DOI: 10.22092/vj.2019.126019.1575
شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

واکاوی پروفایل بیان ریز *RNA* در غدد پستانی گاو به منظور شناسایی مسیرهای زیستی دخیل در تولید شیر

•**سعیده اسکندری نسب**
ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
•**محمدرضا بحرینی بهزادی**
ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
• **زهرا رودباری (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۳-۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۵-۰۱
Emali: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

چکیده

هدف علم اصلاح نژاد بهبود ژنتیکی صفات تولیدی است که تأثیر شگرفی بر سودآوری واحدهای دامپروری دارند. یکی از این صفات تولید شیر است که شیر علاوه بر اینکه غذای کاملی است منبع تأمین پروتئین و کلسیم در تغذیه انسان به شمار می‌رود. یک راهکار مناسب برا ی بهبود این صفت شناسایی ریزRNAهایی است که بر تولید و ترکیب شیر تأثیرگذار هستند. ریزRNAها قطعات تک رشته‌ای و کوتاه RNA با طولی حدود ۲۲ نوکلئوتید هستند که در تمام سلول‌ها و مایعات بدن مثل خون و شیر حضور دارند. در این مطالعه برای بررسی چگونگی اثر ریزRNA بر فرآیند تولید شیر داده‌های پروفایل بیان ریزRNA مربوط به بافت پستانی گاو از پایگاه داده ArrayExpress استخراج گردید. با نرم‌افزار GEO2R آنالیز بیان داده‌ها انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار miRwalk و targetscan ژن‌های هدف ریزRNAها شناسایی شدند. بعد از شناسایی ژن‌های هدف از نرم‌افزار DAVID جهت انجام واکاوی هستی‌شناسی و شناسایی مسیرهای متابولیکی مرتبط با ژن‌های هدف استفاده شد. در نهایت رسم شبکه ژن‌های هدف و واکاوی شبکه ژنی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. در این مطالعه ۱۸ ریزRNA دارای fold change بالاتر از ۲ بوده و ۵ ریز RNA دارای fold change کمتر از ۲ شناسایی شد که کنترل‌کننده بیان ۹۳۶ ژن هدف می‌باشند. مهم‌ترین مسیرهای شناخته شده موثر بر فرآیند تولید شیر که ژن‌های شناسایی شده فوق در تنظیم فعالیت آن‌ها دخالت دارند عبارتند از مسیرهای سیگنالینگ: *PI3k-Akt*، *mTOR*، *MAPK*، *WNT*، *TGFB*، انسولین و پرولاکتین. نتایج این بررسی می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک ارتباط ژن‌های مؤثر و عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها در فرآیند تولید شیر را فراهم آورد.

کلمات کلیدی: ریز RNA، سیستم بیولوژیکی، شبکه ژنی، گاو شیری

Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 49-58

Analysis of The Expression Profile of micro-RNA in Cattle Mammary Glands to Identify The Biological Pathways Involved in The Milk Production

By: Eskandarynasab, S., Animal Breeding and Genetics, Yasoug University. Bahreini Behzadi, M,R., Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Yasoug University. and Roudbari, Z., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft.

Received: 2019-05-26 Accepted: 2019-07-23

Emali: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

The aim of animal breeding is the genetic improvement of traits that have a significant effect on the profitability of livestock units. One of these productive traits is milk production, in which milk and its products are sources of protein and calcium in human nutrition. An appropriate solution for improving these traits is the identification of micro-RNAs that affect milk production and its compounds. Micro RNA is a single stranded and short-chain RNA that has a length of about 22 nucleotides and is present in all cells and body fluids such as blood and milk. In this study, a micro RNA expression profile from the ArrayExpress database was used to study the effect of micro-RNA on the production of milk by samples of bovine mammary tissue. microRNA expression analysis was performed with GEO2R software and then using the miRwalk and targetscan softwares, the target genes for microRNA was detected. After identifying target genes, DAVID software was used to perform ontology analysis and identify the metabolic pathways associated with target genes. Finally, Cytoscape software was used for construction and analysis of the network. In this study, 23 microRNAs with high and low expression were identified whiche were expression regulators of 936 genes. The most important found pathways affecting milk production were TGFβ, WNT, MAPK, mTOR, PI3k-Akt, insulin, and prolactin pathways. Therefore, the results of this study can provide additional information for understanding the relationship between the effective genes and their biological functions in the milk production process.

Keywords: biological system, dairy cattle, gene network, micro-RNA

مقدمه

هدف از اصلاح نژاد دام، به دست آوردن نسل جدیدی از حیوانات است که نسبت به نسل قبل از آن در شرایط آینده تولیدی اقتصادی‌تر داشته باشند و همچنین بهبود ژنتیکی در صفاتی است که تأثیر شگرفی بر سودآوری واحدهای تولیدی دامی دارند. روش‌های اصلاح‌نژاد کلاسیک بر مبنای اطلاعات فنوتیپی و شجره استوار هستند و توانسته‌اند تحول زیادی در بهبود برخی از صفات تولیدی ایجاد کنند اما استفاده از این روش‌ها برای برخی از صفات مانند صفات محدود به جنس شامل تولید شیر با محدودیت‌هایی همراه است (۶). شیر و فرآورده‌های لبنی از بهترین منابع تأمین پروتئین و کلسیم به شمار می‌روند. لذا در تمامی نقاط دنیا در زمینه‌ی تولید، تجارت و مصرف بهینه‌ی آن سرمایه گذاری‌های قابل توجهی صورت می‌گیرد. بنابر گزارش‌های خواربار جهانی کل تولید شیر در ایران در سال ۲۰۱۵ برابر با ۷/۸ میلیون تن برآورد شده است. ایران در سطح جهان رتبه‌ی هجدهمین تولید کننده‌ی بزرگ شیر را کسب کرده است. سرانه مصرف شیر در جهان برای هر نفر ۱۶۹ کیلوگرم است در حالی که در ایران برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد. با وجود روند افزایشی تولید شیر اما هنوز سرانه‌ی مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است (۱۱). همراه با پیشرفت‌های ژنتیکی حاصل در زمینه بهبود تولید شیر صفات تولید مثلی کاهش یافته است. بنابراین در برنامه های پیشرفته اصلاح نژاد برای گاوهای شیرده، راهکارهایی که قادر به بهبود نرخ آبستنی بوده و بطور همزمان باعث حفظ سطح بالای تولید شیر شود بسیار مهم است. یک راهکار مناسب برای بهبود این صفات، جستجوی نشانگرهای ملکولی در داخل و یا اطراف ژن‌هایی است که به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در تولید شیر و یا عملکرد تولید مثلی دخالت دارند. لذا اطلاعات مربوط به ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای ملکولی صفت تولید شیر را از نظر ژنتیکی بهبود می‌دهد (۱۶). ریزRNA قطعات تک رشته‌ای و کوتاه RNA با طول حدود ۲۲ نوکلئوتید می‌باشند که در تمام سلول‌ها و مایعات بدن مثل خون، بزاق، مایع شکمبه و شیر حضور دارند و از عوامل اصلی در تنظیم فرایندهای ژنتیکی هستند و در بیان ژن و فرایندهای توسعه و تکثیر و تمایز، مرگ سلولی و توسعه ژن‌های پستان هم نقش دارند (۱).

همچنین توسعه‌ی سلول‌های بنیادی، ترشح انسولین، کلسترول، متابولیسم و پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند (۱). با توجه به اینکه شناسایی ریزRNA های غدد پستان گاو شیری رویکرد مهمی برای مکانیزم شروع شیردهی و شناسایی مارکرهای زیستی می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، شناسایی ژن‌های هدف مربوط به ریزRNAهای با بیان متفاوت موجود در بافت پستانی به منظور مشخص کردن مسیرهای زیستی دخیل در تولید شیر می‌باشد.

مواد و روش‌کار

آماده‌سازی و تهیه اطلاعات

در این مطالعه به منظور بررسی چگونگی اثر ریزRNAها بر فعالیت تولید شیر در سلول‌های غدد پستانی گاو شیری و گوشتی از داده‌های توالی‌یابی شده ریزRNA مربوط به بافت پستانی استفاده شد. بر همین اساس داده‌های ریزRNA مورد استفاده در این تحقیق که در جدول ۱ آورده شده است، مربوط به هشت نمونه بافت پستانی گاوشیری و گوشتی با فرمت TXT از پایگاه داده‌ای ArrayExpress با شماره دسترسی E-GEOD-61227 دانلود شد. بیان ریزRNAها با استفاده از پلت‌فرم GPL19170 Agilent-049625 Bos Taurus-miRNA اندازه‌گیری شده بود. داده‌های ریزRNA موجود شامل داده‌های خام پردازش شده است. برای استفاده از این داده‌ها نرم‌افزارها ی متعددی طراحی شده است. داده‌های ارسال شده در پایگاه اطلاعاتی ذخیره شده و به سه شکل (Platform و SamPle و Series) در اختیار محققین قرار می‌گیرد. در جدول۱شماره دسترسی نمونه استفاده شده در تحقیق آورده شده است.

بررسی تفاوت بیان ریزRNAها

واکاوی تفاوت بیان ریزRNAها با استفاده از نرم‌افزار GEO2R انجام شد. در واقع GEO2R نرم‌افزاری براساس نرم‌افزارز R است که به کاربران اجازه می‌دهد تغییر بیان ژن‌های دو یا چند نمونه را با هم مقایسه کنند. این نرم‌افزار برای انجام این تجزیه و تحلیل‌ها از بسته‌های نرم‌افزاری Limma، GEO quary موجود در نرم‌افزار R استفاده می‌کند. در این نرم‌افزار بررسی کیفیت داده‌های خام و شناسایی معنی‌داری آن‌ها توسط پیش‌فرض خود نرم‌افزار صورت می‌گیرد. با بررسی کیفیت مراحل استانداردسازی و تصفیه داده‌های خام ریز RNA با شماره دسترسی E-GEOD-61227، ریزRNAهای مناسب برای ادامه آنالیز شناسایی شدند. معیار انتخاب ریزRNAهای متفاوت بیان (-۱>LogFC>+۱) در این تحقیق بود و علاوه بر انتخاب براساس میزان تغییرسطح بیان، براساس آماره adj-P value در سطح ۵ درصد هم انتخاب شدند.

شناسایی ژن‌های هدف ریزRNA

در این مرحله بررسی‌های بیوانفورماتیکی جهت یافتن ژن هدف هر ریزRNA انجام شد، بدین منظور ریزRNAهای با سطح بیان بالاو پایین حاصل از تجزیه و تحلیل در مرحله قبل به نرم‌افزارهای شناسایی ژن هدف معرفی شدند. نظر به اینکه هر یک از نرم‌افزارها فرض‌های متفاوتی برای پیش‌بینی ژن هدف دارند، پیشنهاد شده است که از چندین نرم‌افزار برای پیش بینی ژن‌های هدف ریزRNA استفاده شود. اکثر این برنامه‌ها تحت وب بوده و درآن کاربر نمی‌تواند کنترلی بر تجزیه و تحلیل داشته باشد در این میان می توان به نرم افزارهایی همچون (Miranda, Pictar, Diana-micr, RNAhybrid, miRWalk, TargetScan) اشاره کرد. که در این تحقیق دو تا پرکاربردترین آن‌ها (TargetScan و miRWalk) برای پیش‌بینی ژن هدف ریزRNA استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار TargetScan ژن‌هایی انتخاب شد که cumulative weighed context++score>۰/۰۵ باشد و با استفاده از نرم‌افزار miRWalk ژن‌هایی انتخاب شد که Binding P-value=۱ باشد. در این مرحله

جدول ۱- شماره دسترسی نمونه بافت پستان استفاده شده

ردیف	نوع دام	شماره دسترسی
۱	گاو شیری	GSM1499907
۲	گاو شیری	GSM1499908
۳	گاو شیری	GSM1499909
۴	گاو شیری	GSM1499910
۵	گاو گوشتی	GSM1499911
۶	گاو گوشتی	GSM1499912
۷	گاو گوشتی	GSM1499913
۸	گاو گوشتی	GSM1499914

ژن‌هایی مورد توجه قرار گرفت که توسط هر دو نرم‌افزار miRWalk و TargetScan تأیید شدند.

بررسی هستی‌شناسی و فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ژن‌های هدف

استخراج اطلاعات بیولوژیکی گروه‌های بزرگ ژنی یک مسئله بزرگ می‌باشد. از جمله این اطلاعات بیولوژیکی می‌توان به شناسایی عملکرد بیولوژیکی خاص که ژن‌ها در آنها دخالت دارند و فعالیت مولکولی هر یک از ژن‌ها و همچنین رتبه‌بندی این فرایندها اشاره کرد. بنابراین به ابزارهای کاوش داده نیاز است تا بتواند روابط بین ژن‌های مؤثر را با عبارات بیولوژیکی مرتبط بررسی کند. برای تجزیه و تحلیل و هستی‌شناسی ژن‌های هدف نرم‌افزارهای مختلفی وجود دارد و هر روز به تعداد نرم‌افزارهای طراحی شده افزوده می شود. پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌های هدف ریز RNAها از آنها جهت واکاوی هستی شناسی (فرایندهای بیولوژیکی) شناسایی مسیرهای متابولیکی مرتبط با ژن‌های هدف از پایگاه داده‌ای DAVID استفاده شد. نرم‌افزار DAVID یک پایگاه داده‌ای شامل مجموعه‌ای کامل از ابزارهای شناسایی برای فهم عملکرد بیولوژیکی ژن‌ها می‌باشد. این پایگاه داده‌ای با اتصال به پایگاه‌های دیگر مانند Wikipathway، KEGG، GeneOntology و Reactome به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن‌های معنی‌دار می‌پردازد (۴).

آنالیز شبکه ژنی

در سال‌های اخیر انفجاری در پیشرفت تکنیک‌هایی با تکنولوژی بالا برای دستیابی و نشان دادن جنبه‌های مختلف فعالیت ژن به وجود آمده است. استفاده از این تکنولوژی‌های جدید، اکنون جهت شناسایی ارتباط جدید بین ژن‌ها با تفکیک‌پذیری بالاتر نسبت به گذشته را ممکن ساخته است. یک ساختار داده عمومی که برای این کار به وجود آمد شبکه است. پیاده‌سازی شبکه جهت بررسی روابط بین ژن‌ها با استفاده از داده‌های حاصل از فناوری نوین به درک بهتر سازوکارهای پیچیده فیزیولوژیکی کمک نموده است. در این مطالعه به بازسازی شبکه تنظیم بیان ژن و مطالعه روابط بین ژن‌های دخیل در تولید و ترکیب شیر با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape پرداخته شده است. Cytoscape یک نرم‌افزار بیوانفورماتیکی برای تجزیه وتحلیل شبکه‌های ملکولی پیچیده و مجسم‌سازی اطلاعات می‌باشد. ژن‌هایی که براساس نقش بیولوژیکی

جدول ۲- ریزRNAهای با بیان متفاوت و معنی دار(معیار انتخاب adj-P valu<۰,۰۵ و Log FC >۱- < ۱ است).

Bta-miR	Adj. p. value	Log FC
"bta-miR-375"	"1.07e-07"	"7.301"
"bta-miR-218"	"1.07e-07"	"6.733"
"bta-miR-183"	"3.22e-07"	"5.556"
"bta-miR-21-3p"	"4.55e-02"	"4.720"
"bta-miR-190a"	"4.55e-02"	"4.289"
"bta-miR-1185"	"5.39e-02"	"3.935"
"bta-miR-376a"	"6.48e-02"	"3.860"
"bta-miR-760-3p"	"4.55e-02"	"3.832"
"bta-miR-491"	"4.55e-02"	"3.262"
"bta-miR-204"	"3.79e-06"	"2.706"
"bta-miR-421"	"4.01e-04"	"1.256"
"bta-miR-146b"	"3.48e-03"	"1.164"
"bta-miR-29b"	"1.93e-02"	"1.117"
"bta-miR-21-5p"	"3.37e-02"	"1.072"
"bta-miR-154c"	"2.58e-02"	"1.048"
"bta-miR-101"	"1.17e-02"	"1.021"
"bta-miR-194"	"1.93e-03"	"1.012"
"bta-miR-155"	"1.83e-03"	"1.188"
"bta-miR-2413"	"3.45e-02"	"-2.170"
"bta-miR-2285t"	"7.61e-03"	"-2.118"
"bta-miR-1247-3p"	"4.55e-02"	"-1.220"
"bta-miR-2410"	"4..40e-02"	"-1.010"
"bta-miR-1434-3p"	"9. 56e-03"	"-1.192"

شان در تولید شیر در مرحله قبل انتخاب کردیم به عنوان ورودی این بسته آماری مورد استفاده قرار گرفت. این برنامه براساس میزان همبستگی که در ژن‌های مربوطه وجود دارد، به ترسیم شبکه می‌پردازد. پس از آنالیز شبکه و مشخص شدن آماره‌های شبکه (Network Parameters) با استفاده از نوار ابزار افزونه‌ها (Apps) گزینه CytoNCA، شبکه براساس درجه ارزش ژن و مرکزیت بینابینی ویرایش شد. به این ترتیب از نظر ارزش، درجه ارتباط با گره‌های دیگر و مرکزیت درونی و میانی بزرگ نشان دهنده ژن‌هایی هستند که درجه تنظیم کنندگی بیشتری در شبکه دارند (۷).

نتایج و بحث

بررسی تفاوت بیان ریزRNAها

این مطالعه با توجه به اهمیت و نقش ریزRNAها در توسعه غدد پستانی جهت شناسایی ریزRNAهای مؤثر در مسیرهای بیوسنتز ترکیبات شیر و فعالیت طبیعی سلول‌های غدد پستانی با استفاده از واکاوی پروفایل بیان ریزRNA انجام شد. بیان بیشتر ریزRNAها دارای یک الگوی فضایی است که نشان می‌دهد آن‌ها توابع خاصی را در فرایندهای مختلف بازی می‌کنند (۲). بنابراین شناسایی ریز RNAهای غدد پستان گاو شیری رویکرد مهمی برای مکانیزم شروع شیردهی و شناسایی بیومارکرهامی‌باشد. در این پژوهش،اطلاعات مورد نیاز از پایگاه داده‌ای ArrayExpress جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفتند. در رویکرد اول تفاوت بیان ریزRNAها مورد بررسی قرار گرفت که ۲۳ ریزRNA شناسایی شد که بیان متفاوت و معنی‌داری (۰/۰۵>adj-P valu) داشتند. ریزRNAهایی که (۱>- Log FC) بیان پایینی دارند و سبب افزایش بیان ژن هدف تحت کنترل می شوند که تعداد آن‌ها ۵ تا است و ریزRNAهایی که (۱ < Log FC) بیان بالایی دارند و موجب کاهش بیان ژن هدف تحت کنترل می شوند که تعداد آن‌ها ۱۸ است. ریزRNA های، bta-miR-375، bta-miR-1434-3P، bta-miR-2285t, bta-miR-146b، bta-miR-101, miR-29b, در تحقیق دیگری بیان متفاوت و معنی‌داری توسط بررسی با آزمایشات qPCR بروی بافت پستانی در زمان آبستنی در غدد پستان گاو شیری و گوشتی نشان دادند که این ریزRNAها در بین ۲۳ ریزRNA شناسایی شده هستند بنابراین با نتایج این پژوهش هم راستا می‌باشند (۲۲). لی و همکارانش در ۲۰۱۶ آزمایشی بر روی غدد پستان گاو شیری آلوده به استافیلو کوکوس اورئوس انجام دادند و نشان دادند که "bta-miR-21-3P" یکی از ریزRNAهایی است که در غدد پستان گاو شیری وجود دارد و در نگهداری سلول‌های آلوئل هم نقش مهمی دارد و بیان این ریزRNA در زمان بارداری در مقایسه با زمان خشکی دو برابر می‌شود. بنابراین بیان آن در غدد پستان گاوهای باردار و شیرده بی‌شتر از گاوهای غیر شیرده است (۱۲). در جدول (۲) ریزRNAهای با بیان متفاوت آورده شده است.

جدول ۳-نتایج شناسایی ژن های هدف هر ریزRNA . تعداد ذکر شده براساس ژن های مشترک شناسایی شده تو سط دو نرم افزار miRWalk و TargetScan است.

Bus Tauros-miR	Number of target genes	Bus Tauros-miR	Number of target genes
"bta-miR-375"	۱۵	"bta-miR-146b"	۹
"bta-miR-218"	۱۶	"bta-miR-29b"	۳۱
"bta-miR-183"	۲۹	"bta-miR-21-5P"	۸
"bta-miR-21-3P"	۱۷۲	"bta-miR-154c"	۱۴
"bta-miR-190a"	۱۵	"bta-miR-101"	۱۰
"bta-miR-1185"	۴۲	"bta-miR-194"	۱۸
"bta-miR-376a"	۱۷	"bta-miR-155"	۱۲
"bta-miR-760-3P"	۴۴	"bta-miR-2413"	۵۰
"bta-miR-491"	۱۵	"bta-miR-2285t"	۲۴
"bta-miR-204"	۳۱	"bta-miR-1247-3P"	۱۳۰
"bta-miR-1434-3P"	۱۶	"bta-miR-2410"	۲۰۸
"۴۲۱-bta-miR"	۱۰		

شناسایی ژن‌های هدف ریزRNA

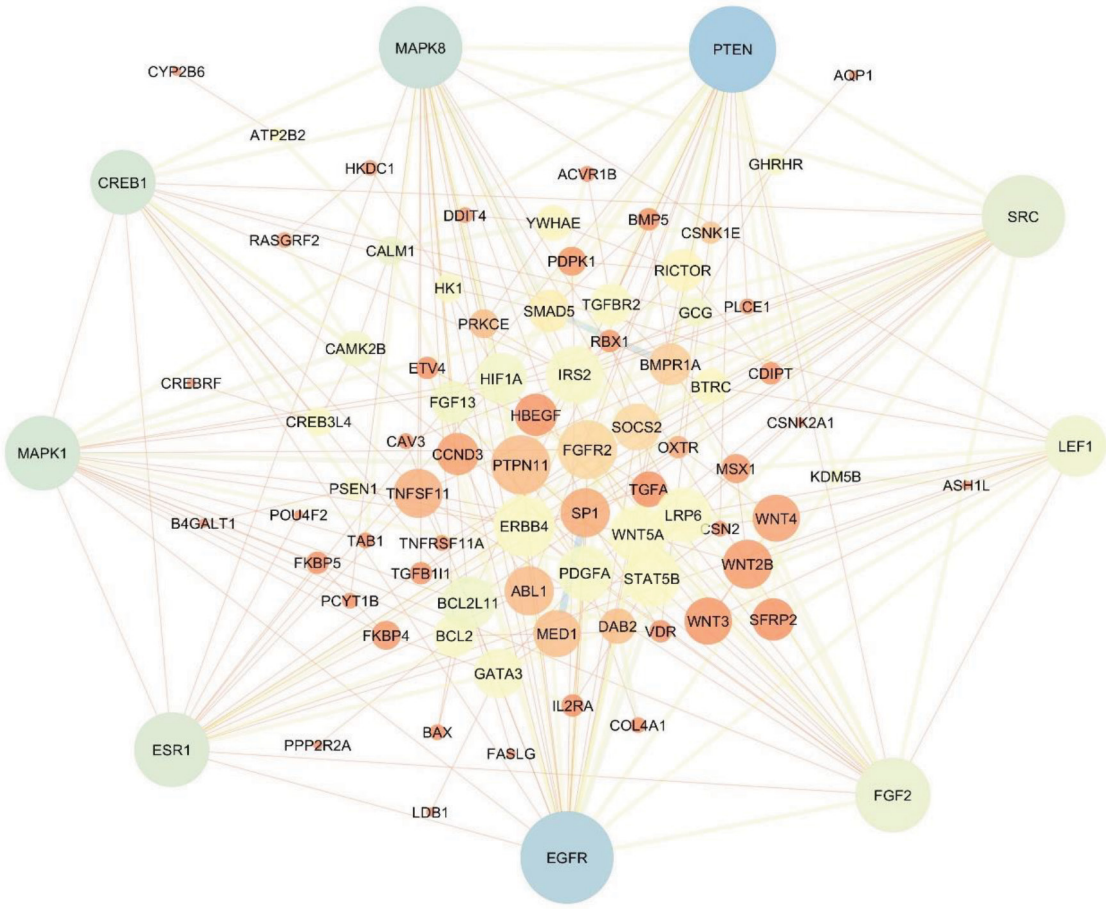
ژن‌های هدف این ریزRNAها توسط پایگاه اطلاعاتی miRWalk و TargetScan شناسایی شدند. از این میان تنها ژن‌هایی برای آنالیزهای بعدی استفاده شد که در بین نرم‌افزارهای miRWalk و TargetScan مشترک بودند. در جدول ۳ تعداد ژن‌های هدف هر ریزRNA آورده شده است. برای ریزRNA هایی با سطح بیان بالا ۵۰۸ و برای ریز RNA هایی با سطح بیان پایین ۴۲۸ ژن هدف شناسایی شد.

آنالیز هستی‌شناسی و فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ژن‌های هدف

امروزه ارتباط و هم‌پوشانی علم بیوانفورماتیک و فن‌آوری‌های ملکولی می‌تواند نقش مهمی در بهبود ژنتیکی صفات تولیدی داشته باشد که یکی از مهم‌ترین صفات تولیدی صفت تولید شیر است که تحت تأثیر چندین مسیر بیولوژیکی قرار دارند. نتایج آنالیز این مطالعه نشان داد که مسیرهای سیگنالیک *PI3k-Akt*، *mTOR*، *MAPK*، *WNT*، *TGFB*، انسولین و پرولاکتین نقش مهمی در توسعه غدد پستان دارند که بصورت مختصر در ذیل مسیرهای ذکر شده مورد بحث قرار گرفته اند.

مسیر *MAPK*، یکی از کلیدی‌ترین تنظیم کننده‌های تمایز سلول‌های اپیتلیال پستان است. هفت پروتئین کیناز فعال (*MAPK*) در سیگنال‌های داخل سلولی نقش دارد که این مسیر سیگنالدهی بر تکثیر سلول‌های آلوئول تأثیر می‌گذارد و افزایش انشعابات این فرایندها را کنترل می‌کند و باعث افزایش ترشح و تولید شیر می‌شود. این مسیر همچنین بر تمایز و تکثیر سلول و مرگ سلولی نقش دارد (۳).

سیگنال *wnt* نیز جزء مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده است. در بسیاری از مراحل رشد در پستانداران شامل تکثیر، تمایز و واکنش‌های اپیتلیال



شکل-۱-شبکه ژنی بازسازی شده توسط ژن های موثر بر فرآیند تولید شیر. تغییر رنگ از قرمز به آبی و اندازه بزرگتر گره ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر ژن ها می باشد.

مزانشیمی که در راستای گسترش بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌باشد، درگیر است. پروتئین‌های *wnt* خانواده بزرگی هستند که لیگاندهای گلیکوزیله شده که برای رشد پستانداران نیاز است را ترشح می‌کنند. این سیگنال از بدو تولد تا گسترش کامل اندام‌ها فعال است (۱۸).

مسیر *PI3k-Akt*، نقش مهمی در حمل و نقل گلوکز و بیوسنتز لیپید در سلول‌های اپیتلیال پستان دارد و باعث افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتز چربی می‌شود. همچنین در ترشح آندوکرین پرولاکتین نقش دارد و بر تولید شیر اثر می‌گذارد (۱۷). این مسیر سیگنالدهی برای سنتز ترکیبات شیر مانند چربی پروتئین شیر و لاکتوز بسیار حیاتی می‌باشد و در توسعه بافت پستانی و مسیر سیگنالدهی پرولاکتین نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۱۷).

مسیر *TGF-β1*، یکی از عامل‌های تنظیم‌کننده رشد غدد شیری است، که شامل دو ایزوفرم *TGF-β2* و *TGF-β3* می‌باشد. در تکثیر سلول‌های اپیتلیال، تکثیر و تمایز غده پستان نقش دارد. ایزوفرم *TGF-β1* در مراحل مختلف رشد پستان گاو شیری بیان می‌شود. مطالعات سلول‌های شیری نشان می‌دهد که *TGF-β1* تکثیر سلول‌های اپیتلیال و تکثیر برخی از سلول‌های مزانشیم، از جمله فیبروبلاست را تحریک می‌کند و هچنین مرگ سلولی را تنظیم می‌کند و از طریق سیکلین‌ها، کیناز وابسته به سیکلین و مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین بر پیشرفت چرخه سلولی تاثیر می‌گذارد (۱۹).

mTOR، در واقع یک پروتئین چند دامنه است که بیان پروتئین شیر در غدد پستانداران وابسته به *mTOR* است و در سلول‌های پستانداران دو عامل *mTOR* متفاوت وجود دارد که عبارتند از: *mTORc1* و *mTORc2*

در مطالعه ای بیان کرده‌اند که القای سنتز پروتئین‌های شیر از طریق مکمل‌های اسیدآمینه‌ای با فعال شدن این مسیر سیگنالدهی ارتباط مستقیم دارد. ارتباط اسید آمینه ها با مسیر سیگنالدهی *mTOR* از طریق مسیر ژنی *WISP3* انجام می‌شود و این مجموعه علاوه بر اثر بر سنتز پروتئین‌های شیر بر رشد سلول نیز مؤثر است (۹).

مسیر پرولاکتین که توسط ژن پرولاکتین که در واقع یک هورمون لاکتوژنیک است، تنظیم می‌شود و این ژن تاثیر قابل توجهی در توسعه و تکامل سیستم پستانی دارد. بنابراین دارای نقش عمده‌ای در ساخت شیر، شیردهی و رشد غدد پستانی حیوان می باشد و به عنوان یک ژن کاندیدا مؤثر بر تغییرات عملکرد تولید شیر است. پرولاکتین یک هورمون پتیدی است که در مهره‌داران از سلول‌های ویژه‌ای در هیپوفیز قدامی ترشح شده و در پستانداران برای شروع و ادامه شیردهی ضروری بوده و مسؤل اصلی سنتز پروتئین‌های شیر، لاکتوز، چربی و تمام ترکیبات اصلی شیر است (۵).

انسولین باعث افزایش در کل مواد جامد شیر، افزایش درصد چربی شیر، افزایش درصد خاکستر شیر، افزایش ناچیز در محتویات نیتروژنی شیر، افزایش کلسیم و فسفر شیر می‌شود. همچنین در سنتز هورمون‌های استروئیدی و نیز آندروژن در سلول‌های تکا در فولیکول تخمدان نقش دارد (۱۰).

ترسیم و واکاوی شبکه ژن‌های مرتبط با تولید شیر

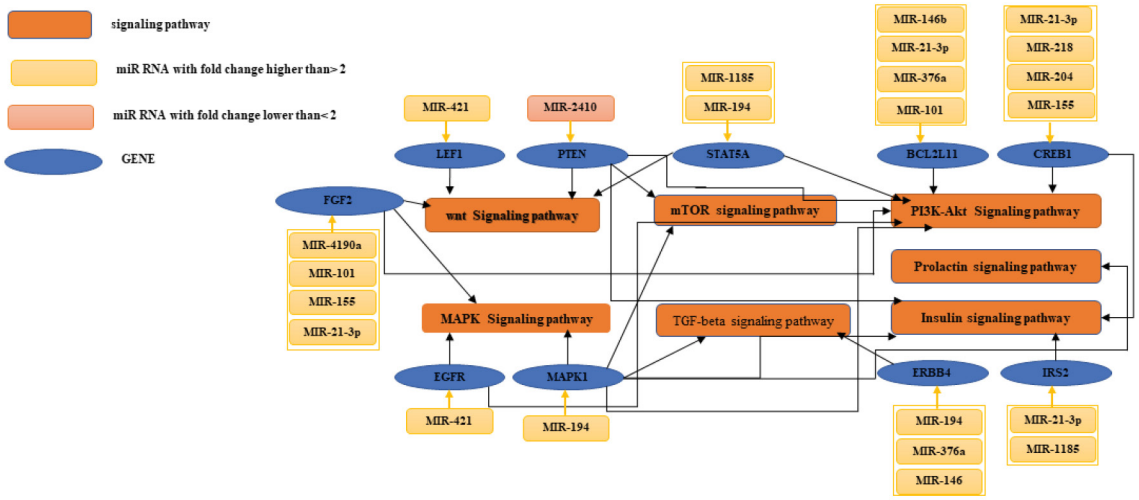
شبکه ژن‌های هدف شناسایی شده به عنوان کلیدی ترین ژن‌های مؤثر در تولید شیر با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی ترسیم (شکل۱) و با استفاده از افزونه‌های نرم‌افزار ذکر شده،

جدول ۴-نتایج آنالیز ویژگی های توپولوژیکی شبکه. ژن هایی با بالاترین مقادیر پارامترهای مرکزیت به عنوان ژن هایی با بیشترین اثرکنترل کنندگی بر فرآیند بیولوژیکی تولید شیر معرفی شدند.

ژن های هاب	درجه ارتباط با گره های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
EGFR	۳۰	۱۱۸۱/۲۸	۰/۵
PTEN	۲۷	۱۴۰۱/۵۶	۰/۵
MAPK1	۲۱	۷۱۹/۸۰	۰/۴۶
FGF2	۲۱	۴۳۶/۳۵	۰/۴۳
CREB1	۱۶	۷۲۷/۲۴	۰/۴۳
ERBb4	۱۴	۱۷۹/۰۸۲	۰/۴۵
LEF1	۱۴	۳۷۹/۱۲۲	۰/۴۲
STAT5B	۱۲	۱۸۴/۶۸	۰/۴۴
IRS2	۱۲	۲۴۴/۶۵	۰/۳۹
BCL2L11	۱۰	۳۳۶/۶۵	۰/۳۵

شبکه ترسیم شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۴). روش‌های اصلی و برنامه‌های کاربردی در واکاوی شبکه به سه موضوع اصلی جهت تفسیر فنوتیپ‌های پیچیده می‌پردازند. نخستین جنبه، شناسایی اهمیت هر گره در شبکه است که مهم‌ترین یا ضروری ترین ژن شبکه، و همچنین کم اهمیت‌ترین ژن تعیین می‌شود. جنبه دیگر، شناسایی ژن‌های کلیدی تر در کل شبکه است که با اندازه‌گیری ارتباطات مستقیم یک ژن با سایر ژن‌ها و توجه به کل ارتباطات شبکه بدست می‌آید. برخی از پارامترها کمک می‌کنند تا از میان تمام ژن‌های شبکه، آن‌هایی که عامل اصلی ارتباط داخل شبکه هستند شناسایی شوند. آماره‌ای به نام مرکزیت بینابینی یا میانی در شبکه برای هر گره تعریف می‌شود. این پارامتر نشان می‌دهد گره‌هایی که دارای همسایگان نیز می‌باشد دارای رتبه بالاتری هستند. آماره بعدی که در تشخیص ژن‌های مؤثر در شبکه به کار می‌رود مرکزیت درونی می‌باشد. این پارامتر به تعداد گره‌هایی اشاره دارد که در نزدیکترین فاصله نسبت به گره مورد نظر قرار دارد و به سرعت می‌توانند با سایر گره‌ها ارتباط برقرار کنند (۲۴).

در پژوهش کنونی، بررسی بیشتر ژن‌های دارای اثر تنظیم شوندگی بالاتر و معنی‌دار در مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با تولید شیر منجر به شناسایی ۱۰ ژن تاثیرگذار بر فرایند بیولوژیکی تولید شیر شد که بصورت مختصر مورد بحث قرار گرفته‌اند. اولین ژن مطرح در شبکه ژن *EGFR* است که فعال کننده سنتز اسیدهای چرب است و باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب درون سلولی می‌شود (۱۴). نتایج این مطالعه به مؤثر بودن آن در فرآیند تولید شیر بر اساس نتایج آنالیز هستی شناسی به نقش آن در شکل‌دهی سلول، رشد سلول، سوخت و ساز پروتئین، تنظیم رشد سلول‌های اپیتلیال و تنظیم مسیر سیگنالدهی *MAPK* اشاره داشت و بیان ژن *EGFR* توسط ریز bta-miR421 RNA کنترل می‌شود. مطابق با بررسی‌های این مطالعه ژن *PTEN* که توسط bta-miR2410 تنظیم بیان می‌شود، در عملکردهای بیولوژیکی سوخت و ساز فسفات و مسیر سیگنالدهی *mTOR* و *PI3K-Akt* و *wnt* تاثیر دارد. در مطالعه دیگری گزارش شده است این ژن باعث توسعه بافت پستانی، تقویت سنتز و ترشح لاکتوز می‌شود (۱۲). یکی دیگر از ژن‌های مطرح، ژن *MAPK1* است که این ژن سنتز پروتئین شیر را از طریق *mTOR* تنظیم می‌کند (۱۳). نتایج پژوهش کنونی نشان داد که این ژن اثر تنظیمی در مسیرهای *TGF-beta*، *PI3K-Akt*، *mTOR* ، *MAPK* و *Prolactin* دارد و تظاهر بیانش تحت تأثیر bta-miR194 قرار می‌گیرد. وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان ژن *FGF2* را در مراحل مختلف رشد غدد پستان گاو شیری مورد آزمایش قرار دادند و گزارش کرده‌اند که ژن *FGF2* در طول توسعه غده پستان بیان متغیری داشته و سبب تحریک رشد سلول در غدد پستان شده است (۲۱). مطابق با نتایج بدست آمده از بخش شناسایی ژن های هدف در مطالعه حاضر، بیان این ژن توسط چهار ریز bta-miR155 ، bta-miR101، bta-miR190a RNA و bta-miR21-3P کنترل می‌شود و این ژن در مسیرهای متابولیکی *Wnt*، *PI3K-Akt*، *MAPK* و عملکردهای بیولوژیکی رشد و توسعه غده پستان حضور دارد. یکی دیگر از کلیدی‌ترین ژن‌های شبکه ژنی، ژن *CREB1* است که یک عامل مهم رونویسی در مسیر تولید کلسیم است (۲۵) نتایج پژوهش کنونی نشان داد نقش تنظیمی در مسیرهای *Insulin* , *PI3K-Akt* دارد و همچنین در عملکرد بیولوژیکی تولید رنین هم نقش دارد. میزان



شکل۲- شبکه برهمکنش بین ریزRNAهای معنی دار، ژن های هدف و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با تولید شیر. تحلیل شبکه نقش تنظیمی ریز RNA های کنترل کننده ژن های موثر در مسیرهای بیولوژیکی دخیل در فرایند تولید شیر را نشان می دهد.

بیان این ژن تحت تأثیر چهار ریز bta-miR204، bta- miR155 RNA bta-miR218 ، و bta- miR21-3P می‌باشد. *ERBb4* از جمله ژن‌های مؤثر در رشد غده پستانی است و بر اساس آنالیز هستی‌شناسی در این مطالعه نشان داده شده است که ژن ذکر شده در شیردهی و توسعه غده پستان و مسیر سیگنالدهی *TGF-beta* نقش دارد و بیانش تحت تأثیر سه ریز bta-miR376a، bta-miR146b RNA و bta-miR194 قرار می‌گیرد. ژن مهم دیگر مورد بررسی در شبکه برهمکنش *LEF1* است که این ژن با مسیر سیگنالدهی *wnt* در ارتباط است که این مسیر هم یکی از مسیرهای مهم در تولید شیر است (۸). در پژوهش کنونی نتایج آنالیز هستی‌شناسی نشان داد که این ژن در مکانیزم رشد سلول‌های اپیتلیال، رشد سلول، تنظیم ساخت DNA، مسیر سیگنالدهی *wnt* و ساخت استروژن نقش دارد. این ژن هدف ریز bta-miR421 می‌باشد. از دیگر ژن‌های تأثیر گذار شناسایی شده در این مطالعه که در شیردهی، تنظیم فرآیند سوخت‌ساز استروئید، سوخت‌ساز چربی، تنظیم چسبندگی سلولی، تنظیم سلول‌های اپیتلیال، مسیر سیگنالدهی پرولاکتین، فرآیند سوخت‌ساز پروژسترون نقش دارد و میزان بیانش تحت کنترل ریز RNA های bta-miR194 و bta-miR1185 قرار می‌گیرد، ژن STAT5A است که گزارش شده این ژن تولید و ترکیب شیر را تنظیم می‌کند و در رشد سلول‌های اپیتلیال در مسیر سیگنالینگ *wnt*، *PI3K-Akt* نقش دارد، بنابراین در فرآیند تولید شیر در شروع باروری نقش بسزایی دارد (۲۳). ژن *IRS2* از دیگر ژن‌های شناسایی شده کلیدی برای فرایند تولید شیر است که در تنظیم بیولوژیک پروتئین، و انتقال فسفولیپید فعالیت دارد. (۱۵). بر اساس نتایج مشاهده شده در این تحقیق در مسیر سیگنالدهی انسولین، فرآیند سوخت و ساز لیپید و توسعه غده پستان نقش دارد و کنترل بیانش تحت تأثیر ریزRNAهای bta-miR1185 و bta-miR21-3P می‌باشد. آخرین ژن مهم و تأثیرگذار در پژوهش کنونی ژن *BCL2L11* است و یکی از ژن‌های بزرگ اثر بر روی تولید و ترکیب شیر می‌باشد و ژن هدف برای ریز RNAی bta-miR146b می‌باشد. در مطالعه‌ای که وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ جهت شناسایی ریزRNAهای مؤثر در تولید شیر در غدد پستانی انجام داده بودند، تأثیرگذاری این ژن به اثبات رسیده است (۲۰). در شکل۲ شبکه بر همکنشی بین ریزRNAها، ژن‌های هدف و مسیرهای بیولوژیکی دخیل در فرایند تولید شیر نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج آنالیز پروفایل بیان ریز RNA منجر به شناسایی ۲۳ ریز RNA با بیان متفاوت و معنی‌دار شد که این تعداد ریز RNA نقش تنظیم‌کنندگی برای بیان ۹۳۶ ژن هدف را داشتند. تعداد ۸۴ ژن از ژن‌های هدف شناسایی شده بر اساس آنالیز هستی شناسایی در هفت مسیر بیولوژیکی مرتبط با تولید شیر و عملکردهای بیولوژیکی سنتز، متابولیسم، نقل و انتقال و آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال نقش داشتند. بر اساس نتایج واکاوی شبکه ترسیم شده توسط ۸۴ ژن هدف موثر بر تولید شیر، تعداد ۱۰ ژن بیشترین اثر تنظیم‌کنندگی را بر فرایند بیولوژیکی تولید شیر داشتند. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک ارتباط ژن‌های مؤثر و مسیرهای بیولوژیکی آن‌ها در فرآیند تولید شیر را فراهم آورد.

منابع مورد استفاده

1. Bach, I., C. Rodriguez-Esteban, C. Carriere, A. Bhushan, A. Krones, D. W. Rose, C. K. Glass, B. Andersen, J. C. I. Belmonte and M. G. Rosenfeld. 1999. RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genetics* 22: 394-399.

2. Baghizadeh, A., M. Bahaaddini, M. R. Mohamadabadi and N. Askari. 2009. Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 Gene in Raeini cashmere goat. *Agricultural and Environmental Science* 6(4): 454-459.

3. Bao, Z., J. Lin, L. Ye, Q. Zhang, J. Chen, Q. Yang and Q. Yu. 2016. Modulation of Mammary Gland Development and Milk Production by Growth Hormone Expression in GH Transgenic Goats. *Frontiers in Physiology* 728: 1-8.

4. Dennis, G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane and R. A. LemPicki. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genomics Biology*.4(9), R60.

5. Ghasemi, N., M. Zadehrahmani, G. H. Rahimi and S. H. Hafezian. 2009. Association between prolactin gene polymorphism and milk production in montebeliard cows. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 1(3): 048-051.

6. Gibson, J. P. 1989. The effect of pricing system, economic weights, and population parameters on economic response to selection on milk components. *Journal of Dairy Sciences* 72: 3314-3326.

7. Hessani, Z. H., M. R. Nasiri, M. R. Bakhtiarizadeh, M. Tahmorsepure and A. Javadmanesh. 2018. Gene expression analysis on apoptosis network and design it in Esfahani and Ross breeds. *Iranian Journal of Animal Science Research* 10(1): 117-130 (In Farsi).

8. Jamora, C., R. Das Gupta, P. Kocieniewski and E. Fuchs. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial and development. *Nature*,422: 317-322.

9. Jiang, N., Y. Wang, Z. Yu, L. Hu, C. Liu, X. Gao and S. Zheng. 2015. WisP3 (CCN6) regulates milk protein synthesis and cell growth through mTOR signaling in dairy cow mammary epithelial cells. *DNA and Cell Biology* 34: 524-533.

10. Karjalainen, j., J. M. Martin, M. Knip, J. Ilonen, B. H. Robinson, E. Savilahti and H. M. Dosch. 1992. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin- dependent diabetes mellitus. *Journal of Medicine* 327(5): 302-307.

11. Koopaei, K., H. M. R. Mohammadabadi, S. A. Mayari, A. R.

Tarang and A. E. Koshkoiyeh. 2012. Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science paper and Report* 30(3): 231-239.

12. Li, D., X. Xie, J. Wang, Y. Bian, Q. Li, X. Gao and C. Wang. 2015. MiR-486 regulates lactation and targets the PTEN gene in cow mammary glands. *PLoS One* 10(3), e0118284.

13. Lu, L. M., Q. Z. Li, J. G. Huang and X. J. Gao. 2013. Proteomic and functional analyses reveal MAPK1 regulates milk protein synthesis. *Molecules Journal* 18(1): 263-275.

14. Mukhopadhyay, C., X. Zhao, D. Maroni, V. Band and M. Naramura. 2013. Distinct effects of EGFR ligands on human mammary epithelial cell differentiation. *PLoS One* 8(10), e75907.

15. Peripolli, E., N. B. Stafuzza, D. P. Munari, A. L. F. Lima, R. Irgang, M. A. Machado and M. V. B. Silva. 2018. Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (Bos indicus) dairy cattle. *BMC Genomics* 19(1): 1-13.

16. Pimentel, E. C. G., S. Bauersachs, M. Tietze, H. Simianer, J. Tetens, G. Thaller, F. Reinhardt, E. Wolf and S. Konig. 2011. Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Animal Genetics* 42(3): 251-262.

17. Raven, L. A., B. G. Cocks, M. E. Goddard, J. E. Pryce and B. J. Hayes. 2014. Genetic variants in mammary development, prolactin signaling and involution pathway explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genetics Selection Evolution* 46: 110-117.

18. Roarty, K. and R. Serra. 2007. Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth. *Development* 134: 3929-3939.

19. Roberts A. B., K. C. Flanders, P. Kondalah, N. L. Thompson, E. Van Obberghen- schilling, L. Wakefield and M. B. Sporn. 1988. Transforming growth factor beta: Biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. In: proceedings of the 1987 Laurentian Hormone Conference. Academic press, British. pp. 157-197.

20. Wang, M., S. Moisa, M. J. Khan, J. Wang, D. Bu and J. J. Loor. 2012. MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation1. *Journal of Dairy Science* 95(11): 6529-6535.

21. Wang, X., C. Maltecca, R. Tal- Stein, E. Lipkin and H. khatib. 2008. Association of bovine fibroblast growth factor2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: an example of the ability of the candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. *Journal of Dairy Science* 91: 2475-2480.

22. Wicik, Z., M. Gajewska, A. Majewska, D. Walkiewicz, E. Osinska and T. Motyl. 2016. Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 133(1): 31-42.

23. Zakizadeh, S., A. Soelymani and R. Haeri. 2015. Determination of POUF1 and STAT5A Polymorphism and Association with Milk Production in Cattle. *Iranian Journal of Animal Science and Biotechnology* 6(4):388-394. (In Farsi).

24. Zali, H., M. Reazee, K. Tavirani, M. Haidarbegi and N. Shahriari. 2013. Network Analysis Method for Interpreting Complex Phenotypes in Biological Networks. *Journal of Ilam University of Medical Science* 20(5): 225-233. (In Farsi).

25. Zhou, J., S. Ye, T. Fujiwara, S. C. Manolagas and H. Zhao. 2013. STEAP4 plays a critical role in osteoclastogenesis in vitro by regulating cellular iron/ROS levels and CREB activation. *Journal of Biological Chemistry* 288: 30064-30074.