

مقاله کامل

شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با کم باروری در گاو (*Bos Taurus*): یک مطالعه بیوانفورماتیک

• علی فروهرمهر (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

• سید مجتبی موسوی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۰۵-۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۷-۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲-۰۷-۲۵ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۰۱-۱۹

Emali: forouharmehr.a@lu.ac.ir



چکیده

کم باروری یک موضوع مهم در صنعت گاوهای شیری است که می‌تواند اقتصاد یک مزرعه را تحت الشعاع قرار دهد. بنابراین، بررسی پدیده‌های بیولوژیکی که می‌تواند منجر به کم باروری شود، بسیار مهم است. مطالعه حاضر برای شناسایی ژن‌های و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با کم باروری طراحی شده است. به همین منظور، پروفایل بیان ژن آندومتر شامل ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم بارور گاو (*Bos Taurus*) از پایگاه داده GEO جمع‌آوری شد. ژن‌های با بیان افتراقی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار آنالیز GEO۲R غربالگری شدند. تجزیه و تحلیل برهمکنش پروتئین-پروتئین، تجزیه و تحلیل ماژول، تجزیه و تحلیل آنتولوژی ژن، تجزیه و تحلیل مسیرهای بیولوژیکی و شناسایی ژن‌های کلیدی با بیان افتراقی توسط نرم‌افزارهای با ارجاع‌دهی بالا انجام شد. بر اساس نتایج مقایسه نمونه‌های بارور و کم بارور، ۱۶۹ ژن به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی معرفی شدند که به ترتیب حاوی ۵۳ و ۱۱۶ ژن با بیان بالا و پایین بودند. علاوه بر این، نتایج تجزیه و تحلیل ماژول وجود چهار خوشه را تایید کرد که امتیاز آنها بین ۲/۸ و ۳ بود. نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی آنتولوژی ژن نشان داد که ترشح انتقال دهنده‌های عصبی، فضای خارج سلولی، فعالیت استروئید دهیدروژناز، چرخه ویکول سیناپسی به ترتیب معنادارترین فرآیند بیولوژیکی، محفظه سلولی، عملکرد مولکولی و مسیر KEGG بودند. نتایج نشان داد که ۵ ژن شامل *CHGA*، *ITGAM*، *HABP2*، *SYT1* و *TAT*، ژن‌های کلیدی مرتبط با کم باروری هستند که می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی مناسب در برنامه‌های اصلاحی و مدیریت تولید مثل گاوداری‌ها معرفی شوند.

کلمات کلیدی: کم باروری، ژن‌های کلیدی، آنالیز بیوانفورماتیک، برهمکنش پروتئین-پروتئین، مسیرهای بیولوژیکی

- Veterinary Research & Biological Products No 142 pp: 60-68

Identification of Key Genes and Pathways Associated with Subfertility in Bos Taurus: a Bioinformatics Study

By: Forouharmehr A (Corresponding Author), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.
Mousavi SM., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Received: 20232-08-08 Accepted: 2023-10-18

Revised: 2023-10-17 Published: 2024-04-07

Email: forouharmehr.a@lu.ac.ir

Subfertility is an important issue in dairy cow industry which can negatively eclipse economics of a farm. Thereby, investigation of the biological phenomena which can lead to subfertility is crucial. The current study was designed to identify hub genes and biological pathways related to subfertility. In this case, an endometrial gene expression profile including 6 fertile and 5 subfertile samples of Bos taurus was collected from database. First, up-regulated and down-regulated differentially expressed genes of the samples were screened by Geo2R server. Then, protein-protein interaction network analysis, module analysis, gene ontology enrichment analysis, pathway analysis and hub gene identification of differentially expressed genes were conducted using reliable tools and software. Based on the results of comparison between fertile and subfertile samples, 169 genes were identified as differentially expressed genes which contained 53 and 116 up-regulated and down-regulated genes, respectively. Moreover, the results of module analysis confirmed existence of four clusters which their scores were between 2.8 and 3. The results of gene ontology enrichment analysis revealed that neurotransmitter secretion, extracellular space, steroid dehydrogenase activity, synaptic vesicle cycle were the most significant terms of biological process, cellular compartment, molecular function and KEGG pathway, respectively. Finally, the results revealed that 5 genes including *SYT1*, *ITGAM*, *HABP2*, *CHGA* and *TAT* were hub genes which can be introduced as a proper molecular markers for breeding and management of cattle reproduction programs.

Keywords: Subfertility, Hub gene, Bioinformatics analysis.

در این دوره، آندومتر رحم با استفاده از سنتز و ترشح ترکیبات مختلف، نقش حیاتی در زنده ماندن جنین ایفا می‌کند (۱۵) بنابراین، استفاده از یک استراتژی قوی که بر رویدادهای رخ داده در آندومتر رحم متمرکز دارد، می‌تواند اطلاعاتی را برای بهبود مدیریت گاوهای فحلی مکرر در گله‌های صنعتی آشکار کند. علی‌رغم اهمیت باروری در صنعت دامپروری، به دلیل وراثت‌پذیری پایین این صفت، راهبردهای مرسوم مانند ژنتیک کمی نمی‌تواند کارآمد باشد، در نتیجه باید نسل جدیدی از تکنیک‌ها در نظر گرفته شود (۲۴).

امروزه، پیشرفت در فناوری توالی‌یابی ژنوم منجر به انقلاب شگفت‌انگیزی در تمام زمینه‌های زیست‌شناسی شده است. علاوه بر این، در کنار این فناوری، توسعه ابزارها و پایگاه‌های بیوانفورماتیک به تجزیه و تحلیل سریع، ارزان و دقیق داده‌ها کمک می‌کند. بررسی پروفایل بیان ژن، یک فناوری قوی است که می‌تواند بیان هزاران ژن را اندازه‌گیری کند، در نتیجه می‌تواند به محققان برای درک بهتر مکانیسم‌های بیولوژیکی کمک کند (۹، ۲۰). در واقع، با استفاده از فن‌آوری پروفایل بیان ژن، ژن‌های با بیان افتراقی و مسیرهای بالقوه مرتبط با یک بیماری یا اختلال خاص را می‌توان شناسایی کرد (۲۶). گزارش شده است که ژن‌های با بیان افتراقی را می‌توان به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص و حتی اهداف مولکولی در نظر گرفت. از این رو، فناوری‌های پروفایل بیان ژن (به

مقدمه

کم باروری به‌عنوان یک مشکل بزرگ در صنعت گاو شیری مطرح است که می‌تواند سودآوری این صنعت را تحت تاثیر قرار دهد. کم باروری می‌تواند منجر به افزایش هزینه خدمات دامپزشکی، نرخ حذف، نرخ جایگزینی و تکرار تلقیح شود (۴). در صنعت گاو شیری پارامترهای مختلفی برای تعیین باروری در تلیسه‌ها و گاوهای شیری معرفی شده است. در بین این پارامترها، نرخ آبستنی که در حقیقت تعداد گاوهای آبستن تقسیم بر تعداد کل گاوهای تلقیح شده می‌باشد به عنوان مهم‌ترین پارامتر برای قضاوت در نظر گرفته می‌شود (۱۷). به طور کلی گاو که حداقل بعد از سه بار تلقیح نتواند باردار شود به عنوان فحلی مکرر محسوب می‌شود. گاوهای فحلی مکرر، هم در گله‌های گاو شیری و هم در گله‌های گاو گوشتی، به دلیل افزایش روزهای باز و تعداد تلقیح مصنوعی منجر به زیان اقتصادی هنگفتی در دامپروری می‌شود (۱۸). علاوه بر مشکلات مدیریتی مانند عدم تشخیص دقیق چرخه فحلی و تلقیح مصنوعی نامناسب، اختلالات فیزیولوژیکی و عفونت‌های مختلف می‌تواند منجر به شکست بارداری در گاوهای فحلی مکرر شود (۱۸). گزارش شده است که مرگ جنینی دلیل اصلی نارسایی تولید مثل در گاوهای فحلی مکرر است که به طور گسترده در طول مهاجرت جنین از مجرای تخمک به رحم (۷ روز پس از تلقیح) مشاهده می‌شود (۱۵).

گردید (۲۳). تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با حداکثر تعداد تعامل کننده = ۰ و امتیاز اطمینان ≤ 0.4 انجام شد. برای مشخص کردن ماژول‌های شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، خروجی‌های پایگاه داده STRING مستقیماً به نرم‌افزار ۳۳,۹,۱ Cytoscape صادر شد و از افزونه Molecular Complex Detection (MCODE) این نرم‌افزار استفاده شد (۹).

غنی‌سازی آنتولوژی ژن و تحلیل مسیر KEGG

در مطالعه حاضر، برای انجام غنی‌سازی آنتولوژی ژن و تحلیل مسیر KEGG مربوط به ژن‌ها با بیان افتراقی، از پایگاه (<https://david.ncicrf.gov>) استفاده شد (۹). در این مورد، یک لیست از ژن‌ها با بیان افتراقی در نرم‌افزار آنلاین DAVID بارگزاری شد و گروه‌های عملکردی ژن‌ها با بیان افتراقی، شامل فرآیند بیولوژیکی، محافظه سلولی و عملکرد مولکولی تعیین شدند. همچنین $P\text{-value} \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

شناسایی ژن‌های کلیدی

به طور کلی، ژن کلیدی به عنوان یک بیومارکر مولکولی در اختلالات مختلف تعریف می‌شود که ارتباط نزدیکی با سایر ژن‌ها دارد. در مطالعه حاضر برای تعیین ژن‌های کلیدی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین از افزونه CytoHubba نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد (۷). برای انجام این کار، با استفاده از الگوریتم درجه، ژن‌های که رتبه آنها بیش از ۸ بود، به‌عنوان ژن‌های کلیدی دسته‌بندی شدند (۹).

نتایج

شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی

همانطور که گفته شد، در مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی بر اساس مقایسه ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم بارور انجام شد. با توجه به نتایج این بخش، ۱۶۹ ژن دارای معیارهای $\log_{2}FC \leq 2$ و $\text{adjusted } P\text{-value} \leq 0.05$ بودند (شکل ۱)، از این رو آن‌ها به عنوان ژن‌ها با بیان افتراقی طبقه‌بندی شدند که حاوی ۵۳ ژن با بیان بالا و ۱۱۶ ژن با بیان پایین بودند (جدول ۱).

تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و ماژول‌ها

نتایج پایگاه داده STRING که توسط نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شد نشان داد که شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین شامل ۶۴ گره و ۵۶ کمان است (شکل ۲). برای تعیین ماژول‌های شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین مربوط به ژن‌ها با بیان افتراقی، از افزونه MOCDE استفاده شد. همانطور که در جدول ۲ ذکر شده است، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین شامل ۴ ماژول بود، ماژول‌های ۱ تا ۳ دارای ۳ گره و ۳ کمان بودند در حالی که ماژول ۴ دارای ۶ گره و ۷ کمان بود (جدول ۲).

غنی‌سازی آنتولوژی ژن و تحلیل مسیر KEGG

نتایج سرور آنلاین DAVID نشان داد که ژن‌ها با بیان افتراقی در ۹ مورد فرآیند بیولوژیکی به طور معناداری غنی شده‌اند که سه مورد برتر آن‌ها

عنوان مثال، ریزآرایه) را می‌توان برای بررسی عوامل ناشناخته در صفات اقتصادی مانند باروری در گاو به کار برد. اخیراً، پروژه‌ای با استفاده از پروفایل بیان ژن برای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی در بافت عضلانی گاو برای بررسی صفت ماربلینگ انجام شده است. بر اساس نتایج این پروژه، ۴۹ ژن با بیان افتراقی و سه ژن کلیدی شامل *CISH*، *UFM1* و *TSHZ1* برای انتخاب حیوانات با صفت ماربلینگ بهتر شناسایی شده‌اند (۱۱). همچنین اخیراً مطالعه‌ای توسط قوتی و همکاران برای شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با ورم پستان ناشی از باکتری اشریشیا کلی انجام شده است. آنها ۱۵۶ ژن با بیان افتراقی، شامل ۹۵ ژن با بیان بالا و ۶۱ ژن با بیان پایین مرتبط با ورم پستان را شناسایی کردند. آنها همچنین ۶ ژن شامل *SOD2*، *COL1A2*، *COL3A1*، *ALDH18A1*، *POSTN* و *CBS* را به‌عنوان ژن‌های کلیدی برای مدیریت ورم پستان ناشی از اشریشیا کلی معرفی کردند (۹).

مطالعه حاضر به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای بیولوژیکی با استفاده از مقایسه بین گاوهای بارور و کم بارور طراحی شد. در این مورد، پروفایل بیان ژن آندومتر حاوی ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم بارور از پایگاه داده GEO جمع‌آوری شد. سپس، ژن‌ها با بیان افتراقی توسط نرم‌افزار آنلاین GEO۲R شناسایی شدند، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط پایگاه داده STRING ایجاد شد. خروجی پایگاه داده STRING برای تجزیه و تحلیل ماژول استفاده شد، همچنین تجزیه و تحلیل غنی‌سازی آنتولوژی ژن توسط سرور DAVID انجام شد. در نهایت ژن‌های کلیدی تعیین شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

برای انجام پروژه فعلی، پروفایل بیان ژن آندومتر مربوط به گاوهای بارور و کم بارور با شماره دسترسی GSE۱۰۷۷۴۱ از پایگاه داده (GEO <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) جمع‌آوری شد. لازم به ذکر است که داده‌های استفاده شده توسط پلتفرم GPL۱۱۶۴۹ ارائه شده است. علاوه بر این، داده‌های استفاده شده شامل ۶ گاو بارور و ۵ گاو کم بارور بود که با استفاده از بیوپسی در روز ۷ چرخه فعلی از بافت آندومتر جمع‌آوری شدند.

شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی

در پروژه فعلی، برای شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی، (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo۲r>) به عنوان یک ابزار آنلاین مبتنی بر R استفاده شد (۱۰). برای انجام این کار، نمونه‌ها در دو گروه بارور و کم بارور طبقه‌بندی و با استفاده از آزمون t مقایسه شدند. همچنین برای کاهش نرخ کشف کاذب از روش بنجامینی و هوچبرگ برای محاسبه مقدار P تعدیل شده استفاده شد. ذکر این نکته ضروری است که معیارهای برش $\log_{2}FC \leq 2$ و $\text{adjusted } P\text{-value} \leq 0.05$ بودند.

تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و ماژول‌ها

برای تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، ژن‌ها با بیان افتراقی در پایگاه داده STRING (<https://string-db.org>) بارگزاری

فعال کلسیم شرکت کننده در عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی شناخته می‌شود. با توجه به نقش مستقیم Ca^{2+} در باروری گاوهای شیری از طریق کنترل تعادل انرژی منفی، پاسخ‌های ایمنی و انقباض رحم، هرگونه تغییر در غلظت این یون می‌تواند منجر به ناباروری در گاوهای شیری شود (۱۴).

نتایج تجزیه و تحلیل مسیر نشان داد که به ترتیب چرخه وزیکول سیناپسی با ۵ ژن و مسیرهای متابولیک با ۱۹ ژن (جدول ۶) به عنوان معنادارترین مسیرهای بیولوژیکی ژن‌ها با بیان افتراقی بودند. بر اساس نتایج شناسایی ژن‌های کلیدی، پنج ژن شامل *Syt1*، *HABP2*، *MTTGAM*، *CHGA* و *TAT* به عنوان ژن کلیدی پیش‌بینی شدند. *Syt1* (synaptotagmine) یک پروتئین غشایی وزیکول سیناپسی حاوی دمین C2 است که می‌تواند با استفاده از این دمین به Ca^{2+} سیتوپلاسمی متصل شود. از این رو، به نظر می‌رسد که پروتئین *Syt1* قادر به تحریک آگروسیتوز وابسته به کلسیم در وزیکول‌های سیناپسی است (۱۹). به طور کلی *Syt1* از ۱۶ ایزوفرم (*Syt1-16*) تشکیل شده است که می‌توان آن‌ها را در بافت‌ها و اندام‌های مختلف (به ویژه سیستم عصبی) حیوانات، انسان و حتی موش را ردیابی کرد (۶، ۸، ۲۲). گزارش شده است که در موش، *Syt1* به عنوان یک تنظیم کننده مهم عمل می‌کند که می‌تواند تخمدان را با استفاده از آگروسیتوز گرانول‌های قشر مغز و تولید سیگنال‌های Ca^{2+} فعال کند. علاوه بر این، *Syt1* به عنوان حسگر Ca^{2+} قادر است انتقال دهنده‌های عصبی را آزاد کند، در نتیجه این پروتئین نقش مهمی در رویان‌زایی دارد (۲۵).

همچنین *MITGAM* پروتئینی است که در پاسخ‌های التهابی واسطه می‌شود. بر اساس مطالعه‌ای که روی موش انجام شده است، مشخص شده است که بیان این پروتئین می‌تواند به رحم در حفظ لانه‌گزینی کمک کند (۲۱).

پروتئین اتصال هیالورونان ۲ (*HABP2*) پروتئینی است که به طور گسترده در آندومتر رحم یافت می‌شود. به نظر می‌رسد این پروتئین نقش مهمی در لانه‌گزینی داشته باشد، به طوری که بیان ژن *HABP2* در موارد سقط در حین لانه‌گزینی به شدت کاهش می‌یابد (۲، ۵).

گزارش شده است که *CHGA* یک پروتئین مرتبط با فرآیند سیستم ایمنی است که فعالیت ضد میکروبی نشان می‌دهد. همچنین تأیید شده است که این پروتئین نقش مهمی در متابولیسم کلسیم و گلوکز دارد، از این رو این نظریه تقویت شده است که *CHGA* نقش مهمی در تقسیم سلولی و متابولیسم جنین دارد (۱۶).

TAT (تیروزین آمینوترانسفراز) یک آنزیم فعال در متابولیسم اسیدهای آمینه است. این آنزیم به وفور در کبد یافت می‌شود و اخیراً در اندام‌های تناسلی مانند بیضه، تخمدان و لوله فالوپ ردیابی شده است. به نظر می‌رسد که آنزیم *TAT* قادر به تحریک سنتز هورمون‌های استروئیدی (مانند استروژن و پروژسترون) است بنابراین ارتباط مستقیمی در عملکرد تولید مثلی هر دو جنس دارد (۱۲، ۱۳).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج ما، ترشح ناقل عصبی، فضای خارج سلولی، اتصال گیرنده، مسیرهای متابولیک به ترتیب معنادارترین ترم‌های فرآیند بیولوژیکی، بخش سلولی، عملکرد مولکولی و مسیر بیولوژیکی بودند. علاوه بر این،

شامل ترشح انتقال دهنده عصبی، پاسخ دفاعی به باکتری گرم منفی/ مثبت و پاسخ هومورال ضدقارچی است (جدول ۳). همچنین فضای خارج سلولی، ناحیه خارج سلولی و غشای وزیکول سیناپسی به عنوان ترم‌های معنادار مولفه سلولی ژن‌ها با بیان افتراقی شناسایی شدند (جدول ۴). ترم‌های معنی‌دار عملکرد مولکولی در جدول ۵ فهرست شده‌اند، طبق فهرست، فعالیت استروئید دهیدروژناز، اتصال یون و اتصال گیرنده کلسیم معنادارترین ترم‌های بودند (جدول ۵). در نهایت، بر اساس تجزیه و تحلیل مسیر KEGG، چرخه وزیکول سیناپسی و مسیرهای متابولیک به عنوان معنادارترین مسیرهای ژن‌ها با بیان افتراقی شناسایی شدند (جدول ۶).

شناسایی ژن کلیدی

همانطور که گفته شد، در پروژه فعلی برای شناسایی ژن کلیدی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین مربوط به ژن‌ها با بیان افتراقی، از افزونه CytoHubba استفاده شده است. نتایج این تجزیه و تحلیل نشان داد که *SYT1*، *HABP2*، *ITGAM*، *CHGA* و *TAT* به ترتیب ۵ ژن کلیدی برتر بودند که بر اساس الگوریتم درجه رتبه‌بندی شدند (جدول ۷). نتایج نشان داد که از بین ۵ ژن برتر، *SYT1* و *CHGA* متعلق به ماژول ۴، *ITGAM* به ماژول ۲ و *HABP2* متعلق به ماژول ۱ بود در حالی که ژن *TAT* در هیچ ماژولی یافت نشد (جدول ۷).

بحث

به طور کلی، شکست در باروری نه تنها به عنوان مهم‌ترین عامل زیان اقتصادی شناخته می‌شود، بلکه به عنوان یک محدودیت عمده برای دستیابی به حداکثر بازده در صنعت گاو شیری تلقی می‌شود (۲۷). بنابراین شناسایی عوامل مرتبط با این موضوع می‌تواند برای نجات صنعت گاو شیری حیاتی باشد. نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که ژن‌ها با بیان افتراقی در فرآیندها و مسیرهای بیولوژیکی مختلف شرکت داشتند. بر اساس نتایج ما، ترشح ناقل عصبی با سه ژن شامل *CACNA1B*، *NRXN2*، و *SYT1* به عنوان معنادارترین فرآیند بیولوژیکی ژن‌ها با بیان افتراقی شناسایی شد (جدول ۳). در حقیقت، انتقال‌دهنده عصبی یک سیگنال شیمیایی است که در قسمت‌های مختلف بدن یافت می‌شود. این سیگنال‌های شیمیایی قادر به تحریک و کنترل فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف مانند خواب، اشتها، ضربان قلب، تنفس و غیره هستند. گزارش نشان می‌دهد بلوغ اووسیت‌ها و فرآیند رویان‌زایی به طور چشمگیری وابسته به ترشح انتقال دهنده‌های عصبی است. لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باروری گاو شیری به موفقیت در ترشح انتقال دهنده‌های عصبی بستگی دارد (۱).

نتایج پروژه حاضر نشان داد که فضای خارج سلولی با ۲۷ ژن (جدول ۴) معنادارترین جزء سلولی ژن‌ها با بیان افتراقی را دارد. علاوه بر این، فعالیت استروئید دهیدروژناز و اتصال یون کلسیم به عنوان معنادارترین ترم عملکرد مولکولی شناسایی شدند (جدول ۵). به طور کلی، کلسیم سرم به سه شکل شامل فرم یونی (Ca^{2+})، کلسیم کمپلکس با فرم آنیون و کلسیم متصل به پروتئین‌ها یافت می‌شود (۳). در بین این سه شکل، Ca^{2+} که ۵۰ درصد کل کلسیم سرم را تشکیل می‌دهد، به عنوان شکل

12-Edge.

13-Terms.

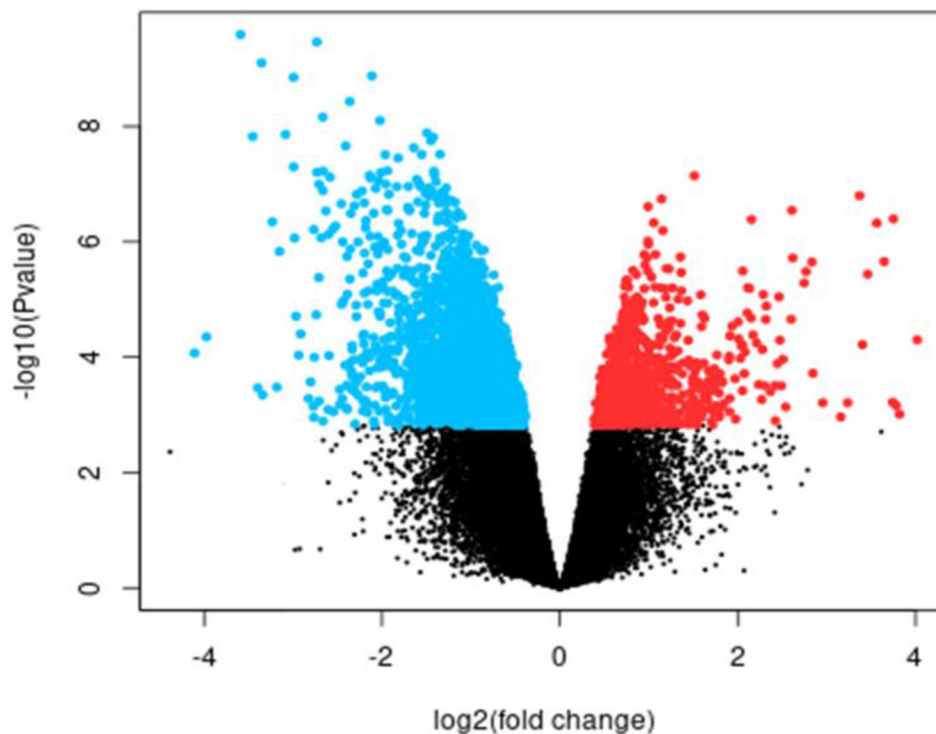
منابع مورد استفاده

- 1- Alhajeri, M. M., R. R. Alkhanjari, R. Hodeify, A. Khraibi and H. Hamdan. 2022. Neurotransmitters, neuropeptides and calcium in oocyte maturation and early development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10.
- 2- Altmäe, S., M. Koel, U. Võsa, P. Adler, M. Suhorutšenko, T. Laisk-Podar, V. Kukushkina, M. Saare, A. Velthut-Meikas and K. Krjutškov. 2017. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Scientific reports* 7: 10077.
- 3- Arechiga-Flores, C. F., Z. Cortés-Vidauri, P. Hernández-Briano, R. R. Lozano-Domínguez, M. A. López-Carlos, U. Macías-Cruz and L. Avendaño-Reyes. 2022. Hypocalcemia in the dairy cow. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 13: 1025-1054.
- 4- Beerda, B., J. Wyszynska-Koko, M. Te Pas, A. De Wit and R. Veerkamp. 2008. Expression profiles of genes regulating dairy cow fertility: recent findings, ongoing activities and future possibilities.

باروری بودند که می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی مناسب در برنامه‌های اصلاحی و مدیریت تولید مثل گاوداری‌ها معرفی شوند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی برای افزایش دقت آزمایش و حصول اطمینان بیشتر، تعداد نمونه‌های بارور و کم بارور بیشتری بررسی شود و همچنین میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در گله‌های حاوی رکورد نیز بصورت کمی بررسی شود.

پاورقی‌ها

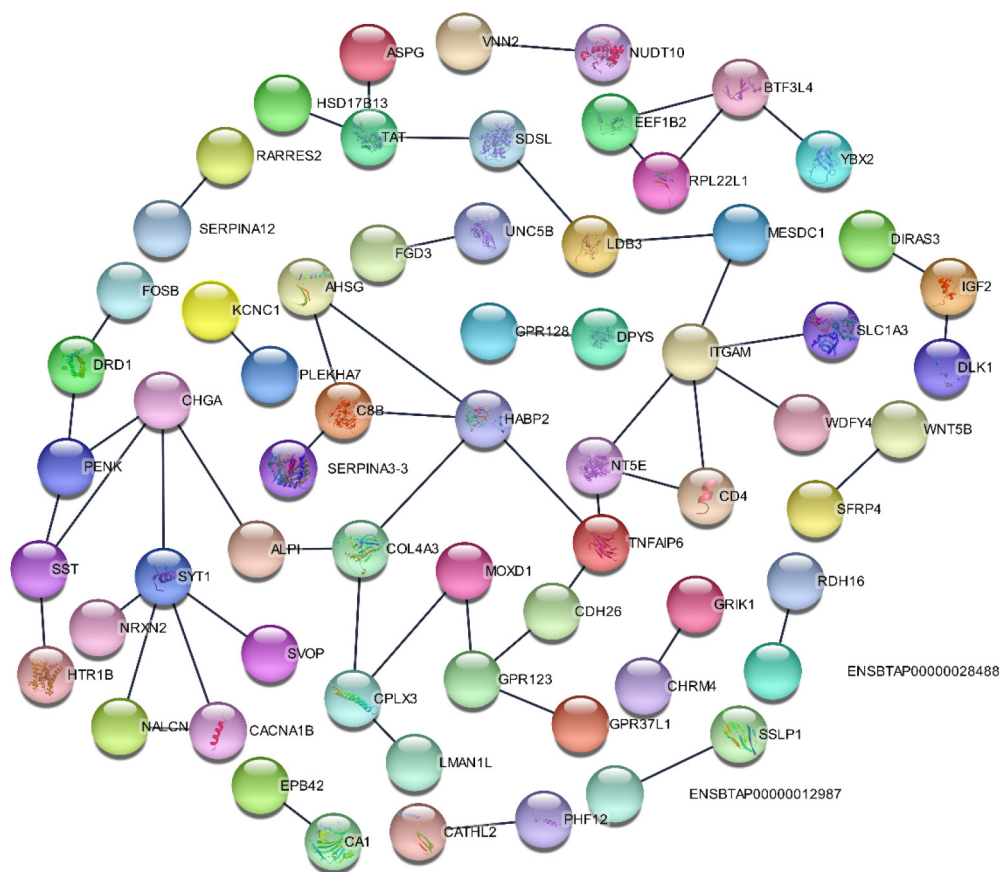
- 1-Pregnancy Rate.
- 2-Repeat Breeder.
- 3-Differentially Expressed Gene.
- 4-False Discovery Rate.
- 5-Benjamini & Hochberg Procedure.
- 6-Plugin.
- 7-Gene Ontology Enrichment.
- 8-Hub Genes.
- 9-Up-Regulated Genes.
- 10-Down-Regulated Genes.
- 11-Node.



شکل ۱- نمودار آتشفشانی ژن‌ها با بیان افتراقی که بر اساس مقایسه بین نمونه‌های بارور و کم بارور ایجاد شده است. ژن‌های با بیان بالا با نقاط قرمز نشان داده شده‌اند در حالی که ژن‌های با بیان پایین با نقاط آبی نمایش داده شده‌اند.

جدول ۱- فهرست ژن‌ها با بیان افتراقی انتخاب شده بر اساس $\log_{2}FC$ و adjusted P-value .

فهرست ژن‌ها با بیان پایین	فهرست ژن‌ها با بیان بالا
<p>KCNC1, SLC22A4, LOC616705, LOC614021, GLIPR2, YBX2, AKR1C2, TMPRSS15, LOC78887, RARRES2, C1orf85, HSD17B2, LOC59660, NCAN, CDH26, LBP, NALCN, ZAR1, TNFAIP6, C16H10ORF65, AHSG, MGC151949, ITGAM, TMEM30C, LOC54104, ATG16L2, S100A16, FGD3, SVOP, ATP6V1B2, ORYZ1, GSG1L, LHFPL3, GPR128, WDFY4, LFNG, LOC517043, DRD1, FGL1, HTR1B, GEMIN1, BEX2, ALPI, LOC517426, MESDC1, SERPINA3-3, LOC519952, EEF1B2, CAB, EPHB1, FXDY2, OAZ2, FXDY2, LOC616233, PFAS, BEND2, DLK1, FBRS, SERPINA2, GPR37L1, SEC14L2, ADIG, SLC5A5, SCGB1A1, CD164L2, SHPK, GPR123, NRXN2, KRT35, BTF3L4, METTL2B, SPTBN2, LDB3, LOC614476, MSFA15, PHF12, PLAYGF, CHST10, LOC615152, CHST3, ASPG, MAN2B2, DUSP4, CDK1V, LOC78248, LOC615365, CACNA1B, SDSL, FOSB, U2AF2, ERF, LOC50842, LOC78279, COCH, CHRM4, RPL22L1, PLACA, PLACA, NUMB, CHGA, CNTFR, CCDC13, DPYS, RDH16, NUDT10, TAT, LOC61802, PLAYGF, HSD17B13, SCAR2, GSTA1, HABP2, DIRAS2, CPLX2, CHST8, LMAN1</p>	<p>IGF2, EPB42, CATHL2, PYGO1, CDF, GRIK1, REEP2, LOC10140757, SST, PHLDB1, MYCBPAP, LOC613333, PLEKHA7, LOC78279, SPC24, HAAO, WNT5B, SLC1A3, BSP2, BDAY2, TFAP2C, CLCN2, UNC5B, TMEM217, TYRP1, SYT1, GDF10, SSLP1, LOC78279, SFRP2, CA1, COL4A3, LOC541059, SFRP2, NT5E, CLIC2, LOC517464, COL4A2, MOXD1, RPSP, GOLGA7, LOC78279, LOC78279, VNN2, NT5E, MOXD1, WISP2, UPK1B, ASGR2, CDH1V, MOXD1, PENK, CNGA1</p>



شکل ۲- شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌ها با بیان افتراقی در پایگاه داده STRING.

جدول ۲- ماژول‌های‌های شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌ها با بیان افتراقی.

امتیاز	تعداد کمان	تعداد گره	نام ژن	ردیف
۳	۳	۳	HABP2, AHSG, CAB	۱
۳	۳	۳	CD4, NT5E, ITGAM	۲
۳	۳	۳	EEF1B2, BTF3L4, RPL22L1	۳
۲/۸	۷	۶	CHGA, SYT1, CACNA1B, PENK, SST, NALCN	۴

جدول ۳- فهرست ترم‌های آنتولوژی ژن غنی شده در فرآیند بیولوژیکی ژن‌ها با بیان افتراقی.

P-value	تعداد ژن	توضیحات	ترم	رتبه بندی
۰/۰۰۸	۳	ترشح ناقل عصبی	GO:۰۰۰۷۲۶۹	۱
۰/۰۱۱	۴	پاسخ دفاعی به باکتری گرم منفی	GO:۰۰۵۰۸۲۹	۲
۰/۰۲۴	۴	پاسخ دفاعی به باکتری گرم مثبت	GO:۰۰۵۰۸۳۰	۳
۰/۰۳۴	۲	پاسخ هومورال ضد قارچی	GO:۰۰۱۹۷۳۲	۴
۰/۰۴۲	۴	درک حسی صدا	GO:۰۰۰۷۶۰۵	۵
۰/۰۴۷	۲	آکسونوژنز نورون برون ریز سیستم عصبی مرکزی	GO:۰۰۲۱۹۵۲	۶
۰/۰۴۷	۲	منطقه حاشیه ای B تمایز سلول های	GO:۰۰۰۲۳۱۵	۷
۰/۰۴۷	۳	پاسخ به محرک	GO:۰۰۵۰۸۹۶	۸
۰/۰۴۹	۳	مدولاسیون انتقال سیناپسی	GO:۰۰۵۰۸۰۴	۹

جدول ۴- فهرست ترم‌های آنتولوژی ژن غنی شده در مولفه سلولی ژن‌ها با بیان افتراقی.

P-value	تعداد ژن	توضیحات	ترم	رتبه بندی
۰/۰۰۰	۳	فضای خارج سلولی	GO:۰۰۰۵۶۱۵	۱
۰/۰۰۸	۴	منطقه خارج سلولی	GO:۰۰۰۵۵۷۶	۲
۰/۰۰۸	۴	غشای وزیکول سیناپسی	GO:۰۰۲۰۶۷۲	۳
۰/۰۰۹	۲	غشاء	GO:۰۰۱۶۰۲۰	۴
۰/۰۲۳	۴	سطح سلول	GO:۰۰۰۹۹۸۶	۵
۰/۰۲۷	۲	ماتریکس خارج سلولی	GO:۰۰۳۱۰۱۲	۶
۰/۰۴۴	۲	غشای گلژی	GO:۰۰۰۰۱۳۹	۷

Animal 2: 1158-1167.

5- Bersinger, N. A., D. M. Wunder, M. H. Birkhäuser and M. D. Mueller. 2008. Gene expression in cultured endometrium from women with different outcomes following IVF. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 14: 475-484.

6- Chapman, E. R. 2008. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem* 77: 615-641.

7- Chin, C.-H., S.-H. Chen, H.-H. Wu, C.-W. Ho, M.-T. Ko and C.-Y. Lin. 2014. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology* 8: 1-7.

8- Craxton, M. 2004. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC genomics* 5: 1-14.

9- Darang, E., Z. Pezeshkian, S. Z. Mirhoseini and S. Ghovvati.

2022. Identification of Key Genes and Potential Pathways Associated with Mastitis Induced by E. coli. *Biochemical Genetics*: 1-19.

10- Davis, S. and P. S. Meltzer. 2007. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 23: 1846-1847.

11- Fonseca, L. F. S., D. B. dos Santos Silva, D. F. J. Gimenez, F. Baldi, J. A. Ferro, L. A. L. Chardulo and L. G. de Albuquerque. 2020. Gene expression profiling and identification of hub genes in Nellore cattle with different marbling score levels. *Genomics* 112: 873-879.

12- Ju, X., Z. Wang, D. Cai, H. Xu, S. F. Bello, S. Zhang, W. Zhu, C. Ji and Q. Nie. 2023. TAT gene polymorphism and its relationship with production traits in Muscovy ducks (*Cairina Moschata*).

جدول ۵- فهرست ترم‌های آنتولوژی ژن غنی شده در عملکرد مولکولی ژن‌ها با بیان افتراقی.

رتبه بندی	ترم	توضیحات	تعداد ژن	P-value
۱	GO:۰۰۱۶۲۲۹	فعالیت استروئید دهیدروژناز	۳	۰/۰۰۳
۲	GO:۰۰۰۵۵۰۹	اتصال یون کلسیم	۱۱	۰/۰۰۵
۳	GO:۰۰۰۵۱۰۲	اتصال گیرنده	۶	۰/۰۰۷
۴	GO:۰۰۰۵۱۷۸	اتصال اینتگرین	۴	۰/۰۲۵
۵	GO:۰۰۴۵۲۹۶	اتصال کادرین	۳	۰/۰۴۵

جدول ۶- تجزیه و تحلیل مسیرهای KEGG ژن‌ها با بیان افتراقی.

رتبه بندی	ترم	توضیحات	تعداد ژن	P-value
۱	bta۰۴۷۲۱	چرخه وژیکول سیناپسی	۵	۰/۰۰۱
۲	bta۰۱۱۰۰	مسیرهای متابولیک	۱۹	۰/۰۱۲

جدول ۷- فهرست ژن‌های کلیدی رتبه‌بندی شده بر اساس الگوریتم درجه.

رتبه بندی	نام ژن	درجه	ماژول
۱	SYT۱	۵	۴
۲	ITGAM	۵	۲
۳	HABP۲	۴	۱
۴	CHGA	۴	۴
۵	TAT	۳	-

- Poultry Science 102: 102551.
- 13- Liu, G., M. Zeng, X. Li, Y. Rong, Z. Hu, H. Zhang and X. Liu. 2021. Expression and analysis of ESR1, IGF-1, FSH, VLDLR, LRP, LH, PRLR genes in Pekin duck and Black Muscovy duck. *Gene* 769: 145183.
- 14- Mahen, P. J., H. J. Williams, R. F. Smith and D. Grove-White. 2018. Effect of blood ionised calcium concentration at calving on fertility outcomes in dairy cattle. *Veterinary Record* 183: 263-263.
- 15- Matsuyama, S., T. Kojima, S. Kato and K. Kimura. 2012. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10: 1-10.
- 16- Mullen, M. P., G. Elia, M. Hilliard, M. H. Parr, M. G. Diskin, A. C. Evans and M. A. Crowe. 2012. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. *Journal of proteome research* 11: 3004-3018.
- 17- Norman, H., L. Walton and J. Dürr. 2017. Reproductive status of cows in Dairy Herd Improvement programs and bred using artificial insemination. Council on dairy cattle breeding (CDCB) website [Accessed on 2020 Apr 20] <https://queries.uscdcb.com/publish/dhi/current/reproall.html>.
- 18- Perez-Marin, C. C., L. Molina Moreno and C. Vizuete. 2012. Clinical approach to the repeat breeder cow syndrome. *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*: 337-362.
- 19- Perin, M. S., V. A. Fried, G. A. Mignery, R. Jahn and T. C. Südhof. 1990. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345: 260-263.
- 20- Pezeshkian, Z., S. Z. Mirhoseini and S. Ghovvati. 2022. Identification of hub genes involved in apparent metabolizable energy of chickens. *Animal Biotechnology* 33: 242-249.
- 21- Rosetti, F., A. de la Cruz and J. C. Crispín. 2019. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology* 31: 185-192.
- 22- Saheki, Y. and P. De Camilli. 2017. The extended-synaptotagmins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1864: 1490-1493.
- 23- Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris and P. Bork. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research* 47: D607-D613.
- 24- Wolf, E., S. Hiendleder, S. Bauersachs, T. Fröhlich, F. Sinowatz, H. Blum and G. J. Arnold. 2006. Methods for transcriptome and proteome research: applications for studying the biology of reproduction in cattle. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 119: 7-16.
- 25- Xiu-Lan, Z., L. Shi-Fen, Z. Xi-Qian, X. Hong, L. Yan-Qun, Y. Yan-Hong, L. Li-Juan, Z. Chun-Hui, S. Heide and L. Feng-Hua. 2020. Synaptotagmin 1 regulates cortical granule exocytosis during mouse oocyte activation.
- 26- Yang, W., J. Ma, W. Zhou, Z. Li, X. Zhou, B. Cao, Y. Zhang, J. Liu, Z. Yang and H. Zhang. 2019. Identification of hub genes and outcome in colon cancer based on bioinformatics analysis. *Cancer Management and Research* 11: 323.
- 27- Zekarias, T., E. Demissie, W. Ahmed, T. Dema and A. Amsalu. 2019. Non-Infectious Causes of Infertility in Dairy Cows: A Review *Journal of Reproduction and Infertility* 10: 51-57.

