



تجزیه و تحلیل غنی سازی مجموعه های ژنی با استفاده از مطالعه گسترده پویش ژنوم برای شناسایی ژن ها و مسیرهای زیستی مرتبط با دوقلوزایی در گوسفند بلوچی

سید مهدی اسماعیلی فرد^۱، سید حسن حافظیان^{۲*}، محسن قلی زاده^۳، رستم عبدالهی آرپناهی^۴

۱- دانشجوی دکتری دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- استادیار دانشکده علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۲)

چکیده

گوسفند بلوچی یکی از نژادهای بومی ایران است که از شرق کشور منشأ گرفته و با شرایط آب و هوایی آن منطقه سازگار شده است. بازده اقتصادی اصلاح نژاد گوسفند به طور واضحی با بازده تولیدمثل میش‌ها مرتبط است. در این پژوهش، صفت دوقلوزایی به عنوان یک صفت تولیدمثلی مهم مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام این پژوهش از داده‌های ژنوتیپی ۹۱ راس میش بلوچی که با استفاده از ریزآرایه گوسفندی 50k شرکت ایلومینا تعیین ژنوتیپ شده بودند، جهت پویش ژنوم و شناسایی ژن‌های مرتبط با دوقلوزایی استفاده شد. بدین منظور از مدل تکرارپذیری تعمیم یافته استفاده شد. در مرحله بعد، از تجزیه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی مرتبط با دوقلوزایی استفاده شد. در این پژوهش تعداد شش نشانگر SNP واقع بر کروموزوم‌های ۱، ۳، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ شناسایی شدند که با ژن‌های CTH، ANKRD13C، SRSF11، LDHB، PTGER3 و LRRC40 مرتبط بودند. همچنین در تجزیه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، تعداد ۲۵ مسیر با صفت دوقلوزایی مرتبط بودند ($P < 0.01$). از این میان، مسیر defense response نقش مهمی در فرآیند تخم‌ریزی دارد. عمده پروتئین‌های این مسیر، اینترفرون‌ها و اینترلوکین‌ها هستند که با ایجاد فرآیندی مشابه التهاب سبب رهاسازی تخمک در اویداکت می‌شوند. مسیرهای مربوط به چسبندگی سلولی مانند cell adhesion و مسیرهای ارتباط سلولی مانند intercellular bridge و cell junction از دیگر مسیرهای معنی‌دار بودند. مسیر cell junction به واسطه پروتئین کانکسین CX43 سبب انتقال اثر GDF9 به سلول‌های گرانولوزا می‌شود. نتیجه این پژوهش اولین گزارش از اثر غیر مستقیم GDF9 بر صفت دوقلوزایی در گوسفندان ایرانی است.

واژه‌های کلیدی: دوقلوزایی، گوسفند بلوچی، SNP، GSEA-SNP، GWAS

* نویسنده مسئول: h.hafezian1955@gmail.com

مقدمه

نژادهای بومی هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند (ادریس و خسروی نیا، ۱۳۷۹). در ایران بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند، شامل ۲۶ نژاد وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (Zamani *et al.*, 2015; Mohammadabadi, 2017). گوسفند نژاد بلوچی از جمله گوسفندان استان خراسان است که با شرایط سخت آب و هوایی منطقه سازگار شده است. این نژاد در نواحی شرقی و جنوبی خراسان، سیستان و بلوچستان، کرمان و یزد پرورش داده می‌شود. از ویژگی‌های این نژاد، قدرت راهپیمایی بالا، تحمل بالا در مناطق کویری و نیمه کویری و تحمل کم آبی نسبت به سایر نژادها است. فرآورده‌های این نژاد شامل گوشت و پشم است. این حیوان دارای دنبه کوچک است و راندمان تولید گوشت نسبت به ذخیره چربی بیشتر به نظر می‌رسد. از ویژگی‌های دیگر این نژاد، بالاتر بودن نرخ دوقلوژی و سرعت رشد مناسب نسبت به دیگر نژادها است که آن را به گزینه‌ای مناسب جهت تولید گوشت قرمز تبدیل کرده است (ضمیری، ۱۳۸۵ و شیخلو و همکاران، ۱۳۹۰). بازده اقتصادی اصلاح نژاد گوسفند به طور واضحی با بازده تولیدمثل می‌شمار مرتبط است. جهت کاهش هزینه‌های تولید، بهبود عملکرد تولیدمثلی در مقایسه با افزایش نرخ رشد بسیار موثرتر است (Fogarty, 1995). گوسفندان بومی ایران، عموماً از لحاظ تولید چند منظوره (گوشت، شیر و پشم) هستند و عمدتاً تولید بره بیشتر، اولویت اول جهت افزایش سودآوری بوده است. بنابراین صفات تولیدمثلی و خصوصاً نرخ بره‌زایی در درجه اول اهمیت قرار دارند. عملکرد صفات تولیدمثلی در گوسفند از نژادی به نژاد دیگر کاملاً متفاوت است، همچنین می‌شمارهای داخل یک گله نیز از لحاظ بروز این صفات با هم تفاوت دارند. شناسایی می‌شمارها با نرخ دوقلوژی بالاتر عامل مهمی در موفقیت اصلاح گوسفند و سودآوری بیشتر در مزرعه است (Gholizadeh *et al.*, 2014).

وراثت‌پذیری صفت دوقلوژی کم است و در نتیجه پیشرفت ژنتیکی نیز کند است (Vatankhah *et al.*, 2008). بنابراین شناسایی ژن‌ها و جهش‌های سببی مرتبط با دوقلوژی می‌تواند به موفقیت برنامه اصلاحی جهت

افزایش نرخ دوقلوژی کمک کند (Gholizadeh *et al.*, 2014). امروزه تعداد زیادی از این واریانتهای سببی در چهار ژن عمده اثر مرتبط با باروری به نام‌های ^۱GDF9، ^۲BMP1B، ^۳B4GALNT2 و ^۴BMP15 شناسایی شده است. این ژن‌ها به ترتیب روی کروموزوم‌های ۵، ۶، ۱۱ و X قرار گرفته‌اند (Fabre *et al.*, 2006; Drouilhet *et al.*, 2013). تمامی این ژن‌ها در پژوهش‌های روی گوسفندان نژادهای غیر ایرانی شناسایی شدند (Serdyńska-Szuster *et al.*, 2016; Kumar Pramod *et al.*, 2013). تاکنون پژوهش‌های زیادی با استفاده از روش‌های ^۵PCR-RFLP، ^۶SSCP و دیگر روش‌ها برای شناسایی واریانتهای موثر این ژن‌های بزرگ اثر در نژادهای گوسفندان ایران انجام شده است که هیچ یک نتوانستند واریانتهای گزارش شده موثر این ژن‌ها را در نژادهای ایرانی شناسایی کنند (امیری، ۱۳۸۵؛ سلیمانی، ۱۳۸۷؛ زارع و همکاران، ۱۳۸۹؛ علی نقی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹؛ اسکندری و ایاران، ۱۳۸۹ و خدابخش زاده و همکاران، ۱۳۹۴).

در پژوهشی که به وسیله (Abdoli *et al.*, 2018a) روی نژاد لری-بختیاری انجام شد، سعی شد با استفاده از تکنیک ^۷PCR و توالی‌یابی، جهش‌های سببی موثر ژن‌های ^۹GDF9، ^{۱۰}BMP1B و ^{۱۱}BMP15 شناسایی شوند. در این پژوهش، تعدادی جهش مشاهده شد و تنوع در این ژن‌ها گزارش شد ولی جهش‌های سببی موثر بر دوقلوژی که قبلاً گزارش شده بودند، شناسایی نشدند. جهت بررسی اثر جهش‌های مشاهده شده نیاز به پژوهش‌های پویش گسترده ژنوم (^۸GWAS) بود که توسط (Abdoli *et al.*, 2018b) انجام شد. طی این بررسی، آنها چهار عدد نشانگر ^۹SNP مرتبط با صفت دوقلوژی را گزارش کردند که روی کروموزوم‌های ۲۲، ۳ (۲ عدد) و ۶ قرار داشتند. تنها ^{۱۰}SNP‌های روی کروموزوم ۳ با ژن ^{۱۱}LHCGR مرتبط شدند و باقی ^۹SNP‌ها با هیچ ژنی مرتبط نشدند. این ژن بر نرخ تخمک‌گذاری و ساخت استروئیدها^{۱۱} در تخمدان موثر

1. Growth differentiation factor 9
2. Bone morphogenetic protein receptor 1B
3. Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2
4. bone morphogenetic protein 15
5. PCR- Restriction fragment length polymorphism
6. Single strand conformation polymorphism (SSCP)
7. Polymerase chain reaction
8. Genome Wide Association Study
9. Single Nucleotide Polymorphism
10. Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
11. Steroidogenesis

هستند بررسی می‌کند. به عبارت دیگر پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی را با فنوتیپ آزمون می‌کند. در واقع در این روش به دنبال ژن‌هایی هستیم که به تنهایی اثر آنها بر صفت مورد نظر معنی‌دار نشد، ولی اثر تجمعی آنها روی صفت دارای تاثیر است. برای اینکه بتوان تفسیر درستی از کنار هم قرار دادن این ژن‌ها حاصل شود، از مسیرهای زیستی به عنوان بستری معنی‌دار که عملکرد مجموع ژن‌ها در آنها یک یا چند هدف واحد را دنبال می‌کند استفاده می‌شود (Mooney and Wilmot, 2015). بنابراین هدف اول از انجام این پژوهش، پویش کل ژنوم با مدل مختلط و رویه صفت تکرار شده جهت یافتن ژن‌های موثر بر صفت دوقلوزایی در گوسفند بلوچی بود. هدف دوم از انجام این پژوهش، بررسی همبستگی طبقات عملکردی با صفت دوقلوزایی - تجزیه بر مبنای مسیر^۶ - با استفاده از روش GSEA-SNP^۷ بود.

مواد و روش‌ها

اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی: در این پژوهش از اطلاعات ژنوتیپی ۹۱ راس میش بلوچی، که با استفاده از ریزآرایه نانویی 50k گوسفندی تعیین ژنوتیپ شده بودند (Gholizadeh et al., 2014) استفاده شد. میش‌ها از دو انتهای توزیع فنوتیپی صفت دوقلوزایی، به نحوی انتخاب شدند که کمترین رابطه خویشاوندی را با هم داشته باشند. فایل اطلاعات فنوتیپی داده‌های استفاده شده در این پژوهش، شامل ۳۸۴۸ رکورد زایش گوسفند بلوچی بود که بین سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۹۰ در ایستگاه اصلاح نژاد عباس آباد مشهد جمع‌آوری شده بود. فایل اطلاعات شجره حاوی ۴۷۲۷ حیوان بود که شامل ۱۷۸ راس نر، ۱۵۰۹ راس ماده و ۸۱۸ راس حیوان پایه‌گذار بود.

کنترل کیفیت: کنترل کیفیت اطلاعات ژنوتیپی با استفاده از بسته نرم‌افزاری GenABEL (Aulchenko et al., 2007) در محیط نرم‌افزار R انجام شد. معیارهای کنترل کیفیت شامل نرخ خوانش حیوان^۸، نرخ خوانش SNP^۹، فراوانی آلل کمیاب^{۱۰} و تعادل هاردی - واینبرگ بودند. حیوانات با نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۵ درصد، SNP‌ها

است (Bacich et al., 1994; Wang et al., 2012; Regan et al., 2015). در مجموع عمده کارهای پژوهشی که در نژادهای مختلف گوسفندان ایرانی انجام گرفته است، عدم وجود واریانت‌های ژن‌های بزرگ اثر متعارف که تا به حال در نژادهای مختلف، در دیگر نقاط جهان گزارش شده است را نشان می‌دهد.

داده‌های مورد استفاده در این پژوهش یک بار به وسیله Gholizadeh et al. (2014) برای صفت دوقلوزایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که در آن با استفاده از نرم‌افزار plink 1.07^۱ (Purcell et al., 2007) و مدل رگرسیون لجستیک، هر شکم زایش به تنهایی و به عنوان یک صفت مستقل، و با استفاده از روش حداقل مربعات تعمیم یافته (GLS^۲) تجزیه شد و دو نشانگر SNP روی کروموزوم‌های ۱۰ و ۱۵ شناسایی شدند. اما از آنجا که توان پژوهش‌های GWAS با روش حداقل مربعات معمولی نسبت به مدل مختلط کمتر است، در پژوهش حاضر با استفاده از داده‌های مشابه، دوقلوزایی در شکم‌های مختلف به عنوان یک صفت و با استفاده از رویه تکرار شده و مدل مختلط به صورت یکجا مورد تجزیه قرار گرفت. استفاده از رکوردهای تکرار شده در طول زمان دارای مزایای زیادی است، برای مثال زمانی که تعداد حیوانات ژنوتیپ شده کم باشد، این داده‌ها بسیار مفید هستند. همچنین با استفاده از این داده‌ها می‌توان اثراتی مثل اثر سال یا اثر سن را نیز در تجزیه GWAS لحاظ کرد (Clutton-Brock and Sheldon, 2010).

یکی از نقص‌های پژوهش‌های GWAS در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری محافظه‌کارانه برای جلوگیری از بروز اشتباه کاذب^۳ است. در حالی که پرهیز از اشتباه نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم یعنی در نظر نگرفتن SNP‌های دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه می‌شود. لذا برای حل این مشکل، تجزیه‌های پسا GWAS^۴ طراحی شده‌اند که یکی از آنها، تجزیه مجموعه‌های ژنی (GSA^۵) است. این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، همبستگی بین صفت و واریانت‌های ژنتیکی را در یک گروه از ژن‌هایی که به طور عملکردی با هم مرتبط

6. Pathway-based analysis

7. Gene Set Enrichment Analysis- SNP

8. Animal call rate

9. SNP call rate

10. Minor allele frequency

1. <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/download>

2. Generalized Least Square

3. False Positive

4. Post-GWAS

5. Gene Set Enrichment Analysis

این پژوهش، ماتریس G با استفاده از ۸۴ حیوان (میش) های باقی مانده بعد از کنترل کیفیت) ایجاد شد و دارای ابعاد ۸۴×۸۴ است. اثر چندژنی به این علت با استفاده از ماتریس خویشاوندی ژنومی در نظر گرفته شده که از نتایج اشتباه کاذب در نتیجه لایه‌بندی جمعیت جلوگیری شود. اندیس‌های m و M به ترتیب نشان‌دهنده تعداد افراد با رکوردهای دوقلوژیایی (۸۴) و تعداد رکوردهای دوقلوژیایی (۴۳۵) است.

این تجزیه به وسیله بسته نرم‌افزاری RepeatABEL (Ronnegard *et al.*, 2016) در محیط R و در دو مرحله انجام شد: در مرحله اول، یک مدل تکرارپذیری بدون اثر SNPها برازش شد و سپس ماتریس (کو)واریانس مدل (V_0) تخمین زده شد. در مرحله دوم، با استفاده از ماتریس V_0 و روش حداقل مربعات تعمیم یافته (GLS)، برای تعیین اثر هر SNP یک مدل خطی برازش شد. نهایتاً برای محاسبه P -value اثر هر SNP از آزمون استاندارد Wald^۱ استفاده شد.

تجزیه مجموعه‌های ژنی (GSA): اساساً تجزیه مجموعه‌های ژنی طی سه مرحله انجام می‌شود: (۱) انتساب SNPها به ژن‌ها، (۲) انتساب ژن‌ها به طبقات عملکردی (GO Terms) و (۳) بررسی همبستگی بین هر یک از طبقات عملکردی و فنوتیپ مورد نظر.

۱- جهت انتساب SNPها به ژن‌ها، SNPهایی که مقدار P -value آنها کمتر و مساوی با ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم‌افزاری biomaRt (Durinck *et al.*, 2009) در محیط R و با استفاده از نسخه ژنوم گوسفند Oar_v3.1 به ژن‌هایی که SNP مورد نظر در داخل آن ژن یا در فاصله 300 Kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، نسبت داده شدند. ژن‌هایی که حداقل حاوی یک SNP باشند، ژن معنی‌دار به حساب می‌آیند.

۲- پایگاه داده Gene Ontology (GO) جهت تعریف طبقات عملکردی ژن‌های معنی‌دار مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله، فرضیه این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند می‌توانند به عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی ویژگی‌های خاص و مشترک دارند- مثلاً شرکت در یک فرآیند زیستی یا مولکولی- در نظر گرفته شوند.

با نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۳ درصد، فراوانی آلل کمیاب کمتر از ۱ درصد و انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ با شدت $P > 10^{-6}$ از تجزیه کنار گذاشته شدند. پس از پایان کنترل کیفیت، تعداد ۸۴ حیوان و ۴۵۳۴۲ نشانگر SNP در تجزیه GWAS مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه GWAS. فایل شجره ابتدا با استفاده از نرم‌افزار CFC (Sargolzaei *et al.*, 2006) تصحیح شد و پس از کدگذاری مجدد در تجزیه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تعداد بره زنده متولد شده در هر زایش به عنوان فنوتیپ مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین اثرات ثابت موثر بر صفت دوقلوژیایی، یک تجزیه لجستیک اولیه با استفاده از رویه GLM در محیط R انجام شد. اثرات سن مادر هنگام زایش، سال تولد بره، گله و جنس بره (به صورت ترکیبی دسته‌بندی شد) مورد تجزیه قرار گرفتند که از این بین، فقط اثر گله معنی‌دار شد ($P < 0.001$). تجزیه و تحلیل ارتباط بین فنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌ها با استفاده از افراد خویشاوند با رکوردهای تکرار شده در چارچوب مدل حیوانی تکرارپذیری اجرا شد. جهت تجزیه داده‌های تکرار شده از مدل تکرارپذیری زیر استفاده شد:

$$y = Xb + X_{SNP}\beta_{SNP} + Zu + Wpe + e$$

در این مدل y بردار مشاهدات فنوتیپی؛ b بردار اثرات ثابت که وارد مدل شدند (گله)؛ u بردار اثرات تصادفی چندژنی حیوان؛ pe بردار اثرات تصادفی محیطی دائمی غیر افزایشی؛ e بردار اثرات باقی‌مانده و X ، Z و W ماتریس‌های طرح جهت مرتبط کردن رکوردهای فنوتیپی به اثرات ثابت، اثرات تصادفی حیوان و اثرات تصادفی محیطی دائمی هستند. همچنین X_{SNP} ماتریس طرح برای SNPها است که به صورت ۰، ۱ و ۲ کد بندی شده اند و β_{SNP} اثر SNP یا ضریب رگرسیون برای هر SNP است که اثر جانشینی آلی نیز گفته می‌شود. در این مدل، پراکندگی اثرات تصادفی به صورت چند متغیره نرمال فرض شده است:

$$\begin{pmatrix} u \\ pe \\ e \end{pmatrix} \sim N \left[0, \begin{pmatrix} G\sigma_u^2 & 0 & 0 \\ 0 & I_m\sigma_{pe}^2 & 0 \\ 0 & 0 & I_M\sigma_e^2 \end{pmatrix} \right]$$

در این مدل از ماتریس G که ماتریس خویشاوندی ژنومی است استفاده شده است. ماتریس G فقط با استفاده از افرادی که داری ژنوتیپ هستند قابل محاسبه است. در

1. Standard Wald test statistic

NCBI^۴ و UCSC^۳، Ensembl^۲، BioMart-Ensembl^۱ استفاده شد. همچنین جهت یافتن ژن‌ها در نواحی از ژنوم گوسفند که فاقد ژن بودند، از ابزار BLAST^۵ برای مقایسه توالی این نواحی و یافتن مشابهت‌ها (نواحی یا ژن‌های ارتولوگ) با ژنوم گاو UMD_3.1 استفاده شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود معنی‌دارترین SNP در این پژوهش OAR10_4976585.1 است که روی کروموزوم ۱۰ و در مکان 6718174 قرار دارد که تا فاصله 500 Kb پایین دست و بالا دست (پنجره 1 Mb) این SNB هم در ژنوم گوسفندی و هم در ژنوم گاو هیچ ژنی یافت نشد. در مطالعه‌ای که به وسیله Gholizadeh *et al.* (2014) در گوسفند بلوچی روی صفت دوقلوزایی انجام شد، در شکم‌های اول، دوم و چهارم، SNP ذکر شده معنی‌دار شده بود. بررسی انجام شده نشان داد که تعداد بسیار اندکی ژن در این ناحیه در ژنوم گوسفند و گاو نقشه‌یابی شده است.

تعداد دو SNP روی کروموزوم ۱ معنی‌دار شدند و چهار ژن با نام‌های CTH، ANKRD13C، SRSF11 و PTGER3 در مجاورت این دو SNP شناسایی شدند. ژن CTH مسئول تولید یک آنزیم به نام Cystathionase است که سبب تجزیه Cystathionine به α -ketobutyrate، Cysteine و آمونیاک می‌شود. Cystathionine از ترکیب هموسیستئین و اسید آمینه سرین ایجاد می‌شود (Berg *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2009; Steegborn *et al.*, 1999). این آنزیم در برخی از باکتری‌ها و پستانداران، در فرآیند تولید هیدروژن سولفید (H_2S) نقش دارد (Sun *et al.*, 2010; Wang, 2009). ثابت شده است که گاز H_2S جزء معدود گازهایی است که در فرآیند cell signaling فعال است (Wang, 2013) و همچنین در تنظیم فشار خون نیز موثر است. موش‌هایی که دارای نقص در ژن CTH هستند علائمی مانند فشار خون بالا وابسته به سن، کاهش سطح H_2S ، اختلال در کاهش کشش رگ‌های خونی و هایپرهومیستئینیمی شدید (افزایش غیرطبیعی هموسیستئین در خون، بیشتر از $15 \mu\text{mol/L}$) را نشان می‌دهند (Yang, 2008).

۳- همبستگی‌های معنی‌دار طبقات عملکردی با صفت دوقلوزایی با استفاده از Fisher's Exact Test مورد آزمون قرار گرفت. P -value طبقات عملکردی که تعداد g ژن معنی‌دار در آن قرار دارد با فرمول زیر محاسبه شد:

$$P - value = 1 - \sum_{i=0}^{g-1} \frac{\binom{S}{i} \binom{N-S}{K-i}}{\binom{N}{K}}$$

در این فرمول، g برابر است با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی، S برابر است با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار همبسته با صفت مورد بررسی، N برابر است با کل تعداد ژن‌هایی که تجزیه شدند و K برابر است با تعداد کل ژن‌ها در طبقه عملکردی (Penagaricano *et al.*, 2013; Abdalla *et al.*, 2016). تجزیه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی با استفاده از بسته نرم‌افزاری goseq (Young *et al.*, 2010) در نرم‌افزار R انجام شد. این بسته نرم‌افزاری از آزمون فوق هندسی استفاده می‌کند. همچنین برای اختلاف طول ژن‌ها نیز تصحیح انجام می‌شود.

نتایج و بحث

تجزیه GWAS. در این پژوهش از مدل تکرارپذیری تعمیم یافته، برای پویا کامل ژنوم گوسفند بلوچی، جهت شناسایی ژن‌های موثر بر صفت دوقلوزایی استفاده شد. پلات منهتن و پلات Q-Q به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ برای صفت دوقلوزایی نشان داده شده است. پس از انجام تجزیه، مقادیر P -value های بدست آمده مقدار 6.9% تورم را نشان دادند ($\lambda = 1.069$) که در بازه قابل قبول قرار دارد. با این حال با استفاده از روش Genomic Control تورم مشاهده شده تصحیح شد و تمامی مقادیر و نمودارها بدون تورم ارائه شده‌اند ($\lambda=1$). در این پژوهش، SNP‌هایی که مقدار P -value تصحیح شده آنها کمتر از 10^{-4} بود ($P < 10^{-4}$)، به عنوان SNP معنی‌دار در نظر گرفته شدند. در مجموع شش نشانگر SNP معنی‌دار شدند که روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ قرار داشتند. جدول ۱ جزئیات مربوط به SNP‌های معنی‌دار را نشان می‌دهد.

جهت یافتن ژن‌ها در نزدیکی SNP‌های معنی‌دار، از نسخه ژنوم گوسفند Ovis_aries_v3.1 و بانک‌های اطلاعاتی

1. <http://www.ensembl.org/biomart>
2. <http://www.ensembl.org>
3. <http://genome.ucsc.edu>
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Basic Local Alignment Search Tool

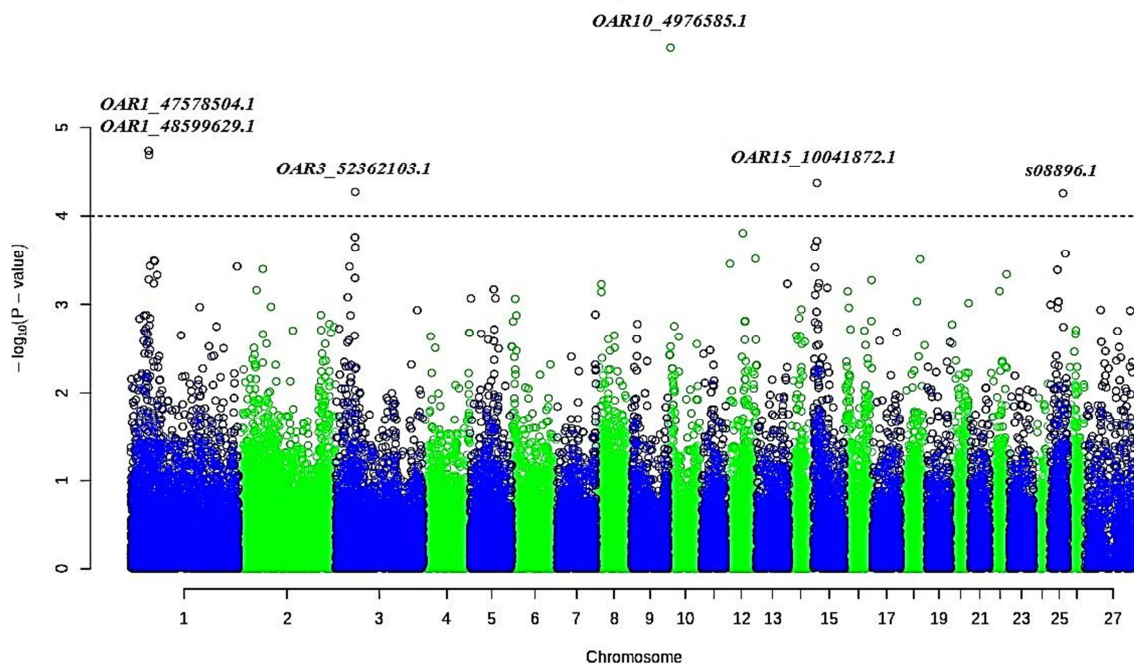


Fig. 1. Manhattan plot for twinning trait in Baluchi sheep. X axis, SNPs positions on chromosomes, Y axis, $-\log_{10} P$ -value

شکل ۱- پلات منهن برای صفت دوقلو زایی در گوسفند بلوچی. محور X، مکان نشانگرها روی کروموزوم‌ها، محور Y، منفی لگاریتم مبنای ۱۰ مقادیر P -value

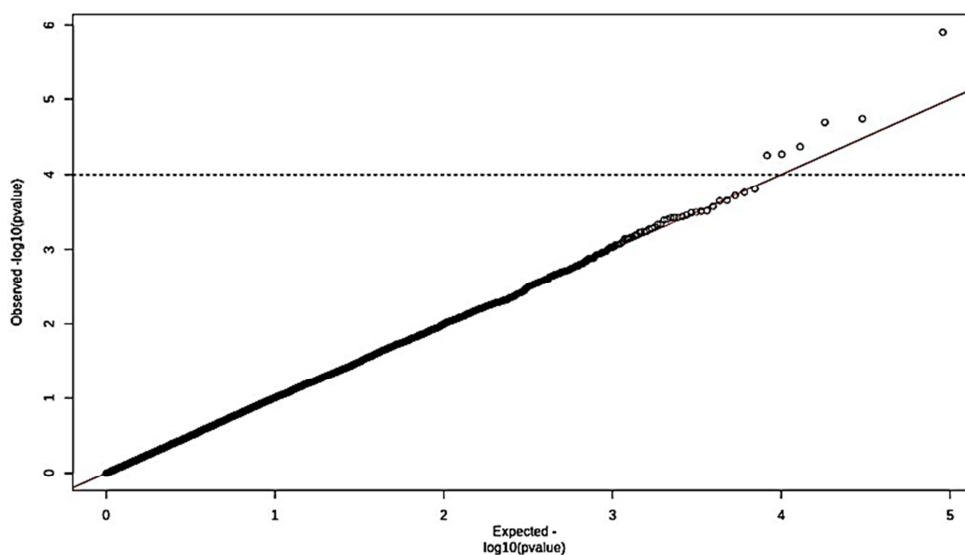


Fig. 2. Q-Q plot for twinning trait in Baluchi sheep. X axis, $-\log_{10}$ expected P -values, Y axis, $-\log_{10}$ observed P -values. Red line shows expected P -values under null hypothesis (no significant association), ($\lambda = 1$)

شکل ۲- پلات Q-Q برای صفت دوقلو زایی در گوسفند بلوچی. محور X، منفی لگاریتم مبنای ۱۰ مقادیر P -value های مورد انتظار، محور Y، منفی لگاریتم مبنای ۱۰ مقادیر P -value های مشاهده شده. خط مورب نشان‌دهنده مقادیر مورد انتظار تحت فرض صفر (عدم وجود همبستگی) است ($\lambda = 1$)

تنش اکسیداتیو، افزایش مرگ سلولی (apoptosis) و اختلال در فرآیند متیلاسیون، در فرآیندهای تولیدمثلی زنان شود. تمام این فرآیندها در تکامل اووسیت، آماده-

همچنین بیان شده که تجمع هموسیستین در خون می‌تواند سبب کاهش تقسیم سلولی، تولید سایتوکاین‌های التهابی، تغییر در سوخت و ساز نیتریک اکسید، افزایش

در سطح سلول‌های تخمدان، سبب افزایش دریافت هورمون‌های جنسی و افزایش تولید فولیکول‌ها و یا تخمک‌گذاری شود.

پروتئین‌های سرین-آرژنین (SR proteins) خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که در ویرایش RNA درگیر هستند و اولین بار در مگس سرکه و تخمک دوزیستان کشف شدند. این پروتئین‌ها حاوی تکرارهای طولانی (تقریباً بین ۲۰۰ تا ۶۰۰) از آمینو اسیدهای سرین و آرژنین هستند و همچنین دارای دامین‌های شناسایی‌کننده ۳RNA و دامین SR هستند. این پروتئین‌ها بیشتر در هسته یافت می‌شوند، اما تعدادی از آنها بین هسته و سیتوپلاسم جابجا می‌شوند. SR پروتئین‌ها در ویرایش mRNA اولیه، خروج mRNA، پایداری ژنوم و ترجمه نقش دارند (Long and Caceres, 2009). با توجه به عملکردهای متفاوت SR پروتئین‌ها در بروز صفات، احتمالاً پروتئین SRSF11 با تغییر و تنظیم بیان پروتئین‌های مختلف در تخمدان و فولیکول می‌تواند بر صفت دوقلو زایی موثر باشد.

ژن بعدی که در این پژوهش در مجاورت SNP معنی‌دار OAR1_48599629.1 روی کروموزوم ۱ قرار داشت، ژن PTGER3^۴ است. محصول این ژن یکی از چهار گیرنده پروستوگلاندین E₂ (PGE₂) است که واسطه تاثیر این ترکیب بر سلول‌ها است. PGE₂ به عنوان یک پروستوگلاندین کلیدی در فرآیندهای تخمک‌گذاری شناخته شده است (Murdoch *et al.*, 1993). در پستانداران، غلظت فولیکولی PGE₂ دقیقاً قبل از تخمک‌گذاری به بالاترین سطح خود می‌رسد (Duffy and Stouffer, 2001; Sirois, 1994; Sirois and Doré, 1991; Wong and Richards, 1997). نقش‌های PGE₂ در فولیکول شامل شکستن غشای پایه، پارگی فولیکول و آزادسازی اووسیت از تخمدان و تبدیل فولیکول به جسم زرد بعد از رها سازی تخمک است (Duffy and Stouffer, 2002; Peters *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 1999). عملکرد سلول‌ها را به کمک چهار گیرنده خود که PTGER1-4 نام دارد و به اختصار EP1-4 نامیده می‌شود تحت تاثیر قرار می‌دهد (Coleman *et al.*, 1994).

سازی اندوتریوم، لانه‌گزینی جنین و بارداری نقش دارند (Gmyrek *et al.*, 2005; Thaler and Epel, 2003; Agarwal *et al.*, 2005; Hussein, 2005; Forges *et al.*, 2007). همچنین کمبود فولات (ویتامین B₉) نیز سبب تجمع هموسیستئین در خون می‌شود. در کل، کمبود فولات و هایپرهموسیستئینمیاز عوامل خطر شناخته شده در باروری هستند (Tamura and Picciano, 2006). در فرآیند ساخت فولیکول، تجمع هموسیستئین ممکن است فرآیند مرگ سلولی را فعال کرده و سبب پس‌روی فولیکول شود (Forges *et al.*, 2007). همچنین رابطه منفی بین غلظت هموسیستئین در مایع فولیکولی و تعداد فولیکول بالغ گزارش شده است (Szymanski and Kazdepka-Zieminska, 2003). با توجه به بررسی انجام شده می‌توان این‌گونه استنباط کرد که واریانت‌های ژن CTH که آنزیم بیشتری تولید می‌کنند نقش قوی‌تری در تجزیه هموسیستئین در فولیکول داشته و ممکن است بر نرخ تخمک‌گذاری اثر مثبت داشته باشند. محصول ژن ANKRD13C به عنوان مولکول همراه جهت بلوغ و تاخوردگی صحیح گیرنده‌های جفت با G-پروتئین‌ها^۱ در بخش سیتوپلاسمی شبکه اندوپلاسمی فعالیت می‌کند (Parent *et al.*, 2010). مانند بسیاری از گیرنده‌ها، GPCRها میانجی پاسخ‌های سلولی به بسیاری از محرک‌ها مانند هورمون‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی، لیپیدها، نوکلئوتیدها، یون‌ها و فتون‌ها هستند. جهت فعال شدن کامل GPCRها، لازم است که آنها با فرم مناسب به غشای سلولی برسند. آرایش صحیح این گیرنده‌ها شامل مجموعه پیچیده‌ای از فرآیندها مانند تاخوردگی پروتئین‌ها، تغییرات بعد از ترجمه و انتقال به غشای سیتوپلاسمی است (Achour *et al.*, 2008). همانطور که بیان شد محصول ژن ANKRD13C یک پروتئین مهم در فرآیند ویرایش، تنظیم بیوزنز، خروج از شبکه اندوپلاسمی و بروز سطح سلولی این گیرنده‌ها است (Parent *et al.*, 2010). بر اساس ارزیابی پایگاه داده Aceview^۲، این پروتئین به طور گسترده در بافت‌های بدن بیان می‌شود و بیشترین بیان آن در مغز و رحم گزارش شده است (Thierry-Mieg *et al.*, 2006). با توجه به توضیحات ارائه شده، احتمالاً ژن ANKRD13C می‌تواند از راه افزایش گیرنده‌های GPCR

3. RNA recognition motif (RRM)
4. Prostaglandin EP3 receptor

1. G protein-coupled receptors (GPCRs)
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly>

جدول ۱- SNP‌های معنی‌دار مرتبط با دوقلو‌زایی در گوسفند بلوچی
Table 1. SNPs significantly associated with twinning in Baluchi sheep

SNP	Chr	Position	P-value (Adjusted (GC))	The nearest known ovine genes	Distance (bp)
OAR10_4976585.1	10	6718174	1.24×10^{-6}	Without gene in 1Mb CTH, cystathionine gamma-lyase	- -17674
OAR1_47578504.1	1	45776527	1.82×10^{-5}	ANKRD13C, ankyrin repeat domain 13C SRSF11, serine and arginine rich splicing factor 11	+18968 +115013
OAR1_48599629.1	1	46785446	2.03×10^{-5}	PTGER3, prostaglandin E receptor 3	+394999
OAR15_10041872.1	15	10104139	4.26×10^{-5}	LDHB, Lactate dehydrogenase B	+414894
OAR3_52362103.1	3	49638479	5.38×10^{-5}	LRRC40, leucine rich repeat containing 40	+161652
s08896.1	25	32588193	5.57×10^{-5}	KCNMA1, potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1	Within

Chr: Chromosome; GC: Genomic Control; bp: base pair

ژن LDHB مسئول تولید زیرواحد B پروتئین لاکتات دهیدروژناز^۴ است. این پروتئین در بیشتر سلول‌های زنده یافت شده و مسئول تبدیل لاکتات به پیرووات است که طی این فرآیند، NAD^+ به NADH تبدیل می‌شود. واکنش برعکس نیز به وسیله همین پروتئین کاتالیز می‌شود (Everse and Kaplan, 1973). LDH دارای چهار زیرواحد است (تترامر) که عمده‌ترین آنها LDHA و LDHB هستند که در مجموع پنج ترکیب مختلف آنها این پروتئین را ایجاد می‌کنند و در بافت‌های مختلف، با توجه به نیاز بافت به اکسیژن پراکنده شده‌اند. برای مثال LDHA در بافت ماهیچه اسکلتی و LDHB در ماهیچه قلب فراوانی بیشتری دارند. زیرواحد LDHC فقط در سلول‌های جنسی بیضه (Goldberg, 1977; Wheat and Coonrod *et al.*, 2006) و تخمدان (Goldberg, 1977) بیان می‌شود که پروتئین هموترامر LDH-C₄ را ایجاد می‌کند. گزارش شده است که LDH-C₄ مختص بیضه (Goldberg, 1975) است و LDHB ایزوزایم غالب لاکتات دهیدروژناز در تخمک است (Roller *et al.*, 1989).

پروتئین LRRC40 که به وسیله ژنی به همین نام کد می‌شود دارای یک توالی غنی از آمینواسید لوسین است. عملکرد دقیق این پروتئین هنوز مشخص نیست ولی با توجه به اینکه جزء خانواده پروتئین‌های غنی از لوسین است، احتمال داده می‌شود که مانند دیگر پروتئین‌های

موش‌هایی که فاقد EP2 هستند، نقص شدید در گسترش سلول‌های کامولوس^۱ (نزدیکترین لایه سلولی اطرف تخمک)، کاهش تخمک‌گذاری و کاهش باروری نشان می‌دهند (Kobayashi and Narumiya, 2002; Hizaki *et al.*, 1999). موش‌های که فاقد EP1 و EP3 هستند بارور باقی می‌مانند، ولی سنجش باروری موش‌های فاقد EP4 به علت مرگ این موش‌ها قابل ارزیابی نیست (Ushikubi *et al.*, 1998; Segi *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1998). هر چهار گیرنده EP به وسیله سلول‌های گرانولوزا^۲ در میمون بیان می‌شوند و EP1-3 در تنظیم اجزای مسیر پروتئولیتیک فعال‌کننده پلاسمینوژن^۳ در سلول‌های گرانولوزا فعال هستند (Harris *et al.*, 2011; Markosyan and Duffy, 2009). احتمالاً کلیه گیرنده‌های EP در فرآیندهای مختلف تخمک‌گذاری در حیوانات بزرگتر درگیر هستند. برای مثال نشان داده شده که سطوح بیان mRNA گیرنده EP3 در سلول‌های کامولوس با کیفیت کمپلکس تخمک-کامولوس دارای همبستگی است (Calder *et al.*, 2001). همچنین گزارش شده است که گیرنده EP3 در تبدیل فولیکول به جسم زرد در گاوسانان و میمون‌ها دخالت دارند (Tsai *et al.*, 1996; Bogan *et al.*, 2008).

1. Cumulus
2. Granulosa
3. Plasminogen activator proteolytic pathway

4. Lactate dehydrogenase (LDH)

مولکولی مرتبط با دوقلوژی در میش‌های بلوچی، تکمیل شد. از ۴۵۳۴۲ نشانگر SNP جهت پوشش‌دهی ژن‌ها تا فاصله 300 kb استفاده شد. تعداد ۲۵۹۸۹ عدد ژن (از ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی شده گوسفند) به وسیله این نشانگرها پوشش داده شد که از این میان، تعداد ۸۴۰۲ ژن دارای اثر معنی‌دار بودند، یعنی حداقل یک نشانگر با P -value کمتر از 0.05 در داخل یا در بالادست یا پایین دست این ژن تا فاصله 300 kb قرار گرفت. این ژن‌ها به عنوان ژن‌های معنی‌دار همبسته با صفت دوقلوژی برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند و باقی ژن‌ها به عنوان ژن‌های پس زمینه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تعداد ۲۵ طبقه عملکردی در هستی‌شناسی فرآیندهای زیستی و اجزای سلولی با صفت دوقلوژی دارای همبستگی هستند ($P < 0.01$). مسیرهایی که بیشتر از ۵ و کمتر از ۵۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند. همانطور که مشاهده می‌شود مسیر defense response معنی‌دارترین مسیر زیستی مرتبط با دوقلوژی در این پژوهش است که نشان‌دهنده نقش سیستم ایمنی در فرآیندهای تخمدان است. عمده ژن‌های موجود در این مسیر مربوط به انواع اینترفرون‌ها (آلفا، بتا، کاپا و امگا)، پروتئین‌های دیفنسین بتا و اینترلوکین‌ها است. ژن‌های اینترلوکین معنی‌دار موجود در این مسیر شامل IL-1، IL-6، IL-8، IL-9 و IL-12 بودند. نقش اینترلوکین‌ها در عملکردهای تخمدان و فرآیند تخم‌ریزی بارها مورد تاکید قرار گرفته است. تخم‌گذاری یک فرآیند زیستی خاص است که طی آن، اووسیت بالغ و سلول‌های سوماتیک کامولوس که با هم کمپلکس اووسیت-کامولوس نامیده می‌شوند، از فولیکول جدا شده و جهت انتقال و باروری به داخل اویداکت رها می‌شوند. جنبه‌های مختلف تخم‌گذاری شباهت زیاد آن را به فرآیند التهاب نشان داده‌اند (Espey and Richards, 2006; Richards, 2007; Russell and Robker, 2007). تخمدان یک اندام ایمنی منحصر نیست، ولی مجموعه متنوعی از لوکوسیت‌ها شامل ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها در مراحل مختلف تکامل فولیکول در تخمدان مشاهده شده‌اند (Brannstrom and Norman, 1993). نوتروفیل‌ها در مدولا، theca، مایع فولیکولی و جسم زرد وجود دارند (Bukulmez and Arici, 2000). نشان داده شده که نوتروفیل‌های ساکن

این خانواده در تداخل پروتئین-پروتئین شرکت داشته باشد (Kobe and Kajava, 2001). بر مبنای نتایج بدست آمده از پایگاه داده^۱ Molecular Interaction، دو پروتئین احتمالی که با LRRC40 می‌توانند تداخل داشته باشند، CDC5L^۲ و SNW1^۳ هستند که CDC5L در تنظیم بیان و ویرایش mRNA و SNW1 فقط در ویرایش mRNA نقش دارد.

SNP معنی‌دار روی کروموزوم ۲۵ در داخل ژن KCNMA1 قرار دارد و محصول این ژن، پروتئینی به همین نام است که یک کانال پتاسیمی است و ویژگی بارز آن، انتقال مقادیر زیاد پتاسیم از غشای سلولی است. این کانال با تغییر پتانسیل الکتریکی غشا و یا با افزایش غلظت درون سلولی کلسیم باز شده و پتاسیم به درون سلول وارد می‌شود و سبب برقراری تعادل الکتریکی در دو طرف غشا می‌شود (Salkoff et al., 2006; Contet et al., 2016). این کانال در بافت‌های زیادی بیان شده است و بیشترین فراوانی آن در سلول‌های مغز و اندام‌های دارای ماهیچه صاف است. همچنین در بافت‌های دیگری شامل اندام‌های جنسی (تخمدان و بیضه)، پانکراس و غدد آدرنال نیز وجود دارد (Behrens et al., 2000). این پروتئین غشایی در چندین عملکرد فیزیولوژیک کلیدی، مانند کنترل انقباض ماهیچه‌های صاف، کنترل فشار خون، تنظیم بار الکتریکی سلول‌های مو در گوش داخلی، تنظیم رهاسازی انتقال‌دهنده‌ها و سیستم ایمنی ذاتی نقش دارد. همچنین در بسیاری از فرآیندهای مرتبط با بیماری سرطان، مانند تکثیر و مهاجرت سلول‌ها نقش دارد. با توجه به نقش گسترده کانال‌های پتاسیمی در بافت‌ها، KCNMA1 می‌تواند با عملکردهای متفاوتی فرآیند تخم‌گذاری و تولیدمثل را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه‌ای که روی صفات تولیدمثلی گاو میش انجام شد، گزارش شد که ژن KCNMA1 روی صفات فاصله گوساله‌زایی و سن سومین زایش موثر است (Li et al., 2018).

تجزیه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی: در این پژوهش، پویش کل ژنوم با تجزیه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و ساز و کارهای

1. <https://mint.bio.uniroma2.it/>
2. Cell division cycle 5-like protein
3. Ski-interacting protein

مهمی در تخمک‌گذاری داشته باشند. شناخته شده‌ترین سایتوکاین‌هایی که در فرآیند تولیدمثل نقش دارند اینترلوکین‌ها هستند. در چندین گونه از پستانداران، این مولکول‌ها در مایعات اندام‌های مرتبط با تولیدمثل و سلول‌های مختلف تخمدان مانند تخمک، گرانولوزا و سلول‌های theca وجود دارند. همچنین مشاهده شده است که ماکروفاژها در تخمدان، سایتوکاین‌ها را ترشح می‌کنند که یکی از آن‌ها اینترلوکین‌ها هستند (Smolikova *et al.*, 2012). پروتئین IL-8 یک سایتوکاین چموتاکتیک

در تخمدان، TNF- α و IL-1 آزاد می‌کنند که در پارگی غلاف یا غشای فولیکول در هنگام تخمک‌گذاری نقش دارند و ثابت شده که این ترکیبات نرخ تخمک‌گذاری در خرگوش را افزایش می‌دهند (Takehara *et al.*, 1997). همچنین بیان شده است که میزان TNF- α و IL-1 در مایع فولیکولی زنانه که تخمک‌گذاری در آنها با گونادوتروپین‌ها تحریک شده است بیشتر از حالت عادی (بدون تحریک به وسیله گونادوتروپین‌ها) است (Loret de Mola *et al.*, 1998).

تعداد زیادی از مطالعات نشان دادند که سایتوکاین‌ها ممکن است بر عملکردهای تخمدان تاثیر بگذارند و نقش

جدول ۲- مسیرهایی که به طور معنی‌دار ($P < 0.01$) با صفت دوقلو زایی دارای همبستگی هستند

Table 2. GO terms significantly ($P < 0.01$) associated with twinning trait

Category	P-value	numDEInCat ¹	numInCat ²	Term	Ontology
GO:0006952	1.79E-08	48	75	defense response	BP
GO:0007155	0.000359439	100	232	cell adhesion	BP
GO:0006821	0.000408927	32	59	chloride transport	BP
GO:0007156	0.00067336	43	87	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	BP
GO:0007611	0.001041252	17	27	learning or memory	BP
GO:0035335	0.001050407	44	91	peptidyl-tyrosine dephosphorylation	BP
GO:0051895	0.00106603	9	11	negative regulation of focal adhesion assembly	BP
GO:0019372	0.001140339	6	6	lipoxygenase pathway	BP
GO:0005856	0.001587861	82	192	cytoskeleton	CC
GO:0090630	0.002425294	19	33	activation of GTPase activity	BP
GO:0019369	0.002727764	8	10	arachidonic acid metabolic process	BP
GO:0019835	0.002727764	8	10	cytolysis	BP
GO:0007507	0.003012913	65	150	heart development	BP
GO:0030539	0.003034805	9	12	male genitalia development	BP
GO:0008286	0.003844635	19	34	insulin receptor signaling pathway	BP
GO:0045171	0.004118489	24	46	intercellular bridge	CC
GO:0014069	0.004649462	41	89	postsynaptic density	CC
GO:0008585	0.005615842	12	19	female gonad development	BP
GO:0048009	0.005771475	6	7	insulin-like growth factor receptor signaling pathway	BP
GO:0043968	0.007032834	9	13	histone H2A acetylation	BP
GO:1902476	0.008269465	26	53	chloride transmembrane transport	BP
GO:0032147	0.008732735	19	36	activation of protein kinase activity	BP
GO:0007052	0.008738724	13	22	mitotic spindle organization	BP
GO:0030054	0.009294876	78	192	cell junction	CC
GO:0005768	0.009668248	60	143	endosome	CC

BP: Biological Process; CC: Cellular Components

1. Number of DEGs in category

2. Total number of category's genes in test

Selstam *et al.*,) و موش (Van der Huck *et al.*, 1995) گزارش شده است. این پروتئین‌ها در یکپارچگی ساختاری سلول‌ها، اتصال سلول به سلول، تمایز و تکثیر سلولی نقش دارند (Lung and Hitt, 1992).

مسیر intercellular bridge با تعداد ۲۴ ژن معنی‌دار از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با دوقلوژی شناسایی شد. این مسیر در هستی‌شناسی اجزای سلولی طبقه‌بندی می‌شود. پل‌های بین سلولی اولین بار طی فرآیند تخم‌ریزی مارمولک شناسایی شدند. زمانی که سلول‌های فولیکول کاملاً کوچک هستند، این پل‌ها ارتباط بین تخمک و سلول‌های فولیکول را برقرار می‌کنند. پیشنهاد شده که این پل‌ها مسیرهایی را فراهم می‌کنند که از راه آن‌ها، سلول‌های فولیکول ریبوزوم و برخی دیگر از مواد را به سلول تخمک منتقل می‌کنند (Andreuccetti *et al.*, 1978).

شاید بتوان مسیر cell junction که جزء آنتالوژی اجزای سلولی است را یکی از مهم‌ترین مسیرهای موثر بر فرآیندهای تخمدان معرفی کرد. این مسیر شامل اجزای سلولی است که یک ناحیه خاص اتصال را بین دو یا چند سلول یا بین سلول و ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کند. در این مسیر، پروتئین‌های واسطه جهت ارتباط دادن اسکلت سلولی یک سلول به اسکلت سلولی سلول مجاور یا یک پروتئین در ماتریکس خارج سلولی، از سطح غشای پلاسمایی گسترش می‌یابند. این مسیر درای چندین Chiled Term است که همه دارای عملکردهایی مهمی در فرآیندهای ارتباط و اتصال سلول‌ها به هم و یا به بافت پایه هستند. مسیر gap junction یکی از این مسیرها است. عمده پروتئین‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند پروتئین‌های Gap junction هستند که در این پژوهش، شش عدد از این پروتئین‌ها با نام‌های GJA4، GJA5، GJA9، GJA10، GJB4، GJB5 در این مسیر قرار گرفتند. این پروتئین‌ها با عنوان کانکسین (Connexin) نیز مشهور هستند. خانواده کانکسین شامل ۲۰ پروتئین هستند که با تشکیل کانال‌های بین سلولی، مسیری را جهت عبور متابولیت‌ها و مولکول‌های فرسته بین دو سلول فراهم می‌کنند. گزارش شده است که چندین پروتئین کانکسین جهت فرآیندهای تولیدمثلی تخمک ضروری هستند. تحقیقات انجام شده روی موش نشان می‌دهد که مواد مغذی (از جمله آمینو اسیدها و

است که در بکارگیری و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها و همچنین در تکثیر سلولی و رگزایی نقش دارد (Iwabe *et al.*, 1998). گزارش‌های متعددی در رابطه با تولید و وجود IL-8 در تخمدان موش (Ushigoe *et al.*, 2000)، خرگوش (Ujioka *et al.*, 1998a; Ujioka *et al.*, 1998b) و انسان (Runesson *et al.*, 1996; Runesson *et al.*, 2000) انجام شده است و نشان داده شده است که این سایتوکاین در تکامل فولیکولی، ساخت هورمون‌های استروئیدی، عملکرد جسم زرد، تخمک‌گذاری و کارایی IVF دخالت دارد.

مسیر cell adhesion مربوط به چسبندگی یک سلول به سلول دیگر یا به بافت پایه است. مسیر homophilic cell adhesion *via* plasma membrane adhesion molecules فقط مربوط به چسبندگی سلول‌ها به هم با استفاده از مولکول‌های چسبنده است. از ۲۳۲ ژن مسیر cell adhesion که در تجزیه وجود داشتند تعداد ۱۰۰ ژن معنی‌دار بودند که نشان‌دهنده فعالیت این مسیر در فرآیندهای تخمدان است. با توجه به این نکته که سلول تخمک به وسیله چندین لایه سلولی احاطه شده است، منطقی به نظر می‌رسد که مسیرهای سیگنال‌رسانی و ارتباطی بین تخمک و محیط پیرامون تاثیر زیادی بر رشد فولیکول و فرآیند تخمک‌گذاری داشته باشند. عمده ژن‌هایی که در این دو مسیر نقش دارند مربوط به ارتباط سلول به سلول هستند. در میان این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های آلفا و بتا خانواده catenin مانند CNTN4، CTNNA3 و CTNNB1، ژن‌های Protocadherin که جز خانواده بزرگ cadherin هستند مانند PCDH1، PCDHA2، PCDHB1 و ...، ژن‌های خانواده Cadherin مانند CDH8، CDH11، CDH15 و ... و تعداد زیادی از ژن‌های دیگر اشاره کرد. ژن‌های خانواده Cadherin گلیکوپروتئین‌هایی را کد می‌کنند که مسئول برقراری ارتباط سلول-سلول به واسطه یون کلسیم هستند.

مسیر cytoskeleton که جزء هستی‌شناسی اجزای سلولی است، از دیگر مسیرهای معنی‌دار در این پژوهش است که تعداد ۸۲ ژن از ۱۹۲ ژن این مسیر معنی‌دار بودند. مطالعات بسیاری نقش پروتئین‌های این مسیر را در عملکردهای فولیکول و تخمدان نشان دادند. بیان پروتئین‌های اسکلت سلولی در تخمدان چندین گونه شامل گوسفند (Marettova and Marett, 2002)، گاو

سرژ هورمون LH سبب ادامه میوز تخمک و تخمک‌گذاری در پستانداران می‌شود که این فرآیند طی رفع فرسته مهارکننده میوز که از راه CX43 از سلول‌های گرانولوزا به تخمک ارسال می‌شود انجام می‌گیرد. نشان داده شده است که ترشح LH سبب کاهش نفوذپذیری کانال CX43 و کاهش عبور فرسته توقف میوز شده که این امر به علت فسفوریلاسیون وابسته به MAPKs اسید آمینه‌های سرین ۲۵۵، ۲۶۲ و ۲۸۲/۲۷۹ پروتئین CX43 است (Norris *et al.*, 2008). مسیرهای دیگری که در این پژوهش معنی‌دار شدند به نحوی در فرآیندهای رشد و تکامل سلول تخمک تاثیر دارند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و سایر پژوهش‌های مرتبط انجام شده در نژاد گوسفند بلوچی و دیگر نژادهای گوسفند بومی ایران، واریانت‌های ژن‌های بزرگ اثر مرتبط با صفت دوقلوزایی و چندقلوزایی، که تاکنون در نژادهای غیر ایرانی کشف شده‌اند مانند GDF9، BMP15، B4GALNT2، BMP1B، در نژادهای ایرانی شناسایی نشده‌اند و احتمالاً ژن‌ها و مسیرهای زیستی دیگری در بروز این صفت نقش دارند. در این پژوهش، تعدادی از این ژن‌ها و مسیرها گزارش شده‌اند. مسیر defense response دارای نقش مهم و ثابت شده‌ای در فرآیند تخمک‌گذاری است. پروتئین‌های این مسیر با ایجاد فرآیندی مشابه به التهاب، سبب جدا شدن تخمک و برخی از سلول‌های اطراف آن از فولیکول بالغ می‌شوند. همچنین مسیرهای دیگری که عمدتاً در ارتباط با چسبندگی سلول‌ها و ارتباط بین سلول‌های فولیکول و تخمک بودند در این پژوهش معنی‌دار شدند که با توجه به وجود لایه‌های مختلف سلولی اطراف تخمک و لزوم انتقال مواد از این سلول‌ها به تخمک، معنی‌داری این مسیرها منطقی به نظر می‌رسد. مسیر cell junction به واسطه پروتئین‌های کانکسین دارای عملکرد گسترده در انتقال متابولیت‌ها و سیگنال‌ها از سلول‌های گرانولوزا به تخمک است. یکی از مهمترین عملکردهای این مسیر، انتقال اثر GDF9 به واسطه CX43 به سلول‌های گرانولوزا می‌باشد. نتیجه این پژوهش اولین گزارش از اثر غیر مستقیم GDF9 بر دوقلوزایی در گوسفندان ایرانی است.

گلوکز) برای حمایت از سوخت و ساز تخمک در حال رشد، یون‌ها برای تنظیم pH تخمک و cGMP مورد نیاز برای نگهداری و حفظ تخمک در حالت توقف میوزی، همه از سلول‌های گرانولوزا به واسطه کانال‌های ایجاد شده با پروتئین‌های کانکسین به تخمک منتقل می‌شوند. در زمان تخمک‌گذاری، کانال‌های ایجاد شده بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک کاهش می‌یابند که سبب کاهش cGMP در تخمک می‌شود و امکان ادامه فرآیند میوز فراهم می‌شود (Norris *et al.*, 2008, 2009; Santiquet *et al.*, 2013). هنگامی که ژن GJA4 که پروتئین کانکسین ۳۷ (CX37) را کد می‌کند حذف شود، کانال‌های بین تخمک و سلول‌های گرانولوزا نیز از بین می‌روند که تاثیرات منفی شدیدی بر تخمک دارد. در این حالت، رشد تخمک‌ها متوقف می‌شود بدون اینکه قابلیت شروع میوز را بدست آورده باشند و در نتیجه از بین می‌روند که به احتمال زیاد به علت از دست دادن ارتباط متابولیکی با سلول‌های گرانولوزا است (Simon *et al.*, 1997). همراه با از دست دادن تخمک، سلول‌های گرانولوزا شروع به لوتینیزاسیون زودرس می‌کنند. بنابراین ممکن است اتصالات کانال ایجاد شده با CX37 نه تنها متابولیت‌های مورد نیاز را از سلول‌های گرانولوزا به تخمک منتقل کند، بلکه یک یا چند فرسته از تخمک برای حفظ حالت تمایز سلول‌های گرانولوزا، از لوتینیزاسیون زودرس آنها قبل از تخمک‌گذاری جلوگیری می‌کند.

تخمک‌هایی که فاقد ژن GJA1 و در نتیجه CX43 هستند، از لحاظ تکامل ناقص هستند. آزمایش‌ها نشان داد که رشد ضعیف فولیکول‌های فاقد CX43 ناشی از عدم پاسخ‌گویی سلول‌های گرانولوزا به فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9) که به وسیله تخمدان و تخمک به صورت پاراکراین ترشح می‌شود است. GDF9 سبب رشد و تمایز سلول‌های گرانولوزا می‌شود (Gittens *et al.*, 2005). با توجه به عدم گزارش تاثیر مستقیم GDF9 در صفت دوقلوزایی گوسفندان ایرانی، به احتمال زیاد این گزارش، اولین گزارش درباره ساز و کار تاثیر غیرمستقیم GDF9 است که به واسطه شناسایی مسیر cell junction و ژن‌های Gap junction در این پژوهش گزارش می‌شود (Winterhager and Kidder (2015). (مطالعه شود).

فهرست منابع

- ادریس م. ع. و خسروی نیا ح. ۱۳۷۹. مقدمه‌ای بر اصلاح نژاد دام. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحات ۳۶-۱۱.
- اسکندری غ. و ایاران ع. ۱۳۸۹. بررسی چند شکلی ژن FecB در گوسفندان نژاد لری بختیاری با استفاده از تکنیک-PCR RFLP. چهارمین کنگره علوم دامی کشور. ۲۹ و ۳۰ شهریور، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج).
- امیری آ. ۱۳۸۵. شناسایی چندشکلی‌های موجود در ژن‌های FecB، BMP15 و GDF9 مرتبط با دوقلوزایی در گوسفند نژاد لری بختیاری. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
- خدابخش زاده ر.، محمدآبادی م. آ.، مرادی شهرابک ح.، و اسمعیلی زاده کشکوئیه ع. ۱۳۹۴. شناسایی جهش‌های موجود در نیمه اول (منتهی به ۵) اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی نژادهای رومانوف و لری بختیاری. تحقیقات تولیدات دامی، ۴(۴): ۱۵-۲۶.
- زارع ن.، نجاتی جوارمی ا.، صادقی م.، و میراب زاده اردکانی ع. ۱۳۸۹. بررسی چند شکلی در ژن BMPR-1B مرتبط با چندقلوزایی در گوسفندان نژاد قزل به روش PCR-RFLP. چهارمین کنگره علوم دامی کشور. ۲۹ و ۳۰ شهریور، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج).
- سلیمانی ق. ۱۳۸۷. بررسی چندشکلی ژن‌های BMP15، FecB و GDF9 در گوسفند نژاد سنجایی با استفاده از روش PBR و SSCP. پایان نامه دوره دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
- شیخلو م. ر.، طهمورث پور م.، و اسلمی نژاد ع. ا. ۱۳۹۰. بررسی همخونی گوسفندان بلوچی ایستگاه اصلاح نژاد عباس آباد مشهد. پژوهش‌های علوم دامی ایران، ۳(۴): ۴۵۳-۴۵۸.
- ضمیری م. ج. ۱۳۸۵. فیزیولوژی تولید مثل. انتشارات حق شناس. صفحه ۱۱۱.
- علی نقی زاده ر.، محمد آبادی م. ر.، و زکی زاده س. ۱۳۹۸. چند شکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز سرخ جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲(۱): ۶۹-۸۰.
- Abdalla E. A., Penagaricano F., Byrem T. M., Weigel K. A. and 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.
- Abdoli R., Ziaeddin- Mirhoseini S., Ghavi Hossein-Zadeh N. and Zamani P. 2018a. Screening for causative mutations of major prolificacy genes in Iranian fat-tailed sheep. *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(1): 51-55.
- Abdoli R., Ziaeddin- Mirhoseini S., Ghavi Hossein-Zadeh N., Zamani P. and Gondro C. 2018b. Genome-wide association study to identify genomic regions affecting prolificacy in Lori-Bakhtiari sheep. *Animal Genetics*, 49(5): 488-491.
- Achour L., Labbe-Jullie C., Scott M. G. and Marullo S. 2008. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10): 528-535.
- Agarwal A., Gupta S. and Sharma. R. K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, 3(1): 28.
- Andreuccetti P., Taddei C. and Filosa S. 1978. Intercellular bridges between follicle cells and oocyte during the differentiation of follicular epithelium in *Lacerta sicula* Raf. *Journal of Cell Science*, 33: 341-350.
- Aulchenko Y. S., Ripke S., Isaacs A. and Van-Duijn C. M. 2007. GenABEL: an R package for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*, 23(10): 1294-1296.
- Bacich D. J., Rohan R. M., Norman R. J. and Rodgers R. J. 1994. Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. *Endocrinology*, 135: 735-744.
- Behrens R., Nolting A., Reimann F., Schwarz M., Waldschutz R. and Pongs O. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Letters*, 474(1): 99-106.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. and Stryer L. 2012. *Biochemistry* (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company press.
- Bogan R. L., Murphy M. J., Stouffer R. L. and Hennebold J. D. 2008. Prostaglandin synthesis, metabolism, and signaling potential in the rhesus macaque corpus luteum throughout the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology*, 149: 5861-5871.
- Brannstrom M. and Norman R. J. 1993. Involvement of leucocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reproduction*, 8(10): 1762-1775.

- Bukulmez O. and Arici A. 2000. Leucocytes in ovarian function. *Human Reproduction Update*, 6(1): 1-15.
- Calder M. D., Caveney A. N., Westhusin M. E. and Watson A. J. 2001. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biology of Reproduction*, 65(1): 135-140.
- Clutton-Brock T. and Sheldon B. C. 2010. Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 562-573.
- Coleman R. A., Smith W. L. and Narumiya S. 1994. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews*, 46(1): 205-229.
- Contet C., Gouling S. P., Kuljis D. A. and Barth A. L. 2016. BK channels in the central nervous system. In *International review of neurobiology*, 128: 281-342.
- Coonrod S., Vitale A., Duan C., Bristol-Gould S., Herr J. and Goldberg E. 2006. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Andrology*, 27(4): 502-509.
- Davis B. J., Lennard D. E., Lee C. A., Tiano H. F., Morham S. G., Wetsel W. C. and Langenbach R. 1999. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1. *Endocrinology*, 140: 2685-2695.
- de Mola J. R., Goldfarb J. M., Hecht B. R., Babbo C. J., Baumgardner G. P. and Friedlander M. A. 1998. Gonadotropins Induce the Release of Interleukin-1 β , Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α from the human preovulatory follicle. *American Journal of Reproductive Immunology*, 39(6): 387-390.
- Drouilhet L., Mansanet C., Sarry J., Tabet K., Bardou P., Woloszyn F., Lluch J., Harichaux G., Viguie C., Monniaux D., Bodin L., Mulsant P. and Fabre S. 2013. The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the B4GALNT2 gene within the ovary. *PLOS Genetics*, 9(9): e1003809.
- Duffy D. M. and Stouffer R. L. 2001. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 7(8): 731-739.
- Duffy D. M. and Stouffer R. L. 2002. Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Human Reproduction*, 17(11): 2825-2831.
- Durinck S., Spellman P., Birney E. and Huber W. 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4: 1184-1191.
- Espey L. L. and Richards J. S. 2006. *Ovulation*. Academic Press, Elsevier.
- Everse J. and Kaplan N. O. 1973. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (1th Ed.), Lactate dehydrogenases: structure and function. New York: An interscience publication. Pp. 61-133.
- Fabre S., Pierre A., Mulsant P., Bodin L., Di Pasquale E., Persani L., Monget P. and Monniaux D. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 4(1): 20.
- Fogarty N. M. 1995. Genetic parameters for live weight, fat and muscle measurements, wool production and reproduction in sheep: a review. *Animal Breeding*, 63(3): 101-143.
- Forges T., Monnier-Barbarino P., Alberto J. M., Gueant-Rodriguez R. M., Daval J. L. and Gueant J. L. 2007. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction Update*, 13(3): 225-238.
- Gholizadeh M., Rahimi-Mianji G., Nejati-Javaremi A., De Koning D. J. and Jonas E. 2014. Genome wide association study to detect QTL for twinning rate in Baluchi sheep. *Journal of Genetics*, 93: 489-493.
- Gilmour A. R., Gogle B. J., Cullis B. R. and Thompson R. 2009. *ASREML User Guide Release 3.0*. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK.
- Gittens J. E. I. and Kidder G. M. 2005. Differential contributions of connexin 37 and connexin 43 to oogenesis revealed in chimeric reaggreated mouse ovaries. *Journal of Cell Science*, 118(21): 5071-5078.
- Gmyrek G. B., Sozanski R., Jerzak M., Chrobak A., Wickiewicz D., Skupnik A., Sieradzka U., Fortuna W., Gabrys M. and Chelmonska-Soyta A. 2005. Evaluation of monocyte chemotactic protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 122(2): 199-205.
- Goldberg E. 1975. Lactate dehydrogenase-X from mouse testes and spermatozoa. *Methods in Enzymology*, 41: 318-323.
- Goldberg E. 1985. Reproductive implications of LDH-C4 and other testis-specific isozymes. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 2(2): 120-124.

- Harris S. M., Aschenbach L. C., Skinner S. M., Dozier B. L. and Duffy D. M. 2011. Prostaglandin E2 receptors are differentially expressed in subpopulations of granulosa cells from primate periovulatory follicles. *Biology of Reproduction*, 85(5): 916-923.
- Henry Davis G. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37(1): 11.
- Hirschhorn J. N. and Daly M. J. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews in Genetics*, 6(2): 95-108.
- Hizaki H., Segi E. and Sugimoto Y. 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18): 10501-10506.
- Hussein M. R. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11: 162-77.
- Iwabe T., Harada T., Tsudo T., Tanikawa M., Oonohara Y. and Terakawa N. 1998. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 69(5): 924-930.
- Kobayashi T. and Narumiya S. 2002. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins and other lipid mediators*, 68: 557-573.
- Kobe B. and Kajava A. V. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6): 725-732.
- Li J., Liu J., Campanile G., Plastow G., Zhang C., Wang Z., Cassandro M., Gasparini B., Salzano A., Hua G., Liang A. and Yang L. 2018. Novel insights into the genetic basis of buffalo reproductive performance. *BMC Genomics*, 19: 814.
- Long J. C. and Caceres J. F. 2009. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical Journal*, 417(1): 15-27.
- Luna E. J. and Hitt A. L. 1992. Cytoskeleton-Plasma membrane interactions. *Science*, 258: 955-963.
- Marettova E. and Marett M. 2002. Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. *Acta Histochem*, 104: 431-434.
- Markosyan N. and Duffy D. M. 2009. Prostaglandin E2 acts via multiple receptors to regulate plasminogen-dependent proteolysis in the primate periovulatory follicle. *Endocrinology*, 150: 435-444.
- Mohammadabadi M. R. 2017. Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture*, 7: 1117-1121.
- Mooney M. A. and Wilmot B. 2015. Gene Set Analysis: A Step-By-Step Guide. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 168(7): 517-527.
- Murdoch W. J., Hansen T. R. and McPherson L. A. 1993. A review—role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins*, 46: 85-115.
- Nguyen M., Camenisch T. and Snouwaert J. N. 1997. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature*, 390: 78-81.
- Norris R. P., Freudzon M., Mehlmann L. M., Cowan A. E., Simon A. M., Paul D. L., Lampe P. D. and Jaffe L. A. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, 135: 3229-3238.
- Norris R. P., Ratzan W. J., Freudzon M., Mehlmann L. M., Krall J., Movsesian M. A., Wang H., Ke H., Nikolaev V. O. and Jaffe L. A. 2009. CyclicGMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136: 1869-1878.
- Parent A., Roy S. J., Iorio-Morin C., Lepine M. C., Labrecque P., Gallant M. A., Slipetz D. and Parent J. L. 2010. ANKRD13C acts as a molecular chaperone for G protein-coupled receptors. *The journal of Biological Chemistry*, 285(52): 40838-40851.
- Penagaricano F., Weigel K. A., Rosa G. J. M. and Khatib H. 2013. Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Frontiers in Genetics*, 3: 307.
- Peters M. W., Pursley J. R. and Smith G. W. 2004. Inhibition of intrafollicular PGE2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. *Journal of Animal Science*, 82(6): 1656-1662.
- Pramod R. K., Sharma S. K., Kumar R. and Rajan A. 2013. Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*, 6(11): 833.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A. R., Bender D., Maller J., Sklar P., De Bakker P. I., Daly M. J. and Sham P. C. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3): 559-575.
- Regan S. L., McFarlane J. R., O'Shea T., Andronicos N., Arfuso F., Dharmarajan A. and Almabbobi G. 2015. Flow cytometric analysis of FSHR, BMRR1B, LHR and apoptosis in granulosa cells and ovulation rate in Merino sheep. *Reproduction*, 150: 151-63.
- Richards J. A. S. 2007. Genetics of ovulation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25(4): 235-242

- Roller R. J., Kinloch R. A., Hiraoka B. Y., Li S. S. and Wassarman P. M. 1989. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development*, 106: 251-261.
- Ronnegard L., McFarlane S., Husby A., Kawakami T., Ellegren H. and Qvarnstrom A. 2016. Increasing the power of genome wide association studies in natural populations using repeated measures – evaluation and implementation. *Methods in Ecology and Evolution*, 7: 792-799.
- Runesson E., Bostrom E. K., Janson P. O. and Brannstrom M. 1996. The human preovulatory follicle is a source of the chemotactic cytokine interleukin-8. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 2(4): 245-250.
- Runesson E., Ivarsson K., Janson P. O. and Brannstrom M. 2000. Gonadotropin-and cytokine-regulated expression of the chemokine interleukin-8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(11): 4387-4395.
- Russell D. L. and Robker R. L. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 13: 289-312.
- Salkoff L., Butler A., Ferreira G., Santi C. and Wei A. 2006. A: High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature Reviews in Neuroscience*, 7(12): 921-931.
- Santiquet N. W., Develle Y., Laroche A., Robert C. and Richard F. J. 2012. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biology of Reproduction*, 87(5): 46-51.
- Santiquet N., Robert C. and Richard F. J. 2013. The dynamics of connexin expression, degradation and localisation are regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PLoS ONE*, 8: 68456.
- Sargolzaei M., Iwaisaki H. and Colleau J. J. 2006. CFC: A tool for monitoring genetic diversity. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 13-18 August, Brasil. Pp. 13-8
- Segi E., Sugimoto Y. and Yamasaki A. 1998. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(1): 7-12.
- Selstam G., Nilsson I. and Mattson M. O. 1993. Changes in the ovarian intermediate filament desmin during the luteal phase of the adult pseudopregnant rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 147(1): 123-129.
- Serdynska Szuster M., Jedrzejczak P., Ewa Ozegowska K., Hołysz H., Pawelczyk L., and Piotr Jagodzinski P. 2016. Effect of growth differentiation factor--9 C447T and G546A polymorphisms on the outcomes of in vitro fertilization. *Molecular Medicine Reports*, 13: 4437-4442.
- Simon A. M., Goodenough D. A., Li E. and Paul D. L. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385: 525-529.
- Sirois J. 1994. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles *in vivo*. *Endocrinology*, 135: 841-848.
- Sirois J. and Dore M. 1997. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology*, 138: 4427-4434.
- Smolikova K., Mlynarcikova A. and Scsukova S. 2012. Role of interleukins in the regulation of ovarian functions. *Endocrine Regulations*, 46(4): 237-253.
- Steebhorn C., Clausen T., Sondermann P., Jacob U., Worbs M., Marinkovic S., Huber R. and Wahl M. C. 1999. Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18): 12675-1284.
- Sun Q., Collins R., Huang S., Holmberg-Schiavone L., Anand G. S., Tan C. H., van-den-Berg S., Deng L. W., Moore P. K., Karlberg T. and Sivaraman J. 2009. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5): 3076-3085.
- Szymanski W. and Kazdepka-Zieminska A. 2003. Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. *Ginekologia Polska*, 74(10): 1392-1396.
- Takehara Y., Dharmarajan A., Kaufman G. and Wallach E. 1997. Effect of interleukin-1 β on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology*, 134: 1788-1793.
- Tamura T. and Picciano M. F. 2006. Folate and human reproduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5): 993-1016.
- Thaler C. D. and Epel D. 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Current Pharmaceutical Design*, 9(5): 399-409.
- Thierry-Mieg D. and Thierry-Mieg J. 2006. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biology*, 7(1): 12.
- Tsai S. J., Wiltbank M. C. and Bodensteiner K. J. 1996. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 α receptor in bovine preovulatory follicles. *Endocrinology*, 137: 3348-3355.

- Ujioka T., Matsukawa A., Tanaka N., Matsuura K., Yoshinaga M. and Okamura H. 1998. Analysis of the cytokine interaction among interleukin-1 beta, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in the rabbit ovulatory process. *Fertility and Sterility*, 70: 759-765.
- Ujioka T., Matsukawa A., Tanaka N., Matsuura K., Yoshinaga M. and Okamura H. 1998. Interleukin-8 as an essential factor in the human chorionic gonadotropin-induced rabbit ovulatory process: interleukin-8 induces neutrophil accumulation and activation in ovulation. *Biology of Reproduction*, 58(2): 526-530.
- Ushigoe K., Irahara M., Fukumochi M., Kamada M and Aono T. 2000. Production and regulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat ovulation. *Biology of Reproduction*, 63(1):121-126.
- Ushikubi F., Segi E. and Sugimoto Y. 1998. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395: 281-284.
- Van der Huck R., Dijkstra G., Vanmil F. N., Hulshof S. C. and Van den Ingh S. G. 1995. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 459-467.
- Vatankhah M., Talebi M. and Edriss M. 2008. Estimation of genetic parameters for reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research*, 74: 216-220.
- Wang L. H., Zhang W., Gao Q. X. and Wang F. 2012. Expression of the luteinizing hormone receptor (LHR) gene in ovine non-gonadal tissues during estrous cycle. *Genetics and Molecular Research*, 11: 3766-3780.
- Wang M., Guo Z. and Wang S. 2013. The effect of certain conditions in the regulation of cystathionine γ -lyase by exogenous hydrogen sulfide in mammalian cells. *Biochemical Genetics*, 51(7-8): 503-513.
- Wang R. 2010. Toxic Gas, Lifesaver. *Scientific American*, 302(3): 66-71.
- Wheat T. E. and Goldberg E. 1977. An allelic variant of the sperm-specific lactate dehydrogenase C4 (LDH-X) isozyme in humans. *Journal of Experimental Zoology*, 202(3): 425-430.
- Wigglesworth K., Lee K. B., O'Brien M. J., Peng J., Matzuk M. M. and Eppig J. J. 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39): 3723-3729.
- Winterhager E. and Kidder G. M. 2015. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update*, 21(3): 340-352.
- Wong W. Y. and Richards J. S. 1991. Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. *Molecular Endocrinology*, 5(9): 1269-1279.
- Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A. K., Mu W., Zhang S., Snyder S. H. and Wang R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 322: 587-590.
- Young M. D., Wakefield M. J., Smyth G. K. and Oshlack A. 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2): 14.
- Zamani P., Akhondi M. and Mohammadabadi M. R. 2015. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*, 132: 123-127.



Research paper

Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and biological pathways associated with twinning in Baluchi sheep

S. M. Esmaili fard¹, S. H. Hafezian^{2*}, M. Gholizadeh³, R. Abdolahi Arpanahi⁴

1. Ph.D Student, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
2. Associate Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3. Assistant Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
4. Assistant Professor, University of Tehran, Pardis Aboreyhan, Tehran, Iran

(Received: 12-12-2018 – Accepted: 22-01-2019)

Abstract

Baluchi sheep is one of the indigenous sheep breeds originating from the eastern part of Iran and it is adapted to the severe weather conditions. The economic efficiency of sheep breeding is clearly related to the reproduction efficiency of the ewes. In this study, twinning trait was studied as an important reproductive trait. To identify the genes associated with twinning trait, genome-wide association was done using 91 Baluchi ewes genotyped with 50k Illumina SNP chips. For this purpose, the extended repeatability model was used. In the next step, a gene set enrichment analysis was implemented to identify the biological pathways associated with the twinning. Six SNP markers on chromosomes 1, 3, 10, 15 and 25 located in CTH, ANKRD13C, SRSF11, PTGER3, LDHB, LRRC40, and KCNMA1 genes were identified. According to pathway analysis, 25 pathways were associated with the twinning trait. Among those pathways, the defense response biological pathway has an important role in the ovulation. Interferons and interleukins are the main cytokine proteins in this pathway. These cytokines create a process such as inflammation that causes oocytes release from the follicle into the oviduct for transport and fertilization. Cell adhesion and intercellular bridge pathways were other significant pathways. Cell junction pathway *via* the CX43 protein can affect the transfer of GDF9 effects to granulosa cells. To the best of our knowledge, this is the first study that reports indirect effects of GDF9 on twinning trait in Iranian sheep.

Keywords: Twinning, Baluchi sheep, SNP, GSEA-SNP, GWAS

*Corresponding author: h.hafezian1955@gmail.com