The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Genome-wide association study to identify genomic regions associated with Johne's disease in Iranian Holstein cattle

Younes Doosti [1]✉ |Mohamad Moradi Shahr Babak [2]✉ |Hossein Moradi Shahr Babak [2] |Hossein Mohammadi [3] |Mahdi Jvan Nikkhah [4] |Farnaz Arjmand Kermani [6]

1. Department of Animal Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: y.devisty@ut.ac.ir, arjmand.farnaz@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: moradim@ut.ac.ir
3. Department of Animal Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hmoradis@ut.ac.ir
4. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran. E-mail: h-mohammadi64@araku.ac.ir
5. College of Agriculture &Natural Resources, University of Tehran, Ares International Campus, jolfa, Iran. E-mail: javannikkhah@yahoo.com
6. College of Agriculture &Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: arjmand.farnaz@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 5 February 2023

Received in revised form: 22 May 2023

Accepted: 25 May 2023

Published online: 20 March 2024

Keywords:

Genotype,

GWAS,

Paratuberculosis,

SNP,

Somatic.

ABSTRACT

Paratuberculosis known as Johne's disease, is a contagious, chronic, intestinal disease in ruminants, which is caused by Mycobacterium avium paratuberculosis subspecies (MAP) and causes a huge economic damage to the livestock industry. There is no effective treatment nor vaccine for MAP infection. Thus, investigating the genetic regions associated with susceptibility to MAP infection can provide a better understanding of paratuberculosis mechanisms and contribute to the genetic improvement of animals. The aim of this study was to identify genomic regions and candidate genes associated with susceptibility to MAP infection in Holstein dairy cattle using a genome-wide association study (GWAS). For this purpose, blood samples of 150 cows were collected, and DNA and serum of them were extracted.The prepared DNA samples were genotyped using bovine SNPchip30k (Illumina). Quality control of genotypes was performed based on the minor allele frequency ($P_{MAF} < 0.05$), missing genotype ($P_{MIND} > 0.05$), genotyping rate ($P_{GENO} > 0.05$), and Hardy-Weinberg equilibrium ($P_{H-W} < 1$) 10^{-6}) using PLINK software. The association was performed using a mixed linear model in PLINK software. After quality control, 28749 markers on 142 cows (99 cases and 43 controls) were remained for the further analysis. Associations analysis showed that 16 markers located in chromosomes 30 and 6, were associated with Johne's disease. Positional candidate genes for Johne's disease were identified. The most important identified genes were *LMX1A*, *THSD7A*, *ELMOD2*, *ATP6AP2*, *RNF150*, *SLIT3*, *SDE2*, *PARP1*, *PBX1*, *TFB2M*, *SMYD3* and *PYCR2*. Gene ontology analysis showed that most of the identified genes are involved in the nervous system, cytoskeleton system, regulation of cytokines, Golgi apparatus, catalytic activity, calcium ion transport, and resistance to diseases. Whole genome-wide association study (GWAS) and ontology analysis (GO) can help to identify candidate genes and regions related to sensitivity to MAP in dairy cows, which can play an important role in the treatment and prevention of Johne's disease.

.

Cite this article: Doosti, Y., Moradi Shahr Babak, M., Moradi Shahr Babak, H., Mohammadi, H., Javan Nikkhah, M. & Arjmand Kermani, F. (2024). Genome-wide association study to identify genomic regions associated with Johne's disease in Iranian Holstein cattle. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 (1), 31-45. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354767.653931

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354767.653931

Extended Abstract

Introduction and Objective

Paratuberculosis is a contagious, chronic, intestinal disease in ruminants, which is caused by Mycobacterium avium paratuberculosis subspecies (MAP) infection and causes great economic damage to the livestock industry worldwide. This disease is one of the most important from the economic point of view and

one of the most widespread diseases in terms of prevalence, which causes a decrease in fat and protein and an increase in milk somatic cells in dairy cows. There is no effective treatment for MAP infection or vaccine for this disease so far. Thus investigating the genetic regions related to susceptibility to MAP infection can provide a better understanding of paratuberculosis mechanisms and contribute to the genetic improvement of animals. The aim of this study was to identify genomic regions and candidate genes associated with susceptibility to MAP infection in Iranian Holstein dairy cattle using the whole genome-wide association study (GWAS).

Material and Methods

For this purpose, blood samples of 150 cows in an industrial farm were collected, and DNA and serum of them were extracted. The prepared DNA samples were genotyped using k30 microarrays (SNPchip30k) (by Illumina). Quality control of genotypes based on rare allele frequency components ($P_{MAF} < 0.05$), missing genotype ($P_{MIND} > 0.05$), genotyping rate ($P_{GENO} > 0.05$), and Hardy-Weinberg equilibrium ($P_{H\text{-}W} < 1) 10^{-6}$) and significance test were performed by PLINK software. Analysis of the ontology of genes was done by the online database https://www.Uniprot.org and finally, the ontology diagram of genes was drawn and analyzed by the online database PANTHER.

Results

After quality control, 142 cows (99 cases and 43 controls) and 28749 markers were left for further analysis. Finally, 16 markers were considered higher than the significant threshold, and the most significant markers were located in chromosomes 30 and 6 respectively. Genes associated with selected markers were identified by ensemble and genecards sites. The most important identified genes related to these disease were *LMX1A*, *THSD7A*, *ELMOD2*, *ATP6AP2*, *RNF150*, *SLIT3*, *SDE2*, *PARP1*, *PBX1*, *TFB2M*, *SMYD3* and *PYCR2*. Ontology analysis showed that most of these genes are involved in coding proteins , cytoplasmic and membrane activities, the nervous system, cytoskeleton system, disease resistance, cytokine regulator, organ Golgi, catalytic activity, calcium ion transport. Also, some of these genes were related to other activities such as reproduction and fertility, mastitis, antiviral response, clinical ketosis, and immune response in dairy cows, as well as muscle growth and meat traits in beef cows.

Conclusion

Whole genome-wide association study (GWAS) and ontology analysis (GO) can help to identify candidate genes and regions related to sensitivity to MAP in dairy cows, which can play an important role in the treatment and prevention of Johne's disease. The most important identified genes related to these disease were *LMX1A*, *THSD7A*, *ELMOD2*, *ATP6AP2*, *RNF150*, *SLIT3*, *SDE2*, *PARP1*, *PBX1*, *TFB2M*, *SMYD3* and *PYCR2*.

.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

مطالعه‌ی پویش کل ژنوم جهت شناسایی جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری یون در گاوهای هلشتاین ایران

یونس دوستی [۱]✉ | محمد مرادی شهر بابک [۲]✉ | حسین مرادی شهر بابک [۲] | حسین محمدی [۳] | مهدی جوان نیکخواه [۴] | فرناز ارجمندکرمانی [۱]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: y.devisty@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: moradim@ut.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hmoradis@ut.ac.ir

۴. گروه ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: h-mohammadi64@araku.ac.ir

۵. گروه ژنتیک واصلاح دام، پردیس بین المللی ارس دانشگاه تهران، جلفا، ایران. رایانامه: javannikkhah@yahoo.com

۶. گروه ژنتیک واصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: arjmand.farnaz@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

کلیدواژه‌ها:

پاراتوبرکلوزیس، ژنوتیپ، سوماتیک، GWAS، SNP

چکیده

پاراتوبرکلوزیس یک بیماری مسری، مزمن و روده‌ای در نشخوارکنندگان است که در اثر عفونت زیرگونه مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) ایجاد می‌شود و خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت پرورش دام تحمیل می‌کند. در حال حاضر واکسن یا درمان موثری برای عفونت MAP وجود ندارد، بنابراین بررسی مناطق ژنتیکی مرتبط با حساسیت به عفونت MAP می‌تواند درک بهتری از مکانیسم‌های پاراتوبرکلوزیس ارائه دهد و به بهبود ژنتیکی حیوانات کمک کند. هدف این پژوهش شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدا مرتبط با حساسیت به عفونت MAP در گاوهای شیری هلشتاین ایران با استفاده از روش پویش کل ژنوم (GWAS) بود. در این پژوهش، از ۱۵۰ راس گاو نمونه گرفته شد. پس از استخراج DNA و سرم، نمونه‌های DNA با استفاده از تراشه‌های ۳۰k (SNPchip30k) (شرکت ایلومینا) تعیین ژنوتیپ شدند. کنترل کیفیت نشانگرها براساس شاخص‌های فراوانی آلل نادر (P_{MAF} <۰/۰۵)، ژنوتیپ از دست رفته (P_{MIND} >۰/۰۵)، نرخ تعیین ژنوتیپ (P_{GENO} >۰/۰۵) و تعادل هاردی واینبرگ ($P_{H-W} < 1\times10^{-6}$) توسط نرم‌افزار PLINK انجام شد. بعد از کنترل کیفیت، ۲۸۷۴۹ نشانگر روی ۱۴۲راس گاو (۹۹ راس بیمار و ۴۳ راس شاهد) برای ادامه آنالیز باقی ماند. پس از انجام آنالیز پویش ژنومی (GWAS) در نرم افزار PLINK ۱۶ نشانگر به عنوان نشانگر های معنی دار شناسایی شدند که بیشتر روی کروموزوم‌های ۳۰ و ۶ قرار داشتند. با بررسی بیوانفورماتیکی مناطق ژنومی معنی‌دار در پایگاه‌های برخط ensemble و genecards، ژن‌های کاندیدای برای بیماری یون شناسایی شد. مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده *LMX1A*، *THSD7A*، *ELMOD2*، *ATP6AP2*، *RNF150*، *SLIT3*، *SDE2*، *PARP1*، *PBX1*، *TFB2M*، *SMYD3* و *PYCR2* بودند. آنالیز هستی‌شناسی نشان داد که بیشتر این ژن‌ها در سیستم عصبی، سیستم اسکلت سلولی، تنظیم سیتوکینز، دستگاه گلژی، فعالیت کاتالیزوری، انتقال یون کلسیم و مقاومت در برابر بیماری‌ها نقش دارند. تجزیه و تحلیل پویش کل ژنوم و آنالیز هستی شناسی می‌تواند به شناسایی ژن‌های کاندیدا و مناطق مرتبط با حساسیت به MAP در گاوهای شیری کمک کند که نقش مهمی در درمان و پیشگیری بیماری یون دارد.

استناد: دوستی، یونس؛ مرادی شهربابک، محمد؛ مرادی شهربابک، حسین؛ محمدی، حسین؛ جوان نیکخواه، مهدی و ارجمند کرمان، فرناز (۱۴۰۳). مطالعه‌ی پویش کل ژنوم جهت شناسایی جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری یون در گاوهای هلشتاین ایران. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۵ (۱)، ۴۵-۳۱. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354767.653931

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354767.653931

مقدمه

یک محقق آلمانی به نام یون در سال ۱۸۵۹ از گاوهایی با علایم اسهال، لاغری شدید، کم‌خونی پیش رونده و در نهایت مرگ، گونه‌ای از مایکوباکتریوم را جدا کرد. این باکتری را MAP[1] (مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه پاراتوبرکلوزیس است که به اختصار مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس گفته می‌شود) و بیماری حاصل از آن را یون نام گذاری کردند (Radostits *et al.*, 2007). این باکتری کوچک با ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ میکرون، گرم مثبت، کند رشد و میله‌ای شکل است و برای رشد به مایکو باکتین و منبع آهن نیاز دارد (Baker *et al.*, 2007). مایکوباکتریوم‌آویوم از نظر ساختار ژنتیکی بیش از ۹۰ درصد با پاراتوبرکلوزیس مشابه است (Baker *et al.*, 2007)،بیماری حاصل از این باکتری از عفونت‌های مزمن نشخوارکنندگان و یک بیماری مسری است که از لحاظ همه‌گیری در رده B تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت دام(OIE[3]) قرار گرفته است (Vansnick *et al.*, 2005). از جنبه اقتصادی از مهم‌ترین و از لحاظ شیوع جزو گسترده‌ترین بیماری‌ها (انتشار جهانی دارد) در صنعت دامپروری است (Douarre *et al.*, 2010). این بیماری نوعی التهاب روده‌ای مزمن است که بر اساس گزارش‌ها در بیشتر نشخوارکنندگان وحشی و اهلی مثل گاو، گوسفند، بز، گوزن، بوفالو، گوشتخواران و پرندگان وحشی مشاهده شده است. این بیماری به ندرت در تک سمی‌ها گزارش شده است و در گاو بیشتر از بز و گوسفند شایع است (Sevilla *et al.*, 2008). بیشترین راه ابتلا به بیماری یون به صورت آلودگی مدفوعی‌دهانی در گوساله‌ها می‌باشد و در اثر خوردن مواد غذایی و آب آلوده به MAP صورت می‌گیرد همچنین انتقال داخل رحمی نیز مشاهده و گزارش شده است (Collins *et al.*, 2006). شیوع بیماری یون به دلیل گسترش آرام بیماری به صورت تک‌گیر می‌باشد (Radostits *et al.*, 2007). بیماری یون بر اساس سادگی شناسایی بیماری، شدت علائم بالینی، قابلیت دفع میکروارگانیسم به محیط به‌وسیله شیوه‌های متداول می‌تواند در چهار مرحله، خاموش، عفونت تحت بالینی، عفونت بالینی و عفونت بالینی پیشرفته دسته بندی شود (Sohal *et al.*, 2007).

از پیامدهای اقتصادی بیماری یون می‌توان به کاهش تولید، افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها، افزایش فاصله گوساله‌زایی، کاهش وزن‌گیری، کاهش ارزش لاشه، کاهش باروری، کاهش کیفیت وکمیت شیر (کاهش چربی و پروتئین و افزایش سلول-های سوماتیک در شیر) و حذف پیش از موعد اشاره کرد. از جهتی، با توجه به نتایج تحقیقات جدید احتمال داده می‌شود این باکتری یک بیمارگر زئونوز باشد که در ایجاد بیماری کرون (یک بیماری التهابی مزمن روده[4](IBD)) در انسان نقش دارد، نتایج بررسی تعدادی از محققان نشان می‌دهد که حتی در مواردی بعد از پاستوریزاسیون شیر نیز این بیمارگر، زنده باقی مانده و در نتیجه تهدیدی برای سلامت جامعه است (Hermon-tylor *et al.*, 2004). به خاطر ماهیت مزمن بیماری و ویژگی‌های این باکتری، آزمایش‌های بالینی معمول، دقت و کارایی لازم برای شناسایی دام مبتلا را نداشته و یا از سرعت بالایی برخوردار نیستند که این موضوع اساسی ترین مشکل در مبارزه با این بیماری می‌باشد (Smith, 2009).

مطالعات پویش کل ژنوم از اطلاعات نشانگرهای ژنتیکی یا پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) ژنوم برای تعیین ارتباط آنها با یک یا چند صفت استفاده می‌کند. در گاو، مطالعات[5]GWAS مختلفی برای بررسی معماری ژنتیکی صفات تولیدی، تولیدمثلی و حساسیت یا مقاومت به بیماری‌هایی مانند یون، سل گاوی و ورم پستان یا امتیاز سلول سوماتیک انجام شده است (Thompson-Crispi *et al.*, 2014). ستلیس و همکاران (۲۰۰۹) ژن‌های *KLRA1*، *ALDH1L2*، *CITED4*، *END2*، *SOD1*، *STC1*، *PSEN2*، *CABC1*، *IL16* و *ZFAND6* را به عنوان ژن‌های کاندیدا برای بیماری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس گزارش کردند (Settles *et al.*, 2009). زارع و همکاران(۲۰۱۴) ژن‌های *SLC17A1*، *UBD*، *HIVEP1*، *CCDC17*، *ZNF684*، *UBE2L3*، *UBE2K*، *FAM109A* و *FAM5C* را به‌عنوان ژن‌های کاندیدا حساسیت

1. Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberc
2. Johne's Disease
3.Office International des Epizooties
4. Inflammatory Bowel Disease
5. Genome wide Association Study

به عفونت MAP گزارش کردند (Zare *et al.*, 2014). سالام و همکاران (۲۰۱۷) ژن‌های *END2* ، *PRDM1*، *LAMB4*، *DLD*، *LDLRAD3*، *CACNA1B*، *TIMD4*، *ITK*، *BTN1A1* و *TDP2* را به عنوان ژن های کاندیدا عفونت MAP در گاوهای جرسی و هلشتاین گزارش کردند. وراثت پذیری عفونت به MAP گاوهای هلشتاین و جرسی بین ۰/۰۳۱ تا ۰/۲۸۳ (zare *et al.*, 2014) و ۰/۰۶ تا ۰/۲۷ گزارش شده است (van Hulzen *et al.*, 2012). این برآوردها نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی کافی برای انتخاب ژنتیکی برای کاهش عفونت به MAP وجود دارد (Kirkpatrick and Shook, 2011).

مطالعات زیادی با استفاده از پویش کل ژنوم و طرح مورد (بیمار) – شاهدی(سالم) برای بیماری یون انجام شده و هر کدام چند ژن عملکردی مرتبط با حساسیت به عفونت MAP گزارش کرده اند که می توان به *IL10RA* (Verschoor *et al.*, 2010) *IL12RB2*، *CLEC7A*، *IL23R*، *IFNGR2* و *PGLYRP1* (Pant *et al.*, 2014; pant *et al.*, 2011)، *NOD2* (kupper *et al.*, 2014)، *SLC11A1*، *SP110*، *TLR1* و *TLR4* (Ruiz-Larranaja *et al.*, 2011; Ruiz-Larranaja *et al.*, 2010)، *TLR2* (Koets *et al.*, 2010) اشاره کرد.

مسری بودن بیماری یون و همچنین رفتار و پاسخ‌های متفاوت دام‌ها در مواجه با این بیماری منجر به تحت تاثیر قرار دادن اقتصاد گاوداری‌ها به ویژه گاوداری‌های صنعتی می‌شود. شناسایی دام‌های حساس و مقاوم به این بیماری می‌تواند از طریق بهبود ژنتیکی نقش به‌سزایی در جلوگیری و یا کاهش آلودگی گاوداری‌ها به این عفونت داشته باشد. هدف این تحقیق شناسایی جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با این بیماری در یک نمونه از گاوهای هلشتاین ایران بود.

مواد روش‌ها

در این پژوهش از اطلاعات فنوتیپی (شماره حیوان، شماره پدر و مادر، سال زایش، جنس حیوان، نوع تولد (یک یا دوقلو)، و سن مادر در هنگام زایش) مربوط به گاوهای هلشتاین یکی از گاوداری صنعتی اصفهان استفاده شد. در ابتدا گاوها از لحاظ بیمار یا سالم بودن نسبت به بیماری یون آزمایش شدند (با روش الایزا) و گاوهای آلوده و سالم شناسایی وگروه بندی شدند. از ۱۵۰ راس گاو هلشتاین خون‌گیری شد و استخراج سرم و DNA نمونه‌ها انجام شد. تعیین ژنوتیپ ۱۵۰ نمونه DNA با استفاده از تراشه‌های ۳۰K (SNPchip30k) شرکت ایلومینا انجام شد.

برای کنترل کیفیت نشانگر از معیارهای فراوانی نرخ تعیین ژنوتیپ دام‌ها (P_{MIND}>۰/۰۵)، نرخ تعیین ژنوتیپ مارکرها (P_{GENO}>۰/۰۵)، تعادل هاردی–واینبرگ (P_{H-W}<۱×۱۰$^{-۶}$) و فراوانی آلل حداقل (P_{MAF}<۰/۰۵) (Teo *et al.*, 2007) در نرم افزارPLINK (نسخه ۱/۰۶) استفاده شد (Purcell *et al.*, 2007). سپس آنالیز GWAS در PLINK مطابق دستورات برنامه انجام شد. مدل آماری استفاده شده به صورت زیر بود.

$$y_{ijk} = SNP_i + sex_j + e_{ijk}$$

y : بردار ارزش‌های فنوتیپی مورد انتظار (بیمار بودن یا نبودن گاوها)، SNPi: ژنوتیپ i امینSNP، sex: جنس و e: اثر باقیمانده.

جهت تعیین سطح معنی‌داری، از تصحیح بنفرونی استفاده شد. جهت تصویرسازی و بررسی سطح معنی‌داری SNPها از گراف منهتن (نرم افزار SNPEVG نسخه ۳/۲) و برای یافتن ارتباط جایگاه‌های شناسایی شده مرتبط با ژن‌ها و عملکرد آن‌ها از پایگاه‌های Ensemble (از قسمت Biomart) و Genecard استفاده شد. آنالیز هستی شناسی ژن‌ها (**GO**[1]) توسط پایگاه برخط https://www.Uniprot.org انجام شد و در نهایت نمودار هستی شناسی ژن‌ها توسط پایگاه برخط PANTHER رسم شد.

نتایج و بحث

1. Geneontology

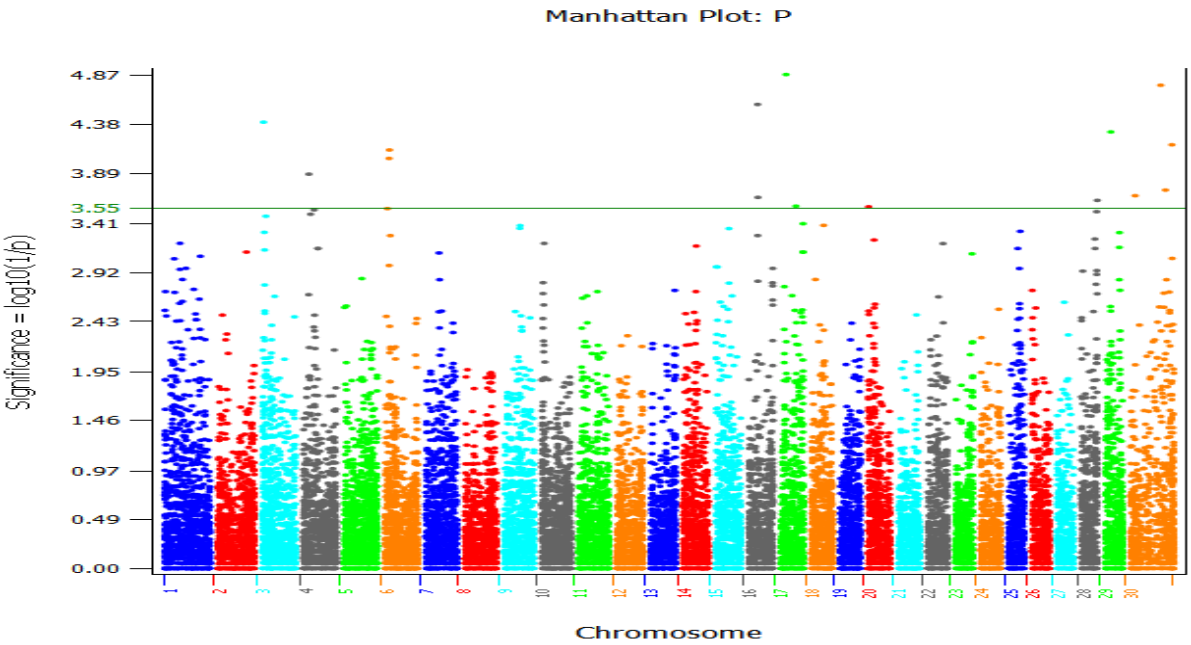
از مجموع ۱۵۰ رأس گاو ، ۱۴۵ رأس با داشتن اطلاع فنوتیپی و ژنومی وارد مرحله آنالیز شدند. بعد از کنترل کیفیت، ۳ رأس گاو و ۷۰۹ نشانگر حذف شدند و ۱۴۲ راس گاو (۹۹ بیمار و ۴۳ شاهد) و ۲۸۷۴۹ نشانگر در آنالیز GWAS استفاده شدند. مراحل مختلف کنترل کیفیت در جدول (۱) ارایه شده است.

جدول۱. مراحل مختلف برسی کنترل کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ

مولفه	قبل از کنترل کیفیت	حذف شده	بعد از کنترل کیفیت
تعداد دام با ژنوتیپ از دست رفته(MIND > ۰/۰۵)	۱۴۵	۳	۱۴۲
تعداد نشانگرها با فراوانی آلل نادر (MAF <۰/۰۵)	۲۹۴۵۸	۰	۲۹۴۵۸
تعداد نشانگر با ژنوتیپ از دست رفته (GENO >۰/۰۵)	۲۹۴۵۸	۷۰۹	۲۸۷۴۹
تعداد نشانگر با هاردی واینبرگ (H-W <۱×۱۰ $^{-۶}$)	۲۹۴۵۸	۰	۲۹۴۵۸

بعد از کنترل کیفیت، آنالیز پویش کل ژنوم انجام شد و فایل نهایی به ترتیب شامل شماره کروموزوم، نام نشانگر، موقعیت فیزیکی، سطح معنی‌داری(P-value) بود. نشانگرهای معنی دار شده انتخاب و گراف منهتن رسم شد (شکل۱).

در این پژوهش ۱۶ نشانگر بالاتر از حد آستانه شناسایی شدند که بیشتر انها روی کروموزوم‌های ۳۰ و ۶ بودند. نکته قابل توجه اینکه در اکثر مطالعات مورد بررسی هیچ گزارشی برای بیماری یون در کروموزوم ۳۰ نبوده است و این اولین مطالعه‌ای است که بیشترین نشانگرها در کروموزوم ۳۰ معنی دار شده و ژن‌های آن گزارش شده است.



شکل۱. گراف منهتن جهت تصویر سازی و مشاهده نشانگرهای حاصل از آنالیز GWAS

در این پژوهش نیز طبق مطالعه **Carignano** و همکاران (**Carignano *et al.*, 2018**) و همچنین مطالعه **Gao** و همکاران **(Gao et al., 2018)** ژن‌های کاندیدا در فاصله **1Mb** (**۵۰۰kb** بالا و **۵۰۰kb** پایین هر **SNP**) شناسایی شدند(جدول ۲)

جدول۲. ژن‌های مرتبط با جایگاه‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون GWAS

شماره کروموزوم	ID نشانگر	موقعیت فیزیکی	P-value	مهم‌ترین ژن شناسایی شده
۱۷	BovineHD1700004778	۱۶۷۰۴۵۰۰	۰/۰۰۰۰۱۳۵۳	*ZNF330, RNF150, TBC1D9, UCP1, ELMOD2*
۳۰	BovineHD3000028087	۱۰۳۳۴۵۳۷۴	۰/۰۰۰۰۱۷۲۴	*ATP6AP2, BCOR, MPC1L*
۱۶	BovineHD1600008290	۲۹۴۳۶۵۵۲	۰/۰۰۰۰۲۶۶۸	*SDE2, PARP1, ITPKB, COQ8A, PSEN2, MIXL1, ACBD3, PYCR2*
۳	ARS-BFGL-NGS-84867	۳۸۱۹۶۵۳	۰/۰۰۰۰۳۹۸۸	*LRRC52, LMX1A, PBX1, RXRG*
۶	BovineHD0600004259	۱۵۷۴۹۸۷۰	۰/۰۰۰۰۷۴۹۸	*EGF. LRIT3, CASP6, MCUB, SEC24B, PLA2G12A, GAR1, ELOVL6*
۶	ARS-BFGL-NGS-19872	۱۴۴۱۹۳۶۹	۰/۰۰۰۰۹۰۸۱	*PITX2, ENPEP*
۴	BovineHD0400005999	۱۹۹۷۲۷۰۳	۰/۰۰۰۱۲۹۸	*THSD7A, TMEM106B*
۳۰	Hapmap38597-BTA-41420	۱۱۹۷۸۱۳۷۶	۰/۰۰۰۱۸۶۴	*PRDX4, PTCHD1, ACOT9, SAT1, APOO*
۳۰	BovineHD3000004923	۱۵۰۳۸۷۶۷	۰/۰۰۰۲۱۱۷	*ARHGAP36, IGSF1, OR1AA3, OR5O1, ENOX2*
۱۶	ARS-BFGL-NGS-118766	۳۰۵۱۰۸۵۲	۰/۰۰۰۲۱۹۹	*AHCTF1, TFB2M, SMYD3, CNST, SCCPDH, CDC42BPA*
۲۸	ARS-BFGL-NGS-119491	۴۵۹۱۶۶۲۸	۰/۰۰۰۲۳۵۵	*TFAM, COG2, ZNF239, ZNF32*
۲۰	BovineHD2000000317	۹۹۵۲۵۱	۰/۰۰۰۲۷۲۳	*SLIT3, SPDL1*
۶	BovineHD0600001950	۸۴۴۲۴۳۹	۰/۰۰۰۲۸۳۸	*TRAM1L1*

با توجه به آنالیز هستی‌شناسی و اطلاعات مربوط به پایگاه‌های برخط genecards و encemble عملکرد برخی ژن‌های شناسایی شده به صورت زیر است:

RNF150 یک ژن رمزکننده پروتئین است. پیش بینی شده است که فعالیت لیگاز پروتئین یوبیکوئیتین را فعال می‌کند که ممکن است در فرآیند کاتابولیک پروتئین وابسته به یوبیکویتین نقش داشته باشد. این ژن جزو جدایی ناپذیر غشاء است که در سیتوپلاسم فعال می‌باشد و در انسان بیماری‌های مرتبط با آن شامل تشریح شریان کاروتید و انسفالوپاتی رشدی و صرعی می‌باشد (Deng *et al.*, 2023). *LMX1A* رمزکننده پروتئینی است که به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت رونویسی ژن انسولین عمل می‌کند. این ژن همچنین در رشد نورون‌های تولید کننده دوپامین در دوران جنینی نقش دارد. در انسان، جهش در این ژن با افزایش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون مرتبط است(Zou *et al.*, 2009). بیماری‌های مرتبط با *LMX1A* شامل ناشنوایی، اتوزومال غالب و کاهش شنوایی حسی عصبی بوده و از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به نوروژنز دوپامینرژیک اشاره کرد. ژن *LMX1A* باکتوز بالینی شیردهی نیز مرتبط است (Soares *et al.*, 2021). *MCUB* یک ژن کد کننده پروتئین است که غشای داخلی میتوکندری و فعالیت کلسیم را تنظیم می‌کند و در نتیجه جذب کلسیم را به داخل میتوکندری تعدیل می‌کند. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به انتقال یون کلسیم میتوکندری و انتقال کاتیون‌ها، آنیون‌های معدنی و اسیدهای آمینه و الیگوپپتیدها اشاره کرد(Huo *et al.*, 2020). *THSD7A* یک ژن کد کننده پروتئین است. پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن منحصراً در سلول‌های اندوتلیال جفت و بند ناف یافت می‌شوند. این پروتئین ممکن است در اسکلت سلولی نقش داشته باشد و تغییرات در این ژن ممکن است با پوکی استخوان همراه باشد. بیماری‌های مرتبط با *THSD7A* عبارتند از نفروپاتی غشایی و برونشکتازی. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به بیماری‌های مرتبط با گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها و

متابولیسم پروتئین‌ها اشاره کرد. ژن *THSD7A* که روی کروموزوم چهار قرار دارد، با عملکرد میتوکندری، رشد ماهیچه و صفات گوشت مرتبط است (Ben-Jemaa *et al*., 2021). *AHCTF1* یک ژن کد کننده پروتئین است و پیش بینی شده که در فعالیت اتصال DNA، منافذ هسته‌ای و تنظیم سیتوکینز نقش دارد بیماری‌های مرتبط با *AHCTF1* شامل کارسینوم سلولی فیبررولاملار مختلط و سندرم لنفوپرولیفراتیو خود ایمنی است(Scholz *et al*., 2019). SLIT3 یک ژن کد کننده پروتئین است و از بیماری‌های مرتبط با آن می توان به آدنوم‌های کبدی، بیماری‌های دیافراگمی اشاره کرد از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به توسعه سیستم عصبی و تنظیم بیان *SLIT*ها و ROBOها اشاره کرد (Dickinson et al., 2004). ژن SLIT3 روی کروموزوم ۲۰ گاوی قرار دارد و با تحمل حرارتی، مقاومت در برابر بیماری و تولید مثل در گاوهای شیری در ارتباط است (Dash *et al*., 2022).

آنالیز هستی شناسی ژن‌ها(GO)

آنالیز هستی شناسی برای برخی ژن‌های مهم شناسایی شده توسط پایگاه برخط https://www.Uniprot.org برای سه دسته‌بندی عمومی اجزاءسلولی[1]، عملکرد مولکولی[2]و فرآیندهای زیستی[3]انجام و نتایج در جدول (۳) ارایه شده است.

جدول ۳. آنالیز هستی شناسی ژن‌های شناسایی شده با استفاده از آزمون GWAS

مؤلفه – ژن	فرآیند زیستی	اجزای زیستی	عملکرد مولکولی
RNF150	فرآیند کاتابولیک پروتئینی	سیتوپلاسم، اجزاء غشاء	اتصال یون فلزی، فعالیت لیگاز، اتصال اسیدامینه
THSD7A	تمایز سلولی، اسکلت سلولی اکتین	غشاء پلاسما، فضای خارج سلولی	–
LMX1A	سیستم عصبی، حافظه، رشد مخچه،تشکیل سیناپس	کروماتین هسته	فعالیت فاکتور رونویسی، اتصال یون فلزی، اتصال DNA، اتصال پروتئین
MCUB	ورود کلسیم به میتوکندری، همؤستاز یون کلسیم میتوکندری	غشاء میتوکندری، غشاء داخل سلولی، نوکلئوپلاسم، کمپلکس کانال کلسیم	بازدارنده فعالیت کلسیمی و یونی
AHCTF1	چرخه‌ی سلولی، تقسیم سلولی، تنظیم سیتوکینز، انتقال mRNA	سیتوزول، غشاء هسته‌ای، نوکلئوپلاسم، کینتوکور	اتصال DNA
SLIT3	هدایت آکسون، پاسخ به کورتیزول، پاسخ به محرک هورمونی، مورفوژنز دیواره بطنی	فضای خارج سلولی، میتوکندری	اتصال یون کلسیم، اتصال هپارین
UCP1	پاسخ سلولی به سرما، پاسخ سلولی به اسید چرب، پاسخ سلولی به محرک هرمونی، انتقال میتوکندریایی	غشاء داخلی میتوکندری، میتوکندری	اتصال کاردیولیپین، اتصال GTPوGDP، جداکننده فسفوریلاسیون اکسیداتیو
ELMOD2	پاسخ دفاعی به ویروس، تنظیم فعالیت GTPase	غشاء	فعالیت فعال کنندهGTPase
ATP6AP2	بلوغ آنژیوتانسین، بلوغ سیستم عصبی مرکزی، کاهش PH داخلی سلول، رنگدانه چشم	غشاء اتوماگوزوم، آکسون، غشاء شبکه آندوپلاسمی، لیزوزوم، غشاء پلاسمایی	فعالیت گیرنده سیگنال
PYCR2	پاسخ سلولی به استرس اکسیداتیو، فرایند بیوسنتزی پرولین و L پرولین	ماتریکس میتوکندری، میتوکندری	فعالیت پرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز
SDE2	تقسیم سلولی، همانند سازی DNA	سیتوزول، دستگاه گلژی، نوکلئوپلاسم، هسته	اتصال DNA آسیب دیده

2. Cellular Component
3. Molecular Function
4. Biological Process

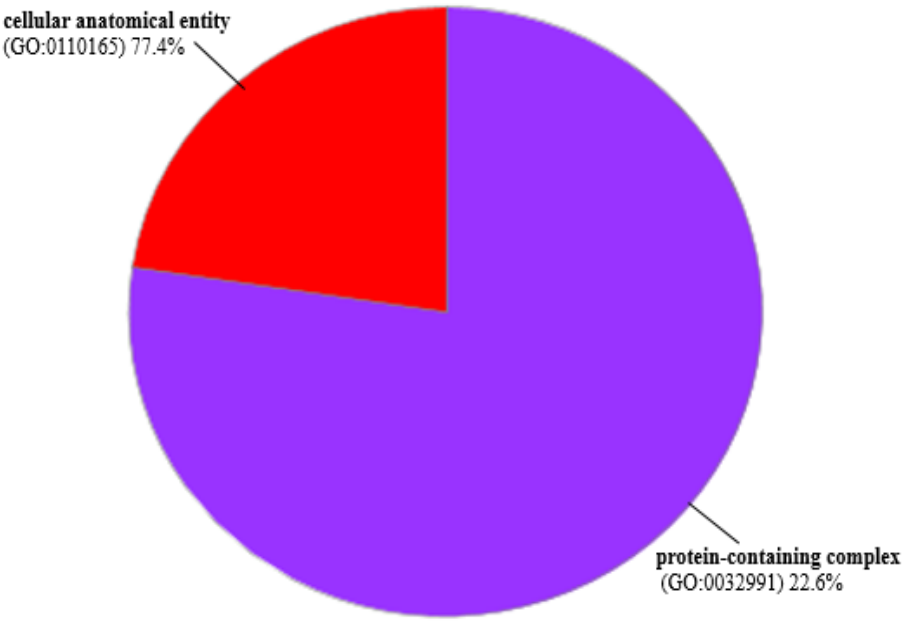
مؤلفه – ژن	فرآیند زیستی	اجزای زیستی	عملکرد مولکولی
PARP1	پاسخ سلولی به محرک اسیب DNA، پاسخ سلولی به محرک انسولین، واسخ سلولی به یون روی، تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی، تنظیم فعالیت کاتالیزوری، تنظیم متیلاسیون DNA	کروماتین، سیتوزول، غشاء، میتوکندری، هسته، محل آسیب DNA، تنظیم کننده رونویسی	اتصال DNA آسیب دیده، اتصال آنزیمی، فعالیت نوکلئوتیدیل ترانسفراز، اتصال پروتئین کیناز، اتصال RNA، اتصال یون روی
PBX1	رشد مغز، خون سازی جنین، رشد اندام جنینی، رشد نورون، تنظیم استخوان سازی، تمایز جنسی	سیتوپلاسم، کروماتین، هسته	اتصال DNA، اتصال همزمان تنظیم کننده رونویسی
TFB2M	رونویسی میتوکندری، متیلاسیون rRNA، شروع رونویسی در پروموتور میتوکندری	ماتریکس میتوکندری، میتوکندری	فعالیت فاکتور رونویسی میتوکندری، اتصال RNA، فعالیت تنظیم کننده رونویسی
SMYD3	پاسخ سلولی به محرک دگزامتازون، متیلاسیون هیستون لیزین، تنظیم منفی فعالیت پروتئین کیناز	سیتوزول، نوکلئوپلاسم، هسته	اتصال یون فلزی، اتصال کمپلکس RNAپلیمرازII

UCP1، *UCP*ها فسفوریلاسیون اکسیداتیو را از سنتز ATP با انرژی تلف شده به عنوان گرما جدا می‌کنند که به آن نشت پروتون میتوکندری نیز می‌گویند. همچنین انتقال آنیون‌ها را از غشای میتوکندری داخلی به بیرونی و انتقال برگشتی پروتون‌ها از غشای میتوکندری خارجی به غشای داخلی را تسهیل می‌کنند. این ژن تنها در بافت چربی قهوه‌ای (بافت تخصصی که برای تولید گرما عمل می‌کند) بیان می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این ژن با بیان چربی قهوه‌ای در گاوهای پرواری نقش دارد و باعث تنظیم حرارتی (NST[1]) در گاو می‌شود (Kanamori *et al.*, 2014). *ELMOD2* یک ژن کد کننده پروتئین است و بیماری‌های مرتبط با آن شامل فیبروز ریوی و فیبروز ریوی پس از التهاب است. این ژن در پاسخ‌های ضد ویروسی نقش دارد و پاسخ‌های ضد ویروسی مربوط به IFN را تنظیم می‌کند. در مطالعه‌ای این ژن را مرتبط با پاسخ ایمنی معرفی کردند (Neszaros *et al.*, 2016). ژن *ATP6AP2* پروتئینی را کد می‌کند که با آدنوزین تری فسفاتازها (ATPases) مرتبط است. ATPaseهای انتقال دهنده پروتون نقش اساسی در حفظ انرژی، انتقال فعال ثانویه، اسیدی شدن بخش‌های درون سلولی و هموستاز pH سلولی دارند. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به سیستم ایمنی ذاتی، مسیر مهارکننده ACE و فارماکودینامیک اشاره کرد(Dubos et al., 2015). در مطالعه‌ای نشان داده شد که مهار LH باعث کاهش بیان این ژن در گاو می‌شود (Bunel *et al.*, 2020). ژن *PYCR2* در پاسخ سلولی به استرس اکسیداتیو نقش دارد. مطالعه‌ای با رویکرد پویش کل ژنوم برای غلظت آلبومین و سرم در گاو هلشتاین چینی انجام شد که در آن ۱۵ ژن به عنوان کاندیدای غلظت آلبومین در آغوز و سرم مشخص شد که ژن *PYCR2* نیز یکی از ژن‌های شناسایی شده بود (Lin *et al.*, 2020). *SDE2* این ژن در در تکثیر DNA و کنترل چرخه سلولی نقش دارد. نشان داده شده است که جهش در ژن *SDE2* که باعث مرگ و میر زودهنگام جنین می‌شود (Kaminski, 2019). ژن *PARP1* در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی مهم مانند تمایز، تکثیر، رونویسی، حفظ پایداری ژنومی و همچنین نقش مهمی در ترمیمDNA دارد. نشان داده شده است د که *PARP1* در طی ورم پستان فعال می‌شود، که ممکن است نشانگر زیستی مفیدی برای ورم پستان باشد. علاوه براین، چندین مطالعه در مدل‌های انسانی و حیوانی فعال شدن *PARP1* را در اختلالات التهابی مختلف نشان داده اند (De-Matteis *et al.*, 2018). نشان داده شده است که در حیواناتی که به عفونت پستانی دچار شده‌اند بیان این ژن افزایش پیدا می‌کند (De-Matteis *et al.*, 2021). ژن *PBX1* از ژن‌های موثر بر وزن لاشه و وزن استخوان در گاوهای سمینتال است و محل اتصال فاکتور رونویسی MyoDI در گاو نیز می‌باشد (Chang *et al.*, 2018). ژن TFB2M فاکتور رونویسی میتوکندری را فعال می‌کند و از مسیرهای مرتبط با

1. Nonshivering Thermogenesis

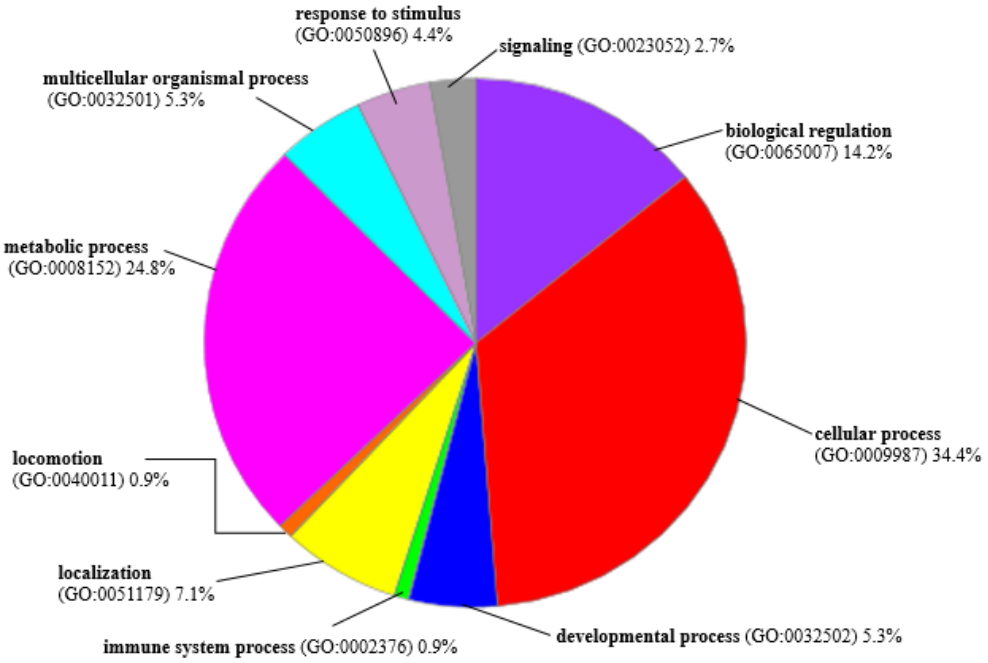
آن می‌توان به فعال سازی رونویسی بیوژنز میتوکندری و بیان ژن[1]اشاره کرد(Litonin *et al.*, 2010). مطالعه‌ای نشان داد که این ژن در گاو با کیفیت گوشت ماربلینگ[2]و عمق چربی زیر جلدی[3](SFD) مرتبط می‌باشد (Jiang *et al.*, 2006). ژن SMYD3 یک هیستون متیل ترانسفراز را کد می‌کند که نقش مهمی در فعال‌سازی رونویسی به عنوان عضوی از کمپلکس RNAپلیمراز ایفا می‌کند. ژن *SMYD3* یکی از ۱۴ ژن شناسایی شده موثر بر صفات لاشه در گائهای نگونی است (De-Vos, 2018).

آنالیز هستی‌شناسی برای کل ژن‌های شناسایی شده، براساس سه دسته‌بندی اجزای سلولی (شکل۲)، فرآیندهای زیستی (شکل۳) و اجزای زیستی (شکل۴) با نمودار دایره‌ای توسط پایگاه برخط PANTHERdb.org رسم شد.

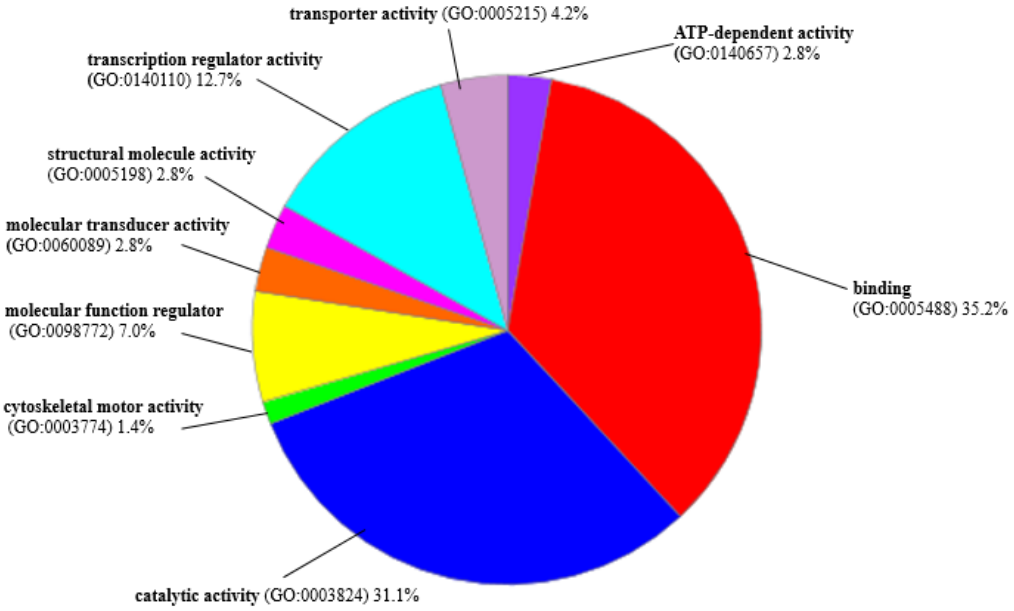


شکل ۲. آنالیز هستی شناسی (GO) ژن‌های شناسایی شده مرتبط با بیماری یون برای اجزاع سلولی (C-C)

1. Transcription
2. Marbling
3. Subcutaneous Fat Depth



شکل ۳. آنالیز هستی شناسی (GO) ژن‌های شناسایی شده مرتبط با بیماری یون برای فرایندهای زیستی (B-P)



شکل ۴. آنالیز هستی شناسی (GO) ژن‌های شناسایی شده مرتبط با بیماری یون برای اجزای زیستی (M-F)

بعضی از ژن‌های شناخته شده در این پژوهش که با ژن‌های دیگر (یا هم خانواده آن‌ها) مشترک بودند، در سایر مطالعات برای عفونت به MAP نیز گزارش شده است. ژن *RNF149* بر روی کروموزوم ۱۰ گاوی و *RNF111* بر روی کروموزوم ۱۱ گاوی (Pant *et al.*, 2010) به عنوان ژن‌های کاندیدای عفونت به MAP گزارش شده‌اند که با ژن *RNF150* واقع در کروموزوم ۱۷ گاوی شناخته شده در این پژوهش، در یک خانواده قرار دارند. ژن‌های هم خانواده زیادی از *TMEM106B* ، از

جمله *TMEM179*، *TMEM82*، *TMEM51* و *TMEM30A* که بر روی کروموزوم ۱۵ گاوی قرار دارند، در مطالعات دیگر برای بیماری یون گزارش شده‌اند (Mallikarjunappa *et al.*, 2018). ژن *ZNF330* بر روی کروموزوم ۱۷ ، با ژن‌های شناسایی شده در گزارش‌های دیگر برای MAP، مثل *ZNF25* و *ZNF334* که روی کروموزوم ۲۸ قرار دارند، هم‌پوشانی دارد (Van Hulzen *et al.*, 2012). مالیکارجاناپا و همکاران (Mallikarjunappa *et al.*, 2021) ژن‌های *PARP1*، *PSEN2* و *SCCPDH* و کیسر و همکاران (Kiser *et al.*, 2017) ژن *CDC42BPA* را برای عفونت به MAP گزارش کردند *PARP1* یکی از مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش است. با توجه به سایر گزارشات، این ژن مرتبط با پاسخ ایمنی بوده و ورم پستان باعث افزایش بیان آن می‌شود (De-Matteis *et al.*, 2018; De-Matteis *et al.*, 2021). *ELMOD2* نیز یکی دیگر از ژن‌های مهم شناسایی شده در این تحقیق می‌باشد که در پاسخ ایمنی ذاتی و پاسخ‌های ضد ویروسی نقش دارد (Meszaros *et al.*, 2016).

نتیجه گیری

در این پژوهش یک آنالیز پویش کل ژنومی موردی-شاهدی، برای عفونت به MAP در گاو هلشتاین ایران صورت گرفت. بیشترین نشانگرهای معنی‌دار در کروموزوم‌های۳۰ و ۶ قرار داشتند. از مهم‌ترین ژن‌ها شناسایی شده مرتبط با این بیماری می‌توان به *THSD7A*، *ELMOD2*، *ATP6AP2*، *RNF150*، *SDE2*، *PARP1*، *PBX1*، *TFB2M*، *SMYD3* و *PYCR2* اشاره کرد که برخی از این ژن‌ها با صفات دیگر از قبیل تولیدمثل و باروری، ورم پستان، پاسخ ضد ویروسی، کتوز بالینی و پاسخ ایمنی در گاوهای شیری همچنین رشد ماهیچه و صفات گوشت در گاوهای گوشتی ارتباط دارند. نتایج هستی-شناسی نشان داد که بیشتر این ژن‌ها کدکننده‌ی پروتئین هستند و در فعالیت‌های سیتوپلاسمی و غشایی، سیستم عصبی، سیستم اسکلت سلولی، مقاومت در برابر بیماری‌ها، تنظیم کننده سیتوکینز، دستگاه گلژی، فعالیت کاتالیزوری و انتقال یون کلسیم نقش دارند. شناخت مناطق ژنومی مرتبط با عفونت‌های ویروسی مانند بیماری یون، می‌تواند در طراحی روش‌های درمانی و راه‌های پیشگیری مؤثر بوده و همچنین در برنامه‌های اصلاح نژادی در گاوهای شیری نیز مفید خواهد بود.

REFRENCES

Baker, D.C., Barker, I.K., Brown, C.C.,Caswell, J.L., and Wittiams, K.J. (2007). Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2, 5th ed.W.B. Saunders, Philadelphia, p: 222-230.

Beaudeau, F., Belliard, M., Joly, A., & Seegers, H. (2007). Reduction in milk yield associated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map) infection in dairy cows. Veterinary research, 38(4), 625-634.

Ben-Jemaa, S., Senczuk, G., Ciani, E., Ciampolini, R., Catillo, G., Boussaha, M., & Mastrangelo, S. (2021). Genome-Wide Analysis Reveals Selection Signatures Involved in Meat Traits and Local Adaptation in Semi-Feral Maremmana Cattle. Frontiers in genetics, 12, 675569.

Bunel, A., Nivet, A. L., Blondin, P., Vigneault, C., Richard, F. J., & Sirard, M. A. (2020). The effects of LH inhibition with cetrorelix on cumulus cell gene expression during the luteal phase under ovarian coasting stimulation in cattle. Domestic Animal Endocrinology, 72, 106429.

Carignano, H. A., Roldan, D. L., Beribe, M. J., Raschia, M. A., Amadio, A., Nani, J. P., & Miretti, M. M. (2018). Genome-wide scan for commons SNPs affecting bovine leukemia virus infection level in dairy cattle. BMC genomics, 19(1), 1-15.

Chang, T., Xia, J., Xu, L., Wang, X., Zhu, B., Zhang, L., & Gao, H. (2018). A genome-wide association study suggests several novel candidate genes for carcass traits in Chinese Simmental beef cattle. Animal genetics, 49(4), 312-316.

Collins, M. T., Gardner, I. A., Garry, F. B., Roussel, A. J., & Wells, S. J. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association, 229(12), 1912-1919.

Dash, S., Singh, A., Dixit, S. P., & Kumar, A. (2022). Identification of Selection Signatures for Milk Performance Traits among Indigenous Dairy Cattle Breeds using High Density Genomic Information. Indian Journal of Animal Research, 1, 7.

De Matteis, G., Reale, A., Grandoni, F., Meyer-Ficca, M. L., Scatà, M. C., Meyer, R. G., & Moioli, B. (2018). Assessment of Poly (ADP-ribose) Polymerase1 (PARP1) expression and activity in cells purified from blood and milk of dairy cattle. Veterinary immunology and immunopathology, 202, 102-108.

De Vos, J. (2018). A Genome wide association study of carcass traits based on Real Time Ultrasound in South African Nguni cattle (Doctoral dissertation, University of Pretoria).

Douarre, P. E., Cashman, W., Buckley, J., Coffey, A., & O'Mahony, J. M. (2010). Isolation and detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. Gut Pathogens, 2(1), 1-7.

Gao, Y., Jiang, J., Yang, S., Cao, J., Han, B., Wang, Y., & Sun, D. (2018). Genome-wide association study of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in Chinese Holstein. BMC genomics, 19(1), 1-10.

Hermon-Taylor, J., & El-Zaatari, F. A. K. (2004). The Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis problem and its relation to the causation of Crohn’s disease. Pathogenic Mycobacteria in Water.

Huo, J., Lu, S., Kwong, J. Q., Bround, M. J., Grimes, K. M., Sargent, M. A., & Molkentin, J. D. (2020). MCUb induction protects the heart from postischemic remodeling. Circulation research, 127(3), 379-390.

Jiang, Z., Kunej, T., Wibowo, T. A., Michal, J. J., Zhang, Z., Gaskins, C. T., & Wright Jr, R. W. (2006, August). The basal nucleus-encoded mitochondrial transcription genes and meat quality in beef cattle. In Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (pp. 13-18). Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Instituto Prociencia.

Kaminski, S. (2019). Missense mutation in SDE2 gene–new lethal defect transmitted into Polish Holstein-Friesian cattle. Polish Journal of Veterinary Sciences, (3).

Kanamori, Y., Yamada, T., Asano, H., Kida, R., Qiao, Y., Abd Eldaim, M. A., & Funaba, M. (2014). Effects of vitamin a status on expression of ucp1 and brown/beige adipocyte-related genes in white adipose tissues of beef cattle. Journal of Veterinary Medical Science, 14-0137.

Kirkpatrick, B. W., & Shook, G. E. (2011). Genetic susceptibility to paratuberculosis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 27(3), 559-571.

Kiser, J. N., White, S. N., Johnson, K. A., Hoff, J. L., Taylor, J. F., & Neibergs, H. L. (2017). Identification of loci associated with susceptibility to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map) tissue infection in cattle. Journal of Animal Science, 95(3), 1080-1091.

Koets, A., Santema, W., Mertens, H., Oostenrijk, D., Keestra, M., Overdijk, M., & Rutten, V. P. M. G. (2010). Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Preventive veterinary medicine, 93(4), 305-315.

Kupper, J. D., Brandt, H. R., & Erhardt, G. (2014). Genetic association between NOD 2 polymorphism and infection status by M ycobacterium avium ssp. paratuberculosis in G erman H olstein cattle. Animal Genetics, 45(1), 114-116.

Lin, S., Wan, Z., Zhang, J., Xu, L., Han, B., & Sun, D. (2020). Genome-wide association studies for the concentration of albumin in colostrum and serum in Chinese Holstein. Animals, 10(12), 2211.

Mallikarjunappa, S., Brito, L. F., Pant, S. D., Schenkel, F. S., Meade, K. G., & Karrow, N. A. (2021). Johne's Disease in Dairy Cattle: An Immunogenetic Perspective. Frontiers in Veterinary Science, 8.

Mallikarjunappa, S., Sargolzaei, M., Brito, L. F., Meade, K. G., Karrow, N. A., & Pant, S. D. (2018). Uncovering quantitative trait loci associated with resistance to Mycobacterium avium ssp.

paratuberculosis infection in Holstein cattle using a high-density single nucleotide polymorphism panel. Journal of dairy science, 101(8), 7280-7286.

Matteis, G., Grandoni, F., Zampieri, M., Reale, A., & Scatà, M. C. (2021). New Insights into the Significance of PARP-1 Activation: Flow Cytometric Detection of Poly (ADP-Ribose) as a Marker of Bovine Intramammary Infection. Cells, 10(3), 599.

Meszaros, G., Taferner, R., & Sölkner, J. (2016). Pleiotropic and epistatic interactions between stillbirth and calving ease in cattle. Acta Agriculture Slovenica, 5, 56.

Nielsen, S. S., & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Preventive veterinary medicine, 88(1), 1-14.

Pant, S. D., Schenkel, F. S., Verschoor, C. P., You, Q., Kelton, D. F., Moore, S. S., & Karrow, N. A. (2010). A principal component regression based genome wide analysis approach reveals the presence of a novel QTL on BTA7 for MAP resistance in holstein cattle. Genomics, 95(3), 176-182.

Pant, S. D., Verschoor, C. P., Schenkel, F. S., You, Q., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2014). Bovine CLEC7A genetic variants and their association with seropositivity in Johne's disease ELISA. Gene, 537(2), 302-307.

Pant, S. D., Verschoor, C. P., Schenkel, F. S., You, Q., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2011). Bovine PGLYRP1 polymorphisms and their association with resistance to Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis. Animal genetics, 42(4), 354-360.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. The American journal of human genetics, 81(3), 559-575.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Veterinary medicine, 10, 2045-2050.

Ruiz-Larranaga, O., Garrido, J. M., Iriondo, M., Manzano, C., Molina, E., Montes, I., & Estonba, A. (2010). SP110 as a novel susceptibility gene for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cattle. Journal of Dairy Science, 93(12), 5950-5958.

Ruiz-Larranaga, O., Manzano, C., Iriondo, M., Garrido, J. M., Molina, E., Vazquez, P., & Estonba, A. (2011). Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. Journal of dairy science, 94(7), 3635-3641.

Settles, M., Zanella, R., McKay, S. D., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Whitlock, R., & Neibergs, H. (2009). A whole genome association analysis identifies loci associated with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection status in US holstein cattle. Animal genetics, 40(5), 655-662.

Sevilla, I., Li, L., Amonsin, A., Garrido, J. M., Geijo, M. V., Kapur, V., & Juste, R. A. (2008). Comparative analysis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. BMC Microbiology, 8(1), 1-8.

Smith, B. P. (2009). Large Animal Internal Medicine. Mosby Elsevier, St. Louis, MO, USA.

Soares, R. A. N., Vargas, G., Duffield, T., Schenkel, F., & Squires, E. J. (2021). Genome-wide association study and functional analyses for clinical and subclinical ketosis in Holstein cattle. Journal of Dairy Science, 104(9), 10076-10089.

Sohal, J.S., Singh S.V., Subhodh, S., Singh A.V., Singh, P.K., Sheoran, N. (2007): Mycobacteri um avium subspecies paratuberculosis diagnosis and strain typing present status and future developments. Indian J Exp Biol. 45(10):843-52.

Tabatabayi, AH. and R. Firouzi. 2001. Disease of Animals due to Bacteria (3rd ed ed.). University of Tehran press.

Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. S., & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human genetics*, *71*(5), 701-703.

Thompson-Crispi, K. A., Sargolzaei, M., Ventura, R., Abo-Ismail, M., Miglior, F., Schenkel, F., & Mallard, B. A. (2014). A genome-wide association study of immune response traits in Canadian Holstein cattle. BMC genomics, 15(1), 1-10.

Van Hulzen, K. J. E., Koets, A. P., Nielen, M., Hoeboer, J., Van Arendonk, J. A. M., & Heuven, H. C. M. (2012). Genetic variation for infection status as determined by a specific antibody response against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in milk of Dutch dairy goats. Journal of dairy science, 95(10), 6145-6151.

Van Hulzen, K. J. E., Schopen, G. C. B., van Arendonk, J. A. M., Nielen, M., Koets, A. P., Schrooten, C., & Heuven, H. C. M. (2012). Genome-wide association study to identify chromosomal regions associated with antibody response to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in milk of Dutch Holstein-Friesians. Journal of Dairy Science, 95(5), 2740-2748.

Vansnick, E., Vercammen, F., Bauwens, L., D'Haese, E., Nelis, H., & Geysen, D. (2005). A survey for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the Royal Zoological Society of Antwerp. *The Veterinary Journal*, *170*(2), 249-256.

Verschoor, C. P., Pant, S. D., You, Q., Schenkel, F. S., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2010). Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection status. BMC genetics, 11(1), 1-9.

Zare, Y., Shook, G. E., Collins, M. T., & Kirkpatrick, B. W. (2014). Heritability estimates for susceptibility to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection defined by ELISA and fecal culture test results in Jersey cattle. Journal of Dairy Science, 97(7), 4562-4567.

Dickinson, R. E., Dallol, A., Bieche, I., Krex, D., Morton, D., Maher, E. R., & Latif, F. (2004). Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. British journal of cancer, 91(12), 2071-2078.

Dubos, A., Castells-Nobau, A., Meziane, H., Oortveld, M. A., Houbaert, X., Iacono, G., & Herault, Y. (2015). Conditional depletion of intellectual disability and Parkinsonism candidate gene ATP6AP2 in fly and mouse induces cognitive impairment and neurodegeneration. Human molecular genetics, 24(23), 6736-6755.

Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., & Temiakov, D. (2010). Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. Journal of Biological Chemistry, 285(24), 18129-18133.

Scholz, B. A., Sumida, N., de Lima, C. D. M., Chachoua, I., Martino, M., Tzelepis, I., & Ohlsson, R. (2019). WNT signaling and AHCTF1 promote oncogenic MYC expression through super-enhancer-mediated gene gating. Nature genetics, 51(12), 1723-1731.

Zou, H. L., Su, C. J., Shi, M., Zhao, G. Y., Li, Z. Y., Guo, C., & Ding, Y. Q. (2009). Expression of the LIM-homeodomain gene Lmx1a in the postnatal mouse central nervous system. Brain research bulletin, 78(6), 306-312.v

Deng, W., Wu, J., Zheng, W., Wang, Q., Li, D., & Kuang, H. (2023). RNF150 suppresses papillary thyroid carcinoma with ASK1 ubiquitination presenting a direct target via inactivating p38 signaling axis. Cell Biology International.