مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۱ شماره ۲/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۴۵ تا ۵۶

DOI: 10.22034/AS.2021.32082.1485

برازش شبکه‌ی برهمکنش عوامل رونویسی مؤثّر بر نرخ تخمک‌گذاری و ژن‌های شناسایی شده با استفاده از تحلیل پروموتردر گاو

سیّد همایون فرهنگ فر[۱]، علی توانا[۲] و الهام بهدانی[۳*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۶

[۱] استاد بخش علوم دام دانشگاه بیرجند

[۲] دانشجوی کارشناسی‌ارشد بخش علوم دام دانشگاه بیرجند

[۳] مدرّس مدعو بخش علوم دام دانشگاه بیرجند

[*] مسؤول مکاتبه: Email: el_behdani86@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: اهمیّت صفات تولیدمثلی، با توجّه به اثر مستقیم بر سودآوری واحدهای پرورشی، روز به روز بیشتر می‌گردد. یکی از این صفات، نرخ تخمک‌گذاری است. **روش کار**: در این پژوهش، با استفاده از تحلیل ناحیه‌ی آغازگر ژن‌های کاندید مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری، به شناسایی ژن‌های کاندید جدید و بررسی سازوکارهای مولکولی مرتبط با این صفت پرداخته شد. برای این منظور، ابتدا ژن‌های کاندید مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری، از پایگاه اطّلاعاتی NCBI استخراج گردیدند. سپس به‌کمک نرم‌افزار Genomatix، عوامل رونویسی که بر ناحیه‌ی آغازگر، جایگاه اتّصال داشتند، مورد کاوش قرار گرفتند. ناحیه‌ی آغازگر تمامی ژن‌ها در رابطه با عوامل رونویسی به‌دست آمده از مرحله‌ی قبل، مورد بررسی قرار گرفت و آن دسته از ژن‌هایی که برای عوامل رونویسی، جایگاه اتّصال داشتند، به‌عنوان ژن‌های کاندید احتمالی در رابطه با نرخ تخمک-گذاری، گزارش گردیدند. به‌منظور بررسی مهمترین عوامل رونویسی و مؤثّرترین ژن‌های هدف آن‌ها، از بازسازی شبکه‌ی برهمکنش پروتئینی با استفاده از پایگاه اطّلاعاتی STRING استفاده گردید. مسیرهای زیستی مؤثّر بر نرخ تخمک‌گذاری نیز با استفاده از پایگاه اطّلاعاتی comparative GO مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج**: نتایج نشان داد عوامل رونویسی مؤثّر بر بیان ژن‌های شناسایی شده بر نرخ تخمک‌گذاری، می‌تواند بیان ۵۱ ژن دیگر را سبب گردد. برازش شبکه‌ی برهمکنش عوامل رونویسی و ژن‌های هدف آن‌ها، نشان داد عوامل رونویسی E2F1 و TFDP1 از مهمترین عوامل رونویسی مؤثّر بر بیان ژن‌های کنترل کننده تخمک‌گذاری می‌باشند و دو ژن CAV1 و RANBP1 نیز به‌عنوان مهمترین ژن‌های هدف عوامل رونویسی، مطرح گردیدند. این ژن‌ها در تمایز سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی و تنظیم رونویسی در تخمک نقش دارند. **نتیجه‌گیری**: بر اساس نتایج این پژوهش، مهمترین سازوکارهای مولکولی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری مسیرهای سیگنالدهی JAK-STAT، تیروزین کیناز، مسیر زیستی مرتبط با عامل رشد بتا، مهاجرت سلولی و مسیرهای زیستی مرتبط با JNK بودند که از جنبه‌های مختلف، تخمک‌گذاری را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

واژگان کلیدی: مسیرهای زیستی، ژن‌های کاندید، تحلیل ناحیه‌ی آغازگر، شبکه‌ی برهمکنش پروتئینی

مقدّمه

تولیدمثل در پرورش دام‌های اهلی از اهمیّت بالایی برخوردار است. توجّه به این موضوع، بسیار حائز اهمیّت است، زیرا به‌طور مستقیم، سودآوری صنعت دامپروری را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. یکی از مسیرهای فزونی عملکرد تولیدمثلی در بین حیوانات اهلی، افزایش نرخ تخمک‌گذاری در بین حیوانات اهلی کم جثّه (مانند گوسفند، بز و خوک و..) و آگاهی دقیق از زمان تخمک-گذاری و همزمان‌سازی تخمک‌گذاری در حیوانات اهلی بزرگ مانند گاو است. یکی از روش‌های افزایش نرخ تخمک‌گذاری، تزریقات هورمونی است که سبب ایجاد چندتخمک‌گذاری می‌شود. استفاده از این روش، نه تنها جنین، بلکه منتج به تخم‌های لقاح نشده (اووسیت) از مادران برتر و ممتاز می‌شود (اسپریگو و همکاران ۲۰۱٤).

تغذیه نیز بر فرآیندهای وابسته به تخمک‌گذاری نقش به-سزایی دارد. تحقیقات متعدّدی نشان داده است که شرایط تغذیه‌ای ممکن است بر عملکرد تولیدمثل پستانداران اهلی اثر گذارد، به‌طوری که نگهداری سطوح معمول تغذیه‌ای برای عملکرد مناسب تخمدان، بسیار مهم گزارش شده است (کاواشیما و همکاران ۲۰۱۲). به‌دلیل ارزش و اهمیّت ویژه‌ای که تولیدمثل دارد، انجام هرگونه پژوهشی در راستای افزایش عملکرد تولیدمثل از اهمیّت خاصّ برخوردار است که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تولید-مثل، بررسی راه‌های افزایش تخمک‌گذاری در بین حیوانات مزرعه‌ای است.

گرچه عوامل متعدّدی بر روی رحم و جنین در طول دوران آبستنی اثر می‌گذارند (که در تعداد نوزادان سالم به‌دنیا آمده نقش دارند) امّا میزان تخمک‌گذاری مهمترین ویژگی در تعیین راندمان تولیدمثل است. روند تخمک-گذاری یک واکنشی زیستی- التهابی و مرتبط به هماهنگی فعالیّت هورمون‌های استروئیدی و گنادوتروپین‌ها است. فزون‌بر آن، واسطه‌های درگیر در واکنش‌های التهابی همچون پروستاگلاندین‌ها، لپتین، اکساید، سایتوکین‌ها و ... در آن دخالت دارند. این فرآیند زیستی، با از سرگیری میوز، پاره شدن سطح فولیکول، آزاد شدن تخم بالغ دارای قابلیّت باروری و تشکیل دوباره ساختار دیواره فولیکولی، انجام می‌شود. آشنایی با تنظیم‌گرهای تخمک-گذاری، هورمون‌ها، اصول تغذیه‌ای یا انتخاب ژنتیکی، از موارد مهم در ارتباط با تخمک‌گذاری است.

پژوهش‌های مختلفی در جهت روشن‌تر شدن جنبه‌های ژنتیکی و تعیین ژن‌هایی مؤثّر بر فرآیندهای فیزیولوژی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری انجام شده اند. عوامل رشد تخمدان شامل یک سری پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوان[1] می‌باشند که نقش مهمی در تخمک‌گذاری و میزان چندقلویی دارد. از مهمترین این پروتئین‌ها می‌توان به BMP15، GDF9 و BMPR1B اشاره کرد (پرامود و همکاران ۲۰۱۳). این پروتئین‌ها نقش خود را به‌صورت وابسته و مستقل از اثر گنادوتروپین‌ها می‌گذارند. گیرنده پروژسترون گاوی، یکی دیگر از پروتئین‌های مهمی می-باشد که بر نرخ تخمک‌گذاری اثرگذار است. حضور چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در اینترون سوم و چهارم این ژن، با میزان پاسخ‌گویی دام به تیمارهای مرتبط به تخمک‌گذاری وابسته است (یانگ و همکاران ۲۰۱۱). سطوح آنتی مولریان هورمون موجود در گردش خون نیز به‌طور مؤثّری می‌تواند جمعیّت فولیکولی را کنترل کند و بر میزان تخمک‌گذاری مؤثّر باشد (باروسلی و همکاران ۲۰۱۵). از این عامل به‌عنوان یک زیست نشانگر در فنّ-آوری‌های تولیدمثلی و تقویّت باروری در گاو بهره می-برند. جهش در برخی دیگر ژن‌ها مانند عامل رشد تبدیل بتا[2] ژن FecX2 و B4GALNT2 نیز در نرخ تخمک‌گذاری، با اهمیّت شمرده شده است (کومار و همکاران ۲۰۱۷). آنالیزهای ژنومی نشان داد که انتخاب برای صفات مرتبط با باروری (مانند تخمک‌گذاری، انتقال جنین) امکان‌پذیر می‌باشد. به‌کمک تحلیل ژنومی، وراثت‌پذیری برای این صفات از کم تا متوسّط برآورد می‌گردد. این

[1] Bone morphogenetic proteins (BMPs)

[2] Transforming growth factor-β (TGFβ)

پژوهش‌ها نشان داد که برخی مناطق ژنومی مرتبط با صفات تخمک‌گذاری با صفات تولیدمثلی دیگر مانند انتقال جنین همپوشانی دارد (گادیس و همکاران ۲۰۱۷).
برخی از ژن‌ها که محصول پروتئنی آن‌ها در سلول به عنوان عوامل رونویسی عمل می‌کنند، می‌توانند چگونگی بروز صفات را تحت تأثیر قرار دهند. این پروتئین‌ها بر روی توالی آغازگر برخی از ژن‌ها، جایگاه اتّصال دارند و با متّصل شدن به این جایگاه‌ها، اثر کنترلی بر روی میزان بیان ژن‌های هدف خود دارند. از این عوامل رونویسی می‌توان به ATF4 اشاره کرد که در فرآیند تخمک‌گذاری اثر مستقیم دارد (دای و همکاران ۲۰۱۸).
با توجّه به اهمیّت تخمک‌گذاری و شناسایی زیست نشانگرهای مرتبط با این فرآیند فیزیولوژی، در این پژوهش به‌کمک تحلیل ناحیه‌ی آغازگری ژن‌های کاندید برای این صفت، به شناسایی سایر ژن‌های احتمالی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری در گاو پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جستجوی ژن‌های کاندید شناسایی شده در رابطه نرخ تخمک‌گذاری در گاو

جهت شناسایی ژن‌های جدید مربوط به نرخ تخمک‌گذاری، با استفاده از داده‌کاوی ناحیه‌ی آغازگری، ابتدا به کاوش ژن‌های کاندید مرتبط با این فرآیند فیزیولوژی پرداخته شد. این ژن‌های کاندید در پژوهش‌ها قبلی به‌صورت آزمایشگاهی و یا آنالیزهای بیوانفورماتیکی اثرشان بر روی تخمک‌گذاری گاو مهم شناخته شده‌اند. این جستجو از طریق پایگاه اطّلاعاتی NCBI انجام شد. ژن‌هایی در الویّت آنالیز قرار گرفتند که بیانشان در تخمدان بیشتر گزارش شده بودند و در مسیرهای زیستی مربوط به تخمک‌گذاری، اثرگذار باشند.

بررسی الگوی اتّصال عوامل رونویسی به ژن‌های نشاگر مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری

برای شناسایی سایر ژن‌های مهم در تخمک‌گذاری که تاکنون در رابطه با نرخ تخمک‌گذاری شناخته نشده‌اند، ازآنالیز آغازگر ژن‌های کاندید شناسایی شده استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا توالی آغازگری ژن‌های کاندید به‌دست آمده در مرحله قبل، با استفاده ازنرم‌افزار اینترنتی Genomatix استخراج شد. پس از به‌دست آوردن آغازگر، به بررسی تنوّع و محل اتّصال عوامل رونویسی به ناحیه آغازگری ژن‌ها، با استفاده از Frameworker پرداخته شد. در انتهای این مرحله، الگوی اتّصال عوامل رونویسی به آغازگر ژن‌های کاندید مرتبط با تخمک-گذاری حاصل شد. از میان تمامی الگوی‌های اتّصال عوامل رونویسی، آن‌هایی که سه جزئی بودند و یا به-عبارت دیگر اتّصال همزمان سه عامل رونویسی به آغازگر ژن‌های کاندید وجود داشت، در مرحله‌ی بعد مورد استفاده قرار گرفت.

برازش الگوی اتّصال عوامل رونویسی بر روی آغازگر ژن‌های گاو

الگوی اتّصال عوامل رونویسی سه جزئی به‌دست آمده از مرحله‌ی قبل بر روی پروموتر کل ژن‌های گاو با استفاده از ModelInspector مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله، ژن‌هایی که در ناحیه‌ی آغازگری خود، این الگوی اتّصال عوامل رونویسی را داشتند، به‌عنوان ژن-های کاندید احتمالی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری در مرحله‌ی بعد مورد استفاده قرار گرفتند. با توجّه به شباهت ناحیه‌ی پروموتری این ژن‌های به دست آمده از این مرحله، با ژن‌های کاندید مرتبط با تخمک‌گذاری، احتمالاً ژن‌های به‌دست آمده در این مرحله، در تخمک-گذاری گاو، اثر مهمی داشته باشند.

بازسازی شبکه برهمکنش پروتئین‌های مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری

به‌منظور تأیید هم‌بیانی ژن‌های به‌دست آمده از مرحله‌ی قبل، با استفاده از پایگاه داده STRING (به آدرس https://string-db.org/) ارتباطات بین عوامل رونویسی و ژن‌های هدف، در این مرحله بررسی شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار cytoscape (3.6.0) شبکه برهمکنش عوامل رونویسی و ژن‌های هدف ترسیم گردید.

بررسی مسیرهای زیستی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری

به‌منظور بررسی سازوکارهای فیزیولوژی احتمالی مرتبط با تخمک‌گذاری، هستی‌شناسی ژن با استفاده از ژن‌های به‌دست آمده از مرحله‌ی قبلی به‌کمک پایگاه اطّلاعاتی comparative GO (به آدرس www.comparativego.com) انجام شد.

نتایج

در این پژوهش، جهت شناسایی مهمترین برنامه‌های سلولی و مسیرهای زیستی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری، ابتدا به شناسایی ژن‌های کاندید مرتبط با این صفت از طریق پایگاه اطّلاعاتی NCBI به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ و با استفاده از لینک GENE پرداخته شد. خروجی این مرحله در جدول ۱ آورده شده است.

Table 1- Candidate genes associated with ovulation rate of cattle in NCBI database

Gene ensemble ID	Gene symbol	Entrez gene ID
ENSBTAG00000005077	CXCL12	613811
ENSBTAG00000017869	CAV1	281040
ENSBTAG00000002912	INHBA	281867
ENSBTAG00000008096	EDN1	281137
ENSBTAG00000001060	CXCR4	281736
ENSBTAG00000032017	INHBB	530430
ENSBTAG00000012510	PLCB3	515669

در مرحله‌ی بعد، با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی Genomatix ناحیه‌ی آغازگری این ژن‌ها (۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ نوکلئوتید بالاتر از ناحیه‌ی شروع رونویسی) به‌دست آمد. برای داده‌کاوی و بررسی تعداد و تنوّع عوامل رونویسی که در ناحیه آغازگری ژن‌های کاندید محل اتّصال دارند، از Frameworker استفاده گردید. Frameworker قسمتی از نرم‌افزار Genomatix می‌باشد که به‌کمک آن می‌توان عوامل رونویسی که جایگاه اتّصال به ناحیه‌ی ژنومی دارند، مورد کاوش قرار گیرند.

Table 2- Explored transcription factors on promoter of the candidate genes associated with ovulation rate in cattle

P-value	Transcription factor	Matrix family	Model
3.08376e-07	ZNF658	V$ZTRE	Model 1
	ZNF658	V$ZTRE	
	ZNF658	V$ZTRE	
1.56787e-05	E2F1، E2F3، E2F5، E2F7،EGR1، EGR3، WT1، EGR4، EGR2، E2F2، E2F4، E2F6، E2F8	V$EGRF	Model 2
	KLF6، KLF8، KLF12، KLF15، KLF3، KLF5، KLF7، KLF9، TFDP2، TFDP1، KLF1، KLF13، KLF17، KLF4	V$KLFS	
	ZBTB7A، ZNF148، ZNF219، ZBTB7B، ZNF202، ZNF300، SP2، SP4، SP6، SP8	V$ZF02	
7.65534e-05	KLF6، KLF8، KLF12، KLF15، KLF3، KLF5، KLF7، KLF9، TFDP2، TFDP1،KLF1، KLF13، KLF17، KLF4	V$KLFS	Model 3
	E2F3، E2F5، E2F7، EGR1، EGR3، WT1، EGR4، EGR2، E2F2، E2F4، E2F6، E2F8، E2F1	V$EGRF	

	ZBTB7A، ZNF148، ZNF219، ZBTB7B، ZNF202، ZNF300، SP2، SP4، SP6، SP8	V$ZF02	
0.00012778	KLF6، KLF8، KLF12، KLF15، KLF3، KLF5، KLF7، KLF9، TFDP2، TFDP1، KLF1، KLF13، KLF17، KLF4	V$KLFS	Model 4
	E2F3، E2F5، E2F7، EGR1، EGR3، WT1، EGR4، EGR2، E2F2، E2F4، E2F6، E2F8، E2F1	V$EGRF	
	ZBTB7A، ZNF148، ZNF219، ZBTB7B، ZNF202، ZNF300، SP2، SP4، SP6، SP8	V$ZF02	

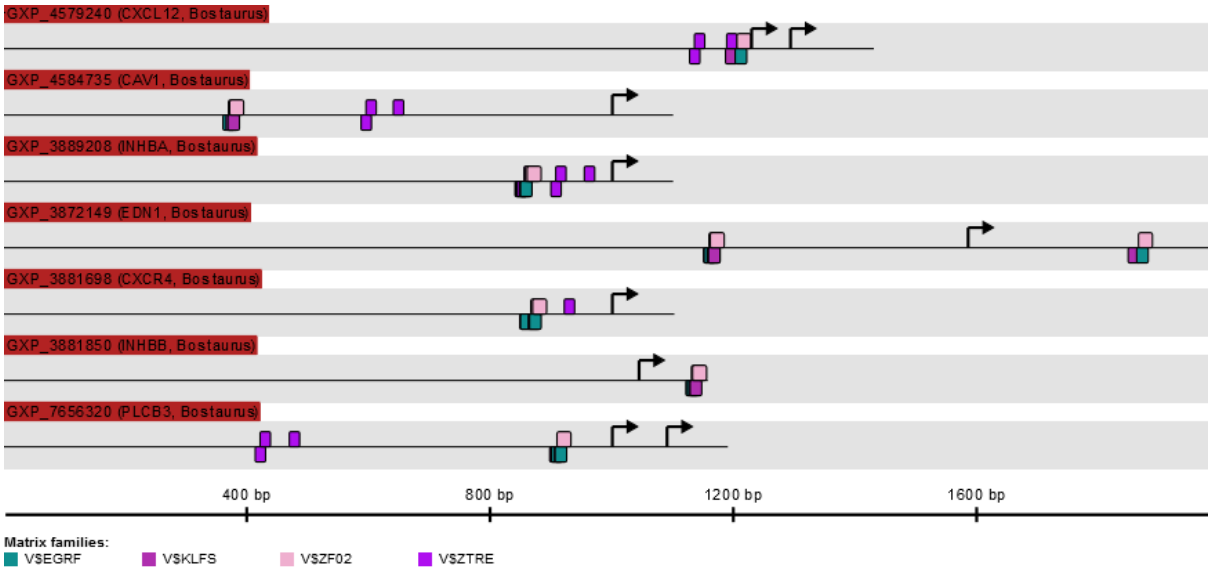

Figure1- Matrix family and their binding to the candidate genes associated with ovulation rate in cattle

پس از کاوش تعداد و تنوّع عوامل رونویسی موجود بر روی آغازگر ژن‌های کاندید در نرخ تخمک‌گذاری، با استفاده از ModelInspector به شناسایی ژن‌های جدیدی پرداخته شد که در ناحیه‌ی آغازگری خود الگوی اتّصال مشابهی را برای عوامل رونویسی داشتند (جدول ۲).

Table 3- Potential candidate genes gained from promoter analysis associated with ovulation rate

Enterz ID				**Chromosome**
		527883	504795	**Chromosome 3**
			281040	**Chromosome 4**
		506821	516544	**Chromosome 5**
		616907	281751	**Chromosome 6**
			511283	**Chromosome 7**
		785849	100297058	**Chromosome 10**
		107132987	505595	**Chromosome 12**
785034	539207	541170	782020	**Chromosome 13**
	101907668	538640	618749	**Chromosome 14**

Chromosome 15	613282				
Chromosome 16	788091				
Chromosome 17	528013	107131275	281834		
Chromosome 18	513015	767618	513377	539607	786369
Chromosome 19	519558	535629			
Chromosome 2	516886				
Chromosome 20	616293				
Chromosome 21	533792				
Chromosome 22	510184	521772	533782	505290	539459
Chromosome 23	539938	100848122	616399		
Chromosome 25	511736				
Chromosome 28	616421	613811			
Chromosome 29	539844	104976257	515669		
Chromosome X	538475	516017	523644		

این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کاندید احتمالی با صفت تخمک‌گذاری در گاو معرفی گردیدند. در این مرحله، ۵۱ ژن وجود داشتند که الگوی مشابهی از اتّصال عوامل رونویسی در آغازگر آن‌ها وجود داشت. با استفاده از پایگاه داده STRING برهمکنش بین عوامل رونویسی و ژن هدف آن بررسی و ۳۰ ارتباط تأیید گردید (تصویر ۱). در آخرین مرحله، به‌کمک ژن‌های کاندید احتمالی و پایگاه داده comparative GO مسیرهای زیستی مرتبط با نرخ تخمک‌گذاری بررسی شد (جدول ۳).

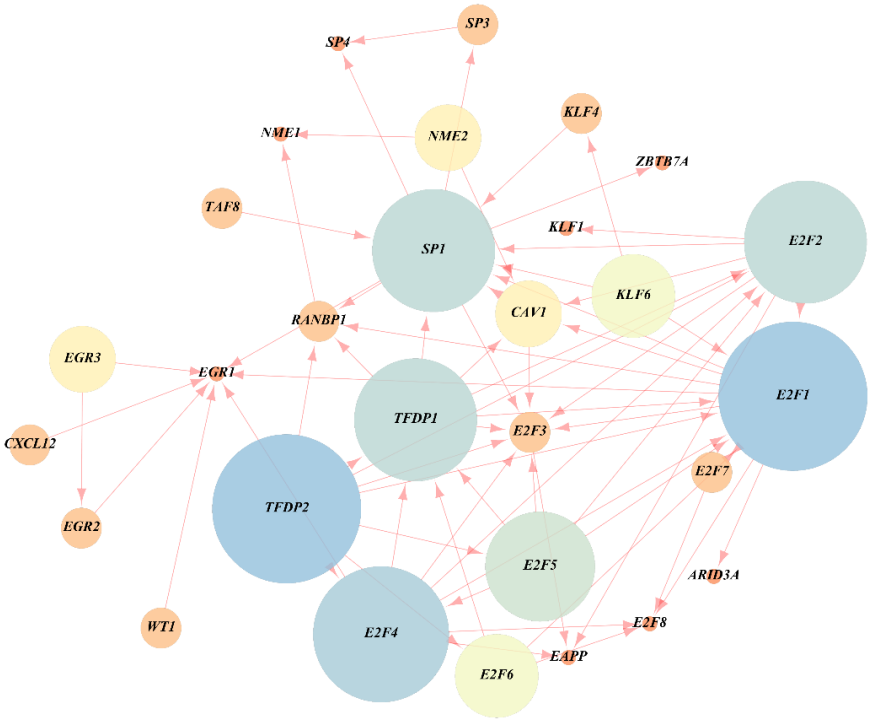

Figure 2- Transcription factors and their target genes interaction network associated with ovulation rate

Table 4- Biological processes associated with ovulation rate by using potential candidate genes related to this trait

P-value	Biological process Name	Biological process ID
2.83E-06	regulation of protein tyrosine kinase activity	61099
3.30E-06	inner cell mass cell proliferation	1833
0.000351	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	71560
0.000361	regulation of JAK-STAT cascade	46426
0.000441	response to estrogen	43627
0.000634	regulation of cell migration	30334
0.000931	positive regulation of JNK cascade	46330

بحث

در این تحقیق، بازسازی شبکه برهمکنش بین عوامل رونویسی مؤثّر بر تخمک‌گذاری و ژن‌های هدفشان نشان داد که ژن E2F1 یکی از مهمترین عوامل رونویسی می‌باشد که رونویسی را در ژن‌های مرتبط با تخمک‌گذاری برعهده دارد (شکل ۲). این ژن یکی از اعضای خانواده E2Fمی‌باشد و مرحله انتقالی G1-S در چرخه‌ی سلولی را تحت کنترل دارد (برکوویچ و گینس برگ ۲۰۰۳). علاوه بر دخالت مستقیم این عامل رونویسی، در چرخه‌ی سلولی، نشان داده شده است که این پروتئین سبب تحریک مرگ سلولی به‌وسیله سازوکار وابسته به p53 می‌شود و تنظیم بیان چندین ژن در مسیر مرگ سلولی را تحریک می‌کند (هولمبرگ و همکاران ۱۹۹۸).

نتایج ایمونوهیستوشیمی، این عامل رونویسی را عمدتاً در مراحل مختلف رشد فولیکول نشان داد و گزارش شده است بیان E2F1 با مرحله‌ی رشد تخمدان همراه است (یین و همکاران ۲۰۱٤). افزون بر این ارتباط، این عامل رونویسی با سطح بیان ژن RIP140 که برای آزادی تخمک مناسب طیّ تخمک گذاری مورد نیاز است، به اثبات رسیده است (دوکوییر و همکاران ۲۰۱۲).

عامل رونویسی مهم دیگری که در این پژوهش با برازش شبکه برهمکنش پروتئینی مهم شناخته شده است، TFDP[1] می‌باشد (شکل ۲). این عامل رونویسی عضو پروتئینی خانواده DP است. عامل رونویسی مزبور به‌خودی خود، دارای فعّالیّت بسیار ضعیف است. با این حال، با خانواده عوامل رونویسی E2Fs همکاری می‌کند تا رونویسی ژن‌های هدف E2F را فعّال کند. پروتئین کُدگذاری شده توسّط TFDP1 به‌عنوان بخشی از این مجموعه، برای کنترل فعّالیّت رونویسی ژن‌های متعدّد درگیر در پیشرفت چرخه‌ی سلولی از G1 تا S گزارش شده است (هلاین و همکاران ۱۹۹۳). این ژن، یکی از ژن‌های بیان شده در چرخه‌ی سلول، عامل بلوغ تخمک و میوز می‌باشد (شاو و همکاران ۲۰۱۳).

در این پژوهش، برازش شبکه برهمکنش پروتئینی بین عوامل رونویسی و ژن‌های هدف آن‌ها توانست علاوه بر شناسایی عوامل رونویسی مهمی که فرآیند تخمک‌گذاری را کنترل می‌کنند، تعدادی از ژن‌ها را نیز شناسایی کند که نسبت به سایر ژن‌ها بیشتر مورد کنترل و هدف عوامل رونویسی می‌باشند. دو تا از ژن‌های هدف اصلی در این شبکه CAV1[2] و RANBP1[3] هستند (شکل ۲).

ژن CAV1 از پروتئین غشایی پلاسمایی هستند. سه ژن caveolin بیان شده در پستانداران (به‌عنوان کائولین ۱، ۲ و ۳ تعیین شده) وجود دارد که پنج ایزوفرم مختلف پروتئینی را کُدگذاری می‌کنند (بوچر و نابی ۲۰۱۲). ژنCav1 در سلول‌های گرانولوزا گاو و فولیکول‌های بالغ بیان می‌شود و بیان آن در سلول‌های اپی‌تلیال تخمدان

[1] Transcription factor Dp-1

[2] Caveolin-1

[3] RAN Binding Protein 1

طبیعی، مورد تأیید قرار گرفته است (ویچن و همکاران ۲۰۰۱). بیان این ژن طی فرآیند تخمک‌گذاری تشخیص داده شده است (لوسییر و همکاران ۲۰۱۷) و به‌عنوان یک ژن کاندید در تخمک‌گذاری معرفی گردیده است (یانگ و همکاران ۲۰۱۸). نشان داده شده است ژنCAV1 احتمالاً به افزایش سیگنالینگ‌های غشایی که در زمان تخمک-گذاری و لوتینه شدن رخ می‌دهد، کمک می‌کند. همچنین، گونادوتروپین‌ها، افزایش بیان CAV1 را در سلول‌های گرانولوزا سبب می‌شود و کاهش بیان آن، به تمایز سلولی گرانولوزا آسیب می‌رساند (دیوف و همکاران ۲۰۰۶).

پروتئین RANBP1 به‌عنوان یکی دیگر از ژن‌های کاندید مهم در ارتباط با تخمک‌گذاری، در این پژوهش مطرح شده است. پروتئین حاصل از RANBP1 به‌همراه یک مجموعه پروتئینی در تنظیم چرخه‌ی سلولی با کنترل حمل و نقل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به هسته اثر دارد (دایفیور و همکاران ۲۰۰۳). علاوه بر این، RNAbp1 یکی از ژن‌های دخیل در تنظیم رونویسی در تخمک و همچنین سلول‌های کومولوس می‌باشد (کایمبل و همکاران ۲۰۱۸). بخش کوچکی از RanBP1 در سانتروم شناسایی شده است که نشان می‌دهد بیان بیش از حدّ این ژن با عوامل حیاتی کنترل کننده ویژگی‌های ساختاری و پویایی سانترزوم‌ها طیّ میتوز مرتبط است (دایفیور و همکاران ۲۰۰۳).

مطابق با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، مسیرهای سیگنال‌دهی JAK-STAT و تیروزین کیناز از جمله مسیرهای زیستی می‌باشند که در نرخ تخمک‌گذاری مهم می‌باشند (جدول ٤). مسیرهای سیگنال‌دهی[٦] JAK-STAT و تیروزین کیناز، سیگنال‌های خارج سلولی را به هسته انتقال می‌دهد و انواع فعالیّت‌های سلولی از جمله آپوپتوز، تمایز، تکثیر و واکنش‌های ایمنی را تنظیم می‌کند. این مسیر متشکّل از گیرنده جنوس کیناز (JAKs)، گیرنده‌های فرسته، فعّال‌کننده‌های رونویسی و یک گیرنده سیتوکین یا هورمون می‌باشد (مولن و گونزالز- پرز ۲۰۱٦). این مسیر سیگنال‌دهی در فعّال شدن فولیکول‌های اوّلیّه به-شدت مورد توجّه قرار گرفته است (سوبینوف و همکاران ۲۰۱۳).

ورود به رشد اوّلیّه توسط یک گروه از سیتوکین‌های پلیوتروپیک و عوامل رشد آغاز شده می‌گردد. JAK3 یکی از اعضای خانواده JAK می‌باشد و به‌عنوان یک ژن کاندید شناخته شده در ارتباط با رشد و تعداد فولیکول-های فعّال شده، شناسایی شده است (نیدیای و همکاران ۲۰۱٦). پژوهشی نشان داد مهارکننده‌های خاصّ مسیرهای سیگنالینگ JAK / STAT موجب اثر بر ترشح پروژسترون گردیده و بر روی فرآیند تخمک گذاری مؤثّر می‌باشد (دای یوریو و همکاران ۲۰۱۳).

نتایج این پژوهش نشان داد مسیر زیستی مرتبط با عامل رشد بتا نقش مهمی در نرخ تخمک‌گذاری دارد (جدول ٤). مطالعات مختلفی اثر کنترلی این مسیر زیستی را بلوغ و تکامل سلول تخمک گزارش کرده‌اند. خانواده رشد بتا (TGFβ) دارای چند زیرمجموعه می‌باشد. یک زیرمجموعه آن شامل پروتئین‌های مورفوژنیک استخوان است. این پروتئین‌ها همراه با سایر عوامل رشد داخل وریدی در تنظیم میزان جذب فولیکول، انتخاب فولیکول غالب و تخمک‌گذاری نقش دارند. علاوه بر این، دسته پروتئینی مزبور در سطح هیپوفیز قدامی، به تنظیم تولید گونادوتروفین کمک می‌کند (رگان و همکاران ۲۰۱۸). زیر مجموعه دیگر عامل رشد بتا، هورمون ضدّ مولرین است که به‌شدّت با ذخایر تخمک‌های اوّلیّه موجود در تخمدان ارتباط دارد (هنسن و همکاران ۲۰۱۱).

مهاجرت سلولی و مسیرهای زیستی مرتبط با JNK[٧] دو مسیر خیلی مهم است که به‌همراه برخی مسیرهای زیستی مانند تولید سیتوکین‌ها، پاسخ التهابی و مرگ سلولی در رابطه با برخی سلول‌های خاص از جمله

[٦] Janus kinases (Jak)-Signal transducers and activators of transcription (Stat)

[٧] C-Jun N-terminal Kinase

مهمترین و اوّلین مسیرهای زیستی می‌باشند که در رابطه با تخمک‌گذاری بین مهره‌داران بسیار محافظت شده است (لیو و همکاران ۲۰۱۷). پژوهش‌های مختلفی، ارتباط نزدیک و همراه بودن این دو مسیر زیستی طیّ تخمک-گذاری را گزارش کردند (ما ۲۰۱٤). نتایج بیان ژن نشان داد که ژن‌های مرتبط با دو مسیر مهاجرت سلولی و مسیرهای زیستی مرتبط با JNK در هنگام تخمک‌گذاری در مهره‌داران افزایش بیان دارند (لیو و همکاران ۲۰۱۷). این نتایج نشان می‌دهد که آنالیز پروموتر انجام شده در این پژوهش به‌خوبی توانسته است مهمترین مسیرهای زیستی مرتبط با فرآیند فیزیولوژی مربوط با تخمک-گذاری را معرفی کند (جدول ٤).

نتیجه‌گیری

با توجّه به اهمیّت مسئله باروری و اثر مستقیم آن بر سودآوری در واحدهای دامپروی، انجام مطالعات مختلف در این زمینه، جهت روشن‌تر شدن سازوکارهای مولکولی و شناسایی کاندیدهای ژنی اهمیّت به‌سزایی دارد. در این پژوهش، تلاش گردید با استفاده از تحلیل آغازگر، مهمترین عوامل رونویسی و ژن‌های هدفشان شناسایی شوند. با برازش شبکه برهمکنش پروتئینی بر روی یافته‌های حاصل از آنالیز پروموتر، مهمترین ژن‌های کاندید مؤثّر بر نرخ تخمک‌گذاری در گاو شامل عوامل رونویسی E2F1 و TFDP1 و ژن‌های هدف CAV1 و RANBP1 معرفی گردید. آنالیز مسیرهای زیستی نشان داد فعّال شدن فولیکول‌های اوّلیّه، انتخاب فولیکول و مهاجرت سلولی از مهمترین سازوکارهای مولکولی مرتبط با تخمک‌گذاری هستند.

منابع مورد استفاده

Baruselli P, Batista E, Vieira L and Souza A, 2015. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. Animal Reproduction 12(3): 487-497.

Berkovich E and Ginsberg D, 2003. ATM is a target for positive regulation by E2F-1. Oncogene 22(2): 161.

Boscher C and Nabi IR, 2012. Caveolin-1: role in cell signaling, in Caveolins and Caveolae. Springer. p. 29-50.

Di Fiore B, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Tassin A-M, Cundari E and Lavia P, 2003. Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. Journal of Cell Science 116(16): 3399-3411.

Di F, Liu J, Li S, Yao G, Hong Y, Chen Z J, Li W and Du Y, 2018. ATF4 contributes to ovulation via regulating COX2/PGE2 expression: A potential role of ATF4 in PCOS. Frontiers in Endocrinology 15(9):669.

Di Yorio MP, Bilbao MG, Biagini-Majorel AM and Faletti AG. 2013. Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process. Reproduction: REP-13-0257.

Diouf MN, Lefebvre R, Silversides DW, Sirois J and Lussier JG, 2006. Induction of alpha-caveolin-1 (αCAV1) expression in bovine granulosa cells in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research 73(11): 1353-1360.

Docquier A, Augereau P, Lapierre M, Harmand P-O, Badia E, Annicotte J-S, Fajas L and Cavaillès V, 2012. The RIP140 gene is a transcriptional target of E2F1. PloS One 7(5): e35839.

Gaddis KP, Dikmen S, Null D, Cole J and Hansen P, 2017. Evaluation of genetic components in traits related to superovulation, in vitro fertilization, and embryo transfer in Holstein cattle. Journal of Dairy Science 100(4): 2877-2891.

Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N and Craig LB, 2011. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. Fertility and Sterility 95(1): 170-175.

Helin K, Wu C-L, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C and Harlow E, 1993. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. Genes & Development 7(10): 1850-1861.

Holmberg C, Helin K, Sehested M and KarlstroÈm O, 1998. E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. Oncogene 17(2): 143.

Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K and Miyamoto A, 2012. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. Journal of Reproduction and Development 58(1): 10-16.

Kimble K, 2018. Transcriptome profiles of porcine oocytes and their corresponding cumulus cells reveal functional gene regulatory networks. masters thesis, Auburn University; Alabama, USA:

Kumar S, Dahiya S P, Magotra A and Kumar S, 2017. Genetic Markers Associated With Fecundity in Sheep. International Journal of Science, Environment and Technology 6(5): 3064-3074.

Liu DT, Brewer MS, Chen S, Hong W and Zhu Y, 2017. Transcriptomic signatures for ovulation in vertebrates. General and Comparative Endocrinology 247: 74-86.

Lussier JG, Diouf MN, Lévesque V, Sirois J and Ndiaye K, 2017. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. Reproductive Biology and Endocrinology 15: 80-88.

Ma X, 2014. Context-dependent interplay between Hippo and JNK pathway in Drosophila. AIMS Genet 1: 20-33.

Mullen M and Gonzalez-Perez R, 2016. Leptin-Induced JAK/STAT signaling and cancer growth. Vaccines 4(3): 26.

Ndiaye K, Castonguay A, Benoit G, Silversides DW and Lussier JG, 2016. Differential regulation of Janus kinase 3 (JAK3) in bovine preovulatory follicles and identification of JAK3 interacting proteins in granulosa cells. Journal of Ovarian Research 9(1): 71.

Pramod RK, Sharma SK, Kumar R and Rajan A, 2013. Genetics of ovulation rate in farm animals. Veterinary World 6(11): 833.

Regan SL, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F and Dharmarajan A, 2018. Involvement of Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in the Regulation of Ovarian Function, in Vitamins and hormones. Elsevier. p. 227-261.

Shaw L, Sneddon SF, Zeef L, Kimber SJ and Brison DR, 2013. Global gene expression profiling of individual human oocytes and embryos demonstrates heterogeneity in early development. PLoS One 8(5): e64192.

Sobinoff A, Sutherland J and McLaughlin E, 2013. Intracellular signalling during female gametogenesis. MHR: Basic Science of Reproductive Medicine 19(5): 265-278.

Sprícigo J, Morais K, Ferreira A, Machado G, Gomes A, Rumpf R, Franco M and Dode M, 2014. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. Cryobiology 69(2): 256-265.

Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M and Schäfer R, 2001. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. The American Journal of Pathology 159(5): 1635-1643.

Yang F, Wang M, Zhang B, Xiang W, Zhang K, Chu M and Wang P, 2018. Identification of new progestogen-associated networks in mammalian ovulation using bioinformatics. BMC Systems Biology 12(1): 36.

Yang W, Tang K, Li S and Yang L, 2011. Association analysis between variants in bovine progesterone receptor geneand superovulation traits in Chinese Holstein cows. Reproduction in Domestic Animals 46(6): 1029-1034.

Yin M, Wang X, Yao G, Lu M, Liang M, Sun Y and Sun F, 2014. Transactivation of miR-320 by miR-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1. Journal of Biological Chemistry 289(26): 18239-18257.

Fitting interaction network among effective transcription factors associated with ovulation rate and explored genes by using promoter analysis in cattle

SH Farhangfar[1], A Tavana[2] and E Behdani[3*]

Received: February 16, 2019 Accepted: April 25, 2020
[1] Professor, Animal Science Department, Agriculture Faculty, University of Birjand
[2] MSc Student, Animal Science Department, Agriculture Faculty, University of Birjand
[3] Invitee Instructor, Animal Science Department, Agriculture Faculty, University of Birjand
[*]Corresponding Author Email: el_behdani86@yahoo.com

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.31 No.2/ 2021/pp 45-56
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/AS.2021.32082.1485

Introduction: Fertility traits and their improvement are the hot topics in animal studies because these traits directly affect profitability of livestock industry. The ovulation rate is an important trait hence breeding and nutritional strategies (Kawashima et al. 2012) as well as managerial approaches must be used. Identifying and choosing the effective regulatory genes and biomarkers are the basic steps in applying molecular breeding strategies such as genomic selection and/or marker assisted selection. It should be noted, one of the major challenges in reproductive traits is the large number of regulatory gene, which control these traits (Pramod et al. 2013). Therefore, selection of the most effective and the best ones requires bioinformatics analysis. In this study, we hypothesized that genes, which have same transcription factor binding site, regulate by same transcription factors, express in same time and act in the same physiological processes. Therefore, transcription factor binding site on identified marker genes associated with ovulation rate was used to introduce new marker genes and then, protein-protein interaction network was applied to select the most regulatory ones and explore candidate molecular mechanisms, which control this trait.

Material and methods: In the present study, known marker genes associated with ovulation rate in cattle were searched from NCBI database. To extract promoter region of these genes, we used the link of gene to promoter of Genomatix, which is an on-line software. Link of Frameworker of Genomatix, was performed to achieve transcription factors that have binding site on promoters of the known markers. New marker genes associated with mentioned trait were investigated by searching genes throughout the genome, which have the same pattern of transcription factor binding sites on their promoter regions. To do this step, ModelInspector link of Genomatix software was used. These genes probably are potential effector genes for ovulation, because their expression are regulated by same transcription factors, which regulate expression of ovulation's genes. In order to confirm the interaction of potential marker and transcription factors, we fitted protein-protein interaction network with the last results of Genomatix by STRING database. Potential marker genes and transcription factorswere used to survey the most important cellular algorithm, which control ovulation rate. The interactions were validated by STRING (https://string-db.org). In this step, we applied comparative GO database (www.comparativego.com).

Results and discussion: We found seven identified genes from NCBI database associated with ovulation rate. Promoter regions of these genes were taken by Genomatix. Frameworker searched transcription factors binding sites and their patterns on promoters. The results indicated the transcription factors, which regulate the expression of these genes thus inducing the expression of 51

other genes in the genome. These genes were introduced as the potential marker genes controlling the ovulation rate. These genes and identified genes have the same transcription factor binding sites on their promoter regions and expression by same transcription factors. Protein–protein interaction network constructed between potential marker genes associated with ovulation rete and their transcription factors showed that two transcription factors (E2F1 and TFDP1) were more important in regulation of genes in ovulation rate over others. These two transcription factors had the most interactions with the targets. The transcription factor E2F1 affects the different stages of ovarian growth, follicle growth and regulate ovulation (Yin et al. 2014). TFDP1 plays an important role in the cell cycle, growth, and puberty of follicles (Shaw et al. 2013). This transcription factor has poor activity, but it participates in the formation of another transcription factor complex with E2Fs families. This complex is more effective in expression of target genes of E2F (Helin et al. 1993). Per our results, *CAV1* and *RANBP1* target genes had the most interactions with transcription factors. In other words, the expression of these genes, rather other target genes, were more regulated by numerous transcription factors in our gene regulatory network. CAV1 is expressed in bovine granulosa cells, mature follicles and ovarian epithelial cells (Wiechen et al. 2001) and it regulates vital processes in ovulation such as differentiation of granulosa cells and luteinization (Yang et al. 2018). Furthermore, gonadotropin hormones induce differentiation of granulosa cells by increasing of CAV1 expression (Diouf et al. 2006). RANBP1 controls cell cycle and transcription processes in ovum and cumulus cells (Kimble 2018). Our analysis revealed that tyrosine kinase activity, JAK-STAT cascade, response to transforming growth factor beta, cell migration, JNK cascade and response to estrogen were the most important molecular mechanisms regulating ovulation. Tyrosine kinase activity and JAK-STAT cascade are two regulatory candidate pathways in cell differentiation and proliferation (Mullen et al. 2016). They also induce first stage of follicle growth and associate with number of activated follicles (Sobinoff el al. 2013). They would affect oogenesis by inducing progesterone secretion. Some inhibitors of JAK/STAT signaling pathway have negative effect on progesterone secretion and ovulation process (Di Yorio et al. 2013). Pathway of transforming growth factor beta was also bold in this study. This pathway regulates differentiation and maturation of ovum, induction of gonadotropins and the selection of dominant follicle. This family of protein regulate gonadotropin secretion by effect on anterior pituitary (Regan et al. 2018). Cell migration and JNK cascade are conserved processes between vertebrata in ovulation processes (Liu et al. 2017). Studies have shown that these pathways are upregulated during ovulation and they control other processes such as cytokines production, inflammatory response and apoptosis occurring during ovulation (Liu et al 2017).

Conclusion: In conclusion, this study offers a vital basis for understanding potential marker genes and cellular algorithm, which control ovulation rate by fitting protein-protein interaction of ovulation related genes. According to our data, presumably E2F1 and TFDP1 were the most important transcription factors, and *CAV1* and *RANBP1* were the major target genes in ovulation. This network induces some biological pathways, which effect the activation of primary follicles, follicle secretion and cell migration. These findings have important implications for enhancement ovulation rate by genomic selection and/or marker assisted selection. This analysis could implications for complex traits, which control by many genes, to detect the novel and important ones.

Keywords: Biological processes, Marker genes, Promoter analysis, Protein-protein interaction network