

آنالیز بیوانفورماتیک پروموتور ژن‌های مؤثر در بافت‌های شکمبه و طحال گاوهای گوشتی تغذیه شده با علوفه و غلات

• محمد قادرزاده^{۱*}، زهره مزدوری^۲، جبار جمالی^۳، یحیی محمدی^۴

۱ دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری.
۲ دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳ استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۴ استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۹۴۳۲۲۰۹۱

Email: mg.mahabad1365@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2021.351949.2099

چکیده

گوشت گاو، یکی از منابع اصلی پروتئین غذای انسان می‌باشد. گوشت بدست آمده از گاوهای تغذیه شده با علوفه که بطور مستقیم از مراتع تغذیه می‌کنند شامل جذب انرژی محدود اما مقدار فراوانی فیبر می‌باشد. در مقابل گاوهای اخته تعدیه شده با غلات، منبع بهینه‌ای از انرژی قابل هضم دریافت می‌کنند. عملکرد شکمبه در تغذیه با علوفه و غلات با هم متفاوت می‌باشد. همچنین حیوانات تغذیه شده با غلات نسبت به حیوانات تغذیه شده با علوفه بیشتر در معرض خطر احتمال ابتلا به ناهنجاری‌های متابولیک و بیماری‌های عفونی هستند. در این مطالعه به منظور درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در طحال و شکمبه گاوهای تحت تأثیر دو جیره غذایی متفاوت علوفه و غلات، در ابتدا ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq شناسایی شدند. آنالیز پروموتور با پایگاه بیوانفورماتیکی Genomatix انجام شد. افزون بر این، برای ترسیم شبکه‌های ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در شکمبه و طحال از نرم افزار Cytoscape استفاده شد. در ادامه، نتایج تجزیه و تحلیل پروموتوری منجر به شناسایی ۳۱ فاکتور رونویسی جدید احتمالی در مراحل تنظیمی عملکرد شکمبه و ۱۰ فاکتور رونویسی در طحال در گاوهای تغذیه شده با علوفه و غلات گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، هم در شکمبه و هم در طحال ۱۰ ژن شناسایی شدند که بیشترین میزان بیان را دارا بودند. با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج در پایگاه اطلاعاتی DAVID، فرایندهای: کاهش اکسیداسیون، تنظیم تکثیر سلولی، انتقال یون، توسعه اپیدیدیم و توسعه اکتودرم، معنی دار ارزیابی شدند. بطور کلی نتایج بدست آمده از این مطالعه بینش ارزشمندی جهت درک مکانسیم‌های مولکولی طحال و شکمبه تحت تأثیر دو رژیم غذایی متفاوت علوفه و غلات فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: شکمبه، طحال، تجزیه و تحلیل محاسباتی، پروموتور.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 132 pp: 151-166

Bioinformatics analysis of promoter genes involved in beef cattle rumen and spleen tissues fed with grass and grain

By: Mohammad Ghaderzadeh^{1*}, Zohreh Mozduri², Jabar Jamali³, Yahya Mohammadi⁴.

1- Former Ph.D. Student, of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

* Corresponding author, mg.mahabad1365@gmail.com

2- P.h.D. candidate in Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Assistant professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

4- Assistant professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

Received: September 2020

Accepted: March 2021

Beef is the main diet component and one of the main sources of protein for humans. The grass-fed beef obtained their nutrients directly from pastures, which contained limited energy absorption but an abundant amount of fiber. On the contrary, the grain-fed steers received a grain-based regime that served as an efficient source of high-digestible energy. Rumen may function differently in the grass-fed and grain-fed regimes. Therefore, grain-fed cattle suffer stronger metabolic stress than pasture-fed steers; and they tend to easily have metabolic and infectious diseases. In this study to gain insights into transcriptional regulation in spleen and rumen tissues under two different regimes include grass and grain, the first high expression genes in two different conditions were identified by RNA-seq data analyses. Promoter analysis was performed using a bioinformatics database of Genomatix. Moreover, in this study to the visualization of regulatory networks containing transcription factors and that regulate the genes in the rumen and spleen, were used Cytoscape software. Then, promoter analysis leads to the identification of 31 novel transcription factor activating in the rumen and 10 novel transcription factors candidates in the spleen in cow fed with grass and grains. Results revealed that 10 genes with the highest expression were identified in both rumen and spleen. According to the analysis of the results in the DAVID Database, the processes: reduction of oxidation, regulation of cell proliferation, ion transport, epididymal development, and ectoderm development were evaluated as significant. The results in this study provide valuable insights into molecular mechanisms in spleen and rumen tissues under two different regimes include grass and grain.

Key words: Rumen, Spleen, Computational analysis, Promoter.

مقدمه

حیوانات را از طریق فناوری‌های مناسب، به ویژه در سیستم تولید و هضم مواد مغذی افزایش دهند (Wanapat et al., 2013). حیوانات نشخوارکننده مشارکت قابل توجهی در اثرات گلخانه‌ای دارند. بنابراین، نگرانی در مورد محیط زیست، رفاه و سلامت عمومی حیوانات، مصرف کنندگان را به انتخاب گاوهای تغذیه

گوشت گاو همواره یک منبع اصلی پروتئین و دیگر مواد مغذی مانند لیپیدها و مواد معدنی را در رژیم غذایی انسان تشکیل می‌دهد. امروزه تقاضای گوشت قرمز، در اکثر کشورهای در حال توسعه و با نرخ رشد سریع جمعیت، روند صعودی و قابل پیش‌بینی خواهد داشت. بنابراین ضروری است که محققان، بهره‌وری

برای رشد و تولید حیوانات را تشکیل می‌دهد. بنابراین عملکرد شکمبه در تغذیه با علوفه و غلات با هم متفاوت می‌باشد. همچنین حیوانات تغذیه شده با غلات نسبت به حیوانات تغذیه شده با علوفه بیشتر در خطر احتمال ابتلا به ناهنجاری‌های متابولیک هستند (Li et al., 2015).

دو پژوهش با استفاده تکنیک RNA-seq در رابطه با گاوهای تغذیه شده با غلات و گاوهای تغذیه شده با علوفه و اثرات این نوع خوراکیها بر بیان ژنهای شکمبه و طحال، انجام شده است (Li et al., 2015). در پژوهش انجام شده بر روی بافت طحال، در گاوهای تغذیه شده با علوفه در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با غلات، نشان داده شد که ۱۲۳ ژن دارای بیان متفاوت حضور دارند و مسیرهای متابولیکی مرتبط با ایمنی و لنفوسیت‌های T برای این ژنها معنی دار شد (Li et al., 2015). در پژوهش دیگر که شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با غلات و علوفه بررسی شد، ۳۲۴ ژن دارای بیان متفاوت و مسیرهای مرتبط با توسعه سلولی و بیوسنتز برای این ژنها معنی دار ارزیابی شد (Li et al., 2015). با این حال، علی‌رغم مطالعات انجام شده در این حوزه، فاکتورها و عملکرد تنظیمی ژنهای درگیر در درک مکانسیم‌های مولکولی طحال و شکمبه تحت دو رژیم غذایی متفاوت علوفه و غلات به طور کامل شناسایی نشده است. فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند و به عنوان تنظیم-گرهای اصلی ژن‌ها شناخته شده‌اند (Le et al., 2015). این پروتئین‌ها به محل‌های تنظیمی DNA (نواحی تنظیمی ژن هدف مانند پروموتور و نواحی افزاینده) که مکان‌های اتصال فاکتورهای رونویسی^۱ (TFBSs) نامیده می‌شوند، متصل می‌شوند. این اتصال منجر به افزایش یا کاهش در سطوح بیان ژن‌های هدف می‌شود (Fatima, 2014). اگر در نواحی تنظیمی ژن‌های هم بیان، TFBSs یا عوامل تنظیمی مشابه وجود داشته باشد، احتمال هم-تنظیم بودن و همچنین عملکرد مشابه وجود خواهد داشت. بدین منظور امروزه از روش‌های محاسباتی پیچیده برای بررسی این موضوع استفاده می‌شود که در حال حاضر با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در این حوزه در حال گسترش نیز می‌باشند.

شده با علوفه کشانده است (Li et al., 2015). بطور قابل توجهی، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی متفاوت ترکیب گوشت گاو را تغییر می‌دهند. استئاریک اسید تنها اسید چرب اشباعی است که روی کلسترول سرم نقش دارد و در گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به غلات سطح بالاتری دارد (Alfaia et al., 2009). همچنین تفاوت معنی دار در نسبت امگا ۳: امگا ۶، بین گاوهای تغذیه شده با علوفه و غلات گزارش شده است (Leheska et al., 2008). همچنین بتاکاروتن (پیش‌ساز ویتامین A)، بطور معنی‌داری در ماهیچه گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به غلات بالاتر می‌باشد (Descalzo et al., 2005). علاوه بر این، ویتامین A می‌تواند به یکپارچگی غشاء مخاطی، حفاظت در برابر بیماری‌های عفونی و ویروسی کمک کرده (Smith et al., 2002) و عملکرد ایمنی را با تأثیر بر گلوبول‌های سفید تعدیل نماید (Beauchesne-Rondeau et al., 2003). همچنین پژوهش‌ها نشان داده که حیوانات تغذیه شده با غلات نسبت به حیوانات تغذیه شده با علوفه بیشتر در معرض خطر احتمال ابتلا به بیماری‌های عفونی هستند (Smith, 1998). طحال، بزرگترین اندام لنفاوی در بدن می‌باشد و نقش مهمی در سیستم ایمنی بازی می‌کند و به عنوان فیلتر اصلی بدن برای آنتی‌ژن‌های منتقل شده از خون و عوامل بیماری‌زا و همچنین به عنوان یک اندام مهم برای هموستازی اریتروسیت‌ها و متابولیسم آهن عمل می‌کند (Bronte and Pittet, 2013). بنابراین، طحال یک اندام ایمنی است که ممکن است تحت رژیم‌های غذایی گوناگون، متفاوت عمل کند (Li et al., 2015).

علاوه بر طحال، شکمبه نیز در رژیم‌های غذایی متفاوت، عملکرد متفاوتی دارد. شکمبه، ۹۰ درصد از حجم معده نشخوارکنندگان را تشکیل می‌دهد. اکوسیستم میکروبی شکمبه، مجموعه‌ی پیچیده‌ای از گروه‌های مختلف میکروبی است که دارای همزیستی با دام میزبان هستند، این ارتباط همزیستی برای تبدیل غذاهای لیگنو-سلولزی به اسیدهای چرب فرار است که این اسیدهای چرب فرار منبع انرژی حیوان می‌باشند. به عبارتی شکمبه عضو کلیدی برای هضم علوفه می‌باشد و یک منبع مهم برای تأمین مواد مغذی کافی

¹ - Transcription Factor Binding Sites

حالت مورد نظر فوق به عنوان ژن‌های نهایی برای انجام تجزیه و تحلیل پروموتور انتخاب شدند.

بررسی گروه‌های کارکردی

به منظور بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های معنادار با بیان زیاد در دو حالت مختلف ذکر شده، از پایگاه اطلاعاتی DAVID استفاده شد (Huang et al., 2009). بدین منظور ژن‌های معنادار حاصل از داده‌های مطالعه‌ی RNA-seq در دو حالت مختلف ذکر شده به این پایگاه اطلاعاتی معرفی و عبارات معنادار ($P < 0/05$) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. تنها عبارات معنادار مربوط به مراحل بیولوژیکی جهت بررسی بیشتر در نظر گرفته شدند.

استخراج توالی‌های پروموتوری و تجزیه و تحلیل آنها

به منظور انجام تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری و تشخیص (TFBSs) Transcription Factor Binding Sites موجود در ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل، توالی پروموتوری ژن‌های شناسایی شده (پروموتور ژن‌های *bos taurus*) در مرحله قبل توسط بانک اطلاعاتی موجود در بسته نرم‌افزاری Genomatix و با استفاده از قسمت Gene2Promoter استخراج گردید (Cartharius et al., 2005). برای ژن‌های با بیش از یک توالی پروموتوری، معتبرترین توالی بر اساس پیشنهاد خود نرم‌افزار انتخاب شد. همچنین نواحی پروموتوری همه ژن‌ها به صورت ۱۰۰۰ جفت باز بالادست و ۲۰۰ جفت باز پایین دست محل آغاز رونویسی ژن مورد نظر تعریف و استخراج گردید. به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی مشابه در توالی‌های پروموتوری ژن‌ها از نرم‌افزار MatInspector استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از ماتریس‌های وزنی-مکانی^۲ (PWM)، TFBSها را در توالی‌های DNA شناسایی می‌کند (Cartharius et al., 2005). بدین منظور از بانک اطلاعاتی جامع MatBase موجود در Genomatix که حاوی PWM مرتبط با TFBS می‌باشد، استفاده گردید. در ابتدا هر یک از توالی‌های پروموتوری با استفاده از ماتریس‌های PWM این بانک اطلاعاتی بررسی شدند و TFBS معنادار ($P < 0/05$)

بنابراین، یک راهکار مناسب برای درک بهتر مکانیسم تنظیمی درگیر در یک مرحله بیولوژیکی خاص، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه در آن مرحله با استفاده از روش‌های محاسباتی و با فرض اینکه این ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی مشابه در توالی پروموتوری خود هستند، می‌باشد (Bakhtiarizadeh et al., 2014). هدف از مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های با بیان بالا در دو بافت طحال و شکمبه گاو تحت دو رژیم غذایی متفاوت علوفه و غلات به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی درگیر در این مراحل و همچنین ترسیم شبکه تنظیمی ژن‌های مؤثر در طحال و شکمبه تحت دو رژیم غذایی متفاوت علوفه و غلات و بررسی فرآیندهای بیولوژیکی مربوطه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور شناسایی ژن‌های با بیان زیاد و معنادار در دو بافت شکمبه (چهار نمونه شکمبه شامل دو نمونه شکمبه گاوهای تغذیه شده با علوفه و دو نمونه دیگر شکمبه گاوهای تغذیه شده با غلات) طحال (چهار نمونه طحال شامل دو نمونه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه و دو نمونه دیگر طحال گاوهای تغذیه شده با غلات) گاوهای آنگوس داده‌های مربوط به دو مطالعه RNA-seq یکی انجام شده روی شکمبه (Li et al., 2015) با شماره دسترسی GSE63550 و مطالعه RNA-seq دیگر انجام شده روی بافت طحال (Li et al., 2015) با شماره دسترسی GSE67018 از سایت NCBI Gene Expression Omnibus DataSets (GEO) استخراج گردید. در پژوهش‌های فوق، افتراق بیان داده‌های RNA-seq با استفاده از نرم‌افزار R پکیج edgeR (بر مبنای توزیع باینومیال منفی) و نرمال‌سازی بر مبنای خوانش‌های خام انجام شد (Li et al., 2015) و آنالیز مسیرها با کمک پایگاه DAVID انجام شد (Huang et al., 2009). در ادامه ژن‌های با بیان زیاد و معنادار ($p < 0/05$) مربوط به مطالعه RNA-seq ذکر شده در دو

² - Position Weight Matrix

گاوهای تغذیه شده با علوفه در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات، نشان داد که در طحال ۱۰ ژن و در شکمبه نیز ۱۰ ژن بیان بالایی داشتند. در ادامه هر یک از دو حالت مورد نظر به طور کامل بررسی شده است.

الف) مقایسه بافت شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات

نتایج نشان داد که ۲۶۷ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه بافت شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه داشتند ($P < 0.01$). پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۲۶۷ ژن با بیان بالا و معنادار، ۳۱ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ($P < 0.05$) که بیشتر آنها مرتبط با تمایز سلول‌های اپیتلیال، کاهش اکسیداسیون، تنظیم منفی تکثیر سلولی، چسبندگی سلول به سلول بودند. برخی از عبارات بیولوژیکی معنادار و مهم حاصل از این تجزیه و تحلیل در جدول ۱ ارائه شده است.

مرتبط با هر یک از توالی‌های پروموتوری این ژن‌ها شناسایی شدند. در نهایت TFBS‌های معنادار ($P < 0.05$) به عنوان کاندیدهای جدید مؤثر در تنظیم مکانسیم‌های مولکولی طحال و شکمبه تحت تأثیر دو رژیم غذایی متفاوت علوفه و غلات معرفی شدند.

شبکه ژنی

در مطالعه حاضر به منظور مصورسازی و یکپارچه‌سازی شبکه‌های تنظیمی حاوی فاکتورهای رونویسی که mRNAs را تنظیم می‌کنند، از نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.2.1 استفاده گردید (Shannon et al., 2003). در ادامه جهت ایجاد طرح‌بندی شبکه با استفاده از الگوریتم Circular از منوی Layout موجود در نرم‌افزار Cytoscape، شبکه بدست آمده مجدداً سازماندهی شد (Shannon et al., 2003).

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های دو مطالعه RNA-seq که یکی مربوط به بافت شکمبه و دیگری مربوط به بافت طحال

جدول ۱. عبارات بیولوژیکی معنادار حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های با بیان بالا و معنادار (مقایسه بافت شکمبه گاوهای تغذیه شده با علوفه و غلات) حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq

عبارات مراحل بیولوژیکی	P-value مربوط به عبارات بیولوژیکی
اکسیداسیون	۰/۰۰۰۰۰۵
فرآیندهای توسعه سلولی	۰/۰۰۰۰۴۸
تنظیم تکثیر سلولی	۰/۰۰۳۷۶۹
تمایز سلولهای اپی تلیال	۰/۰۲۰۰۰۰

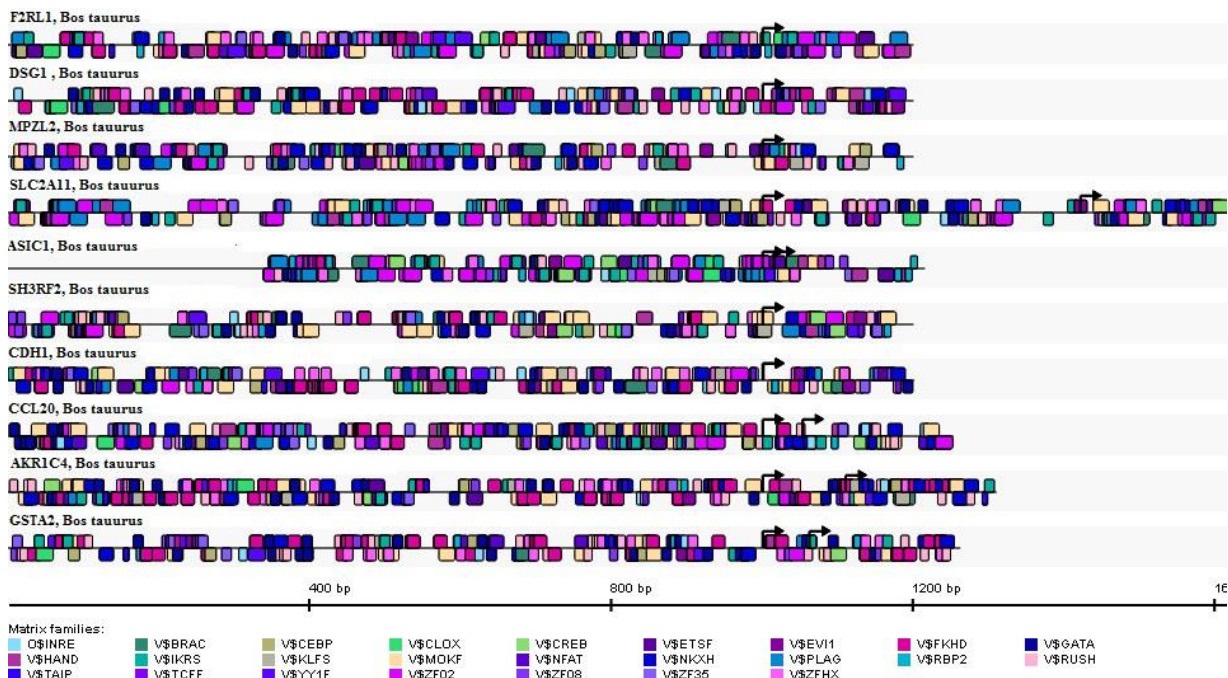
گاوهای تغذیه شده با دانه غلات استفاده شد. در پایان با تجزیه و تحلیل این ۱۰ ژن، ۳۱ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتوری ۱۰ ژن مورد نظر قرار داشتند. فاکتورهای رونویسی شناسایی شده عبارتند از *c-CEBPE*، *AREB6*، *Drosophila initiator motifs*، *Jun/ATF2*، *CSRNPI* (*AXUD1*، *CDP (CUTL1)*، *deltaEF1*)

در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۰ ژن برتر ($P < 0.01$) شامل *DSG1*، *F2RL1*، *CDH1*، *SH3RF2*، *ASIC1*، *SLC2A11*، *MPZL2*، *CCL20*، *AKR1C4* و *GSTA2* انتخاب شدند. با توجه به اهمیت این ژن‌ها در مطالعه‌ی حاضر، از این ۱۰ ژن برای بررسی ساختار پروموتوری آنها و شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید جدید مقایسه بافت شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با علوفه با

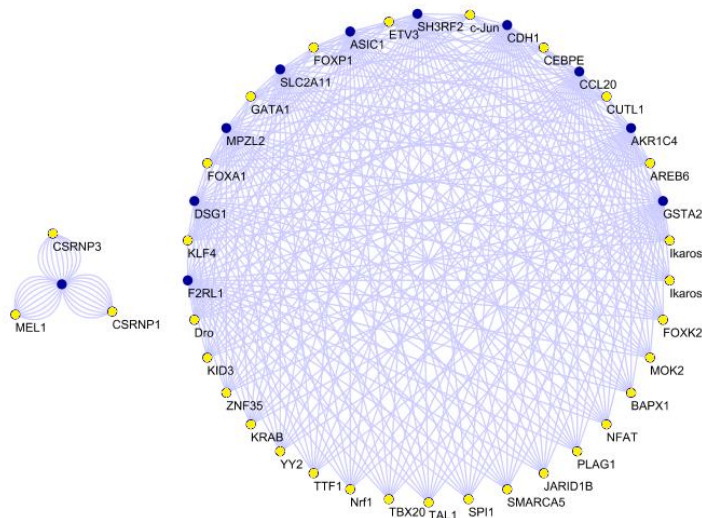
GATA1 FOXPI ETV3 CSRNP3 AXIN1
Ikars2 Ikars1 KLF4 FOXA1 (FOXA2)
MOK2 MEL1 (MDS1, EVI1) FOXK2 (ILF)
JARID2 PLAG1 NFAT NKX3.2 (BAPX1)
SCL (TAL1) SPI1 SMARCA5 (JARID1B)
KRAB YY2 TTF1 TCF11 (Nrf1) TBX20
KID3 ZNF35. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتری این ۱۰ ژن در شکل ۱ گزارش شده است. در این شکل، محل اتصال این ۳۱ فاکتور رونویسی شناسایی شده برای هر یک از توالی‌های پروموتری ۱۰ ژن مورد بررسی، ارائه شده است. از آنجا که فاکتورهای رونویسی در قالب خانواده‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (فاکتورهای رونویسی با محلی تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند)، ۳۱ فاکتور رونویسی شناسایی شده در این مطالعه در ۲۵ خانواده قرار گرفتند که در شکل ۱ مشخص است. به عنوان مثال فاکتورهای رونویسی *CSRNP3* و *CSRNP1* متعلق به خانواده *V\$TAIP*^۳ هستند. همچنین فاکتور رونویسی *CEBPE* متعلق به خانواده *V\$CEBP*^۴ می‌باشد. در شکل ۱ این خانواده‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده‌اند. در ادامه شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در مقایسه‌ی بافت شکمبه گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات حاصل از معرفی ۳۱ فاکتورهای رونویسی جدید شناسایی شده و ۱۰ ژن هدف‌شان با کمک نرم‌افزار Cytoscape در شکل ۲ ارائه شده است.

³ - TGF-beta induced apoptosis proteins

⁴ - Ccaat/Enhancer Binding Protein



شکل ۱. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن های دخیل در بافت شکمبه گاو (مقایسه بافت شکمبه گاوهای تغذیه شده با علوفه و ذرت) که در تمام ۱۰ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن ها است. هر یک از خانواده های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده اند (توضیحات در متن ارائه شده است).



شکل ۱. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در مقایسه بافت شکمبه ی گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به گاوهای تغذیه شده با دانه غلات.

ب) مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات

معنادار شناسایی شد ($P < 0.05$) که بیشتر آنها مرتبط با انتقال یون، ظرفیت حمل و نقل کاتیون غیر آلی، توسعه اپیدیم، توسعه اکتودرم، چسبندگی بیولوژیکی و چسبندگی سلول بودند. برخی از عبارات بیولوژیکی معنادار و مهم حاصل از این تجزیه و تحلیل در جدول ۲ ارائه شده است.

نتایج نشان داد که ۸۷ ژن معنادار، بیان زیادتری در بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات داشتند ($P < 0.01$). پس از شناسایی ژن‌های با بیان زیاد و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۸۷ ژن با بیان زیاد و معنادار، ۲۸ عبارت بیولوژیکی

جدول ۲. عبارات بیولوژیکی معنادار حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های با بیان زیاد و معنادار

(مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با غلات) حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq.

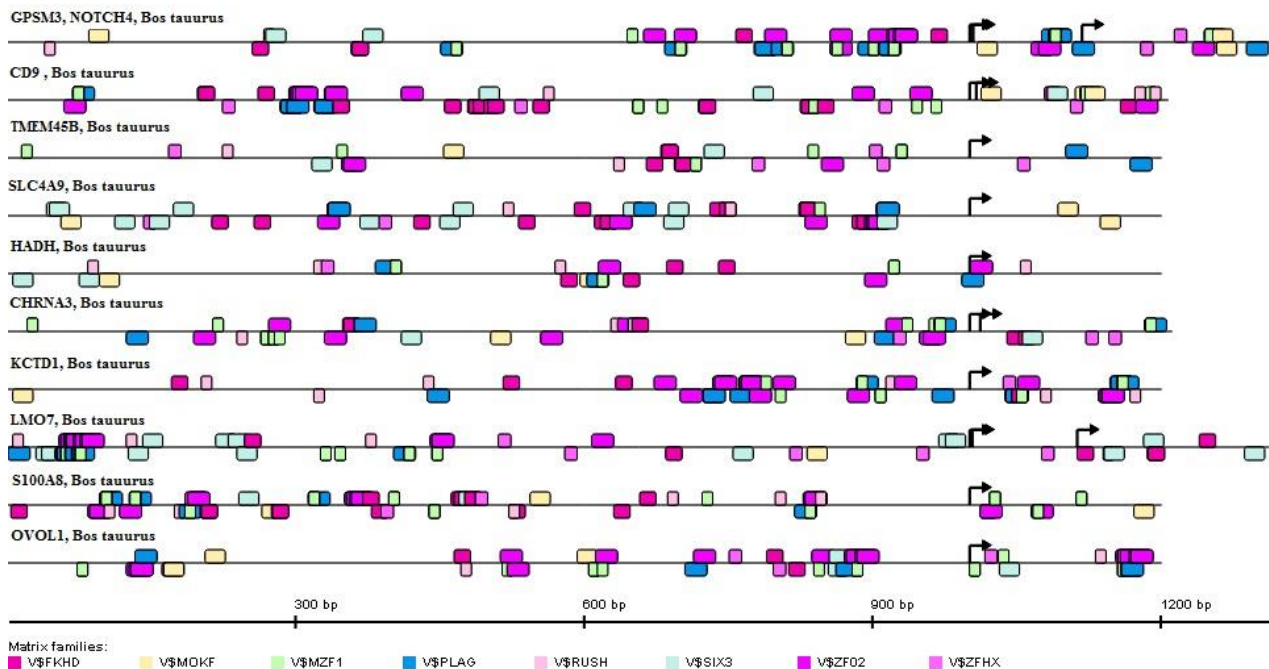
عبارات مراحل بیولوژیکی	P-value مربوط به عبارات بیولوژیکی
انتقال یون	۰/۰۰۲۷۸۵
فرآیندهای نقل و انتقال کاتیونی	۰/۰۰۷۷۹۶
تنظیم تکثیر سلولی	۰/۰۱۴۸۹۱
فرآیندهای تمایز سلولی	۰/۰۲۰۰۰۰
چسبندگی سلول	۰/۰۲۳۰۰۰

رونویسی *FOXPI* متعلق به خانواده *V\$FKHD*^۵ در شکل ۳ این خانواده‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده‌اند. در ادامه شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات حاصل از معرفی ۱۰ فاکتورهای رونویسی جدید شناسایی شده و ۱۰ ژن هدف‌شان به نرم‌افزار Cytoscape در شکل ۴ ارائه شده است.

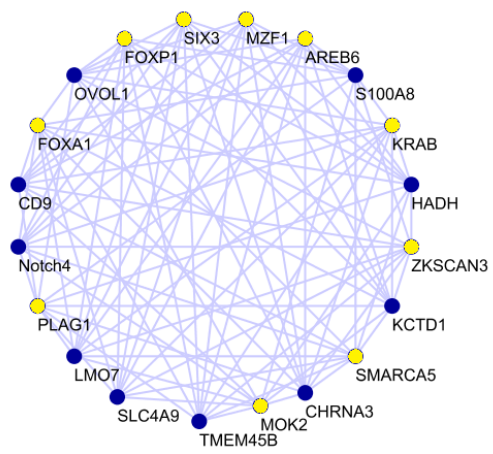
در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۰ ژن برتر ($P < 0.01$) شامل *TMEM45B*، *CD9*، *LMO7*، *KCTD1*، *CHRNA3*، *HADH*، *SLC4A9*، *OVOL1*، *S100A8* و *Notch4* انتخاب شدند. در پایان با تجزیه و تحلیل این ۱۰ ژن، ۱۰ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتری ۱۰ ژن مورد نظر بودند. فاکتور-های رونویسی شناسایی شده عبارتند از *deltaEF1*، *MOK-2*، *FOCA1 (FOXA2)*، *FOXPI*، *(AREB6)* و *ZKSCAN3*، *SMARCA5*، *SIX3*، *PLAG1*، *MZF1* و *KRAB*. از آنجا که فاکتورهای رونویسی در قالب خانواده‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (فاکتورهای رونویسی با محل تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند)، ۱۰ فاکتور رونویسی شناسایی شده در این مطالعه در هشت خانواده قرار گرفتند که در شکل ۳ مشخص است. به عنوان مثال فاکتورهای رونویسی *ZKSCAN3* و *KRAB* متعلق به خانواده *V\$ZF02*^۵ هستند. همچنین فاکتور

⁵ - C2H2 zinc finger transcription factors 2

⁶ - Fork head domain factors



شکل ۲. فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژنهای دخیل در بافت طحال گاو (مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات) که در تمام ۱۰ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن‌ها است. هر یک از خانواده‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده‌اند.



شکل ۴. شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه با گاوهای تغذیه شده با دانه غلات

بحث

از آنجا که ظهور محصولات ارگانیک، مزایا و معایب خود را دارد و به موضوعی بحث برانگیز تبدیل شده است. بنابراین مطالعات متعددی به منظور شناسایی تفاوت واقعی بین غذاهای ارگانیک و معمولی و پیامدهای احتمالی این غذاها در سلامت انسان و حیوان انجام شده است (Holtcamp, 2012; Bjorklund et al., 2014; Bjorklund et al., 2014). بطور قابل توجهی، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی متفاوت ترکیب گوشت گاو را تغییر می‌دهند (Alfaia et al., 2009). شکمبه عضو کلیدی برای هضم علوفه می‌باشد و یک منبع مهم برای تأمین مواد مغذی کافی برای رشد و تولید حیوانات را تشکیل می‌دهد. بنابراین عملکرد شکمبه در تغذیه با علوفه و غلات با هم متفاوت می‌باشد. همچنین حیوانات تغذیه شده با غلات نسبت به حیوانات تغذیه شده با علوفه بیشتر در معرض خطر احتمال ابتلا به ناهنجاری‌های متابولیک و بیماری‌های عفونی هستند (Li et al., 2015). طحال یک اندام ایمنی است که ممکن است تحت تأثیر رژیم‌های غذایی گوناگون، متفاوت عمل کند (Li et al., 2015).

به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم ژن‌های مؤثر در بافت شکمبه و طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به گاوهای تغذیه شده با دانه غلات، تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های با بیان زیاد و مشابه در این مراحل بررسی شد. همانطور که ذکر شد نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های دو مطالعه RNA-seq ذکر شده در دو حالت مختلف مقایسه بافت شکمبه و طحال، نشان داد که ژن‌های بسیاری در این دو اندام بیان بالا نشان دادند. نقش این ژن‌ها در هر یک از دو حالت مختلف در ادامه بحث شده است.

در پژوهش حاضر که به بررسی تنظیمی بیان ژن‌ها پرداخته شد، همانند پژوهش (Li et al., 2015) مسیرهای زیستی شامل اکسیداسیون کاهشی، تنظیم تکثیر سلولی، انتقال یون، فرآیندهای بیوسنتزی و فرآیندهای تمایز سلولی شناسایی و مشترک بودند بنابراین می‌توان گفت فرآیندهای تنظیمی نیز تا حدودی باعث

ایجاد مسیرهای متابولیکی و زیستی مشترک با بیان ژن‌ها خواهند شد.

در حالت مقایسه بافت شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با علوفه در مقابل گاوهای تغذیه شده با دانه غلات، در این حالت ۱۰ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بیشتری داشتند. به عنوان مثال گزارش شده است که ژن *DSGI* در توسعه بافت نقش دارد (Li et al., 2015). نقش ژن *F2RL1* در متابولیسم لیپید/ اسیدچرب در گاوهای شیری گزارش شده است (Ibeagha-Awemu et al., 2016). همچنین ژن *MPZL2*، به عنوان یک نشانگر در بافت چربی قهوه‌ای شناسایی شده است (Lillefosse et al., 2013). ژن *SLC2A11* در انتقال گلوکز و بطور کلی در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد (Varma et al., 2010). ژن *ASIC1* در متابولیسم لیپید (Vasile, Mernea et al. 2013) و ژن *SH3RF2* در متابولیسم کلسترول مؤثر است (Nolan et al., 2012). ژن *CCL20* در متابولیسم لیپید (Duffau et al., 2009). و ژن *AKR1C4* در متابولیسم استروئید ایفای نقش می‌کنند (Consortium, 2013). نقش ژن *GSTA2* در پراکسیداسیون لیپیدها به وضوح بررسی و اثبات شده است (Yang et al., 2001). ژن *CDH1* در گلیکولیز و متابولیسم گلوتامین مؤثر است (Colombo et al., 2010).

با بررسی مطالعات قبلی مشخص شده است که فاکتورهای رونویسی شناسایی شده را می‌توان با توجه به عملکردشان به چند دسته تقسیم‌بندی کرد که عبارتند از: فاکتورهای رونویسی که نقش شناخته شده‌ای در بافت شکمبه گاو در حالت تغذیه با علوفه در مقایسه با حالت تغذیه با دانه غلات برای آنها گزارش نشده است اما به نحوی مرتبط با عملکرد شکمبه می‌باشند.

مطالعات نشان داده فاکتور رونویسی *PLAG1* نقش مهمی در نرخ رشد و وزن بدن گاو بازی می‌کند (Karim et al., 2011). فاکتور *PLAG1* در جذب لیپید (Van Dyck, 2007) و فاکتور *CEBPE* در کنترل مصرف چربی و اسیدهای

CSRNPI ZNF35 AREB6 KRAB YY2 FOXK2 KID3 NKX3.2 MOK-2 AREB6 CSRN3 Drosophila initiator و *SMARCA5 TAL1 SPII motifs* می‌باشند که دارای نقش اثبات شده در بافت شکمبه گاو در حالت تغذیه با علوفه در مقایسه با حالت تغذیه با دانه غلات نیستند و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارش نشده است اما با توجه به نقش دیگر فاکتورهای رونویسی ذکر شده که به طحال مرتبط می‌باشند، به عنوان کاندیدهای جدید معرفی می‌شوند.

در حالت مقایسه بافت طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به گاوهای تغذیه شده با دانه غلات، در این حالت ۱۰ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بیشتری داشتند. به عنوان مثال گزارش شده است که ژن *CD9* با توسعه ساختار بافت لنفی، ایمنی سلولی، متابولیسم لیپید و پاسخ‌های التهابی مرتبط می‌باشد (Rocha-Perugini et al., 2014). ژن *TMEM45B* احتمالاً در تنظیم عملکرد طحال نقش دارد (Li et al., 2015). ژن‌های *CHRNA3* و *SLC9A* در فرآیند انتقال آهن با تأثیر روی بیماری‌زایی باکتری و پاسخ ایمنی میزبان نقش دارند (Baltes et al., 2001). نقش ژن *KCTD1* مرتبط با کمپلکس کانال آهن است (Li, Carrillo et al. 2015). ژن *HADH* در توسعه بافت پیوندی و متابولیسم لیپید (Covaleda et al., 2010)، ژن *SI00A8* در ایمنی داخلی و التهاب (Gebhard et al., 2006; Nacken et al., 2003) و ژن *LMO7* در مراحل بلوغ سلول‌های B مؤثر است (Lindvall, 2005). ژن *Notch4* در فرآیندهای توسعه‌ای طحال (Hoffman et al., 2006) و نقش ژن *OVOLI* در توسعه و تمایز سلول‌های بافت اپیتلیال مهم ارزیابی شده است (Baltes et al., 2001).

با بررسی مطالعات قبلی مشخص شده است که فاکتورهای رونویسی شناسایی شده را می‌توان با توجه به عملکردشان به چند دسته تقسیم‌بندی کرد که عبارتند از: فاکتورهای رونویسی که نقش شناخته شده‌ای در بافت طحال گاو در حالت تغذیه شده با علوفه در مقایسه با حالت تغذیه با دانه برای آنها گزارش نشده

چرب غیراشباع نقش دارد (Xu et al., 2015). *c-jun* سیگنال آبشار انسولین را مهار می‌کند (Xu et al., 2015) و در چاقی و دیابت نقش دارد (Hotamisligil, 2005). نقش فاکتور رونویسی *FOXPI* در هموستازی گلوکز آشکار شده است (Zou et al., 2015). بیان فاکتور رونویسی *NFAT* در تمایز آدیپوسیت‌ها دارای اهمیت بوده و همچنین پژوهشها نشان داده است که *NFAT* در هموستازی گلوکز و انسولین مؤثر است (Yang et al., 2006). نقش *FOXAI* در متابولیسم لیپید و کاهش تجمع لیپید در کبد بسیار حائز اهمیت است (Moya et al., 2012). *CUTLI* در متابولیسم آمینواسیدها اثر دارد (Takahashi et al., 2015). فاکتور *KLF4* تنظیم آدیپوژنیز (Birsoy et al., 2008) و *Ikaros1* جذب کلسترول را تعدیل می‌کند (Loeper et al., 2008). نقش *EVII* در کنترل تمایز اولیه سلول‌های چربی سفید بررسی و اثبات شده است (Ishibashi et al., 2012). نقش *TBX20* در متابولیسم گلوکز مهم ارزیابی شده است (Liang et al., 2010). نقش *Nrf1* در تنظیم ترشح انسولین (Zheng et al., 2015) و متابولیسم لیپید (Hirotsu et al., 2012) گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که *Nrf1* بصورت منفی انتقال‌دهنده سیستئین/گلوتامات و آنزیم‌های متابولیزه کننده لیپیدها را تنظیم می‌کند (Tsuji et al., 2014). نقش فاکتور رونویسی *ETV3* در سلول‌های سرطانی کلون (Carlson et al., 2011)، نقش *GATA1* در بافت چربی (Wu et al., 2011) و نقش *JARID1B* در چرخه سلولی و تکثیر اثبات شده است (Wu et al., 2008).

بنابراین ۱۶ فاکتور رونویسی گزارش شده در این گروه که به نوعی مرتبط با شکمبه می‌باشند، به عنوان کاندیدهای جدید در تنظیم ژن‌های مؤثر در بافت شکمبه‌ی گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به گاوهای تغذیه شده با دانه غلات معرفی می‌شوند.

فاکتورهای رونویسی که دارای نقش اثبات شده در شکمبه نیستند و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارش نشده است. فاکتورهای رونویسی این گروه شامل ۱۴ فاکتور رونویسی جدید شامل

گزارش نشده‌اند، بنابراین فاکتورهای رونویسی ذکر شده کاندید-های مهم و جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش تنظیمی در بافت شکمبه و طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به گاوهای تغذیه شده با غلات بوده و دارای پتانسیل مناسبی برای بررسی بیشتر در سطح آزمایشگاهی می‌باشند.

منابع

- Alfaia C. P., Alves S. P., Martins S. I., Costa A. S., Fontes C. M. Lemos J. P., Bessa R. J. and Prates J. A. 2009. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chemistry*, 114: 939-946.
- Bakhtiarizadeh M. R., Moradi-Shahrbabak M. and Ebrahimie E. 2014. Transcriptional regulatory network analysis of the over-expressed genes in adipose tissue. *Genes & Genomics*, 36: 105-117.
- Baltes N., Tonpitak W., Gerlach, G. F., Hennig-Pauka I., Hoffmann-Moujahid A., Ganter M. and Rothkötter H. J. 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infection and immunity*, 69: 472-478.
- Beauchesne-Rondeau É., Gascon A., Bergeron J. and Jacques H. 2003. Plasma lipids and lipoproteins in hypercholesterolemic men fed a lipid-lowering diet containing lean beef, lean fish, or poultry. *The American journal of clinical nutrition*, 77: 587-593.
- Birsoy K., Chen Z. and Friedman J. 2008. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell metabolism*, 7: 339-347.
- Bjorklund E., Heins, B., DiCostanzo A. and Chester-Jones H. 2014. Fatty acid profiles, meat quality, and sensory attributes of organic versus conventional dairy beef steers. *Journal of dairy science*, 97: 1828-1834.

است اما به نحوی مرتبط با طحال می‌باشند.

فاکتور رونویسی *AREB6* در تنظیم ایمنی و التهاب (Gu et al., 2009) نقش داشته و *FOXPI* یک فاکتور رونویسی ضروری برای تنظیم توسعه سلول‌های لنفوسیت B می‌باشد (Hu et al., 2006). *SMARCA5* و *SWI/SNF* در تمایز ماکروفاژها (Xu et al., 2011) و فاکتور رونویسی *PLAG1* در لوسمی لنفوسیتی مزمن نقش دارند (Pallasch et al., 2009). فاکتور *KRAB* در کنترل سیستم ایمنی تطبیقی انسان و موش (Santoni de Sio, 2014) و فاکتورهای رونویسی *MZF1* به عنوان تنظیم‌گرهای سیستم ایمنی گزارش شده‌اند (Polouliakh et al., 2009). فاکتور *FOXAI* در تمایز و تنظیم سلول‌های T مفید واقع شده است (Delgoffe and Vignali, 2014).

فاکتورهای رونویسی که دارای نقش اثبات شده در طحال نیستند و در مراحل مشابه نقش برای آنها گزارش نشده است: فاکتورهای رونویسی این گروه شامل فاکتورهای رونویسی *SIX3*، *MOK-2* و *ZKSCAN3* می‌باشند که دارای نقش اثبات شده در بافت طحال گاو در حالت تغذیه شده با علوفه در مقایسه با حالت تغذیه با دانه غلات نیستند و در مراحل مشابه نقشی برای آنها گزارش نشده است اما با توجه به نقش دیگر فاکتورهای رونویسی ذکر شده که به طحال مرتبط می‌باشند، به عنوان کاندیدهای جدید معرفی می‌شوند.

نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی در مطالعه حاضر ۳۱ فاکتور رونویسی کاندید جدید احتمالی مؤثر در مراحل تنظیمی عملکرد شکمبه و ۱۰ فاکتور رونویسی در طحال در گاوهای تغذیه شده با علوفه و غلات شناسایی گردید. با بررسی نتایج دو حالت مورد نظر و بررسی نتایج گروه‌های کارکردی و با توجه به اینکه تنظیم‌گرها (فاکتورهای رونویسی) و ژن‌های ذکر شده دارای نقش اثبات شده و یا مرتبط با دو بافت شکمبه و طحال می‌باشند اما تا کنون در بافت شبکه و طحال گاوهای تغذیه شده با علوفه نسبت به غلات

- Bjorklund E., Heins, B. DiCostanzo A. and Chester-Jones H. 2014. Growth, carcass characteristics, and profitability of organic versus conventional dairy beef steers. *Journal of dairy science*, 97: 1817-1827.
- Bronte V. and Pittet, M. J. 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39: 806-818.
- Carlson S. M., Chouinard C. R., Labadorf A., Lam C. J., Schmelzle K., Fraenkel E. and White F. M. 2011. Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Science signaling*, 4: rs11.
- 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: 2933-2942.
- Colombo S. L., Palacios-Callender M., Frakich N., De Leon J., Schmitt C. A., Boorn L., Davis N. and Moncada S. 2010. Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 18868-18873.
- Consortium G. L. G. 2013. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature genetics*, 45: 1274-1283.
- Covalada A. M. S., Savelkoul H. F., Boeren S., Gustafsson J. Å., Rietjens I. M. and Vervoort J. 2010. Genistein Induced ER β -Mediated Downregulation of Immune Signaling Networks as Revealed by Quantitative Proteome Analysis of Genistein Exposed Breast Cancer Cells in vitro. Unravelling the mechanism of differential biological responses induced by food-borne xeno- and phyto-estrogenic compounds: 119.
- De la Fuente J., Diaz M., Alvarez I., Oliver M., i Furnols M. F., Sañudo C., Campo M., Montossi F., Nute G. and Caneque V. 2009. Fatty acid and vitamin E composition of intramuscular fat in cattle reared in different production systems. *Meat Science*, 82: 331-337.
- De Smet, S., Raes K. and Demeyer D. 2004. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Animal Research*, 53: 81-98.
- Delgoffe G. M. and Vignali D. A. 2014. A Fox of a different color: FoxA1 programs a new regulatory T cell subset. *Nature medicine*, 20: 236-237.
- Descalzo A., Insani E., Biolatto A., Sancho A., Garcia P., Pensel N. and Josifovich J. 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70: 35-44.
- Duffaut C., Zakaroff-Girard A., Bourlier V., Decaunes P., Maumus M., Chiotasso P., Sengenès C., Lafontan M., Galitzky J. and Bouloumié A. 2009. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29: 1608-1614.
- Fatima, A. 2014. Analysis of hepatic microRNA expression in postpartum dairy cows in negative energy balance.
- Garcia P., Pensel N., Sancho A., Latimori N., Kloster A., Amigone M. and Casal J. 2008. Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Science*, 79: 500-508.
- Gebhardt C., Németh J., Angel P. and Hess J. 2006. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology*, 72: 1622-1631.
- Gu L., Dean J., Oliveira A. L., Sheehy N., Hall W. W. and Gautier V. W. 2009. Expression profile and differential regulation of the Human I-mfa domain-Containing protein (HIC) gene in immune cells. *Immunology letters*, 123: 179-184.
- Higgs J. D. 2000. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 85-95.

- Hirotsu Y., Hataya N., Katsuoka F. and Yamamoto M. 2012. NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1 β genes. *Molecular and cellular biology*, 32: 2760-2770.
- Hoffman B., Williams K., Tien A., Lu, V., de Algora T. R., Ting J. y. and Helgason C. 2006. Identification of novel genes and transcription factors involved in spleen, thymus and immunological development and function. *Genes and immunity*, 7: 101-112.
- Holtcamp W. 2012. Suspect sweetener: arsenic detected in organic brown rice syrup. *Environmental health perspectives*, 120: a204.
- Hotamisligil G. S. 2005. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes." *Diabetes* 54(suppl 2): S73-S78.
- Hu H., Wang B., Borde M., Nardone J., Maika S., Allred L., Tucker P. W. and Rao A. 2006. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nature immunology*, 7: 819-826.
- Huang D. W., Sherman B. T. and Lempicki R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4: 44-57.
- Ibeagha-Awemu E. M., Li, R., Ammah A. A., Dudemaine P. L., Bissonnette N., Benchaar C. and Zhao X. 2016. Transcriptome adaptation of the bovine mammary gland to diets rich in unsaturated fatty acids shows greater impact of linseed oil over safflower oil on gene expression and metabolic pathways. *BMC genomics*, 17: 1.
- Ishibashi J., Firtina Z., Rajakumari S., Wood K. H., Conroe H. M., Steger D. J. and Seale P. 2012. An Evi1-C/EBP β complex controls peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene expression to initiate white fat cell differentiation." *Molecular and cellular biology*, 32: 2289-2299.
- Karim L., Takeda H., Lin L., Druet T., Arias J. A., Baurain D., Cambisano N., Davis S. R., Farnir F. and Grisart B. 2011. Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nature genetics*, 43: 405-413.
- Le T. D., Liu, L., Zhang, J., Liu B. and Li J. 2015. From miRNA regulation to miRNA-TF co-regulation: computational approaches and challenges. *Briefings in bioinformatics*, 16: 475-496.
- Leheska J., Thompson, L., Howe, J., Hentges, E., Boyce J., Brooks J., Shriver B., Hoover L. and Miller M. 2008. Effects of conventional and grass-feeding systems on the nutrient composition of beef. *Journal of animal science*, 86: 3575-3585.
- Li Y., Carrillo J. A., Ding Y., He Y., Zhao C., Liu J., Liu G. E., Zan L. and Song J. 2015. Transcriptomic profiling of spleen in grass-fed and grain-fed Angus cattle. *PloS one*, 10: e0135670.
- Li Y., Carrillo J. A., Ding Y., He Y., Zhao C., Zan L. and Song J. 2015. Ruminant transcriptomic analysis of grass-fed and grain-fed angus beef cattle. *PloS one*, 10: e0116437.
- Liang J., Gui Y., Wang W., Gao S., Li J. and Song H. 2010. Elevated glucose induces congenital heart defects by altering the expression of *tbx5*, *tbx20*, and *has2* in developing zebrafish embryos. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88: 480-486.
- Lillefosse H. H., Tastesen H. S., Du Z. Y., Ditlev D. B., Thorsen F. A., Madsen L., Kristiansen K. and Liaset B. 2013. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. *The Journal of nutrition*, 143: 1367-1375.
- Lindvall J. M. 2005. Molecular dissection of B-lymphocyte signalling using expression profiling. Institutionen för laboratoriemedicin/Department of Laboratory Medicine.
- Loeper S., Asa S. L. and Ezzat S. 2008. Ikaros modulates cholesterol uptake: a link between tumor suppression and differentiation. *Cancer research*, 68: 3715-3723.
- Moya M., Benet M., Guzmán C., Tolosa L.,

- García-Monzón C., Pareja E., Castell J. V. and Jover R. 2012. Foxa1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PloS one*, 7: e30014.
- Nacken W., Roth J., Sorg C. and Kerkhoff C. 2003. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microscopy research and technique*, 60: 569-580.
- Nolan D. K., Sutton B., Haynes C., Johnson J., Sebek J., Dowdy E., Crosslin D., Crossman D., Sketch M. H. and Granger C. B. 2012. Fine mapping of a linkage peak with integration of lipid traits identifies novel coronary artery disease genes on chromosome 5. *BMC genetics*, 131: 1.
- Pallasch C. P., Patz, M., Park Y. J. Hagist S., Eggle D., Claus R., Debey-Pascher S., Schulz A., Frenzel L. P. and Claasen J. 2009. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114: 3255-3264.
- Polouliakh N., Nock R., Nielsen F. and Kitano H. 2009. G-protein coupled receptor signaling architecture of mammalian immune cells. *PLoS One*, 4: e4189.
- Rocha-Perugini V., González-Granado J. M., Tejera E., López-Martín S., Yañez-Mó M. and Sánchez-Madrid F. 2014. Tetraspanins CD9 and CD151 at the immune synapse support T-cell integrin signaling. *European journal of immunology*, 44: 1967-1975.
- Santoni de Sio F. R. 2014. Kruppel-associated box (KRAB) proteins in the adaptive immune system. *Nucleus*, 5: 138-148.
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B. and Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13: 2498-2504.
- Smith D. R., Wood R., Tseng S. and Smith S. B. 2002. Increased beef consumption increases apolipoprotein AI but not serum cholesterol of mildly hypercholesterolemic men with different levels of habitual beef intake. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 266-275.
- Smith R. A. 1998. Impact of disease on feedlot performance: a review. *Journal of Animal Science*, 76: 272-274.
- Takahashi T., Tanaka T., Tsushima Y., Muragaki K., Uehara K., Takeuchi S., Maeda H., Yamagata Y., Nakayama M. and Yoshimi A. 2015. Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RolA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1. *Molecular microbiology*, 96: 14-27.
- Tsujita T., Peirce V., Baird L., Matsuyama Y., Takaku M., Walsh, S. V., Griffin J. L., Uruno A., Yamamoto M. and Hayes J. D. 2014. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Molecular and cellular biology*, 34: 3800-3816.
- Van Dyck F. 2007. SUMOylation of PLAG1 and PlagL2 and their respective roles in cavernous angiomas and dietary lipid absorption.
- Varma V., Wise C. and Kaput J. 2010. Carbohydrate metabolic pathway genes associated with quantitative trait loci (QTL) for obesity and type 2 diabetes: identification by data mining. *Biotechnol J*, 5: 942-949.
- Vasile I., Mernea M. and Mihailescu D. 2013. Protein-membrane interaction: molecular dynamics simulation of ASIC1 in lipid bilayer. *EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS*, SPRINGER 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA.
- Wanapat M., Kang S. and Phesatcha K. 2013. Enhancing buffalo production efficiency through rumen manipulation and nutrition. *Buffalo Bull*, 32: 258-275.
- Wu D., Molofsky A. B., Liang H. E., Ricardo-Gonzalez R. R., Jouihan H. A., Bando J. K., Chawla A. and Locksley R. M. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, 332: 243-247.

- Wu J. Q., Dwyer D. E. Dyer W. B., Yang Y. H., Wang B. and Saksena N. K. 2008. Transcriptional profiles in CD8+ T cells from HIV+ progressors on HAART are characterized by coordinated up-regulation of oxidative phosphorylation enzymes and interferon responses. *Virology*, 380: 124-135.
- Xu X. Y., Hu, J. P., Wu, M. M., Wang L. S. and Fang N. Y. 2015. CCAAT/enhancer-binding protein CEBP-2 controls fat consumption and fatty acid desaturation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 468: 312-318.
- Xu Y. Z., Thuraisingam T., Marino R. and Radzioch D. 2011. Recruitment of SWI/SNF complex is required for transcriptional activation of the SLC11A1 gene during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 12839-12849.
- Yang T. T., Suk H. Y., Yang X., Olabisi O., Raymond Y., Durand J., Jelicks L. A., Kim J. Y., Scherer P. E. and Wang Y. 2006. Role of transcription factor NFAT in glucose and insulin homeostasis. *Molecular and cellular biology*, 26: 7372-7387.
- Yang Y., Cheng J.-Z. Singhal S. S., Saini M., Pandya U., Awasthi S. and Awasthi Y. C. 2001. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation overexpression of HGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 19220-19230.
- Zheng H., Fu J., Xue P., Zhao R., Dong J., Liu D., Yamamoto M., Tong Q., Teng W. and Qu W. 2015. CNC-bZIP protein Nrf1-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion." *Antioxidants & redox signaling*, 22: 819-831.
- Zou Y., Gong N., Cui Y., Wang X., Cui A., Chen Q., Jiao T., Dong X., Yang H. and Zhang S. 2015. Forkhead box P1 (FOXP1) transcription factor regulates hepatic glucose homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 290: 30607-30615.