

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

## چکیده

عفونت ویروس لوسمی گاوی (BLV) بیشتر در گله‌های شیری شیوع داشته و به دلیل محدودیت‌های تجاری و مرگ و میر ناشی از لنفوسارکوم باعث ضررهای اقتصادی مستقیم می‌شود که همچنین با کاهش تولید شیر و افزایش نرخ حذف نیز مرتبط می‌باشد. تاکنون هیچ درمان یا واکسنی برای این بیماری شناخته نشده است، لذا بررسی مناطق ژنومی مرتبط با حساسیت به عفونت BLV می‌تواند در کنترل و درمان این بیماری مؤثر بوده و در بهبود ژنتیکی حیوانات کمک کننده باشد. هدف از این پژوهش، مطالعه‌ی پویش کل ژنوم (GWAS) برای شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدا مرتبط با عفونت به BLV بود. این مطالعه با استفاده از گاوهای هلشتاین ایران که به طور طبیعی به BLV آلوده شده بودند انجام گرفت. بدین منظور از ۱۵۰ راس گاو هلشتاین در یکی از گاو‌داری‌های صنعتی اصفهان، نمونه خون جمع‌آوری و از آن‌ها استخراج DNA و سرم انجام گردید. سپس نمونه‌های DNA آماده شده با استفاده از تراشه‌های ۳۰k (SNPchip30k) (توسط شرکت ایلومینا) تعیین ژنوتیپ شدند. کنترل کیفیت نشانگرهای تعیین ژنوتیپ شده براساس شاخص‌های فراوانی آلل نادر ( $0.05 < P_{MAF}$ ), ژنوتیپ از دست رفته ( $0.05 > P_{MIND}$ ), نرخ تعیین ژنوتیپ ( $0.05 > P_{GENO}$ ) و تعادل هاردی-واینبرگ ( $1 \times 10^{-6} < P_{H-W}$ ) توسط نرم‌افزار PLINK انجام شد. بعد از آنالیز کنترل کیفیت ۱۴۵ راس گاو (۷۷ بیمار و ۶۸ شاهد) و ۲۲۸۶۸ نشانگر برای ادامه آنالیز باقی‌ماند. پس از انجام آنالیز پویش ژنوم در برنامه PLINK در نهایت هشت نشانگر بالاتر از حد آستانه معنی‌داری، شناخته شدند که بیشترین نشانگرهای معنی‌دار در کروموزوم‌های ۱۷ و ۲۱ قرار داشتند. سپس با بررسی بیوانفورماتیکی مناطق ژنومی معنی‌دار با استفاده از پایگاه‌های برخط ensemble و genecards، ژن‌های مرتبط با نشانگرهای معنی‌دار انتخاب شده، شناسایی شدند که مهم‌ترین آن‌ها شامل GRK4، TP53BP1، SCAPER، GLRB، PDGFC، TNIP2، PSTPIP1، CEP350، MR1، TOM1L2، SREBF1، COPS و TNFRS13B بود. آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) نشان داد که این ژن‌ها بیشتر در تنظیم فعالیت آنزیمی، تبادلات بین سلولی، پایداری DNA، فعالیت کلسیمی و فعالیت لیپیدی، پاسخ ضد ویروسی، پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر بیماری‌ها نقش دارند. تجزیه و تحلیل پویش کل ژنوم و همچنین آنالیز هستی‌شناسی جهت شناخت مناطق ژنومی مرتبط با عفونت‌های ویروس لوسمی گاوی، می‌تواند در طراحی روش‌های درمانی و راه‌های پیشگیری مؤثر و در اصلاح نژاد حیوانات نیز مفید باشد.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ، لنفوسیت، لوسمی گاوی، GWAS، SNP

## Genom-wide association study to identify the loci related to resistance in Leukosis Disease in Iranian Holstein cattle

### Abstract

Bovine Leukemia Virus (BLV) infection is more common in dairy cattle herds. Due to trade restrictions and deaths caused by lymphosarcoma, it causes direct economic losses, which is also related to the decrease in milk production and the increase in the elimination rate. No treatment or vaccine is known for this disease so far. So studying the genomic regions related to susceptibility to BLV infection can be effective in controlling and treating this disease and genetic improvement of animals. This research aimed to perform a whole genom-wide association study (GWAS) of cattle to identify genomic regions and candidate genes associated with BLV infection. This study was conducted using Holstein cows that were naturally infected with BLV. For this purpose, blood samples of 150 Holstein cows in an industrial dairy cattle farm in Isfahan 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 sequences for rare allele frequency components ( $P_{MAF} < 0.05$ ), missing genotype ( $P_{MIND} > 0.05$ ), genotyping rate ( $P_{GENO} > 0.05$ ), and Hardy-Weinberg equilibrium ( $P_{H-W} < 1 \times 10^{-6}$ ) and significance test was performed by PLINK software. After control analyzing, 145 cows (77 cases and 68 controls) and 22868 markers were left for further analysis. Finally 8 markers higher than the significant threshold were identified, and most significant markers were located on chromosomes 17 and 21. Using ensemble sites and genecards, genes associated with significant selected markers were identified and the most important of them were GRK4, TP53BP1, SCAPER, GLRB, PDGFC, TNIP2, PSTPIP1, CEP350, MR1, TOM1L2, SREBF1, COPS and TNFRS13B. Gene Ontology (GO) analysis showed that these genes are more involved in regulating enzyme activity, intercellular exchanges, DNA stability, calcium activity, and lipid activity. Whole genome wide association study analysis as well as ontology analysis to identify genomic regions related to bovine leukemia virus infections can be useful in designing effective treatment and prevention methods and in animal breeding.

**Keywords:** Bovine Leukemia, Genotype, GWAS, Lymphocyte, SNP



بیماری لکوز نخستین بار در آلمان، در سال ۱۸۷۱ (میلادی) توسط لسسرینگ پس از دیدن برآمدگی‌های زرد رنگ در طحال متورم گاو توصیف شد. در سال ۱۹۱۱ برای اولین بار در اروپای شرقی گزارش و در سال ۱۹۶۹ عامل آن (ویروس لوسمی گاو (BLV) و لکوز آنژئوتیک گاو) شناسایی شد، که با اسامی متفاوتی چون لکوز، لوسمی، لنفومای بدخیم و لنفوسارکوم شناخته می‌شود (Kim *et al.*, 2015). این ویروس سرطان‌زا با RNA تک رشته‌ای، از جنس دلتا رتروویروس اگزوژن بوده و در خانواده retroviridae قرار می‌گیرد (Reginald j. 1999). BLV با وارد کردن DNA پروویروس خود در DNA سلول میزبان، باعث ایجاد عفونت مداوم در تعدادی از لنفوسیت‌های B محیطی شده و احتمالاً در تمام طول زندگی حیوان پایدار باقی می‌ماند (Hemmatzadeh & Momtaz, 2007); همچنین یکی از بیماری‌های کشنده ویروسی می‌باشد که منجر به تومورهای بدخیم دستگاه رتیکیولاندوتلیال شده و می‌تواند توده‌هایی از لنفوسیت‌های سرطانی را در بافت‌های مختلف ایجاد کند (Radostits *et al.*, 2000). دوره‌ی نهفته بیماری، معمولاً از سه تا ۱۶ هفته متغیر بوده و نواحی که معمولاً درگیر می‌شود شامل روده، رحم، کلیه، کبد، قلب و طحال می‌باشد. نشانه‌های بالینی این بیماری برحسب عضو مبتلا متفاوت خواهد بود و دارای علائمی چون بی‌حالی، کم‌خونی، لاغری، ضعف عضلانی، کاهش شیر و تورم غده‌های لنفی سطحی می‌باشد که اغلب در دام‌های بالغ بالای سه سال مشاهده می‌شود (Carlson, 2002; Radostits *et al.*, 2007). لکوز ضررهای اقتصادی قابل توجهی را به صنعت گاوداری وارد کرده و هزینه‌های زیادی جهت کنترل و ریشه‌کنی آن صرف می‌شود (Carlson, 2002) که شامل کاهش تولید شیر، کاهش ارزش لاشه، کاهش فعالیت‌های تولیدمثلی، حذف گاو مبتلا به لنفوسارکوم، کاهش طول عمر و افزایش بیماری‌های تولیدمثلی در گله می‌باشند؛ اما پیامدهای غیرمستقیم این بیماری مانند هزینه جایگزینی حیوان، هزینه تشخیص و مراقبت‌های دامپزشکی و محدودیت در صادرات گاو و اسپرم از اهمیت بیشتری برخوردارند (Radostits *et al.*, 2007). اکثر ضررهای اقتصادی که اشاره شده، در گاوهای هلشتاین ایران نیز بروز پیدا کرده و باعث کاهش و افت تولید در واحدهای صنعتی می‌شود (Mohammadi *et al.*, 2011). شیوع عفونت در بین گله‌ها متفاوت بوده و به عواملی چون جنس، سن، نوع پرورش و مدیریت بستگی دارد (Saifi, 1384). همچنین میزان عفونت در گاوهای شیری بیشتر از گاوهای گوشتی بوده است که به واسطه تماس بیشتر می‌باشد نه یک حساسیت نژادی خاص (Radostits *et al.*, 2007). در سال ۲۰۱۱ محمدی و همکاران با بررسی ۱۳۷ گاو در تهران به روش ال‌ای‌زا، درصد آلودگی به لکوز آنژئوتیک را ۲۹/۹ درصد بدست آوردند که شیوع بیشتری نسبت به کشورهای پیشرفته دارای پایش سلامت منظم دارد (Mohammadi *et al.*, 2011). روش‌های تشخیص و شناسایی بیماری لکوز شامل خنثی‌سازی سرم، سنجش ایمنی با مواد رادیواکتیو، آگار ژل ایمونودیفیوژن (AGID<sup>۲</sup>)، ال‌ای‌زا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و وسترن بلاتینگ است که رایج‌ترین این روش‌ها AGID و ال‌ای‌زا سرم و شیر می‌باشند.

از سال ۱۹۷۰ با پیشرفت دانش ژنتیک مولکولی، روش‌های ارزیابی جدیدی برای دستیابی به ارزش اصلاحی با استفاده از نشانگرهای (SNP<sup>۳</sup>) ارائه شد (Abdullahi *et al.*, 2013). مطالعات پویش کل ژنومی (GWAS<sup>۴</sup>) برای شناسایی وابستگی بین یک نشانگر SNP و یک صفت به وسیله نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم انجام می‌شود (Goddard and Hayes, 2009). مطالعه‌ای توسط Abdalla و همکاران در سال ۲۰۱۶ در جمعیت گاوهای هلشتاین ایالات متحده انجام شد که از ۱۱۵۵۴ گاو هلشتاین در ۱۲ گله و در ۱۶ ایالت استفاده شد. پویش کل ژنوم نشان داد که BLV یک صفت پلی‌ژن و پیچیده می‌باشد که توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود. تجزیه و تحلیل مجموعه غنی‌سازی ژنی (GSEA<sup>۵</sup>)، مسیرهای مختلفی از جمله مسیر سیگنالینگ گیرنده جفت شده با پروتئین G، تنظیم فرآیندهای متابولیسمی نوکلئوتیدی و فرآیندهای مختلف مرتبط با کلسیم را به عنوان مسیرهای مرتبط با عفونت BLV شناسایی کردند. یافته‌های مربوط به GWAS و GSEA می‌تواند در درک بهتر ساختار ژنتیکی این بیماری کمک کننده باشد (Abdalla *et al.*, 2016). مطالعات مختلفی جهت شناسایی ژن‌های کاندید برای ویروس لوسمی گاو تحت عنوان پویش کل ژنوم انجام و به شناسایی ژن‌های عملکردی مرتبط با مسیرهای مختلف زیستی و ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها از جمله (CNTN3 (Takishima *et al.*, 2017); DOA1, LTB, LER3, GRP11, CRISP1, CD2AP, PKHD1

1. Bovine leukemia virus
2. Agar Gel Immunodiffusion
4. Single Nucleotide Polymorphism
5. Genome Wide Association Study
6. Gene Set Enrichment Analysis

(Mekata and Yamamoto, 2022) *SPATA16*; (Carignano *et al.*, 2018) *TFAP2D*, *TNXB*, *TRAM2*, *TUBB5*; حساسیت به عفونت BLV نقش مهمی را ایفا کنند. بنابراین با توجه به اهمیت صفات سلامت و همچنین نقش مؤثر نژاد هلشتاین در تولید شیر و زیان‌های اقتصادی ناشی از این بیماری که گاوداری‌های صنعتی متحمل می‌شوند، شناسایی دام‌های حساس و مقاوم به این بیماری می‌تواند نقش بسزایی در کاهش و جلوگیری از آلودگی گاوداری‌ها به این عفونت داشته باشد.

در این پژوهش هدف استفاده از مارکرهای پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) با تراکم بالا برای شناسایی ژن‌ها و جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری لکوز و آل‌های مقاوم به این بیماری، با استفاده از روش پویس کل ژنوم (GWAS) بود که می‌تواند در انتخاب علیه این بیماری مؤثر باشد. این اولین مطالعه پویس ژنومی مرتبط با بیماری لکوز در گاوهای هلشتاین ایران می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از اطلاعات فنوتیپ (شماره حیوان، شماره پدر و مادر، سال زایش، جنس حیوان و نوع تولد (یک یا دوقلو) و سن مادر هنگام زایش) مربوط به گاوهای هلشتاین یک گاوداری صنعتی در اصفهان استفاده شد. در ابتدا گاوها از لحاظ بیمار یا سالم بودن نسبت به بیماری لکوز آزمایش شدند (الایزا نمونه خون) و گاوهای آلوده و سالم شناسایی و گروه بندی و تعیین فنوتیپ صورت گرفت. بدین منظور از ۱۵۰ راس گاو هلشتاین خون‌گیری به عمل آمد و استخراج سرم و DNA از آنها صورت گرفت (۵ راس گاو به دلیل در دسترس نبودن اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی از روند آنالیز حذف شدند). تعیین ژنوتیپ ۱۴۵ گاو هلشتاین (۶۸ راس دام سرم منفی، ۷۷ راس دام سرم مثبت) با استفاده از ریز آرایه‌های ۳۰K (SNPchip30k) شرکت Gene seek ایلومینا انجام شد. برای ویرایش اولیه داده‌های ژنومی با استفاده از نرم‌افزار PLINK، نیاز به تهیه فایل ped و map بود. فایل map، به ترتیب شامل چهارستون شماره نوکلئوتید، نام snp، فاصله ژنتیکی و فاصله فیزیکی بود که از پایگاه اطلاعاتی <https://support.illumina.com/downloads/geneseek-ggp-bovine-ld-v4-product-files.html> استفاده شد؛ همچنین فایل ped به ترتیب شامل نژاد، شماره دام، شماره پدر، شماره مادر، اثر ثابت (در اینجا اثر جنس لحاظ شد) ستون مربوط به فنوتیپ و سپس برای هر جایگاه نشانگر، جفت نوکلئوتید (آلل رفت) بود که این فایل نیز با استفاده از نرم‌افزارهای exel (Microsoft office 2019) و texpad (نسخه ۵,۳,۱,۰) تهیه شد.

برای کنترل کیفیت داده‌های تعیین ژنوتیپ شده از معیارهای فراوانی نرخ تعیین ژنوتیپ دام‌ها ( $P_{MIND} > 0.05$ )، نرخ تعیین ژنوتیپ مارکرها ( $P_{GENO} > 0.05$ )، تعادل هاردی-واینبرگ ( $P_{H-W} < 1 \times 10^{-6}$ ) و فراوانی آلل حداقل ( $P_{MAF} < 0.05$ ) (Teo *et al.*, 2007) به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ، طبق دستور نرم افزار PLINK (نسخه ۱/۰۶) استفاده شد (Purcell *et al.*, 2007)، سپس آنالیز GWAS در PLINK مطابق دستور برنامه انجام شد.

جهت تعیین سطح معنی‌داری، از تصحیح بنفرونی ( $\beta = \alpha/n$ ) استفاده شد که n تعداد آزمون (در این مطالعه تعداد مارکرهای مورد استفاده) و  $\alpha$  خطای آزمایشی (در سطح ۰/۰۵) می‌باشد. جهت تصویرسازی و بررسی سطح معنی‌داری مارکرها از گراف منهتن (نرم افزار SNPEVG نسخه ۳/۲) و برای یافتن ارتباط جایگاه‌های شناسایی شده مرتبط با ژن‌ها و عملکرد آنها به ترتیب از پایگاه‌های بر خط Ensemble (قسمت Biomart) و Genecards استفاده شد. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌ها توسط پایگاه بر خط <https://www.Uniprot.org> انجام و در نهایت نمودار هستی‌شناسی (GO<sup>۱</sup>) ژن‌ها توسط پایگاه بر خط PANTHER ترسیم و مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

از مجموع ۱۵۰ راس گاو نمونه برداری شده، ۱۴۵ راس گاو دارای اطلاعات فنوتیپی و ژنومی وارد مرحله آنالیز شدند که از این ۱۴۵ راس دام براساس آزمایش الایزا، ۶۸ راس دام در گروه سالم یا مقاوم (سرم منفی سالم) و ۷۷ راس دام در گروه بیمار (سرم مثبت) دسته‌بندی شدند. بعد از کنترل کیفیت، پنج راس گاو به دلیل ژنوتیپ از دست رفته ( $MIND > 0.05$ ) حذف شدند؛ ۶۸۲۸ نشانگر به دلیل فراوانی آلل نادر ( $MAF < 0.05$ )، ۳۳۹ نشانگر به دلیل نرخ تعیین ژنوتیپ ( $GENO > 0.05$ ) و هشت نشانگر با تعادل هاردی-واینبرگ ( $H-W < 1 \times 10^{-6}$ ) حذف شدند. در نهایت

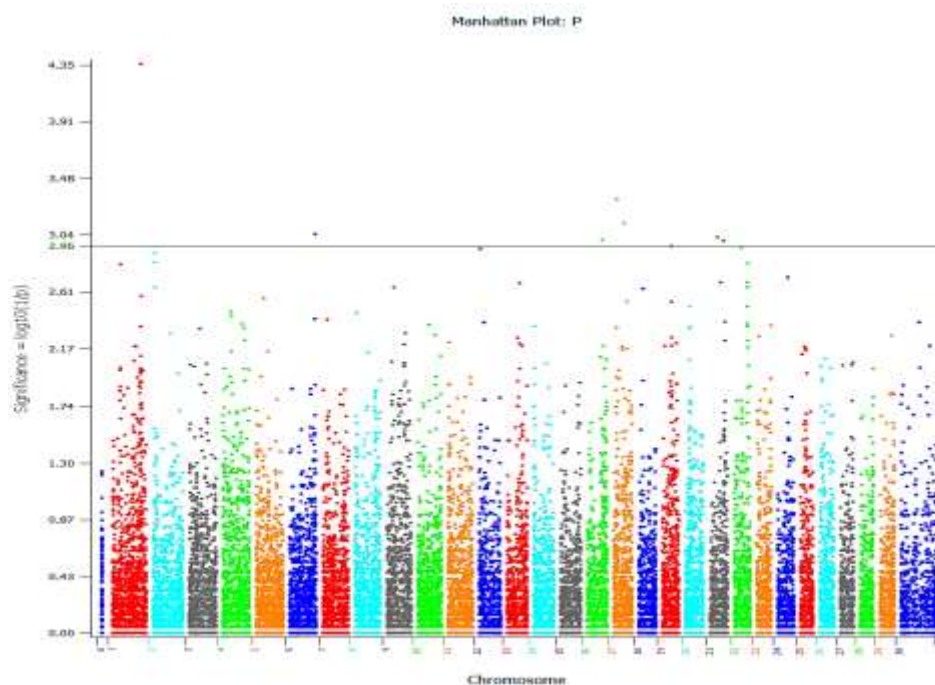
۱۴۰ راس گاو با تعداد ۲۲۸۶۸ نشانگر باقی و در آنالیز GWAS مورد استفاده قرار گرفتند. مراحل مختلف کنترل کیفیت در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱. مراحل مختلف 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 ( $MIND > 0.05$ )	۱۴۵	۵	۱۴۰
تعداد نشانگرها با فراوانی آلل نادر ( $MAF < 0.05$ )	۳۰۰۴۳	۶۸۲۸	۲۳۲۱۵
تعداد نشانگر با ژنوتیپ از دست رفته ( $GENO > 0.05$ )	۳۰۰۴۳	۳۳۹	۲۹۷۰۴
تعداد نشانگر با تعادل هاردی واینبرگ ( $H-W < 1 \times 10^{-6}$ )	۳۰۰۴۳	۸	۳۰۰۳۵

بعد از تکمیل مراحل کنترل کیفیت، آنالیز پویش کل ژنوم (GWAS) انجام شد و فایل نهایی GWAS به ترتیب شامل شماره کروموزوم، نام نشانگر، موقعیت فیزیکی و سطح معنی‌داری (P-value) بود که نشانگرها (براساس یک درصد SNPهای معنی‌دار شده در سطح  $0.05$ ) انتخاب و گراف منهتن رسم شد (شکل ۱).

در این پژوهش هشت نشانگر بالاتر از حد آستانه، برای ادامه آنالیز در نظر گرفته شده و بیشترین نشانگرهای معنادار در کروموزوم‌های ۲۱ و ۱۷ بودند. مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهای معنادار در جدول (۲) نشان داده شده‌اند (توسط پایگاه‌های برخط [ensembl.org](http://ensembl.org) و [genecards.org](http://genecards.org)).



شکل ۱. گراف منهتن جهت تصویرسازی و مشاهده‌ی نشانگرهای حاصل از آنالیز GWAS

مطالعه‌ای مشابهی در سال ۲۰۱۶ توسط Brym و همکاران، تحت عنوان ارتباط ژنومی برای پاسخ به ویروس لوسمی گاوی بر روی ۷۳ گاو هلستاین انجام دادند که وضعیت BLV گاوها با استفاده از الایزا سرم، nested-PCR و شمارش هماتولوژیک تعیین و پویش کامل ژنوم با استفاده از تراشه ۵۰k صورت گرفت. در نتیجه ۹ نشانگر معنی‌دار با استفاده از آنالیز GWAS تعیین و بیشترین نشانگرها روی کروموزوم‌های ۳، ۸ و ۲۳ قرار داشتند (Brym et al., 2016).

در این پژوهش طبق مطالعه Carignano و همکاران در سال ۲۰۱۸ و همچنین مطالعه Gao و همکاران (Gao et al., 2018)، ژن‌ها در فاصله 1Mb (۵۰۰kb بالا و ۵۰۰kb پایین) از SNP‌های معنی‌دار شده، مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲. ژن‌های مرتبط با جایگاه‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون GWAS

شماره کروموزوم	ID نشانگر	موقعیت فیزیکی	P Value	مهمترین ژن شناسایی شده
۱	BTB-00061242	۱۳۳۳۳۳۹۶۷	۰/۰۰۰۰۴۴۸۶	PPP2R3A, MSL2, STAG1
۱۷	BovineHD1700003491	۱۲۱۱۴۳۸۲	۰/۰۰۰۴۸۳۳	REELD1, POU4F2, LSM6, ZNF827
۱۷	BTB-01680332	۴۲۵۸۴۹۶۵	۰/۰۰۰۷۴۰۷	GLRB, PDGFC
۶	ARS-BFGL-NGS-117080	۱۱۵۷۹۳۵۱	۰/۰۰۰۸۹۳۹	GRK4, LRPAP1, HTT, TNIP2, FAM193, RNF4
۲۱	ARS-BFGL-NGS-119025	۳۱۹۶۰۶۳۶	۰/۰۰۰۹۴۸۳	SCAPER, TMEM266, ETFA, ISL2, PSTPIP1
۱۶	BovineHD1600017306	۶۱۶۹۲۲۸۶	۰/۰۰۰۹۹۱۷	ACBD6, CEP350, MR1, LHX4, TSPAN3, XPR1, STX6
۲۱	BovineHD2100015790	۵۵۲۲۶۶۴۱	۰/۰۰۱۰۰۹	TP53BP1, FKBP3, TUBGCP4, PPIP5K1, CKMT1A, MFAPI, PDIA3
۱۹	ARS-BFGL-NGS-1097	۳۴۸۳۶۴۱۶	۰/۰۰۱۱۰۴	ATPAF2, TOM1L2, SREBF1, COPS3, TNFRSF13B, TMEM11, MAP2K3

با توجه به آنالیز هستی‌شناسی و اطلاعات مربوط به پایگاه‌های بر خط genecards و ensemble عملکرد برخی ژن‌های شناسایی شده به صورت زیر است:

**PPP2R3A** این ژن کد کننده‌ی یکی از زیر واحدهای تنظیمی پروتئین فسفاتاز ۲ ( $B^{\alpha}$ ) و در کنترل منفی رشد و تقسیم سلولی نقش دارد. بیماری‌های مرتبط با این ژن عبارتند از تاکی کاردی بطنی، پلی مورفیک کاتکول آمینرژیک و اختلال عملکرد دهلیزی. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به سیگنالینگ p70S6K و سیگنالینگ بتا آدرنرژیک اشاره کرد. حاشیه نویسی هستی‌شناسی (GO) مربوط به این ژن شامل اتصال یون کلسیم و فعالیت تنظیم کننده پروتئین فسفاتاز است. پارالوگ مهم این ژن **PPP2R3B** است. مطالعه‌ای که در گاو هلشتاین کانادایی بر روی ضایعات سم عفونی با رویکرد ارتباط ژنومی و تجزیه و تحلیل عملکردی انجام شد، نشان داد که ژن **PPP2R3A** در کروموزوم یک با ضایعات سم عفونی در ارتباط است؛ درحالی که این ژن در این پژوهش برای بیماری لکوز شناسایی شده است (Malchiodi et al., 2018). **GRK4** یک ژن کد کننده پروتئین بوده که عضوی از زیرخانواده گیرنده کیناز پروتئین متصل شونده به نوکلئوتید گوانین (پروتئین G) را کد کرده و به طور خاص فرم‌های فعال گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G را فسفریله و موجب غیرفعال شدن آن‌ها می‌شود. این ژن با فشار خون ژنتیکی و اکتسابی و سندرم هرمانسکی-پودلاک ارتباط دارد و از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به فوتوترنس‌داکشن (انتقال نوری بینایی) و مسیرهای آرامش و انقباض میومتر اشاره کرد. هستی‌شناسی این ژن شامل فعالیت ترانسفراز، انتقال گروه‌های حاوی فسفر و فعالیت پروتئین تیروزین کیناز بوده و پارالوگ مهم این ژن **GRK5** می‌باشد. یک تجزیه تحلیل عملکردی به روش پویش کل ژنوم (GWAS) برای کتوز بالینی و تحت بالینی در گاو هلشتاین، جهت شناسایی ژن‌های مرتبط انجام شد. ژن **GRK4** که در این مطالعه برای بیماری لکوز تعیین شد، یکی از ژن‌های شناسایی شده بر روی کروموزوم ۶ برای حساسیت به کتوز تحت بالینی شیر نیز بود (Soares et al., 2021). **TP53BP1** یک ژن کد کننده پروتئین بوده که نقش‌های متعددی را در پاسخ به آسیب DNA و ساختار سه بعدی ایفا کرده و ارتقای مسیرهای NHEJ را موجب می‌شود. بیماری‌های مرتبط با این ژن شامل میکروسفالی و کوریورینوپاتی و اتوزومال مغلوب بوده و حاشیه نویسی‌های هستی‌شناسی ژن مربوط به آن شامل اتصال DNA به توالی خاص و اتصال p53 است (Blasiak et al., 2021). **ACBD6** یک ژن کد کننده پروتئین بوده و پیش‌بینی می‌شود که باعث

فعال شدن اتصال لیپیدی و اتصال آسیل-CoA، تنظیم فعالیت آنزیم‌های NMT<sup>1</sup> و محافظت از سیستم‌های غشایی در برابر ماهیت شویندگی استیل‌کواهای آزاد می‌شود. بیماری‌های مرتبط با این ژن شامل کمبود هورمون هیپوفیز بوده و از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به متابولیسم اسیدهای چرب اشاره کرد. حاشیه نویسی‌های هستی شناسی ژن مربوط به این ژن شامل اتصال لیپیدی و اتصال چربی آسیل-CoA است (Soupene and Kuypers, 2019). SCAPER یک ژن کد کننده پروتئین است که در سیتوزول و هسته قرار دارد و پیش‌بینی می‌شود که باعث فعال شدن اتصال اسید نوکلئیک و اتصال یون روی می‌شود. بیماری‌های مرتبط با این ژن شامل اختلال رشد فکری و رتینیت پیگمانتوزا و اختلال گفتار است. حاشیه نویسی‌های هستی شناسی ژن مربوط به آن شامل اتصال اسید نوکلئیک است. یک مطالعه فراتحلیلی (متاآنالیز) برای تشخیص اثر انتخاب بر روی هفت جمعیت گاو گوشتی اسپانیا انجام گرفت که نشان داد ژن SCAPER در کروموزوم ۲۱، بین جفت باز ۳۲،۲۰۷،۲۶۴ و ۳۲،۴۱۴،۳۱۶ قرار دارد که در شبکه آندوپلاسمی و در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش دارد (Gonzalez- Rodriguez *et al.*, 2016).

### آنالیز هستی‌شناسی ژن‌ها (GO)

آنالیز هستی‌شناسی برای برخی از ژن‌های شناسایی شده توسط پایگاه برخط <https://www.Uniprot.org> براساس سه دسته‌بندی عمومی اجزاء سلولی<sup>۲</sup>، عملکرد مولکولی<sup>۳</sup> و فرآیندهای زیستی<sup>۴</sup> انجام و نتیجه در جدول (۳) درج شده است.

جدول ۳. آنالیز هستی‌شناسی مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده با استفاده از آزمون GWAS

ژن	اجزای زیستی	عملکرد مولکولی	فرآیند زیستی
PPP2R3A	بخشی از کمپلکس پروتئین فسفاتاز	اتصال یون کلسیم، فعالیت پروتئین فسفاتاز، اتصال یون فلزی	تنظیم فعالیت کاتالیزوری، دفسفوریلاسیون پروتئین، توسعه سومیت
GRK4	سیتوپلاسم، سیتوزول، غشاء، پلاسمایی	اتصال ATP، فعالیت پروتئین کیناز، رودوپسین کیناز	فسفوریلاسیون پروتئین، تنظیم مسیر سیگنالینگ G پروتئین، تنظیم و هدایت انتقال سیگنال
TP53BP1	سیتوپلاسم، کمپلکس ترمیم DNA، کینتوکور، نوکلئوپلاسم، هسته	اتصال DNA آسیب دیده، اتصال هیستون، اتصال به DNA تلومریک، فعالیت تنظیم-کننده رونویسی	پاسخ سلولی به اشعه ایکس، تنظیم فعالیت رونویسی، هم-الیگومریزاسیون پروتئین
ACBD6	سیتوزول	اتصال آسیل CoA	_____
SCAPER	سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی، نوکلئوپلاسم	اتصال اسید نوکلئیک، اتصال یون روی	رشد فولیکول تخمدان، رشد شبکه چشم، اسپرماتوژنسیز
GLRB	دندریت، غشای پلاسمایی، غشای پس سیناپسی، اتصال گلیسین	فعالیت کانال یونی و کانال کلرید، فعالیت گیرنده انتقال دهنده عصبی، مسیر سیگنالینگ نوروپپتیدی، اتصال کمپلکس حاوی پروتئین	انتقال سیناپسی شیمیایی، انتقال غشایی یون، فرآیند سیستم عصبی، هدایت سیگنال
PDGFC	سیتوزول، لومن شبکه آندوپلاسمی، فضای خارج سلولی، هسته، غشای پلاسمایی	اتصال گیرنده فاکتور رشد، فعالیت همودایمیریاسیون پروتئین	توسعه سیستم عصبی مرکزی، توسعه دستگاه گوارش، رشد اندام جنینی، تنظیم تقسیم سلولی، تنظیم فعالیت MAP کیناز

1. N-myristoyl Transferase
2. Cellular Component
3. Molecular Function
4. Biological Process

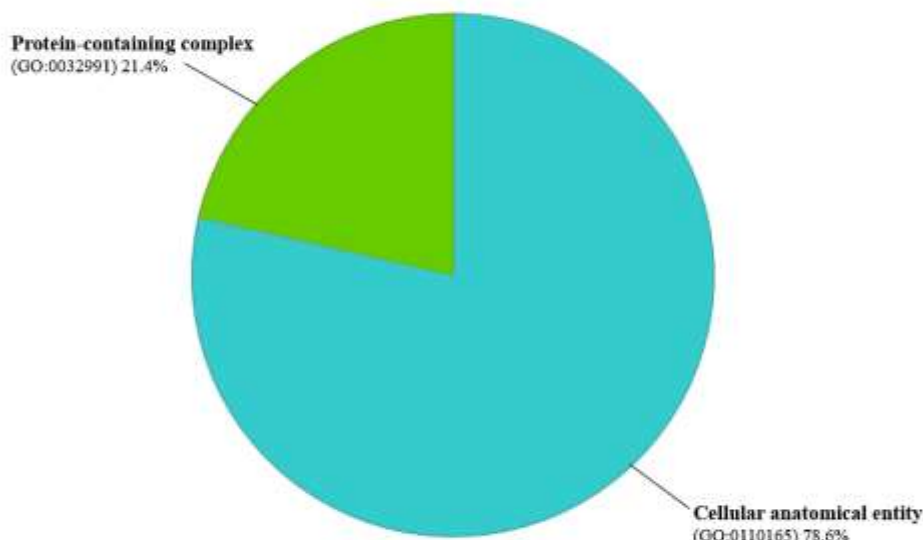
<i>TNIP2</i>	سیتوزول، نوکلئوپلاسم	اتصال یون فلزی، اتصال پروتئین وابسته به اصلاح پلی یوبیکوئیتین، اتصال پروتئین کیناز	واکنش التهابی، تنظیم فعال سازی سلول های B، تنظیم فعال شدن ماکروفاژها
<i>PSTPIP1</i>	رشته اکتین، سیتوزول، ناحیه دور هسته ای سیتوپلاسم	اتصال رشته اکتین، اتصال پروتئین یکسان	پلیمریزاسیون رشته اکتین، چسبندگی سلولی، اندوسیتوز، واکنش التهابی، پاسخ ایمنی ذاتی، هدایت سیگنال
<i>CEP350</i>	سیتوپلاسم، غشاء، هسته، دوک	اتصال میکروتوبول	استحکام میکروتوبول، لکالیزاسیون پروتئین در سانتروزوم
<i>MRI</i>	غشای شبکه آندوپلاسمی، غشای گلژی	اتصال بتا ۲ میکروگلوبولین، اتصال به گیرنده سلول T	پاسخ ایمنی ذاتی، تنظیم سمیت سلولی به واسطه سلول T علیه سلول تومور، تمایز سلول های T در تیموس
<i>TOM1L2</i>	اندوزوم، اگزوزوم خارج سلولی، غشاء	اتصال پروتئین کیناز	تنظیم منفی تقسیم هسته ای میتوزی، انتقال پروتئین، هدایت سیگنال
<i>SREBF1</i>	کروماتین، سیتوزول شبکه آندوپلاسمی، نوکلئوپلاسم	فعالیت گیرنده های هسته ای، اتصال پروتئین کیناز، اتصال عنصر پاسخ استرول، اتصال همزمان تنظیم کننده رونویسی	ترشح انسولین، فرآیند متابولیک لیپید، تنظیم ضریب قلب توسط سیگنال شیمیایی، تنظیم ذخیره چربی، تنظیم رونویسی توسط RNA پلیماز
<i>COPS3</i>	سیتوپلاسم، نوکلئوپلاسم، هسته	—	در رشد جنینی رحم، تنظیم پاسخ آسیب DNA، فرآیند کاتابولیک پروتئین وابسته به یوبیکوئیتین
<i>TNFRSF13B</i>	غشای پلاسمایی	فعالیت گیرنده سیگنال	پاسخ ایمنی ذاتی، هموستاز سلول B، مسیر سیگنالینگ گیرنده سطح سلولی، تنظیم تکثیر سلول های B

*GLRB*، این ژن زیر واحد بتا گیرنده گلیاسین را کد می کند که نقش مهمی در کاهش تحریک پذیری عصبی دارد و به تولید جریان های پس سیناپسی با دارنده کمک می کند. مسیرهای مرتبط با آن عبارتند از، انتقال از طریق سیناپس های شیمیایی و بیان *CFTR* وابسته به آدرنژیک بتا-۲. جهش در این ژن باعث بیماری هایپراکلکسی ارثی شده که با سفتی عضلانی مشخص می شود. میکولونوس مادرزادی ارثی گوساله ها، یک بیماری اتوزوم مغلوب است که طی مطالعه ای با ژن *GLRB* در ارتباط می باشد (Pierce et al., 2001). *PDGFC* یک ژن کد کننده پروتئین و فاکتور رشد است. این ژن در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله رشد جنینی، رگ زایی، تمایز و تکثیر سلولی نقش اساسی دارد و بنظر می رسد که نقش مهمی در بهبود زخم، در سه مرحله التهاب، تکثیر و بازسازی داشته باشد؛ همچنین به رشد طبیعی قلب، گوش، سیستم عصبی مرکزی و کلیه کمک می کند. در بیماری پیش رونده کلیه، گلیوبلاستوما، مدولوبلاستوما و فیروز نقش دارند (Reigstad et al., 2005). طی مطالعه ای نشان داده شد که *PDGF-Cb* ممکن است به عنوان یک مولکول تنظیم کننده منفی ترشح *PDGF-C* عمل کند و همچنین در تومورزایی نیز نقش دارد (Zhao et al., 2008). *LRPAP1* این ژن پروتئینی را رمز گذاری می کند که با پروتئین مرتبط با گیرنده لیوپروتئین تعامل می کند. همچنین طی مطالعه ای این ژن با رسوب چربی در نژادهای گوسفند در ارتباط بود (Taghizadeh et al., 2022). *TNIP2* طی مطالعه ای در فرآیند التهابی و همچنین در پاسخ ایمنی ذاتی نقش داشته و یک کمپلکس سه تایی را با *NFKB1* و *MAP3K8* تشکیل می دهد، اما به نظر می رسد که در بالادست *MAP3K8* در مسیر سیگنالینگ *TLR4* عمل می کند. در سلول های اندوتلیال نیز نقش داشته و ممکن است به عنوان فعال کننده رونویسی عمل کند (Lou and Huang, 2020). *PSTPIP1* این ژن یک پروتئین اسکلت سلولی را کد می کند که در بافت های خون ساز بیان می شود و از مسیرهای مرتبط با آن می توان به التهاب و بیماری اشاره کرد؛ همچنین باعث فعال سازی سلول T شده و در ایمنی ذاتی، پاسخ التهابی و در تنظیم اسکلت سلولی اکتین نقش دارد (Badour et al., 2003). *CEP350* محصول این ژن پروتئینی مرتبط با اسکلت سلولی است. طبق مطالعه غنی سازی مجموعه ژن (GSEA) که بر روی گاوهای هلشتاین چینی انجام شد، نشان داد که ژن *CEP350* با گلوبول های سفیدخون، التهاب، مسیرهای مربوط به شیردهی در گاوهای شیری و ایمنی در ارتباط است (Chen et al., 2022). به نظر می رسد که *MRI*، بخشی از پاسخ ایمنی ذاتی را تشکیل می دهد. توسعه این ژن به لنفوسیت های B وابسته بوده و به عنوان یک حسگر ایمنی متابولوم سلول سرطانی عمل می کند؛ همچنین ممکن است یک متابولیت خاص تومور یا مرتبط با تومور را برای بقای سلول های سرطانی



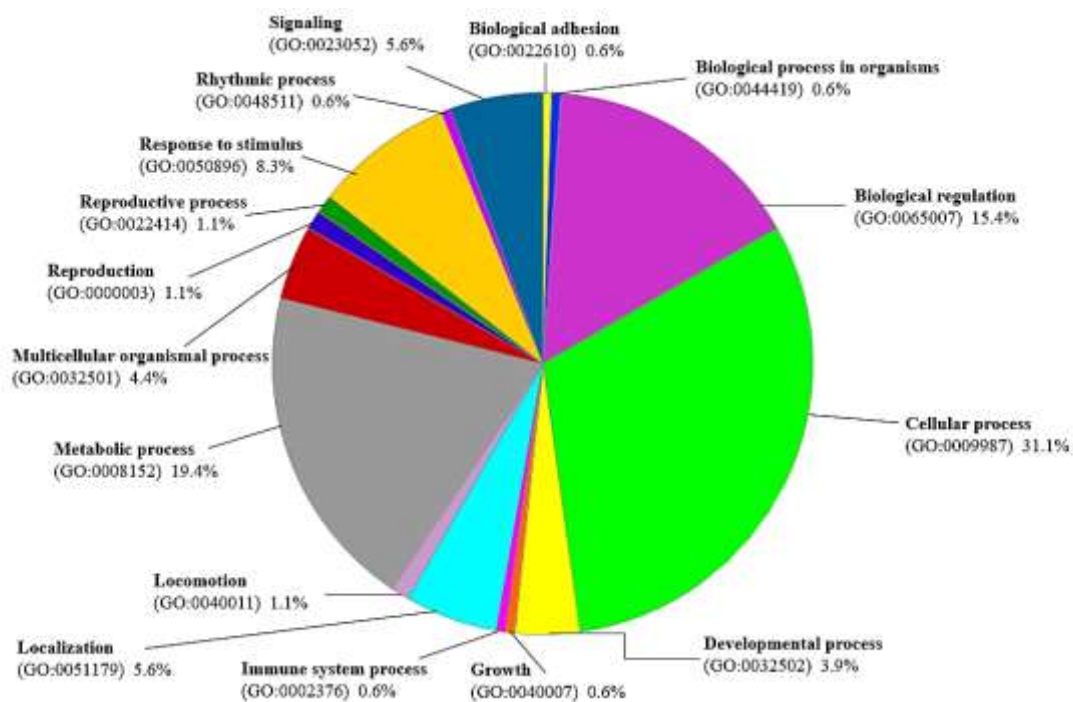
ارائه دهد (Goldfinch, 2010). *TOM1L2* نقش این ژن در پاسخ به ایمنی و احتمالاً در سرکوب تومور است. کاهش آن باعث افزایش خطر ابتلا به عفونت، تشکیل تومور، افزایش تعداد سلول‌های B و T و اختلال در پاسخ هومورال می‌شود (Girirajan *et al.*, 2008). *SREBF1* از مسیرهای مرتبط با این ژن می‌توان به متابولیسم استروئیدها و بیان ژن (رونویسی) اشاره کرد. *SREBF1* قادر به تحریک بیان ژن لیپوژنیک و کلستروژنیک بوده و برای پاسخ ایمنی ذاتی در ماکروفاژها با تنظیم متابولیسم لیپید، مورد نیاز می‌باشد؛ همچنین با متابولیسم اسید چرب شیر نیز در ارتباط است. در مطالعه‌ای بیان شده که پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در *SREBF1* می‌توانند برای ترکیب اسید چرب سالم‌تر استفاده شوند (Nafikov *et al.*, 2013). *COPS3* پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن دارای فعالیت کیناز است که تنظیم کننده‌های دخیل در انتقال سیگنال را فسفریله می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان انجام شد، نشان داده شد که بیان اکثر ژن‌های بتا دفسین<sup>۱</sup> مثل *COPS* در بافت مشتق شده از پستان‌های آلوده به باکتری، بسیار بیشتر از پستان‌های عاری از باکتری است (Kościuczuk *et al.*, 2014). پروتئین کدگذاری شده توسط *TNFRSF13B*، یک عضو خاص لنفوسیتی از خانواده گیرنده فاکتور نکروز تومور ( $TNF^{\alpha}$ ) است. بیماری‌های مرتبط با *TNFRSF13B* عبارتند از کمبود ایمنی و ایمونوگلوبولین A2. این ژن در تحریک عملکرد سلول‌های B و T و نیز در تنظیم ایمنی هومورال نقش دارد (Salzer *et al.*, 2009). *MAP2K3* پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن یک پروتئین کیناز با ویژگی دوگانه است که به خانواده MAP کیناز تعلق دارد. این کیناز برای بیان ناقل گلوکز ضروری بوده و می‌تواند توسط انسولین فعال شود. مطالعه‌ای در گاو نشان داد که این ژن در چربی عضلانی و متابولیسم چربی نقش دارد (Taye *et al.*, 2017).

آنالیز هستی‌شناسی برای کل ژن‌های شناسایی شده، براساس سه دسته‌بندی اجزاء سلولی (شکل ۲)، فرآیندهای زیستی (شکل ۳) و عملکرد مولکولی (شکل ۴) با نمودار دایره‌ای توسط پایگاه بر خط PANTHERdb.org رسم شد.

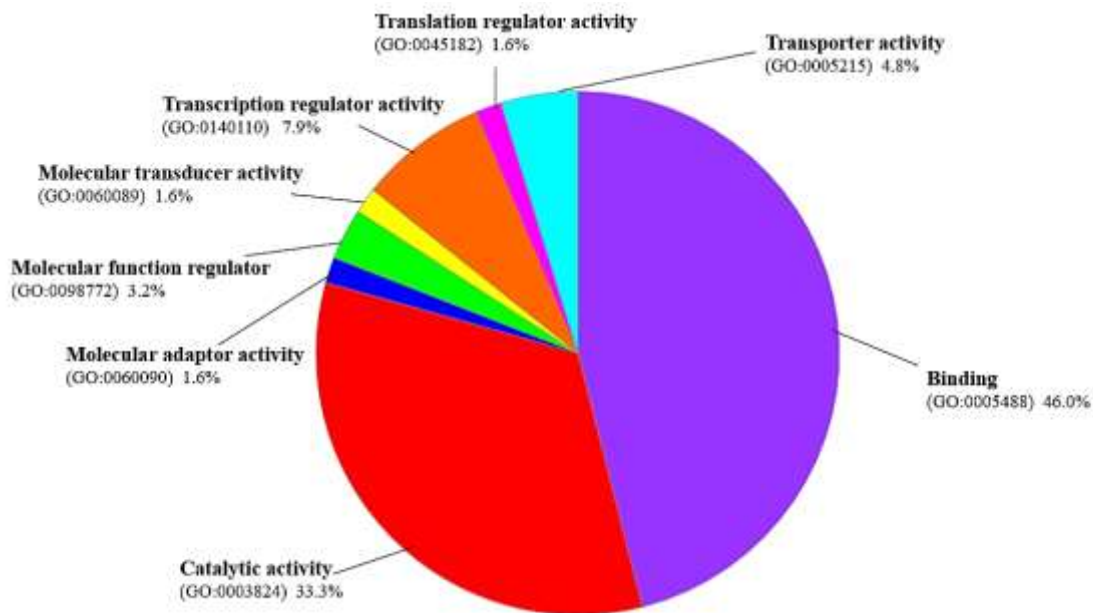


شکل ۲. آنالیز هستی‌شناسی (GO) ژن‌های شناسایی شده مرتبط با بیماری لکوز برای اجزاء سلولی (C-C)

1. Beta Defensin
2. Tumor Necrosis Factor



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



شکل ۴. آنالیز هستی شناسی (GO) ژن‌های شناسایی شده مرتبط با بیماری لکوز 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 BLV نیز گزارش شدند. ژن *RNF123* و *CEP104*، به ترتیب بر روی کروموزوم ۲۲ و ۱۶ گاوی که برای عفونت به BLV گزارش شده‌اند، با ژن *RNF4* و *CEP350* واقع در کروموزوم ۶ و ۱۶ گاوی که در این پژوهش شناسایی شد، در یک خانواده قرار داشتند (Brym *et al.*, 2016; Sahana *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای گزارش شد که ژن‌های *MAP2K3* و *TNFRSF13B* در تحریک عملکرد سلول‌های B و T و تنظیم ایمنی هومورال نقش دارند (Falini *et al.*, 2022; Salzer *et al.*, 2009). طی مطالعه‌ی پویا کل ژنومی در جمعیت گاو هلشتاین چینی، ژن‌های *ETFA*، *TMEM266* و *ISL2* را که مربوط به سازگاری، سلامت و صفات تولید مثل و ایمنی بود را شناسایی کردند (Liu *et al.*, 2021)؛ نکته قابل توجه اینکه، این سه ژن جزء ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق بودند که با مطالعه‌ی Liu و همکاران مطابقت داشت. همچنین ژن‌های *TNIP2*، *PSTPIP1*، *CEP350*، *MR1*، *TOM1L2*، *TP53BP1* و *TNFRSF13B* در مسیرهای مهمی چون پاسخ ایمنی ذاتی و التهابی، فعال سازی سلول‌های T و B، سرکوب تومور و تنظیم ایمنی هومورال نقش دارند که با توجه سایر گزارشات احتمال داده می‌شود که این ژن‌ها نقش اساسی را در مقاومت بر علیه عفونت BLV در گاوهای هلشتاین ایران ایفا می‌کنند.

## نتیجه گیری

در این پژوهش یک آنالیز پویا کل ژنومی موردی\_شاهدی، برای عفونت به BLV در گاو هلشتاین ایران صورت گرفت. همچنین بیشترین نشانگرهای معنی‌دار در کروموزوم‌های ۱۷ و ۲۱ قرار داشت. نتایج هستی شناسی نشان داد که بیشتر این ژن‌ها کدکننده‌ی پروتئین بوده و در تنظیم فعالیت‌های آنزیمی، تبادلات بین سلولی، پایداری DNA، فعالیت کلسیمی، سیستم عصبی و فعالیت لیپیدی نقش دارند. مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده مرتبط با این بیماری *GRK4*، *TP53BP1*، *TNIP2*، *PSTPIP1*، *CEP350*، *MR1*، *TOM1L2*، *SREBF1*، *COPS* و *TNFRSF13B* هستند، که این ژن‌ها طبق تحقیقات دیگر در مواردی از قبیل ضایعات عفونی سم، بیماری کتوز تحت بالینی، BCS گاو، متابولیسم اسیدهای چرب و رسوب چربی، عفونت‌های مختلف مثل ورم پستان و در صفات گوشت و سفتی عضلانی در گاوهای گوشتی نقش داشتند؛ همچنین مرتبط با مسیرهای ایمنی ذاتی، ایمنی هومورال و تومورهای سرطانی بودند. بنابراین می‌توان گفت شناخت مناطق ژنومی مرتبط با عفونت‌های ویروسی مانند لکوز، می‌تواند در طراحی روش‌های درمانی و راه‌های پیشگیری مؤثر باشد و همچنین در انتخاب ژنومی و برنامه‌های اصلاح نژادی در گاوهای شیری ایران نیز مفید خواهد بود.

## REFERENCES

1. Abdalla, E. A., Peñagaricano, F., Byrem, T. M., Weigel, K. A., & Rosa, G. J. M. (2016). Genome- wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. *Animal genetics*, 47(4), 395-407.
2. Abdullahi Arpanahi, R., Pakdel, A., Zandi Bagche Mariam, M. B. (2013). From the infinitesimal inheritance model with partial effects (modelInfinitesimal) to genomic selection. *New genetics*, seventh period, serial number 29, number 2 (in pertion).
3. Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M. K., Rampersad, V., Hardy, L. A., Field, D., & Siminovitch, K. A. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity*, 18(1), 141-154.
4. Blasiak, J., Szczepańska, J., Sobczuk, A., Fila, M., & Pawłowska, E. (2021). RIF1 Links Replication Timing with Fork Reactivation and DNA Double-Strand Break Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11440.
5. Brym, P., Bojarój-Nosowicz, B., Oleński, K., Hering, D. M., 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.
6. 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.

7. Carlson, G. (2002). Diseases of the hematopoietic and hemolymphatic systems. *Large Animal Internal Medicine*, ed, 3, 1042-1043.
8. Chen, Q. Z., Yang, M. Y., Liu, X. Q., Zhang, J. N., Mi, S. Y., Wang, Y. J., & Yu, Y. (2022). Blood transcriptome analysis and identification of genes associated with supernumerary teats in Chinese Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 105(12), 9837-9852.
9. Falini, B., Martino, G., & Lazzi, S. (2022). A comparison of the International Consensus and 5th World Health Organization classifications of mature B-cell lymphomas. *Leukemia*, 1-17.
10. 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.
11. Girirajan, S., Hauck, P. M., Williams, S., Vlangos, C. N., Szomju, B. B., Solaymani-Kohal, S., & Elsea, S. H. (2008). Tom112 hypomorphic mice exhibit increased incidence of infections and tumors and abnormal immunologic response. *Mammalian Genome*, 19(4), 246-262.
12. Goddard, M. E., & Hayes, B. J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 10(6), 381-391.
13. Goldfinch, N. G. (2010). Characterisation of mucosal associated invariant T-cells and MR1 in ruminants.
14. González-Rodríguez, A., Munilla, S., Mouresan, E. F., Cañas-Álvarez, J. J., Díaz, C., Piedrafita, J., & Varona, L. (2016). On the performance of tests for the detection of signatures of selection: a case study with the Spanish autochthonous beef cattle populations. *Genetics Selection Evolution*, 48(1), 1-12.
15. Hemmatzadeh, F., & Momtaz, H. (2007). Detection of bovine Leukemia virus antigens expressed in lymph node tumors that induce humoral immunity in cow. *Journal of Veterinary Research*, 62(3), 281-284.
16. Kim, E. S., Sonstegard, T. S., & Rothschild, M. F. (2015). Recent artificial selection in US Jersey cattle impacts autozygosity levels of specific genomic regions. *BMC genomics*, 16(1), 1-10.
17. Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., & Bagnicka, E. (2014). Expression patterns of  $\beta$ -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1-14.
18. Liu, D., Chen, Z., Zhao, W., Guo, L., Sun, H., Zhu, K., & Pan, Y. (2021). Genome-wide selection signatures detection in Shanghai Holstein cattle population identified genes related to adaption, health and reproduction traits. *BMC genomics*, 22(1), 1-19.
19. Lou, Y., & Huang, Z. (2020). microRNA-15a-5p participates in sepsis by regulating the inflammatory response of macrophages and targeting TNIP2. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(4), 3060-3068.
20. Malchiodi, F., Brito, L. F., Schenkel, F. S., Christen, A. M., Kelton, D. F., & Miglior, F. (2018). Genome-wide association study and functional analysis of infectious and horn type hoof lesions in Canadian Holstein cattle. In *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.
21. Mekata, H., & Yamamoto, M. (2022). Single-Nucleotide Polymorphism on Spermatogenesis Associated 16 Gene-Coding Region Affecting Bovine Leukemia Virus Proviral Load. *Veterinary Sciences*, 9(6), 275.
22. Meuwissen, T. H., Hayes, B. J., & Goddard, M. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *genetics*, 157(4), 1819-1829.
23. Mohammadi, V., Atyabi, N., & Nikbakht, B. G. (2011). Seroprevalence of bovine leukemia virus in some dairy farms in Iran. *Global Veterinaria*, 7(3), 305-309.
24. Nafikov, R. A., Schoonmaker, J. P., Korn, K. T., Noack, K., Garrick, D. J., Koehler, K. J., & Beitz, D. C. (2013). Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1) polymorphism and milk fatty acid composition. *Journal of dairy science*, 96(4), 2605-2616.

25. Pierce, K. D., Handford, C. A., Morris, R., Vafa, B., Dennis, J. A., Healy, P. J., & Schofield, P. R. (2001). A nonsense mutation in the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor associated with bovine myoclonus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17(2), 354-363.
26. 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.
27. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2000). Mastitis In: *Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Edn. 9th publ. Book power with Saunders, London, 611-613.
28. 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.
29. Reginald, J. (1999). Bovine Leukemia Virus. *Current Veterinary therapy (Food Animal Practice)*. 4th ed. Saunders Company, pp: 296-299.
30. Reigstad, L. J., Varhaug, J. E., & Lillehaug, J. R. (2005). Structural and functional specificities of PDGF- C and PDGF- D, the novel members of the platelet- derived growth factors family. *The FEBS journal*, 272(22), 5723-5741.
31. Sahana, G., Guldbrandsen, B., Thomsen, B., Holm, L. E., Panitz, F., Brøndum, R. F., & Lund, M. S. (2014). Genome-wide association study using high-density single nucleotide polymorphism arrays and whole-genome sequences for clinical mastitis traits in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 97(11), 7258-7275.
32. Saifi Abad Shapouri, M. (2005). *Viral diseases of cattle*. Author: Robert Karz, first edition, Shahid Chamran University of Ahvaz Printing and Publishing Department, 157-171.(in pertion)
33. Salzer, U., Bacchelli, C., Buckridge, S., Pan-Hammarström, Q., Jennings, S., Lougaris, V., & Grimbacher, B. (2009). Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(9), 1967-1976.
34. Sender, G., Korwin-Kossakowska, A., Pawlik, A., Hameed, K. G. A., & Oprzadek, J. (2013). Genetic Basis of Mastitis Resistance in Dairy Cattle-A Review/Podstawy Genetyczne Odpornosci Krow Mlecznych Na Zapalenie Wymienia-Artykul Przegladowy. *Annals of Animal Science*, 13(4), 663.
35. 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.
36. Soupene, E., & Kuypers, F. A. (2019). ACBD6 protein controls acyl chain availability and specificity of the N-myristoylation modification of proteins [S]. *Journal of lipid research*, 60(3), 624-635.
37. Taghizadeh, S., Gholizadeh, M., Moradi, M. H., Costilla, R., Moore, S., & Di Gerlando, R. (2022). Genome-wide identification of copy number variation and association with fat deposition in thin and fat-tailed sheep breeds. *Scientific Reports*, 12(1), 1-12.
38. Takeshima, S. N., Sasaki, S., Meripet, P., Sugimoto, Y., & Aida, Y. (2017). Single nucleotide polymorphisms in the bovine MHC region of Japanese Black cattle are associated with bovine leukemia virus proviral load. *Retrovirology*, 14(1), 1-7.
39. Taye, M., Kim, J., Yoon, S. H., Lee, W., Hanotte, O., Dessie, T., & Kim, H. (2017). Whole genome scan reveals the genetic signature of African Ankole cattle breed and potential for higher quality beef. *BMC genetics*, 18(1), 1-14.
40. 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.
41. Zhao, J., Liu, Z., Liu, T., Nilsson, S., & Nistér, M. (2008). Identification and expression analysis of an N-terminally truncated isoform of human PDGF-C. *Experimental cell research*, 314(14), 2529-2543.

# Genom-wide association study to identify the loci related to resistance in Leukosis Disease in Iranian Holstein cattle

**Introduction and Objective:** Bovine Leukemia Virus (BLV) infection is more common in dairy cattle herds. The main cause of leukosis is the disease that leads to the creation of cancerous lymphocytes in different organisms of the body and affects different species, including cattle. This disease reduces milk production and causes reproductive diseases, and finally the removal of infected animals. Due to trade restrictions and deaths caused by lymphosarcoma, it causes direct economic losses, which is also related to the decrease in milk production and the increase in the elimination rate. No treatment or vaccine is known for this disease so far. So studying the genomic regions related to susceptibility to BLV infection can be effective in controlling and treating this disease and genetic improvement of animals. This research aimed to perform a whole genom-wide association study (GWAS) study of cattle to identify genomic regions and candidate genes associated with BLV infection.

**Material and Methods:** This study was conducted using Holstein cows that were naturally infected with BLV. For this purpose, blood samples of 150 Holstein cows in an industrial dairy cattle farm in Isfahan 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 sequences for rare allele frequency components ( $P_{MAF} < 0.05$ ), missing genotype ( $P_{MIND} > 0.05$ ), genotyping rate ( $P_{GENO} > 0.05$ ), and Hardy-Weinberg equilibrium ( $P_{H-W} < 1 \times 10^{-6}$ ) and significance test was 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 control analyzing, 145 cows (77 cases and 68 controls) and 22868 markers were left for further analysis. Finally 8 markers higher than the significant threshold were identified, and most significant markers were located on chromosomes 17 and 21. Using ensemble sites and genecards, genes associated with significant selected markers were identified.

**Conclusion:** The most important of them were *GRK4*, *TP53BP1*, *SCAPER*, *GLRB*, *PDGFC*, *TNIP2*, *PSTPIP1*, *CEP350*, *MR1*, *TOM1L2*, *SREBF1*, *COPS* and *TNFRS13B*. Gene Ontology (GO) analysis showed that these genes are more involved in protein-coding and play a role in regulating enzyme activities, intercellular exchanges, DNA stability, calcium activity, nervous system, and lipid activity. Also, according to other research, these genes played a role in cases such as infectious poison lesions, subclinical ketosis disease, BCS of cattle, fatty acid metabolism and fat deposition, various infections such as mastitis, and in meat traits and muscle stiffness in beef cattle. It should be noted that some of these genes were related to the pathways of innate immunity, humoral immunity, and cancer tumors. There fore, it can be said that whole genome wide association study analysis as well as gene ontology analysis to identify genomic regions related to viral infections such as leukemia can be effective in designing treatment methods and prevention methods and also in choosing Genomics and breeding programs in Iranian dairy cows will also be useful.