومی می‌تواند اطلاعات ارزشمند دیگری در این زمینه فراهم نماید. همچنین با بررسی چندشکلی موجود در ژن‌های  
۲۵۰ کاندیدای شناسایی شده در تحقیق حاضر، در جمعیت‌های مستقل به ویژه در نژادهای گاو بومی می‌توان اطلاعات بیشتری در ارتباط  
۲۵۱ با سازوکار ژنتیکی کنترل کننده این بیماری بدست آورد.

## نتیجه‌گیری

۲۵۲ اگرچه مطالعات مختلف SNP‌های معنی‌داری برای مقاومت به سل گاوی گزارش کرده‌اند، ولی اغلب آنها متفاوت بوده و  
۲۵۳ نهایتاً ژن‌ها و یا مناطق ژنومی مشابه بین تحقیقات بسیار کم بوده است. آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی و مسیرهای بیولوژیکی،  
۲۵۴ می‌تواند به طور بالقوه مکمل تلاش‌های دیگر برای یافتن جایگاه‌های ژنی موثر بر صفات پیچیده در طول ژنوم باشد. لذا تحقیق  
۲۵۵ حاضر با استفاده از پویس پیوستگی ژنومی، جهت شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با مقاومت به بیماری سل  
۲۵۶ گاوی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی انجام شد. در این تحقیق از اطلاعات ژنومی حیوانات بیمار و سالم گاوهای شیری  
۲۵۷ هلشتاین که با استفاده از آرایه‌های ژنومی با تراکم بالا (700 K) تعیین ژنوتیپ شده بودند استفاده شد. در نهایت نتایج این تحقیق  
۲۵۸ منجر به شناسایی مسیرهایی شد که به طور معنی‌داری با بیماری سل گاوی در ارتباط بودند. بررسی این مسیرها با جزئیات بیشتر  
۲۵۹ نشان داد که اکثر این مسیرها با سیستم ایمنی، استرس و مقاومت در برابر بیماری‌ها در ارتباط می‌باشند. همچنین بررسی ژن‌های  
۲۶۰ موجود در این مسیرها نیز نشان داد که مقاومت به بیماری سل گاوی با مسیرهای زیستی مرتبط با سیستم عصبی، ایمنی ذاتی،  
۲۶۱ پاسخ به التهابات، تنظیم پاسخ ایمنی، اتصالات سلولی و هموستازی گلوکز ارتباط نزدیکی دارد و ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم برخی  
۲۶۲ از ژن‌های موجود در این مسیرهای زیستی با بیماری سل گاوی در تحقیقات گذشته نیز تأیید شده است که در متن این مقاله مورد  
۲۶۳ بررسی قرار گرفتند. در مجموع، با توجه به اهمیت شناسایی جایگاه‌های ژنی تأثیرگذار بر سل گاوی از دیدگاه علمی و اقتصادی،  
۲۶۴ نتایج این تحقیق می‌تواند در بهبود عملکرد دام‌های شیری دارای اهمیت زیادی باشد.

۲۶۶

۲۶۷

## سپاسگذاری

- ۲۶۸ نویسندگان مقاله از دکتر برمینگام و همکاران در دانشگاه ادینبورگ به خاطر فراهم نمودن اطلاعات مورد نیاز این تحقیق
- ۲۶۹ صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.
- ۲۷۰

## منابع

- ۲۷۱ عزیزپور، ن؛ خلت‌آبادی فراهانی، ا.ح؛ مرادی، م.ح؛ محمدی، ح. (۱۳۹۹). مطالعه پویش کل ژنومی صفات مرتبط با تولید شیر بر پایه
- ۲۷۲ تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی در گاو هلشتاین. نشریه پژوهش‌های علوم دامی، ۳۰ (۱)، ۷۹-۹۲.
- ۲۷۳ محمدی، ح؛ خلت‌آبادی فراهانی، ا.ح؛ مرادی، م.ح؛ نجفی، ا. (۱۴۰۱). مطالعه پویش کامل ژنوم با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های
- ۲۷۴ ژنی برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با خلق‌وخوی در گاو براهمن. مجله تولیدات دامی، ۲۴ (۴)، ۴۸۱-۴۹۰.
- ۲۷۵

## References

- ۲۷۶ Abernethy, D., Denny, G., Menzies, F., McGuckian, P., Honhold, N., & Roberts, A. (2006). The Northern Ireland
- ۲۷۷ programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, 112, 231-
- ۲۷۸ 237.
- ۲۷۹ Abernethy, D.A., Upton, P., Higgins, I.M., McGrath, G., Goodchild, A.V., Rolfe, S.J., Broughan, J.M., Downs,
- ۲۸۰ S.H., Clifton-Hadley, R., Menzies, F.D., de la Rua-Domenech, R., Blissitt, M.J., Duignan, A., & More, S.J.
- ۲۸۱ (2013). Bovine tuberculosis trends in the UK and the Republic of Ireland. *Veterinary Records*, 172, 312.
- ۲۸۲ Alain, K., Karrow, N.A., Thibault, C., Pierre, J., Lessard, M., & Bissonnette, N. (2009). An early innate immune
- ۲۸۳ marker of *Escherichia coli* mastitis harbors genetic polymorphisms with possible links with resistance to
- ۲۸۴ mastitis. *BMC Genomics*, 10, 444.
- ۲۸۵ Alavi, M., Mozafari, M.R., Ghaemi, S., Ashengroph, M., Hasanzadeh Davarani, F., & Mohammadabadi, M.
- ۲۸۶ (2022). Interaction of Epigallocatechin Gallate and Quercetin with Spike Glycoprotein (S-Glycoprotein) of
- ۲۸۷ SARS-CoV-2: In Silico Study. *Biomedicines*, 10(12), 3074.
- ۲۸۸ Allen, A.R., Skuce, R.A., & Byrne, A.W. (2018). Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland-A Perfect Storm?
- ۲۸۹ the confluence of potential ecological and epidemiological impediments to controlling a chronic infectious
- ۲۹۰ disease. *Frontiers in Veterinary Science*. 5, 109.
- ۲۹۱ Alonso-Hearn, M., Badia-Bringué, G., & Canive, M. (2022). Genome-wide association studies for the
- ۲۹۲ identification of cattle susceptible and resilient to paratuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science*. 9,
- ۲۹۳ 935133.
- ۲۹۴ Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M.R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa,
- ۲۹۵ G.J. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for
- ۲۹۶ classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, 124 (5), 658-674.
- ۲۹۷

- 298 Barazandeh, A., Mohammadabadi, M.R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016). Genome-wide  
299 analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech*  
300 *Journal of Animal Science*, 61(11), 487–495.
- 301 Bermingham, M.L., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R., Allen, A.R., McBride, S.H., Ryder, J.J.,  
302 Wright, D.M., Skuce, R.A., McDowell, S.W.J., & Glass, E.J. (2014). Genome-wide association study  
303 identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity*, 112, 543–551.
- 304 Bermingham, M.L., More, S., Good, M., Cromie, A., Higgins, I., Brotherstone, S., & Berry, T.P. (2009). Genetics  
305 of tuberculosis in Irish Holstein–Friesian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 92, 3447.
- 306 Bermingham, M.L., More, S.J., Good, M., Cromie, A.R., Higgins, I.M., & Berry, D.P. (2010). Genetic  
307 correlations between measures of Mycobacterium bovis infection and economically important traits in Irish  
308 Holstein–Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 5413–5422.
- 309 Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate  
310 genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine  
311 Beadchip and next-generation sequencing. *Animals*, 12 (9), e1103.
- 312 Brajnik, Z., & Ogorevc, J. (2023). Candidate genes for mastitis resistance in dairy cattle: a data integration  
313 approach. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14, 10.
- 314 Canive, M., Badia-Bringué, G., Vázquez, P., Garrido, J.M., Juste, R.A., Fernandez, A., González-Recio, O. &  
315 Alonso-Hearn, M. (2022). A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies  
316 candidate genes involved in dna packaging, dna damage repair, innate immunity, and pathogen  
317 persistence. *Frontiers Immunology*, 13, 820965.
- 318 Chen, Y.C., Guo, Y.F., He, H., Lin, X., Wang, X.F., Zhou, R., Li, W.T., Pan, D.Y., Shen, J., & Deng, H.W.  
319 (2016). Integrative analysis of genomics and transcriptome data to identify potential functional genes of  
320 BMDs in females. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31, 1041-1049.
- 321 Chen, Z., Bian, Z., Chen, X., Li, B., & Li, L. (2023). Identification of key genes in bovine mammary epithelial  
322 cells challenged with Escherichia coli and Staphylococcus aureus by integrated bioinformatics analysis.  
323 *Revista Brasileira de Zootecnia*, 52, e20220064.
- 324 Donaldson, L., Vuocolo, T., Gray, C., Strandberg, Y., Reverter, A., McWilliam, S., Wang, Y., Byrne, K., &  
325 Tellam, R. (2005). Construction and validation of a bovine innate immune microarray. *BMC Genomics*, 6,  
326 1-22.
- 327 Finlay, E.K., Berry, D.P., Wickham, B., Gormley, E.P., & Bradley, D.G. (2012). A genome wide association  
328 scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein–Friesian dairy cattle. *PLoS One*, 7, e30545.
- 329 Frie, M.C., Droscha, C.J., Greenlick, A.E., & Coussens, P.M.. (2018). MicroRNAs encoded by bovine leukemia  
330 virus (blv) are associated with reduced expression of b cell transcriptional regulators in dairy cattle naturally  
331 infected with BLV. *Frontiers Veterinary Science*, 4, 245.
- 332 González-Ruiz, S., Strillacci, M.G., Durán-Aguilar, M., Cantó-Alarcón, G.J., Herrera-Rodríguez, S.E., Bagnato,  
333 A., Guzmán, F., Milián-Suazo, F., & Román-Ponce, S.I. (2019). Genome-wide association study in Mexican



- 334 Holstein cattle reveals novel quantitative trait loci regions and confirms mapped loci for resistance to bovine  
335 tuberculosis. *Animals*, 9(9),636.
- 336 Heidarpour, F., Mohammadabadi, M.R., Zaidul, I.S.M., Maherani, B., Saari, N., Abbas, F., & Mozafari, M.R.  
337 (2011). Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective.  
338 *Pharmazie*, 66 (5), 319-324.
- 339 Holder, A., Garty, R., Elder, C., Mesnard, P., Laquerbe, C., Bartens, M.C., & Connelly, T. (2020). Analysis of  
340 genetic variation in the Bovine SLC11A1 gene, its influence on the expression of NRAMP1 and potential  
341 association with resistance to Bovine Tuberculosis. *Frontiers in microbiology*, 11, 1420.
- 342 Huang, X.L., Xu, D.H., Wang, G.P., Zhang, S., & Yu C.G. (2015). Associations between CD24 gene  
343 polymorphisms and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*,  
344 21(19), 6052.
- 345 Kadarmideen, H.N. (2014). Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: progress, lessons  
346 and opportunities. *Livestock Science*, 166, 232-248 .
- 347 Kadarmideen, H.N., Ali, A.A., Thomson, P.C., Muller, B., & Zinsstag, J. (2011). Polymorphisms of the  
348 SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Animal Genetics*, 42, 656–658.
- 349 Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S.E. (2023). Introduction of a Newcastle  
350 disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14 (4),  
351 221.
- 352 Mazzone, P., Di Paolo, A., Petrucci, L., Torricelli, M., Corneli, S., Sebastiani, C., Ciullo, M., Sebastianelli, M.,  
353 Costarelli, S., & Scoccia, E. (2023). Evaluation of single nucleotide polymorphisms (snps) associated with  
354 genetic resistance to bovine paratuberculosis in marchigiana beef cattle, an Italian native breed. *Animals*,  
355 13(4), 587.
- 356 Mazzoni, G., Pedersen, H.S., de Oliveira Junior, G.A., Alexandre, P., Razza, E.M., Callesen H, Hyttel, P.,  
357 Marcelo, F.G., Ferraz, J.B., & Kadarmideen, H.N. (2017). Application of integrative genomics and systems  
358 biology to conventional and in vitro reproductive traits in cattle. *Animal Reproduction*, 14(3), 507-513 .
- 359 Michel, A.L., Muller, B., & van Helden, P.D. (2010). Mycobacterium bovis at the animal–human interface: a  
360 problem, or not? *Veterinary Microbiology*, 140, 371–381.
- 361 Mohammadabadi, M., Babenko, O., Borshch, O.O., Kalashnyk, O., Ievstafieva, Y., & Buchkovska, V. (2024).  
362 Measurement of the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere  
363 goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16 (3), 317-332.
- 364 Mooney, M.A., Nigg, J.T., McWeeney, S.K., & Wilmot, B. (2014). Functional and genomic context in pathway  
365 analysis of GWAS data. *Trends Genetics*, 30(9), 390-400.
- 366 Moré, D.D., Cardoso, F.F., Mudadu, M.A., Malagó-Jr, W., Gulias-Gomes, C.C., Sollero, B.P., Ibelli, A.M.,  
367 Coutinho, L.L., & Regitano, L.C. (2019). Network analysis uncovers putative genes affecting resistance to  
368 tick infestation in Braford cattle skin. *BMC genomics*, 20, 1-20.
- 369 Peñagaricano, F., Weigel, K.A., Rosa, G.J., & Khatib, H. (2013). Inferring quantitative trait pathways associated  
370 with bull fertility from a genome-wide association study. *Frontiers Genetics*, 3, 307-314.

- 371 Perry, B.D., Randolph, T.F., McDermott, J.J., Sones, K.R., & Thornton, P.K. (2002). Investing in animal health  
372 research to alleviate poverty. ILRI (International Livestock Research Institute): Nairobi, Kenya.
- 373 Pineda, S., Nikolova-Krstevski, V., Leimena, C., Atkinson, A.J., Altekoster, A.K., Cox, C.D., Jacoby, A.,  
374 Huttner, I.G., Ju, Y.K., Soka, M., & Ohanian, M. (2021). Conserved role of the large conductance calcium-  
375 activated potassium channel, KCa1. 1, in sinus node function and arrhythmia risk. *Genomic and Precision  
376 Medicine*, 14(2), e003144.
- 377 Prohaszka, Z., & Fust, G. (2004). Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life.  
378 *Molecular Immunology*, 41, 29-44.
- 379 Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., Bakker, P.I.,  
380 Daley, M.J., & Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based  
381 linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
- 382 Safaei, S.M.H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska, R., Klopenko, N., & Kalashnyk,  
383 O. (2022). An Origanum majorana Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and  
384 Carcass Characteristics in Lambs. *Animals*, 13 (1), e14.
- 385 Scott, M.A., Woolums, A.R., Swiderski, C.E., Perkins, A.D., Nanduri, B. (2021). Genes and regulatory  
386 mechanisms associated with experimentally-induced bovine respiratory disease identified using supervised  
387 machine learning methodology. *Scientific Reports*, 11(1), 22916.
- 388 Sharifi, S., Pakdel, A., Jahanbakhsh, J., Aryan, Y., Mahdavi, A., & Ebrahimie, E. (2020). Molecular mechanisms  
389 of resistance to bovine mastitis. *Livestock Science*, 239, 104068.
- 390 Sun, L., Song, Y., Riaz, H., Yang, H., Hua, G., Guo, A., & Yang, L. (2012). Polymorphisms in toll-like receptor  
391 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Veterinary  
392 Immunology Immunopathology*, 147, 195-201.
- 393 Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., & Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *The American  
394 Journal of Human Genetics*, 90(1), 7-24.
- 395 Visscher, P.M., Wray, N.R., Zhang, Q., Sklar, P., McCarthy, M.I., & Yang, J. (2010). 10 Years of GWAS  
396 Discovery: Biology, Functioning and Translation. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7-24.
- 397 Wang, X., Ma, P., Liu, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Ding, X., Jiang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Sun, D., Zhang, S.,  
398 Su, G., & Yu, Y. (2015). Genome-wide association study in Chinese Holstein cows reveal two candidate  
399 genes for somatic cell score as an indicator for mastitis susceptibility. *BMC genetics*, 16(1), 111.
- 400 Wang, Z., Shen, D., Parsons, D.W., Bardelli, A., Sager, J., Szabo, S., Ptak, J., Silliman, N., Peters, B.A., van der  
401 Heijden, M.S., Parmigiani, G., Yan, H., Wang, T.L., Riggins, G., Powell, S.M., Willson, J.K., Markowitz,  
402 S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., & Velculescu, V.E. (2004). Mutational analysis of the tyrosine  
403 phosphatome in colorectal cancers. *Science*, 304, 1164-1166.
- 404 Yang, H., Yang, Y.L., Li, G.Q., Yu, Q., Yang, J. (2021). Identifications of immune-responsive genes for  
405 adaptative traits by comparative transcriptome analysis of spleen tissue from Kazakh and Suffolk sheep.  
406 *Scientific Reports*, 11(1), 3157.
- 407

## 408 **Extended Abstract**

### 409 **Introduction and Objective:**

410 The identification of genes and pathways that influence economically important traits is one of the main goals in the  
411 breeding of dairy cattle. Bovine tuberculosis (bTB), poses significant economic challenges to the livestock industry  
412 due to its detrimental effects on animal health and productivity. Understanding the genetic basis of resistance to this  
413 disease can facilitate better management practices and breeding strategies aimed at enhancing disease resistance in  
414 cattle populations. The objective of this study was to conduct a genome-wide association study (GWAS) to identify  
415 genes and biological pathways associated with resistance to bovine tuberculosis through gene set enrichment analysis.

### 416 **Methods and Materials:**

417 In this study, data were collected from a total of 1355 cows, including 685 cases (infected with bTB) and 670 controls  
418 (healthy animals), derived from 178 herds. Following various quality control measures, 592 cases and 559 healthy  
419 controls retained for further analysis. The genotyping was performed using the Illumina BovineHD 700k BeadChip,  
420 which provides comprehensive coverage across the bovine genome with a total of 727252 SNP markers. To investigate  
421 associations between SNPs and bovine tuberculosis resistance, mixed linear logistic models were employed.  
422 Subsequently, gene set enrichment analysis was conducted on the regions that were associated with bovine  
423 tuberculosis at the 0.05 level, to elucidate their biological implications regarding pathways related to immune  
424 response, stress regulation, and disease resistance.

### 425 **Results:**

426 Our findings revealed several significant genomic regions linked with bovine tuberculosis susceptibility at  $p < 0.05$   
427 level through GWAS analyses. Gene set enrichment analysis led to the identification of the pathways that were  
428 significantly associated with bovine tuberculosis. Further investigation of these pathways showed that most of them  
429 are related to the immune system, stress and disease resistance. Also, study of function of the genes that were located  
430 in these pathways revealed that some of these genes such as *HSPD1*, *BCL6*, *KCNMA1*, *SPPI*, *CD24*, *CD80*, *MYO1B*,  
431 *CCL20*, *SLC11A1*, *LCP2* and *SLC2A2*, have also been confirmed to be directly or indirectly associated with disease  
432 resistance and bovine tuberculosis in previous studies.

### 433 **Conclusion:**

434 In general, the results of this study elucidate critical biological pathways involved in the mechanisms of disease  
435 resistance, specifically in relation to bovine tuberculosis. These findings not only have the potential to improve animal  
436 health but also to enhance overall productivity within dairy farms. Furthermore, this research contributes significantly  
437 to identifying genomic regions associated with key phenotypic traits, particularly those related to disease resistance,  
438 immunity, and adaptability. Given the increasing economic importance of these traits amid observable climatic  
439 changes in recent years across various countries, our findings could help future breeding strategies aimed at developing  
440 more resilient livestock populations.