نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد نهم، شماره اول، ۱۴۰۰
http://ejrr.gau.ac.ir
۱-۱۶
DOI: 10.22069/ejrr.2021.17106.1711

شناسایی مسیرهای سیگنال‌دهی مؤثر در تولید شیر گاو با استفاده از داده‌های ریز RNA

سعیده اسکندری نسب[۱]، *محمدرضا بحرینی بهزادی[۲] و زهرا رودباری[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد و [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، [۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: اطلاعات حاصل از RNAها به علت اینکه حلقه ارتباط دهنده ژنوتیپ و فنوتیپ هستند، کمک شایانی در فهم و درک جنبه‌های زیست‌شناختی مرتبط با مسیرهای فیزیولوژیکی می‌کنند. ریز RNAها، مولکول‌های ۲۲ نوکلئوتیدی و تک رشته‌ای هستند که می‌توانند به صورت اختصاصی بر عملکرد و بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند. از این رو پژوهش‌های فراوانی در مورد نقش این مولکول‌ها در فرآیندهای زیستی مختلف مانند تولید شیر انجام شده است. صفت تولید شیر یکی از مهمترین صفات در صنعت دامپروری است. این صفت در حیوانات مزرعه به صورت چندژنی می‌باشد و هر ژن ممکن است در مسیرهای زیستی مختلف دخیل باشد و در مقابل هر مسیر زیستی نیز می‌تواند شامل تعداد زیادی ژن شود. این روابط شبکه پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند که نشان دهنده ارتباط تعداد زیادی ژن با تعداد زیادی مسیر زیستی است. مولکول‌های سیگنالی که می‌توانند به عنوان مورفوژن عمل نمایند، الگوی شبکه ژنی ساختمان بافت را در تمام طول عمر از مرحله رویان در حال رشد تا ارگانیزم بالغ کنترل می‌نمایند. مورفوژن‌ها بستگی به میزان ترشح و فاصله منبع ترشح، می‌توانند واکنش‌های مختلف سلولی را ایجاد نمایند. از این رو هدف پژوهش حاضر بررسی مستندسازی عملکردی ژن‌های هدف ریزRNAهای با بیان متفاوت جهت شناسایی تعدادی از مسیرهای زیستی دخیل در فرآیند تولید شیر است.

مواد و روش‌ها: به منظور شناسایی و بررسی مسیرهای زیستی دخیل در تولید شیر از داده‌های توالی‌یابی شده ریزRNA استفاده شد که از پایگاه داده ArrayExpress با شماره دسترسی E-GEOD-61227 استخراج شدند. در مطالعه حاضر همه مراحل استانداردسازی داده‌ها، تفاوت بیان ریزRNAها و تعیین معنی‌داری توسط نرم‌افزار GEO2R انجام شد. معیارهای انتخاب ریز RNAها در این مطالعه شامل p value تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ و (۱>Log fc>-۱) بودند. در مرحله بعد بررسی‌های بیوانفورماتیکی جهت یافتن ژن هدف هر ریزRNA انجام شد. بدین منظور ریزRNAهای با بیان متفاوت حاصل از تجزیه و تحلیل در مرحله قبل، جهت پیدا کردن ژن‌های هدف به نرم‌افزار Target Scan معرفی شدند. پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌های هدف ریزRNA جهت بررسی اطلاعات زیستی و آنالیز عملکردی از سرور DAVID استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که ۲۳ ریزRNA با بیان متفاوت وجود دارد که ژن‌های زیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و این ژن‌ها در مسیرهای سیگنال‌دهی TGF-β، WNT، MAPK، mTOR، PI3k-Akt، انسولین، استروژن و پرولاکتین نقش دارند که بیشتر این مسیرهای سیگنال‌دهی در رشد و تکثیر سلولی، فعالیت سلول‌های اپیتلیال و در نتیجه توسعه غدد پستان

*نویسنده مسئول: bahreini@yu.ac.ir

تاثیرگذار هستند. از آنجایی که این مسیرهای شناسایی شده با تولید شیر ارتباط دارند می‌توان از ژن‌های شناسایی شده در این مسیرهای سیگنال‌دهی در بهبود صفت تولید شیر استفاده کرد.

نتیجه‌گیری: ژن‌های MAPK1، MAPK8، FASLG و PTEN در اکثر مسیرهای زیستی فعال و با ژن‌های مختلفی در ارتباط هستند، بر این اساس این ژن‌ها جزء ژن‌های عمده اثر در فرآیند تولید شیر به شمار می‌روند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، ژن هدف، غده پستان، مسیر زیستی

مقدمه

اطلاعات حاصل از RNAها به علت اینکه حلقه ارتباط دهنده ژنوتیپ و فنوتیپ هستند، کمک شایانی در فهم و درک جنبه‌های زیست‌شناختی مرتبط با مسیرهای فیزیولوژیکی می‌کنند (۳۲). ریزRNAها، مولکول‌های RNA کوچک با طول ۲۲ نوکلئوتید و تک رشته‌ای هستند که می‌توانند به صورت اختصاصی بر عملکرد و بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند. از این رو تحقیقات فراوانی در مورد نقش این مولکول‌ها در فرآیندهای زیستی مختلف مانند تولید شیر انجام شده است (۱۷). مصرف شیر و فرآورده‌های آن باعث بالا رفتن سطح تندرستی، هوش، قدرت فراگیری، طول عمر، کارایی و تأخیر در از کارافتادگی انسان می‌شود. همچنین در صورت افزایش تولید شیر و ایجاد مازاد بر مصرف مطلوب در کشور، می‌تواند صادر شود (۲۰). افزایش شیر تولیدی در کاهش هزینه‌ها و سودآوری بیشتر واحدهای تولیدی نقش دارد (۲). از آنجا که شیر و فرآورده‌های لبنی از بهترین منابع تأمین پروتئین و کلسیم به شمار می‌رود، در تمامی نقاط دنیا در زمینه‌ی تولید، تجارت و مصرف بهینه آن سرمایه-گذاری قابل توجهی صورت می‌گیرد. به همین منظور یکی از فعالیت‌های اصلی دامداری در دنیا پرورش دام‌های شیری است (۲). داده‌های حاصل از ریزRNAها بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است زیرا اطلاعات دیجیتالی از رونوشت‌های داخل بافت (سلول) را مهیا می‌کند و این مولکول‌ها با توجه به اینکه در بین گونه‌ها به صورت محافظت شده باقی مانده‌اند و فرآیند انشقاق گونه‌ها در ساختار و توالی آنها تأثیر نداشته است، دارای نقش قابل توجه‌ای در شناسایی مسیرهای زیستی می‌باشند (۳۱). هر ژن ممکن است در مسیرهای زیستی مختلفی دخیل باشد و در مقابل هر مسیر زیستی هم می‌تواند از تعداد زیادی ژن شامل شود که این روابط شبکه پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند که نشان دهنده ارتباط تعداد زیادی ژن با تعداد زیادی مسیر زیستی است. شناسایی این مسیرهای زیستی و ژن‌های تشکیل دهنده‌ی آنها دیدگاه وسیع‌تر و فهم کامل‌تری در مورد مکانیسم ژنتیکی پیچیده فنوتیپ صفات تولیدی ایجاد می‌کند که می‌تواند از طریق شناسایی نشانگرهای زیستی کاندید برای صفات تولیدی مختلف قدم مفیدی در ارائه راهبردی جهت بهبود اصلاح نژاد دام باشد (۱).

از این رو هدف پژوهش حاضر واکاوی پروفایل بیان ریزRNA مربوط به بافت پستانی به منظور شناسایی ریز RNAهای دارای تغییرات بیان در گاو شیری و بررسی مستندسازی عملکردی ژن‌های هدف ریزRNAهای با بیان متفاوت جهت شناسایی تعدادی از مسیرهای زیستی دخیل در فرآیند تولید شیر است. تا در نهایت بتوان، با نتایج ارائه شده در این پژوهش، به دید روشن‌تری نسبت به عملکرد مکانیسم ژنتیکی پیچیده تولید شیر با استفاده از ابزارهای دقیق، سریع و در دسترس، دست یافت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور شناسایی و بررسی مسیرهای زیستی دخیل در تولید شیر از داده‌های توالی‌یابی شده ریزRNA موجود در پایگاه داده ArrayExpress با شماره دسترسی E-GEOD-61227 استفاده شد. داده‌ها از آزمایش‌های انجام شده روی چهار گاو نژاد هلشتاین و چهار گاو نژاد لیموزین به‌دست آمدند که شماره دسترسی نمونه‌های بافت پستان استفاده شده در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- شماره دسترسی نمونه‌های بافت پستان استفاده شده در پژوهش حاضر

Table 1. The accession number of mammary tissue samples used in this study

تعداد	گاو هلشتاین	گاو لیموزین
۱	GSM1499907	GSM1499911
۲	GSM1499908	GSM1499912
۳	GSM1499909	GSM1499913
٤	GSM1499910	GSM1499914

همه مراحل استانداردسازی داده‌ها، تفاوت بیان ریزRNA ها، معنی‌داری و کیفیت داده‌های خام توسط پیش‌فرض‌های نرم‌افزار GEO2R انجام شد. معیارهای انتخاب ریزRNAها در این مطالعه P value تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ بود (۱). یکی دیگر از معیارهای انتخاب ریزRNAها (۱<Log FC<۱-) می‌باشد (۱). ریز RNAهایی که لگاریتم Fold change آن‌ها کمتر از ۱- است بیان پایینی دارند و ریزRNAهایی که لگاریتم Fold change آن‌ها بیشتر از ۱+ است بیان بالایی دارند. با شناسایی ریز RNA همواره شناسایی ژن‌های هدف ریزRNA نیز ضروری است. یکی از کاربردی‌ترین نرم‌افزارها TargetScan است که در پژوهش حاضر از آن استفاده شد. این نرم‌افزار ابتدا جفت‌شدگی به ناحیه seed را جستجو و سپس به نواحی اطراف بسط داده می‌شود. به این ترتیب بسیاری از پاسخ‌های مثبت کاذب از همان ابتدا فیلتر می‌شوند (۳۰). پس از شناسایی و مشخص شدن ژن-های هدف ریزRNAها به منظور بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌های معنی‌دار و کاوش مسیرهای زیستی از سرور DAVID استفاده شد. DAVID یک پایگاه داده برای فهم عملکرد زیستی ژن‌ها می‌باشد (۱۲) و در دسته‌بندی زیستی گروهی از ژن‌ها جهت بررسی اطلاعات زیستی و آنالیز عملکردی آن‌ها کارآمد است. این پایگاه با اتصال به پایگاه‌های دیگری مانند GO و KEGG به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن‌های معنی‌دار می-پردازد (٦). نتایج این مرحله مسیرهای ژنی و فرایندهای زیستی را که ژن‌ها می‌توانند تحت تأثیر قرار دهد و در کنترل آن‌ها مؤثر می‌باشد، نشان داد. به بیان دیگر این ژن‌ها با اثر بر این مسیرهای ژنی و یا فرایندهای زیستی روی تولید شیر تأثیر گذار می‌باشند.

نتایج و بحث

شیر یکی از ارزشمندترین محصولات دامی است و شناخت مسیرهای ژنی می‌تواند روی این محصول تأثیرگذار باشد (۷). طبق آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی تولید شیر دارای یک روند رو به افزایش است ولی با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است (۷). اهداف اصلاح نژاد در ایران بایستی برای افزایش

تولید شیر در کشور برنامه‌ریزی شود لذا مطالعه و بررسی عواملی که روی تولید و ترکیب شیر نقش مؤثری دارند اهمیت دوچندانی می‌یابد (۷). با توجه به روش ارایه شده در این مطالعه به کنکاش مسیرهای پیام‌دهی هر یک از ریزRNAها پرداخته می‌شود و همچنین با توجه به چند ژنی بودن این مسیرها شناسایی ژن‌های کلیدی مربوط به تولید شیر با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزRNA امکان‌پذیر است (۱۱). در این پژوهش، ابتدا اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده مورد استفاده قرار گرفتند که ۲۳ ریزRNA با بیان متفاوت شناسایی شد که ۹۲۳ ژن هدف داشتند که این ژن‌ها از طریق پایگاه DAVID مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ریزRNAهای با بیان متفاوت در جدول ۲ ارائه شده است. با وجود توسعه دانش زیست‌شناسی، شناسایی شبکه‌های زیستی به ما این اجازه را می‌دهند تا یک بینش عمیق به مکانیسم‌های مولکولی ارگانیزم خاص پیدا کنیم. لذا در پژوهش حاضر، نتایج آنالیز منجر به شناسایی مسیرهای سیگنال‌دهی TGF-β، WNT، MAPK، mTOR، PI3k-Akt، انسولین، استروژن و پرولاکتین شد که موضوع بحث این مقاله می‌باشد و نقش قابل توجه آنها در رشد و تکثیر سلولی، فعالیت سلول‌های اپیتلیال و در نتیجه توسعه غدد پستان گزارش شده است.

جدول ۲- ریز RNAهای با بیان متفاوت

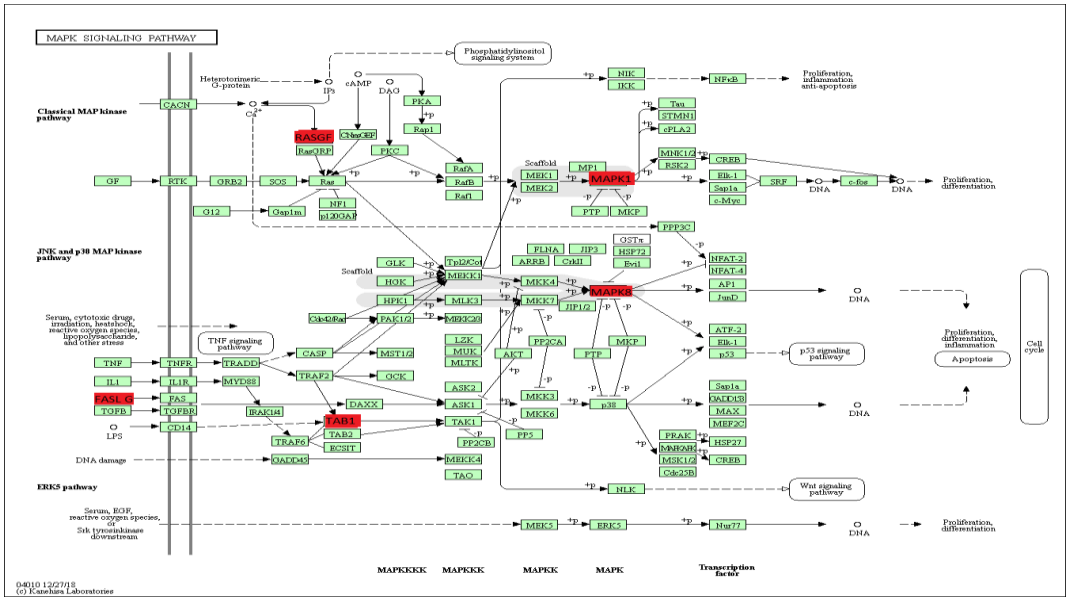
Table 2. MicroRNAs with different expression

ریزRNA	Adj. P value	Log Fold Change
bta-miR-375	1.07×10^{-7}	7.301
bta-miR-218	1.07×10^{-7}	6.733
bta-miR-183	3.22×10^{-7}	5.556
bta-miR-21-3p	4.55×10^{-2}	4.720
bta-miR-190a	4.55×10^{-2}	4.289
bta-miR-1185	5.39×10^{-2}	3.936
bta-miR-376a	6.48×10^{-2}	3.861
bta-miR-146b	4.55×10^{-2}	3.832
bta-miR-491	4.55×10^{-2}	3.262
bta-miR-204	3.79×10^{-6}	2.706
bta-miR-421	4.01×10^{-4}	1.257
bta-miR-146b	3.48×10^{-3}	1.165
bta-miR-29b	1.93×10^{-2}	1.118
bta-miR-21-5p	3.37×10^{-2}	1.073
bta-miR-154c	2.58×10^{-2}	1.049
bta-miR-101	1.17×10^{-2}	1.022
bta-miR-194	1.93×10^{-3}	1.012
bta-miR-155	1.83×10^{-3}	1.189
bta-miR-2413	3.45×10^{-2}	−2.171
bta-miR-2285t	7.61×10^{-3}	−2.119
bta-miR-1247-3p	4.55×10^{-2}	−1.221
bta-miR-2410	4.40×10^{-2}	−1.011
bta-miR-1434-3p	9.56×10^{-3}	−1.193

مولکول‌های سیگنالی که می‌توانند به عنوان مورفوژن عمل نمایند، الگوی شبکه ژنتیکی ساختمان بافت را در تمام طول عمر از مرحله رویان در حال رشد تا ارگانیزم بالغ کنترل می‌نمایند. مورفوژن‌ها

بستگی به میزان ترشح و فاصله منبع ترشح، می‌توانند واکنش‌های کیفی مختلف سلولی را ایجاد نمایند. این مسیرهای زیستی مهم را می‌توان به صورت زیر مورد بحث قرار داد.

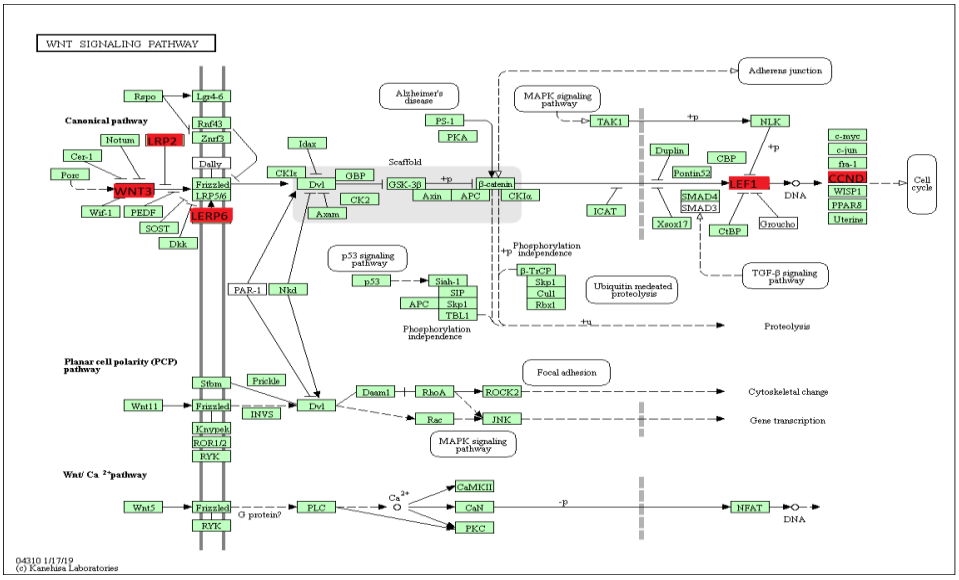
مسیر MAPK: یکی از کلیدی‌ترین تنظیم کننده‌های تمایز سلول‌های اپیتلیال پستان است. این مسیر سیگنال‌دهی بر تکثیر سلول‌های آلوئول تأثیرگذار می‌باشد، افزایش انشعابات را کنترل می‌کند و باعث افزایش ترشح و تولید شیر می‌شود (۳). این مسیر همچنین به تمایز و تکثیر سلول و مرگ سلولی می‌پردازد (٤). در بررسی ژن‌های مورد مطالعه مشخص شد که ژن‌های TAB1، MAPK1، MAPK8، FASLGو RASGF در این مسیر فعال هستند که در شکل ۱ با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.



شکل ۱- مسیر سیگنال‌دهی MAPK، ژن‌های هدف شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

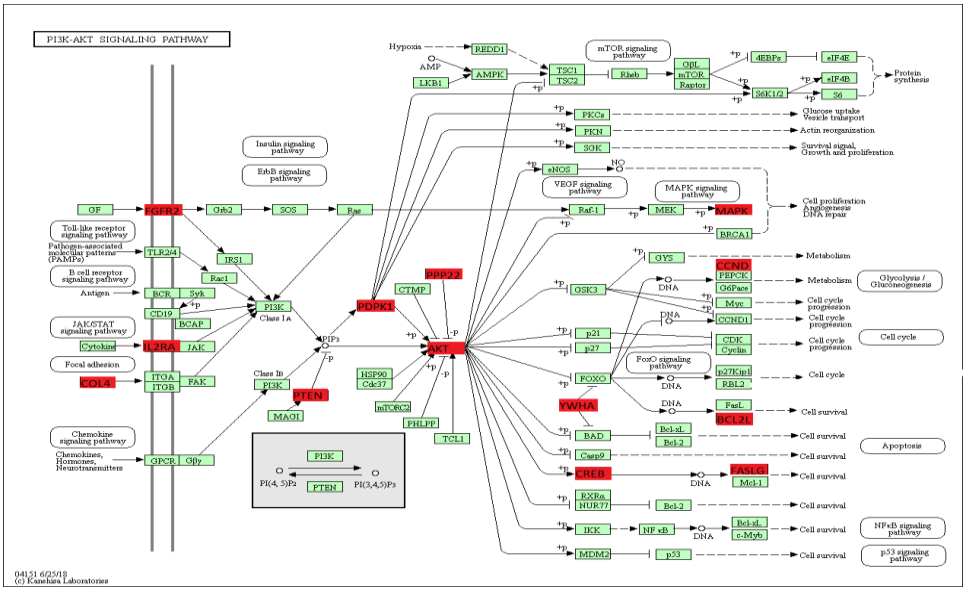
Figure 1. The MAPK signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

مسیر WNT: مسیر سیگنال‌دهی WNT در بسیاری از مراحل رشد در پستانداران شامل تکثیر، تمایز و واکنش‌های اپیتلیال–مزانشیمی که در راستای گسترش بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌باشد، درگیر است. پروتئین‌های WNT خانواده بزرگی هستند که لیگاندهای گلیکوزیله شده که برای رشد پستانداران نیاز است را ترشح می‌کنند. این سیگنال از بدو تولد تا گسترش کامل اندام‌ها فعال است (۲۸). این مسیر برای توسعه‌ی غدد شیری ضروری است و باعث فعال شدن بسیاری از مسیرهای سیگنال‌دهی می‌شود. این مسیر همچنین در تمام مراحل رشد پستان فعال است (۱۵). WNT باعث فعال‌سازی کلاژن و فسفوریلاسیون و چسبندگی سلول‌های پستان می‌شود. همچنین TGF را تنظیم می‌کند و باعث رشد غده پستان می‌شود (۵). از جمله ژن‌های مهم شناسایی شده در این مسیر می‌توان به LEF1، WNT4، WNT3، LRP2، LERP6 و CCND3 اشاره کرد که در این پژوهش به عنوان ژن‌های هدف برای ریزRNAهای با بیان متفاوت، شناسایی شدند و در شکل ۲ نیز با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.



شکل ۲- مسیر سیگنال‌دهی WNT، ژن‌های هدف شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 2. The WNT signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.



شکل ۳- مسیرسیگنال‌دهی PI3k-Akt، ژن‌های هدف شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

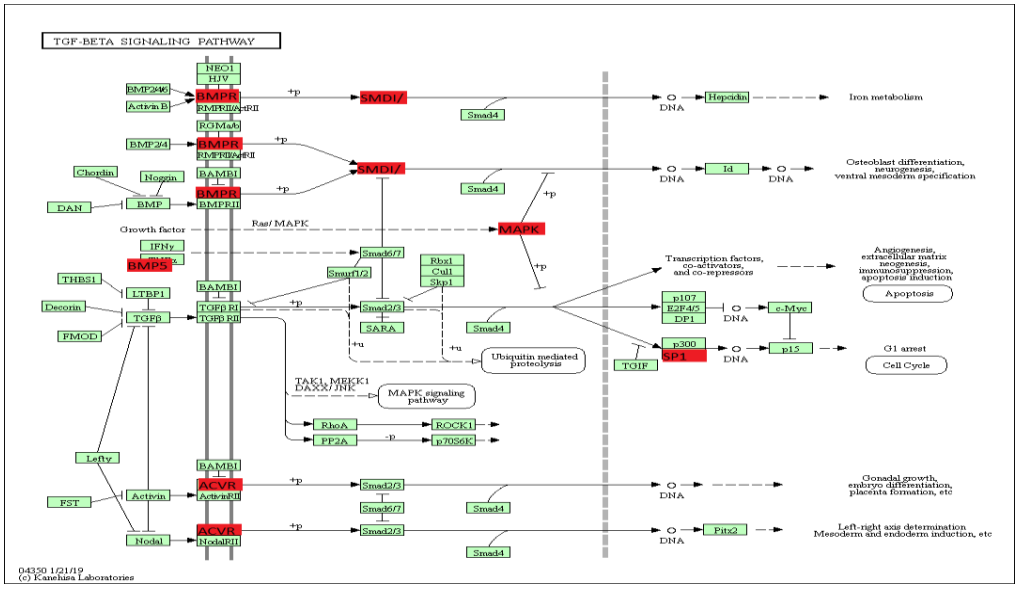
Figure 3. The PI3k-Akt signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

مسیر PI3k-Akt: این مسیر سیگنال‌دهی باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال آلوئول شده و روی ترشح شیر اثر دارد، همچنین باعث افزایش ترجمه پروتئین شیر می‌شود و به عنوان تنظیم کننده اصلی سنتز اسید چرب در شروع شیردهی است (۹). این مسیر نقش مهمی در حمل و نقل گلوکز و بیوسنتز لیپید در سلول‌های اپیتلیال پستان دارد و باعث افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتز چربی می‌شود. همچنین با تحریک ترشح آندوکرین پرولاکتین، بر تولید شیر اثر می‌گذارد و در رشد و نمو پستان‌ها و تداوم ترشح شیر نقش دارد (۲۳). این مسیر سیگنال‌دهی نقشی اساسی در سنتز ترکیبات شیر مانند چربی، پروتئین شیر و لاکتوز دارد. همچنین مشخص شده است که مسیر سیگنال‌دهی PI3k-Akt در توسعه بافت پستانی

و مسیر سیگنال‌دهی پرولاکتین نقش دارد (۲۶). در مطالعه حاضر مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده در این مسیر که در شبکه هم موجود می‌باشند شامل AKT، FGFR2، BCL2L، CREB1، COL4، MAPK1، YWHA، PDPK1، IL2RA، PTEN، PPP22 FASLG و CCND می‌باشند و در شکل ۳ با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

مسیر TGF-β1: ژن‌هایی که در مسیر TGF-β1شناسایی شدند شامل SMAD5، MAPK1، SP1، ACVR، BMP5 و BMPR می‌باشند و در شکل ٤ با رنگ قرمز مشخص شده‌اند. TGF-β1 یکی از عامل‌های تنظیم کننده رشد غدد شیری می‌باشد که دو ایزوفرم TGF-β2 و TGF-β3 دارد و در تکثیر سلول اپیتلیال، تمایز و آپوپتوز غده پستان نقش دارد. ایزوفرم‌های TGF-β2 و TGF-β3 مانند TGF-β1 روی رشد و توسعه غدد پستان تأثیر دارند و در مراحل مختلف رشد پستان گاو شیری بیان می‌شوند (۲۵). مطالعات سلول‌های شیری نشان می‌دهد که TGF-β1 تکثیر سلول‌های اپیتلیال و تکثیر برخی از سلول‌های مزانشیم، از جمله فیبروبلاست را تحریک می‌کند (۲۹). هنوز مکانیسم‌هایی که از طریق آن TGF-β1 رشد سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد به طور کامل شناسایی نشده‌اند. TGF-β1 به چرخه سلول از طریق سیکلین‌ها، کیناز وابسته به سیکلین، مهار کننده‌های کیناز وابسته به سیکلین تأثیر می‌گذارد که همه آن‌ها بر پیشرفت چرخه سلولی تأثیر می‌گذارند. علاوه بر این TGF-β1 آپوپتوز را تنظیم می‌کند (۲۱). بنابراین TGF-β1 از طریق یک یا هر دو مکانیسم نامبرده، رشد غده پستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. TGF-β1 با تغییر میزان ECM[۲] رشد غده پستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. TGF-β1 بیان پروتئین ECM مانند فیبرونکتین، کلاژن و لامینین سلول‌های اپیتلیال پستان را تنظیم می‌کند (۲۹).

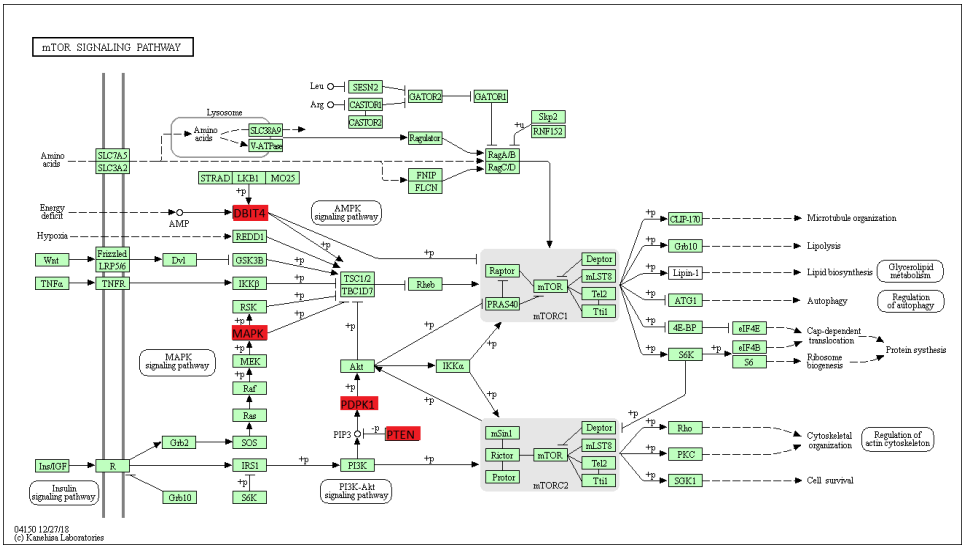
1. Mammary Epithelial Cell



شکل ٤- مسیرسیگنال‌دهی TGF-β1، ژن‌های هدف شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 4. The TGF-β1 signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

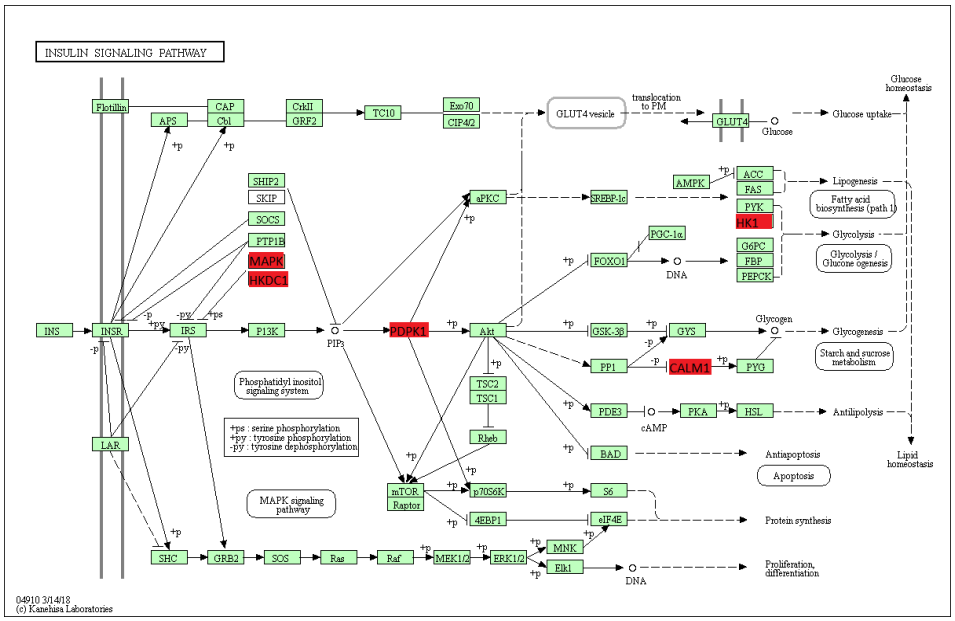
مسیر mTOR: مطالعه حاضر نشان دهنده‌ی نقش تنظیمی ژن‌های DBIT4، MAPK1، PDPK1 و PTEN در مسیر mTOR می‌باشد که این ژن‌ها در شکل ۵ با رنگ قرمز نشان داده شده است. mTOR یک پروتئین چند دامنه است، در سلول‌های پستانداران دو عامل mTOR متفاوت به نام 1-mTORc1 و 2-mTORc2 وجود دارد. بیان پروتئین شیر در غدد پستانداران وابسته به mTOR است. mTOR بخش کلیدی ترجمه mRNA را فعال می‌کند و باعث تحریک رونویسی ژن می‌شود (۱۸). متابولیسم اسیدهای آمینه با اثر بر نرخ جریان خون عبوری از غدد پستانی، اثر بر سیستم آندوکرینی و مسیرهای سیگنال‌دهی، نقش مهمی در تولید شیر دارند. تعداد زیادی از مطالعات بیان کرده‌اند که القای سنتز پروتئین‌های شیر از طریق مکمل‌های اسید آمینه‌ای با فعال شدن این مسیر سیگنال‌دهی ارتباط مستقیم دارد. فعالیت mTOR توسط اسیدهای آمینه زنجیره‌ای تعدیل می‌شود (۱۹). ارتباط اسید آمینه‌ها با مسیر سیگنال‌دهی mTOR از طریق مسیر ژنی WISP3 انجام می‌شود و این مجموعه علاوه بر اثر بر سنتز پروتئین‌های شیر بر رشد سلول نیز مؤثر است. mTOR ترجمه، سنتز پروتئین، سنتز انسولین، رشد سلولی، تکثیر سلولی، سنتز لیپید را مهار می‌کنند. در مطالعه دیگر بیان شده است این مسیر سیگنال‌دهی بر تمایز و تکثیر سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی در گاو اثر زیادی دارد (۱۳).



شکل ۵- مسیرسیگنال‌دهی mTOR، ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 5. The mTOR signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

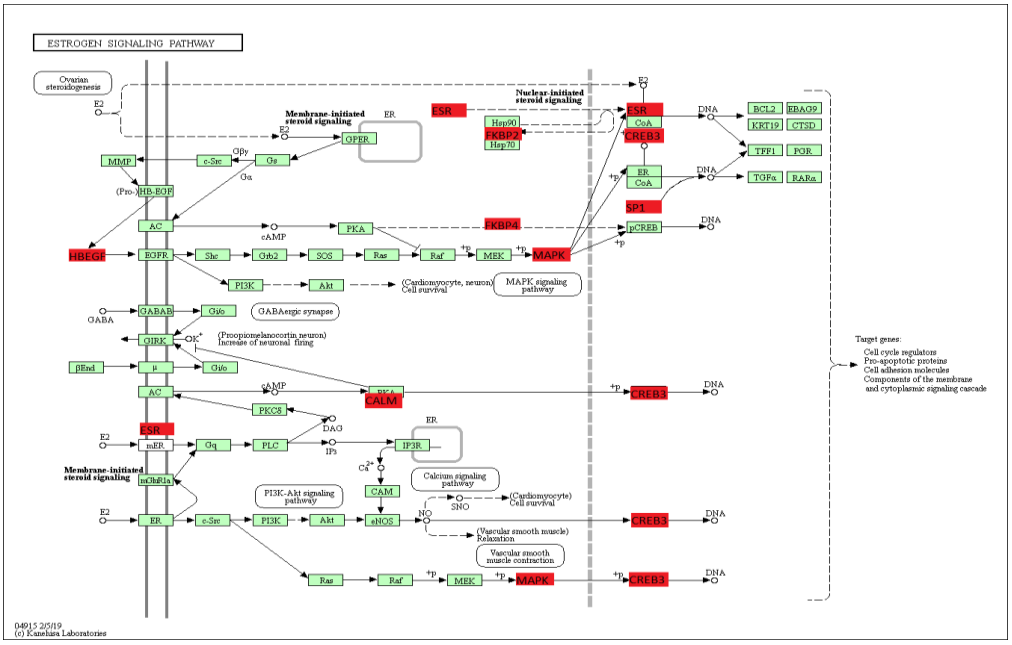
مسیر سیگنال‌دهی انسولین: نقش انسولین در لاکتوژنز، ایجاد پاسخ‌های لاکتوژنیک درپستان گاو، جذب گلوکز در بافت پستان برای سنتز لاکتوز، تحریک بیان ژن‌های پروتئین شیر، تحریک تقسیم‌های سلولی در سلول‌های اپیتلیال غیر ترشحی می‌باشد (۲۷). انسولین باعث افزایش در کل مواد جامد شیر، افزایش درصد چربی شیر، افزایش درصد خاکستر شیر، افزایش ناچیز در محتویات نیتروژنی شیر، افزایش فسفر و کلسیم شیر، افزایش ایجاد شده در ترکیبات شیر می‌شود. همچنین در سنتز هورمون‌های استروئیدی و نیز آندروژن در سلول‌های تیکا در تخمدان نقش دارد (١٤). از مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش CALM1، HKDC1، MAPK1، MAPK8، PDPK1 و HK1 می‌باشند که تنظیم کننده‌های کلیدی در این مسیر می‌باشند و در شکل ٦ با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.



شکل ٦- مسیر سیگنال‌دهی انسولین، ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 6. The Insulin signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

مسیر سیگنال‌دهی استروژن: ژن‌های مورد تحقیق که نقش مهمی در کنترل استروژن دارند شامل CALM، FKBP2، ESR، MAPK1، FKBP4، SP1، CREB3 و HBEGF می‌باشند که با نتایجی که در شکل ۷ مشاهده می‌شوند در یک راستا می‌باشند. ژن‌های هدف شناسایی شده برای ریزRNAهای با بیان متفاوت در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص گردیده است. هورمون‌های استروئیدی ترکیباتی هستند که از کلسترول مشتق می‌شوند. این هورمون‌ها ترکیباتی چربی دوست، با وزن مولکولی پایین و از لحاظ زیستی فعال هستند که بر اساس گروه عملکردی که به ساختار فنلی آن‌ها می‌چسبد از هم متفاوت می‌گردند. استروئیدها با منشأ داخلی ترکیباتی هستند که در داخل بدن تولید می‌شوند و علاوه بر نقش کلیدی که در فرآیند تولید مثل دارند، در متابولیسم چربی‌ها، قندها و پروتئین‌ها نقش مؤثری دارند (۸). هورمون‌های استروئیدی بر اساس فعالیت فارماکولوژی و زیستی به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه نخست که تحت عنوان هورمون‌های جنسی شناخته می‌شوند، شامل استروژن‌ها و آندروژن‌ها هستند و گروه دوم که کورتیکواستروئیدها نامیده می‌شوند شامل گلوکوکورتیکواستروئیدها و مینرالوکورتیکواستروئیدها هستند. استروئیدها در داخل بدن تولید می‌شوند و علاوه بر نقشی که در فرآیند تولید مثل دارند، متابولیسم مواد معدنی، چربی‌ها، قندها و پروتئین‌ها را هم در انسان و هم در حیوانات تحت تأثیر قرار می‌دهند. استروژن و پروژسترون دارای نقشی در رشد و فعالیت ترشحی پستان می‌باشند مثلاً پروژسترون تحریک کننده رشد مجاری پستان و پروژسترون و استروژن با یکدیگر تحریک کننده افزایش بافت ترشحی پستان می‌باشند (۲۲).

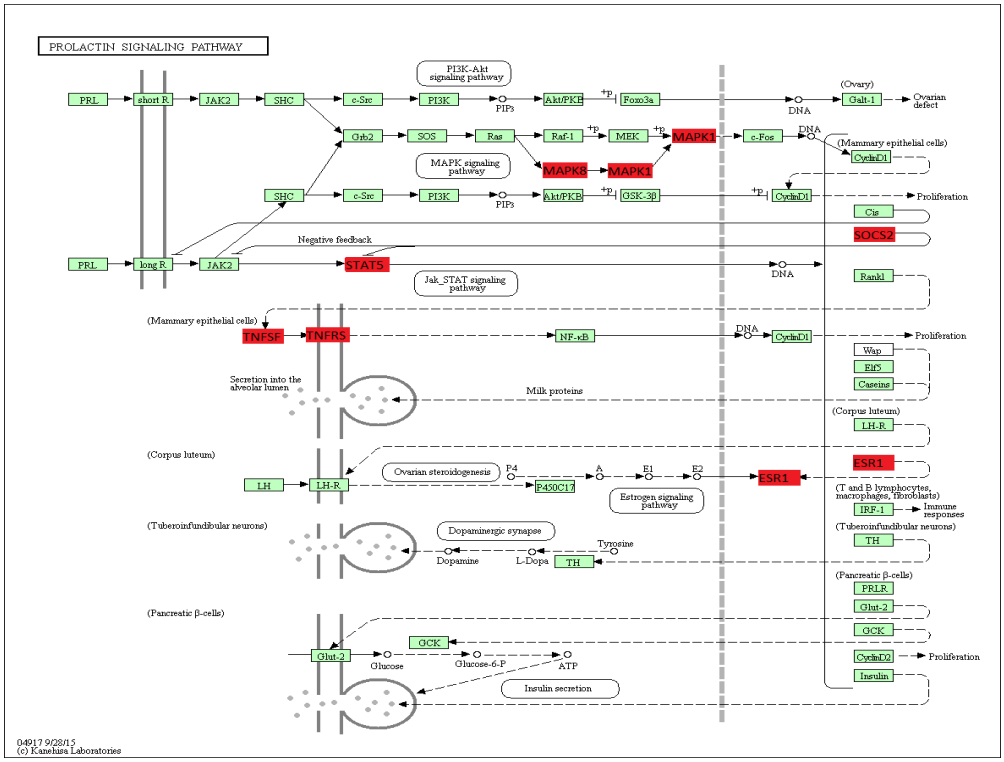


شکل ۷- مسیر سیگنال‌دهی استروژن، ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 7. The Estrogen signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

مسیر سیگنال‌دهی پرولاکتین: پرولاکتین یک هورمون لاکتوژنیک است که نقش قابل توجهی در تولید شیر دارد و کاهش آن باعث کاهش شدید تولید شیر می‌شود. ژن پرولاکتین به عنوان یک ژن کاندیدا، مؤثر بر تغییرات عملکرد تولید شیر است (۲۴). این ژن در

توسعه و تکامل سیستم پستانی و تولید شیر مهم است و نقش عمده‌ای در ساخت شیر، شیردهی و رشد غدد پستانی حیوان دارد. پرولاکتین یک هورمون پپتیدی است که در مهره‌داران از سلول‌های ویژه‌ای در هیپوفیز قدامی ترشح شده و در پستانداران برای شروع و ادامه شیردهی ضروری بوده و مسؤل اصلی سنتز پروتئین‌های شیر، لاکتوز، چربی و تمام ترکیبات اصلی شیر است (۱۰). ژن پرولاکتین گاو روی کروموزم شماره ۲۳ قرار داشته و شامل ۵ اگزون و ٤ اینترون است (۱٦). از بین ژن‌های مورد مطالعه می‌توان به نقش تأثیر گذار ژن‌های TNFSF11، TNFRSF11A، STAT5A، ESR1، MAPK1، MAPK8 و SOCS2 در این مسیر اشاره کرد که در شکل ۸ با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

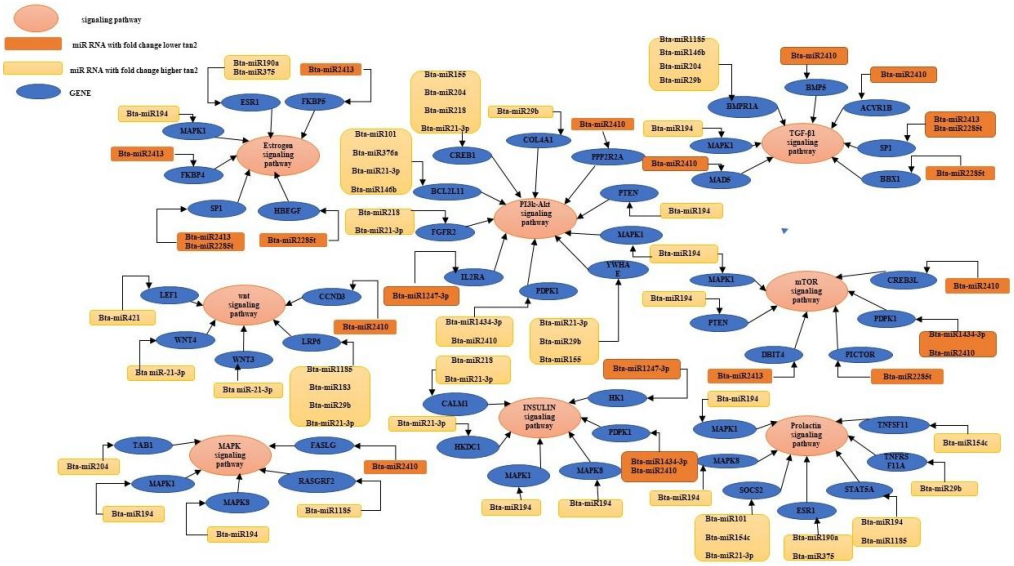


شکل ۸- مسیر سیگنال‌دهی پرولاکتین، ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 8. The Prolactin signaling pathway, the target genes identified in this study are marked in red.

خلاصه مسیرهای سیگنال‌دهی و ژن‌های مؤثر در این مسیرها و ریزRNAهایی که روی این ژن‌ها اثر دارند در شکل ۹ آورده شده است. مسیر سیگنال‌دهی PI3k-Akt بیشترین ژن‌های هدف را دارد. هشت ژن که در این مسیر فعالیت دارند توسط ریزRNAهای با بیان بالا و دو ژن توسط ریزRNAهای با بیان پایین کنترل می‌شوند. ریزRNAها دارای نقش تنظیمی کاهشی می‌باشند. ریزRNA با تاثیر بر mRNA هدف، سبب تجزیه mRNA هدف و یا مهار ترجمه آن می‌شود که پیامد این فعالیت، جلوگیری از ساخته شدن پروتئین حاصل از ژن هدف مورد نظر است (۳۱). می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که کاهش بیان ریزRNA می‌تواند باعث افزایش محصول نهایی ژن هدف شود. ریزRNAهای bta-miR-2413 و bta-miR-2285t دارای بیانی پایین‌تر نسبت به سایر ریزRNAها بودند و همچنین ژن‌های FKBP5، FKBP4، HBEGF، CCND3، FASLG، PPP2R2A،

BBX1، SP1، ACVR1B، BMP5، MAD5، IL2RA، DBIT4، PICTOR، PDPK1 و CREB3L بیشترین تأثیر را در مسیرهای سیگنال‌دهی فوق داشتند.



شکل ۹- خلاصه مسیرهای سیگنال‌دهی، ژن‌های موثر و ریزRNAهایی که روی این ژن‌ها اثر دارند.

Figure 9. Summary of the signaling pathways, effective genes and the microRNAs that affect these genes.

نتیجه‌گیری کلی

توجه به مسیرهای سیگنال‌دهی در مقایسه با نگاه به ژن‌ها، میزان پیچیدگی زیستی موجود در برهمکنش‌های ملکولی در تولید شیر و مدیریت زیستی آن را آسان‌تر می‌کند. ژن‌هایی که در اکثر مسیرهای سیگنال‌دهی مربوط به یک پدیده زیستی مانند تولید شیر فعال و با ژن‌های مختلف دیگر در ارتباط باشند را می‌توان به عنوان ژن‌های عمده اثر در مدل‌های ارزیابی ژنتیکی و اصلاح نژاد به کار برد. در سالیان اخیر استفاده از ریز RNA به‌عنوان زیست نشانگر بر توسعه صفات اقتصادی به شدت رواج یافته است. در این پژوهش، بررسی ریز RNAهای مورد بررسی، مسیرهای سیگنال‌دهی را آشکار کرد که با کنکاش بهتر آن می‌توان هم در جهت اهداف اقتصادی قدم برداشت و هم آن دسته از ژن‌هایی که اهمیت بالاتری در مسیرهای زیستی دارند را در مدل‌های اصلاح نژاد به کار برد و به این صورت سعی شود که میزان تولید شیر را بالا برد. بیشتر این مسیرهای سیگنال‌دهی در فعالیت سلول‌های اپیتلیال مانند رشد و تکثیر نقش دارند. از آنجایی که این مسیرهای شناسایی شده با صفت تولید شیر ارتباط مستقیمی دارند، می‌توان از ژن‌های شناسایی شده در این مسیرهای سیگنال‌دهی در بهبود صفت تولید شیر استفاده کرد. ژن‌های MAPK1، MAPK8، FASLG و PTEN در اکثر مسیرهای سیگنال‌دهی فعال و با ژن-های مختلفی در ارتباط هستند و بر این اساس این ژن‌ها جزء ژن‌های عمده اثر به شمار می‌روند.

منابع

1. Alipanah, M., Roudbari, Z., Javadmenesh, A., Sataei Mokhtari, M., Seydabadi, H.R. and Gharari, F. 2017. Identification of biological pathways involved in body growth of cattle using gene expression profiles. Animal Science Journal (Pajouhesh and

Sazandegi). 31(119): 59-70. (In Persian).
2. Amini Shal, S.H., Yazdani, A.R., Chizari, A.H., Alaei Borujeni, P. and Rafiei, H. 2013. Investigate the effect of management factors on production and profitability of industrial dairy cattle breeding farms: the case study of southern Tehran province. Iranian Journal of Agricultural Economics and Development Research. 44(1): 67- 76. (In Persian).
3. Bao, Z., Lin, J., Ye, L., Zhang, Q., Chen, J., Yang, Q. and Yu, Q. 2016. Modulation of mammary gland development and milk production by growth hormone expression in GH transgenic goats. Frontiers in Physiology. 7: 74-79.
4. Booth, A.K. and Gutierrez-Hartmann, A. 2015. Signaling pathways regulating pituitary lactotrope homeostasis and tumorigenesis. In Recent Advances in prolactin Research. Springer, Cham. 37-59.
5. Dejmek, J., Dib, K., Jonsson, M. and Andersson, T. 2003. Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. International Journal of Cancer. 103(3): 344-351.
6. Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. and Lempicki, R.A. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. Genome Biology. 4(9): 1-11.
7. Farhangfar, H. and Behdani, E. 2018. Identification of the major miRNAs, target genes and signaling pathways associated with milk production using miRNA-Seq. Journal of Ruminant Research. 5(4): 73-86. (In Persian).
8. Farlow, D.W., Xu, X. and Veenstra, T.D. 2009. Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS. Journal of Chromatography B. 877(13): 1327-1334.
9. Fata, J.E., Kong, Y.Y., li, J., Sasaki, T., Irie-Saski, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B. and Lacey, D.L. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell. 103(1): 41-50.
10. Ghasemi, N., Zadehrahmani, M., Rahimi, GH. and Hafezian, S.H. 2009. Association between prolactin gene polymorphism and milk production in montebeliard cows. International Journal of Genetics and Molecular Biology. 1(3): 048-051.
11. Ghorbani, Sh., Tahmoorespur, M., Masoudi-nejad, A., Nasiri, M.R., Asgari, Y. and Motamedian, E. 2016. Reconstruction and topology analysis of metabolism network involved in Bos Taurus milk production. Animal Science Journal (Pajouhesh and Sazandegi). 29(110): 167-180. (In Persian).
12. Huang, T.H., Fan, B., Rothschild, M.F., Hu, Z.L., Li, K. and Zhao, S.H. 2007. MiRFinder: an improved approach and software implementation for genome-wide fast microRNA precursor scans. BMC bioinformatics. 8(1): 341-350.
13. Jiang, N., Wang, Y., Yu, Z., Hu, L., Liu, C., Gao, X. and Zheng, S. 2015. WISP3 (CCN6) regulates milk protein synthesis and cell growth through mTOR signaling in dairy cow mammary epithelial cells. DNA and Cell Biology. 34(8): 524-533.
14. Karjalainen, J., Martin, J.M., Knip, M., Ilonen, J., Robinson, B.H., Savilahti, E., Akerblom H.K. and Dosch, H.M. 1992. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 327(5): 302-307.
15. Kikuchi, A., Kishida, S. and Yamamoto, H. 2006. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. Experimental and Molecular Medicine. 38(1): 1-10.
16. Lan, X.Y., Pan, C.Y., Chen, H., Lei, C.Z., Zhang, H.Y. and Ni, Y.S. 2009. Novel SNP of the goat prolactin gene (PRL) associated with cashmere traits. Journal of Applied Genetics. 50(1): 51-54.

17. Lu, Y.C., Chen, Y.J., Wang, H.M., Tsai, C.Y., Chen, W.H., Huang, Y.C., Fan, K.H., Tsai, C.N., Huang, S.F., Kang, C.J., Chang, J.T.C. and Cheng, A.J. 2012. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. Cancer Prevention Research. 5(4): 665-674.
18. Melnik, B.C., John, S.M., Carrera-Bastos, P. and Cordain, L. 2012. The impact of Cow's milk-mediated mTORC1-signaling in the initiation and progression of prostate cancer. Nutrition and Metabolism. 9(1): 1-24.
19. Moshel, Y., Rhoads, R.E. and Barash, I. 2006. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells. Journal of Cellular Biochemistry. 98(3): 98: 685-700.
20. Mumtaz, Kh.I. 2002. Method of food preservation and Sterilization: Commercial Method of food preservation. Bawarchi: health and nutrition. Copyright Satyan Infoway Ltd.
21. Musters, S., Coughlan, K., McFadden, T., Maple, R., Mulvey, T. and Plaut, K. 2004. Exogenous TGF-β1 promotes stromal development in the heifer mammary gland. Journal of Dairy Science. 87(4): 896-904.
22. Noppe, H., Le Bizec, B., Verheyden, K. and De Brabander, H.F. 2008. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. Analytica Chimica Acta. 611(1): 1-16.
23. Oliver, C.H. and Watson, C.J. 2013. Making milk: A new link between STAT5 and Akt1. Jak-Stat. 2(2): 2154-2168.
24. Orford, M., Tzamaloukas, O., Papachristoforou, C. and Miltiadou, D. 2010. A simplified PCR- based assay for the characterization of two prolactin variants that affect milk traits in sheep breeds. Journal of Dairy Science. 93(12): 93: 5996-5999.
25. Plath, A., Einspanier, R., Peters, F., Sinowarz, F. and Schams, D. 1997. Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. Journal of Endocrinology. 155(3): 501-511.
26. Raven, L.A., Cocks, B.G., Goddard, M.E., Pryce, J.E. and Hayes, B.J. 2014. Genetic variants in mammary development, prolactin signaling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. Genetics Selection Evolution. 46(1): 29.
27. Rodriguez Neira, J.D. Correa Londono, G.A. and Echeverri Zuluaga, J. J. 2013. Prediction models for total milk yield and fat percentage using partial samples. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 66(1): 6909-6917.
28. Smalley, M.J. and Dale, T.C. 1999. Wnt Signaling in mammalian Development and Cancer. Cancer and Metastasis Reviews. 18(2): 215-230.
29. Stampfer, M.R., Yaswen, P., Alhadeff, M. and Hosoda, J. 1993. TGFβ induction of extracellular matrix associated proteins in normal and transformed human mammary epithelial cells in culture is independent of growth effects. Journal of Cellular Physiology, 155(1): 210-221.
30. Tabass-Madrid, D., Muniategui, A., Sanchez-Caballero, I., Martinez-Herrera, D.J., Sorzano, C.O.S., Rubio, A. and Pascual-Montano, A. 2014. Improving miRNA-mRNA interaction predictions. BMC Genomics. 15(S10): 1-12.
31. Warnefors, M., Liechti, A., Halbert, J., Valloton, D. and Kaessmann, H. 2014. Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease. Genome Biology. 15(6): 1-14.
32. Wickramasinghs, S., Canovas, A., Rincon, G. and Medrano, J.F. 2014. RNA sequencing: a tool to explore new frontiers in animal genetics. Livestock Science. 166: 206-216.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 9(1), 2021
http://ejrr.gau.ac.ir

Identification of effective signaling pathways in cow's milk production using micro-RNA data

S. Eskandarynasab[1], *M.R. Bahreini Behzadi[2] and Z. Roudbari[3]
[1]M.Sc. Student and [2]Associate Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Iran, [3]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Iran
Received: 09/06/2019; Accepted: 02/01/2021

Abstract

Background and objectives: Information from RNAs helps to understand the biological aspects of physiological pathways because they are the link between genotype and phenotype. MicroRNAs are molecules with 22 nucleotides in length and a single strand which can specifically affect the function and expression of genes, hence many studies have been done on the role of these molecules in various biological processes, such as milk production. The milk production trait is one of the most important traits in the dairy cattle industry. This trait is polygenic trait in farm animals and controlled by a large number of genes and each gene may be involved in various biological pathways and mutually any biological pathway can include a large number of genes. These relationships form a complex network which indicates the association of a large number of biological pathways with a lot of genes. Signal molecules that can act as morphogens control the pattern of the gene network of tissue structure throughout the lifespan of the growing embryo stage to the adult organism. The morphogens depend on the amount of secretion and the destination of secretion source can produce different cellular responses. Therefore, the present study aimed to investigate target genes of differentially expressed microRNAs in bovine mammary tissue to identify a number of biological pathways involved in the milk production process.

Materials and methods: In order to identify and investigate the biological pathways involved in milk production, microRNA sequenced data were used which were extracted from ArrayExpress database with E-GEOD-61227 access number. In the present study, all stages of standardization of data, differences between the expression of microRNA, and significance determination were performed by GEO2R software. The criteria for the selection of microRNA in this study were corrected P-value<0.05 and 1< Log fc <-1. Next, bioinformatics tools were used to find the target gene for each microRNA. The microRNAs with different expressions derived from the analysis in the previous step were introduced to TargetScan software for finding target genes. After identifying target genes for each microRNA, DAVID server was used for the investigation of biological data and functional analysis.

Results: The results of this study showed that there are 23 microRNAs with different expressions that affect many genes. These genes are involved in the signaling pathways of TGF-β, WNT, MAPK, mTOR, PI3k-Akt, insulin, estrogen, and prolactin. Most of these signaling pathways are involved in cell growth and proliferation, mammary gland development, and epithelial cell activity. Since these identified pathways are associated with milk production, the genes identified in these signaling pathways can be used to improve milk production traits.

*Corresponding author; bahreini@yu.ac.ir

Conclusion: MAPK1, MAPK8, FASLG and PTEN genes are activated in most biological pathways and they are associated with various genes, accordingly, these genes are the major genes in the process of milk production.

Keywords: Bioinformatics, Biological pathway, Mammary gland, Target gene.