نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۹، زمستان ۱۳۹۹
ص‌ص: ۱۴۱~۱۵۴

کاوش ترانسکریپتومی لانه‌گزینی جنینی در اندومتریوم گاوهای شیری

- **جعفر جمعدار زنوزق**
دانشجوی دکتری ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
- **محمد مرادی شهربابک** (نویسنده مسئول)
استاد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
- **اردشیر نجاتی جوارمی**
استاد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

تاریخ دریافت : شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۸
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۶۱۲۶۴۲
Email: moradim@ut.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2020.127529.1972

چکیده

ایجاد و حفظ آبستنی در نشخوارکنندگان و به‌ویژه گاوهای شیری جهت تداوم تولید ضروری است. لانه‌گزینی جنین در رحم یک فرآیند ضروری برای حفظ آبستنی و شامل ارتباطات پیچیده بین جنین و اندومتریوم مادری است. بررسی ژن‌ها و مکانیسم‌های تنظیم کننده شروع لانه‌گزینی برای درک فرآیند لانه‌گزینی ضروری است. در این تحقیق، برای درک بهتر اساس مولکولی لانه‌گزینی، پروفیل یاخته‌ای اندومتریوم رحمی گاوهای آبستن در طول این فرآیند در مقایسه با گاوهای غیرآبستن بررسی شد. در مجموع با مقایسه پروفیل‌های اندومتریوم، ژن‌های دارای تفاوت بیانی شناسایی شد. بدین ترتیب بعد از پیش پردازش و تجزیه داده‌ها و انجام فراواکاوی، اثرات متقابل بین ژنی با استفاده از روش داده‌کاوی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با بازسازی شبکه و جستجوی ماژول‌های مهم و عملکردی، تعداد چهار ماژول اصلی شناسایی گردید. مهم‌ترین ژن‌های موجود شامل CLU، ACTA2، MX1، MX2، C1S، COL3A1، S100A11، NID1، SELL، PTN و CDH13 بودند. مشاهدات این تحقیق توصیه می‌کند که ماژول‌های شناسایی شده می‌توانند نشانگرهای مناسبی برای شروع پذیرش رحمی و لانه‌گزینی جنینی باشند.

واژه‌های کلیدی: داده‌کاوی، رحم، شبکه ژنی، ماژول عملکردی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 129 pp: 141-154

Transcriptome mining of embryonic implantation in the endometrium of dairy cattle.

By: Jafar Jamdar Zonuzag[1], Mohammad Moradi Shahrbabak[2*], Ardeshir Nejati Javaremi[2]
1,2. Ph.D. Candidate and Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: September 2019 **Accepted: January 2020**

Establishment and maintenance of pregnancy are essential for product persistency in ruminants, and especially in dairy cattle. Embryo implantation into the uterus is an essential process for the maintenance of pregnancy, and involves complex interactions between the embryo and maternal endometrium. Examination of genes and mechanisms regulating the initiation of implantation is necessary to understand implantation process. In this study, in order to better understand the molecular basis of implantation, we undertook the transcriptome profiling of endometrial cells of pregnant with non-pregnant cows, during this period. In total differentially expressed genes were identified with the comparison of the endometrial profiles. Thus, after preprocessing and analysis of data and meta-analysis, gene interactions were investigated using data mining approach. Also with the reconstruction of network and search for important and functional modules, we found 4 main modules. The most important genes contained CLU, ACTA2, MX1, MX2, C1S, COL3A1, S100A11, NID1, SELL, PTN and CDH13. The results of this study suggest that identified modules can be used as markers for uterus receptivity, and embryo implantation.

Key words: Data mining, Functional module, Gene network, Uterus.

مقدمه

ارتباط جنین با مادر برای ایجاد و حفظ آبستنی یک نیاز حیاتی است. لانه‌گزینی فرآیندی است که طی آن جنین در حال رشد، به‌صورت بلاستوسیست در طول رحم حرکت می‌کند و سبب ارتباط با دیواره رحم می‌شود و تا تولد به‌صورت چسبیده و متصل باقی می‌ماند. اندومتریوم نقش مهمی را در بین بافت‌های تولیدمثلی در زمینه ارتباطات جنین- مادر و آبستنی ایفاء می‌کند. اکثر مطالعاتی که مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تعاملات جنین- مادر را در حین لانه‌گزینی بررسی کرده‌اند، بر قسمت مادری تأکید داشته‌اند و بیشتر آنها تغییرات در ترانسکریپتوم اندومتریوم را توصیف می‌کنند (Bauersachs و همکاران، ۲۰۰۶؛ Forde و همکاران، ۲۰۰۹؛ Sponchiado و همکارن، ۲۰۱۹). بنابراین برای درک مکانیسم‌های تنظیمی رشد و تکوین جنین در زمان قبل و حین لانه‌گزینی و پذیرش رحمی، بررسی پروفیل‌های ترانسکریپتومی لازم و ضروری است. اگر چه سیگنال‌های مهم آبستنی جنینی (مانند اینترفرون تاو) مدت زیادی است که شناخته شده است، اما جزئیات مکانیسم‌های مرتبط با آماده‌سازی اندومتریوم برای لانه‌گزینی جنین هنوز بطور کامل شناخته نشده است و هنوز اطلاعات کمی در مورد ژن‌ها و مکانیسم‌های مسئول در لانه‌گزینی موجود است. درک بهتر الگوهای بیان ژن و سطوح آن در دوره اوایل لانه‌گزینی جنین، دیدگاه جامع‌تری را در مورد ژن‌ها و مسیرهای مولکولی کنترل کننده فراهم خواهد کرد.

لانه‌گزینی جنین بستگی به کیفیت جنین و پذیرش اندومتریوم دارد. ناتوانی و شکست اندومتریوم در ایجاد آبستنی یکی از دلایل اصلی عدم باروری است (Boivin و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر این، ناتوانی در حفظ آبستنی موجب کاهش بازده تولید در گاوهای شیری است (Ribeiro و همکاران، ۲۰۱۲) . با وجود نرخ بالای تلقیح موفقیت‌آمیز در گاوهای شیری، نرخ گوساله‌زایی بطور معنی‌داری پایین است که این نشان‌دهنده اهمیت بالای حفظ آبستنی است (Nyman و همکاران، ۲۰۱۸). گزارش‌های متفاوتی از میزان حفظ و ازدست دادن آبستنی صورت گرفته است. در

حالی که در برخی از تحقیقات، میزان آبستنی بعد از تلقیح تا حدود ۹۰ درصد بوده، ولی میانگین نرخ گوساله‌زایی حدود ۵۵ درصد گزارش شده است (Diskin و همکاران، ۲۰۰۶). بیشترین میزان از دست دادن آبستنی در سه هفته اول آبستنی اتفاق می‌افتد که ۷۰ الی ۸۰ درصد کل آبستنی‌های از دست رفته را در این زمان شامل می‌شود (Diskin و همکاران، ۲۰۰۶؛ Ribeiro و همکاران، ۲۰۱۸). در فن‌آوری های زیستی تولیدمثلی (مانند انتقال جنین) نیز اختلال در پذیرش رحمی یکی از دلایل اصلی شکست در ایجاد آبستنی است (Macklon و همکاران، ۲۰۰۶). در فن‌آوری زیستی انتقال دورن‌تنی(in-vivo) جنین، میانگین حفظ آبستنی تا گوساله‌زایی ۳۱ الی ۶۰ درصد و در انتقال برون‌تنی (in-vitro) این میزان از ۳۰ الی ۴۰ درصد است (Berg و همکاران، ۲۰۱۰؛ Ferraz و همکاران، ۲۰۱۶). این ارقام اهمیت حفظ آبستنی و پذیرش رحمی همراه با لانه‌گزینی جنین را نشان می‌هد.

بدست آوردن اطلاعات جدید از فرآیندهای پیچیده از جمله پذیرش اندومتریوم، شناسایی ژن‌ها و ماژول‌های مهم و عملکردی مرتبط با لانه‌گزینی جنینی منجر به شناسایی رفتاری عدم باروری در گاوهای شیری و بهبود صفات تولیدمثلی خواهد شد. تشخیص ژن‌های درگیر در صفات کمی و فرآیندهای پیچیده از جمله لانه‌گزینی جنینی علاوه بر تشخیص و بهبود این فرآیندها و صفات، در انتخاب دام‌های مناسب از نظر این صفات به اصلاحگران کمک شایانی خواهد کرد. با تجزیه و واکاوی مجموعه پروفیل‌های ترانسکریپتومی می‌توان ژن‌ها و ماژول‌های مهم و عملکردی را که در پذیرش اندومتریوم و لانه‌گزینی موفق نقش مهمی دارند، مشخص کرد. با توجه به اهمیت موضوع و بدلیل اینکه تاکنون تحقیق جامعی از مجموع بررسی‌های مختلف برای کاوش ترانسکریپتومی در لانه‌گزینی گاوهای شیری و پیدا کردن ژن‌ها و ماژول‌های مهم صورت نگرفته است، بنابراین هدف از تحقیق حاضر شناسایی ژن‌های مؤثر، شناسایی اثرات متقابل بین ژنی با داده‌کاوی، بازسازی و واکاوی شبکه و همچنین جستجوی ماژول‌های مهم و عملکردی لانه‌گزینی جنینی با استفاده از پیش‌پردازش و تجزیه داده‌های مربوط به این فرآیند مهم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای تجزیه داده‌ها و پیدا کردن ژن‌هایی با تفاوت بیانی و یافتن ماژول‌های عملکردی مرتبط با لانه‌گزینی جنین، مراحل مختلفی در نظر گرفته شد. در تحقیق حاضر از نرم‌افزارهای متعددی برای انجام این مراحل استفاده شد که در زیر شرح داده می‌شود.

در این گام داده‌های مناسب مرتبط با تحقیق حاضر شناسایی شد. با جستجو در پایگاه GEO (Edgar و همکاران، ۲۰۰۲؛ Barrett و همکاران، ۲۰۱۲) و ArrayExpress (Brazma و همکاران، ۲۰۰۳) شماری داده گردآوری شد. با بررسی‌هایی که انجام دادیم، پنج بررسی ریزآرایه مختلف و مرتبط با این تحقیق وجود داشت که در نهایت از بین این مجموعه داده‌ها، چهار بررسی ریزآرایه که مستندسازی (Annotation) کاملی در اختیار ما می‌گذاشتند و نیز اطلاعات کاملی از نحوه انجام آزمایش برای ما فراهم می‌کردند، انتخاب شدند. از بین نمونه‌های مجموعه داده‌های انتخاب شده، تنها نمونه‌هایی استفاده شد که پروفیل بیانی اندومتریوم گاوهای شیری آبستن و غیرآبستن را در زمان لانه‌گزینی جنینی به ما ارائه می‌دادند (جدول ۱). بدین ترتیب از ۷۲ نمونه از این داده‌ها که مرتبط با فرآیند لانه‌گزینی جنینی بودند، استفاده گردید.

جدول ۱. خلاصه داده های استفاده شده در تحقیق

Table1. Summary of datasets used in this study

Accession number	Publication	Platform	Samples used in this study
GSE93580	(Sakumoto and Kizaki, 2017)	(Agilent-018964 NIAS) GPL19801	8
GSE13664	(Mansouri-Attia et al., 2009)	UIUC Bos taurus 13.2K 70-mer) GPL2853 (oligoarray	36
GSE30694	(Bauersachs et al., 2006)	Affymetrix Bovine Genome) GPL2112 (Array	8
GSE13728	(Mansouri-Attia et al., 2009)	UIUC Bos taurus 13.2K 70-mer) GPL2853 (oligoarray	20

ابتدا داده‌های ریزآرایه کنترل کیفیت شدند. در اینجا پیدا کردن ژن‌ها با تفاوت بیانی، با در نظر گرفتن پروفیل یاخته‌ای اندومتریوم رحمی گاوهای آبستن در طول فرآیند لانه‌گزینی جنینی در مقایسه با گاوهای غیرآبستن انجام شد. کیفیت مجموعه این داده‌ها با استفاده از Box Plot و PCA پیش از نرمال‌سازی چارکی (Quantile Normalization) بررسی شد. نرمال‌سازی و خلاصه‌سازی با مقیاس لگاریتمی توسط بسته نرم‌افزاری LIMMA نسخه ۳/۳۶/۱ و الگوریتم RMA (Linear Models for Microarray Data) روی تک تک مجموعه داده‌های ریزآرایه صورت گرفت. بعد از خلاصه‌سازی ژن‌هایی با تفاوت بیانی، بیان این ژن‌ها که حاصل از تجزیه مجموعه داده‌های ریزآرایه بودند با استفاده از بسته نرم افزاری ggplot2 ترسیم شد. در نهایت ژن‌هایی با تفاوت بیانی معنی‌دار برای این مجموعه داده‌های انفرادی مشخص شدند.

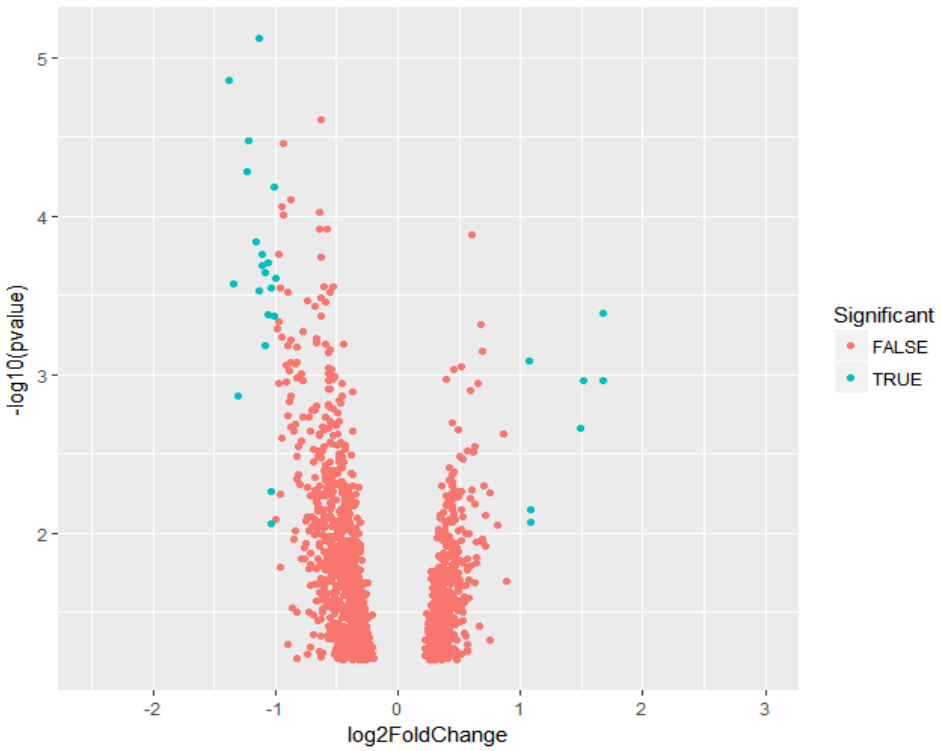
بعد از تجزیه و واکاوی هر کدام از مجموعه داده های انفرادی، از روش فراواکاوی (Meta-analysis) برای بدست آوردن ژن‌های نهایی با تفاوت بیانی، در گاوهای آبستن در مقایسه با گاوهای غیرآبستن در فرآیند لانه‌گزینی جنینی استفاده شد. بدین‌ترتیب با انجام فراواکاوی و همچنین افزایش شمار نمونه‌ها امکان شناسایی ژن‌های دارای تفاوت بیانی، با توان آماری بالا فراهم شد. برای انجام فراواکاوی، مجموعه داده‌های انفرادی در قالب ۷۲ نمونه از چهار بررسی یکی شدند. در این مرحله، Fold-change های بدست آمده برای هر ژن با استفاده از روش ناپارامتری رتبه‌ای (Rank-production) و بسته نرم‌افزاری RankProd (نسخه ۳/۹) یکی شدند. نتایج حاصل از این مرحله به‌عنوان ژن‌های نهایی با بیان متفاوت معنی دار بود. بدین‌ترتیب از فراواکاوی جهت بالا بردن قدرت تجزیه آماری در شناسایی ژن‌های دخیل در لانه‌گزینی جنین، سازوکارهای مربوطه و ماژول‌های مهم و عملکردی مرتبط با این فرآیند استفاده شد.

ترسیم، تجزیه و واکاوی شبکه بر روی داده‌های گردآوری شده مورد اجرا قرار گرفت. برای این منظور از مجموعه‌های ژنی بدست آمده از مراحل قبل که حاصل از تجزیه داده‌های ریزآرایه بودند، استفاده گردید. به منظور بازسازی شبکه، از پایگاه‌های داده‌ای String (Jansen و همکاران، ۲۰۰۸) و GeneMania (Warde-Farley و همکاران، ۲۰۱۰) استفاده گردید. با توجه به اینکه برای بازسازی شبکه، ما نیازمند یافتن اثرات متقابل بین ژنی هستیم بدین‌ترتیب اثرات متقابل مختلف از جمله اثرات متقابل ناشی از یافته‌های آزمایشی، همسایگی روی ژنوم، اثرات متقابل ناشی از ژن‌های هم‌بیان (Co-expressed genes) و اثرات متقابل بین پروتئینی (Protein-Protein Interaction (PPI)) بررسی شدند. در نهایت ترسیم، تجزیه و واکاوی شبکه بر روی داده‌ها اجرا شد. بدین‌منظور از نرم افزار Cytoscape

(Assenov و همکاران، ۲۰۰۸) استفاده شد. همچنین از الگوریتم‌های ClusterOne (Nepusz و Paccanaro، ۲۰۱۲) و MCOD (Bader و Hogue، ۲۰۰۳) برای شناسایی ماژول‌های مهم و عملکردی بهره گرفته شد.

نتایج و بحث

قبل از انجام فراواکای، نتایج تجزیه داده‌های انفرادی ریزآرایه که در مراحل قبل با انجام پیش پردازش و سنجش تفاوت بیانی ژن‌ها بدست آمده بود مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پس از در نظر گرفتن حد آستانه تغییر بیان، ژن‌های دارای بیان متفاوت ژنی شناسایی شدند. شناسایی ژن‌هایی با بیان متفاوت بر مبنای مقادیر Fold change و p-value صورت گرفت. بدین ترتیب ژن‌هایی که میزان Foldchange بالای قدر مطلق ۲ داشتند انتخاب شدند (log2Foldchange> |1|) و در نهایت ژن‌های معنی‌دار در سطح p-value <۰/۰۵ شناسایی گردیدند. برای نمونه در داده‌های ریزآرایه مربوط به شماره دسترسی GSE13728 ما توانستیم در نهایت شمار ۲۷ ژن مرتبط با فرآیند لانه‌گزینی جنین را شناسایی کنیم. نمودار ggplot مربوط به این داده‌ها در شکل (۱) آورده شده است. ژن‌های انتخاب شده در این نمودار، به صورت نقاط سبز رنگ دیده می‌شوند.

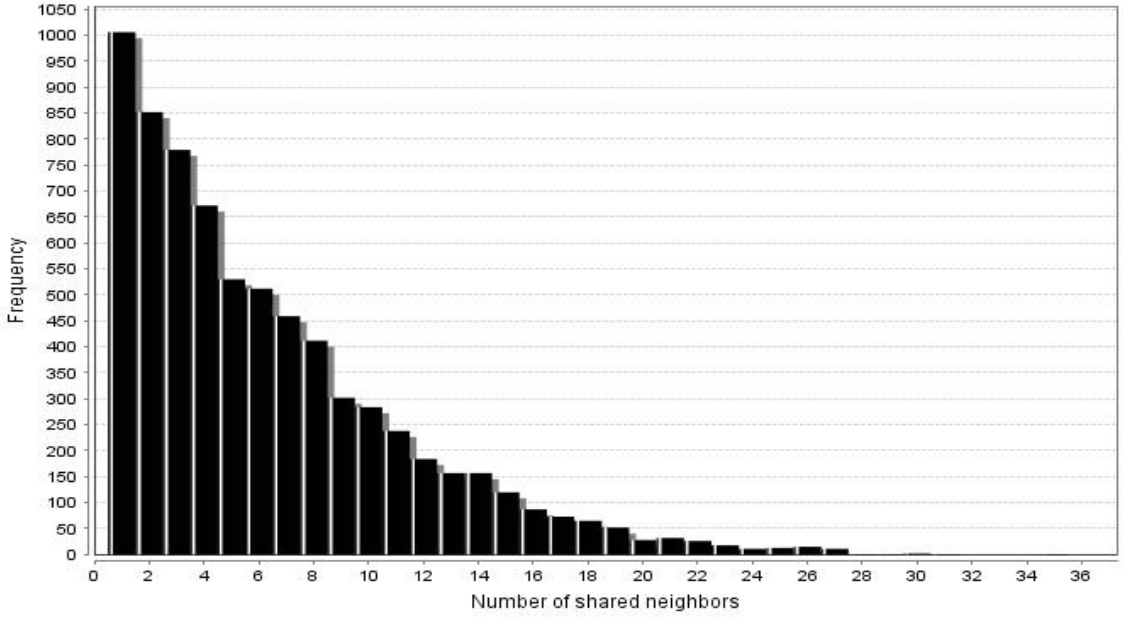


شکل ۱- نمودار ggplot مربوط به تجزیه داده‌های ریزآرایه (مرتبط با شماره دسترسی GSE13728)

Figure 1- ggplot for microarray data analysis (related to GSE13728 accession number)

برای درک بهتر اساس مولکولی مراحل اولیه لانه‌گزینی جنینی، پروفیل بیانی اندومتریوم در طول این مرحله بررسی شد. بدین‌ترتیب در گام بعدی پس از انجام مراحل مختلف پیش‌پردازش که بر روی داده‌های انفرادی انجام گرفته بود، و با مقایسه پروفیل بیانی بین گاوهای آبستن و غیرآبستن، فراواکاوی بر روی ۷۲ نمونه اجرا شد و خروجی حاصل از RankProd به‌صورت ژن‌های دارای تفاوت بیانی بررسی شد. در مجموع، با تجزیه تمام داده‌های ریزآرایه شمار ۱۲۵ ژن مرتبط با فرآیند لانه‌گزینی جنین انتخاب شدند.

به منظور استفاده کامل از اثرات متقابل بین ژنی، شبکه بازسازی شده مورد بررسی و واکاوی قرار گرفت. هر کدام از ژن‌ها به صورت یک گره(node) در شبکه بازسازی شده حضور داشتند. در تحقیق حاضر، شبکه بازسازی شده شامل ۱۴۴ گره و ۲۰۷۹ یال با میانگین ۲۸/۵۸۳ گره مجاور به‌ازای هر گره بود و ضریب کلاسه‌بندی (Clustering Coefficient) نیز برابر با ۰/۳۴۱ و قطر ۵ بود. همچنین توزیع شاخص مجاورهای سهیم (Shared Neighbors) مربوط به شبکه بازسازی شده در شکل (۲) آورده شده است. با توجه به شکل، فراوانی گره‌ها با افزایش تعداد گره‌های مجاور سهیم کاهش پیدا کرده است. حداکثر تعداد مجاورهای سهیم ۳۵ بود. در تحقیق حاضر فقط یک جفت ژن دارای ۳۵ گره مجاور سهیم بودند، و در پایین بازه، شمار ۱۰۰۶ جفت ژن دارای فقط یک گره مجاور سهیم بودند.

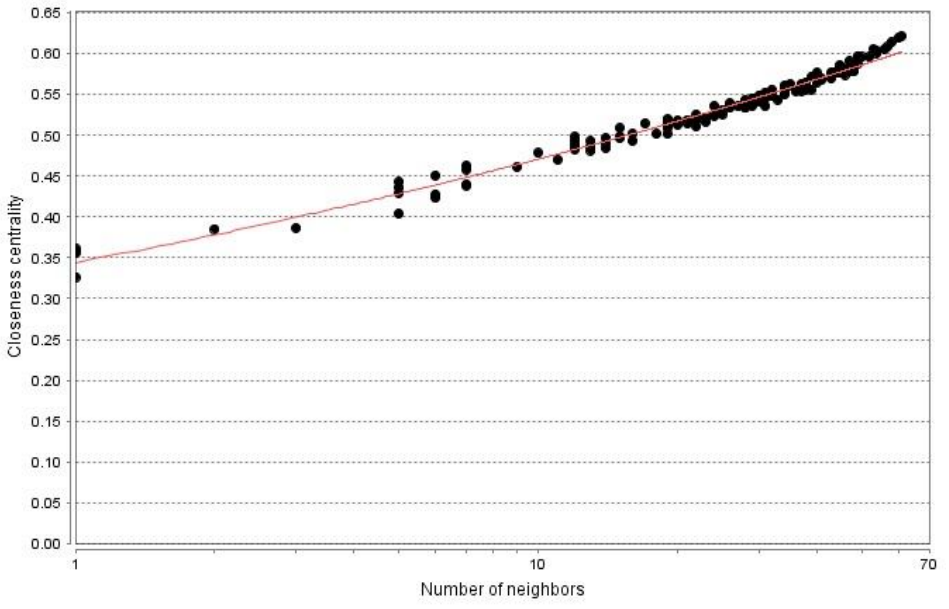


شکل ۲- توزیع شاخص مجاورهای سهیم در شبکه بازسازی شده اصلی

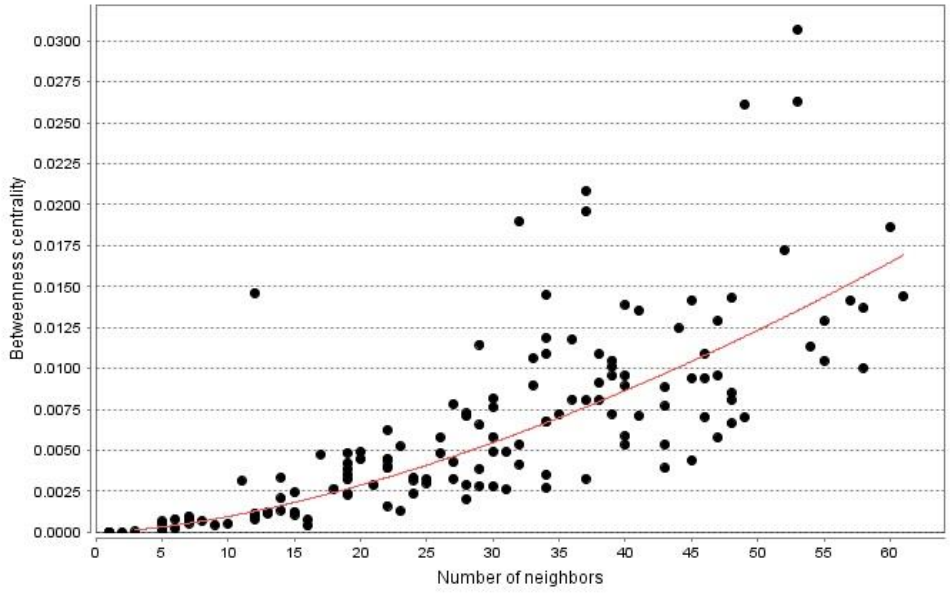
Figure 2- Distribution of shared neighbors index in main reconstructed network

در شکل (۳) مرکزیت نزدیکی و مابینی (Closeness and Betweenness centrality) مربوط به شبکه بازسازی شده لانه‌گزینی جنینی با استفاده از الگوریتم براندز (Brandes algorithm) (Brandes، ۲۰۰۱) و توسط نرم‌افزار Network Analyser (Assenow و همکاران، ۲۰۰۸) آورده شده است. مرکزیت نزدیکی و مابینی دو شاخص مهم در بررسی شبکه‌های زیستی است که سنجشی از مرکزیت یک گره در شبکه بازسازی شده می‌باشند که از طریق نسبت تعداد کوتاه‌ترین مسیرها بین جفت گره‌هایی که توسط گره مدنظر باهم در ارتباط هستند، محاسبه می‌شوند. در تحقیق حاضر همانطور که مشاهده شد، شاخص مرکزیت نزدیکی با افزایش تعداد گره‌های مجاور افزایش داشت و این نشان‌دهنده صحت بالای شبکه بازسازی شده است که در آن، هر

گرهی که مرکزیت آن در شبکه بالا است و در فاصله کمتری از مرکز شبکه قرار گرفته است، متوسط نزدیکی آن نیز به دیگر گره‌ها بیشتر است (شکل ۳-الف). شاخص مرکزیت مابینی شاخصی است که در شبکه‌های زیستی برای تعیین میزان کنترلی که هر گره توسط ارتباط با سایر گره‌ها در شبکه دارد. همانطور که مشاهده شد، با افزایش تعداد گره‌های مجاور مربوط به هر گره، میزان شاخص مرکزیت مابینی افزایش داشت و این نشان‌دهنده این است که با افزایش تعداد گره‌های مجاور مربوط به هر گره، نقش و کنترل آن گره در شبکه افزایش پیدا کرده است چرا که میزان اطلاعات مربوط به آن گره افزایش پیدا کرده است (شکل۳-ب).



(الف)

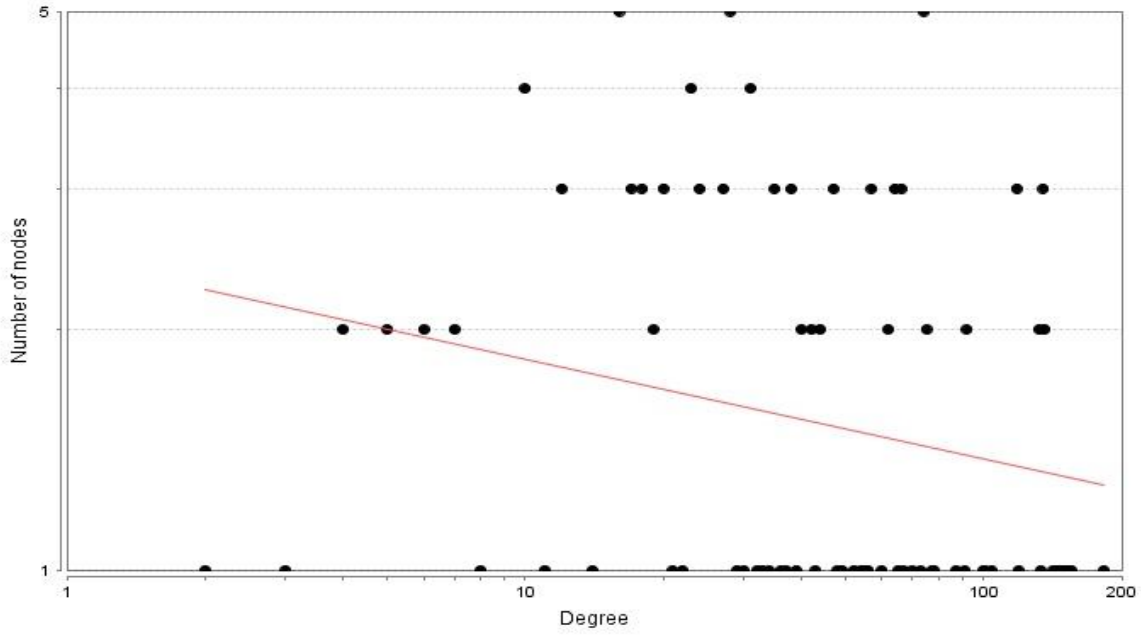


(ب)

شکل ۳- توزیع شاخص های مرکزیت در شبکه بازسازی شده اصلی. الف) شاخص مرکزیت نزدیکی، ب) شاخص مرکزیت مابینی

Figure 3. Distribution of centrality indexes in main reconstructed network. a) closeness centrality index, b) Betweennness centrality index

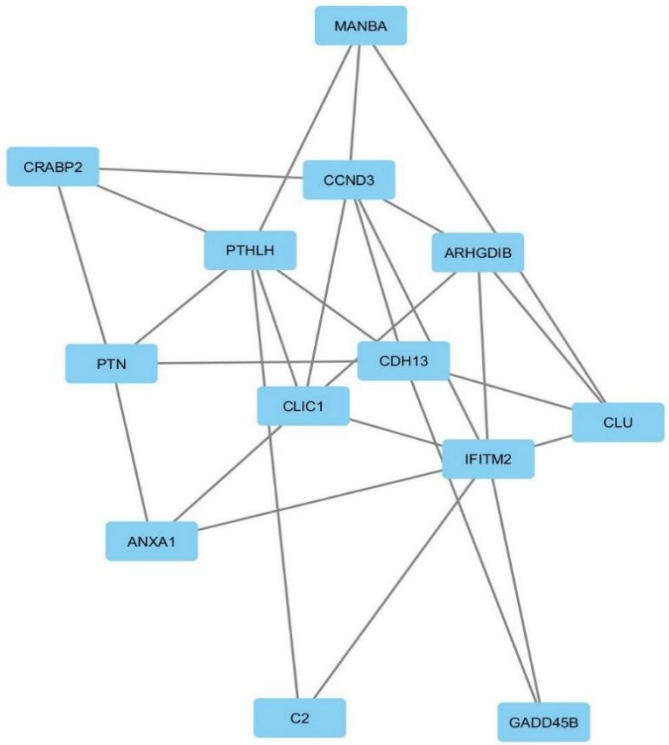
نمودار مربوط به توزیع درجه آزادی گره‌ها در شکل (۴) آورده شده است. با ویژگی‌های شبکه‌های تصادفی و شبکه‌هایی با مقیاس آزاد (Scale-Free) (مستقل از مقیاس) (Barabási و Bonabeau، ۲۰۰۳) و با مشاهده شکل و توزیع درجه آزادی گره‌های مربوط، این شکل نشانگر شبکه بازسازی شده دارای مقیاس آزاد است. با بررسی درجه آزادی مربوط به گره‌ها و نمودار مربوطه، از غیرتصادفی بودن شبکه بازسازی شده اطمینان حاصل گردید.



شکل٤- توزیع درجه آزادی گره های مربوط به شبکه بازسازی شده

Figure 4- Degree of freedom distribution related to reconstructed network

در بررسی حاضر بعد از بازسازی شبکه، برای واکاوی هر چه بهتر آن، ماژول‌های مهم و معنی‌دار شناسایی گردید. در بررسی ماژول‌های شبکه بازسازی شده، در مجموع ۸ ماژول شناسایی گردید که از این بین، شمار ۴ ماژول مهم و معنی‌دار (p-value < 0.01) انتخاب شدند. ماژول ۴ به‌دلیل مهم بودن، سادگی و وجود ژن‌های مهم در مسیر لانه‌گزینی جنینی در شکل (۵) آورده شده است.



شکل ۵- ماژول شماره ٤ از شبکه بازسازی شده اصلی

Figure 5- Module 4 of reconstructed main network

در طول دوره لانه‌گزینی، تغییرات مهم مورفولوژیکی و عملکردی اتفاق می‌افتد. حفظ و نگهداری آبستنی بستگی به سازگاری اعضای جدید ایجاد شده و سامانه ایمنی جنین در حال رشد دارد. این مهم توسط ارتباط هورمونی و فیزیکی جنین با مادر امکان می‌پذیرد که برای لانه‌گزینی، تشکیل جفت و بازسازی عروق رحم توسط تکوین ایمنی مادری لازم و ضروری است (Cartwright و همکاران، ۲۰۱۰). عامل هسته‌ای kB (Nuclear factor k-B (NFkB)) یک عامل رونویسی درگیر در تنظیم ژن‌های مرتبط با التهاب و پاسخ ایمنی است. این عامل نقش مهمی در شروع لانه‌گزینی و زایش در پستانداران دارد (Roos و همکاران، ۲۰۱۰). چندین ژن تنظیم‌کننده این مسیر از جمله ژن CLU وجود دارد، که در تحقیق حاضر شناسایی گردید. این ژن پروتئین‌هایی شبیه به پروتئین کلاسترین انسانی در گاو تولید می‌کند. این پروتئین‌ها در مسیرهای زیستی مختلف از جمله التهاب، بازسازی بافت، تکثیر سلولی و ارتباط سلول با سلول فعالیت می‌کنند (Essabbani و همکاران، ۲۰۰۹). مازاد بر این، MX1 و MX2 از جمله ژن‌های مهمی بودند که در تحقیق حاضر شناسایی شدند. این ژن‌ها نقش ایمنی دارند و در پاسخ ضد ویروسی سلولی شرکت می‌کنند. پروتئین‌های کد شده توسط اینترفرون نوع I القاء می‌شود (Sadler و همکاران، ۲۰۰۸). چندین ژن القاء کننده اینترفرون (IFN stimulated genes (ISGs)) در محیط رحمی بیان می‌شوند (Bauersachs و Wolf، ۲۰۱۳). بررسی‌ها نشان داده است که پروتئین‌های Mx بین گاوهای آبستن و غیرآبستن تفاوت بیان معنی‌داری نشان داده‌اند، و در زمان پیش از لانه‌گزینی در رحم نقش مهمی ایفا می‌کنند (Shirozu و همکاران، ۲۰۱۶). بدین‌ترتیب برخی از ژن‌های مهم و دارای تفاوت بیانی معنی‌دار در طول لانه‌گزینی جنین، نقش ایمنی و حفظ آبستنی را دارند. ANX1 پروتئینی را کد می‌کند که این پروتئین به فسفولیپیدها می‌چسبد، این پروتئین فعالیت مقاومت در برابر بیماری دارد. ANX1 در گاوهای شیری

نیز به‌عنوان یک ژن مقاوم در برابر بیماری‌های تنفسی شناخته شده است (Senthilkumaran و همکاران، ۲۰۱۳). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که این ژن در سلول‌های ترفکتودرم جنین حضور دارد و نقش مهمی در حفظ آبستنی و جفت‌سازی دارد. در تحقیقی با واکاوی پروتئومی نشان داده شد که پروتئین مربوط به این ژن فراوانی بیشتری در جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (In-vitro frtilization) در مقایسه با جنین‌های حاصل از انتقال سلول‌های سوماتیکی (Somatic cell nuclear transfer (NT)) دارد و یکی از دلایل موفقیت آبستنی‌های حاصل از لقاح درون آزمایشگاهی بوده است (Talbot و همکاران، ۲۰۱۰).

در گاو برخلاف جوندگان، لانه‌گزینی جنین نسبتاً دیرتر و از روز ۱۸ آبستنی شروع می‌شود، یعنی زمانی که لایه تروفوبلاست جنین به حدی تکوین می‌یابد که تمام شاخ رحمی گاو آبستن را در بر می‌گیرد و بدین‌ترتیب، بلاستوسیست جهت تشکیل جفت، به سطح اندومتریوم مادری اتصال می‌یابد و یک خط اتصال بین جنین در حال رشد و مادر را فراهم می‌سازد (Denker، ۱۹۹۳). در این رابطه، ژن S100A11 پروتئینی را کد می‌کند که عضوی از خانواده پروئتین‌های S100 است. این پروتئین‌ها شامل موتیف‌هایی هستند که کلسیم به آنها اتصال می‌یابد و در تنظیم تعدادی از فرآیندهای سلولی، از جمله پیشرفت چرخه سلولی و تمایز سلولی نقش دارند. اهمیت کلسیم در لقاح، رشد، تکوین جنین و لانه‌گزینی در برخی از مطالعات بررسی شده است (Tinel و همکاران، ۲۰۰۰؛ Whitaker، ۲۰۰۶). ژن S100A11 در انسان به‌عنوان یک میانجی‌گر در چسبندگی جنین، پذیرش رحمی و همچنین سامانه مقاومت ایمنی از طریق جذب کلسیم و آزاد شدن آن از ذخایر داخل سلولی است (Liu و همکاران، ۲۰۱۲). ژن‌های دیگری از جمله NID1 نیز شناسایی شدند که از این طریق عمل می‌کنند و گروهی از خانواده نیدوژن (Nidogen) ها را کد می‌کنند، این پروتئین‌ها با اجزای دیگر غشای سلولی ارتباط برقرار می‌کنند و نقش مهمی در ارتباطات سلولی با ماتریکس خارج از سلول دارند. مازاد براین در تحقیق حاضر، CDH13 به‌عنوان یک ژن مهم در شروع لانه‌گزینی جنین شناسایی گردید. CDH13 ژنی است که گروهی از خانواده پروتئین‌های کادهرین (Kadherin) را کد می‌کند. این خانواده گلیکوپروتئین‌هایی هستند که ارتباط سلول با سلول را توسط اتصال وابسته به کلسیم تنظیم می‌کنند (Stemmler، ۲۰۰۸). در تحقیق حاضر این ژن نقش مستقیم در چسبندگی سلول با سلول و اپی تلیوم اندومتریوم با تروفوبلاست جنینی دارد. مسلماً در زمان لانه‌گزینی جنینی، مولکول‌های سطح سلولی جهت چسبندگی سلول با اندومتریوم یا ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی ایفاء می‌کنند. ژن SELL به‌عنوان یکی از ژن‌های مهم در تحقیق حاضر شناسایی گردید. این ژن یکی از اعضای مهم مولکول‌های چسبندگی سطح سلولی L-selectin را کد می‌کند، این مولکول یک مولکول ضروری برای لنفوسیت‌ها است. همچنین این ژن بعد از هچ‌شدگی، در سطح سلولی بلاستوسیست شناخته شده است و در فرآیند اتصال جنین– اندومتریوم انسانی نقش دارد (Liu و همکاران، ۲۰۱۱). اخیراً این ژن مهم در شروع لانه‌گزینی جنین گاوهای شیری نیز گزارش شده است (Bai و همکاران، ۲۰۱۵).

برخی از ژن‌ها از جمله ACTA2 در انسان و موش نقش ساختاری دارد و همچنین در تنظیم مرگ سلولی و علامت‌دهی سلولی نقش دارد. علاوه بر این، در اوایل آبستنی و ایجاد آن نقش دارد (Ishiwata و همکاران، ۲۰۰۳). PTN نیز در مسیرهای مهمی از جمله رشد سلولی، زنده‌مانی، مهاجرت سلولی و رگ‌زایی (Angiogenesis) فعالیت دارد. این ژن در گاو به‌عنوان ژنی که توسط اینترفرون-تاو تحریک و تنظیم می‌شود، شناخته شده است (Mansouri-Attia و همکاران، ۲۰۰۹). در گاو و گوسفند، بلاستوسیستی که آزادانه شناور است پروتئین‌های اینترفرون تولید می‌کند که علامت‌های جلوگیری از پس‌روی جسم زرد محسوب می‌شوند. این اینترفرون‌ها در گاو و گوسفند، به‌ترتیب به نام اینترفرون گاوی تاو (bIFN-τ) و اینترفرون گوسفندی تاو (oIFN-τ) خوانده می‌شوند (Bovien and ovine interferon tau). در واقع در نشخوارکنندگان علامت

تشخیص آبستنی (عامل MRP)، اینترفرون‌ها هستند (Flint و همکاران، ۱۹۹۴). اینترفرون‌ها علاوه بر بخشی از عوامل علامت‌دهی، نقش‌های مهم دیگری از جمله محافظت جنین و رحم در مقابل عفونت‌های ویروسی، در اوایل آبستنی نشخوارکنندگان دارند (Roberts و همکاران، ۲۰۰۸). تغییرات در پاسخ ایمنی مادری برای شروع و حفظ آبستنی مورد نیاز است. در زمان لانه‌گزینی، پاسخ التهابی شدیدی مشاهده می‌شود که به دنبال افزایش در سطوح لنفوسیت‌های T، اینترفرون و سیتوکین‌های ضد التهابی مانند اینترلوکین‌ها (IL) اتفاق می‌افتد که توسط سلول‌های اندومتریوم و سلول‌های ایمونولوژیکی ترشح می‌شوند (Dekel و همکاران، ۲۰۱۰). اینترلوکین‌ها هم نقش مهمی در جای‌گیری جنین در اندومتریوم ایفاء می‌کنند.

بدین‌ترتیب، در تحقیق حاضر ژن‌ها و ماژول‌های عملکردی مرتبط با شروع لانه‌گزینی جنین شناسایی گردید. استفاده از فراواکاوی و ترکیب اطلاعات مجموعه‌های داده‌های انفرادی روشی قابل اتکا و با قدرت تجزیه آماری بالا جهت بررسی ژن‌هایی با تفاوت بیانی بالا است که در تحقیق حاضر استفاده گردید. ژن‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر می‌توانند در فرآیندهای مربوط به پذیرش رحمی و لانه‌گزینی جنینی از جمله ژن‌های مهم باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ژن‌های شناسایی شده با بیان متفاوت معنی‌دار، در اندومتریوم ممکن است مرتبط با مسیرهای دیگر مهم در فرآیند لانه‌گزینی باشند و فقط ژن‌های دخیل در ارتباط هورمونی و اتصال فیزیکی بین بلاستوسیست و اندومتریوم نباشند. علاوه بر این، بازسازی و واکاوی شبکه مرتبط با لانه‌گزینی جنینی منجربه شناسایی چهار ماژول مهم و عملکردی گردید که می‌توانند به‌عنوان نشانگر در شروع فرآیند لانه‌گزینی باشند.

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر با بررسی جامع از مطالعات مختلف، کاوش ترانسکریپتومی در لانه‌گزینی جنین گاوهای شیری جهت پیدا کردن ژن‌ها و ماژول‌های مهم صورت گرفت. با تجزیه و واکاوی مجموعه پروفیل‌های ترانسکریپتومی، ژن‌ها و ماژول‌های مهم و ساز و کار مرتبط با آن‌ها در پذیرش اندومتریوم و لانه‌گزینی موفق مشخص گردید. در این بررسی، با ترکیب اطلاعات ریزآرایه توانستیم به طور موفقیت‌آمیزی ژن‌های مرتبط با شروع لانه‌گزینی جنینی را شناسایی کنیم. شبکه بازسازی شده شامل ۱۴۴ گره و ۲۰۷۹ یال بود. از بین ژن‌های شناسایی شده، برخی در تنظیم فرآیندهای سلولی از جمله ایمنی، تنظیم چرخه سلولی، تکثیر و ارتباط سلول با سلول در دیگر بافت‌ها نیز دخالت دارند. نتیجه اساسی و کلی تحقیق حاضر شامل کاوش جامع ترانسکریپتومی جنینی با استفاده از بررسی‌های مختلف بود. از نتایج اصلی تحقیق حاضر، شناسایی چهار ماژول مهم و عملکردی است که مرتبط با ژن‌های دخالت کننده در لانه‌گزینی جنین است. بطور کلی این ژن‌ها در رشد، تکوین و لانه‌گزینی جنین و پذیرش رحمی و برخی فرآیندهای زیستی می‌توانند نقش داشته باشند.

منابع

Bader, G. D. and Hogue, C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, 4(1), 2.

Barabási, A. L. and Bonabeau, E. (2003). Scale-free networks. *Scientific american*, 288(5), 60-69.

Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., ... and Yefanov, A. (2012). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D991-D995.

Assenov, Y., Ramírez, F., Schelhorn, S. E., Lengauer, T. and Albrecht, M. (2007). Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 24(2), 282-284.

Bai, R., Kusama, K., Sakurai, T., Bai, H., Wang, C., Zhang, J., ... and Imakawa, K. (2015). The role of endometrial selectins and their ligands on bovine conceptus attachment to the uterine epithelium during peri-implantation period. *Biology of reproduction*, 93(2).

Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E., Meyer, H. H., Wenigerkind, H., ... and Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, 132(2), 319-331.

Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Reichenbach, H. D., Reichenbach, M., Büttner, M., Meyer, H. H., ... and Wolf, E. (2012). Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biology of reproduction*, 86(2), 46-1.

Bauersachs, S. and Wolf, E. (2013). Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. *Journal of reproductive immunology*, 97(1), 20-26.

Berg, D. K., Van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M. and Pfeffer, P. L. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*, *73*(2), 250-260.

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A. and Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*, 22(6), 1506-1512.

Brandes, U. (2001). A faster algorithm for betweenness centrality. *Journal of mathematical sociology*, 25(2), 163-177.

Brazma, A., Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M., Vilo, J., Abeygunawardena, N., ... and Oezcimen, A. (2003). ArrayExpress—a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic acids research*, *31*(1), 68-71.

Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E. and James, J. L. (2010). Remodelling at the maternal–fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 140(6), 803-813.

Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I. and Mor, G. (2010). Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(1), 17-21.

Denker, H. W. (1993). Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 266(6), 541-558.

Diskin, M. G., Murphy, J. J. and Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal reproduction science*, *96*(3-4), 297-311.

Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, *30*(1), 207-210.

Essabbani, A., Margottin-Goguet, F. and Chiocchia, G. (2009). Identification of clusterin domain involved in NF-kappaB pathway regulation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-C109.

Ferraz, P. A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J. E. P., Chebel, R. C. and Galvão, K. N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*, *86*(7), 1834-1841.

Flint, A. P. F., Guesdon, F. M. J. and Stewart, H. J. (1994). Regulation of trophoblast interferon gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 100(1-2), 93-95.

Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M. A., Evans, A. C. O., Spencer, T. E., ... and Lonergan, P. (2009). Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(4), 784-794.

Ishiwata, H., Katsuma, S., Kizaki, K., Patel, O. V., Nakano, H., Takahashi, T., ... and Suzuki, Y. (2003). Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Molecular Reproduction and Development*, 65(1), 9-18.

Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., ... and Bork, P. (2008). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D412-D416.

Liu, S., Yang, X., Liu, Y., Wang, X. and Yan, Q. (2011). sLeX/L-selectin mediates adhesion in vitro implantation model. *Molecular and cellular biochemistry*, 350(1-2), 185-192.

Liu, X. M., Ding, G. L., Jiang, Y., Pan, H. J., Zhang, D., Wang, T. T., ... and Huang, H. F. (2012). Down-regulation of S100A11, a calcium-binding protein, in human endometrium may cause reproductive failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(10), 3672-3683.

Macklon, N. S., Stouffer, R. L., Giudice, L. C. and Fauser, B. C. (2006). The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine reviews*, 27(2), 170-207.

Mansouri-Attia, N., Aubert, J., Reinaud, P., Giraud-Delville, C., Taghouti, G., Galio, L., ... and Yang, X. (2009). Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological genomics*, 39(1), 14-27.

Nepusz, T., Yu, H. and Paccanaro, A. (2012). Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks. *Nature methods*, 9(5), 471.

Nyman, S., Gustafsson, H. and Berglund, B. (2018). Extent and pattern of pregnancy losses and progesterone levels during gestation in Swedish Red and Swedish Holstein dairy cows. *Acta veterinaria scandinavica*, *60*(1), 68.

Ribeiro, E. S., Galvão, K. N., Thatcher, W. W. and Santos, J. E. P. (2012). Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod*, *9*(3), 370-387.

Ribeiro, E. S., Spricigo, J. F. W., Carvalho, M. R. and Ticiani, E. (2018). Physiological and cellular requirements for successful elongation of the preimplantation conceptus and the implications for fertility in lactating dairy cows. *Anim. Reprod*, *15*(1), 765-783.

Roberts, R. M., Chen, Y., Ezashi, T. and Walker, A. M. (2008, April). Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. *In Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 2, pp. 170-177). Academic Press.

Ross, J. W., Ashworth, M. D., Mathew, D., Reagan, P., Ritchey, J. W., Hayashi, K., ... and Geisert, R. D. (2010). Activation of the transcription factor, nuclear factor kappa-B, during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *8*(1), 39.

Sadler, A. J. and Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews immunology*, *8*(7), 559.

Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Fujii, S., Kanahara, H., Hosoe, M., Furusawa, T. and Kizaki, K. (2017). Possible roles of CC-and CXC-Chemokines in regulating bovine endometrial function during early pregnancy. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 742.

Senthilkumaran, C., Clark, M. E., Abdelaziz, K., Bateman, K. G., MacKay, A., Hewson, J. and Caswell, J. L. (2013). Increased annexin A1 and A2 levels in bronchoalveolar lavage fluid are associated with resistance to respiratory disease in beef calves. *Veterinary research*, 44(1), 24.

Shirozu, T., Sasaki, K., Kawahara, M., Yanagawa, Y., Nagano, M., Yamauchi, N. and Takahashi, M. (2016). Expression dynamics of bovine MX genes in the endometrium and placenta during early to mid pregnancy. *Journal of Reproduction and Development*, 62(1), 29-35.

Sponchiado, M., Gonella-Diaza, A. M., Rocha, C. C., Turco, E. G. L., Pugliesi, G., Leroy, J. L. and Binelli, M. (2019). The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition in vivo. *Scientific reports*, *9*(1), 8354.

Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular BioSystems*, 4(8), 835-850.

Talbot, N. C., Powell, A. M., Caperna, T. J. and Garrett, W. M. (2010). Proteomic analysis of the major cellular proteins of bovine trophectoderm cell lines derived from IVP, parthenogenetic and nuclear transfer embryos: Reduced expression of annexins I and II in nuclear transfer-derived cell lines. *Animal reproduction science*, 120(1-4), 187-202.

Tinel, H., Denker, H. W. and Thie, M. (2000). Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Molecular human reproduction*, 6(12), 1119-1130.

Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., ... and Maitland, A. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W214-W220.

Whitaker, M. (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiological reviews*, 86(1), 25-88.