تولیدات دامی
دوره ۲۳ ■ شماره ٤ ■ زمستان ۱٤۰۰
صفحه‌های ٤۹۰-٤۸۱
DOI: 10.22059/jap.2021.327445.623630

مقاله پژوهشی

مطالعه پویش کامل ژنوم با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با خلق‌وخوی در گاو براهمن

حسین محمّدی[۱*]، امیر حسین خلت آبادی فراهانی[۲]، محمدحسین مرادی[۲]، ابوذر نجفی[۳]
۱. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵

چکیده
درک کنترل ژنتیکی خلق‌وخوی به‌عنوان یک صفت پیچیده و دارای همبستگی با صفات اقتصادی یکی از اهداف اصلاح نژادی در صنعت گاو گوشتی است. هدف پژوهش حاضر، مطالعه پویش کل ژنوم بر مبنای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات مرتبط با خلق‌وخوی گاو نژاد براهمن بود. بدین منظور از اطلاعات ژنوتیپی ۱۳۷۰ رأس گاو براهمن و رکوردهای فنوتیپی شامل سرعت خروج، امتیاز پن و امتیاز خلق‌وخوی استفاده شد. ارزیابی پویش کامل ژنوم با PLINK نسخه ۱/۹۰ انجام شد. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی به‌وسیله بسته نرم‌افزاری *goseq* برنامه R با هدف شناسایی مسیرهای زیستی ژن‌های نزدیک در مناطق انتخابی کاندیدا انجام شد. در نهایت تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی از پایگاه‌های برخط GO، Metacyc، KEGG، Reactome و Panther استفاده شد. با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، مسیرهای بیوشیمیایی و (ژن‌های کاندیدای) neurotransmitter secretion (*NRXN3* و *CACNG3*)، Dopamine Neurotransmitter Release Cycle، regulation of neuron projection development (*GRID2*)، neuron projection (*SLC8A1* و *KCNQ2*)، Axonal growth inhibition (*PPFIA2*)، Neurotrophin signaling pathway (*RTN4R*)، (*MAP2K2*، *MAP3K5* و *PSEN1*) و Focal adhesion (*TLN2*) مرتبط با سرعت خروج شناسایی شدند. ژن‌های کاندیدای شناسایی‌شده نقش مهمی در تفرق و تمایز سیناپس‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی، بیماری‌های عصبی و اختلال روانی، استرس‌های اکسیداتیو و محیطی، گیرنده‌های هورمونی و هموستازی گلوکز داشتند. با توجه به تأیید مناطق قبلی پویش ژنومی و شناسایی مناطق ژنومی جدید، استفاده از یافته‌های این پژوهش می‌تواند در انتخاب ژنتیکی حیوانات با تولید بالاتر از طریق دام‌های آرام مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: آرایه ژنومی، بوس ایندکیوس، رفتار، ژن کاندیدا، هستی‌شناسی ژن.

Genome-wide association study by gene set enrichment analysis to identify genes and pathways associated with temperament in Brahman cattle

Hossein Mohammadi[1*], Amir Hossein Khaltabadi Farahani[2], Mohammad Hossein Moradi[2], Abozar Najafi[3]
1. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
Received: August 25, 2021 Accepted: October 27, 2021

Abstract
Understanding the genetic control of temperament as a complex trait and correlated with economic traits is one of the breeding goals in beef cattle industry. The aim of the current study was genome wide association studies (GWAS) based on Gene set enrichment analysis for detecting the loci associated with temperament traits in Brahman cattle breed. Therefore, 1370 Brahman cattle and phenotype records associated with temperament traits including Exit velocity, Pen Score, and Temperament Score were used. The evaluation of genome-wide association was carried out using PLINK package 1.90. The gene enrichment analysis was performed by the *goseq* R package for identifying biological pathways of nearby genes in selected candidate regions and finally, GO, Metacyc, KEEG, Reactome and panther databases were applied for bioinformatics analysis. By Gene set enrichment analysis, the biological pathways and candidate genes of neurotransmitter secretion (*NRXN3* and *CACNG3*), Dopamine Neurotransmitter Release Cycle (*PPFIA2*), regulation of neuron projection development (*GRID2*), neuron projection (*SLC8A1* and *KCNQ2*), Axonal growth inhibition (*RTN4R*), Neurotrophin signaling pathway (*MAP2K2, MAP3K5* and *PSEN1)* and Focal adhesion (*TLN2*) were identified. The detected candidate genes played an important role in differentiation of synapse, neurotransmitters, neurological diseases and disorders, oxidative and environmental stresses, hormone receptors and glucose homeostasis. Considering the confirmation of the previous region of genome wide association and the identification of new genomic regions, the findings of this study can be useful in the genetic selection of higher production cattle through calm animals.

Keywords: Behaviour, Bos indicus, Candidate gene, Gene ontology, SNPchip.

* نویسنده مسئول
Email: H-mohammadi64@araku.ac.ir

مقدمه

برنامه‌های اصلاحی تجاری با هدف افزایش سرعت رشد، به‌طور مداوم در حال انتخاب روی دام‌هایی است که باعث کوتاه‌تر شدن دوره پرورش آن‌ها شده است [۱۷]. از طرف دیگر، در حال حاضر مطالعات درباره خلق‌وخوی حوزه پژوهشی فعالی در گاوها به‌ویژه نژادهای گوشتی تبدیل شده است، چرا که تفاوت‌های اولیه دام‌ها به‌طور فزاینده‌ای با صفات مهم اقتصادی مانند افزایش وزن، تولید شیر، کارایی تولید مثلی، حساسیت به بیماری، کیفیت گوشت و هم‌چنین حمل و نقل در ارتباط هست [۸]. به‌طور مثال در حیوانات آرام افزایش وزن به میزان ۱۰ تا ۱٤ درصد بالاتر از حیوان‌های عصبی گزارش شده است [۹]. خلق‌وخوی از منظر مفهومی عبارتست از تفاوت‌های ذاتی هر رأس دام در بروز واکنش، سطح فعالیت، سازگاری و کیفیت خلق در مواجهه با انسان و محیط جدید می‌باشد. منظور از واکنش، ویژگی‌های خاص هر فرد که در پاسخ به تغییرات اعمال‌شده بر محیط زندگی او بروز کرده و در حالات جسمانی، عملکرد غده‌های درون‌ریز و سیستم عصبی وی انعکاس می‌یابد [۸]. از نظر کاربردی در این پژوهش منظور از مؤلفه خلق‌وخو نمره‌ای است که با استفاده از آزمون‌هایی مانند سرعت خروج، امتیاز پن براساس دستورالعمل شیوه امتیازدهی به‌دست می‌آید [۱].

هدف از مطالعات پویش ژنومی که به‌منظور شناسایی وابستگی بین یک نشانگر SNP و یک صفت با استفاده از نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم انجام می‌گیرد، پیداکردن جهش‌های مؤثر بر صفات تولیدی، تولیدمثلی و یا بیماری اثر می‌باشد. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به‌کمک نشانگر مفید بوده و به درک مکانیسم مولکولی صفات موردمطالعه کمک نماید [۱۹]. داده‌های مورد استفاده در این پژوهش اولین بار توسط Paredes-Sanchez و همکاران جهت شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات خلق‌وخوی شامل سرعت خروج و امتیاز پن، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند که در آن با استفاده مدل تک‌نشانگری مورد- شاهدی تجزیه شده و از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده شده بود. در مجموع ۱٤ نشانگر تک نوکلئوتیدی معنی‌دار مرتبط با سرعت خروج روی کروموزوم‌های چهار، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹، ۲۱ و ۲۹ شناسایی شد که در این مناطق ژنومی، ژن‌های کاندیدای *EXOC4*، *NRXN3*، *CACNG4*، *SLC9A4*، *LOC10713318*، *TSKU*، *FANCL* و *SLCO3A1* قرار دارند [۱۸].

مطابق یافته‌های مطالعه مدنظر و مقاله‌های مختلف در مطالعات پویش ژنومی مبتنی بر مدل‌های خطی و غیرخطی، مشکل بالابودن نرخ خطای نوع اول و بیش برآورد اثر نشانگرهای SNPها می‌باشد. به‌عبارت دیگر یکی از ایرادات پژوهش‌های مطالعات پویش ژنومی در نظرگرفتن آستانه معنی‌داری برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. درحالی‌که پرهیز از خطای نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم یعنی در نظرنگرفتن SNPهای دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه در نظر گرفته شده می‌شود [۲].

یکی از راه‌کارهای مناسب برای حل این مشکل، انجام مطالعات پویش کامل ژنوم بر مبنای مسیر است. در واقع در این روش به‌جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت موردمطالعه و واریانت‌های ژنتیکی را در یک دسته یا گروه ژنی که به‌طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می‌کند. به‌عبارتی دیگر، تجزیه و تحلیل پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی با فنوتیپ مورد آزمون قرار می‌گیرد. در این روش ژن‌هایی مورد بررسی قرار می‌گیرند که به تنهایی اثر آن‌ها بر صفت

مورد نظر معنی‌دار نشده و دارای اثرات متوسط دارند، اما اثر تجمعی آن‌ها روی صفت دارای اثر معنی‌دار است. برای این‌که بتوان تفسیر درستی از کنار هم قراردادن این ژن‌ها به‌دست آورد، از مسیرهای زیستی به‌عنوان بستری معنی‌دار که عملکرد مجموع ژن‌ها در آن‌ها یک یا چند هدف واحد را پیگیری می‌کند، استفاده می‌شود [۲].

در مطالعه پویش کامل ژنوم برپایه فراتحلیل با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم با استفاده از ۲۵/٤ میلیون نشانگر SNP، منجر به شناسایی ۱٦۳ مناطق ژنومی معنی‌دار مرتبط با ساختار بدنی گزارش شد [٤]، اما در ارتباط با صفات مرتبط با خلق‌وخوی مطالعات پویش ژنومی اندکی انجام گرفته است. در یک مطالعه پویش کامل ژنوم در گاوهای نلور، مناطق ژنومی روی کروموزوم های دو، ۹، ۱۱، ۱۵، ۱۷ و ۲٦ و ژن‌های کاندیدای *NCKAP5*، *PARK2*، *ANTXR1*، *GUCY1A2*، *CPE* و *DOCK1* مؤثر بر صفت خلق‌وخوی براساس آزمون سرعت فرار گزارش شد [۲٤]. هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی حاوی مسیرهای زیستی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات خلق‌وخوی در گاوهای نژاد براهمن براساس تجزیه بر مبنای مسیر و با استفاده از روش غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر ابتدا مطالعات پویش کل ژنوم مرتبط با صفات خلق‌وخوی ذخیره‌شده در پایگاه‌های آنلاین ذخیره ژنومی (Dryad، FigShare، Zenodo، Animal Genome) استخراج و برحسب اطلاعات مفید گروه‌بندی شدند. در نهایت از اطلاعات فنوتیپی ۱۳۷۰ رأس گوساله‌های نژاد براهمن نگهداری‌شده در مرکز پژوهش و توسعه تگزاس A&M آمریکا که در بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۷ متولد شده بودند، استفاده شد [۱۸]. جهت تعیین تعداد ژنوتیپ نمونه‌ها براساس رویکرد دوطرفه انتهای توزیع فنوتیپی انجام شده بود، به‌طوری‌که از میان ۱۳۷۰ رکورد فنوتیپی، تعداد ۹۸ رأس دام آرام و ۹۱ رأس دام عصبی انتخاب و تعیین ژنوتیپ شده بودند.

برای کنترل داده‌های تعیین ژنوتیپ‌شده، ابتدا حیوانات با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ از دست‌رفته حذف شدند. در مرحله بعد SNPهایی که حداقل فراونی آللی در آن‌ها کم‌تر از یک درصد و SNPهایی که در کم‌تر از ۹۰ درصد افراد تعیین ژنوتیپ شده بودند، حذف شدند. SNPهای باقیمانده آن‌هایی که در تعادل هاردی- واینبرگ (سطح احتمال 10^{-6}) قرار نداشتند به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند. هم‌چنین SNPهای با موقعیت نامشخص روی کروموزوم‌ها و کروموزوم جنسی، حذف شدند.

صفات شاخص موردبررسی جهت تعیین مؤلفه خلق‌وخوی شامل) سرعت خروج (Exit velocity; PS)، امتیاز پن (Pen Score; PS) و امتیاز خلق‌وخوی (Temperament Score; TS) می‌باشند. سرعت خروج برابر مدت زمان حرکت دام برحسب ثانیه در یک مسیری به مسافت ۱/۸۳ متری است و با استفاده از سنسورهای مادون قرمز ثبت می‌شود. گزارش شده است که غلظت سرمی کورتیزول (هورمون استرس) همبستگی مثبتی با آزمون سرعت خروج دارد [۵]. امتیاز پن با ارزیابی‌های چشمی رفتار حیوانات در داخل‌های پن‌های با ابعاد (۷/۳×۷/۳ متر) با پنج حیوان بررسی می‌شود. در این روش امتیاز یک برای دام آرام و مطیع و امتیاز پنج برای دام عصبی و پرخاشگر منظور می‌شود. امتیاز خلق‌وخوی که براساس ارزش‌های محاسبه‌شده برای PS و EV به‌کمک رابطه (۱) محاسبه می‌شود [۱۸].

$$TS = \frac{(PS+EV)}{2} \qquad (۱)$$

برای انجام تجزیه و تحلیل پویش کامل ژنوم با استفاده از روش موردی- شاهد نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) براساس آزمون سرعت خروج انجام شد.

تجزیه و تحلیل پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در طی سه مرحله انجام شد.

تعیین مکان SNPها با ژن‌ها

SNPهایی که مقدار *P*-value آن‌ها کم‌تر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم‌افزاری *biomaRt2* در محیط R (نسخه ۳/۶/۱) با دستور getBM و با استفاده از ژنوم مرجع گاو (*ARS-UCD 1.2*) به ژن‌هایی که نشانگر SNP موردنظر در داخل آن ژن و یا kb ۳۰ بالادست یا پایین‌دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند.

ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی

جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از نرم‌افزار GO2MSIG (http://www.go2msig.org/cgibin/prebuilt.cgi?taxid= 9913) استفاده شد. برنامه GO2MSIG از پنج پایگاه‌های اطلاعاتی شامل هستی‌شناسی ژن (GO, /http://www.geneontology.org)، مسیرهای بیوشیمیایی (KEGG, /http://www.genome.jp/kegg)، Panther (http://www.pantherdb.org)، Metacyc (http://www.metacyc.org) و Reactome (http://www.reactome.org)جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی استفاده می‌نمایید. در این مرحله فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند مانند شرکت در سه فرایند هستی‌شناسی شامل فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی در نظر گرفته شوند.

پویش کامل ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مسیر

ارتباط‌های معنی‌دار مسیرهای عملکردی با صفات مرتبط با خلق‌وخوی شامل مسیرهای عصبی، ترشح هورمونی و یا افزایش فشار با استفاده از توزیع فوق هندسی و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. P-value مسیرهای عملکردی با سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ که تعداد k ژن معنی‌دار در آن قرار دارد با کمک رابطه (۲) محاسبه شد:

$$P-value = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{S}{i}\binom{N-S}{m-i}}{\binom{N}{m}} \qquad (۲)$$

در این رابطه، k، برابر با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی؛ S، برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت موردبررسی؛ N، برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه تجزیه و تحلیل شدند و m، برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم‌افزاری *goseq* در محیط نرم‌افزار R (نسخه ۳/۶/۱) انجام شد. بسته *goseq* از آزمون فوق هندسی استفاده می‌کند و برای اختلاف طول ژن‌ها نیز تصحیح انجام می‌شود. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست‌آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

نتایج و بحث

بعد از کنترل کیفیت اولیه (در مرحله تعیین ژنوتیپ)، ۱۷ فرد به‌خاطر ژنوتیپ از دست‌رفته بیش‌تر از ۱۰ درصد حذف شدند و در نتیجه ۱۷۲ حیوان برای آنالیزهای بعدی باقی ماندند. از مجموع ۱۳۹۳۷۶نشانگر به‌کاررفته در این پژوهش، ۱۰۴۲۳۵ نشانگر توانستند مراحل مختلف کنترل کیفیت را بگذرانند. به‌طور کلی ۱۴۴۴۱ نشانگر به‌دلیل حداقل فراوانی آللی کم‌تر از یک درصد، ۵۲۹۹ نشانگر به‌دلیل نرخ تعیین ژنوتیپ کم‌تر از ۹۰ درصد در هر نمونه و ۳۴۷ نشانگر

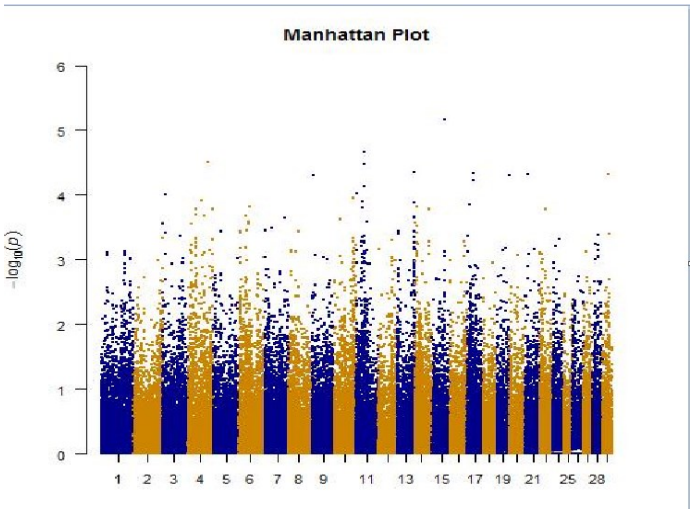
به‌دلیل عدم تعادل هاردی واینبرگ حذف شدند. مراحل مختلف کنترل کیفیت در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱. مراحل مختلف کنترل کیفی داده‌های ژنوتیپی

تعداد حیوانات	**۱۸۹**
حذف نمونه‌هایی با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ از دست‌رفته	**۱۷**
تعداد کل نمونه‌های باقی‌مانده	**۱۷۲**
تعداد کل نشانگرهای موردبررسی	**۱۳۹۳۷۶**
حذف نشانگرها با حداقل فراوانی آللی کم‌تر از یک درصد	**۱٤٤٤۱**
حذف نشانگرهای با نرخ فراخوانی کم‌تر از ۹۰ درصد در هر نمونه	**۵۲۹۹**
حذف نشانگرها با انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ(10^{-6})	**۳٤۷**
نشانگرهای روی کروموزوم‌های جنسی	**٦۸۲**
نشانگرهای با موقعیت نامشخص	**۱٤۳۷۲**
تعداد نشانگرهای باقی‌مانده	**۱۰٤۲۳۵**

در این پژوهش مطالعه پویش کامل ژنوم با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی و مجموعه ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و سازوکارهای مولکولی مرتبط با صفت خلق‌وخوی در گاوهای نژاد براهمن انجام شد. پلات منهتن مرتبط با خلق‌وخوی براساس آزمون سرعت خروج در شکل (۱) ارائه شده است.

تعداد ۱۹۷۲۰ ژن از ۲۷٦۰۷ ژن‌های کدکننده حاشیه‌نویسی‌شده در ژنوم گاو (ARS-UCD 1.2) به‌وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان مجموع ۱۳۰٤ ژن دارای اثر معنی‌دار روی صفات خلق‌وخوی بودند، یعنی حداقل یک نشانگر با P-value کم‌تر از ۰/۰۵ در داخل و یا در بالا یا پایین‌دست این ژن تا فاصله ۳۰kb قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات خلق‌وخوی برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۱۸۷ طبقات هستی‌شناسی، ٥٤ مسیر بیوشیمیایی PANTHER و مسیر Reactome بود. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود تعداد ۱۵ طبقه عملکردی در هستی‌شناسی فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و مسیرهای بیوشیمیایی با صفات خلق‌وخوی دارای ارتباط بودند (P<۰/۰۵). مسیرهای که بیش‌تر از سه ژن و کم‌تر از ۳۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند.



شکل ۱. پلات منهتن مرتبط با خلق‌وخوی براساس آزمون سرعت خروج در گاو براهمن.

محور X مکان نشانگرهای SNP روی کروموزوم‌ها و محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ ارزش P-value.

از مسیرهای زیستی مهم و معنی‌دار مرتبط با خلق‌وخوی می‌توان به مسیرهای neurotransmitter secretion و response to extracellular stimulus اشاره نمود که از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیرها، ژن کاندیدای *NRXN3* جزو خانواده ژنی نوروکسین‌ها می‌باشد و غالباً نقش کلیدی در پایانه پیش سیناپسی، تمایز و تفرق سیناپس‌ها و انعطاف‌پذیری سیناپسی دارند (genecards). انتقال‌دهنده‌های عصبی یا نوروترانسمیترها مواد شیمیایی هستند که از یک نورون ترشح می‌شوند و بر فعالیت نورون دیگر از طریق سیناپس‌ها تأثیر می‌گذارند. این مواد انتقال‌دهنده که به آن‌ها پیک عصبی نیز می‌گویند، از تکمه‌های پایانی نورون‌ها در شکاف سیناپسی آزاد می‌شوند [۲۲]. ژن کاندیدای *NRXN3* از جمله ژن‌های کاندیدای بسیار مهم در ارتباط با خلق‌وخوی می‌باشد. در مطالعه قبلی پویش کامل ژنوم در گاوهای براهمن روی کروموزوم ۱۰ ژن کاندیدای *NRXN3* گزارش شده بود، که با منطقه شناسایی‌شده در پژوهش حاضر همخوانی داشت. هم‌چنین ژن *CACNG3* شناسایی شده در مطالعه حاضر از خانواده ژنی *CACNG* بود که در مطالعه قبلی نیز گزارش شده بودند [۱۸].بین چند شکلی ژن کاندیدای *NRXN3* در انسان با بیماری‌های تحلیل عصبی مانند آلزایمر و پارکینسون و اختلال روانی مانند اوتیسم و اسکیزوفرنی ارتباط معنی‌داری وجود دارد [۱۱].

جدول ۲. مهم‌ترین مسیرهای غنی‌شده مرتبط با ژن‌های هدف خلق‌وخوی در گاو نژاد براهمن

نام مسیر	کل ژن‌های موجود در Term	ژن‌های معنی‌دار	ژن‌های کاندیدای مرتبط	P-adjust	فاصله ژن (های) کاندیدا از نشانگر (bp)
فرایند زیستی					
neuron apoptotic process (GO:0051402)	۱۱	٤	*FAS, NTF3, APOE, SNCB*	۰/۰۲۰۱	–
positive regulation of apoptotic signaling pathway (GO:2001235)	۱۰	۳	*FAS, TRPS1, SNRPF*	۰/۰۰٤۱	۲۲/۳٤٦
synaptic vesicle exocytosis (GO:0016079)	۳٦	٦	*STX2, SYT1, SYT2, SNAP23, SNAP25, RIMS1*	۰/۰۰۵۱	–
neurotransmitter secretion (GO:0007269)	٤۸	۹	*STX2, SYT2, SYT1, MCTP1, SNAP23, SNAP25, RIMS1, NRXN3, CACNG3*	۰/۰۰۱۳	داخل ۸/٤٤۲
response to extracellular stimulus (GO:0009991)	٦۵	۱۰	*KANK2, SIK1B, CLPS, SIK1, PRKAA2, RRAGC, RPTOR, CLPSL2, PRKAG2, ATG7*	۰/۰۲۷۱	۱۲/۵۳۷
regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	۸٦	۱۰	*KANK2, IL16, SEMA3A, PGF, ZSWIM5, CGAS, PPARD, NCAPG, PPARG, SEMA3C*	۰/۰۰٤٤	۲۰۲
regulation of neuron projection development (GO:0010975)	۱۹	۵	*GATA3, CCDC88A, GRID2, SNAP25, ULK4*	۰/۰۲٦۱	۱۰/۷۳٤
اجزای سلولی					
Focal adhesion (GO:0005925)	٤۳	۷	*ITGB3, PXN, ADD1, NECTIN2, DLC1, TLN2, ARHGAP22*	۰/۰۰۳۲	۱٦/۰۸٦
calcium channel complex (GO:0034704)	۲٦	۵	*RYR2, CATSPERB, CACNA2D3, CACHD1, CACNA2D1*	۰/۰۰۰۱	۳/۱۳۱
neuron projection (GO:0043005)	۳۲	۸	*SV2B, EPHA3, KCNQ2, SYT2, SLC8A1, EPHA2, GABRB2, SLC6A11*	۰/۰۲۱۷	داخل ۸/٦۷۳
مسیرهای Reactome و KEGG					
Adrenaline signalling through Alpha-2 adrenergic receptor	۳	۲	*ADA2C, ADRA2B*	۰/۰۰٦۲	–
Axonal growth inhibition (RHOA (activation	۹	۳	*MAG, RTN4, RTN4R*	۰/۰۰۳۱	۲۷/۳۵٤
Dopamine Neurotransmitter Release Cycle	۱٦	۵	*SYT1, PPFIA4, PPFIA2, SNAP25, RIMS1*	۰/۰۰۷۱	۲۹/۱۳۰
Synaptic vesicle trafficking	۳۲	٦	*STX2, SYT2, SYT1, VAMP1, SNAP25, RIMS1*	۰/۰۰۹۳	–
Neurotrophin signaling pathway	۳٦	۱۲	*BRAF, FASLG, GAB1, SHC4, CALM2, MAPK14, MAPK9, MAP2K2, MAP3K5, PLCG2, PSEN1, PTPN11*	۰/۰۰۳	۱۱/٦٤۲ ۱۰/۲۰۱ ۹/۰۰٦

***: ژن‌های کاندیدای به شکل ایتالیک و برجسته نشان داده شده است.**

ژن کاندیدای *RPTOR* به‌عنوان ژن کاندیدای مرتبط با تحمل به استرس حرارتی در مطالعه پویش کامل ژنومی گاوهای کلمبیایی گزارش شده است [۱۵]. هم‌چنین ژن *RPTOR* به‌عنوان ژن مؤثر بر استرس محیطی در مرغ نیز گزارش شده است [۷]. در انسان نیز تنوع چندشکلی در ژن کاندیدای *RPTOR* با استرس ارتباط دارد [۲۳]. از دیگر مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با خلق‌وخوی را می‌توان به مسیر بیولوژیکی Dopamine Neurotransmitter Release Cycle اشاره نمود که ژن کاندیدای *PPFIA2* در این مسیر قرار داشت. دوپامین یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای کاتاکول آمینی مغز است که علاوه بر قسمت‌های مختلف مغز، جسم سلولی نورون‌های دوپامینرژیکی در هسته‌های دور بطنی هیپوتالاموس قرار گرفته است. دوپامین مسئول رفتارهای انگیزشی- پاداشی می‌باشد. علاوه بر این، دوپامین در عملکردهای مغزی نظیر رفتار، شناخت، خلق‌وخوی و یادگیری نقش‌های بسیار مهمی را ایفا می‌نماید (genecards). ژن کاندیدای *PPFIA2* در مطالعات قبلی ارتباط معنی‌داری با توسعه و محافظت آکسون و سیستم عصبی مرکزی در انسان گزارش شد [۱۶].

از مسیرهای معنی‌دار مرتبط با خلق‌وخوی می‌توان به مسیر positive regulation of apoptotic signaling pathway اشاره نمود که از بین ژن‌های موجود در این مسیر، ژن کاندیدای *SNRPF* نقش کلیدی در متابولیسم و هموستازی اسیدهای چربی در بدن دارد (genecards). در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با خلق‌وخوی در گاوهای گوجرات هندی، ژن *SNRPF* به‌عنوان ژن کاندیدای مرتبط با آزمون سرعت فرار شناسایی شد [۸].

شاید بتوان مسیر regulation of neuron projection development را که جزو هستی‌شناسی فرایند زیستی است، یکی از مهم‌ترین مسیرهای مؤثر بر فرایند عصبی در ارتباط با صفات خلق‌وخوی دانست. از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، می‌توان به ژن کاندیدای *GRID2* اشاره نمود. ژن *GRID2* جزو گیرنده‌های اصلی گلوتامات می‌باشد و دارای نقش محرک افزایشی بر فاکتور نکروز توموری آلفا دارد که به‌عنوان بیو مارکر بیماری عصبی اوتیسم می‌باشد [۱۲]. در مطالعه پویش کل ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های مؤثر بر خلق‌وخوی در گاوهای براهمن و ایولینگ، ژن کاندیدای *GRID2* جزو ژن‌های کاندیدای مؤثر گزارش شد [۲۱]. از دیگر مسیرهای زیستی مهم و معنی‌دار مرتبط با خلق‌وخوی می‌توان به مسیر neuron projection اشاره نمود که جزو مسیرهای فرایندهای زیستی مرتبط با سیستم عصبی می‌باشد که ژن‌های کاندیدای *SLC8A1* و *KCNQ2* دارای نقش بیولوژیکی مستقیمی با صفات مرتبط با خلق‌وخوی هست. ژن کاندیدای *SLC8A1* دارای نقش اساسی در انتقال گلوکز به داخل سلول‌ها و تنظیم هموستازی گلوکز دارد (genecards).

در مطالعه پویش کامل ژنوم گاوهای گوشتی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با استرس محیطی تحت شرایط گرمسیری، ژن کاندیدای *SLC8A1* گزارش شده است [۶]. در مطالعه قبلی پویش ژنومی گاوهای براهمن ژن کاندیدای *SLC9A4* از خانواده ژنی SLC مرتبط با صفات خلق‌وخوی گزارش شده بود. خانواده ژنی SLC نقش کلیدی در انتقال نوروترانسمیترها دارند (genecards). در مطالعه پویش کامل ژنوم صفات مرتبط با خلق‌وخوی در گاوهای شاروله ژن کاندیدای *SLC6A4* براساس آزمون امتیاز پن گزارش شده بود (Garza-Brenner et al., 2016). هم‌چنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن کاندیدای *KCNQ2* با بیماری‌های روانی و اختلال دو قطبی در انسان گزارش شد [۳].

مسیر بیوشیمیایی Axonal growth inhibition از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با خلق‌وخوی شناسایی شدند.

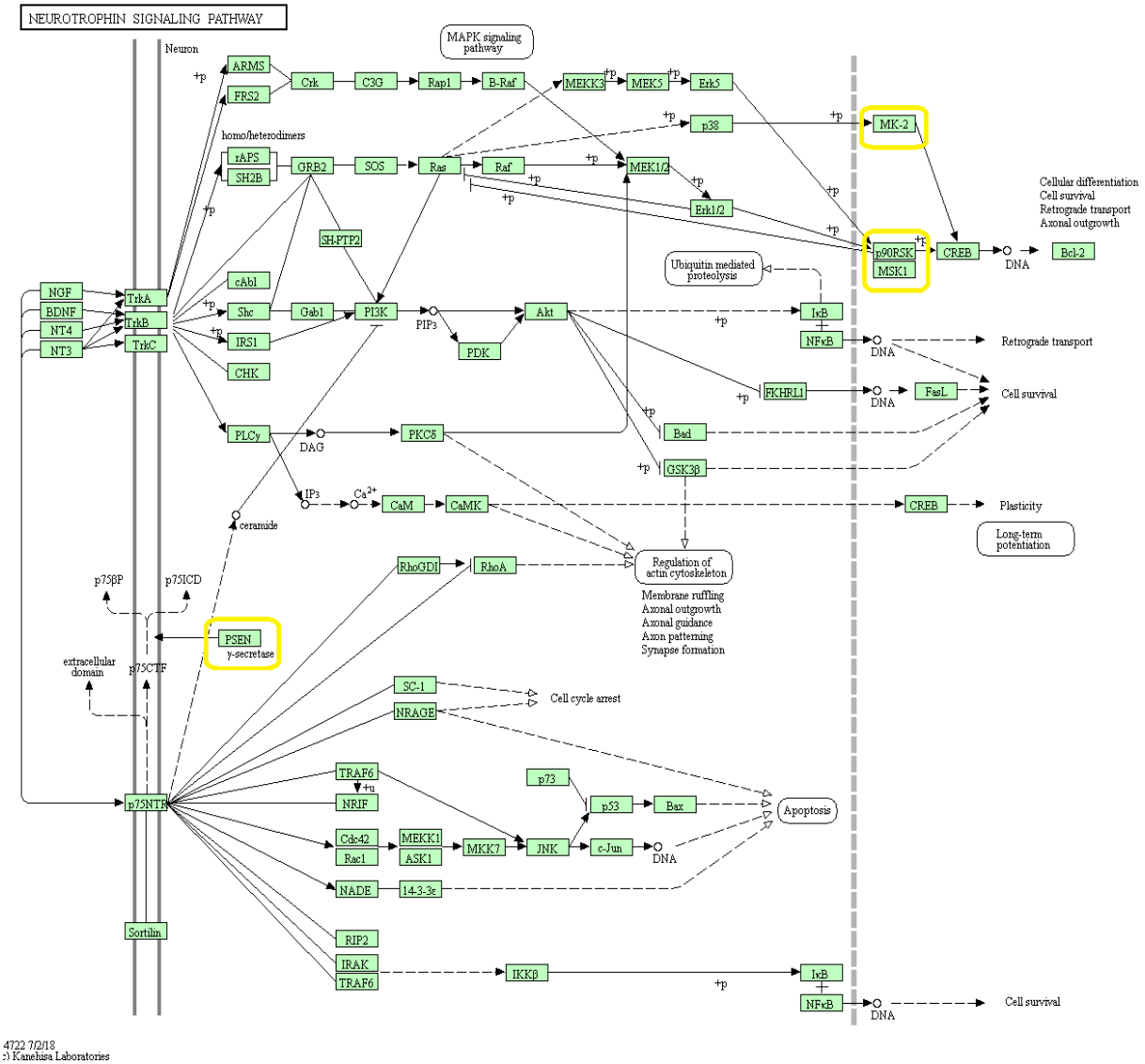
در مطالعه‌ای با بررسی چندشکلی ژن کاندیدای *RTN4R* در انسان و موش ارتباط معنی‌داری با بیماری عصبی اسکیزوفرنی دارد [۱۰]. مسیر Focal adhesion بخشی از مسیرهای اجزای سلولی، در اتصال و چسبندگی با برقراری مسیرهای سیگنال‌دهی بر رفتار و عملکرد سلول مانند خلق‌وخوی بسیار مؤثر است (genecards). در نتیجه ژن‌های هدف در مسیر موردبررسی از طریق اثر و فعال‌سازی این مسیر ژنی بر توسعه سلول‌های عصبی اثرگذار هستند. در مطالعه شناسایی نشانه‌های انتخاب در گوسفندان و بزهای بومی مصر آداپته‌شده به شرایط محیطی گرم و خشک، ژن کاندیدای *TLN2* به‌عنوان کاندیدای مرتبط با استرس حرارتی گزارش شد [۱۳].

مسیرهای زیستی مرتبط با ژن‌های خلق‌وخوی با استفاده از پایگاه‌های داده KEGG و Reactome موردبررسی قرار گرفت که با نتایج برخی از پژوهش‌های قبلی مرتبط با صفات خلق‌وخوی مطابقت داشت [۱٤ و ۲۰]. جزئیات کامل این مسیرهای زیستی به‌همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول (۲) ارائه شده است. تحلیل مسیرهای زیستی KEGG نشان‌دهنده این است که ژن‌های *MAP2K2*، *MAP3K5* و *PSEN1* به‌طور معنی‌داری با مسیر زیستی Neurotrophin signaling pathway در ارتباط می‌باشند. این مسیر زیستی نقش مهمی در مکانیسم سیستم عصبی به خصوص خلق‌وخوی دارد. در شکل (۲) مسیر سیگنالی نوروتروفینی و ژن‌های مربوطه شناسایی‌شده ارائه شده است.

نوروتروفین‌ها مهم‌ترین عوامل تروفیکی شناخته‌شده در سیستم عصبی هستند که نقش مهمی در تکثیر، تمایز، نگهداری، شکل‌پذیری، بقا و عملکرد سلول‌های عصبی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی دارند. نوروتروفین‌ها یک تنظیم‌کننده اصلی رشد آکسون‌ها و عامل اتصال، تمایز عصبی، بقاء و شکل‌پذیری سیناپسی هستند (genecards). مطالعه پویش کل ژنومی در گاوهای creole که در محیط گرمسیری سازگار شده‌اند، ژن کاندیدای *MAP2K2* به‌عنوان ژن معنی‌دار مرتبط با استرس محیطی گزارش شد [۲۰]. در تجزیه و تحلیل بیان کل ژنوم براساس تکنیک RNA-Seq، ژن *PSEN1* ارتباط معنی‌داری با استرس‌های اکسیداتیو (استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تخریب نورونی و آسیب بافتی ایفا می‌کند)، نقصان نورونی، عملکرد سیناپس‌ها، رشد نورون‌ها و انعطاف‌پذیری عصبی و بیماری آلزایمر گزارش شده است [۱٤].

با بررسی منابع انجام‌شده، پژوهش حاضر اولین مطالعه پویش کامل ژنوم برپایه تجزیه و تحلیل مسیر مرتبط با خلق‌وخوی در گاوهای بوس ایندکیوس بوده است، لذا در تجزیه و تحلیل‌ها تلاش شد از آزمون‌های پرکاربرد و سخت‌گیرانه (مانند برنامه GO2MSIG) برای شناسایی مسیرهای زیستی معنی‌دار استفاده شود. به‌طور کلی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش می‌تواند ما را به سمت ژن‌های مؤثر بر صفات هدایت کند. از طرفی در این پژوهش به‌دلیل عدم دسترسی به رکوردهای فنوتیپی و اطلاعات ژنوتیپی مرتبط با صفات خلق‌وخوی در گاوهای بومی کشور، از اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی نژادهای خالص براهمن استفاده شد. لذا استفاده از نتایج این پژوهش در دام‌های بومی کشور نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد تا در این جمعیت‌ها نیز تأیید شوند.

با توجه به عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش، به‌نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفات مرتبط با خلق‌وخوی نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارایی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای پویش ژنومی صفات مهم اقتصادی را نیز مورد تأیید قرار داد. هم‌چنین با بررسی چندشکلی موجود در ژن‌های کاندیدای شناسایی‌شده از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی مرتبط با خلق‌وخوی از طریق مطالعات آزمایشگاهی در نژادهای گاو بومی و نتایج به‌دست‌آمده را برای مطالعات اصلاحی به‌کار برد.



شکل ۲. مسیر سیگنالی‌دهی نوروتروفینی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با آزمون سرعت خروج که به‌صورت هایلایت مشخص شده‌اند (پایگاه داده KEGG)

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر پاردس- سانچز به‌خاطر در اختیارگذاشتن داده‌های ژنوتیپی و رکوردهای فنوتیپی برای انجام پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Alvarenga AB, Oliveira HR, Chen SY, Miller SP, Marchant-Forde JN, Grigoletto L and Brito LF (2021) A Systematic Review of Genomic Regions and Candidate Genes Underlying Behavioral Traits in Farmed Mammals and Their Link with Human Disorders. Animals (Basel), 11(3): 715.
2. Azizpour N, Khaltabadi Farahani AH, Moradi MH and Mohammadi H (2020) Genome-wide association study based on Gene-set enrichment analysis associated with milk yield in Holstein cattle. Animal Science Researches, 30(1): 79-92. (In Persian)

3. Borsotto M, Cavarec L, Bouillot M, Romey G, Macciardi F, Delaye A, Nasroune M, Bastucci M, Sambucy JL, Luan JJ, Charpagne A, Jouët V, Léger R, Lazdunski M, Cohen D and Chumakov I (2007) PP2A-Bgamma subunit and KCNQ2 K+ channels in bipolar disorder. The Pharmacogenomics Journal, (2): 123-32.
4. Bouwman AC, Daetwyler HD, Chamberlain AJ, Ponce CH, Sargolzaei M and Schenkel FS (2018) Meta-analysis of genome-wide association studies for cattle stature identifies common genes that regulate body size in mammals. Nature Genetics, 50: 362.
5. Burdick NC, Agado B, White JC, Matheney KJ, Neuendorff DA and Riley DG (2011) Technical note: Evolution of exit velocity in suckling Brahman calves. Journal of Animal Science, 89: 233-236.
6. Carvalheiro R, Costilla R, Neves HHR, Albuquerque LG, Moore S and Hayes BJ (2019) Unraveling genetic sensitivity of beef cattle to environmental variation under tropical conditions. Genetic Selection Evaluation, 51(1): 29.
7. Chen ZY, Zhang WW, Gan JK and Kong LN (2010) Genetic effect of an A/G polymorphism in the HSP70 gene on thermotolerance in chicken. Genet. Mol. Res. 15(2): gmr8271.
8. Dos Santos FC, Peixoto MG, Fonseca PA, Pires MF, Ventura RV, Rosse ID, Bruneli FA, Machado MA and Carvalho MR (2017) Identification of Candidate Genes for Reactivity in Guzerat (Bos indicus) Cattle: A Genome-Wide Association Study. PLoS One, 12(1): e0169163.
9. Friedrich J, Brand B and Schwerin M (2015) Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding–A review. Archives Animal Breeding, 58: 13-21.
10. Hsu R, Woodroffe A, Lai WS, Cook MN, Mukai J, Dunning JP, Swanson DJ, Roos JL, Abecasis GR, Karayiorgou M and Gogos JA (2007) Nogo Receptor 1 (RTN4R) as a candidate gene for schizophrenia: analysis using human and mouse genetic approaches. PLoS One, 2(11): e1234.
11. Harkin LF, Lindsay SJ, Xu Y, Alzu'bi A, Ferrara A, Gullon EA, James OG and Clowry GJ (2019). Neurexins 1-3 Each Have a Distinct Pattern of Expression in the Early Developing Human Cerebral Cortex. Cerebral Cortex Journal, 27(1): 216-232.
12. Kalkan Z, Durasi İM, Sezerman U and Atasever-Arslan B (2016) Potential of GRID2 receptor gene for preventing TNF-induced neurodegeneration in autism. Neuroscience Letters, 620: 62-9.
13. Kim ES, Elbeltagy AR, Aboul-Naga AM, Rischkowsky B, Sayre B, Mwacharo JM and Rothschild MF (2016) Multiple genomic signatures of selection in goats and sheep indigenous to a hot arid environment. Heredity (Edinb), 116(3): 255-64.
14. Kumar S, Chowdhury S, Razdan A, Kumari D, Purty RS, Ram H, Kumar P, Nayak P and Shukla SD (2021) Downregulation of Candidate Gene Expression and Neuroprotection by Piperine in Streptozotocin-Induced Hyperglycemia and Memory Impairment in Rats. Frontiers in Pharmacology, 11: 595471.
15. León CD, Manrique C, Martínez R and Rocha JF (2019) Genomic association study for adaptability traits in four Colombian cattle breeds. Genetics and Molecular Research, 18(3): gmr18373.
16. Mota LFM, Lopes FB, Fernandes Júnior GA, Rosa GJM, Magalhães AFB, Carvalheiro R and Albuquerque LG (2020) Genome-wide scan highlights the role of candidate genes on phenotypic plasticity for age at first calving in Nellore heifers. Scientific Reports, 10(1): 6481.
17. Mohammadi H and Sadeghi M (2010) Estimation of Genetic Parameters for Growth and Reproduction Traits and Genetic Trends of Growth Traits in Zel Sheep Breed under Rural Production System. Iranian Journal of Animal Science, 41(3): 231-241. (In Persian)
18. Paredes-Sánchez FA, Sifuentes-Rincón AM, Casas E, Arellano-Vera W, Parra-Bracamonte GM, Riley DG, Welsh TH and Randel RD (2020) Novel genes involved in the genetic architecture of temperament in Brahman cattle. PLoS One, 15(8): e0237825.
19. Seabury CM, Oldeschulte DL, Saatchi M, Beever JE, Decker JE, Halley YA, Bhattarai EK, Molaei M, Freetly HC, Hansen SL, Yampara-Iquise H, Johnson KA, Kerley MS, Kim J, Loy DD, Marques E, Neibergs HL, Schnabel RD, Shike DW, Spangler ML, Weaber RL, Garrick DJ and Taylor JF (2017) Genome-wide association study for feed efficiency and growth traits in U.S. beef cattle. BMC Genomics, 18(1): 386-396.
20. Sevane N, Martínez R and Bruford MW (2019) Genome-wide differential DNA methylation in tropically adapted Creole cattle and their Iberian ancestors. Animal Genetics, 50(1): 15-26.
21. Shen J, Chen Q and Zhang F (2020) Genome-wide Association Studies Identify Quantitative Trait Loci Affecting Cattle Temperament. Research Square, rs-107748/v1.
22. Shen Q, Qu K, Ma Z, Zhan J, Zhang F, Shen J, Ning Q, Jia P, Zhang J, Chen N, Chen H, Huang B and Lei C (2020) Genome-Wide Association Study Identifies Genomic Loci Associated With Neurotransmitter Concentration in Cattle. Frontiers in Genetics, 11: 139.
23. Sun CH, Southard C, Witonsky DB and Kittler R (2010) Allele-Specific Down-Regulation of RPTOR Expression Induced by Retinoids Contributes to Climate Adaptations. PLoS one Genetics, 6: e1001178.
24. Valente TS, Baldi F, SantAnna AC, Albuquerque LG and Paranhos da Costa MJ (2016) Genome-Wide Association Study between Single Nucleotide Polymorphisms and Flight Speed in Nellore Cattle. PLoS One, 11(6): e0156956.