

פיתוח גישה לזיהוי שינויים גנטיים המעורבים בפוריות נמוכה בפרים על ידי ניתוח מאפייני זרמה ושיוך

משפחתי

רותם וינברגר^{1,2}, טניה קוגן³, דורית קלו², אליסה קומסקי-אלבז², צבי רוט² ומורן גרשוני^{1*}

¹המכון לחקר בעלי חיים, מרכז וולקני; ²הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים; ³שיאון-חברה להזרעה מלאכותית בע"מ

רקע- טיפוח חיות משק באמצעות הכלאות ברניות הוביל לשיפור משמעותי בתכונות בעלות זיקה כלכלית, כמו ייצור חלב בבקר. עם זאת, במספר תכונות חשובות, ביניהן פוריות, לא ניכר שיפור משמעותי. בין השאר, הסיבה לכך היא כי פוריות הינה תכונה מורכבת ומושפעת ממספר משתנים גנטיים וסביבתיים, ולכן קשה לברייה באסטרטגיית טיפוח פשוטה. בנוסף, כיום אינדקס הטיפוח אינו כולל את אומדן ההורשה של פוריות הפר (הזכר) אלא רק את פוריות בנות הפר. מאידך, מערך ההזרעות במשק הבקר מבוסס על מספר קטן של פרים המזריעים את כל הפרות בעדר, ולכן משקלו של פר יחיד גדול. כיום, פוריות בבקר נמדדת על פי אחוז ההתעברות, כלומר, אחוז ההריונות שאובחנו מסך כל ההזרעות שבוצעו. על פי דו"ח ג'ורג', המופק על ידי התאחדות מגדלי הבקר וחברת "שיאון" 70% מפרי השירות מוגדרים כבעלי אחוזי יכולת לעבר נמוכים מ-40%. אחוז התעברות נמוך יכול להיות תוצאה של גורמים רבים, בהם גנטיים וסביבתיים. כלומר, אוכלוסיית הפרים המציגים אחוז התעברות נמוך היא למעשה אוסף רב של קבוצות עם אטיולוגיות גנטיות שונות, מה שמקשה על זיהוי אותם גורמים.

הנחת המחקר: כדי להגדיל את ההיתכנות לזיהוי שינויים גנטיים המעורבים בתת-פוריות, יש לצמצם את ההטרוגניות הגנטית והפנוטיפית של קבוצת המחקר. על מנת לבחון את הנחת המחקר פיתחנו גישה המשלבת ניתוח עמוק של פזיולוגיית הזרמה, לצד ניתוח שושלתי ורחב גנומי ומתבססת על קיבוץ פרים בשתי פעימות: קיבוץ אוכלוסיית פרים בעלי אחוזי התעברות נמוכים לאשכולות, על פי שיוך משפחתי המבוסס על נתוני שבב הכולל מערך סמנים בצפיפות גבוהה. קיבוץ פרים בכל אשכול על פי מאפיינים מדויקים של פיזיולוגיית הזרמה המצביעים על איכות תאי הזרע תוך שימוש בטכנולוגיית flow cytometry. ניתוח גנומי מלאים לכל תת אוכלוסייה - פרים מאותו ייחוס משפחתי ואותה הפרעה תפקודית של תאי הזרע ינותחו כקבוצה המועשרת באותה אטיולוגיה גנטית באמצעות פיתוח כלים חישוביים ביואינפורמטיים יעודים.

מהלך העבודה: בשלב הראשון איתרנו פרים בעלי נתוני פוריות נמוכים מובהקים מתוך דו"ח ג'ורג', וכן פרים בעלי נתוני פוריות תקינה. מטריצת הייחוסים משפחתיים עבור 1750 פרים חושבה ע"פ נתוני הגנוטיפ שנקבע באמצעות 40 אלף סמנים גנטיים, כאשר עבור כל זוג פרים נקבעה דרגת הקרבה המשפחתית שהיא נגזרת של מקטעים גנומיים אותם משתפים שני הפרטים. ע"י קיבוץ היררכי של כל זוגות הפרים, יצרנו אשכולות משפחתיים בהם נבדקו העשרה של תכונות תת-פוריות. לאחר מכן, ביצענו ניתוח רחב היקף של מאפייני זרמה של אותם פרים, באמצעות סמנים פלורסנטיים שנאמדו במכשיר Flow cytometry נבחנו פרמטרים המנבאים את יכולת ההפריה ופוטנציאל פוריות של תאי זרע לאחר הקפאה. המדדים שנבחנו היו: שלמות ותקינות ממברנה התא - מדד המהווה אינדיקציה של חיות התאים ופוטנציאל הפרייה; פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה- מדד זה מהווה אינדיקציה לפעילות המיטוכונדריה וכושר ניצול האנרגיה בתא, מרכיב הכרחי לתנועתיות תא הזרע; שלמות ותקינות ממברנת האקרזום- ריאקציית האקרזום הנה שלב מקדים הנחוץ לצורך חדירת מעטפת הביצית והפרייה; בחינת התמודדות התאים עם עקה חמצונית - נמדד ע"י כמות צורני-חמצן-פעילים (ROS) שנוצרו, לאחר השראת עקה חמצונית; כימות נזקי דנ"א- מדד זה מהווה אינדיקציה לשלמות הדנ"א בתאים.

לאחר הניתוח הפיזיולוגי של פעילות הזרמה, הפקנו דנ"א מתאי הזרע של הפרים שהציגו פנוטיפ דומה, וביצענו עבורם ריצוף גנומי מלא על ידי שימוש בטכנולוגיית NGS וביססנו פרוטוקול ניתוח חישובי ומאגרי נתונים בכדי לאתר שינויים גנטיים המשפיעים על פוריות הזכר ע"פ הפתולוגיות שזיהינו בניתוח הזרמה.

תוצאות ומסקנות: ראשית, בהסתמך על נתוני פוריות הפרים ומטריצת ייחוסים משפחתיים, זיהינו 20 פרים בעלי נתוני פוריות נמוכים מובהקים סטטיסטית, 16 מהם התקבצו ל-4 מבנים משפחתיים. ממצאים אלו

תומכים במעורבות של גורם גנטי בפוריות הנמוכה. בהמשך, כדי לבחון את הדמיון בפתו-פיזיולוגיה של הירידה בפוריות בכל מבנה משפחתי, ביצענו ניתוח עמוק של מאפייני הזרמה. איתרנו משפחה אחת בה נמצאה עליה מובהקת בייצור ROS כתגובה לחשיפה לעקה חמצונית. לפיכך הנחנו כי במשפחה זו נוכחות גורם גנטי משותף המעורב בירידה בפוריות על רקע תגובה לא תקינה לעקה חמצונית. ביצענו ריצוף גנומי מלא לפרי משפחה זו ובנוסף, לארבע פרי ביקורת מאותה משפחה וממשפחות אחרות להם מדדי פוריות תקינים. בניתוח חישובי וביואינפורמטי של נתוני הרצף הגנומי נמצא פולימורפיזם בתדירות נמוכה הגורם לשינוי מבנה החלבון תוצר הגן AHR. עבודות שונות שבחנו בעבר באדם ובעכבר את פעילות הגן, הראו כי שינויים בחלבון קשורים בירידה בפוריות הזכר על רקע עקה חמצונית וייצור עודף של ROS, בדומה לממצאים במשפחה שנבחנה בעבודה זו.

לסיכום- זיהינו שינוי בגן AHR אשר בסבירות גבוהה גורם לירידה בפוריות הזכרית על רקע תגובה לקויה של תאי הזרע לעקה חמצונית. לאחר ואלידציות נוספות של הממצא, גילוי זה יאפשר סלקציה של צאצאים בשושלת הפרים שאינם נושאים את הווריאנט הגנטי. תוצאות אלו מדגימות את יעילות הגישה באיתור גורמים גנטיים המשפיעים על ירידה בפוריות הזכרית.