



تجزیه و تحلیل داده های بیان بافت پستان مرتبه با گاو شیری هلشتاین

نغمه ساعدی^۱، مهدی امین افشار^{۲*}، محمود هنرور^۳، مهدی چمنی^۴، علی جواد منش^۵

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲،۴. عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۵. عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

*ایمیل نویسنده مسئول: aminafshar@gmail.com

چکیده

بافت پستانی گاو یک اندام مهم و پیچیده در گاو های شیری می باشد. این اندام از سلول های مختلف تشکیل شده است، این سلول ها برای سنتز و ترشح شیر با یکدیگر در ارتباط هستند. داده های بیان بافت پستانی گاو در روز های ۳۰-۳۰+ شیردهیاز پایگاه داده NCBINCDR ریافت شد. هدف از این مطالعه شناسایی زن های بیان شده افتراقی و ارتباط آنها با یکدیگر و با چرخه های متابولیکی و فرایندهای بیولوژیکی می باشد. ۴۵۹ زن بیان شده افتراقی بین این داده ها در سطح ۱٪ معنی دار شدند. سپس توسط نرم افزار cytoscape ارتباط زن ها مشخص شد. علاوه بر این خوشه های معنی دار در سطح ۱٪ معنی شد. در انتهای با آنالیز خوشه ها با نرم افزار DAVID فرایندهای بیولوژیکی و چرخه های متابولیکی: cell division, mitotic spindle assembly check point, DNA Replication initiation, Cell cycle, Condensed chromosome kinetochore, ATP binding, Chromatin binding, Translation, Ribosome و ... در ارتباط با زن های بیان شده افتراقی مشخص شدند. نتایج نشان می دهد که ماهیت زن های بیان شده افتراقی می تواند درک بهتری از اجزای سلولی و فرایندهای بیولوژیکی بافت پستان در گاو های شیری را فراهم کند. این داده ها ممکن است در توسعه انتخاب مارکر در برنامه های اصلاح نژادی گاو های شیری کمک کند.

کلمات کلیدی: زن بیان شده افتراقی، بافت پستان، شبکه ژئی، چرخه متابولیکی

مقدمه

گاو شیرده به طور معمول با متوقف کردن روند شیر دوشی تقریباً دو ماه قبل از تولد، خشک می شود. سپس بافت پستان تحت فرایند باز تولید قرار می گیرد، که با پایان دادن به فعالیت ترشح شیر و جذب باقی مانده های شیر مشخص می شود. دوره خشک برای گاو های شیری مهم است. حذف یا کوتاه شدن دوره خشک باعث تأثیر منفی بر سلامت شیر مادر و عملکرد شیر در شیردهی بعدی می شود (Coppock et. al., 1974; Sorensen and Enevoldsen., 1991; Madsen et. al., 2008). یکی از اندام های مهم در گاو های شیری، بافت پستان آن ها می باشد که در یک دوره ی کامل شیردهی قادر به تولید میزان زیادی شیر می باشد. بافت پستانی تنها اندامی است که پس از بلوغ، سیکلهای تکثیر و باز تولید منظمی را تجربه می کند، که این امر یک مدل ایده آل برای مطالعه رشد اندام می باشد (Gao et. al., 2013).

در چند دهه گذشته، پیشرفت های زیادی برای فهم فیزیولوژی بافت پستان دیده شده است که بخشی از آن مرتبه با بهبود کارایی تولید و کیفیت شیر می باشد (Bauman et. Al., 2007). علی رغم این پیشرفت ها، سازگاری های سلولی برای سنتز و ترشح شیر توسط این اندام مورد نیاز است که عمدتاً ناشناخته باقی مانده است. توسعه نرم افزار هایی با کارایی بالا مانند آنالیز ریز آرایه ها، امکان کشف شبکه های مولکولی در بافت پستان در طول دوره حاملگی و سنتز شیر را فراهم کرده است. آنالیز ریز آرایه ها در موش برای شناسایی سازگاری بافت پستان در طول دوره شیر دهی انجام شده است (Rudolph et. al., 2003 ; Clarkson et. al., 2004)، با این حال تفسیر داده های خیلی زیاد تا به اکنون یک چالش محسوب می شود. نرم افزار های بیوانفورماتیکی این امکان را به وجود آورده اند تا داده های بزرگ ریز آرایه ها به صورت خلاصه و ساده تفسیر شوند.

با توجه به اهمیت بافت پستانی در گاو های شیری، هدف از این مطالعه شناسایی زن های بیان شده افتراقی و ارتباط آنها با یکدیگر و اهمیت آنها در فرایندهای بیولوژیکی و چرخه های متابولیکی موثر در تولید شیر می باشد.



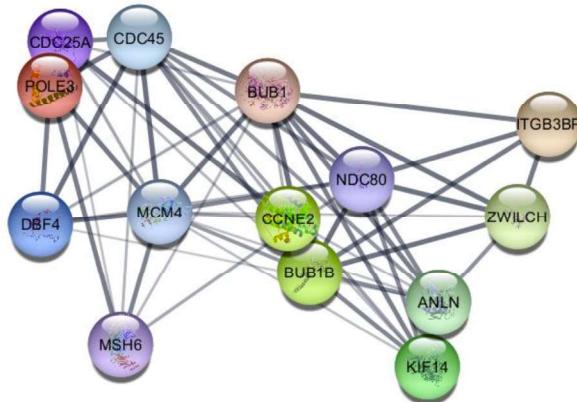
مواد و روش ها

در این مطالعه، داده های بیان رونویسی بافت پستان مرتبط با روزهای ۳۰+ و ۳۰- از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی GSE19055 دریافت شد. سپس توسط بسته LIMMA در نرم افزار R ژن های بیان شده افتراقی در سطح ۱٪ مشخص شدند. در ادامه، شبکه ژنی توسط STRINGAPP در نرم افزار cytoscape version 3.6.0 رسم شد. خوشه های مرتب با این شبکه ژنی با کمک نرم افزار cytocluster version 2.1.0 در سطح ۱٪ معین شدند. در انتها فرایند های بیولوژیکی، اجزای سلولی و فعالیت مولکولی مرتب با ژن های بین شده در خوشه ها، با نرم افزار DAVID version 6.7 آنالیز شد.

نتایج و بحث

با استفاده از نرم افزار R بسته LIMMA، ۴۵۹ ژن بیان شده افتراقی در سطح ۱٪ (adj.P.Va<0.01) بین داده های بیان مرتب با روزهای ۳۰+ و ۳۰- معنی دار شدند.

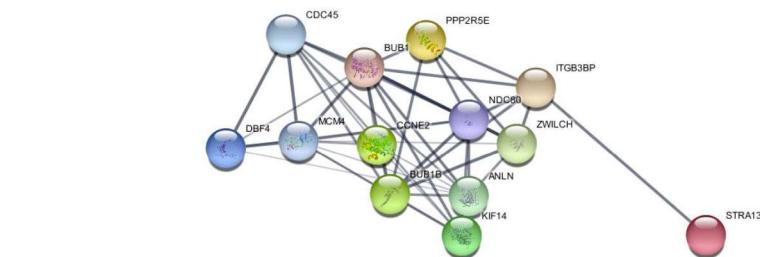
با توجه به بزرگ بودن شبکه ژنی رسم شده، با کمک نرم افزار cytocluster، خوشه های معنی دار در سطح ۱٪ مشخص شدند. ۵ خوشه در این شبکه ژنی بیشترین سطح معنی داری را نشان می دهد. خوشه اول (شکل ۱) بیشترین سطح معنی داری خوشه (pvalue=1.442*10⁻⁵) را در ارتباط با شبکه ژنی رسم شده بیان می کند که این خوشه شامل ژن های CDC25A, POLE3, BUB1, ITGB3BP, CCNE2, BUB1B, ZWILCH, KIF14, ANLN, CDC45, MCM4, DBF4, NDC80, MSH6: می باشد.



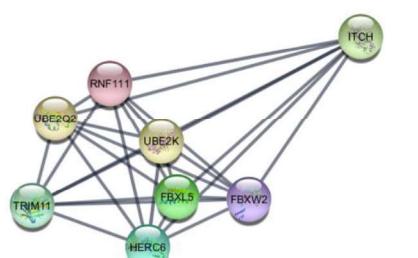
شکل ۱- خوشه اول که بیشترین سطح معنی داری (pvalue=1.442*10⁻⁵) را در ارتباط با شبکه ژنی رسم شده دارد

خوشه دوم که سطح معنی داری آن با شبکه ژنی رسم شده برابر با 4-10 pvalue=1.706*10⁻⁵ می باشد شامل ژن های زیر است: BUB1, ITGB3BP, CCNE2, BUB1B, ZWILCH, KIF14, ANLN, CDC45, MCM4, DBF4, NDC80, STRA13, PPP2R5E, AP1S2, AP3B1, SH3D19, CPD, AP3S1, CLINT1, BLOC1S1, PPP2R5E. خوشه سوم شامل ژن های AP1S2, AP3B1, SH3D19, CPD, AP3S1, CLINT1, BLOC1S1, BUB1, ITGB3BP, CCNE2, BUB1B, ZWILCH, KIF14, ANLN, CDC45, MCM4, DBF4, NDC80, STRA13, UBE2Q2, UBE2K, ITCH, FBXL5, TRIM11, RPL39, RPL27, MRPS5,, EIF3M, RPL14, HERC6, FBXW2, RNF111 می باشد (شکل ۲).

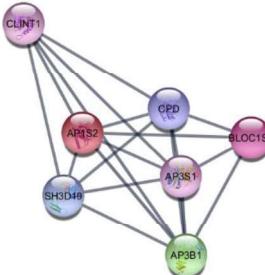
با توجه خوشه های رسم شده، فرایند های بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی این ژن ها توسط نرم افزار DAVID آنالیز شد.



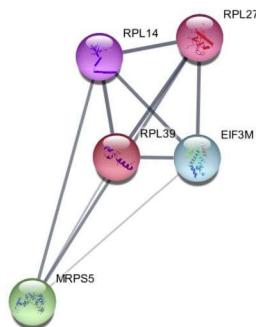
الف



ج



ب



د

شکل ۲: الف، ب، جو د به ترتیب متعلق به خوشه های ژنیدوم، سوم و چهارم مرتبط با شبکه ژنی رسم شده می باشد. این خوشه ها بر اساس سطح معنی داری ۱٪ با نرم افزار cytocluster رسم شده اند.

بعد از آنالیز ژن های هر خوشه با نرم افزار DAVID نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است:



جدول ۱: فرایند های بیولوژیکی، اجزای سلولی و فعالیت مولکولی ژن های مربوط به هر خوشه ژنی

cluster	Biological Processes	Cellular Components	Molecular Function
cluster 1	Cell division		ATP binding
	Mitotic spindle assembly checkpoint	Condensed chromosome kinetochore	Chromatin binding
	DNA Replication initiation		Protein kinase activity
cluster 2	Cell cycle		
	Cell division		
	Mitotic spindle assembly checkpoint	Condensed chromosome kinetochore	Chromatin binding
cluster 3	DNA Replication initiation		Protein kinase activity
	Cell cycle		
	Vesicle-mediated transport	Membrane coat	Protein transporter activity
cluster 4	Intracellular protein transport		
cluster 5	-	-	-
	Transalation	Ribosome	Structural constituent of ribosome
		Cytosolic large ribosomal subunit	

با توجه به تجزیه و تحلیل ژن های خوشه ها، ژن های BUB1B و BUB1 مربوط به خوشه ۱ ، در mitotic spindleassembly checkpoint point مدخل هستند. این ۲ ژن عملکردهای مختلفی در Mitotic spindleassembly checkpoint (SAC) (spindle assembly checkpoint) دارند و از اجزای مهم SAC در درمان سرطان می تواند کمک کند، همچنین در طراحی دارو و توسعه مدل های حیوانی که جهش ها در آنها باعث سرطان می شوند، مهم می باشد (Victor and Tom, 2011). چرخه سلولی و تقسیم سلولی که از فرایند های بیولوژیک مرتب با ژن های خوشه ۱ هستند، در مطالعاتی که بر روی بافت پستان گاو شیری برای شناسایی ژن های بیان شده افتراتی و چرخه های متابولیکی مرتب با آنها بود، مشاهده شدند (Bionaz et. al., 2012; GAO et. al., 2013; Finucaneet. al., 2012).

(2008)

نتایج به ما نشان می دهد که مسیر ها و فرایندهای دخیل در ارتباط با ژن های بیان شده افتراتی در بافت پستانی گاو شیری می تواند دید وسیعی در ارتباط با اجزای سلولی و فعالیت های مولکولی ژن های مهم در این بافت را برای ما فراهم کند. علاوه بر این با توجه به شناسایی ژن های مهم و موثر در تولید شیر می توان از این جایگاه های ژنی در برنامه های انتخاب بر اساس نشانگر در گاوهای شیری استفاده کرد.

منابع

- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J. and Lock, A.L. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 1235–1243.
- Bionaz, M., Periasamy, K., Rodriguez-Zas, S.L., Everts, R.E., Lewin, H.A., Hurley, W.L. and loor, J.J. 2012. Old and New Stories: Revelations from Functional Analysis of the Bovine Mammary Transcriptome during the Lactation Cycle. *PLoS ONE*, 7(3): e33268.
- Clarkson, R.W., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T. and Watson, C.J. 2004. Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Research*, 6: R92–109.



انجمن علوم دامی ایران

هشتمین کنگره علوم دام ایران



دانشگاه کردستان

Coppock, C.E., Everett, R.W., Everett, R.P. and Ainslie, H.R. 1974. Effect of dry period length on Holstein milk production and selected disorders at parturition. *Journal of Dairy Science*, 57: 712–718.

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. *FunctIntegr Genomics*, 8:251–264.

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.

Madsen, T.G., Nielsen, M.O., Andersen, J.B. and Ingvartsen, K.L. 2008. Continuous lactation in dairy cows: Effect on milk production and mammary nutrient supply and extraction. *Journal of Dairy Science*, 91: 1791–1801.

Rudolph, M.C., McManaman, J.L., Hunter, L., Phang, T. and Neville, M.C. 2003. Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 8: 287–307.

Sorensen, J.T. and Enevoldsen, C. 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *Journal of Dairy Science*, 74: 1277–1283.

Victor, M.B. and Tom, L.B. 2011. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Cell Press*, 36:141-150.