



## تولیات دایمی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

صفحه‌های ۱۳-۲۶

# تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های مؤثر در تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری

زهرا مزدوری<sup>۱</sup>، محمدرضا بختیاری‌زاده<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

۲. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۲۴

### چکیده

این تحقیق به منظور درک بهتر سازوکارهای تنظیمی بیان ژن‌های مربوط به تعادل منفی انرژی انجام شد. ژن‌های با بیان بالا در تعادل منفی انرژی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و RNA-seq شناسایی و توالی‌های پروموتوری آنها برای شناسایی فاکتورهای رونویسی جدید در ارتباط با این مراحل تجزیه و تحلیل شدند. افزون بر این، از پایگاه اطلاعاتی STRING برای ترسیم شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در تعادل منفی انرژی استفاده شد. نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها نشان داد که هشت ژن بیان بالا و معنادار در مقایسه تعادل منفی انرژی شدید نسبت به خفیف دارند ( $P < 0.05$ ). در نتیجه تجزیه و تحلیل پروموتوری این ژن‌ها، ۱۹ فاکتور رونویسی شناسایی شد. این مجموعه مشتمل بر یک فاکتور رونویسی (NF- $\kappa$ B) با نقش تأیید شده در تعادل منفی انرژی و فاکتورهای رونویسی جدید همچون SP1, ZBP89, NFI, Zf9, MYC, ZBTB7A, FOXF2, و KLF6، که نقش تنظیمی آنها در تعادل منفی انرژی گزارش نشده، است. براساس نتایج، ۱۸ فاکتور رونویسی کاندید جدید معرفی شده در این مطالعه می‌تواند اطلاعات جدیدی را در درک بهتر شبکه تنظیمی مؤثر در تعادل منفی انرژی فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، ریزآرایه، شبکه ژنی، فاکتورهای رونویسی، RNA-seq.

## مقدمه

باتوجه به اینکه انتخاب ژنتیکی گاوهای شیری برای افزایش ظرفیت شیردهی لازم دام پس از زایش سبب می شود که میزان نیاز انرژی مصرفی رشد و شیردهی بیش از انرژی دریافتی ناشی از خوراک باشد و موجب بروز اختلال متابولیکی تحت عنوان تعادل منفی انرژی می شود [۱]، به همین دلیل، دوره پس از زایش از نظر سلامت کلی و باروری برای گاوهای شیری اهمیت زیادی دارد. همچنین تعادل منفی انرژی احتمال بروز شماری از دیگر بیماری های متابولیکی (نظیر کتوز و کبد چرب) را افزایش می دهد و به دلیل کاهش ایمنی، حیوان مستعد بیماری های عفونی همچون ورم پستان می شود [۲]. بنابراین این اختلال متابولیکی، اهمیت اقتصادی زیادی به دلیل اثر منفی خود بر باروری و سلامتی در صنعت گاو شیری دارد [۳]. در همین زمینه، بر مبنای مطالعات انجام شده در این مورد دام ها به دو گروه با تعادل منفی انرژی خفیف و تعادل منفی انرژی شدید گروه بندی شده اند [۴].

با وجود راهبردهای گوناگون برای جلوگیری از ایجاد این اختلال، همچون مدیریت تغذیه و افزودن مکمل های غذایی، ابتلای گاوهای شیری به تعادل منفی انرژی موجب ضررهای اقتصادی سنگینی در صنعت گاو شیری شده است [۳]. یکی از علل مهم ایجاد این مشکل تغییر بیان ژن ها در کبد ناشی از تعادل منفی انرژی است. برای بررسی سازوکارهای تنظیمی ژن های مؤثر در تعادل منفی انرژی از روش های متفاوتی چون RT-PCR، ریزآرایه، و توالی یابی نسل بعد (RNA-Seq) استفاده شده و برخی ژن های مؤثر در متابولیسم چربی به عنوان عامل ایجاد این نارسایی متابولیکی شناسایی شده است [۳]. به عنوان مثال، نقش ژن هایی از خانواده ژنی IGF، ژن CYP11A1، و بیوستتر هورمون های استروئیدی، فاکتورهای رونویسی HNF4A، PPARA، FOXC2، PPARGC1A، و PPARD.

SREBF2، آنزیم های ACOX1 و ARG1، و ژن های LPIN1، LPIN3، و ANGPTL4 در ایجاد تعادل منفی انرژی گاوهای شیری گزارش شده است. با این حال، به رغم مطالعات انجام شده در این حوزه، مکانیسم های تنظیمی و ژنی درگیر در تعادل منفی انرژی به خوبی و به طور کامل شناسایی نشده است [۱، ۲ و ۳].

به طور کلی، رونویسی ژن ها از طریق اتصال پروتئین های تنظیم کننده با عنوان فاکتورهای رونویسی به مناطق مشخصی از مناطق پروموتوری با نام مکان های اتصال فاکتور رونویسی (Transcription Factor Binding Site) کنترل و تنظیم می شود. در نتیجه این اتصال میزان بیان ژن های هدف افزایش یا کاهش می یابد. ترکیب و ترتیب فاکتورهای تنظیمی گوناگون بر پروموتورها، تعیین کننده عملکرد ژن ها است. بنابراین انتظار این است که ژن های با بیان مشابه در سلول، مکانیسم تنظیمی مشابهی داشته باشند. همچنین ژن های با بیان مشابه ممکن است دارای ساختار پروموتوری مشابه و عوامل تنظیمی مشترک باشند. ولی باید توجه داشت که لزوماً ژن های هم بیان، هم تنظیم نیستند. بنابراین اگر در نواحی تنظیمی ژن های هم بیان، TFBSs و یا عوامل تنظیمی مشابه وجود داشته باشد، احتمال هم تنظیم بودن و همچنین عملکرد مشابه وجود خواهد داشت.

بدین منظور، امروزه از روش های محاسباتی نسبتاً پیچیده برای بررسی این موضوع استفاده می شود که در زمان حاضر با توجه به پیشرفت های صورت گرفته در این حوزه در حال گسترش نیز هستند [۵]. در مطالعات متعدد، سازوکارهای تنظیمی مؤثر در مراحل بیولوژیکی گوناگون و در گونه های متفاوت شناسایی شده است [۵ و ۶]. باتوجه به کامل نبودن سازوکارهای تنظیمی مؤثر در تعادل منفی انرژی و اهمیت این اختلال متابولیکی در صنعت گاوهای شیری، می توان از این روش برای درک بهتر

## تولیدات دامی

شناسایی شده حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه با نتایج مطالعه مقایسه شدند [۳]. در این مطالعه، ۲۱۷ ژن با بیان بالا و معنادار در مقایسه تعادل منفی انرژی شدید نسبت به تعادل منفی انرژی خفیف گزارش شده است. پس از مقایسه ۱۷ ژن با بیان بالا و معنادار حاصل از مطالعه ریزآرایه با نتایج مطالعه RNA-Seq، هشت ژن شناسایی شد که در هر دو مطالعه بیان بالا و معناداری داشتند. به عبارت دیگر، ژن‌های با بیان بالا و معنادار حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه که در مطالعه دوم نیز تأیید شده بودند، به عنوان ژن‌های نهایی برای تجزیه و تحلیل پروموتور انتخاب شدند.

از نرم‌افزار DAVID برای بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های معنادار با بیان بالا در تعادل منفی انرژی شدید در مقایسه با تعادل منفی انرژی خفیف، استفاده شد [۷]. بدین منظور، ژن‌های معنادار حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه به نرم‌افزار معرفی و عبارات معنادار مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد ( $P < 0.01$ ). فقط عبارات معنادار مربوط به مراحل بیولوژیکی در نظر گرفته شد ( $P < 0.01$ ).

توالی پروموتوری ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل توسط بانک اطلاعاتی موجود در نرم‌افزار Genomatix و با نرم‌افزار Gene2Promoter استخراج شد. برای ژن‌هایی با بیش از یک توالی پروموتوری، معتبرترین توالی براساس پیشنهاد خود نرم‌افزار انتخاب شد. همچنین نواحی پروموتوری همه ژن‌ها به صورت ۱۰۰۰ جفت باز بالادست و ۲۰۰ جفت باز پایین دست از محل آغاز رونویسی ژن موردنظر تعریف و استخراج شد.

از نرم‌افزار MatInspector برای شناسایی فاکتورهای رونویسی مشابه در توالی‌های پروموتوری ژن‌ها استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از نوکلئوتیدهای هسته ماتریس‌های وزنی-مکانی (Position Weight Matrix, PWM) و

سازوکارهای تنظیمی مؤثر در تعادل منفی انرژی و شناسایی فاکتورهای تنظیمی بیشتر استفاده کرد.

هدف از انجام پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های با بیان بالا و مشابه در تعادل منفی انرژی شدید نسبت به خفیف در بافت کبد گاوهای شیری به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی مؤثر در این مراحل است.

## مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی ژن‌های با بیان زیاد در اختلال ناشی از تعادل منفی انرژی (مقایسه تعادل منفی انرژی شدید در مقایسه با تعادل منفی انرژی خفیف)، داده‌های یک مطالعه ریزآرایه با شماره دسترسی GSE56547 از سایت NCBI (Gene Expression Omnibus DataSets (GEO)) استخراج شد. در مطالعه مذکور، ساختار بیان ژن‌ها مربوط به شش گاو شیری در تعادل منفی انرژی شدید و پنج گاو شیری در تعادل منفی انرژی خفیف مطالعه شده است [۴]. داده‌های ریزآرایه برای شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار در حالت تعادل منفی انرژی شدید در مقایسه با تعادل منفی انرژی خفیف با نرم‌افزار GEO2R تجزیه و تحلیل شدند. با معرفی داده‌های آزمایش به شماره دسترسی GSE56547 با نرم‌افزار GEO2R، مراحل استانداردسازی، تصفیه داده‌ها، و شناسایی ژن‌های معنادار انجام شد و ژن‌های با بیان بالا و معنادار ( $P < 0.05$ ) و تصحیح شده برای خطای چندتستی با روش FDR و با دستور eBayes شناسایی شدند.

همچنین از نتایج مطالعه‌ای مشابه که در آن از روش RNA-Seq برای ارزیابی ساختار بیان ژن‌ها استفاده شده بود (با شماره دسترسی GSE37544 در سایت NCBI)، برای تأیید و شناسایی ژن‌های با بیان بالا در حالت تعادل منفی انرژی شدید نسبت به تعادل منفی انرژی خفیف استفاده شد [۳]. بنابراین، ۱۷ ژن با بیان بالا و معنادار

## تولیدات دائمی

همچنین استفاده از ساختاری حفاظت شده بر مبنای فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در هر یک از مکان‌های ماتریس، اقدام به شناسایی TFBS روی توالی‌های پروموتری می‌کند [۸]. بدین منظور از بانک اطلاعاتی جامع MatBase موجود در Genomatix که حاوی PWM مرتبط با TFBS است، استفاده شد. در ابتدا هر یک از توالی‌های پروموتری با استفاده از ماتریس‌های PWM این بانک اطلاعاتی بررسی شدند و TFBS معنادار مرتبط با هر یک از توالی‌های پروموتری این ژن‌ها شناسایی شدند. مقدار تشابه بین هسته مرکزی PWM و توالی پروموتری ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

در ادامه و با فرض اینکه ژن‌های با بیان مشابه و بالا در تعادل منفی انرژی شدید ساختار پروموتری و TFBS‌های مشابه دارند، TFBS مشترک در بین حداقل هفت ژن از هشت ژن در توالی‌های پروموتری ژن‌های بررسی شده، شناسایی و به‌عنوان کاندیدهای جدید مؤثر در تنظیم تعادل منفی انرژی معرفی شدند. در این مطالعه، از نرم‌افزار STRING (ویرایش ۱۰) برای ترسیم شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در تعادل منفی انرژی استفاده شد. از دو روش آزمایشگاهی و محاسباتی در STRING شامل neighborhood, geneFusion, co-expression, occurrence, homology, databases, text mining برای افزایش صحت روابط بین‌ژنی شناسایی شده، نمره اطمینان بالا (۰/۷) انتخاب شد. در ادامه، گروه‌های کارکردی و مسیرهای بیولوژیکی (با استفاده از بانک اطلاعاتی KEGG) ژن‌هایی که وارد شبکه شدند، بررسی شد.

## نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ۳۶۴ ژن معنادار بیان بالاتری در تعادل منفی انرژی شدید در مقایسه با تعادل منفی انرژی خفیف داشتند ( $P < 0.05$ ). در نتیجه انجام تصحیح برای خطای

## تولیدات دایمی

تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های مؤثر در تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری

جدول ۱. عبارت بیولوژیکی معنادار حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های با بیان بالا و معنادار (تعادل منفی انرژی شدید در برابر تعادل منفی انرژی خفیف) حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه

p-value	عبارت مراحل بیولوژیکی
۰/۰۰۰	پاسخ به تحریک
۰/۰۰۰	پاسخ دفاعی
۰/۰۰۲	مراحل متابولیسم کتون سلولی
۰/۰۰۲	مراحل متابولیسم اسیدکربوکسیلیک
۰/۰۰۳	فرایندهای مربوط به سیستم ایمنی
۰/۰۰۴	پاسخ التهابی
۰/۰۰۵	پاسخ ایمنی
۰/۰۰۷	پاسخ به استرس
۰/۰۱	چرخه تری کربوکسیلیک اسید
۰/۰۱	مراحل کاتابولیک استیل کوآ

کبدی گزارش شده است. علاوه بر این، بیان FAM19A5 در گاوهای شیری در دوره اولیه پس از زایمان در شرایط تعادل منفی انرژی شدید به بیش از دو برابر افزایش پیدا کرده است [۱۴].

CYP11A1، عامل محدودکننده سرعت آنزیم‌ها در استروئیدوزن در سلول‌های کبدی است [۱۲]. ژن RAB30، متعلق به خانواده GTPase های کوچک است. نقش این ژن در فاز اولیه شکل‌گیری کبد گزارش شده است [۱۳]. بیان بالای FAM19A5 در فیروز کبدی و سیروز

جدول ۲. ژن‌های با بیان بالا و معنادار و مشترک بین دو مطالعه ریزآرایه و RNA-Seq

نام ژن	توصیف ژن	p-value تصحیح شده در مطالعه ریزآرایه	p-value تصحیح شده در مطالعه RNA-Seq
Tmem41a	transmembrane protein 41a	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۶
ANGPTL4	angiopoietin-like 4	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۰
MEM120A	transmembrane protein 120A	۰/۰۰۸۹۹	۰/۰۰۰
CREB3L3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3	۰/۰۱۴۱۸	۰/۰۱۵
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	۰/۰۱۴۱۸	۰/۰۹۱
CYP11A1	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	۰/۰۱۴۱۸	۰/۰۰۰
RAB30	member RAS oncogene family	۰/۰۱۷۸۸	۰/۰۰۰
FAM19A5	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5	۰/۰۴۶۴۲	۰/۰۰۳

## تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

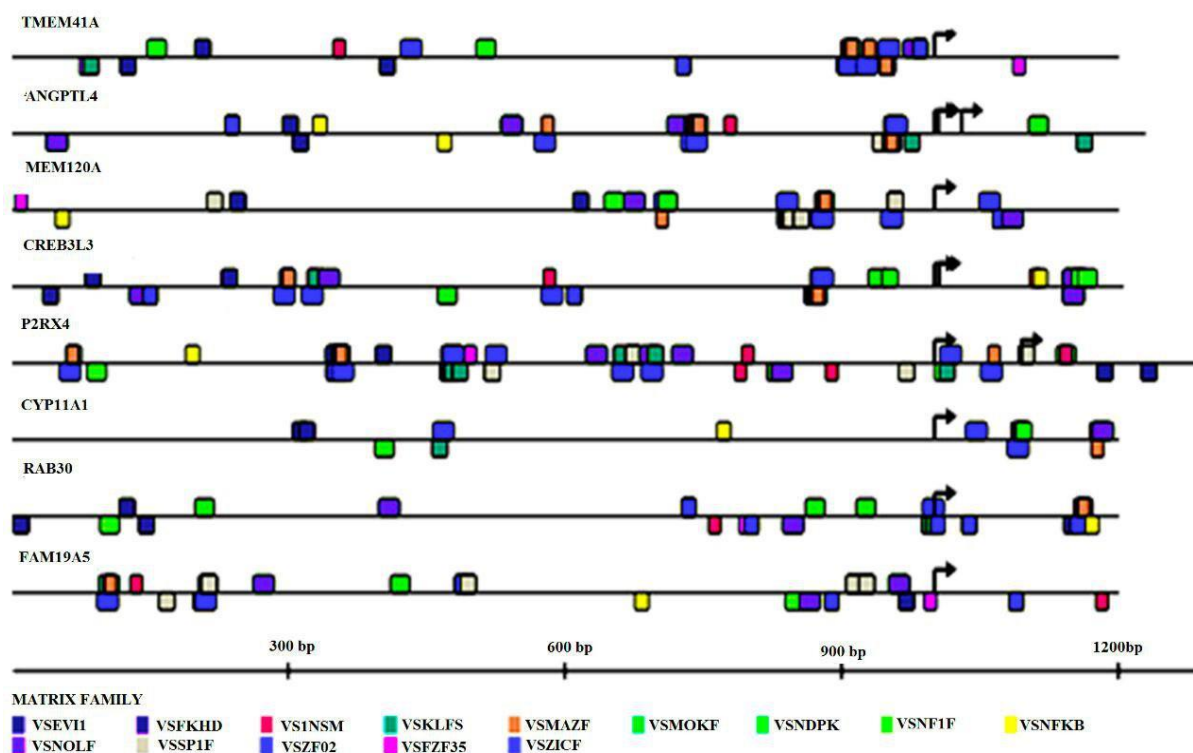
باتوجه به اهمیت این ژن‌ها در مطالعه حاضر، از این هشت ژن برای بررسی ساختار پروموتری آنها و شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید جدید در تعادل منفی انرژی استفاده شد. در پایان با تجزیه و تحلیل پروموتر این هشت ژن، ۱۹ فاکتور رونویسی شناسایی شد. از ۱۹ فاکتور رونویسی شناسایی شده، تعداد شش فاکتور رونویسی به‌طور مشترک دارای محل اتصال روی همه توالی‌های پروموتری بودند. اطلاعات مربوط به این فاکتورهای رونویسی در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. فاکتورهای رونویسی شناسایی شده دارای مکان اتصال روی توالی‌های پروموتری ژن‌های با بیان بالا در حالت تعادل منفی انرژی شدید در مقابل تعادل منفی انرژی خفیف

نام فاکتور رونویسی	توصیف	P-value	مشترک <sup>†</sup>
Ebf1	Early B-cell factor 1	۰/۰۰۰	۸
FOXF2	Fork head related activator-2 (FOXF2)	۰/۰۱۹	۷
IA-1	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	۰/۰۰۰	۸
KLF15	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	۰/۰۰۰	۸
KLF6,ZF9	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	۰/۰۰۰	۸
MYC	MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	۰/۰۰۳	۷
MEL1	MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) DNA-binding domain 2	۰/۰۰۰	۷
MOK-2	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2	۰/۰۰۴	۷
NFI	Non-palindromic nuclear factor I binding sites	۰/۰۰۰	۷
NF-κB	NF-kappaB	۰/۰۰۰	۷
NME1	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	۰/۰۰۰	۸
Olf1	Olfactory neuron-specific factor	۰/۰۰۰	۷
Sp1	sp1	۰/۰۰۰	۷
ZBP-89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	۰/۰۰۰	۸
ZBTB7A	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokemon	۰/۰۰۸	۷
ZIC1	Zic family member 1 (odd-paired Drosophila homolog)	۰/۰۰۰	۷
ZIC2	Zic family member 2 (odd-paired Drosophila homolog)	۰/۰۰۰	۷
ZIC3	Zic family member 3 (odd-paired Drosophila homolog)	۰/۰۰۰	۷
ZNF35	Human zinc finger protein ZNF35	۰/۰۰۰	۷

<sup>†</sup> - تعداد ژن‌هایی که در پروموتر خود این فاکتور را دارند.

## تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های مؤثر در تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری



شکل ۱. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن‌های دخیل در تعادل منفی انرژی که حداقل در هفت ژن از هشت ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع‌نویسی 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).

olfactory (V\$NOLF), و فاکتورهای KLF6 و KLF15 متعلق به خانواده Krueppel like transcription factors (V\$KLF5) هستند. فاکتورهای رونویسی EBF1, IA-1, KLF6, KLF15, MYC, NM23, و ZBP89 در توالی پروموتوری هر هشت ژن حضور دارند و بقیه فاکتورهای رونویسی حداقل در پروموتور هفت ژن به صورت مشترک قرار گرفته‌اند (شکل ۱).

با بررسی مطالعات قبلی مشخص شد که فاکتورهای رونویسی شناسایی شده را می‌توان با توجه به عملکردشان در بافت کبد به سه دسته تقسیم کرد که عبارت‌اند از: ۱. فاکتورهای رونویسی که نقش آن‌ها در مبحث تعادل منفی انرژی در کبد گاوهای شیری از قبل تأیید شده است. تنها فاکتور این گروه، فاکتور NF-κB است که

نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری در شکل ۱ ارائه شده است. در این شکل، محل اتصال فاکتورهای رونویسی گوناگون بر هر یک از توالی‌های پروموتوری هشت ژن بررسی شده ارائه شده است. از آنجا که فاکتورهای رونویسی در قالب خانواده‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (فاکتورهای رونویسی با محل اتصال تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند)، ۱۹ فاکتور شناسایی شده در این مطالعه در ۱۴ خانواده قرار گرفتند که در شکل ۱ مشخص است. بدین ترتیب فاکتورهای رونویسی ZIC1, ZIC2, و ZIC3 متعلق به خانواده ZIC (V\$ZICF), فاکتورهای ZBP89 و ZBTB7 متعلق به خانواده zinc finger transcription factors 2 (V\$ZF02), فاکتورهای OLF1 و EBF1 متعلق به خانواده Neuron-specific factor

## تولیدات دائمی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

فاکتور Ebf1 نقش مهمی را در فرایندهایی همچون آدیپوژنسیز و نوروژنسیز بازی می‌کند. همچنین در مطالعات آزمایشگاهی، به طور قطعی نشان داده شده است که Ebf1 نقش محوری در آدیپوژنسیز بازی می‌کند [۱۸]. بیان KLF15 در هنگام روزه‌داری افزایش می‌یابد و به وسیله خوراکی‌دهی و انسولین از طریق سیگنال PI3K افزایش می‌یابد. فقدان ژن KLF15 در موش برای جلوگیری از سوختن کارآمد چربی نشان داده است. همچنین KLF15 نقشی ضروری در آدیپوژنسیز در سلول‌های 3T3-L1 از طریق تنظیم بیان PPAR گاما بازی می‌کند [۱۹]. فاکتور KLF6، با تأثیر مستقیم روی گلوکوکیناز کبدی، حساسیت به انسولین کبدی را تعدیل می‌کند. این فاکتور تمایز آدیپوسیت‌ها را تحریک می‌کند [۲۰]. بیان ژن ZBTB7A در کبد و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی کبد گزارش شده است [۲۱]. ژن NFI، در بیان ژن‌های مرتبط با آدیپوسیت‌ها را تنظیم می‌کند [۲۲].

۳. همچنین در مطالعه حاضر، هشت فاکتور رونویسی جدید (IA-1, ZNF35, ZIC1, ZIC2, ZIC3, MEL1, MOK-2, و Olf1) شناسایی شدند که دارای نقش اثبات‌شده در بافت کبد و تعادل منفی انرژی نیستند و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارشی ارائه نشده است. با توجه به اینکه این فاکتورها مشترکاً روی توالی‌های پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه و درگیر در تعادل منفی انرژی شناسایی شده است و همچنین در کنار فاکتورهای شناسایی شده‌اند که نقش اثبات‌شده دارند و یا مرتبط با کبد هستند، کاندیدهای مهم و جدیدی هستند که احتمالاً نقشی در کبد گاوهای شیری در شرایط تعادل منفی انرژی دارند.

باید توجه داشت که فاکتورهای شناسایی شده جدید در مطالعه حاضر (به‌ویژه فاکتورهای گروه دوم به دلیل پتانسیل این فاکتورها در سازوکارهای مرتبط با کبد) در توالی‌های پروموتوری هشت ژن مرتبط با کبد شناسایی شده‌اند،

پروتئین پیچیده‌ای است و رونویسی DNA را کنترل می‌کند. این فاکتور، در تمام جنبه‌های تنظیم سلولی شامل شروع پاسخ‌های ایمنی و تکثیر سلولی نقش ایفا می‌کند. نقش این فاکتور رونویسی به‌عنوان عامل مؤثر در تعادل منفی انرژی در کبد گاوهای شیری پس از زایمان در مطالعات قبلی گزارش شده است. گاوهای در شرایط تعادل منفی انرژی شدید، در معرض اختلال رشد سلول‌های کبدی هستند و در طی دوره اولیه پس از زایمان ترمیم می‌شوند. افزون بر این، NFkB، PPAR، گاما را مهار می‌کند. PPAR گاما برای تمایز سلول‌های چربی حیاتی است و این کاهش PPAR گاما از تمایز سلول‌های چربی جلوگیری می‌کند [۱۵].

۲. فاکتورهای رونویسی که نقش شناخته‌شده‌ای در بافت کبد دارند، اما نقش اختصاصی در تعادل منفی انرژی برای آنها گزارش نشده است: از ۱۹ فاکتور شناسایی شده در مطالعه حاضر، ۱۱ فاکتور رونویسی (SP1, ZBP89, FOXF2, ZBTB7A, MYC, NME1, KLF6, Zf9, NFI, Ebf1) و فاکتورهای هستند که به‌عنوان فاکتورهای درگیر و مرتبط با فرایندهای متابولیسمی کبد شناخته شده‌اند اما در تعادل منفی انرژی در گاو شیری گزارشی از آنها وجود ندارد.

به‌عنوان مثال، فاکتورهای رونویسی KLF6، KLF15، Ebf1، SP1، و FOX2 در تمایز آدیپوسیت‌ها نقش دارند. طی مطالعه‌ای SP1، به‌عنوان کاندیدی مؤثر در متابولیسم چربی گزارش شده است [۵]. در همین راستا، نقش Ebf1، SP1، و FOXF2 در متابولیسم چربی گزارش شده است [۵] و [۱۶]. مطالعات پیشین حاکی از آن است که MYC سنتز لیپید را از طریق مجموعه‌های خاص ژن‌های هدف تحریک می‌کند. فاکتور رونویسی ZBP-89 نقشی به‌عنوان سرکوبگر تومور بازی می‌کند و عملکرد احتمالی در فیزیولوژی جذب چربی دارد [۱۷].

## تولیدات دائمی



ژن‌ها که مرتبط با متابولیسم چربی و تعادل منفی انرژی هستند، در ادامه ارائه شده است. نقش ژن TP53 در مراحل متفاوت بیولوژیکی کبد شناسایی شده است. بیان ژن TP53 به‌طور منفی با سرم NEFA و TAG کبدی در گاوهای با رژیم غذایی محدود شده همبسته است اما به‌صورت مثبت در گاوهای تا حد اشتها تغذیه شده همبستگی دارد.

همچنین بیان ژن TP53 در گاوهای شیری در تعادل منفی انرژی و شرایط التهابی در بافت‌های متفاوتی همچون کبد، آدیپوز، و طحال نشان داده شده است [۲۳]. بیان ژن CREBBP در گاوهای تغذیه شده با لیپید بیشتر بوده و بعد از زایمان کاهش نیافته است که فعال‌سازی لیگاند PPAR گاما را پیشنهاد می‌دهد [۲۴]. نقش ژن KAT5 به‌عنوان کوفاکتوری ضروری در آدیپوژن‌ساز گزارش شده است [۲۵]. از مطالعات در سطح متابولومیکس که منجر به اتصال کربن‌های گلوکز به اسیدهای چرب در پاسخ به MYC شده‌اند، می‌توان حدس زد که MYC سنتز لیپید را از طریق مجموعه‌های خاص ژن‌های هدف تحریک می‌کند [۱۷].

پس از بررسی گروه‌های کارکردی و مسیرهای بیولوژیکی، عبارات و مسیرهای متعددی مرتبط با ۳۰ ژن موجود در شبکه ژنی معنادار شد که مؤید نقش احتمالی این ژن‌ها در تعادل منفی انرژی است. مسیرهای بیولوژیکی با استفاده از بانک اطلاعاتی KEGG بررسی شد. به‌طور کلی، ۴۵ مسیر بیولوژیکی معنادار شناسایی شد. در جدول ۴ برخی از مسیرهای مهم و مرتبط با تعادل منفی انرژی گزارش شده است.

یکی از مسیرهای معنادار شناسایی شده مسیر سیگنال p53 است که نقش مرتبط با تعادل منفی انرژی دارد (در شکل ۳ ژن‌های مرتبط با مسیر P53 در شبکه ژنی مشخص شده‌اند).

به‌طوری که در پروموتور این ژن‌ها فاکتور نقش اثبات شده‌ای در تعادل منفی انرژی نیز دارد (فاکتور NF-κB)، این نتایج نشان‌دهنده نقش احتمالی این فاکتورها در مراحل تنظیمی تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری است. در این رابطه، با توجه به اینکه فاکتورهای گروه دوم نقش شناخته شده‌ای مرتبط با متابولیسم کبد دارند و به‌صورت مشترک در توالی پروموتوری ژن‌هایی شناسایی شده‌اند که بیان مشابه و بالا در تعادل منفی انرژی دارند، نقش احتمالی آنها را در تنظیم تعادل منفی انرژی محتمل تر می‌کند. در این مطالعه برای انتخاب ژن‌های با بیان مشابه و بالا در تعادل منفی انرژی از داده‌های ریزآرایه و RNA-seq استفاده شد و فقط ژن‌هایی که توسط هر دو داده تأیید شدند، انتخاب شدند، اعمال چنین سخت‌گیری‌هایی باعث شناسایی ژن‌های بسیار مرتبط با تعادل منفی انرژی شد. به‌طوری که شناسایی فاکتور NF-κB در پروموتور این ژن‌ها مؤید این مطلب است.

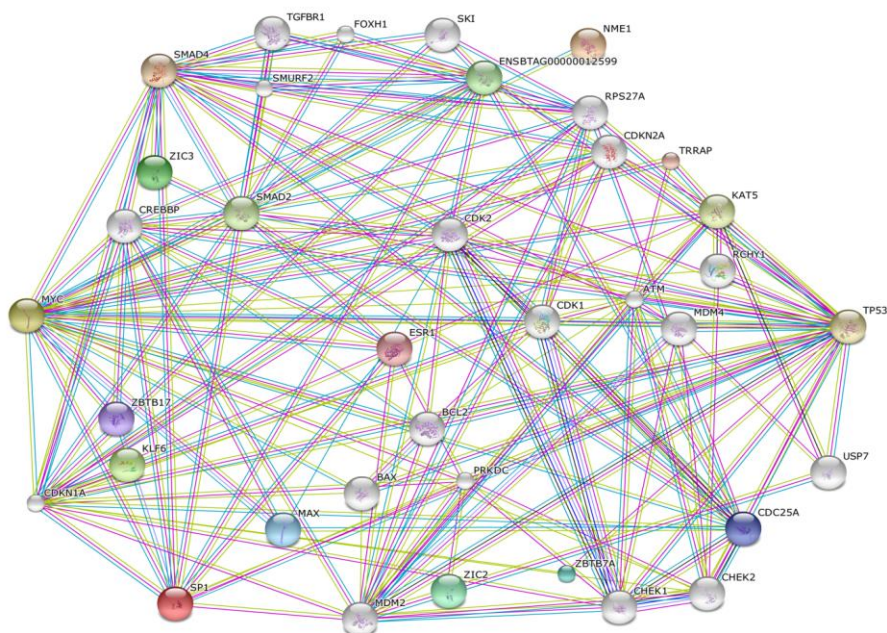
نتایج حاصل از ترسیم شبکه منجر به شناسایی هفت فاکتور رونویسی (شامل MYC, SP1, NME1, KLF6, ZBTB7A, ZIC2, ZIC3) شد که با ژن‌های دیگر ارتباط داشتند. استفاده از نمره اطمینان بالا در این مطالعه این اطمینان را می‌دهد که روابط بین‌ژنی شناسایی شده صحت بالایی دارند. در شکل ۲ شبکه ژنی ترسیم شده با استفاده از STRING ارائه شده است. شایان ذکر است که دو فاکتور رونویسی ZIC2 و ZIC3 که جزء گروه سوم بودند، وارد شبکه شدند.

به‌طور کلی، ۳۰ ژن در شبکه ژنی شناسایی شد که در این میان ژن‌های TP53, SMAD2, Chk1, KAT5, MDM2, CREBBP, MYC, و SP1 بالاترین ارتباطات با دیگر ژن‌ها را داشتند. به‌طور جالبی این ژن‌ها نیز در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی دخیل در تعادل منفی انرژی و متابولیسم چربی نقش دارند. به‌عنوان مثال، نقش برخی از

## تولیدات دامی

جدول ۴. برخی از مسیرهای بیولوژیکی مهم و معنادار مرتبط با تعادل منفی انرژی در کبد گاو شیری (مربوط به ژنهای شبکه ژنی)

ژنهای مرتبط یافت شده	تعداد ژنها	ارزش p	مسیر بیولوژیکی
CHEK1, CDK1, MDM2, RCHY1, CHEK2, CDKN2A, BAX, CDK2, MDM4, TP53, ATM, CDKN1A	۱۲	E-۲۲ ۸/۲۶	مسیر سیگنال p53
USP7, SMAD2, CDK2, ATM, CDKN1A, TGFBR1, CREBBP, SMAD4, MDM2, ENSBTAG00000012599	۱۰	E-۱۴ ۲/۶۴	مسیر سیگنال FoxO
TP53, MYC, TGFBR1, MAX	۴	E-۳ ۱/۰۳	مسیر سیگنال MAPK
ATM, BCL2	۲	E-۲ ۱/۱۵	مسیر سیگنال NF-kappa B
TP53, MYC, SMAD4, CREBBP	۴	E-۴ ۱/۰۴	مسیر سیگنال Wnt



شکل ۲. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده درگیر در تعادل منفی انرژی

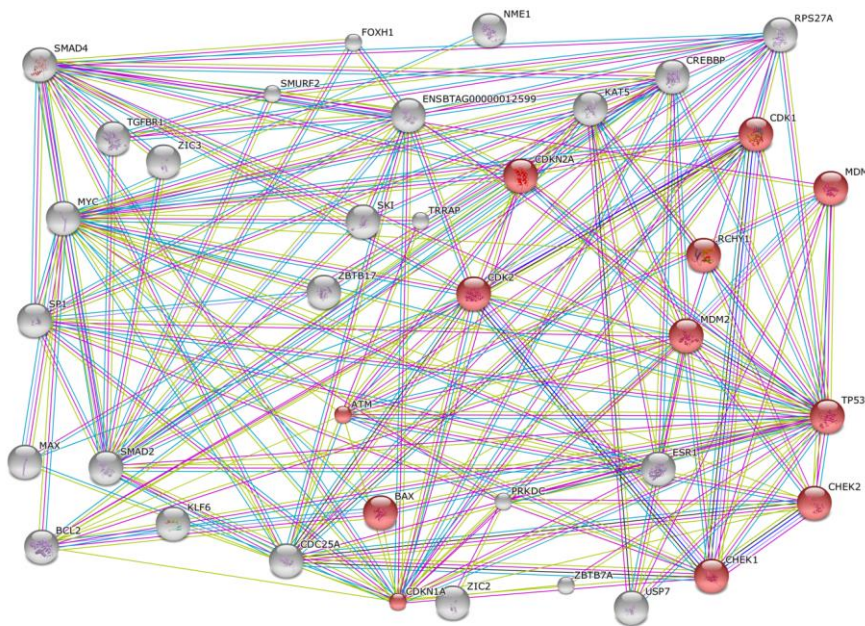
چرب الکلی و غیرالکلی بازی می کند. همچنین p53 در تنظیم متابولیسم اسید چرب کبدی نقش دارد. علاوه بر این ژنهای دخیل در بلوغ آدیپوسیت در کنترل تنظیمی p53 هستند [۲۶].

به عنوان مثال، در تنها مطالعه RNA-seq موجود در این زمینه، مسیر سیگنال p53 در ارتباط با تعادل منفی انرژی در کبد گاو شیری که با استرس مرتبط است، گزارش شده است [۳]. p53 نقشی محوری در پاتوژنز بیماری کبد

## تولیدات دائمی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

## تجزیه و تحلیل پرموتر ژن‌های مؤثر در تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری



شکل ۳. ژن‌های درگیر در مسیر P53. دایره‌های با رنگ قرمز مربوط به ژن‌های مرتبط با مسیر P53 هستند که در شبکه ژنی مشخص شده‌اند.

نتایج این بخش حاکی از ارتباط این مسیرها با فعالیت‌های گوناگون بافت کبد و تعادل منفی انرژی در مطالعات پیشین است و همچنین ژن‌هایی که مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در این مطالعه هستند، فعالیت مرتبط با متابولیسم کبد و تعادل منفی انرژی دارند. بعد از بررسی گروه‌های کاربردی مرتبط با ژن‌های درگیر در شبکه ژنی، ۸۱۱ عبارت مرتبط با مراحل گوناگون بیولوژیکی معنادار شد. برخی از عبارات مهم و مرتبط با تعادل منفی انرژی در جدول ۵ ارائه شده است. عبارات بیولوژیکی مرتبط با استرس، توسعه کبد، و پاسخ به لیپید که مرتبط با فعالیت کبد و تعادل منفی انرژی نیز هستند، معنادار شدند. این نتایج مؤید احتمال وجود ارتباط فاکتورهای رونویسی شناسایی شده با تعادل منفی انرژی است.

دیگر مسیر معنادار شناسایی شده مسیر سیگنال MAPK است. پروتئین‌های MAPK، در تنظیم تولید استروئید توسط مکانیسم‌های گوناگون شناخته شده‌اند. در این میان، مکانیسم‌هایی که بیان گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین را القا می‌کنند، برجسته‌اند که برای جذب لیپوپروتئین‌های غنی از کلسترول در کبد ضروری است. بنابراین به نظر می‌رسد که MAPK نقش مهمی در تنظیم هموستاز در کبد و تنظیم هموستازی کلسترول بازی می‌کند [۲۷]. مسیر سیگنال Wnt نیز یکی دیگر از مسیرهای شناسایی شده در این مطالعه بود. در این رابطه، مهار مسیر سیگنال Wnt با استفاده از مهارکننده‌های ویژه، تجمع لیپید در سلول‌های کبدی را افزایش می‌دهد و بنابراین مشارکتش را در پاتوفیزیولوژی کبد نشان می‌دهد [۲۸]. در رابطه با مسیر سیگنال FoxO گزارش شده است که در سطح اندام‌های پیچیده، تصور می‌شود که پروتئین‌های FoxO در تنظیم متابولیسم کربوهیدرات، لیپید، و پروتئین عمل کند [۲۹].

## تولیدات دومی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

جدول ۵. برخی از گروه‌های کارکردی مهم و معنادار مرتبط با کبد گاوهای شیری در تعادل منفی انرژی (مربوط به ژن‌های شبکه ژنی)

ژن‌های مرتبط یافت‌شده	تعداد ژن‌ها	ارزش P	گروه کارکردی
USP7, MDM2, TRRAP, BCL2, CHEK2, ATM MYC, CDKN1A, CDK2, CDKN2A, BAX, KAT5 MDM4, TP53, CHEK1, CDK1, PRKDC	۱۷	۳/۰۱ E-۱۴	پاسخ سلولی به استرس
BAX, TP53, ATM, MDM2, MYC, CHEK1, CDKN2A	۷	۲/۶۷ E-۶	تنظیم پاسخ سلولی به استرس
ENSBTAG00000012599, ATM, MDM2, MYC, CDKN2A, BAX, TP53, CHEK1	۸	۱/۶۹ E-۵	تنظیم پاسخ به استرس
SMAD2, BCL2, TGFB1, KAT5	۴	۴/۰۲ E-۳	پاسخ به لیپید
SP1, ZIC3, ENSBTAG00000012599	۳	۲/۱۵ E-۴	توسعه کبد

lactating dairy cows divergent in negative energy balance. BMC Genomics. 13(1): 193-204.

- McCarthy SD, Waters SM, Kenny DA, Diskin MG, Fitzpatrick R, Patton J, Wathes DC and Morris DG (2010) Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. Physiological Genomics. 42(3): 188-199.
- Bakhtiarizadeh MR, Moradi-Shahrbabak M and Ebrahimie E (2014) Transcriptional regulatory network analysis of the over-expressed genes in adipose tissue. Genes and Genomics. 36(1): 105-117.
- Hosseinpour B, Bakhtiarizadeh MR, Khosravi P and Ebrahimie E (2013) Predicting distinct organization of transcription factor binding sites on the promoter regions: a new genome-based approach to expand human embryonic stem cell regulatory network. Gene. 531(2): 212-219.
- Da Wei Huang BTS and Lempicki RA (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols. 4(1): 44-57.
- 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.

در مطالعه حاضر با فرض مشابه بودن ساختار پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه در تعادل منفی انرژی، ۱۸ فاکتور رونویسی کاندید جدید مؤثر در تعادل منفی انرژی شناسایی شد. با توجه به نوع داده‌ها و روش محاسباتی استفاده شده در مطالعه حاضر، فاکتورهای رونویسی کاندید معرفی شده (به‌ویژه فاکتورهای رونویسی گروه ۲) پتانسیل کافی برای بررسی در سطح آزمایشگاهی دارند. این یافته‌ها اطلاعات جدیدی را در درک بهتر شبکه تنظیمی مؤثر در تعادل منفی انرژی فراهم می‌کند. همچنین از روش استفاده شده در این مطالعه می‌توان به‌عنوان روشی مناسب در شناسایی سازوکارهای تنظیمی در بافت‌ها و شرایط گوناگون استفاده کرد.

## منابع

- Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J and Murphy JJ (2009) Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. Physiological Genomics. 39(1): 1-13.
- Fatima A, Lynn DJ, Padraic O, Seoighe C and Morris D (2014) The miRNAome of the postpartum dairy cow liver in negative energy balance. BMC Genomics. 15(1): 279-286.
- McCabe M, Waters S, Morris D, Kenny D, Lynn D and Creevey C (2012) RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from

## تولیدات دامی

9. Kelly EE, Giordano F, Horgan CP, Jollivet F, Raposo G and McCaffrey MW (2012) Rab30 is required for the morphological integrity of the Golgi apparatus. *Biology of the Cell*. 104(2): 84-101.
10. Hato T, Tabata M and Oike Y (2008) The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 18(1): 6-14.
11. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A and Sugano S (2001) CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Research*. 29(10): 2154-2162.
12. Grasfeder LL, Gaillard S, Hammes SR, Ilkayeva O, Newgard CB, Hochberg RB, Dwyer MA, Chang C-y and McDonnell DP (2009) Fasting-induced hepatic production of DHEA is regulated by PGC-1 $\alpha$ , ERR $\alpha$ , and HNF4 $\alpha$ . *Molecular Endocrinology*. 23(8): 1171-1182.
13. Chiba M, Murata S, Myronovych A, Kohno K, Hiraiwa N, Nishibori M, Yasue H and Ohkohchi N (2011) Elevation and characteristics of Rab30 and S100a8/S100a9 expression in an early phase of liver regeneration in the mouse. *International Journal of Molecular Medicine*. 27(4): 567-574.
14. Fatima A (2014) Analysis of hepatic microRNA expression in postpartum dairy cows in negative energy balance: National University of Ireland, Galway.
15. Arner P (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 14(3): 137-145.
16. Gao H, Mejhert N, Fretz JA, Arner E, Lorente-Cebrián S, Ehrlund A, Dahlman-Wright K, Gong X, Strömlad S and Douagi I (2014) Early B Cell Factor 1 Regulates Adipocyte Morphology and Lipolysis in White Adipose Tissue. *Cell Metabolism*. 19(6): 981-992.
17. Dang CV (2013) MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(8): a014217.
18. Fretz JA, Nelson T, Xi Y, Adams DJ, Rosen CJ and Horowitz MC (2010) Altered metabolism and lipodystrophy in the early B-cell factor 1-deficient mouse. *Endocrinology*. 151(4): 1611-1621.
19. Haldar SM, Jeyaraj D, Anand P, Zhu H, Lu Y, Prosdocimo DA, Eapen B, Kawanami D, Okutsu M and Brotto L (2012) Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(17): 6739-6744.
20. Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, Hannivoort RA, Lang UE, Kocabayoglu P, Fiel MI, Muñoz U, Patman GL and Ge F (2013) Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *Journal of hepatology*. 58(5): 1000-1006.
21. Yang X, Zu X, Tang J, Xiong W, Zhang Y, Liu F and Jiang Y (2012) Zbtb7 suppresses the expression of CDK2 and E2F4 in liver cancer cells: Implications for the role of Zbtb7 in cell cycle regulation. *Molecular Medicine Reports*. 5(6): 1475-1480.
22. Graves R, Tontonoz P, Ross S and Spiegelman B (1991) Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes and Development*. 5(3): 428-437.
23. Mukesh M, Bionaz M, Graugnard D, Drackley J and Looor J (2010) Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: inflammatory gene expression in vitro. *Domestic Animal Endocrinology*. 38(3): 168-178.
24. Zhang F and Du G (2012) Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World Journal of Biological Chemistry*. 3(8): 167.
25. Heldin C-H, Miyazono K and Ten Dijke P (1997) TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390(6659): 465-471.

26. Derdak Z, Villegas KA, Harb R, Wu AM, Sousa A and Wands JR (2013) Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 58(4): 785-791.
27. Go G-w and Mani A (2012) Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 85(1): 19-28.
28. Kaur K, Pandey AK, Srivastava S, Srivastava AK and Datta M (2011) Comprehensive miRNome and in silico analyses identify the Wnt signaling pathway to be altered in the diabetic liver. *Molecular BioSystems*. 7(12): 3234-3244.
29. Barthel A, Schmoll D and Unterman TG (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16(4): 183-189.