

شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به بیماری لکوز (BLV) در گاوهای هلشتاین ایران

مهدی جوان نیکخواه^۱، حسین مرادی شهربابک^{۲*}، محمدحسین مرادی^۳ و علی صادقی سفیدمزگی^۴
۱. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، پردیس ارس، دانشگاه تهران، جلفا، ایران
۲. استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۴. دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹)

چکیده

بیماری ویروس لکوز گاوی (BLV) یکی از بیماری‌های کشنده ویروسی است که هر ساله با ضررهای اقتصادی زیادی در صنعت گاو شیری، همانند کاهش توان تولیدی و عملکرد تولیدمثلی حیوانات مبتلا و در نهایت حذف آن‌ها همراه است. هدف از اجرای این پژوهش شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به BLV در گاوهای هلشتاین ایران بود. به این منظور مجموع ۱۵۲ حیوان برای ۳۰۱۰۵ جایگاه نشانگری SNP با استفاده از تراشه‌های GGP Bovine LD v4 تعیین ژنوتیپ شدند. پس از کنترل کیفیت داده‌های اولیه در نهایت ۲۳۵۱۳ نشانگر SNP در ۱۴۰ رأس دام وارد آنالیزهای بعدی شدند. حیوانات مورد استفاده در دو دسته مقاوم به بیماری یا سالم (۶۸ رأس) و بیمار (۷۷ رأس) گروه‌بندی شدند و بخش‌هایی از ژنوم که در این حیوانات به صورت واگرا هدف انتخاب قرار گرفته بودند با استفاده از آماره نأریب تنا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که چهار منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۲ در این حیوانات هدف انتخاب قرار گرفته‌اند. بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که در داخل یا مجاورت این مناطق ژنومی، ژن‌هایی همانند ژن *STGA1* در کروموزوم ۱، ژن‌های *STK35*، *EBF4* و *PDYN* در کروموزوم ۱۳ و ژن‌های *SLC38A3*، *RASSF1* و *RBM6* در کروموزوم ۲۲ شناسایی شده است. بررسی عملکرد این ژن‌ها نشان داد که این ژن‌ها در سیستم ایمنی و تنظیم چرخه میتوز و میوز و سرکوب سرطان نقش دارند. در مجموع نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمندی در جهت شناسایی مناطق ژنومی کاندیدا و یا ژن‌های سببی مرتبط با این بیماری فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: آماره تنا، بیماری لکوز گاوی، سیستم ایمنی، نشانه‌های انتخاب.

Identification of selective signatures associated with resistance to bovine leukosis (BLV) in Iranian Holstein cows

Mehdi Javan Nikkha¹, Hossein Moradi Shahrabak^{2*}, Mohammad Hossein Moradi³ and Ali Sadeghi-Sefidmazgi⁴

1. Ph.D. Candidate in Animal Breeding & Genetics, Aras International Campus, University of Tehran, Jolfa, Iran

2. Assistant Professor of Animal Breeding & Genetics, College of Agriculture & Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Animal Science, Arak University, Arak, Iran

4. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: Oct. 13, 2020 - Accepted: Feb. 7, 2021)

ABSTRACT

Bovine viral leukemia (BLV) is one of the deadliest viral diseases that is associated with many economic losses in the dairy industry, such as reduced production capacity and reproductive performance of infected animals and their eventual culling. The aim of this study was to identify the selection signatures associated with resistance to BLV in Iranian Holstein cows. For this purpose, a total of 152 animals were genotyped for 30,105 SNP markers using GGP Bovine LD v4 chips. After quality control of the initial data, 23,513 SNP markers in 140 animals of cattle were finally entered for further analysis. The animals used were classified into two groups consisting resistant to disease or healthy (68 animals) and sick (77 animals) animals, and then the regions of the genome that were divergently selected in these animals were evaluated using the unbiased Theta method. The results of this study showed that four genomic regions on chromosomes 1, 13, 20 and 22 were divergently selected in these groups. Study of the genes reported in these regions revealed that some genes such as the *STGA1* on chromosome 1, the *STK35*, *EBF4*, and *PDYN* on chromosome 13 and the *SLC38A3*, *RASSF1*, and *RBM6* on chromosome 22 were previously reported within or adjacent to these genomic regions. Study the function of these genes showed that the genes are involved in the immune system, the regulation of mitotic and meiotic cycles and cancer suppression. Overall, the results of this study can provide a valuable source of information to identify candidate genomic regions or causal genes associated with this disease.

Keywords: Bovine leukosis, Immune system, Selection signatures, Theta statistics.

* Corresponding authors E-mail: hmoradis@ut.ac.ir; moradi.hossein@gmail.com

مقدمه

انتخاب، یکی از نیروهای اصلی است که در طول زمان منجر به ایجاد نشانه‌هایی در نواحی خاصی در سطح ژنگان (ژنوم) می‌شود. این ردپاهای ژنگانی که در نتیجه انتخاب برجای می‌ماند، نشانه‌های انتخاب نامیده می‌شود و می‌تواند در شناسایی جایگاه‌هایی که تحت انتخاب بوده‌اند، استفاده شوند (Kreitman, 2000). در سال‌های اخیر در دسترس بودن اطلاعات ژنگانی گونه‌های دامی اهلی و توسعه ابزارهای آماری، شناسایی این ردپاها را در یک گونه خاص امکان‌پذیر کرده است (Dong *et al.*, 2013). به دنبال انتخاب مثبت و افزایش فراوانی واریانت‌های سودمند، فراوانی آلل‌های موجود در جایگاه‌های خنثی یا به نسبت خنثی که با واریانت مطلوب پیوسته^۱ هستند نیز افزایش خواهد یافت که این پدیده را انتقال همراه^۲ می‌گویند. به کاهش یا حذف تنوع در جایگاه‌های مجاور یک جهش سودمند در فرآیند انتخاب مثبت، جاروب انتخاب^۳ گفته می‌شود (Biswas & Akey, 2012; Moradi *et al.*, 2006). شناسایی نشانه‌های انتخاب، یکی از اهداف بزرگ در ژنتیک جمعیت می‌باشد و به دلیل شناخت مکان‌های ژنی دارای عملکرد و آشکار نمودن تنوع ژنتیکی زیربنای صفات کمی دارای اهمیت است. همچنین شناسایی این نواحی، اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با تکامل و مکانیسم‌های پایه که بر روی تکامل مولکولی تأثیر می‌گذارند، فراهم می‌نماید (Biswas & Akey, 2006; Nielsen, 2005).

نتایج تحقیقات گسترده در طی چند سال اخیر نشان داده است که اهلی کردن و به دنبال آن شکل‌گیری نژادها و انتخاب طبیعی یا مصنوعی باعث ایجاد نشانه‌های انتخاب در مناطق ژنگانی شده است (Hayes *et al.*, 2009; Qanbari *et al.*, 2011; Stella *et al.*, 2010). انتخاب می‌تواند منجر به تغییر فراوانی یک آلل در یک جمعیت شود، در حالی که فراوانی آن در جمعیت‌هایی که تحت انتخاب نبوده‌اند بدون تغییر باقی می‌ماند. نتیجه این حالت ایجاد تفرق در بین

جمعیت‌ها، در این مناطق ژنگانی است. بنابراین تفاوت به نسبت زیاد در فراوانی آللی بین جمعیت‌ها (چه برای خود آلل انتخابی و یا جایگاه‌های اطراف آن) نیز می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از انتخاب مثبت در جایگاه‌های ژنگانی مربوطه به شمار آید (Moradi *et al.*, 2012). این جایگاه‌ها را می‌توان از طریق مقایسه تمایز جمعیتی در نژادهای مختلف با استفاده از روش‌های آماری مناسب شناسایی نمود. از مهم‌ترین آزمون‌های آماری مورد استفاده در این زمینه می‌توان به آماره تمایز جمعیتی یا شاخص تثبیت^۴ (F_{ST}) اشاره کرد (Akey *et al.*, 2002; MacEachern *et al.*, 2009). ارزش‌های F_{ST} مربوط به جایگاه‌های منفرد است و از لحاظ نظری ارزش آن بین صفر (بدون تفاوت) و یک (تفاوت کامل) متغیر است. معیار F_{ST} کاهش در هتروزیگوسیتی بر اثر تفرق آللی را نشان می‌دهد. در واقع این آماره بیانگر کاهش هتروزیگوسیتی در زیر جمعیت‌ها نسبت به آنچه که در حالت طبیعی مورد انتظار است، می‌باشد (MacEachern *et al.*, 2009). یکی از مشکلات اصلی روش F_{ST} این می‌باشد که خطای نمونه‌گیری را در نظر نمی‌گیرد که این مورد با استفاده از روش نآریب تتا (θ) (Weir & Cockerham, 1984) تصحیح شده است. روش‌های F_{ST} و تتا هر دو تفاوت در ژنوم را نشان می‌دهند. زمانی که تعداد حیوانات در جمعیت‌های متفاوت، برابر باشد از روش F_{ST} استفاده می‌شود، اما در مواقعی که تعداد حیوانات جمعیت‌های مختلف، متفاوت باشند جهت لحاظ نمودن آریب ناشی از اندازه جمعیت‌ها، روش تتا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Weir & Cockerham, 1984).

Forough Ameri *et al.* (2016) با استفاده از داده‌های ۷۷۷۹۶۲ SNP پراکنده در سرتاسر ژنوم و ۹۰ حیوان از هشت نژاد گاو بومی ایران (سرابی، کرمانی، سیستانی، نجدی، کردی، تالشی، پارس و مازندرانی) برای شناسایی نشانه‌های انتخاب استفاده کردند. بررسی تمایز جمعیتی با استفاده از روش شاخص تثبیت (F_{ST}) تصحیح شده برای اندازه نمونه

1. Link
2. Genetic Hitchhiking
3. Selective sweep

صرف هزینه‌های قابل توجه برای انجام برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی، بعضی از کشورها برنامه‌هایی جهت ریشه‌کنی آن در دست اجرا دارند (Gottschau *et al.*, 1990; Howard, 1993). شیوع BLV در گاوهای شیری ایالات متحده طی دهه‌های گذشته رو به افزایش بوده است، به طوری که در جدیدترین گزارش تخمین زده می‌شود در حال حاضر حدود ۹۴٪ گله‌ها و ۴۲٪ گاوهای شیری برای آنتی‌بادی‌های BLV مثبت هستند (LaDronka *et al.*, 2018).

چهار حالت پس از قرارگرفتن گاو در معرض ویروس ممکن است رخ دهد: (۱) عدم بروز عفونت به دلیل مقاومت ژنتیکی دام در معرض ابتلا، (۲) بروز عفونت پایدار و تولید پادتن‌های قابل ردیابی، (۳) بروز عفونت پایدار و لنفوسیتوز پایدار که نوعی تکثیر خوش‌خیم لنفوسیتی است و به لنفوسارکوما تبدیل می‌شود، (۴) بروز عفونت پایدار، همراه یا بدون لنفوسیتوز پایدار و وقوع تومورهای سرطانی بدخیم لمفوسارکوما (Jacobsen *et al.*, 1985). ابتلا، عدم ابتلا و بروز مشکلات مختلف درمانگاهی بیماری در دام بستگی به وضعیت ژنتیکی دارد. همچنین ممکن است به توان دستگاه ایمنی حیوان و مقدار ویروس نیز وابسته باشد (Schoepf *et al.*, 1997).

بررسی‌های انجام‌شده در کشور ایران نیز نشان می‌دهد این بیماری یکی از بیماری‌های مهم به‌ویژه در سطح گاوداری‌های صنعتی می‌باشد، که هر ساله باعث ایجاد خسارت‌های مختلفی می‌شود. شیوع گله‌های لکوز آنزوتیک گاو (EBL) در ایران بر اساس تشخیص انتخابی در گاوهای شیری ۴۱/۳٪ گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2011). شیوع کلی عفونت BLV در بین حیوانات در ایران به ترتیب ۲۹/۹٪ و ۳۲/۸٪ توسط Mohammadi *et al.* (2011) و Kazemimanesh *et al.* (2012) ثبت شده است. همچنین در برخی منابع نیز میزان شیوع کلی عفونت BLV بین ۲۰-۳۰٪ گزارش شده است (Mousavi *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری که بر روی جمعیت گاو، گوسفند و شتر انجام شد، میزان شیوع به ترتیب ۲۲/۱٪، ۵/۳٪ و صفر درصد با استفاده از تکنیک PCR گزارش شده است (Nekoei *et al.*, 2015).

(θ) نشان داد که در طول ۳۰ کروموزوم گاو، تعداد هفت ناحیه ژنومی شناسایی شد که نشانه‌های انتخاب در آنها وجود داشت. این نواحی بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۷، ۸، ۱۲، ۱۳ و X واقع بودند. بررسی ژن‌ها و QTL‌های پیشین گزارش شده، نشان داد که این مکان‌ها با ژن‌ها و QTL‌های صفات مهم اقتصادی نظیر صفات مرتبط با تولید و اجزای شیر، وزن بدن، مقاومت به سرما و صفات تولیدمثل مرتبط هستند.

طی تحقیقی نژادهای متفاوتی از گاوهای شیری و گوشتی آلمان، کانادا و استرالیا برای شناسایی نشانه‌های انتخاب، با استفاده از آرایه‌های SNP 50K گاو تعیین ژنوتیپ شدند و ۲۳۶ ناحیه ژنگانی شناسایی شد که تحت انتخاب مثبت قرار گرفته بودند. یکی از مهم‌ترین مناطق شناسایی شده روی کروموزوم ۱۸ قرار داشت که بر پایه تحقیقاتی که پیش‌تر صورت گرفته بود یک QTL بزرگ اثر مرتبط با طول عمر تولیدی و تولیدمثلی در گاو هلشتاین در این ناحیه گزارش شده است (Qanbari *et al.*, 2011). محققانی در پنج نژاد گاو ایتالیایی با استفاده از آماره F_{ST} نشانه‌های انتخاب در کروموزوم‌های ۶ و ۱۳ شناسایی کردند که در این مناطق برخی ژن‌های کاندید برای صفات شیر و گوشت گزارش شده بود (Mancini *et al.*, 2014). همچنین در بررسی با ارزیابی نشانه‌های انتخاب روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۴ در ۳۹۶ حیوان از نژاد *Canchim* (آمیخته شاروله و زبو)، مناطق حاوی ژن‌های مؤثر در سوخت‌وساز^۱ و زیست‌ساخت^۲ ملانین و توسعه استخوان و جنین، شناسایی شدند (Urbinati *et al.*, 2017).

بیماری ویروس لکوز گاوی (BLV) در ابتدا در سال ۱۹۸۱ در آلمان گزارش شد. بعد از جنگ جهانی دوم بر میزان وقوع آن اضافه شد و در اکثر کشورها گزارش گردید (Murphy *et al.*, 1999). لکوز آنزوتیک گاو موجب ضررهای اقتصادی می‌گردد که شامل حذف گاوهای مبتلا، کاهش توان تولید و فعالیت تولیدمثلی و محدودیت‌های صادرات گاو و اسپرم به کشورهای واردکننده می‌باشند (D'angelino *et al.*, 1998; Radostitis *et al.*, 2000). با توجه به

1. Metabolism
2. Biosynthesis

از آن دو عامل فراوانی آلل نادر (MAF: Minor Allele Frequency) و نرخ تعیین نژادگان (Call rate) برای هر نشانگر SNP محاسبه شده و SNP‌هایی که در مجموع گاوها دارای MAF و Call rate به ترتیب کمتر از ۱ درصد و ۹۵ درصد بودند از مراحل بعدی آنالیزها حذف شدند (Moradi *et al.*, 2017). سپس از بین SNP‌های باقیمانده نشانگرهایی که به شدت از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند ($P < 10^{-5}$) به عنوان معیار دیگری از خطای تعیین نژادگان از تجزیه نهایی کنار گذاشته شدند (Teo *et al.*, 2007).

آنالیزهای آماری

در این تحقیق جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با بیماری لکوز گاوی ابتدا حیوانات بر اساس ابتلا به این بیمار به گروه‌های سالم و بیمار دسته‌بندی شدند. برای شناسایی و دسته‌بندی گاوها مورد بررسی در این تحقیق از آزمایش آنتی‌بادی سرم خون (الایزا) دامها استفاده شده و گاوهای سرم مثبت، بیمار و گاوهای سرم منفی، سالم دسته‌بندی شدند. سپس برای شناسایی نواحی تحت انتخاب از آزمون تمایز جمعیتی F_{ST} استفاده شد. آزمون تمایز جمعیتی F_{ST} به دو روش رایب (Wright, 1965) و روش برآوردگر ناریب تتا (θ) (Weir & Cockerham, 1984) محاسبه می‌شود. یکی از مشکلات اصلی روش رایب در نظرنگرفتن خطای نمونه‌گیری است که این مشکل توسط ویر و کوکرهام با ارائه روش تتا تصحیح شد که مستقل از شمار گروه‌های نمونه‌گیری شده و شمار افراد داخل هر گروه است (Weir & Cockerham, 1984). ارزش‌های به دست آمده از این روش‌ها بین ۰ تا ۱ متغیر است. محاسبه‌های مربوط به دو روش رایب و تتا در محیط R برنامه‌نویسی شد (Moradi *et al.*, 2012). پس از محاسبه ارزش تتا برای هر نشانگر SNP، برای نمایش بهتر مناطق تحت انتخاب به جای ارزش هر SNP، میانگین ارزش عددی تتای هر پنج SNP مجاور به عنوان ارزش Win5 هر نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد و سپس نگاره (گراف) منتهن ارزش تمایز جمعیتی تتا در سطح نژادگان گاو هلشتاین با استفاده از نرم‌افزار Haploview 4.1 ترسیم شد.

با توجه به اهمیت صفات سلامت و آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها در صنعت گاو شیری، همچنین نقش مؤثر نژاد هلشتاین در تولید شیر در بیشتر کشورهای جهان، هدف از این تحقیق، کاوش ژنگانی نشانه‌های انتخاب و شناسایی نواحی کاندیدا مرتبط با بیماری لکوز (BLV) در سطح نژادگان گاوهای هلشتاین بود که این تحقیق با همکاری شرکت فکای اصفهان اجرا شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین نژادگان (ژنوتیپ)

در این تحقیق از اطلاعات شرکت "کشت و دامداری فکا" در اصفهان، برای تهیه شجره و داده‌های فنوتیپی استفاده شد. در این تحقیق ابتدا از مجموع ۱۵۲ رأس حیوان خالص هلشتاین نمونه‌گیری شد. با استفاده از اطلاعات شجره‌ای سعی شد که دام‌های نمونه‌گیری شده دارای کمترین رابطه خویشاوندی باشند. در نهایت از این ۱۵۲ رأس دام پس از بررسی و تطابق داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی، ۱۴۵ رأس گاو که هم دارای اطلاعات فنوتیپی و هم دارای اطلاعات ژنومی بودند در آنالیز باقی ماندند. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA استخراج شده، تعیین ژنوتیپ SNP نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های شرکت ایلومینا (Neogen Corporation Company, Lincoln, NE, USA) (GGP Bovine LD v4 30k) GeneSeek (NE, USA) انجام شد (Illumina Inc. San Diego, USA).

ویرایش داده‌ها

جهت اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در تجزیه‌های نهایی، ویرایش داده‌ها و مراحل مختلف کنترل کیفیت (Quality Control) با استفاده از نرم‌افزارهای Excel (Microsoft Office 2010) و Plink (Purcell *et al.*, 2007) بر روی داده‌های اولیه تعیین ژنوتیپ شده، اعمال شد. در نخستین مرحله، گاوهای با بیش از ۵ درصد نژادگان (ژنوتیپ) از دست‌رفته از تجزیه‌های بعدی حذف شدند. دلیل این امر آن است که نمونه‌هایی که نژادگان گمشده بالایی دارند احتمال بیشتری دارد که با خطای تعیین نژادگان همراه باشند (Barendse *et al.*, 2009). پس

SNP در ۱۴۵ رأس گاو (۷۷ رأس بیمار و ۶۸ رأس سالم) انجام شد. ابتدا تعداد ۵ رأس گاو به علت درصد SNP تعیین نژادگان شده کمتر از ۹۵ درصد حذف شدند. از بین نشانگرهای SNP اولیه نیز تعداد ۵۴۵۵ و ۱۰۴۶ نشانگر به دلیل پایین بودن به ترتیب فراوانی آللی نادر و نرخ تعیین نژادگان و در نهایت ۹۱ نشانگر نیز به خاطر انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ از مراحل بعدی آنالیزها کنار گذاشته شدند. در پایان ۲۳۵۱۳ SNP در ۱۴۰ رأس گاو هلشتاین (۶۸ سالم و ۷۲ بیمار) برای ادامه آنالیزها باقی ماند.

شناسایی نشانه‌های انتخاب در حیوانات مقاوم و مبتلا به بیماری لکوز

در این تحقیق گاوهای هلشتاین مورد بررسی قرار گرفتند که به دو علت این رویه پیش گرفته شد: اول این که گله گاوهای شیری غالب ایران از نژاد هلشتاین است. دلیل دوم، میزان بروز لکوز در هلشتاین بالاتر از سایر نژادها است و چون تعداد گاوها نژاد هلشتاین زیاد است میزان تنوع در بروز لکوز نیز بالا می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد در چند منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۲ نشانگرهای SNPهای مجاور، تفرق جمعیتی بالایی داشته و دارای ارزش تنای بالاتر از ۰/۰۳ می‌باشند (شکل ۱). ارزش تنای ۰/۰۳ در مقایسه حیوانات سالم و بیمار در صدک ۹۹/۹ کل ارزش‌های تنای قرار داشتند.

از روش نشانه‌های انتخاب و آماره تنای تاکنون جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری‌های مختلف در گاو شیری استفاده شده است. در یک بررسی جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با ورم پستان در گاوهای هلشتاین در اولین دوره شیردهی از آماره تمایز جمعیتی تنای استفاده کردند. نتایج آنها منجر به شناسایی ۱۰ ناحیه ژنومی کاندیدا برای این صفت روی کروموزوم‌های ۱ (۲ ناحیه)، ۳، ۵، ۶، ۱۴ (۲ ناحیه)، ۲۱ (۲ ناحیه) و ۲۸ شناسایی شد. بررسی‌های بیشتر بیوانفورماتیکی نشان داد که ژن‌های موجود در این مناطق با سیستم ایمنی و بیماری‌های خود ایمنی، سیستم عصبی، انواع سرطان از جمله سرطان پستان و تولید شیر مرتبط می‌باشند (Abbasi Moshaii *et al.*, 2017).

همچنین پس از مرتب‌کردن نشانگرها بر پایه ارزش محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار Excel صدک ۹۹/۹ محاسبه و مناطقی که برای همه نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند به عنوان نشانه انتخاب در نظر گرفته شدند.

در این تحقیق جهت مشخص نمودن جایگاه‌های تحت انتخاب، از روش‌های مبتنی بر تنوع (بررسی سطح تمایز بین جمعیتی) استفاده شد. به این منظور پس از محاسبه ارزش‌های تنای در هر جایگاه نشانگری، با توجه به این که انتخاب افزون بر جهش سودمند جایگاه‌های مجاور آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد (Akey *et al.*, 2002)، به جای در نظرگرفتن ارزش هر نشانگر SNP، میانگین ارزش عددی تنای پنج SNP مجاور به عنوان ارزش Win5 هر نشانگر محاسبه شد (Moradi *et al.*, 2012) و سپس نگاره منهن ارزش تمایز جمعیتی تنای در سطح ژنگان گاو هلشتاین ترسیم شد (شکل ۱). مناطق دارای ارزش بالایی تنای می‌توانند نشان دهنده مناطقی از ژنگان باشند که در گروه‌های سالم و مبتلا به بیماری لکوز به صورت متمایز هدف انتخاب قرار گرفته و می‌توانند به عنوان کاندید برای این صفت مهم اقتصادی در گاوهای هلشتاین مطرح باشند.

بررسی ژن‌های گزارش شده در مناطق حاوی نشانه‌های انتخاب

پس از شناسایی مناطق دارای نشانه انتخاب، برای بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق و ۲۰۰ کیلو جفت باز اطراف آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی Ensemble Biomart tool UMD3.1 Bos Taurus استفاده شد. در نهایت برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (<http://www.genecards.org>) و UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) استفاده شد.

نتایج و بحث

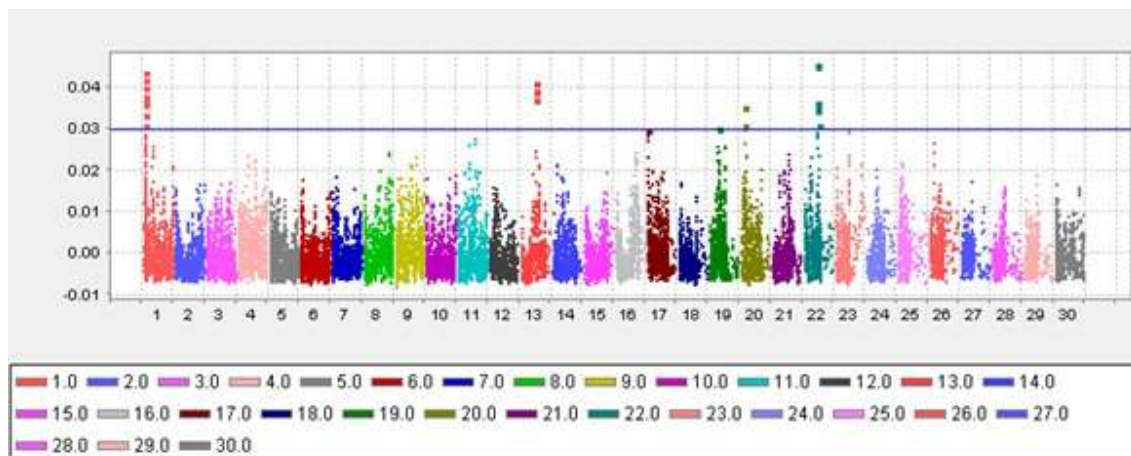
کنترل کیفیت داده‌ها

مراحل مختلف کنترل کیفیت، روی مجموع ۳۰۱۰۵

می‌شود. اگرچه زیر واحدها از نظر میتوز و میوز کمی متفاوت هستند، با این وجود مجموعه کوهسین در بین یوکاریوت‌ها در طی فرایند تکامل حفظ شده است (Guacci *et al.*, 1997) و از چهار زیرواحد تشکیل شده است. در پستانداران این زیرواحدها شامل دو ساختار نگهداری کروموزوم (زیرواحدهای $SMC1\alpha$ یا $SMC1\beta$ و $SMC3$)، یک استرومالین، و درنهایت زیر واحد دامنه HEAT repeat (شامل $STAG1$ یا $STAG2$ یا $STAG3$ که به ترتیب $SA1$ یا $SA2$ یا $SA3$ نیز نامیده می‌شوند) می‌باشند (Carramolino *et al.*, 1997). $SA1/STAG1$ و $SA2/STAG2$ در میتوز وجود دارند، در حالی که $SA3/STAG3$ مختص میوز است. $SA1$ و $SA2$ هر دو با سایر زیر واحدهای کوهسین ارتباط برقرار می‌کنند تا یک گروه متنوع از مجتمع‌های کوهسین در مهره‌داران ایجاد کنند (Carramolino *et al.*, 1997; Sumara *et al.*, 2000).

بررسی ژن‌ها و QTL‌های گزارش شده در مناطق ژنومی حاوی نشانه‌های انتخاب

پس از شناسایی مناطق ژنگانی تحت انتخاب، ژن‌های موجود در این مناطق شناسایی و عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها بررسی شد (جدول ۱). بررسی عملکرد ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف همانند چرخه‌های ایمنی (Wu, 2009) و تنظیم چرخه میتوز و میوز (Sumara *et al.*, 2000) و سرکوب تومورهای سرطانی (Yang *et al.*, 2017) نقش دارند که می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با بیماری لکوز گاور (BLV) در ارتباط باشند. در کروموزوم یک در موقعیت فیزیکی $STGAI$ ژن شناسایی ۱۳۲۶۴۳۵۶۲-۱۳۲۵۱۸۷۱۶ ژن شد. پروتئین حاصل از این ژن، کوهسین نام دارد. انسجام در طول تکثیر DNA قبل از تقسیم‌های میتوز و میوز توسط زیر واحدهای این پروتئین کنترل



شکل ۱. توزیع ارزش‌های Win5 تا در سطح ژنوم حیوانات سالم و مبتلا به بیماری ویروس لکوز گاوی (BLV): موقعیت ژنومی SNP‌ها روی کروموزوم‌های مختلف در محور X و ارزش‌ها آن‌ها روی محور Y نمایش داده شده است. خط ترسیم شده نشان‌دهنده صدک ۹۹/۹ کل ارزش‌های تا می‌باشد.

Figure 1. Distribution of windowed theta values for healthy and patient animals of Bovine leukemia virus (BLV): the SNP position on different chromosomes shown on the X-axis, and win5 theta values are plotted on the Y-axis. The values above the line are in the 99.9 percentile of all Theta values.

جدول ۱. مناطق ژنومی حاوی نشانه‌های انتخاب در حیوانات مقاوم (سالم) و مبتلا به بیماری لکوز گاوی (BLV)، میانگین ارزش‌های تا برای نشانگرهای موجود در این مناطق و ژن‌های گزارش شده در این مناطق ژنومی

Table 1. Genomic regions containing selection signatures in resistant (control) and animals with bovine leukemia virus (BLV), mean theta values for markers in these regions, and genes reported in these genomic regions

Chromosome	Position	The average of theta values	Reported genes in the region
1	132518716-132643562	0.045	<i>STGAI</i>
13	52468051-53142486	0.047	<i>STK35, EBF4, PDYN</i>
20	18310932-18442538	0.033	<i>NDUFAF2</i>
22	50009060-50474049	0.041	<i>SLC38A3, RASSF1, RBM6</i>

از آنجاکه این زیر واحدها بسیار متنوع هستند، طیف گسترده‌ای از مجتمع‌های کوهسین با ترکیب‌های مختلف زیرواحدی در تقسیمات میتوزی و میوزی به وجود می‌آورند. این مجتمع‌های کوهسین در جداسازی کروموزوم، ترمیم DNA، بیان ژن و توسعه و یکپارچگی ژنوم نقش دارند (Demasius *et al.*, 2013). در کروموزوم ۱۳ ژن‌های *STK35*، *EBF4* و *PDYN* در موقعیت فیزیکی ۵۳۱۴۲۴۸۶-۵۲۴۶۸۰۵۱ (سرین/ترئونین کیناز (۳۵) آنزیمی است که به‌طور عمده در هسته یافت می‌شود. این آنزیم کیناز انسانی است که به تازگی شناسایی شده و دارای یک عملکرد اتوفسفوریلاسیون است و به‌طور عملکردی با الیاف اکتین، چرخه سلولی و بقا مرتبط است (Lamore *et al.*, 2017). شواهدی وجود دارد که محصولات *STK35* را به‌عنوان اهداف مناسبی برای تشخیص یا مداخله در آسیب‌شناسی‌های قلبی شناسایی می‌کند (Lamore *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). با توجه به نقش مهم ژن *STK35* در سرطان‌های کولورکتال و سایر سرطان‌ها (Capra *et al.*, 2006) و بیماری مالاریا (Prudêncio *et al.*, 2008). از این‌رو، تحقیقات در مورد نقش‌های فیزیولوژیکی آن بسیار مورد توجه است. بنابراین، *STK35* هم در چرخه سلولی طبیعی و هم در کنترل بیان ژن‌های درگیر در آسیب DNA و واکنش‌های استرس سلولی نقش دارد (Goyal *et al.*, 2011). کاهش *STK35* توسط سلول‌های siRNA از مرگ محافظت می‌کند، درحالی‌که بیان بیش از حد *STK35* باعث افزایش مرگ سلولی غیر آپوپتوز در استرس اکسیداتیو می‌شود (Yasuda *et al.*, 2012). از این‌رو، پیشنهاد می‌شود که *STK35* یک مولکول پاسخگو به استرس است که در تعیین سرنوشت سلول نقش دارد (Yasuda *et al.*, 2012).

ژن *PDYN* یا Prodynorphin که به‌عنوان پروآنکفالین B شناخته می‌شود، یک هورمون پلی‌پپتید افیونی است که در انتقال سیگنال شیمیایی و ارتباط سلولی نقش دارد. این ژن نقش اساسی در ساختمان آندورفین‌ها یا پیام‌رسان‌های شیمیایی در مغز دارد که به نظر می‌رسد به‌شدت در پیش‌بینی و تجربه درد و ایجاد پیوندهای عاطفی عمیق دخیل هستند و در یادگیری و حافظه نیز بسیار مهم می‌باشند (Bicalho *et al.*, 2007; Mee *et al.*, 2011). آنکفالین یک پپتید است که در تنظیم درد در بدن نقش دارد. آنکفالین‌ها به‌عنوان لیگندهای درون‌زا نامیده می‌شوند، زیرا از داخل بدن مشتق شده و به گیرنده‌های مواد افیونی بدن متصل می‌شوند. دو شکل از آنکفالین یافت شده است، یکی حاوی لوسین و دیگری حاوی متیونین است که هر دو محصول ژن *PDYN* هستند (Bicalho *et al.*, 2007). علاوه بر این، نتایج متآنالیز نشان داد که بین *PDYN* در کروموزوم ۱۳ و مشکل زایمان مادر ارتباط وجود دارد، که مطابق با درک بصری است که دشواری زایمان یکی از دردناک‌ترین شرایطی است که یک گاو می‌تواند تجربه کند. در واقع نشان داده شد که *PDYN* با رفتار ادراک درد و فرآیندهای روان‌شناختی مرتبط است و بیان یا تنظیم این هورمون به‌عنوان یک نشانگر بیولوژیکی از استرس در گاوها محسوب می‌شود (Huxley & Whay, 2006).

در موقعیت فیزیکی ۵۰۴۷۴۰۴۹-۵۰۰۰۹۰۶۰ کروموزوم ۲۲، ژن *SLC38A3* شناسایی شد. در بررسی‌های ارتباط خانوادگی ژنی SLC با ۲۳ عضو، با عوامل تنظیمی و آنزیم‌های گوارشی گزارش شده است (Wu, 2009). حمل‌ونقل گلوتامین در غشاهای سلولی توسط چندین حامل اسیدآمینه با خصوصیات مختلف انجام می‌شود. یکی از مهمترین این حامل‌ها پروتین

ژن *EBF4* از خانواده ژن عامل اولیه سلول B (Ebf) است که گروهی از فاکتورهای رونویسی که بسیار همولوگ هستند را رمزگذاری می‌کند. به‌عنوان آخرین فاکتور رونویسی Ebf در مهره‌داران، *EBF4* براساس شباهت بالای توالی آن با سایر فاکتورهای خانوادگی Ebf، توسط PCR دژنراسیون کلون شد

ژن *EBF4* از خانواده ژن عامل اولیه سلول B (Ebf) است که گروهی از فاکتورهای رونویسی که بسیار همولوگ هستند را رمزگذاری می‌کند. به‌عنوان آخرین فاکتور رونویسی Ebf در مهره‌داران، *EBF4* براساس شباهت بالای توالی آن با سایر فاکتورهای خانوادگی Ebf، توسط PCR دژنراسیون کلون شد

کدشده توسط ژن *SLC38A3* است. گلوتامین فراوان‌ترین اسیدآمیننه در بدن انسان است و در فرآیندهای فیزیولوژیکی بیشتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه دخیل است (Curi *et al.*, 2005; Curi *et al.*, 2007; Wu, 2009). گلوتامین به‌عنوان اسیدآمیننه مهم برای ساخت پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، گلیکوژن‌ها، گلوکز و سنتز پروتئین عمل می‌کند (Stumvoll *et al.*, 1999) و در تعداد بی‌شماری از فرآیندهای متابولیک نقش دارد. همچنین تنظیم‌کننده اصلی فرایندهای فیزیولوژیکی کلیدی مانند گلوکونوزنز کبدی و کلیوی، چرخه اسید گلوتامات/گاما آمینوبوتیریک (GABA)، در سیستم عصبی مرکزی (McKenna, 2007)، سم‌زدایی آمونیاک کبدی (Haeussinger & Schliess, 2007) و در پاسخ کلیوی به اسیدوز نقش دارد (Welbourne & Matthews, 1999). علاوه بر این گلوتامین مهم‌ترین سوخت اکسیداتیو برای تکثیر سریع سلول‌ها مانند آنتروسیت‌ها و سلول‌های سیستم ایمنی بدن است و ATP را برای گردش پروتئین داخل سلول، انتقال مواد مغذی از طریق غشای پلازما، رشد سلول و مهاجرت و همچنین حفظ تمامیت سلول فراهم می‌کند (Wu, 2009) و یک واسطه اصلی در انتقال نیترژن و کربن بین ارگان‌ها است (Nurjhan *et al.*, 1995; Welbourne *et al.*, 1986).

در موقعیت فیزیکی ۵۰۴۷۴۰۴۹-۵۰۰۰۹۰۶۰ کروموزوم ۲۲ ژن *RASSF1* گزارش شده است. مجموعه خانواده پروتئینی دامنه RAS1 (*RASSF1*)، یک ژن کدکننده حامل سدیم است که با استفاده از متیلاسیون پروموتور در سرکوب انواع مختلف سرطان‌های بدخیم مانند سرطان تیروئید نقش دارد (Khatami *et al.*, 2017; Stephan *et al.*, 2011). سطح متیلاسیون بالاتر در پروموتور *RASSF1* با رفتارهای تهاجمی تومورها مرتبط است (Vlahov *et al.*, 2015). جالب است که برخی مطالعات نشان داده‌اند که وضعیت متیلاسیون در پروموتور *RASSF1* می‌تواند در حضور DNA تومور در گردش خون قابل ردیابی باشد (Ponomaryova *et al.*, 2013). در نهایت در کروموزوم ۲۲ در موقعیت کروموزومی ۵۰۴۷۴۰۴۹-۵۰۰۰۹۰۶۰ ژن *RBM6* شناسایی شد. نتایج تحقیقات نشان داده است که RBMها نقش مهمی در آسیب‌شناسی سرطان‌ها بازی می‌کنند و بیان بیش از حد *RBM6*، با کاهش رشد و پیشرفت کارسینوما در حنجره منجر به سرکوب رشد تومور سرطانی حنجره می‌شود (Prabhu & Devaraj, 2017). شواهد مختلف نشان می‌دهند که اعضای خانواده پروتئینی RBM به‌عنوان یک عامل مهم در کنترل تومورزایی و توسعه آن عمل می‌کنند (Grupp *et al.*, 2014). به‌عنوان مثال، Yang *et al.* (2017) گزارش کردند که بیان خارج از حالت عادی *RBM5* رشد و تهاجم سلول‌های LNCap سرطان پروستات را سرکوب می‌کند. Sakurai *et al.* (2017) نیز نشان دادند که بیان بیش از حد *RBM3* در سرطان‌های مرتبط با کولیت در انسان مرتبط می‌باشد. کیفیت پاسخ دفاعی برعلیه عوامل آسیب‌رسان از جمله صفاتی است که به کدهای ژنتیکی به ارث رسیده بستگی دارد. از این رو یافتن نشانگرهایی برای شناسایی ساختار سیستم توارثی و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها و مطالعه مکان‌های ژنی و انتخاب میزبان-های مقاوم، ابزار قدرتمندی برای مبارزه با عوامل عفونی و بیماری‌ها است. به عبارت دیگر، در کنار انتخاب صفات تولیدی، انتخاب ژنتیکی مقاومت نسبت به بیماری‌ها می‌تواند به طور همزمان به‌عنوان نوعی از کنترل بیولوژیک در یک استراتژی یکپارچه به کار گرفته شود (Gibson & Bishop, 2005). در تحقیقات گذشته، ژن‌های مجتمع اصلی سازگاری بافتی (MHC) به‌عنوان ژن‌های اصلی در پاسخ‌های ایمنی و مقاومت و یا حساسیت به بیماری‌ها گزارش شده‌اند (Lewin *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1990). تاکنون سه کلاس عمده MHC در پستانداران مشخص شده که ملکول‌های MHC کلاس یک و دو، در اتصال به پپتیدهای ایمونوژن و عرضه آنها به لنفوسیت‌های T دخالت دارند (Tizard, 2004). در گاو این مکان ژن Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) نامیده می‌شود و واجد سه خوشه ژنی کلاس‌های یک، دو و سه است که روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۲۳ قرار گرفته‌اند (Tizard, 2004). در این بین، کلاس دو

کدشده توسط ژن *SLC38A3* است. گلوتامین فراوان‌ترین اسیدآمیننه در بدن انسان است و در فرآیندهای فیزیولوژیکی بیشتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه دخیل است (Curi *et al.*, 2005; Curi *et al.*, 2007; Wu, 2009). گلوتامین به‌عنوان اسیدآمیننه مهم برای ساخت پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، گلیکوژن‌ها، گلوکز و سنتز پروتئین عمل می‌کند (Stumvoll *et al.*, 1999) و در تعداد بی‌شماری از فرآیندهای متابولیک نقش دارد. همچنین تنظیم‌کننده اصلی فرایندهای فیزیولوژیکی کلیدی مانند گلوکونوزنز کبدی و کلیوی، چرخه اسید گلوتامات/گاما آمینوبوتیریک (GABA)، در سیستم عصبی مرکزی (McKenna, 2007)، سم‌زدایی آمونیاک کبدی (Haeussinger & Schliess, 2007) و در پاسخ کلیوی به اسیدوز نقش دارد (Welbourne & Matthews, 1999). علاوه بر این گلوتامین مهم‌ترین سوخت اکسیداتیو برای تکثیر سریع سلول‌ها مانند آنتروسیت‌ها و سلول‌های سیستم ایمنی بدن است و ATP را برای گردش پروتئین داخل سلول، انتقال مواد مغذی از طریق غشای پلازما، رشد سلول و مهاجرت و همچنین حفظ تمامیت سلول فراهم می‌کند (Wu, 2009) و یک واسطه اصلی در انتقال نیترژن و کربن بین ارگان‌ها است (Nurjhan *et al.*, 1995; Welbourne *et al.*, 1986).

در موقعیت فیزیکی ۵۰۴۷۴۰۴۹-۵۰۰۰۹۰۶۰ کروموزوم ۲۲ ژن *RASSF1* گزارش شده است. مجموعه خانواده پروتئینی دامنه RAS1 (*RASSF1*)، یک ژن کدکننده حامل سدیم است که با استفاده از متیلاسیون پروموتور در سرکوب انواع مختلف سرطان‌های بدخیم مانند سرطان تیروئید نقش دارد (Khatami *et al.*, 2017; Stephan *et al.*, 2011). سطح متیلاسیون بالاتر در پروموتور *RASSF1* با رفتارهای تهاجمی تومورها مرتبط است (Vlahov *et al.*, 2015). جالب است که برخی مطالعات نشان داده‌اند که وضعیت متیلاسیون در پروموتور *RASSF1* می‌تواند در حضور DNA تومور در گردش خون قابل ردیابی باشد (Ponomaryova *et al.*, 2013).

در نهایت در کروموزوم ۲۲ در موقعیت کروموزومی

استنباط PVL در گردش در یک حیوان آلوده استفاده کرد (Gutiérrez *et al.*, 2012). هنگامی که شیوع BLV (براساس آزمایش ELISA) به عنوان فنوتیپ برای GWAS در جمعیت هلشتاین آمریکایی و هلشتاین-فریزی لهستان در نظر گرفته شد، به نظر می‌رسد که بسیاری از ژن‌های خارج از MHC در حال کنترل این صفت هستند (Abdalla *et al.*, 2016; Brym *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر نیز مناطق کروموزومی غیر از محدوده ژن‌های MHC روی کروموزوم ۲۳، مانند کروموزوم ۲۲، ۱، ۱۳ و ۲۰ به عنوان مناطق ژنومی تأثیرگذار روی نحوه مقابله بدن گاو نسبت به BLV شناسایی شد که می‌تواند اطلاعات ارزشمندی علاوه بر نتایج تحقیقات قبلی در زمینه شناسایی مناطق ژنومی کاندیدای مرتبط با این بیماری در گاوهای هلشتاین فراهم آورد.

نتیجه‌گیری کلی

شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با عفونت‌های ویروسی، نه تنها در طراحی روش درمانی و راه‌های پیش‌گیری اثربخش است، بلکه می‌تواند در طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی و انتخاب ژنومی در گاوهای شیری مفید باشد. در این تحقیق با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به بیماری لکوز (BLV) در گاوهای هلشتاین ایران، مجموع ۱۵۲ حیوان برای ۳۰۱۰۵ جایگاه نشانگری SNP با استفاده از تراشه‌های GGP Bovine LD v4 تعیین ژنوتیپ شدند. پس از انجام آنالیزهای آماری در نهایت چهار منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۲ شناسایی شدند که در حیوانات مقاوم و بیمار به صورت واگرا هدف انتخاب قرار گرفته بودند. بررسی عملکرد ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که این ژن‌ها در سیستم ایمنی و تنظیم چرخه میتوز و میوز و سرکوب سرطان نقش دارند. در مجموع نتایج به دست آمده در این مطالعه منجر به شناسایی مناطق ژنومی جدید به غیر از MHC در گاو شد که این نتایج می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمندی در جهت شناسایی مناطق ژنومی سببی مرتبط با این بیماری در تحقیقات آینده فراهم آورد.

خود به دو زیرگروه IIA و IIB تقسیم می‌شود. گروه IIA شامل نواحی ژنی *DRB1*، *DRB2*، *DRB3*، *DRA*، *DQA1*، *DQA2* و *DQB1* است. جایگاه ژنی *DRB3* از چند شکلی بسیار بالایی برخوردار بوده و در تشکیل پاکت اتصال به پپتید شرکت می‌کند. هر آلل سبب ایجاد پاکت اتصال متفاوتی می‌شود که مخصوص پپتید ویژه‌ای است. از این‌رو، *DRB3* به عنوان نشانگر ژنی در ارتباط با بیماری‌ها و صفات ایمونولوژیک گاو مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Sharif *et al.*, 2003; Udina *et al.*, 1998). گزارش‌های بسیاری مبنی بر ارتباط ژن *BoLA DRB3* با مقاومت و حساسیت به ورم‌پستان و بیماری‌های عفونی مانند بیماری‌های انگلی و لوکوز آنژئوتیک گاو (EBL)، تب برفکی (FMD)، تب بدخیم نزله‌ای گاو، تیلریوز و همچنین خصوصیات تولیدی (مانند شیر، پروتئین و چربی) و میزان سلول‌های سوماتیک شیر (Somatic cell count - SCS) در گاو هلشتاین موجود است (Ballingall *et al.*, 2004).

تحقیقات قبلی به چندشکلی در ژن‌های کاندیدا به‌ویژه آلل‌های موجود در ژن DRB MHC کلاس II گاو اشاره کرده است. با این حال، تنوع ژنتیکی برای مقاومت در برابر یا ابتلا به بیماری در گاوها معمولاً از لحاظ بیماری‌زایی، از جمله استعداد ابتلا به پاراتوبرکلوزیس (Bermingham *et al.*, 2014; Minozzi *et al.*, 2012)، مجتمع بیماری تنفسی گاو (BRDC) (Neiberger *et al.*, 2014) و اخیراً در یک نقشه‌برداری ژنومی برای تعیین عوامل ژنتیکی شیوع BLV مشاهده شده است (Abdalla *et al.*, 2016; Brym *et al.*, 2016). در حقیقت، این نتایج نشان می‌دهد که بروز BLV یک صفت پیچیده است که احتمالاً توسط بسیاری از ژن‌ها با اثر کوچک کنترل می‌شود (Miyasaka *et al.*, 2013). پاسخ ایمنی هومورال نقش مهمی در کنترل عفونت‌های ویروسی در گاوها و انسان‌ها دارد و میزان پاسخ آن از فردی به فرد دیگر متفاوت است، زیرا این تنوع بسیار وراثتی است. در گاوها، مطالعات مشخص کرد که واکنش هومورال به عفونت‌های BLV در واقع در بین حیوانات متفاوت است و جالب آن‌که می‌توان از آن برای

REFERENCES

1. Abbasi Moshaii, B., Rahimi-Mianji, G., Nejai-Javaremi, A., Moradi, M. h. & Konig, S. (2017). Genomic scan for selection signatures associated with mastitis in German Holstein cattle. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(3), 453-461. (In Farsi)
2. Abdalla, E., Peñagaricano, F., Byrem, T., Weigel, K. & Rosa, G. (2016). Genome-wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. *Animal Genetics*, 47(4), 395-407.
3. Akey, J. M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L. & Shriver, M. D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, 12(12), 1805-1814.
4. Ballingall, K. T., Luyai, A., Rowlands, G. J., Sales, J., Musoke, A. J., Morzaria, S. P. & McKeever, D. J. (2004). Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3* 2703 and DRB3* 1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. *Infection and Immunity*, 72(5), 2738-2741.
5. Barendse, W., Harrison, B. E., Bunch, R. J., Thomas, M. B. & Turner, L. B. (2009). Genome wide signatures of positive selection: the comparison of independent samples and the identification of regions associated to traits. *BMC Genomics*, 10(1), 178.
6. Bermingham, M., Bishop, S., Woolliams, J., Pong-Wong, R., Allen, A., McBride, S., Ryder, J., Wright, D., Skuce, R. & McDowell, S. (2014). Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity*, 112(5), 543-551.
7. Bicalho, R., Galvão, K., Cheong, S., Gilbert, R., Warnick, L. & Guard, C. (2007). Effect of stillbirths on dam survival and reproduction performance in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2797-2803.
8. Biswas, S. & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22(8), 437-446.
9. Brym, P., Bojarój-Nosowicz, B., Oleński, K., Hering, D., Ruś, A., Kaczmarczyk, E. & Kamiński, S. (2016). Genome-wide association study for host response to bovine leukemia virus in Holstein cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 175, 24-35.
10. Capra, M., Nuciforo, P.G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Pallotti, F., Viale, G., Gishizky, M.L. & Draetta, G.F. (2006). Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Research*, 66(16), 8147-8154.
11. Carramolino, L., Lee, B.C., Zaballos, A., Peled, A., Barthelemy, I., Shav-Tal, Y., Prieto, I., Carmi, P., Gothelf, Y., De Buitrago, G.G. & Aracil, M. (1997). SA-1, A nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene*, 195(2), 151-159.
12. Curi, R., Lagranha, C.J., Doi, S.Q., Sellitti, D.F., Procópio, J., Pithon-Curi, T.C., Corless, M. & Newsholme, P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 392-401.
13. Curi, R., Newsholme, P., Procópio, J., Lagranha, C., Gorjão, R., & Pithon-Curi, T. C. (2007). Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*, 12(1), 344-357.
14. D'angelino, J., Garcia, M. & Birgel, E. (1998). Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 30, 13-15.
15. Demasius, W., Weikard, R., Hadlich, F., Müller, K. E. & Kühn, C. (2013). Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle. *Veterinary Research*, 44(1), 93.
16. Dong, Y., Xie, M., Jiang, Y., Xiao, N., Du, X., Zhang, W., Tosser-Klopp, G., Wang, J., Yang, S., Liang, J. & Chen, W. (2013). Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature Biotechnology*, 31(2), 135-141.
17. Forough Ameri, N., Asadi Foozi, M. & Esmailzadeh Koshkoiyeh, A. (2016). Whole-genome scan of eight Iranian native cattle breeds to detect selection signatures. *Animal Production*, 18(2), 201-213. (In Farsi)
18. Gibson, J. & Bishop, S. (2005). Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(1), 343.
19. Gottschau, A., Willeberg, P., Franti, C. & Flensburg, J. (1990). The effect of a control program for enzootic bovine leukosis: changes in herd prevalence in Denmark, 1969-1978. *American Journal of Epidemiology*, 131(2), 356-364.
20. Goyal, P., Behring, A., Kumar, A. & Siess, W. (2011). STK35L1 associates with nuclear actin and regulates cell cycle and migration of endothelial cells. *Plos One*, 6(1), e16249.

21. Grupp, K., Wilking, J., Prien, K., Hube-Magg, C., Sirma, H., Simon, R., Steurer, S., Budäus, L., Haese, A., Izbicki, J. & Sauter, G. (2014). High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *European Journal of Cancer*, 50(4), 852-861.
22. Guacci, V., Koshland, D. & Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, 91(1), 47-57.
23. Gutiérrez, G., Carignano, H., Alvarez, I., Martínez, C., Porta, N., Politzki, R., Gammella, M., Lomonaco, M., Fondevila, N., Poli, M. & Trono, K. (2012). Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 187.
24. Haeussinger, D. & Schliess, F. (2007). Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci*, 12(1), 371-391.
25. Hayes, B.J., Chamberlain, A.J., Maceachern, S., Savin, K., McPartlan, H., MacLeod, I., Sethuraman, L. & Goddard, M.E. (2009). A genome map of divergent artificial selection between *Bos taurus* dairy cattle and *Bos taurus* beef cattle. *Animal Genetics*, 40(2), 176-184.
26. Howard, J. L. (1993). *Current veterinary therapy 3: Food Animal Practice* (Vol. 3): WB Saunders Company.
27. Huxley, J. & Whay, H. (2006). Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Veterinary Record*, 159(20), 662-668.
28. Jacobsen, K., Kaneene, J., Miller, J. & Bull, R. (1985). Comparison of the commercial agar-gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *American Journal of Veterinary Research*, 46(7), 1430-1433.
29. Kazemimanesh, M., Madadgr, O., Mahzoonieh, M., Zahraei, S. T. & Steinbach, F. (2012). A serological study on bovine leukemia virus infection in ten provinces of Iran between 2010 and 2012. *Iranian Journal of Virology*, 6(3), 1-7.
30. Khatami, F., Larijani, B., Heshmat, R., Keshtkar, A., Mohammadamoli, M., Teimoori-Toolabi, L., Nasiri, S., & Tavangar, S.M. (2017). Meta-analysis of promoter methylation in eight tumor-suppressor genes and its association with the risk of thyroid cancer. *Plos One*, 12(9), p.e0184892.
31. Kreitman, M. (2000). Methods to detect selection in populations with applications to the human. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1(1), 539-559.
32. LaDronka, R. M., Ainsworth, S., Wilkins, M. J., Norby, B., Byrem, T. M. & Bartlett, P. C. (2018). Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle. *Veterinary Medicine International*, 2018.
33. Lamore, S.D., Ahlberg, E., Boyer, S., Lamb, M.L., Hortigon-Vinagre, M.P., Rodriguez, V., Smith, G.L., Sagemark, J., Carlsson, L., Bates, S.M. & Choy, A.L. (2017). Deconvoluting kinase inhibitor induced cardiotoxicity. *Toxicological Sciences*, 158(1), 213-226.
34. Lewin, H. A., Russell, G. C. & Glass, E. J. (1999). Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Reviews*, 167(1), 145-158.
35. MacEachern, S., Hayes, B., McEwan, J. & Goddard, M. (2009). An examination of positive selection and changing effective population size in Angus and Holstein cattle populations (*Bos taurus*) using a high density SNP genotyping platform and the contribution of ancient polymorphism to genomic diversity in Domestic cattle. *BMC Genomics*, 10(1), 181.
36. Mancini, G., Gargani, M., Chillemi, G., Nicolazzi, E. L., Marsan, P. A., Valentini, A. & Pariset, L. (2014). Signatures of selection in five Italian cattle breeds detected by a 54K SNP panel. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 957-965.
37. McKenna, M.C. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *Journal of Neuroscience Research*, 85(15), 3347-3358.
38. Mee, J., Berry, D. & Cromie, A. (2011). Risk factors for calving assistance and dystocia in pasture-based Holstein-Friesian heifers and cows in Ireland. *The Veterinary Journal*, 187(2), 189-194.
39. Minozzi, G., Williams, J.L., Stella, A., Strozzi, F., Luini, M., Settles, M.L., Taylor, J.F., Whitlock, R.H., Zanella, R. & Neiberghs, H.L. (2012). Meta-analysis of two genome-wide association studies of bovine paratuberculosis. *Plos One*, 7(3), e32578.
40. Miyasaka, T., Takeshima, S.N., Jimba, M., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Sentsui, H. & Aida, Y. (2013). Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens*, 81(2), 72-82.
41. Mohammadi, V., Atyabi, N. & Nikbakht, B. (2011). Seroprevalence of bovine leukemia virus in some dairy farms in Iran. *Global Veterinaria*, 7(3), 305-309.
42. Moradi, M., Phua, S., Hedayat, N., Khodaei, M. M. & Razmkabir, M. (2017). Haplotype and Genetic Diversity of mtDNA in Indigenous Iranian Sheep and an Insight into the History of Sheep Domestication. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(3), 591-601.

43. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13(1), 10.
44. Mousavi, S., Haghparast, A., Mohammadi, G. & Tabatabaeizadeh, S.-E. (2014). Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. *Veterinary Research Forum*, 5(2), 135-9.
45. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary Virology*: Elsevier. Oct 27
46. Neiberghs, H.L., Seabury, C.M., Wojtowicz, A.J., Wang, Z., Scraggs, E., Kiser, J.N., Neupane, M., Womack, J.E., Van Eenennaam, A., Hagevoort, G.R. & Lehenbauer, T.W. (2014). Susceptibility loci revealed for bovine respiratory disease complex in pre-weaned holstein calves. *BMC Genomics*, 15(1), 1164.
47. Nekoei, S., Taktaz Hafshejani, T., Doosti, A. & Khamesipour, F. (2015). Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(4), 703-7.
48. Nielsen, R. (2005). Molecular signatures of natural selection. *Annual Review Genetics*, 39, 197-218.
49. Nurjhan, N., Bucci, A., Perriello, G., Stumvoll, M., Dailey, G., Bier, D.M., Toft, I., Jenssen, T.G. & Gerich, J.E. (1995). Glutamine: A major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(1), 272-277.
50. Ponomaryova, A.A., Rykova, E.Y., Cherdynseva, N.V., Skvortsova, T.E., Dobrodeev, A.Y., Zav'yalov, A.A., Bryzgalov, L.O., Tuzikov, S.A., Vlassov, V.V. & Laktionov, P.P. (2013). Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, 81(3), 397-403.
51. Prabhu, V.V. & Devaraj, N. (2017). Regulating RNA Binding Motif 5 Gene Expression– A Novel Therapeutic Target for Lung Cancer. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 36(2).
52. Prudêncio, M., Rodrigues, C.D., Hannus, M., Martin, C., Real, E., Gonçalves, L.A., Carret, C., Dorkin, R., Röhl, I., Jahn-Hoffmann, K. & Luty, A.J. (2008). Kinome-wide RNAi screen implicates at least 5 host hepatocyte kinases in Plasmodium sporozoite infection. *PLoS Pathog*, 4(11), e1000201.
53. Qanbari, S., Gianola, D., Hayes, B., Schenkel, F., Miller, S., Moore, S., Thaller, G. & Simianer, H. (2011). Application of site and haplotype-frequency based approaches for detecting selection signatures in cattle. *BMC Genomics*, 12(1), 1-12.
54. Radostitis, E., Gay, C., Blood, D. & Hinchcliff, K. (2000). *Veterinary Medicine*, 9th Edition. *WB Saunders, London*, 1881.
55. Sakurai, T., Kashida, H., Komeda, Y., Nagai, T., Hagiwara, S., Watanabe, T., Kitano, M., Nishida, N., Fujita, J. & Kudo, M. (2017). Stress response protein RBM3 promotes the development of colitis-associated Cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(1), 66-74.
56. Schoepf, K., Kapaga, A., Masami, H. & Hyera, J. (1997). Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania. *Tropical animal health and production*, 29(1), 15-19.
57. Sharif, S., Mallard, B., Wilkie, B., Sargeant, J., Scott, H., Dekkers, J. & Leslie, K. (1998). Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29(3), 185-193.
58. Stephen, J.K., Chitale, D., Narra, V., Chen, K.M., Sawhney, R. & Worsham, M.J. (2011). DNA methylation in thyroid tumorigenesis. *Cancers*, 3(2), 1732-1743.
59. Stella, A., Ajmone-Marsan, P., Lazzari, B. & Boettcher, P. (2010). Identification of selection signatures in cattle breeds selected for dairy production. *Genetics*, 185(4), 1451-1461.
60. Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C. & Gerich, J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International*, 55(3), 778-792.
61. Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. & Peters, J.-M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *The Journal of Cell Biology*, 151(4), 749-762.
62. Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71(5), 701-703.
63. Tizard, I. (2004). Acquired immunity: antigen-presenting receptors. *Veterinary Immunology: an introduction*. Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 153, 67-77.
64. Udina, I., Karamysheva, E., Turkova, S., Orlova, A. & Sulimova, G. (2003). Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. *Russian Journal of Genetics*, 39(3), 306-317.
65. Urbinati, I., Stafuzza, N.B., Oliveira, M.T., Chud, T.C.S., Higa, R.H., de Almeida Regitano, L.C., de Alencar, M.M., Buzanskas, M.E. & Munari, D.P. (2016). Selection signatures in Canchim beef cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1-9.

66. Vlahov, N., Scrace, S., Soto, M.S., Grawenda, A.M., Bradley, L., Pankova, D., Papaspyropoulos, A., Yee, K.S., Buffa, F., Goding, C.R. & Timpson, P. (2015). Alternate RASSF1 transcripts control SRC activity, E-cadherin contacts, and YAP-mediated invasion. *Current biology*, 25(23), 3019-3034.
67. Wang, S. S., Betz, A. G. & Reed, R. R. (2002). Cloning of a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20(3), 404-414.
68. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
69. Welbourne, T., Childress, D. & Givens, G. (1986). Renal regulation of interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 251(5), 859-866.
70. Welbourne, T. C. & Matthews, J. C. (1999). Glutamate transport and renal function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(4), 501-505.
71. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.
72. Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 395-420.
73. Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17.
74. Yang, S., Li, X., Li, K., Fan, B. & Tang, Z. (2014). A genome-wide scan for signatures of selection in Chinese indigenous and commercial pig breeds. *BMC Genetics*, 15(1), 1-9.
75. Yang, Z.-G., Ma, X.-D., He, Z.-H. & Guo, Y.-x. (2017). miR-483-5p promotes prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting RBM5. *International Braz Journal*, 43(6), 1060-1067.
76. Yasuda, Y., Miyamoto, Y., Yamashiro, T., Asally, M., Masui, A., Wong, C., Loveland, K.L. & Yoneda, Y. (2012). Nuclear retention of importin α coordinates cell fate through changes in gene expression. *The EMBO Journal*, 31(1), 83-94.