

## דו"ח מדעי מסכם - פברואר 2023, מספר הצעה 362-0583

מוגש למועצת החלב ע"י דר' מורן גרשוני, המכון לחקר בעלי חיים, מכון וולקני.

### נושא העבודה: זיהוי שינויים גנטיים המעורבים בפוריות נמוכה בפרים

#### תקציר

פוריות הנה תכונה חשובה המשפיעה על מדדים יצרניים כגון ייצור חלב, ובעקבות כך השפעה משמעותית על כלכלת הענף. בניגוד לפוריות בנות הפר, פוריות הפר (הזכר), שלו חלק חשוב בהצלחה הרבייתית, אינה נבררת וכיום חסרים כלים המסוגלים לנבא את פוריות הפר לאורך חייו. יתרה מכך, מכיוון שבפועל כל הפרות עוברות הזרעה על ידי מספר מצומצם של פרים, פוריות כל פר עשויה להיות בעלת משקל גבוה לכלל העדר.

מטרת עבודה זו הנה פיתוח גישה לזיהוי גורמים גנטיים המשפיעים על פוריות הפר ע"י שימוש בטכנולוגיות אפיון תפקודי זרמה וטכנולוגיות ריצוף מתקדמות. כדי להשיג מטרה זו, זיהינו קבוצות משפחתיות של פרים ע"פ דמיון גנומי, המראים ירידה מובהקת בפוריות. לאחר מכן הקמנו מערכת כימות של מספר מדדים פיזיולוגיים של הזרמה במטרה לאפיין פתולוגיות הקשורות בפריון נמוך ומשותפות לכל הפרים מאותו אשכול משפחתי. בהמשך ביססנו פרוטוקול למיצוי דנ"א מתאי זרע והקמנו מערכת חישובית לניתוח גנומים מלאים מבקר לחלב. בנוסף, הקמנו מאגר שונות גנומית של אוכלוסיות בקר מרחבי העולם לצורך פרוש ממצאים גנומיים בפרי ההולשטיין. לבסוף, השלמנו ריצוף גנומי מלא של פרי ביקורת וכן של משפחת פרים עם ירידה מובהקת בפוריות על רקע עליה בייצור רדיקלים חופשיים שהודגמה בכל פרי המשפחה. הניתוח הגנומי הצביע על פולימורפיזם בגן AHR כגורם גנטי המסביר את הירידה בפוריות ואת הממצאים הפתולוגיים בזרמת הפרים באותו אשכול משפחתי. לאחר אשרור, ממצא זה הינו מועמד לפיתוח סמן שיאפשר ברירה גנומית לשיפור הפוריות בעדר.

#### מבוא

בבקר, לפוריות השפעה רבה על יעילות הייצור. זאת מכיוון שהמלטה מהווה טריגר ראשוני לייצור חלב, ומחזורי התחלובה תלויים ביכולת הפרה להתעבר, לשאת הריון, ולבסוף לעבור המלטה. הצלחה רבייתית מושפעת ממשתנים רבים, ותלויה ביכולת של שני המינים (זכר ונקבה) לייצר את תאי המין ומערכות הרבייה. למרות שמדדי פוריות הפרות הוכנסו לאינדקס הטיפוח, לא הושג שיפור משמעותי במדדי הפוריות בעדר החלב הישראלי. יתרה מכך, שכיחות גבוהה של תת-פוריות ועקרות דווחו במיני בעלי חיים רבים, כולל באדם. בשנים האחרונות הראנו כי, בין היתר, השכיחות הגבוהה של בעיות פוריות נובעת מכך שמאות גנים אשר חיוניים לפוריות פעילים רק בזכרים או רק בנקבות<sup>1</sup>. משום כך, סלקציה על גנים אלו לא מתקיימת בחצי מהאוכלוסייה, מה שמאפשר למוטציות מזיקות להתפשט באוכלוסייה<sup>2</sup>.

בזמן שמדדי פוריות הפרות (נקבות) הוכנסו למדדי הטיפוח, ישנה התייחסות פחותה לפוריות הזכר, למרות שלאחרונים תרומה חשובה לפוריות העדר. ע"פ נתוני שירות המידע הבריטי למחלות בע"ח (NADIS) מעל 20% מהפרים מראים תת-פוריות. בפועל, מניתוח נתוני דו"ח ג'ורג שהופקו ע"י שיאון, כשליש מפרי השירות מציגים שיעורי התעברות הנמוכים מ-30%. מכיוון שפוריות הזכר לא נלקחת בחשבון באומדן הטיפוח, חלק מהפרים בעלי הפוריות הנמוכה ביותר מבצעים את מספר ההזרעות הגבוה ביותר (פרים אלו מציגים אומדנים גבוהים עבור תכונות ייצור, למשל).

מכיוון שטיפוח תלוי מאוד במידת התורשתיות של התכונה הרצויה, הרי שריבוי הגנים והספציפיות למין, הופכים טיפוח פוריות למאתגר במיוחד. על מנת להגדיל את ההיתכנות לזיהוי שינויים גנטיים הגורמים לתת-פוריות הצענו לבצע ריצוף גנומי מלאים לעשרות פרים שיבחרו ע"פ אומדנים פיזיולוגיים מדייקים של הזרמה (פגיעה באקרוזום,

שלמות דנ"א וכיו"ב) והשתייכות לאותם קווים משפחתיים המציגים פוריות נמוכה. ריצוף גנום מלא מאפשר בחינת הספקטרום המלא של השונות גנטית בכל רחבי הגנום, למשל באזורים רגולטורים וגנים ל RNA - לא מקודד, זיהוי הכפלות והחסרים גדולים, וכן שינויים כרומוזומליים מבניים. ניתוח גנומים מלאים דורש תשתית חישובית ביואינפורמטית יעודית והקמת מערכי ומאגרי מידע שיאפשרו פרשנות של השינויים המאותרים. ככל הידוע לנו, תשתית כזו לא הייתה קיימת עבור מחקר בבקר בישראל בתחילת המחקר.

## מטרות המחקר

מטרת המחקר הנה פתוח גישה מותאמת להטרוגניות הרחבה של תכונת פוריות הזכר, כדי למצוא גנים ושינויים גנטיים המשפיעים על פוריות הפר.

## מטרות ספציפיות:

1. ניתוח שיוך משפחתי מבוסס גנוטיפ של פרים המציגים ירידה מובהקת בשעורי ההתעברות.
2. ניתוח מדויק של תפקודי הזרמה והזרע במשפחות פרים בהם נצפתה ירידה בפוריות לצורך איתור פתולוגיה משותפת.
3. הקמת תשתית חישובית, ביואינפורמטית ומערכי מידע לניתוח גנומים מלאים, איתור שונות גנטית, ופרשנותה בבקר לחלב.
4. ריצוף וניתוח הגנום המלא של משפחות פרים המציגים ירידה בפוריות לצד פתולוגית זרמה משותפת למציאת גורמים גנטיים המסבירים את הפתולוגיה שנצפתה.

## שיטות עבודה

### ניתוח שיוך משפחתי

נתוני פוריות הפרים בין השנים 2012-2018 התקבלו משיאון. נתוני שבב עבור 1750 פרי שירות התקבלו מהתאחדות מגדלי הבקר וכללו כ- 50 אלף סמנים. מתוך כלל הסמנים, נבחרו סמנים בהם יש כיסוי (קריאה) בלפחות 90% מהפרים. סה"כ נותרו כ- 41 אלף סמנים. קבצי הגנוטיפים הוכנו תוך שימוש בתכנה <sup>3</sup>PLINK והקרבה המשפחתית ע"פ דימיון גנטי חושבה עבור כל צמדי הפרים באמצעות התכנה <sup>4</sup>KING. קיבוץ פרים ע"פ קרבה משפחתית בוצע ע"י חבילת HCLUST R.

### איפיון תפקודי ואיכות הזרע והזרמה

איכות הזרע הוערכה על ידי שימוש בערכות לשימוש במכשיר (IMV Technologies, L'Aigle) Flow Citometry, צרפת). הפרמטרים הבאים הוערכו: שלמות הממברנה הציטופלזמטית, פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריאלית (MMP), שלמות הממברנה האקרוזומלית, תגובה לעקה חמצונית, שלמות ה-DNA כפי שתואר על ידי<sup>5</sup>. עבור כל פר נדגמו שלוש קשיות מהקפצות שונות.

### הכנת דגימת זרע

קשיות זרמת פרים הופשרו באמבט מחומם ל 37 מעלות והועברו למבחנות. לזרמה הוסף בופר NKM ( 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MOPS [3-N-morpholino propanesulfonic acid; pH 7.4]). לאחר שטיפות, דגימות הזרע הושרו בכדי לאפשר swim-up למשך 30 דק'. בסיומם נאספו התאים משכבת הנוזל העליונה.

ניתוח תפקודי הזרע בוצע ע"י הצביעות הבאות:

שלמות הממברנה הציטופלסמטית של הזרע: Propidium iodide (PI) and SYBR-14  
שלמות ממברנת האקרזום: fluorescein isothiocyanate - peanut agglutinin (FITC-PNA)

פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריאלית: הצבען הקטיוני JC-1

ייצור רדיקלים חופשיים (ROS): עקה כימצונית הושרתה ע"י H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROS הוערכו באמצעות הצבען 2',7'-  
dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)

פרגמנטציה דנ"א: הצבען acridine orange (AO)

הפקת דנ"א לריצוף: זרע הופק מקשיות הפרים ודנ"א בודד וחולץ באמצעות Genomic Mini AX Swab & Semen Spin kit לאחר הוספת DTT בכדי להפטר מחלבוני הפרוטמינים העוטפים את הדנ"א בתאי הזרע.

### ריצוף גנומים מלאים

דנ"א שהופק מתאי הזרע רוצף על גבי מכונות Illumina HiSeq X Ten platform בכיסוי כולל של 90Gb לדוגמה ובממוצע כיסוי 30X לכל בסיס בגנום. תוצאות הריצוף נותחו כפי שמפורט במאמרנו<sup>6</sup>, תוצר עבודה זו, ומפורט בהמשך כחלק מתשתית הניתוח הגנומי שהקמנו.

### הקמת מאגר לשונות גנומית בבקר לחלב

קבצי Fastq המכילים קריאות קצרות מפרוייקטים שונים של ריצוף גנומים של בקר הורדו מארכיון ה-SRA משרת NCBI, מאגר זמין לציבור של נתוני רצף גולמיים (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>). השתמשנו ברצפים אלו בכדי לבנות מסד נתונים של השונות הגנטית של גנום הבקר. בסך הכל, נותח רצף הגנום של כ-300 דגימות בקר, כפי שמפורט ב<sup>6</sup>.

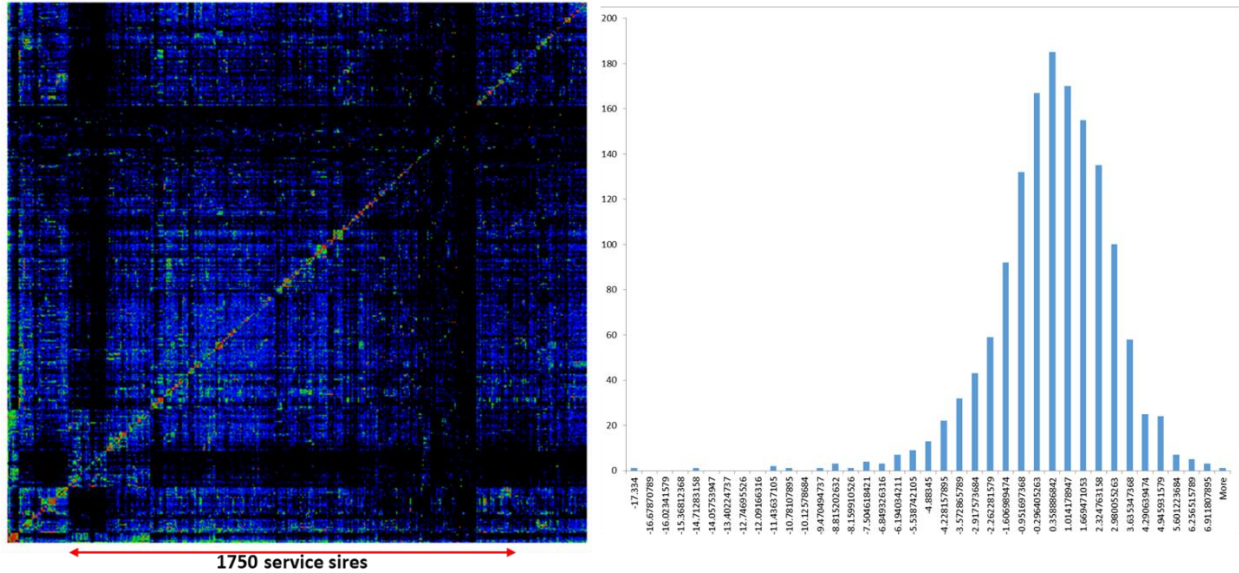
### ניתוח ביטוי גנטי בתאי זרע

כדי לזהות וריאציות גנטיות שכנראה קשורות לתפקוד הזרע, השתמשנו בנתוני ביטוי של 44,000 גנים אנושיים, כולל גנים מקודדי RNA, מ-53 רקמות בכדי לקבוע את ספציפיות הביטוי שלהם ברקמת אשך ותאי זרע. ערך ה-r-score שחושב עבור כלל הגנים, מייצג את סגוליות הביטוי באשך, כאשר 1 מציין ביטוי בלעדי בתאי אשך, כפי שתואר קודם לכן<sup>1</sup>.

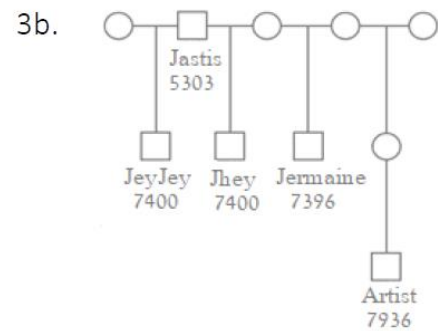
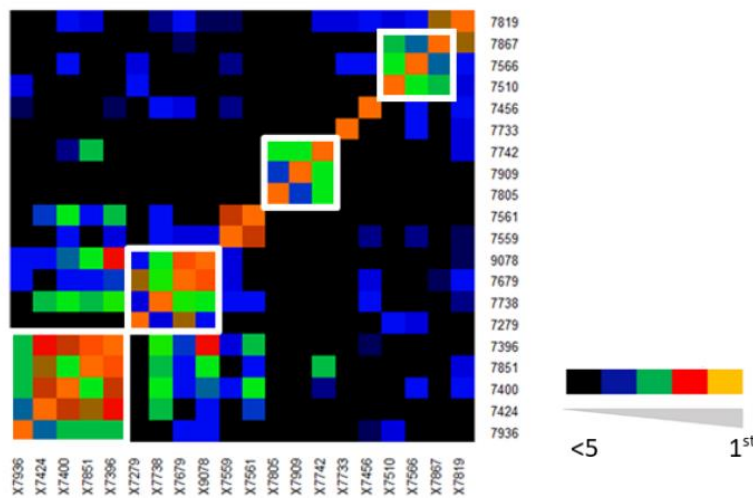
### **תוצאות**

#### קיבוץ פרים עם פוריות מופחתת ע"פ שיוך משפחתי (מטרה 1)

רישומי שיעור ההתעברות 2012-2018 התקבלו מספר העדר הישראלי. ניתוח סטטיסטי של הרישומים העלה 20 פרי שירות שחרגו באופן מובהק מהתפלגות שיעור ההתעברות באוכלוסייה (טבלה 1, איור 1), 16 מהם הראו פוריות נמוכה. כדי לזהות אשכולות משפחתיים מתוך האוכלוסייה הראשונית, יצרנו תחילה מטריצת קרבה מבוססת גנוטיפ עבור כל 1750 הפרים, תוך שימוש ב-41,000 סמנים גנטיים (איור 1). ממטריצה זו, חילצנו את ערכי הקרבה של 20 פרי השירות שנמצאו עם פוריות מופחתת, כדי לייצר את מטריצת הקרבה של אוכלוסיית המחקר (טבלה 1). מצאנו כי 16 הפרים בעלי פוריות מופחתת קשורים בעיקר לארבע שושלות משפחתיות (איור 2).



**איור 1. מטריצת הייחוסים המשפחתיים המחושבת מנתונים גנוטיפיים.** פאנל ימין, התפלגות נתוני פוריות הפרים בעדר הישראלי המחושבת כאפקט אחוז ההתעברות. ציר ה-X מצוין את האפקט המחושב וציר ה-Y את תדירות הפרים. פאנל שמאל, מטריצת הייחוסים המשפחתיים מוצגת כמפת חום. הצירים הם פרי העדר, כאשר שדות מפת החום מייצגים את דרגת הקרבה המשפחתית (כתום קרבה ראשונה, כחול קרבה רחוקה, ושחור ללא קרבה מחושבת) בין כל זוג פרים. מקבצי שדות מדגימים מבנה משפחתי של מספר פרים.



**איור 2. ניתוח מבנה משפחתי ע"פ נתוני גנוטיפ, בקרב 20 פרים המציגים אחוז התעברות עם סטייה מובהקת מהמוצע.** משמאל מטריצת הייחוסים המשפחתיים. בצירים מספרי הפרים. שדות מפת החום מציגים את דרגת הקרבה בין כל זוג פרים ע"פ המקרא, דרגה קרבה ראשונה עד חמישית. במסגרות לבנות מסומנים מקבצי פרים בעלי קשרים משפחתיים קרובים (מבנים משפחתיים). מימין פיצוח אילן היוחסין של אשכול משפחתי לדוגמה.

טבלה מספר 1. נתוני הפוריות ושייכות משפחתית בפרים עם שיעורי התעברות חורגים במובהק מהמוצע.

Bulls Name	Cluster	Insemination count	Conception rate(%)	Effect
jhey	family 4	7710	25.67	-9.1
jey-jey		30,789	30.88	-1.51
artist		2241	21.33	-4.23
jermin		35,091	25.14	-9.05
garden		9920	39.8	3.21
stajer	family 3	2047	34.49	-5.31
start		27,134	26.76	-10.36
atav		2157	29.9	-5.54
sted		9536	26.13	-3.78
doots	family 2	3063	30.36	-5.23
donny		2567	23.26	-15.45
daso		2063	30.93	-4.41
buffon	family 1	52,308	34.24	1.3
silon		662	35.2	-7.09
slugy		2492	16.49	-7.8
patit		7618	27.53	-2.91
macro	unrelated	63,119	33.64	1.96
massage		14,761	24.23	-4.75
iser		46,392	35.89	1.38
wisdum		8099	27.52	-0.21

#### ניתוח מדייק של תפקודי זרע (מטרה 2)

לאחר שזיהינו פרים בעלי פוריות מופחתת, המשכנו לניתוח מעמיק של הפיזיולוגיה של תאי הזרע של 16 פרים המציגים ירידה בשיעורי התעברות. ההנחה היא כי פרים מאותה ששושלת המציגים ירידה בשיעור ההתעברות ומבטאים פתולוגיית זרמה דומה, חולקים את אותה אטיולוגיה גנטית המסבירה את התצפית. דגימות זרע מ-16 פרים עם פוריות מופחתת, וכן מ-6 עד 17 פרי ביקורת שנבחרו באקראי (מציגים שיעורי התעברות בטווח הנורמה), עברו הערכת תפקודי זרמה באמצעות סמנים פלורסנטים וניתוח ציטומטריית זרימה.

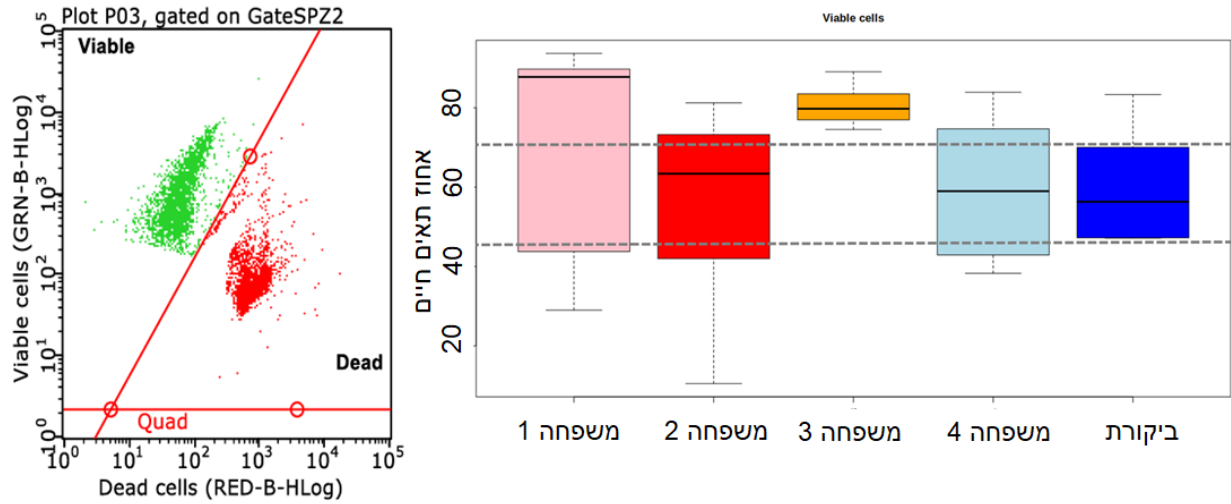
#### שלמות הממברנה הציטופלסמטית של תאי הזרע בזרמה.

שלמות הממברנת הציטופלסמטית של תאי הזרע חיונית לפעילות הזרע וליכולת ההפריה. כדי להעריך את שלמות הממברנה, השתמשנו בצבען PI ו-SYBR-14. SYBR-14 צובע רק תאי זרע שאינם תנועתיים וממברנת התא מופרעת, בעוד ש-PI צובע גרעינים של תאים חיים, השומרים על קרום שלם. עבור כל פר שנבדק, מדדנו את מספר התאים החיוניים (קרום פלזמה שלם) ואת מספר התאים המתים בדגימות בקשיות משלושה מירוקים שונים. התפלגות המדדים מוצגת באיור 3. הזרמה מהפרים של משפחה 3 הראו אחוז גבוה מובהק של תאים חיים בזרמה ( $P < 0.01$ ; Mann-Whitney two sides test).

#### שלמות ממברנת האקרזום

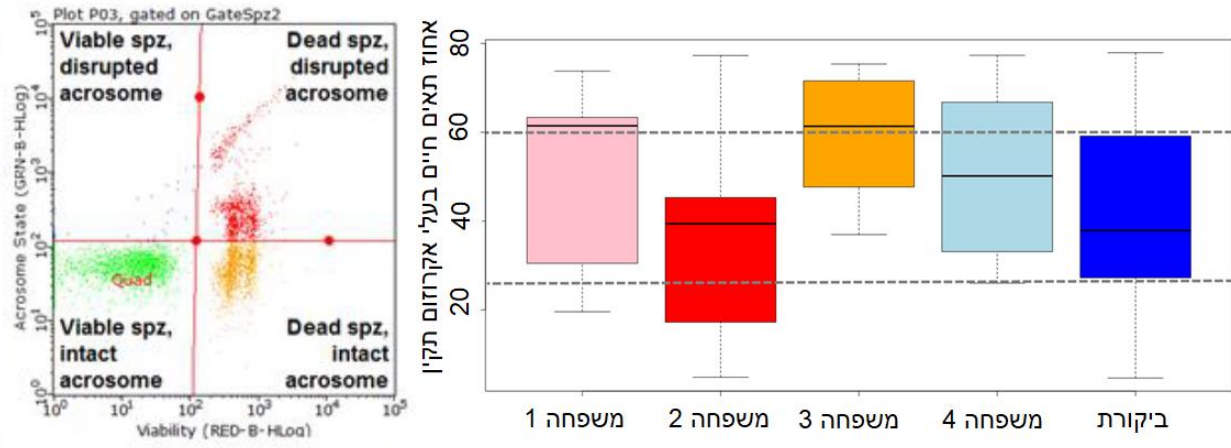
תהליך שפעול האקרזום נדרש בכדי לאפשר את חדירת הזרע לתוך ה-הביצית במהלך ההפריה. שיפעול מוקדם של האקרזום יגרום לאובדן יכולת ההפריה של תא הזרע. כדי לבחון האם שפעול מוקדם של תאי זרע בזרמה

הוא גורם לירידה בפוריות, ניתחנו את שלמות ממברנת האקרזום על ידי ביצוע צביעת PI ו-PNA. FITC-PNA. יכנס לתוך שלפוחית האקרזום רק אם ממברנת האקרזום פגועה.



**איור 3. הערכת חיות התאים בזרמה ע"פ השתייכות משפחתית.** משמאל גרף מייצג של ניתוח ציטומטרי של חיות התאים בזרמה, כאשר נקודות ירוקות מייצגות תאים חיים בעלי ממברנה ציטופלסמטית תקינה. מימין, בוקס-פלוט המתאר את התפלגות אחוז התאים החיים שהתקבלו מבדיקת זרמה משלושה מירוקים שונים מכל אחד מבני המשפחה. בכחול קבוצת הביקורת (6 פרים, סה"כ 18 מירוקים). הקו המקווקו מצוין את טווח הנורמה שנקבע כטווח 95% מהתפלגות הביקורת.

באמצעות ניתוח ציטומטרי של זרמה שטופלה בצבען, חישבנו את אחוז התאים החיים להם ממברנת אקרזום שלימה, כלומר האקרזום לא עבר עדיין שפעול והוא מסוגל להפרות את הביצית (איור 4). לא נמצאו הבדלים בין זרמת הפרים הנבדקים לפרי הביקורת.

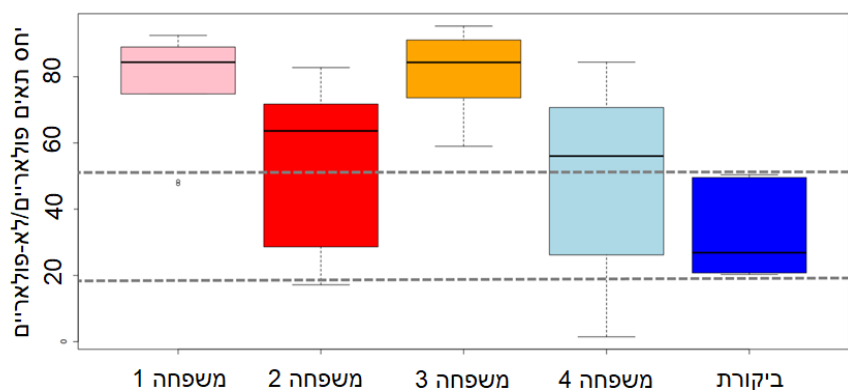
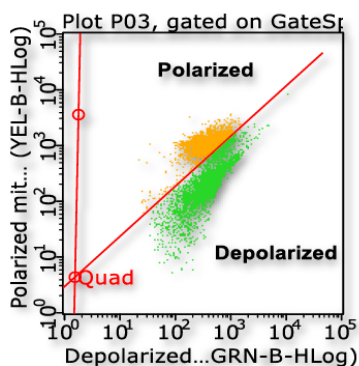


**איור 4. הערכת שלמות ממברנת האקרזום בזרמה ע"פ השתייכות משפחתית.** משמאל גרף מייצג של ניתוח ציטומטרי של שלמות ממברנת אקרזום, כאשר קו האורך מפריד בין תאים מתים לחיים וקו הרחב מפריד בין ממברנה שלימה (תחתון) למופרעת (עליון). מימין, בוקס-פלוט המתאר את התפלגות אחוז התאים החיים עם ממברנה תקינה מסך התאים החיים, שהתקבלו מבדיקת זרמה משלושה מירוקים שונים מכל אחד מבני

המשפחה. בכחול קבוצת הביקורת ( 6 פרים, סה"כ 18 מירוקים). הקו המקווקו מציין את טווח הנורמה שנקבע כטווח 95% מהתפלגות הביקורת. לא נמצאו הבדלים בין זרמות פרי הביקורת לפרים הנבחים.

### פוטנציאל הממברנה המיטוכונדראלית (MMP)

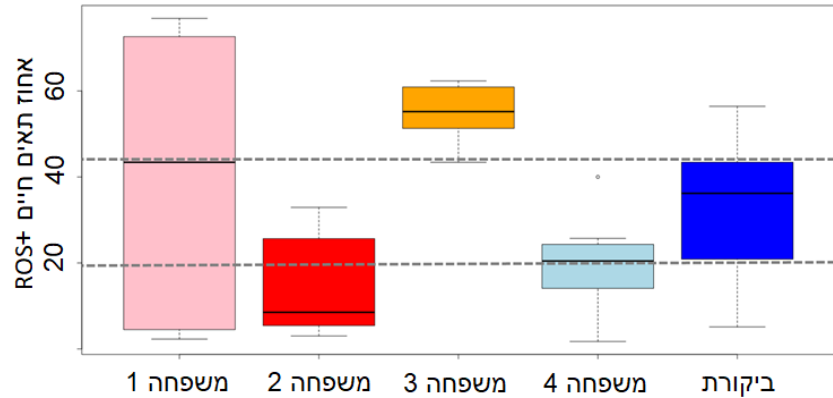
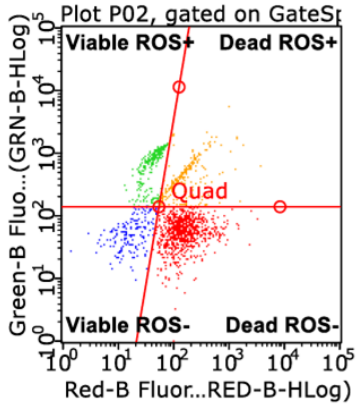
ה-MMP הוא אינדיקטור מרכזי לפעילות המיטוכונדריה, ספקית האנרגיה העיקרית של תא הזרע החשובה לצורך פעילות ותנועתיות הזרע. הצבען JC-1 שימש כאינדיקטור לסטטוס MMP של הזרע. באמצעות ניתוח ציטומטריית זרימה, חישבנו את היחס בין תאים המציגים MMP גבוה לנמוך בכל אחת מדגימות הזרמה (איור 5). ניתוח זה העלה שבזרמות הפרים במשפחות 1 ו-3 יחס עודף לתאים בעלי MMP גבוה, כלומר סטטוס אנרגטי חיובי ( $P < 0.01$ ; Mann-Whitney two sides test).



**איור 5. הערכת פוטנציאל הממברנה המיטוכונדראלית (MMP) בזרמה ע"פ השתייכות משפחתית.** משמאל גרף מייצג של ניתוח ציטומטרי של MMP בזרמה, כאשר קו האלכסון מפריד בין תאים פולאריים (חצי עליון) לתאים לא פולאריים (חצי תחתון). מימין, בוקס-פלוט המתאר את התפלגות יחס התאים הפולאריים/לא-פולאריים בכל זרמה מכל אחד מבני המשפחה. בכחול קבוצת הביקורת ( 17 פרים, סה"כ 51 מירוקים). הקו המקווקו מציין את טווח הנורמה שנקבע כטווח 95% מהתפלגות הביקורת. נמצא יחס גבוה מובהק של MMP במשפחות 1 ו-3. ( $p < 0.01$ )

### ייצור רדיקלים חופשיים (ROS) בתגובה לעקה חמצונית.

בתאי זרע רמות גבוהות של ROS הנגרמות בין היתר כתוצאה מחשיפה לעקה חמצונית או עקת חום, עלולות לפגוע בממברנת התא, בדנ"א הגרעיני או המיטוכונדריאלי ולהביא לירידה ביכולת ההפריה של תאי הזרע. להערכת ייצור ROS בתאי זרע בעקבות השראת עקה חמצונית ( $H_2O_2$ ) השתמשנו ב-  $H_2ADFC$  שכאשר עובר חימצון ע"י מולקולות ROS מאפשר זיהוי פלורסנטי. באמצעות ציטומטריית זרימה, כימתנו את מספר התאים החיים עם ייצור גבוה של ROS (איור 6). ניתוח זה העלה כי לכל הזרמות שנבדקו במשפחה 3 ייצור ROS הינו גבוה במובהק מקבוצת הביקורת ( $P = 0.008$ ; Mann-Whitney two sides test). לממצא זה עלולה להיות משמעות פתולוגית.



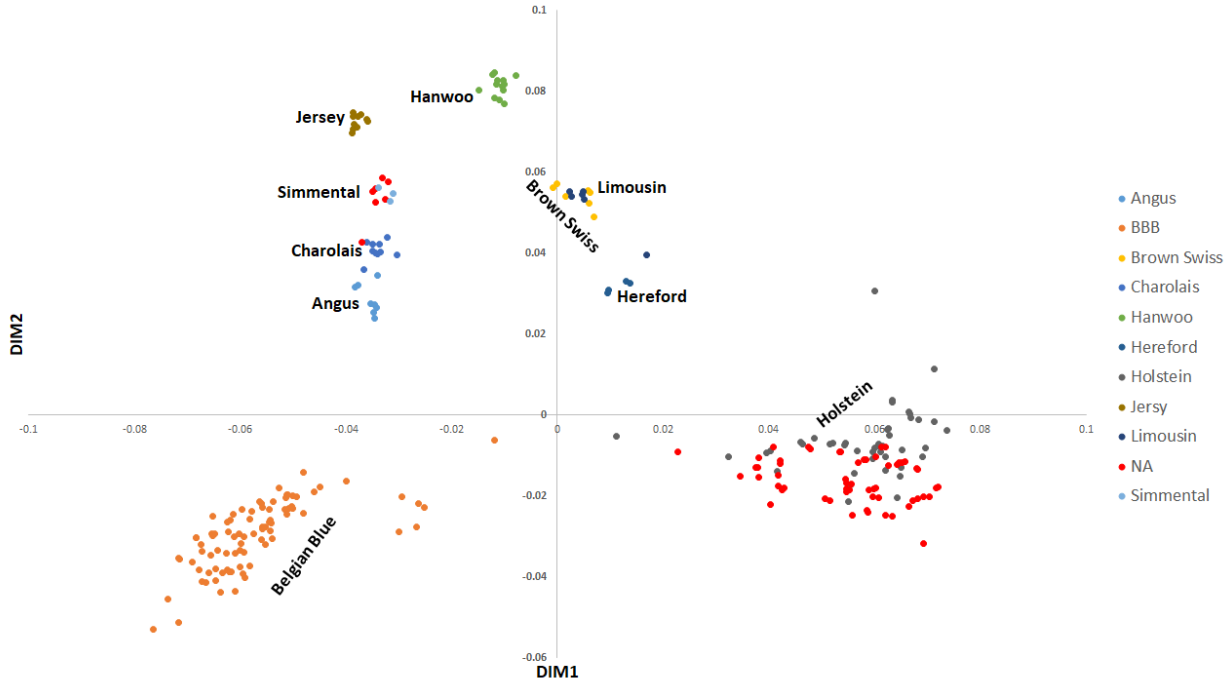
**איור 6. ניתוח ייצור ROS בזרמה לאחר חשיפה לעקה חמצונית.** משמאל גרף מייצג של ניתוח ציטומטרי של ניתוח של תאים מייצרי ROS בזרמה, כאשר קו האלכסון מפריד בין תאים חיים למתים, וקו הרוחב מפריד בין תאים חיוביים ל ROS (חצי עליון) לתאים שליליים ל ROS (חצי תחתון). מימין, בוקס-פלוט המתאר את התפלגות אחוז התאים החיים החיוביים ל ROS בכל זרמה מכל אחד מבני המשפחה. בבחול קבוצת הביקורת (17 פרים, סה"כ 51 מירוקים). הקו המקווקו מציין את טווח הנורמה שנקבע כטווח 95% מהתפלגות הביקורת. נמצא אחוז גבוה מובהק של ROS ( $p = 0.008$ ) במשפחה 3.

לסיכום חלק זה, מתוך המטרה השניה של עבודה זו, מצאנו משפחה אחת בה כל הפרים המציגים ירידה בפוריות, מציגים גם ייצור מוגבר של ROS, ממצא בעל משמעות פתולוגית ולכן מצביע על חשד לאטיולוגיה גנטית משותפת ומצדיק בירור באמצעות אנליזה גנומית.

#### הקמת תשתית חישובית ניתוח גנומי מלאים בבקר לחלב (מטרה 3).

עד כה וכחלק מהצעת המחקר, הקמנו תשתית חישובית וביואינפורמטית- הכוללת חומרה ותשתית אחסון מידע של עשרות TB, עם יכולת עיבוד מידע מתאימים (RAM ומעבדים). בנינו מאגרי מידע רלוונטיים לניתוח גנום הפרה הכולל ניתוח שונות גנומית שערכנו בקרב 300 פרים ופרות שרצפי הגנום שלהם הופקדו במאגרים ציבוריים. באמצעות בניית הגנומים של הדוגמאות זיהינו את הגזעים של כל הדוגמאות (איור 7). כלי זה מאפשר לנו למעשה לזהות גזעים של בקר מדוגמאות דנ"א ואף למצוא קשרים משפחתיים או עדריים. המאגר מאפשר לנו פרשנות רחבה לכל וריאנט גנטי שנמצא בריצוף גנומי של פרים ופרות ישראלים, והתקבל לאחרונה לפרסום<sup>6</sup>. זהו מאגר השונות הגנטית מריצוף עמוק של גנומים של פרה הראשון הפתוח לציבור למיטב ידיעתנו. בנוסף, בנינו את כלל הכלים המאפשרים לנו חיזוי אפקטים פונקציונליים של שינויים גנטיים, המהווים בסיס לניתוח ואנוטציה של הממצאים הגנטיים. כמו כן, כתבנו קוד לתוכניות המאפשרות לנו כיום אוטומציה גבוהה של תהליכי העיבוד והניתוח. למיטב ידיעתנו, זוהי המערכת הראשונה והיחידה בארץ המאפשרת ניתוח גנומים מלאים מבקר והיא זמינה לציבור ב- <https://github.com/morangershoni/BovEx>.



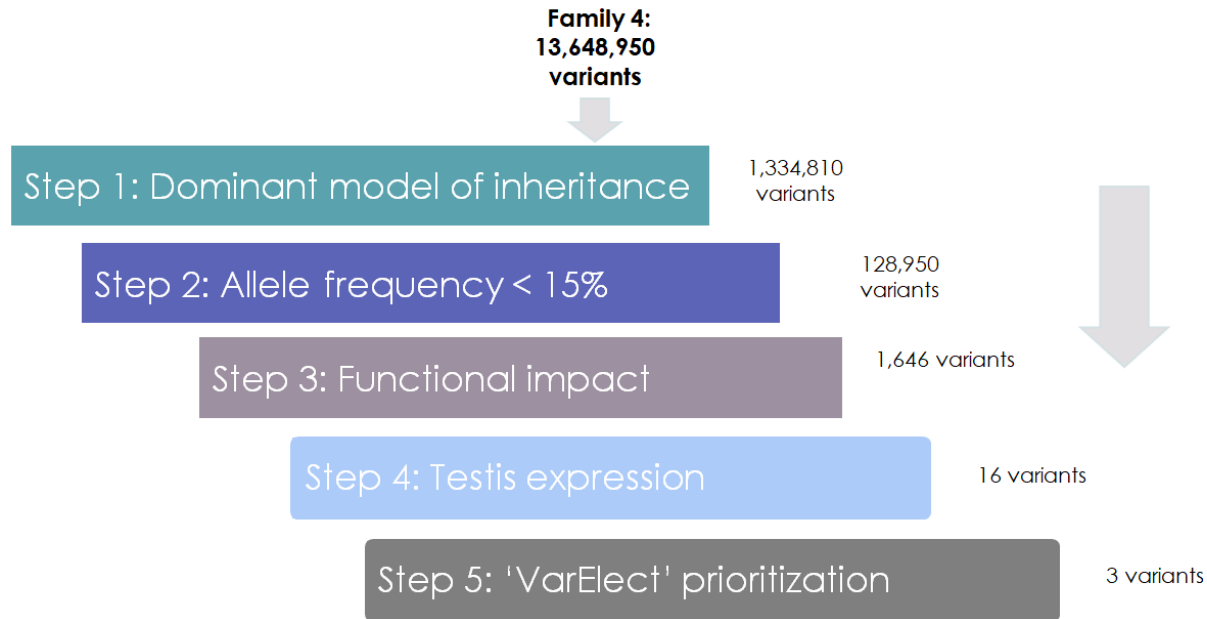


**איור 7. מבנה אוכלוסיות הבקר במאגר הגנטי שבנינו (ExAgBov).** כל נקודה מייצגת פר/ה שעבר ריצוף גנומי. הגזעים נמצאו ע"פ הניתוח הגנטי שביצענו לכלל האוכלוסייה. במאגר 20 מיליון ווריאנטים גנטיים מעשרה גזעי בקר. לכל ווריאנט אנוטציה רחבה הכוללת את מיקומו הגנומי, השפעתו על פעילות הגנים ותדירותו באוכלוסייה.

אנליזה גנומית לזיהוי גורמים גנטיים המשפיעים על ייצור גבוה של ROS במשפחה 3 (מטרה 4).

בעקבות תוצאות ניתוח הזרמה נבחרו 4 פרים ממשפחה 3, וכמו כן 8 פרים נוספים המציגים פוריות בטווח הנורמה כביקורת, לאנליזת גנום מלא.

בשלב זה סיימנו ניתוח גנומים מלאים במשפחה 3 (טבלה 1) בה מצאנו ירידה מובהקת בייצור ROS, ובשמונת פרי הביקורת. לאחר ריצוף ובניית הגנום של כל הפרים, זיהינו בסה"כ מעל 13 מיליון שינויים גנטיים ב 12 הפרים (בייחס לגנום הייחוס של הפרה). באמצעות הכלים שפיתחנו התחלנו תהליך סינון של השוניות הגנטיות ע"פ קריטריונים כפי שמתואר באיור 8. שלבים אלו הצביעו על 3 חשודים. ניתוח ביואינפורמטי מעמיק הצביע על מועמד אחד (טבלה 2, מובלט בצהוב), בגן AHR. AHR הינו פקטור שעתוק המאפשר הסתגלות תאים לשינויים במטבוליזם התאי וכן לשינויים שמקורם מהסביבה החיצונית. בדומה לממצאים שלנו, פולימורפיזם ב-AHR בבני אדם נמצא קשור לפגיעה בפוריות זכרים (בבני אדם ובעכברים) עקב עקה חמצונית ועליה בייצור ROS בזרמה<sup>7</sup>. לכן, מוצע כי לאחר אימות, אלל AHR יכול לשמש כסמן לפוריות הפרים ויהווה כלי לבדיקה גנומית.



### איור 8. שלבי סינון ע"פ קריטריונים של וריאנטים גנטיים.

**טבלה 2. וריאנטים גנטיים חשודים במשפחה 3.** הוריאנט החשוד נמצא בגן AHR מובלט בצהוב. תדירות הוריאנט באוכלוסיות בקר נאמדה ב 2.5% והוא לא זוהה ב 13 פרים נוספים מחוץ למשפחה שעברו ריצוף גנומי מלא.

CHROM	POS	REF	ALT	Consequence	IMPACT	Symbol	AA	SIFT	AF	Matched Phenotypes	Score
4	25851940	C	T	missense_variant	MODERATE	AHR	A>V	-0.55	0.025	sperm, oxidation, fertility, ROS	12.29
8	94696012	G	A	splice_region_variant&intron_variant	LOW	ABCA1			0.035	oxidation, fertility, ROS	10.01
10	1191682	C	T	missense_variant	MODERATE	APC	C>Y	0	0.019	sperm, oxidation, fertility, ROS	7.51
8	80873738	C	T	splice_region_variant&intron_variant	LOW	DAPK1			0.089	oxidation, fertility, ROS	6.06
1	157758838	C	T	missense_variant	MODERATE	AKR1C4	P>L	-0.39	0.045	oxidation, ROS	5.68

### סיכום ומסקנות

בעבודה זו הדגמנו כי שילוב של ניתוח פנוטיפי מדייק ביחד עם התייחסות לאשכולות משפחתיים מגדיל את הסיכוי לאיתור גורמים גנטיים המשפיעים ישירות על תכונה, גם כשהיא נחשבת למורכבת, כמו פוריות. פיתוח התשתית החישובית ובניית מאגרי המידע קידמו את יכולת ניתוח הגנומים המלאים, כאשר השאיפה היא המשך פיתוח תוך צמצום פערים מהתשתית הקיימת כיום עבור אנליזות גנום אנושי. אשורר הווריאנט בגן AHR עשוי להוסיף כלי לברירה גנומית, בעיקר בשושלות בעלות ערך גנטי גבוה המציגות ירידה בפוריות ונשאות לאלל.

ממצאים אלו מסוכמים היום לכדי מאמר מדעי (בהכנה), בנוסף למאמר שפורסם, והוצגו לאחרונה בכנס מדעי הבקר ( דצמ' 2022) ובכנס החברה האמריקאית למדעי החלב (ADSA). בהמשך יוצגו המסקנות לגורמים הרלוונטיים בהתאחדות ובשיאון.

1. Gershoni M, Pietrokovski S. Reduced selection and accumulation of deleterious mutations in genes exclusively expressed in men. *Nat Commun.* 2014;5. doi:10.1038/ncomms5438
2. Gershoni M, Pietrokovski S. The landscape of sex-differential transcriptome and its consequent selection in human adults. *BMC Biol.* 2017;15(1). doi:10.1186/s12915-017-0352-z
3. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-575. doi:10.1086/519795
4. Altshuler DL, Durbin RM, Abecasis GR, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061-1073. doi:10.1038/nature09534
5. Komsky-Elbaz A, Kalo D, Roth Z. Effect of aflatoxin B1 on bovine spermatozoa's proteome and embryo's transcriptome. *Reproduction.* 2020;160(5):709-723. doi:10.1530/REP-20-0286
6. Raz R, Roth Z, Gershoni M. ExAgBov: A public database of annotated variations from hundreds of bovine whole-exome sequencing samples. *Sci Data.* 2022;9(1):1-8. doi:10.1038/s41597-022-01597-8
7. Mostafa T, Fouad H, Nabil N, et al. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) rs2066853 gene polymorphism association with infertile oligoasthenoteratozoospermic men and seminal oxidative stress. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(9):8297-8301. doi:10.1007/s11356-017-8519-2