

بررسی شبکه تنظیمی مؤثر در شروع شیردهی در بافت پستان گاو

شیری با استفاده از داده‌های RNA-seq

• زهره مزدوری

دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دام و طیور پردیس ابرویحان، دانشگاه تهران

• محمد قادرزاده (نویسنده مسئول)

دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۹۴۳۲۲۰۹۱

Email: mg.mahabad1365@gmail.com

چکیده

در این مطالعه به منظور درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در شروع شیردهی در بافت پستان گاو شیری، در ابتدا ژن‌های با بیان بالا با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq در سه حالت زیر شناسایی گردید: حالت اول) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان، حالت دوم) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان، حالت سوم) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان. به منظور بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های معنادار با بیان بالا در سه حالت مختلف ذکر شده، از نرم‌افزار DAVID استفاده شد. تنها عبارات معنادار ($P < 0.05$) مربوط به مراحل بیولوژیکی در نظر گرفته شد. سپس توالی پروموتوری این ژن‌ها جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید درگیر در این مکانسیم استخراج شد. نتایج تجزیه و تحلیل پروموتوری با استفاده از نرم‌افزار Genomatix منجر به شناسایی ۲۴ فاکتور رونویسی کاندید جدید احتمالی مؤثر در مراحل تنظیمی شروع شیردهی گردید. افزون بر این، برای ترسیم شبکه‌های ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در شروع شیردهی از نرم‌افزار STRING استفاده شد. با توجه نتایج بدست آمده از این پژوهش، ۲۴ فاکتور رونویسی جدید شناسایی شدند که دارای پتانسیل مناسبی برای بررسی بیشتر در سطح آزمایشگاهی می‌باشند و می‌توانند اطلاعات جدیدی را در درک بهتر شبکه‌ی تنظیمی مؤثر در شروع شیردهی در بافت پستان گاو شیری فراهم کنند.

واژه‌های کلیدی: شبکه تنظیمی، پروموتور، فاکتورهای رونویسی، بیان ژن

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 193-208

Study gene regulatory networks involved in lactogenesis in dairy cow mammary tissue using RNA-Seq data

1: Zohre Mozduri,

MSc Graduated of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal and Poultry Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran.

2*: Mohammad Ghaderzadeh,

Ph.D student of Genetics and Animal Breeding, College of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Corresponding author email: mg.mahabad1365@gmail.com, Tel: 09394322091

Received: July 2016

Accepted: September 2016

In this study to gain insights into transcriptional regulation Lactogenesis in mammary tissue, at the first high expression genes in lactogenesis in three different condition were identified by RNA-Seq data analysis. This three conditions including comparison of the dairy cow mammary tissue in 35 days before and 3 days after birth, dairy cow mammary tissue in 7 days before and 3 days after birth and dairy cow mammary tissue in 7 and 35 days before birth. To investigate the biological processes of significant high expression genes in three different condition mentioned above, the DAVID software was used. The only significant terms ($P < 0.05$) related to biological processes were considered. Then promoter regions of these genes were extracted to identify candidate transcription factors involved in this mechanisms. Assuming that changes in the transcription level of co-expressed genes may result from the coordinated action of a limited number of transcription factors, we looked for over-represented putative transcription factor binding sites in the promoters of these genes. Promoter analysis by using Genomatix software lead to identify of 24 novel transcription factors candidates activating in lactogenesis. In this study in order to visualization of regulatory networks containing transcription factors and that regulate the genes, STRING software were used. According to the results, 24 new candidates transcription factor introduced in this study has good potential for more investigation in the laboratory.

Key words: Gene Expression, promoter, Transcription Factors, Regulatory Network.

مقدمه

داشتند (Finucane et al., 2008). این نتایج با دیگر مطالعه انجام شده روی غده پستان که نشان داد بافت پستان گاو شیری به طور عمده در اواخر آبستنی تکثیر شده و تقریباً این تکثیر بعد از زایمان متوقف می‌شود، سازگار است (Sorensen et al., 2006). تا به حال روش‌هایی همچون RT-PCR و Q-RT-PCR، EST^1 ، $SAGE^2$ و $CAGE^3$ به منظور اندازه‌گیری بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Najafpanah et al., 2013). در همین رابطه ارائه فناوری ریزآرایه برای اولین بار انقلابی در بخش بیولوژی و شناسایی بیان ژن‌های مختلف در سطح

غده پستان فعالیت خود را حدود دو تا سه هفته قبل از زایمان متوقف خواهد نمود، زیرا در این دوره تغییرات چشم‌گیری جهت آماده شدن برای ترشح شیر فراوان بعد از زایمان رخ می‌دهد. غده پستان تنها اندامی است که بعد از بلوغ نیز تکثیر نموده و یک مدل ایده‌آل برای مطالعه توسعه اندام‌های تولیدی می‌باشد (Gao et al., 2013). گزارش شده است که آماده شدن غده پستان برای شیردهی، تغییرات در سطح رونویسی را القاء می‌کند (Andrson et al., 2007). به عنوان مثال وقایع مولکولی در مرحله دوم شروع شیردهی در گاو شیری با استفاده از روش ریزآرایه نشان داد که در این دوره ژن‌های مرتبط با تکثیر و چرخه سلولی بیان پایین

1 - Expressed Sequence Tag

2 - Serial Gene Expression Analysis

3 - Cap Analysis of Gene Expression

۱۱۸۹ ژن در روز سوم بعد از زایمان در مقایسه با روز ۲۷ (مرحله دوم) بطور متمایز بیان شدند و عمدتاً با پاسخ ایمنی و چرخه سلولی مرتبط بودند. همچنین ۱۶۷۲ ژن در روز سوم بعد از زایمان در مقایسه با روز سی و پنجم قبل از زایمان، ۲۳۵ ژن بطور متمایز بیان شدند و با فرآیندهای متابولیکی مرتبط بودند (Gao et al., 2013). با این حال، علی‌رغم مطالعات انجام شده در این حوزه، مکانیسم‌های تنظیمی و ژنی درگیر در فرآیند شروع شیردهی در بافت پستان گاو شیری به طور کامل شناسایی نشده است. فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند و به عنوان تنظیم‌گرهای اصلی ژن‌ها شناخته شده‌اند (Le et al., 2015). این پروتئین‌ها به محل‌های تنظیمی DNA (نواحی تنظیمی ژن هدف مانند پروموتور و نواحی افزایش‌دهنده) که مکان‌های اتصال فاکتورهای رونویسی^۴ (TFBS) نامیده می‌شوند، متصل می‌شوند. این اتصال منجر به افزایش یا کاهش در سطوح بیان ژن‌های هدف می‌شود (Fatima, 2014). اگر در نواحی تنظیمی ژن‌های هم بیان، TFBSs و یا عوامل تنظیمی مشابه وجود داشته باشد، احتمال هم‌تنظیم بودن و همچنین عملکرد مشابه وجود خواهد داشت. بدین منظور امروزه از روش‌های محاسباتی پیچیده برای بررسی این موضوع استفاده می‌شود که در حال حاضر با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در این حوزه در حال گسترش نیز می‌باشند. بنابراین، یک راه کار مناسب برای درک بهتر مکانیسم تنظیمی درگیر در یک مرحله بیولوژیکی خاص، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه در آن مرحله با استفاده از روش‌های محاسباتی و با فرض اینکه این ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی مشابه در توالی پروموتوری خود هستند، می‌باشد (Bakhtiarizadeh et al., 2014). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های با بیان بالا و مشابه در شروع شیردهی در بازه‌های زمانی مختلف قبل و بعد از زایمان به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی درگیر در این مراحل و همچنین ترسیم شبکه تنظیمی ژن‌های مؤثر در فرآیند شروع شیردهی و بررسی فرآیندهای بیولوژیکی مربوطه می‌باشد.

گسترده فراهم کرد. با این وجود فناوری‌های مذکور دارای محدودیت‌هایی بود که با ظهور فناوری توالی‌یابی نسل بعد و ارائه RNA-seq این محدودیت‌ها رفع و انقلاب دیگری در این زمینه بوجود آورد. به عبارتی RNA-seq برابر است با توالی‌یابی کل رونوشت‌ها (ژن‌های کدکننده) در یک بافت در شرایط خاص به منظور اندازه‌گیری بیان همه ژن‌های بیان شده. با RNA-seq می‌توان به کمیت دقیق ژن‌های بیان شده در شرایط بیولوژیکی مختلف و در مقایسه نمونه‌های متفاوت دست یافت (Buermans and Dunnen, 2014). بطور کلی، توالی‌یابی RNA و اطلاع از توالی ژنوم امکان دستیابی به اهدافی مثل رمزگشایی رموز حیات، درمان و کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری‌ها، پرورش حیواناتی که مقاومت بهتری در برابر بیماری‌ها دارند، تولید محصولات مغذی‌تر و بهتر در کشاورزی، شناسایی پاتوژن‌ها، حفظ محیط زیست و بهبود کیفیت زندگی را میسر می‌سازد (Liu et al., 2012). در حال حاضر استفاده از RNA-Seq در بخش‌های مختلف ژنتیک مولکولی (شامل تحقیقات پزشکی، کشاورزی، میکروبی و ...) به یک امر بسیار متداول و بسیار مهم تبدیل شده است (Jalili, 2013). در مطالعه ریزآرایه دیگر انجام شده روی تلیسه‌های هلشتاین، گزارش شد که در مرحله دوم شروع شیردهی، بافت پستان تحت مجموعه‌ای از فرآیندهای توسعه‌ای قرار می‌گیرد که منجر به ترشح آغوز و سپس شیر می‌شود و نشان دادند که ترکیبات اصلی شیر لاکتوز، پروتئین و چربی می‌باشند (Suchyta et al., 2013). همچنین در مطالعه انجام شده توسط Loor و همکاران که بیان ۴۴ ژن دخیل در سنتز پروتئین شیر بافت پستان گاو و ۴۵ ژن دخیل در تولید چربی شیر را با استفاده از qPCR ارزیابی کردند، نقش اساسی برای عملکرد هماهنگ PPARG، PPARGC1A و INSIG1 در تنظیم سنتز چربی شیر و یک نقش مرکزی برای انتقال‌دهنده‌های گلوکز و آمینواسیدها و سیگنال‌انسولین از طریق mTOR در تنظیم سنتز پروتئین در بافت پستان گاو گزارش کردند (Bionaz and Loor, 2011; Bionaz and Loor, 2008). همچنین در یک پژوهش RNA-Seq موجود در این زمینه نشان داده شد که

⁴ - Transcription Factor Binding Sites

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی ژن‌های با بیان بالا در بافت پستان گاو شیری، داده‌های بیان ژن مربوط به بافت پستان ۱۸ گاو هلشتاین در سه بازه زمانی متفاوت مربوط به یک مطالعه RNA-Seq با شماره دسترسی GSE44796 از سایت NCBI (Gene Expression Omnibus DataSets (GEO) استخراج گردید. در مطالعه ذکر شده ساختار بیان ژن‌های مربوط به نمونه‌های بافت پستان ۱۸ گاو هلشتاین در سه بازه‌ی زمانی متفاوت (شش گاو در هر گروه) شامل: الف) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان، ب) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان و ج) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان، که با استفاده از فناوری RNA-Seq مورد مطالعه قرار گرفته است (Gao et al., 2013) بررسی گردید. در ادامه ژن‌های با بیان بالا و معنادار ($P < 0.05$) مربوط به مطالعه RNA-Seq ذکر شده در سه حالت مورد نظر فوق به عنوان ژن‌های نهایی برای انجام تجزیه و تحلیل پروموتور انتخاب شدند.

به منظور بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های معنادار با بیان بالا در سه حالت مختلف ذکر شده، از نرم‌افزار DAVID استفاده شد (Huang et al., 2009). بدین منظور ژن‌های معنادار حاصل از داده‌های مطالعه‌ی RNA-Seq در چهار حالت مختلف ذکر شده به نرم‌افزار معرفی و عبارات معنادار ($P < 0.05$) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. تنها عبارات معنادار مربوط به مراحل بیولوژیکی در نظر گرفته شد.

به منظور انجام تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری و تشخیص TFBS موجود در ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل، توالی پروموتوری ژن‌های شناسایی شده (پروموتور ژن‌های *bos taurus*) توسط بانک اطلاعاتی موجود در بسته نرم‌افزاری Genomatix و با استفاده از قسمت Gene2Promoter استخراج گردید (Cartharius et al., 2005). برای ژن‌های با بیش از یک توالی پروموتوری، معتبرترین توالی بر اساس پیشنهاد خود نرم‌افزار انتخاب شد. همچنین نواحی پروموتوری همه ژن‌ها به صورت ۱۰۰۰

جفت باز بالادست و ۲۰۰ جفت باز پایین دست محل آغاز رونویسی ژن مورد نظر تعریف و استخراج گردید. به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی مشابه در توالی‌های پروموتوری ژن‌ها از نرم‌افزار MatInspector استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از ماتریس‌های وزنی- مکانی (PWM)^۵، TFBSها را در توالی-های DNA شناسایی می‌کند (Cartharius et al., 2005). بدین منظور از بانک اطلاعاتی جامع MatBase موجود در Genomatix که حاوی PWM مرتبط با TFBS می‌باشد، استفاده گردید. در ابتدا هر یک از توالی‌های پروموتوری با استفاده از ماتریس‌های PWM این بانک اطلاعاتی بررسی شدند و TFBS معنادار ($P < 0.05$) مرتبط با هر یک از توالی‌های پروموتوری این ژن‌ها شناسایی شدند. در نهایت TFBSهای معنادار ($P < 0.05$) به عنوان کاندیدهای جدید مؤثر در تنظیم مراحل متفاوت فرآیند شروع شیردهی معرفی شدند.

در این مطالعه به منظور ترسیم شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در NEB از پایگاه اطلاعاتی STRING (نسخه ۱۰) استفاده شد. به همین منظور از دو روش آزمایشگاهی و محاسباتی در STRING شامل Neighborhood، Coexpression، Co-occurrence، GeneFusion experiments، text mining، homology، databases برای ترسیم شبکه (Jensen et al., 2009) استفاده گردید. برای افزایش صحت مرتبط با روابط بین ژنی شناسایی شده، نمره اطمینان بالا (۰/۷) انتخاب گردید. در ادامه مسیرهای بیولوژیکی ژن‌هایی که وارد شبکه شدند مورد بررسی قرار گرفت (۰/۱). ($P <$

⁵ - Position Weight Matrix

نتایج

داشتند ($P < 0/01$). پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۲۰۹ ژن با بیان بالا و معنادار، ۷۶ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ($P < 0/05$) که بیشتر آنها مرتبط با پاسخ به استرس، توسعه اندام، فرآیندهای توسعه‌ای، فرآیند تولیدمثل، فرآیند بیوسنتز اسید چرب بودند. برخی از عبارات بیولوژیکی معنادار و مهم حاصل از این تجزیه و تحلیل در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq در سه حالت مختلف ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها نشان داد که به ترتیب در حالت‌های فوق، تعداد ۱۰، ۱۳ و ۱۷ ژن بیان بالایی داشتند. در ادامه هر یک از سه حالت مورد نظر به طور کامل بررسی شده است.

الف) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان:

نتایج نشان داد که ۲۰۹ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه بافت پستان گاو در ۳۵ روز قبل از زایمان نسبت به سه روز بعد از زایمان

جدول ۱. عبارات بیولوژیکی معنادار حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های با بیان بالا و معنادار (مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان) حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq.

عبارات مراحل بیولوژیکی	P-value مربوط به عبارات بیولوژیکی
پاسخ به استرس	۰/۰۰۱۱۴۸۸۴۳
توسعه اندام	۰/۰۰۱۵۹۴۸۴۷
تنظیم تکثیر سلولی	۰/۰۰۲۴۵۲۰۰۷
توسعه اپیتلیوم	۰/۰۰۳۷۰۳۸۵۴
ریخت‌زایی اندام (توسعه بافت)	۰/۰۰۵۷۷۰۷۹۱
پاسخ التهابی	۰/۰۱۰۰۳۵۲۰۲
گردش خون	۰/۰۱۲۲۳۷۱۴
تمایز سلول‌های اپیتلیال	۰/۰۱۷۸۲۳۴۰۶
فرآیندهای توسعه‌ای	۰/۰۲۲۴۹۷۸۱۷
پاسخ دفاعی	۰/۰۲۲۶۲۹۸۹۷
فرآیند تولیدمثل	۰/۰۲۵۱۷۱۱۰۷
فرآیند بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع	۰/۰۲۸۳۶۱۱۵۴
تنظیم تثبیت پروتئین	۰/۰۲۹۰۶۴۶۰۵
فرآیند بیوسنتز اسید چرب	۰/۰۳۱۹۶۸۹۸۳
تنظیم مهاجرت سلول	۰/۰۴۵۰۳۸۵۵۹
سیگنال باروری	۰/۰۴۵۱۴۶۵۱۵
انتقال اسید آمینه	۰/۰۴۹۵۳۷۴۶۴

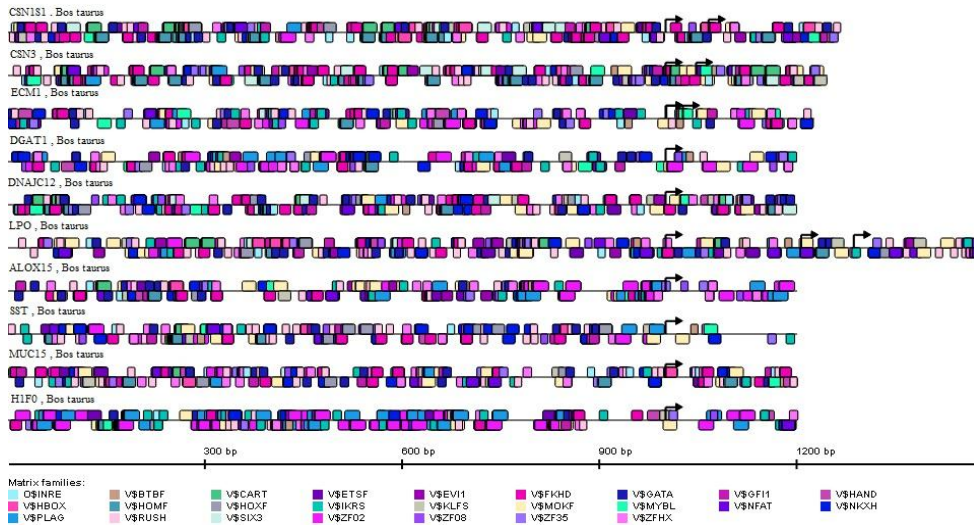
نمره اطمینان بالا در این مطالعه (۰/۷۰) این اطمینان را می‌دهد که روابط بین ژنی شناسایی شده صحت بالایی دارند. در شکل ۲ شبکه ژنی ترسیم شده با STRING ارائه شده است. بطور کلی ۲۱ ژن وارد شبکه شد که در این میان ژن‌های POU5F1، JAK1، HDAC2 بالاترین ارتباطات را با دیگر ژن‌ها داشتند. بعد از بررسی گروه‌های کارکردی مرتبط با ژن‌های درگیر در شبکه‌ی ژنی، ۴۲ عبارت مرتبط با مراحل گوناگون بیولوژیکی معنادار شد ($P < 0/05$) که بیشتر آنها مرتبط با پاسخ سلولی به محرک‌های هورمونی، توسعه بافت، تنظیم مثبت سلول‌های لنفوسیت B، تنظیم مثبت سلول‌های اپیتلیال، تنظیم مثبت تکثیر سلولی و غیره بودند. این نتایج مؤید احتمال وجود ارتباط فاکتورهای رونویسی شناسایی شده با شروع رونویسی می‌باشد.

در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، ۱۰ ژن برتر ($P < 0/01$) شامل ECM1، CSN3، CSN1S1، SST، ALOX15، LPO، DNAJC12، DGAT1، MUC15 و HIF0 انتخاب شدند. با توجه به اهمیت این ژن‌ها در مطالعه‌ی حاضر، از این ۱۰ ژن برای بررسی ساختار پروموتوری آنها و شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید جدید مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان استفاده شد. در پایان با تجزیه و تحلیل این ۱۰ ژن، ۳۰ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتوری ۱۰ ژن مورد نظر قرار داشتند. ۳۰ فاکتور رونویسی شناسایی شده عبارتند از deltaEF1(ZEB1، Barx2، c-Myb، ETS2، Drosophila initiator motifs، AREB6)، FOXA1، Gsh-2، KLF4، GF11، GATA1، FOXP1، MOK-2، MEL1، ZBTB33، IL-2، Ikaros2، PLAG1، NKX3.2، Nkx-2.5، NFAT، NANOG، SIX3، Bining site for S8 type homeodomains، KRAB، KSCAN3، bHLH، SPI-1، SMARCA5، KID3، ZNF35 پروموتوری این ۱۰ ژن در شکل ۱ گزارش شده است. در این شکل، محل اتصال این ۳۰ فاکتور رونویسی شناسایی شده برای هر یک از توالی‌های پروموتوری ۱۰ ژن بررسی شده، ارائه شده است. از آنجا که فاکتورهای رونویسی در قالب خانواده‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (فاکتورهای رونویسی با محل تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند)، ۳۰ فاکتور رونویسی شناسایی شده در این مطالعه در ۲۴ خانواده قرار گرفتند که در شکل ۱ مشخص است. به عنوان مثال فاکتورهای رونویسی KSCAN3 و KRAB متعلق به خانواده V\$ZF02⁶ هستند. همچنین فاکتور رونویسی PLAG1 متعلق به خانواده V\$PLAG⁷ می‌باشد. در شکل ۱ این خانواده‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده‌اند.

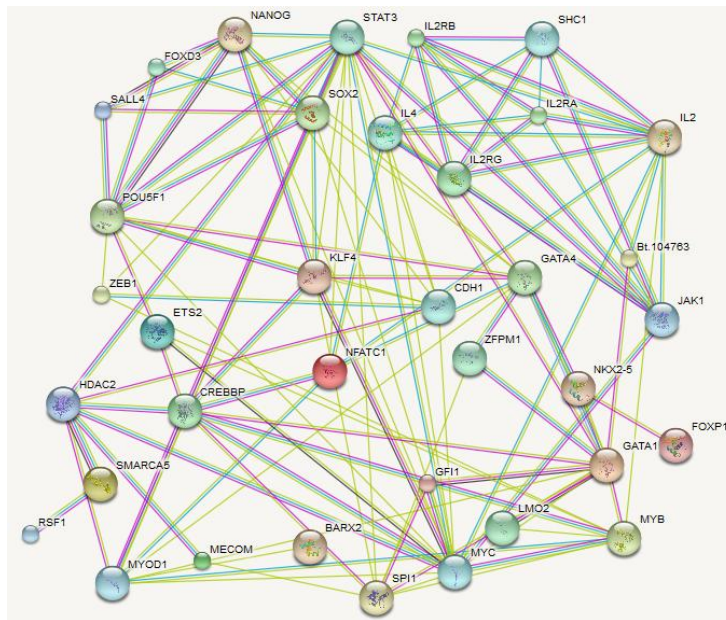
نتایج حاصل از ترسیم شبکه با STRING منجر به شناسایی ۱۵ فاکتور رونویسی شد که با ژن‌های دیگر ارتباط داشتند. استفاده از

⁶ - C2C2 zing finger transcription factors

⁷ - Pleomorphic ddenoma gene



شکل ۱. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن‌های دخیل در بافت پستان گاو شیری (مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان) که در تمام ۱۰ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن‌ها است. هر یک از خانواده‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده‌اند (توضیحات در متن ارائه شده است).

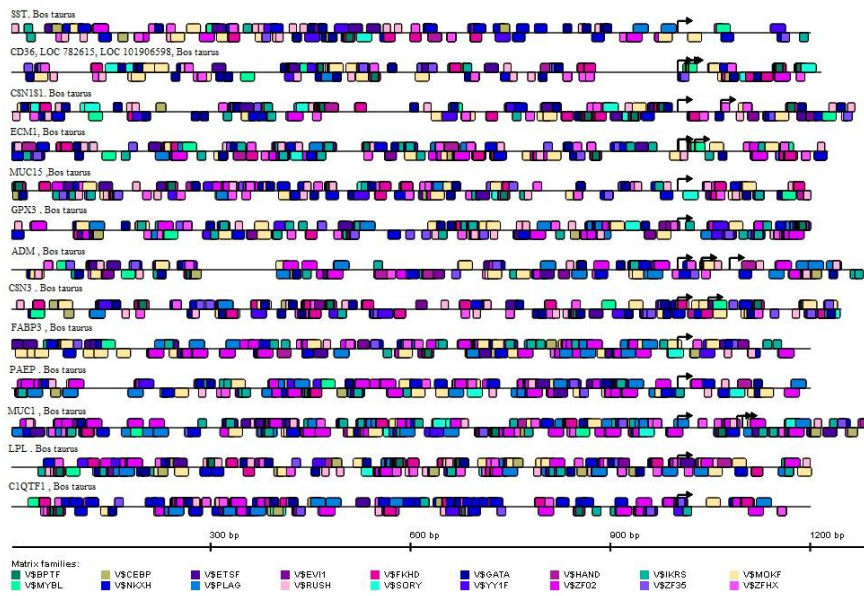


شکل ۲. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در شروع شیردهی در حالت مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان

ب) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان:

نتایج نشان داد که ۲۷۵ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه بافت پستان گاو هفت روز قبل نسبت به سه روز بعد از زایمان داشتند ($P < 0.01$). پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۲۷۵ ژن با بیان بالا و معنادار، ۱۱۰ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ($P < 0.05$) که بیشتر آنها مرتبط با پاسخ به التهاب، پاسخ دفاعی، چسبندگی سلول، پاسخ‌های توسعه‌ای، پاسخ ایمنی، پردازش پروتئین، فرآیند بیوسنتز کربوهیدرات، پاسخ ایمنی هورمونی، ریخت‌زایی اندام، تمایز سلولی، توسعه بافت، فرآیندهای توسعه‌ای، فرآیند تولیدمثل، فرآیند بیوسنتز اسید چرب بودند. در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۳ ژن برتر ($P < 0.01$) شامل *CD36*، *SST*،

CN1S1، *ECM1*، *MUC15*، *GPX3*، *ADM*، *CSN3*، *FABP3*، *PAEP*، *MUC1*، *LPL*، *C1QTNF1* انتخاب شدند در پایان با تجزیه و تحلیل پروموتور این ۱۳ ژن، ۲۱ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتوری ۱۳ ژن مورد نظر قرار داشتند. ۲۱ فاکتور رونویسی شناسایی شده عبارتند از *FAC1*، *deltaEF1*، *cMyb*، *CEBPE*، *MEL1*، *FOXK2*، *Ikaros2*، *GATA1*، *FOXP1*، *SRY*، *SMARCA5*، *PLAG1*، *NKX3.2*، *MOK-2*، *KRAB*، *KSCAN3*، *YY2*، *TTF1*، *bHLH*، *SPI1*، *ZNF35* نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری این ۱۳ ژن در شکل ۳ گزارش شده است. در این شکل، محل اتصال این ۲۱ فاکتور رونویسی شناسایی شده برای هر یک از توالی‌های پروموتوری ۱۳ ژن بررسی شده، ارائه شده است.



شکل ۳. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن‌های دخیل در بافت پستان گاو شیری (مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان) که در تمام ۱۳ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن‌ها است. هر یک از خانواده‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده‌اند.

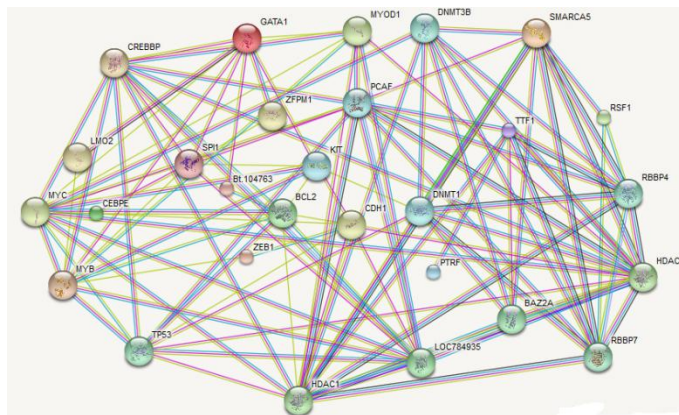
بیشتر آنها با فرآیند متابولیک لاکتوز، فرآیند بیوسنتز لاکتوز، فرآیند بیوسنتز استرول، فرآیند توسعه سلولی، سیگنال باروری، میتوز، چرخه سلولی، تقسیم سلولی، متابولیسم لیپید، متابولیسم کلسترول، فرآیند متابولیک دی ساکارید مرتبط بودند.

در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۷ ژن برتر ($P < 0.01$) شامل SCD, CSN1S1, RNASE1, LOC525947, FASN, FCGR2, PIGR, GTSE1, ACSS2, DGAT1, H1FO, CSN3, SLC27A6, DGAT2, XDH, INSIG1, SREBF1 انتخاب شدند. با تجزیه و تحلیل پروموتور این ۱۷ ژن، ۱۵ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتوری ۱۷ ژن مورد نظر قرار داشتند. ۱۵ فاکتور رونویسی شناسایی شده عبارتند از ZEB1, Drosophila initiator motifs, NFAT, MOK-2, IKAROS2, KLF4, GATA1, KSCAN3, SPI1, SMARCA5, PLAG1, NKX3.2, KID3, ZNF35, KRAB. توالی‌های پروموتوری این ۱۰ ژن در شکل ۵ گزارش شده است.

نتایج حاصل از ترسیم شبکه با STRING منجر به شناسایی هفت فاکتور رونویسی شد که با ژن‌های دیگر ارتباط داشتند. در شکل ۴ شبکه ژنی ترسیم شده با STRING ارائه شده است. بطور کلی ۲۱ ژن وارد شبکه شد که در این میان ژن‌های TP53, HDAC2, CREBBP و غیره بالاترین ارتباطات را با دیگر ژن‌ها داشتند. بعد از بررسی گروه‌های کارکردی مرتبط با ژن‌های درگیر در شبکه‌ی ژنی، ۶۱ عبارت مرتبط با مراحل گوناگون بیولوژیکی معنادار شد ($P < 0.05$) که بیشتر آنها مرتبط با خون-سازي جنين، توسعه اندام جنين، توسعه بافت، تنظيم رشد، چسبندگی سلول-سلول، تمایز سلول‌های B، تنظيم تکثیر سلولی، فعال‌سازی سلول‌های T دخیل در پاسخ ایمنی، توسعه اندام، غیره بودند. این نتایج مؤید احتمال وجود ارتباط فاکتورهای رونویسی شناسایی شده با فرآیند شروع شیردهی می‌باشد.

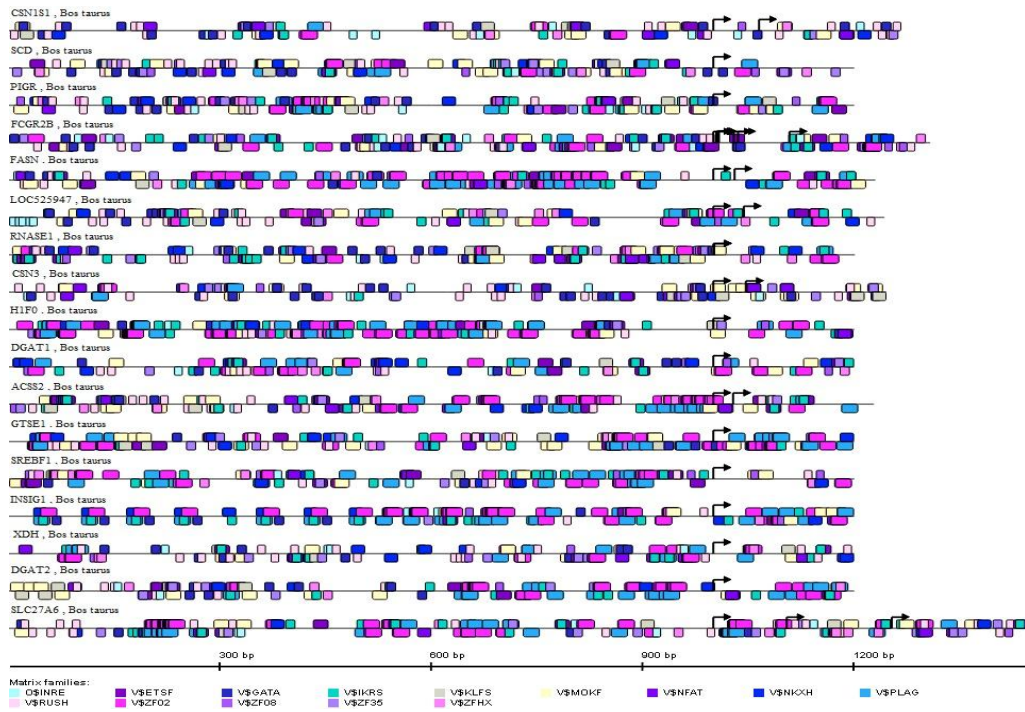
ج) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان:

نتایج نشان داد که ۲۳۴ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه بافت پستان گاو هفت و ۳۵ روز از زایمان داشتند ($P < 0.01$). پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۲۳۴ ژن با بیان بالا و معنادار، ۳۱ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ($P < 0.05$) که

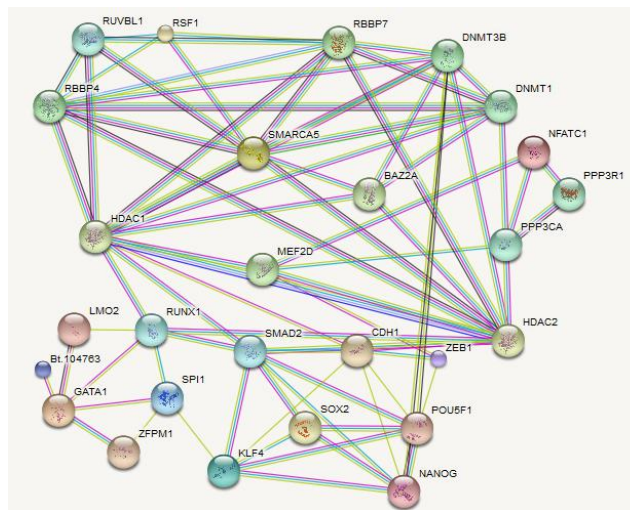


شکل ۴. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در شروع شیردهی در حالت مقایسه بافت پستان گاو شیری ۷ روز قبل با سه روز بعد از

زایمان



شکل ۵. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن‌های دخیل در بافت پستان گاو شیری (مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان) که در تمام ۱۷ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن‌ها است. هر یک از خانواده‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده‌اند.



شکل ۶. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در شروع شیردهی در حالت مقایسه بافت پستان گاو شیری در مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان.

گزارش شده است (Lupoli et al., 2001). سیستم lactoperoxidase یک سیستم ضد میکروبی است که بطور طبیعی در شیر رخ می‌دهد (Fonteh et al., 2002). گزارش شده است که ژن *DGAT1*، زمینه‌ساز تنوع ژنتیکی زیادی در ترکیب چربی شیر گاوهای شیری می‌باشد. چندشکلی لیزین به آلانین در *DGAT1*، ۵۰٪ تنوع ژنتیکی در درصد چربی شیر را توضیح می‌دهد و اثر قوی بر ترکیب اسیدهای چرب شیر دارد (Schennink et al., 2007). بیان بالای ژن *DNAJC12* (*Hsp40*) در بافت پستان گاو، ۳۰ روز پس از زایمان گزارش شده است (Wang et al., 2012). با بررسی مطالعات قبلی مشخص شده است که فاکتورهای رونویسی شناسایی شده را می‌توان با توجه به عملکردشان به چند دسته تقسیم‌بندی کرد که عبارتند از: ۱. فاکتورهای رونویسی که نقش آن‌ها در میحث فرآیند شروع شیردهی در بافت پستان گاوهای شیری از قبل تأیید شده است. به عنوان مثال گزارش شده است که فاکتورهای رونویسی *CEBP* و *EVI1* (*MEL1*) به بیان پروتئین‌های شیر مربوط می‌باشند (Keating et al., 2007). همچنین گزارش شده است که اتصال فاکتورهای رونویسی *SRY*، *GATA1*، *c-Myb*، *GFI1*، *AREB6*، *C/EBP*، *Nkx-2.5* در پروموتور ژن *s1* کازئین (*CSN1S1*) در گاو اثبات شده است (al., 2013 Kishore et). گزارش شده است که در گاوهای شیری، فاکتور رونویسی *bHLH* با ورود به هسته، بطور مستقیم ژن‌های مورد نیاز برای سنتز اسیدهای چرب و کلسترول را فعال می‌کند (Gao et al., 2013). کاهش بیان *IL-2* در مراحل قبل از زایمان نسبت به مراحل بعدی شیردهی گزارش شده است. نقش فاکتور رونویسی *IL-2* در افزایش تکثیر سلول‌های پستان، افزایش فعالیت لمفوسیت‌ها و افزایش تعداد سلول‌های پلازما گزارش شده است (Sordillo and Streicher, 2002). گزارش شده است که *PLAG1* در تولید مثل، تولید شیر، اندازه بدن و شکل‌گیری ماهیچه‌ها نقش دارد (Zhao et al., 2015). افزایش بیان *Nkx-2.5* در بافت پستانی شیرده در مقایسه با بافت پستان غیرشیرده در انسان گزارش شده است (Dentice et al., 2004).

نتایج حاصل از ترسیم شبکه با *STRING* منجر به شناسایی هفت فاکتور رونویسی شد که با ژن‌های دیگر ارتباط داشتند. در شکل ۶ شبکه ژنی ترسیم شده با *STRING* ارائه شده است. بطور کلی ۲۰ ژن وارد شبکه شد که در این میان ژن‌های *DNMT3B*، *HDAC1*، *HDAC2*، *RBPP4* بالاترین ارتباطات را با دیگر ژن‌ها داشتند. بعد از بررسی گروه‌های کارکردی مرتبط با ژن‌های درگیر در شبکه‌ی ژنی، ۱۴ عبارت مرتبط با مراحل گوناگون بیولوژیکی معنادار شد ($P < 0.05$) که بیشتر آن‌ها مرتبط با تنظیم مثبت فرآیندهای متابولیک سلولی، فرآیندهای متابولیک اولیه، تنظیم بیان ژن، تنظیم مثبت رونویسی بودند.

بحث

فرآیند شروع شیردهی شامل دو مرحله می‌باشد، مرحله اول چند هفته قبل از زایمان آغاز می‌شود و مرحله دوم نزدیک زایمان می‌باشد و تا چند روز پس از زایمان نیز ادامه می‌یابد. به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم ژن‌های مؤثر در فرآیند شروع شیردهی در بافت پستان گاو شیری، تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های با بیان بالا و مشابه در این مراحل بررسی شد. همانطور که ذکر شد نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های *RNA-Seq* در سه حالت مختلف ذکر شده، نشان داد که ژن‌های بسیار در بافت پستان گاوشیری در سه حالت متفاوت اوایل شیردهی بیان بالایی داشتند.

الف) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۳۵ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان: در این حالت ۱۰ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال بر اساس مطالعات ژن *CSN1S1* به عنوان یکی از اصلی‌ترین کازئین‌های در شیر گاو گزارش شده است. نقش پروموتور *CSN1S1* در بیان کازئین، دلالت بر اثر این ژن در تولید پروتئین شیر در بافت پستان دارد (Prinzenberg et al., 2003). نقش ژن *CSN3* بشدت با خصوصیات انعقاد شیر در گاوهای هلشتاین گزارش شده است (Caroli et al., 2009). افزایش قابل توجه سطح *somatostatin* (*SST*) در پلازما، ۳۰ دقیقه بعد از آغاز شیردوشی در گاوهایی که بطور جداگانه‌ای نگهداری می‌شدند

MOK-, NKX3.2(BAPX1), type homeodomains Drosophila initiator motifs, Barx2, Gsh-2, 2 شناسایی شدند که دارای نقش اثبات شده در بافت پستان و فرآیند شروع شیردهی در گاو شیری بوده و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارش نشده است. با توجه به اینکه این فاکتورها روی توالی‌های پرموتوری ژن‌های با بیان مشابه و درگیر در شروع شیر-دهی شناسایی شده است و همچنین در کنار فاکتورهایی شناسایی شده‌اند که دارای نقش اثبات شده و یا مرتبط با بافت پستان می-باشند، کاندیدهای مهم و جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش در شروع شیردهی در بافت پستان گاوهای شیری در دوره اولیه شیردهی می‌باشند.

ب) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ روز قبل از زایمان با ۳ روز بعد از زایمان: در این حالت ۱۳ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال نقش ژن LPL در جذب اسیدهای چرب بافت پستان از خون گزارش شده است (Gao et al., 2013). ژن MNC15 به عنوان یک پروتئین بسیار گلیکوزیله مرتبط با غشای گلبول چربی شیر در گاو گزارش شده است (Pallesen et al., 2007). چندشکلی ژن MUC1 شیر گاوهای هلشتاین گزارش شده است (Huott et al., 1995) و این چند شکلی ارتباط نزدیکی با تنوع گلبول‌های موسین چربی شیر دارد (Rasero et al., 2002). گزارش شده است که ژن adrenomedullin در طول شیردهی در غده پستان تنظیم می‌شود. این ژن به عنوان یک عامل آندوژن زنده‌مانی بافت شناخته شده و تعدیل‌کننده پاسخ‌های التهابی می‌باشد (Elsasser et al., 2007). بیان نسبی پروتئین‌های اصلی شیر (CSN1S1، PAEP، CSN3، LALBA، CSN2 و LALBA) الگوی مشابهی را در ۲۰ هفته آغاز شیردهی نشان داده است (Sigl and Wiedermann, 2012). نقش ژن FABP3 در متابولیسم لیپید در بافت پستان گاو گزارش شده است. همچنین بیان فوق العاده بالای ژن FABP3 در طول انتقال از دوره غیرشیردهی به شیردهی گزارش شده است. بیان این ژن در شروع شیردهی نسبت به سطوح بعدی پس از زایمان بسیار بیشتر است (Bionaz and

۲. فاکتورهای رونویسی که نقش شناخته شده‌ای در فرآیند شروع شیردهی برای آنها گزارش نشده است اما به نحوی مرتبط با شروع شیردهی و بافت پستان می‌باشند. به عنوان مثال نقش فاکتور رونویسی ETS2 در سرطان پستان و شیردهی غیرطبیعی گزارش شده و این فاکتور رونویسی با فوتیپ غده پستانی (ورم پستان) ارتباط دارد (Ogorevc et al., 2009). گزارش شده است که FOXA1 یکی از عوامل ضروری ریخت‌شناسی مجرای پستان می‌باشد (Benardo et al., 2010) و در توسعه بافت پستان نقش دارد (Bernardo, 2012). گزارش شده است که در انسان بیان فاکتور رونویسی NANOG در اپیتلیوم پستان در حال استراحت حداقل بود اما در اپیتلیوم شیرده افزایش بیان داشته است (Twigger et al., 2013). گزارش شده است که فاکتور رونویسی KRAB در جنین و غده بالغ از طریق توسعه چرخه پستان، با سطوح بالاتر در آستنی بیان می‌شود (Oliver et al., 2012). گزارش شده است که KLF4 ممکن است سیستم ایمنی را در طول پیشرفت سرطان پستان سرکوب کند (Yu et al., 2013). نقش فاکتور رونویسی NFAT در کنترل ژن‌های سایتوکین دخیل در پاسخ‌های ایمنی گزارش شده است (Mazière et al., 2005). گزارش شده است که FOXP1 با پاسخ به محرک هورمون استروئیدی، سطوح تغذیه، انتقال اسید، توسعه رشد سلولی و توسعه سیستم ایمنی ارتباط دارد (Huang et al., 2015). بنابراین ۹ فاکتور رونویسی گزارش شده در این گروه که شامل فاکتورهای رونویسی NFAT، FOXP1، Ikarose2، ETS2، OXA1، NANOG، KRAB، ZBTB33 می‌باشند به عنوان کاندیدهای جدید در تنظیم ژن‌های مؤثر در فرآیند شروع شیردهی در اوایل شیردهی در گاو شیری معرفی می‌شوند.

۳. فاکتورهای رونویسی که دارای نقش اثبات شده در فرآیند شروع شیردهی در بافت پستان گاو شیری در اوایل شیردهی نیستند و در مراحل مشابه نقش برای آنها گزارش نشده است. همچنین در مطالعه حاضر ۱۱ فاکتور رونویسی جدید شامل S8، SIX3، SMARCA5، SPI1، KSCAN3، ZNF35

serotransferrin-like در آغوز و شیر mature گزارش شده است (Yamada et al., 2002). بیان بالای ژن SLC31A2 در بافت پستان گاو شیری در دوره پس از زایمان گزارش شده است (Wang et al., 2012). آنزیم RNASE1 به عنوان یکی از پروتئین‌های سرم شیر گاو گزارش شده است (Zhang et al., 2015). گزارش شده است که mRNA ژن ACSS2 بطور قابل توجهی در طول دوره شیردهی افزایش یافته است. الگوی رونوشت ACSS2 با تولید استیل کوآ بافت پستان در گاو در طول شیردهی مطابقت دارد (Mellenberger et al., 1973). بیان بالای ژن INSIG1 نزدیک به پیک شیردهی گزارش شده است و نقش مرکزی در کنترل متابولیسم لیپید دارد (Ntambi and Miyazaki, 2003). نقش ژن XDH در شکل‌گیری قطرات چربی در شیر گاو گزارش شده است (Bionaz and Loor, 2008). گزارش شده است که ژن BTN1A1 برای ترشح مناسب چربی شیر لازم است (Ogg et al., 2004). ژن DGAT1 ژنی است که با QTL صفات تولید شیر روی کروموزوم چهارده ارتباط دارد (Spelman et al., 2002). از ۱۵ فاکتور رونویسی شناسایی شده در حالت ج، تمام این فاکتورها در حالت الف نیز وجود داشتند بودند و مورد بررسی قرار گرفتند و جدید بودن این فاکتورهای رونویسی در مرحله قبل اثبات گردید.

نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی در مطالعه حاضر با فرض مشابه بودن ساختار پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه در فرآیند شروع شیردهی، ۲۴ فاکتور رونویسی کاندید جدید در بافت پستان گاو شیری در سه حالت مختلف بررسی شده در اوایل دوره شیردهی شناسایی گردید. با بررسی نتایج کلیه حالات مورد نظر و بررسی نتایج گروه‌های کارکردی و با توجه به اینکه تنظیم‌گرها (فاکتورهای رونویسی) و ژن‌های ذکر شده دارای نقش اثبات شده و یا مرتبط با شروع شیردهی می‌باشند اما تا کنون در بافت پستان گاو شیری در سه زمان ذکر شده گزارش نشده‌اند، بنابراین فاکتورهای رونویسی ذکر شده کاندیدهای مهم و جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش تنظیمی

(Loor, 2008). گزارش شده است که CSN3 نقش مهمی در شیمی شیر از طریق ثبات کلونیدی به مسیل کازئین ایفا می‌کند (Rachagani and Gupta, 2008). بیان CD36 در بافت غده پستان در مراحل مختلف شیردهی گزارش شده است. بیان CD36 در طی شیردهی نشان می‌دهد که این پروتئین برای آرایش و عملکرد مناسب پروتئین‌های غشای پلاسمایی سلول‌های اپیتلیال غده پستانی ضروری می‌باشند (Spitsberg et al., 1995). از ۱۷ فاکتور رونویسی شناسایی شده در حالت ب، ۱۷ فاکتور با حالت الف مشترک بودند و مورد بررسی قرار گرفتند و جدید بودن این فاکتورهای رونویسی در مرحله قبل اثبات گردید. در رابطه با نقش فاکتور رونویسی TTF1 در سرطان سینه گزارش شده است (Sakurai et al., 2011) و به عنوان کاندید جدید معرفی می‌گردد. همچنین در مطالعه حاضر سه فاکتور رونویسی جدید شامل YY2، SRY، FAC1، شناسایی شدند که دارای نقش اثبات شده در بافت پستان و لاکتوژنز در گاو شیری نبوده و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارش نشده است. با توجه به اینکه این فاکتورها بطور مشترک روی توالی‌های پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه و درگیر در شروع شیردهی شناسایی شده است و همچنین در کنار فاکتورهای شناسایی شده‌اند که دارای نقش اثبات شده و یا مرتبط با بافت پستان می‌باشند، کاندیدهای مهم و جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش در شروع شیردهی در بافت پستان گاوهای شیری در دوره اولیه شیردهی می‌باشند.

(ج) مقایسه بافت پستان گاو شیری در ۷ و ۳۵ روز قبل از زایمان: در این حالت ۱۷ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال گزارش شده است که ژن PIGR در توسعه غده پستان و تنظیم هورمونی در گوسفند نقش دارد (Rinchev-Alarnold et al., 2002). نقش ژن FCGR2 در شیر گاو گزارش شده است. همچنین نقش این ژن در متابولیسم کربوهیدرات، پاسخ التهابی، گزارش شده است (D'Alessandro et al., 2011). نقش ژن FASN در متابولیسم لیپید در فرآیند شروع شیردهی در گاو شیری گزارش شده است (D'Alessandro et al., 2011). بیان ژن

- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21(13): 2933-2942.
- D'Alessandro, A., Zolla, L. and Scaloni, A. (2011). The bovine milk proteome: cherishing, nourishing and fostering molecular complexity. An interactomics and functional overview. *Molecular BioSystems*. 7(3): 579-597.
- Dentice, M., Luongo, C., Elefante, A., Romino, R., Ambrosio, R., Vitale, M., Rossi, G., Fenzi, G. and Salvatore, D. (2004). Transcription factor Nkx-2.5 induces sodium/iodide symporter gene expression and participates in retinoic acid-and lactation-induced transcription in mammary cells. *Molecular and cellular biology*. 24(18): 7863-7877.
- Elsasser, T.H., Capuco, A.V., Caperna, T.J., Martínez, A., Cuttitta, F. and Kahl, S. (2007). Adrenomedullin (AM) and adrenomedullin binding protein (AM-BP) in the bovine mammary gland and milk :Effects of stage of lactation and experimental intramammary E. coli infection. *Domestic animal endocrinology*. 32(2): 138-154.
- Fatima, A. (2014). Analysis of hepatic microRNA expression in postpartum dairy cows in negative energy balance.
- Finucane, K.A., McFadden, T.B., Bond, J.P., Kennelly, J.J. and Zhao, F.Q. (2008). Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Functional & integrative genomics*. 8(3): 251-264.
- Fonteh, F.A., Grandison, A.S. and Lewis, M.J. (2002). Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. *Journal of Dairy Research*. 69(03): 401-409.
- Gao, Y., Lin, X., Shi, K., Yan, Z. and Wang, Z. (2013). Bovine mammary gene expression profiling during the onset of lactation. *PloS one*. 8(8): e70393.
- در بافت پستان گاوهای شیری در اوایل شیردهی بوده و دارای پتانسیل مناسبی برای بررسی بیشتر در سطح آزمایشگاهی به منظور شناسایی ژن‌های مهم کاندیدا و انتخاب به کمک مارکر می‌باشند. همچنین از روش استفاده شده در مطالعه‌ی حاضر می‌توان برای درک سازوکارهای تنظیمی مؤثر در بافت‌ها و شرایط مختلف نیز بهره برد.

منابع

- Bakhtiarizadeh, M.R., Moradi-Shahrbabak, M. and Ebrahimie, E. (2014). Transcriptional regulatory network analysis of the over-expressed genes in adipose tissue. *Genes & Genomics*. 36(1): 105-117.
- Bernardo, G.M. (2012). Discerning the role of FOXA1 in mammary gland development and breast cancer, *Case Western Reserve University*. 1-240.
- Bernardo, G.M., Lozada, K. L., Miedler, J.D., Harburg, G., Hewitt, S.C., Mosley, J.D., Godwin, A.K., Korach, K.S., Visvader, J.E. and Kaestner, K.H. (2010). FOXA1 is an essential determinant of ER α expression and mammary ductal morphogenesis. *Development*. 137(12): 2045-2054.
- Bionaz, M. and Loor, J.J. (2008). ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *The Journal of nutrition*. 138(6): 1019-1024.
- Bionaz, M. and Loor, J.J. (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC genomics*. 9(1): 1.
- Bionaz, M. and Loor, J.J. (2011). Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinformatics and biology insights*. 5: 83.
- Buermans, H. and Den Dunnen, J. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1842 (10): 1932-1941.
- Caroli, A., Chessa, S. and Erhardt, G. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of dairy science*. 92(11): 5335-5352.

- Huang, D.W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 4(1): 44-57.
- Huang, S., Wang, J., Yue, W., Chen, J., Gaughan, S., Lu, W., Lu, G. and Wang, C. (2015). Transcriptomic variation of hepatopancreas reveals the energy metabolism and biological processes associated with molting in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Scientific reports*. 5.
- Huott, M.L., Josephson, R.V., Hens, J.R., Rogers, G.W. and Patton, S. (1995). Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS-I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 111(4): 559-565
- Jalili, R. 2013. Next Generation Sequencing Methods and Its Impacts on Genomics and Clinical Applications. Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A. and Simonovic, M. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1): D412-D416. Keating, A., Davoren, P., Smith, T., Ross, R. and Cairns, M. (2007). Bovine κ -casein gene promoter haplotypes with potential implications for milk protein expression. *Journal of dairy science*. 90(9): 4092-4099.
- Kishore, A., Mukesh, M., Sobti, R.C., Mishra, B.P. and Sodhi, M. (2013). Variations in the regulatory region of alpha s1-casein milk protein gene among tropically adapted Indian native (*Bos Indicus*) cattle. *ISRN biotechnology* . 1-10.
- Le, T.D., Liu, L., Zhang, J., Liu, B. and Li, J. (2015). From miRNA regulation to miRNA-TF co-regulation: computational approaches and challenges. *Briefings in bioinformatics*, 16(3): 475-496.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*, 2012. 1-11.
- Lupoli, B., Johansson, B., Uvnas-Moberg, K. and Svennersten-Sjaunja, K. (2001). Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. *Journal of Dairy Research*. 68(02): 175-187.
- Mazière, C., Morlière, P., Massy, Z., Kamel, S., Louandre, C., Conte, M.A. and Mazière, J.C. (2005). Oxidized low-density lipoprotein elicits an intracellular calcium rise and increases the binding activity of the transcription factor NFAT. *Free Radical Biology and Medicine*. 38(4): 472-480.
- Mellenberger, R., Bauman, D. and Nelson, D. (1973). Metabolic adaptations during lactogenesis. Fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. *Biochemical Journal*. 136(3): 741-748.
- Najafpanah, M.J., Sadeghi, M., and Bakhtiarzadeh, M.R. (2013). Reference genes selection for quantitative real-time PCR using RankAggreg method in different tissues of *Capra hircus*. *PloS one*; 8 (12): e83041.
- Yamada, M., Murakami, K., Wallingford, J. C. and Yuki, Y. (2002). Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 23(7-8): 1153-1160.
- Yu, F., Shi, Y., Wang, J., Li, J., Fan, D. and Ai, W. (2013). Deficiency of Kruppel-like factor KLF4 in mammary tumor cells inhibits tumor growth and pulmonary metastasis and is accompanied by compromised recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *International journal of cancer*. 133(12): 2872-2883.
- Zhang, L., Boeren, S., Hageman, J.A., van Hooijdonk, T., Vervoort, J. and Hettinga, K. (2015). Perspective on calf and mammary gland development through changes in the bovine milk proteome over a complete lactation. *Journal of dairy science*. 98(8): 5362-5373.
- Zhao, F., McParland, S., Kearney, F., Du, L. and Berry, D. P. (2015). Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genetics Selection Evolution*. 47(1): 1.

- Ntambi, J.M. and Miyazaki, M. (2003). Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Current opinion in lipidology*, 14(3): 255-261.
- Ogg, S.L., Weldon, A.K., Dobbie, L., Smith, A.J. and Mather, I.H. (2004). Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27): 10084-10089.
- Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A. and Dovc, P. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal genetics*. 40(6): 832-851.
- Oliver, C.H., Khaled, W.T., Friend, H., Nichols, J. and Watson, C. J. (2012). The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3. *Genes & development*. 26(10):1086-1097.
- Pallesen, L.T., Pedersen, L.R.L., Petersen, T.E. and Rasmussen, J.T. (2007). Characterization of carbohydrate structures of bovine MUC15 and distribution of the mucin in bovine milk. *Journal of dairy science*. 90(7): 3143-3152.
- Prinzenberg, E.M., Weimann, C., Brandt, H., Bennewitz, J., Kalm, E., Schwerin, M. and Erhardt, G. (2003). Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: linkage mapping, intragenic haplotypes, and effects on milk production traits. *Journal of dairy science*. 86(8): 2696-2705.
- Rachagani, S. and Gupta, I.D. (2008). Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. *Genetics and Molecular Biology*. 31(4): 893-897.
- Rasero, R., Sacchi, P., Rosati, S., Cauvin, E. and Maione, S. (2002). Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 119(5): 342-349.
- Rinchev-Alarnold, A., Belair, L. and Djiane, J. (2002). Developmental expression of pIgR gene in sheep mammary gland and hormonal regulation. *Journal of dairy research*. 69(01): 13-26.
- Sakurai, A., Sakai, Y. and Yatabe, Y. (2011). Thyroid transcription factor-1 expression in rare cases of mammary ductal carcinoma. *Histopathology*. 59(1): 145-148.
- Schennink, A., Stoop, W., Visker, M.W., Heck, J., Bovenhuis, H., Van Der Poel, J., Van Valenberg, H. and Van Arendonk, J. (2007). DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal genetics*. 38(5): 467-473.
- Sigl, T., H. Meyer and S. Wiedemann (2012). "Gene expression of six major milk proteins in primary bovine mammary epithelial cells isolated from milk during the first twenty weeks of lactation." *Czech J Anim Sci* 57: 469-480.
- Sordillo, L.M. and K.L. Streicher (2002). "Mammary gland immunity and mastitis susceptibility." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(2): 135-146.
- Sorensen, M., Nørgaard, J.V., Theil, P.K., Vestergaard, M. and Sejrsen, K. (2006). Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of dairy science*. 89(12): 4632-4639.
- Spelman, R., Ford, C., McElhinney, P., G. and Snell, R. (2002). Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*. 85(12): 3514-3517.
- Spitsberg, V.L., Matitashvili, E. and Gorewit, R. C. (1995). Association and Coexpression of Fatty-Acid-Binding Protein and Glycoprotein CD36 in the Bovine Mammary Gland. *European Journal of Biochemistry*. 230(3): 872-878.
- Suchyta, S.P., Sipkovsky, S., Halgren, R.G., Kruska, R., Elftman, M., Weber-Nielsen, M., Vandehaar, M.J., Xiao, L.,
- Twigger, A. J., Hodgetts, S., Filgueira, L., Hartmann, P. E. and Hassiotou, F. (2013). From Breast Milk to Brains The Potential of Stem Cells in Human Milk. *Journal of Human Lactation*. 29(2): 136-139.
- Wang, M., Moisés, S., Khan, M., Wang, J., Bu, D. and Loor, J. (2012). MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *Journal of dairy science*. 95(11): 6529-6535.