نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد پنجم، شماره چهارم، ۱۳۹۶
http://ejrr.gau.ac.ir

شناسایی ریز RNAها، ژن‌های هدف و مسیرهای سیگنالدهی مرتبط با تولید شیر با استفاده از miRNA-seq

همایون فرهنگ‌فر[۱] و *الهام بهدانی[۲]

[۱]استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند،

[۲]فارغ التحصیل دکتری، گروه ژنتیک و اصلاح‌نژاد، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین- خوزستان

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید[۲] توالی‌های کوتاهی (با میانگین طول ۲۲ نوکلئوتید) هستند که با اثر بر تنظیم بیان ژن‌ها فرآیندهای بیولوژیکی بسیاری را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تولید شیر فرآیند فیزیولوژیکی می‌باشد که تحت تأثیر تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها، ریز ریبونوکلئیک‌اسید ها، مسیرهای ژنی و مسیرهای سیگنال‌دهی قرار می‌گیرد. در این مطالعه با بررسی مولکول‌های محافظت شده ریز ریبونوکلئیک‌اسید در بین گونه‌های موش، گاو و بز به شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها، ژن‌های هدف آن‌ها و مسیرهای ژنی مرتبط با تولید شیر پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه جهت بررسی مکانسیم مولکولی اثر ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها بر تولید شیر، ابتدا داده‌های مورد نظر با شماره دسترسی GSM1295115 برای گونه موش، GSM1295118 برای گونه گاو و GSM969927 برای گونه بز از پایگاه داده GEO دانلود شدند. شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها با استفاده از نرم‌افزار mirdeep2 انجام شد. در این مطالعه از پایگاه داده mirwalk برای شناسایی ژن‌های هدف ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی که دربافت پستان هر سه گونه بیان می‌شوند؛ استفاده گردید. پایگاه اطلاعاتی mirwalk قادر به تخمین ژن‌های هدف بر اساس الگوریتم‌های ده پایگاه اطلاعاتی دیگر می‌باشد. ترسیم ارتباطات ژنی شبکه برهم‌کنش ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها و ژن‌های هدفشان توسط نرم‌افزار cytoscape انجام شد. جهت بررسی مسیرهای ژنی و سیگنالدهی مرتبط با ژن‌های هدف از پایگاه اطلاعاتی DAVID استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این مطالعه ژن‌های miR-93-5p، miR-27b-3p، miR-27a-3p و miR-200c-3p از مهم‌ترین ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها و ژن‌های Pten، Rlim، Pdik1l و Setd5 از مه‌مترین ژن‌های هدف در فرآیند تولید شیر و مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات شیر بودند. از مهمترین نتایج این مطالعه معرفی Setd5 به‌عنوان یک ژن جدید مرتبط با فرآیند تولید شیر می‌باشد. آنالیز مسیرهای ژنی نشان داد که مسیر چسبندگی کانونی، مسیر سیگنال‌دهی MAPK، مسیر سیگنال‌دهی mTOR، مسیر سیگنال‌دهی PI3K-Akt و مسیر سیگنال‌دهی نروتروفین از مهمترین مسیرهای ژنی می‌باشند که توسط ژن‌های هدف فعال شده و نقش مهمی در بیوسنتز تولید شیر و توسعه بافت پستانی دارند. این مسیرهای ژنی می‌توانند با اثرگذاری بر تکثیر سلول‌های

*نویسنده مسئول: PhD.behdani@ramin.ac.ir

2 - RNA

آلوئول، افزایش انشعابات، توسعه بافت پستانی، متابولیسم اسیدهای آمینه، اثر بر سیستم اندوکرینی، مسیرهای سیگنال‌دهی پرولاکتین و سنتز ترکیبات شیر مانند چربی، پروتئین و لاکتوز، فیزیولوژی و بیولوژی تولید شیر را تحت تأثیر قرار دهند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش حیاتی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای مهم در شبکه مورد بررسی و ژن‌های هدف این مولکول‌ها و همچنین مسیرهای ژنی مورد مطالعه، می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی به‌عنوان مهمترین تنظیم‌کننده‌های مربوط به فرآیند تولید شیر از آنها بهره برد. از این اطلاعات می‌توان جهت معرفی و کاربرد ژن‌های کاندید و کاربرد آنها در روش انتخاب به کمک ژن و یا انتخاب ژنومی استفاده کرد. با توجه به اینکه تولید شیر با توسعه و تکامل بافت پستانی همراه می‌باشد، مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدفی که در این مطالعه به آن پرداخته شده است، می‌توانند کاندید مناسبی در کلیه فرآیندهای تکامل و تمایز نیز مطرح گردند.

واژه‌های کلیدی: مقایسه بین گونه‌ای، داده‌های توالی‌یابی ریز ریبونوکلئیک‌اسید، تولید شیر

مقدمه

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاوداری با ظرفیت ۲۰٤۸٥٦۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (۱۹). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هرنفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱٦۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (۱۹). به علاوه، حدود ۳۰ میلیون راس بز در سراسر جهان وجود دارد که ٤/٥ تا ٥ میلیون راس از آن‌ها (حدود ۲۰ درصد بزهای جهان) در ایران پرورش داده می‌شوند (۳، ۲۵ و ۳۳). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه‌ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی عواملی که روی تولید و ترکیب شیر نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می‌یابد (۲۰).

بیان ژن در یوکاریوت‌ها فرآیندی بسیار پیچیده می‌باشد زیرا تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله تغییرات کروماتین، اثرات اپی‌ژنتیک و ریبونوکلئیک اسیدهای مداخله‌گر قرار می‌گیرد. ریبونوکلئیک اسیدهای مداخله‌گر در سه گروه miRNA، siRNA و piRNA تقسیم‌بندی می‌شوند. این ریبونوکلئیک اسید با اینکه توالی کوتاهی دارند ولی به‌صورت اختصاصی بر عملکرد و بیان ژن‌ها تأثیرگذارند. ریز ریبونوکلئیک‌اسید مولکول‌های منشأ گرفته از ژنوم می‌باشد که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند. این مولکول-ها که تقریباً از ۲۲ نوکلئوتید تشکیل می‌شوند، بر بیان ژن در مراحل بعد از رونویسی با تخریب mRNA و یا مسدود کردن ترجمه آن تأثیرگذار است (٤۰). برای انجام این عمل بازدارندگی، جفت شدن ناقص با mRNA هم می‌تواند کارآمد باشد. حدود ٦۰ درصد ژن‌هایی که پروتئین‌ها را کد می‌کنند، جزء ژن‌های هدف مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید محسوب می‌گردند (۱۰). این مولکول‌ها با تأثیر بر بیان ژن‌ها به طور فعال فرآیندهای مختلف سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. از جمله این فرآیندها می‌توان به تکثیر، تمایز، رشد، توسعه سلولی، پاسخ به عفونت‌های ویروسی و استرس، پاسخ ایمنی در موجودات مختلف اشاره کرد (۳۷).

بررسی ریز ریبونوکلئیک‌اسید در بافت پستان، از جنبه‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعاتی میزان بیان ریز ریبونوکلئیک‌اسید در شیر و

آغوز مورد مطالعه قرار گرفت و گزارش شد که میزان بیان این مولکول به‌صورت پویا و دینامیکی تغییر می‌کند. همچنین تفاوت بین پروفایل بیان ریز ریبونوکلئیک‌اسید در دو زمان پیک و اواخر دوره شیردهی می‌تواند دلیلی بر تفاوت ترکیب شیر در این دو زمان باشد (۲۲). بررسی بیان ریز ریبونوکلئیک‌اسید در هنگام آلودگی با سویه‌های عامل ورم پستان نیز مورد مطالعه واقع شده است (۲٦). نقش ریز ریبونوکلئیک‌اسید در توسعه بافت پستانی و ایجاد سرطان در این بافت نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۳٤). برهمکنش بین بافت اپیتلیلا و استروما در بافت پستانی موش مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد دو مولکول miR-212/132 در این برهمکنش اثر کنترلی دارند (۳٦). مطالعه بیان بیش از حد برخی مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید مانند miR-15a و miR-101a نشان داد که این امر اثر مهاری بر تمایز سلول‌های اپیتلیال و بافت غدد پستانی دارد (۳۵). مطالعات انجام شده ارتباط مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید با مباحث سلامت و ایمنی سلول‌های پستانی را مورد بحث قرار داده‌اند در برخی دیگر به‌صورت موردی اثر یک ریز ریبونوکلئیک‌اسید خاص را در فرآیند توسعه بافت پستانی مورد توجه قرار داده‌اند. با این وجود مطالعات اندکی به ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای محافظت شده بین گونه‌های مختلف و اثر این مولکول‌های محافظت شده بر تمایز و توسعه بافت پستانی پرداخته‌اند و اثر ریز ریبونوکلئیک‌اسید را بر تولید شیر به‌طور جامع‌تری به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است.

مولکول‌هایی که در بین گونه‌ها به‌صورت محافظت شده باقی مانده‌اند و فرآیند گونه‌زایی در ساختار و یا توالی آنها تأثیر نداشته است؛ در شناسایی و بررسی یک فرآیند سلولی یا مسیر بیوشیمیایی بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند (۳۹). در بررسی‌های بیان ژنی، دقیق‌ترین کاوش‌های مولکولی را می‌توان بر اساس داده‌های حاصل از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید بدست آورد زیرا این نوع داده‌ها اطلاعات دیجیتالی و بسیار دقیقی را از بیان ژن‌ها در اختیار محقق قرار می‌دهد.

در این مطالعه با تکیه بر این مطلب که مولکول‌های حفاظت شده بین گونه‌ها دارای عملکرد حیاتی و اساسی در بافت و یا سلول مورد بررسی هستند؛ به شناسایی انواع ریز ریبونوکلئیک‌اسید مشترک بین سه گونه موش، گاو و بز در بافت پستان پرداخته شده است. داده‌های توالی‌یابی، مربوط به بافت سالم و در حال تولید شیر می‌باشد. بررسی داده‌ها با برازش شبکه بین ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای مشترک بین این سه نژاد و ژن‌های هدف ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها می‌باشد. به کمک مطالعه این شبکه، ژن‌ها و ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای مؤثر در بیوسنتز ترکیبات شیر، فعالیت طبیعی سلول‌های غدد پستانی و چگونگی تنظیم این فرآیندها معرفی بررسی گردیدند.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد مطالعه: در این مطالعه به‌منظور شناسایی و بررسی چگونگی اثر ریز ریبونوکلئیک‌اسید بر فعالیت تولید شیر در سلول‌های غدد پستانی از داده‌های توالی‌یابی شده ریز ریبونوکلئیک‌اسید مربوط به این بافت در سه گونه موش، گاو و بز استفاده شد. شماره دسترسی GSM1295115 مربوط به بافت پستانی موش، GSM1295118 متعلق به بافت پستانی گاو و GSM969927 مربوط به بافت پستانی در بز می‌باشد. این داده‌ها حاوی به‌ترتیب ۳۵، ۳۵ و ۳۰ میلیون خوانش حاصل از دستگاه توالی‌یابی ایلومینا بودند.نمونه‌برداری از هر سه بافت در شرایط طبیعی تولید شیر انجام گرفته شده بود. با توجه به اینکه این داده‌ها مربوط به سه گونه می‌باشد، بنابراین مواردی از ریز

ریبونوکلئیک‌اسید که در هر سه گونه وجود داشته باشند، می‌توان عملکرد اساسی‌تری را برای آنها در فعالیت غدد پستانی در فرآیند تولید شیر و تنظیم این فرآیند قائل شد.

شناسایی ژن‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید: در ابتدا و قبل از شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسید کیفیت داده‌ها با استفاده از FastQC بررسی شد (۹). trimmomatic جهت ترمیم و حذف آداپتورها بکار گرفته شد (٦). برای شناسایی ژن‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید و تعیین سطح بیان آن‌ها از نرم‌افزار miRDeep2 استفاده شد. این نرم‌افزار جهت شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسید از داده-های حاصل از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید طراحی شده است که قادر است این شناسایی را در تمامی موجودات مهره‌داران و بی‌مهرگان با دقت ۹۸/٦ تا ۹۹ درصد و با حساسیت ۷۱ تا ۹۰ درصد انجام می‌دهد. این نرم‌افزار امکان شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای جدید را نیز دارا می‌باشد (۸). برای آنالیز داده‌ها به کمک این نرم‌افزار از ژنوم مرجع برای موش (GRCm38.71 از بانک اطلاعاتی ensemble)، گاو (UMD3.1 از بانک اطلاعاتی ensemble)، و بز (CHIR_1.0 از NCBI) استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از فایل داده توالی‌یابی ریز ریبونوکلئیک‌اسید، فایل ژنوم مرجع و فایل annotation ژنوم به شناسایی ژن‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید و تعیین سطح بیان آن‌ها می‌پردازد.

تعیین ژن‌های هدف و مجسم‌سازی شبکه: تعیین ژن‌های هدف به کمک پایگاه داده (zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/ mirwalk) انجام گردید. این پایگاه داده قادر به شناسایی ژن‌های هدف از طریق پیش‌بینی و مشاهدات آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین این پایگاه داده پیش‌بینی ژن‌های هدف را می‌تواند با استفاده از الگوریتم‌های موجود در ده پایگاه اطلاعاتی دیگر (miRanda ،Micrit4، miRNAMap ،miRMap ،miRDB ،mirbridge، Pictar2، PITA، RNA22 و Targetscan) انجام دهد. در این مرحله miRNAهایی مورد توجه قرار گرفت که ژن‌های هدف آنها هم از طریق mirwalk تأیید شد و هم از طریق هر ده پایگاه داده‌ای که توسط mirwalk قابل بررسی بود، مورد تأیید قرار گرفت. از این داده‌ها برای بررسی شبکه ژنی آنها به منظور شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی که ژن‌ها را بیشتر از سایرین تحت تأثیر قرار می‌دهند و ژن‌های هدفی که بیشتر از سایر ژن‌ها تحت تأثیر ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها قرار می‌گیرند، استفاده شد.

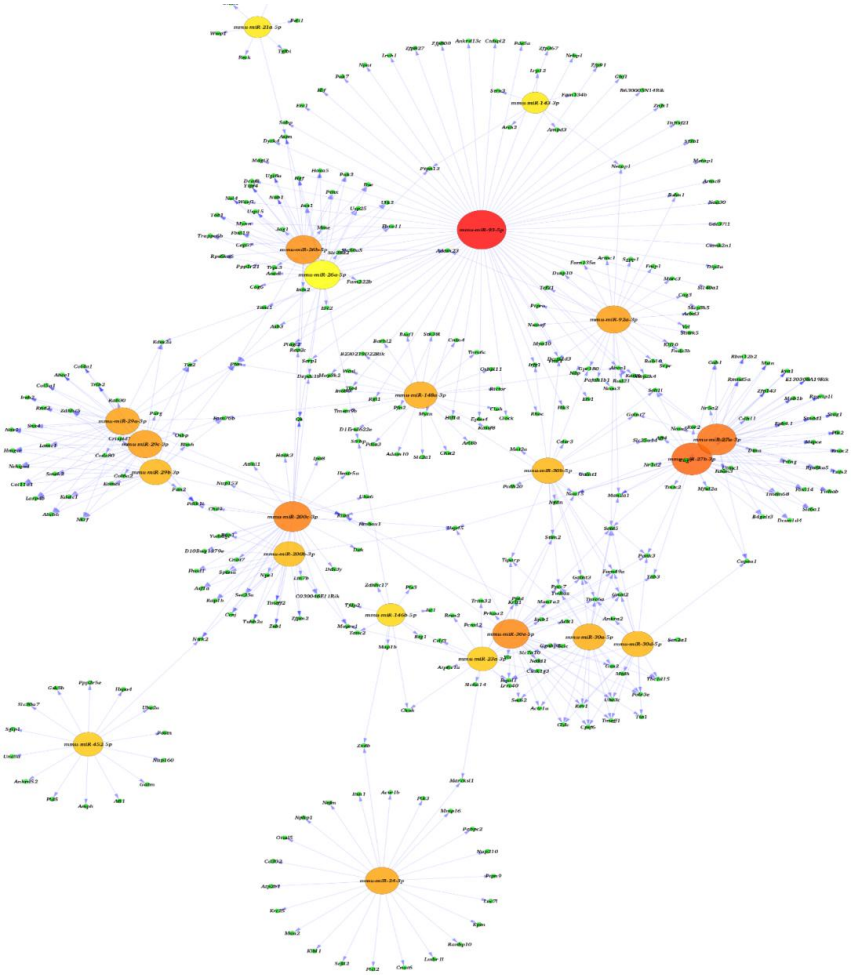
بررسی مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با ژن‌های هدف: از پایگاه اطلاعاتی DAVID برای شناسایی مسیرهای ژنی مرتبط با ژن‌های هدف موجود در شبکه برهمکنش ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها و ژن‌های هدفشان استفاده شد. برای انجام این مرحله ژن‌های هدف موجود در شبکه وارد پایگاه اطلاعاتی DAVID گردید و به کمک این پایگاه اطلاعاتی مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی که ژن‌های هدف در آن‌ها نقش دارند؛ بررسی گردید. با استفاده از بررسی مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی می-توان به این سؤال پاسخ داد که این شبکه برهمکنش مورد بررسی چه مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد و در کنترل آنها مؤثر باشد.

نتایج

این مطالعه در خصوص شناسایی ریز ریبونوکلئیک-اسیدهای مؤثر در مسیرهای بیوسنتز ترکیبات شیر و فعالیت طبیعی سلول‌های غدد پستانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید ریز ریبونوکلئیک‌اسید انجام شد. داده‌ها پس از بررسی کیفیت و حذف آداپتور، جهت شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها با

نرم‌افزار miRDeep2 مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از میان تمام ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای شناسایی شده توسط نرم‌افزار miRDeep2 در سه گونه موش،گاو و بز تعداد ۱۸٤ ژن در بین سه گونه مشترک بود. بنابراین، با توجه به اینکه این ژن‌ها در طول مسیر تکامل و گونه‌زایی تغییر نکرده‌اند، نقش مهمتری را می‌توان برای آنها در بافت مربوطه در خصوص فرآیندهای فیزیولوژیکی آن بافت در نظر گرفت. ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها مشترک بین سه گونه وارد مرحله بعد گردیدند و ژن‌های هدفشان توسط پایگاه اطلاعاتی mirwalk شناسایی شد. این پایگاه اطلاعاتی، نتیجه کاوش ژن‌های هدف ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها در ده پایگاه اطلاعاتی دیگر را به طور جداگانه در اختیار کاربر قرار می‌دهد. از این میان تنها به ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی توجه شد که نه تنها ژن‌های هدفشان توسط پایگاه داده mirwalk تأیید شده بود، بلکه هر ده پایگاه اطلاعاتی دیگر که مورد استفاده mirwalk قرار دارند این ژن‌های هدف را تأیید کردند. بنابراین از بین ۱۸٤ ریز ریبونوکلئیک‌اسید که برای تعیین ژن‌های هدف انتخاب شده بودند، در ۲۵ مورد ژن‌های هدف آنها هم از طریق mirwalk تأیید شد و هم از طریق هر ده پایگاه داده‌ای که توسط mirwalk قابل بررسی بود، مورد تأیید قرار گرفت. به‌طور کلی برای این ۲۵ ریز ریبونوکلئیک‌اسید تعداد ۲۳۸ ژن هدف شناسایی شد. از این داده‌ها به منظور بررسی شبکه ژنی آنها به منظور شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی که ژن‌ها را بیشتر از سایرین تحت تأثیر قرار می‌دهند و ژن‌های هدفی که بیشتر از سایر ژن‌ها تحت تأثیر ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها قرار می‌گیرند، استفاده شد.

این مطالعه نشان داد که مطابق با شکل ۱ تعداد چهار ریز ریبونوکلئیک‌اسید در شبکه برهمکنش ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدف بر اساس تعداد ژن هدف مهمتر از بقیه ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها هستند و تعداد بیشتری از ژن‌های مطرح در شبکه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها شامل miR-93-5p، miR-27b-3p، miR-27a-3p و miR-200c-3p می‌باشند. تعداد ژن‌های هدف هر یک از ۲۵ مولکول ریز ریبونوکلئیک‌اسید که توسط mirwalk و هر ده پایگاه اطلاعاتی مورد استفاده در mirwalk در جدول ۱ آمده است.



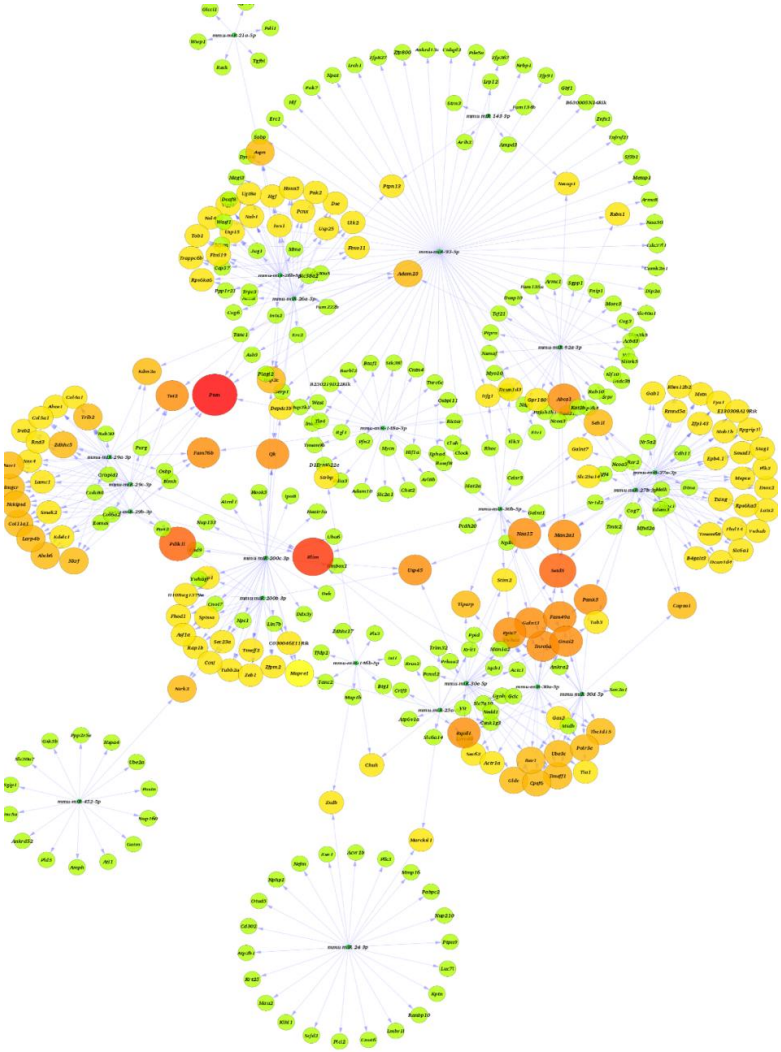
شکل ۱: مجسم‌سازی برهمکنش ریز RNA و ژن‌های هدفشان. تغییر رنگ از قرمز به سبز ( ) بر اهمیت ریزRNA اشـاره دارد. ریز RNA که تعداد ژن‌های هدف بیشتری دارند در این شبکه مهمتر می‌باشد و رنگ قرمز دارد.

Figure 1. Visualization of miRNA and their target genes' interactions. Color change from red to greed( ) introduces the important of miRNA. MiRNA which have more target genes is more important and are red color.

جدول ۱: شناسه ریزRNA و تعداد ژن‌های هدف آنها.

Table 1. miRNA's IDs and number of their target genes

تعداد ژن هدف number of target genes	شناسه miRNA - miRNA's ID	تعداد ژن هدف number of target genes	شناسه miRNA miRNA's ID
25	mmu-miR-29a-3p	61	mmu-miR-93-5p
24	mmu-miR-24-3p	40	mmu-miR-27b-3p
23	mmu-miR-148a-3p	37	mmu-miR-27a-3p
22	mmu-miR-30a-5p	34	mmu-miR-200c-3p
20	mmu-miR-29b-3p	31	mmu-miR-30e-5p
20	mmu-miR-30b-5p	30	mmu-miR-26a-5p
20	mmu-miR-30d-5p	29	mmu-miR-26b-5p
18	mmu-miR-200b-3p	26	mmu-miR-29c-3p
15	mmu-miR-23a-3p	26	mmu-miR-92a-3p
7	mmu-miR-21a-5p	15	mmu-miR-452-5p
4	mmu-miR-379-5p	11	mmu-miR-146b-5p
1	mmu-miR-99a-5p	7	mmu-miR-143-3p



شکل ۲: مجسم‌سازی برهمکنش ریز RNA و ژن‌های هدفشان. تغییر رنگ از قرمز به سبز ( ) بر اهمیت ژن‌های هدف اشاره دارد. ژن‌های هدفی که تحت تأثیر تعداد بیشتری از ریز RNAها هستند رنگ قرمز دارد.

Figure 2. Visualization of miRNA and their target genes' interactions. Color change from red to greed ( ) introduces the important of genes. Target genes which affect by more miRNA are red color.

نتایج بررسی شبکه ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها و ژن‌های هدفشان در بافت پستان در شرایط طبیعی و تولید شیر نشان داد که ۱۲۶ مورد از ژن‌های هدف تحت تأثیر بیش از یک ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها قرار می‌گیرند و بیان ۴۳ مورد از ژن‌های هدف توسط بیش از دو ریز ریبونوکلئیک‌اسید کنترل می‌شود (شکل ۲). مطابق با شکل ۲ ژن‌های Pten، Rlim، Pdik1l و Setd5 از مهمترین ژن‌های هدف مطرح در شبکه برهمکنش ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدفشان می‌باشد که به‌ترتیب توسط ۷، ٦، ۵ و ۵ ریز ریبونوکلئیک‌اسید مورد هدف قرار می‌گیرند. سایر ژن‌ها توسط ٤ مولکول ریزRNA و یا کمتر از آن بیان‌شان تنظیم می‌گردد.

مهمترین مسیرهای ژنی فعال شده توسط ژن‌های هدف که توسط پایگاه اطلاعاتی DAVID شناسایی گردید، در جدول ۲ آورده شده است. از این مسیرهای ژنی می‌توان به عنوان مسیرهای ژنی فعال در بافت پستان در شرایط طبیعی و در حال تولید شیر یاد کرد.

جدول ۲: مسیرهای ژنی مرتبط با ژن‌های هدف شبکه مورد بررسی.

Table 2. Gene pathway related to target genes in the investigated network

مسیر ژنی Gene pathway	مقدار P P-value
چسبندگی کانونی (mmu04510:Focal adhesion)	0.001
مسیر سیگنالدهی PI3K-Akt (mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway)	0.010
مسیر سیگنالدهی MAPK (mmu04010:MAPK signaling pathway)	0.015
مسیر سیگنالدهی mTOR (mmu04150:mTOR signaling pathway)	0.021
مسیر سیگنالدهی نروتروفین (mmu04722:Neurotrophin signaling pathway)	0.022

بحث

در این مطالعه با هدف شناسایی ریز ریبونوکلئیک-اسیدهای محافظت شده و مؤثر در فرآیند تولید شیر و مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات شیر به بررسی پروفایل بیان مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید در سه گونه موش، گاو و بز پرداخته شد. این داده‌ها مربوط به بافت پستانی در شرایط طبیعی و د رحال تولید شیر در این سه گونه بودند. بعد از شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسید ژن‌های هدفشان در مورد ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی که بین هر سه گونه مشترک بودند؛ مورد بررسی قرار گرفت. مهمترین ریز شناسایی شده در این مطالعه miR-93-5p بود. اهمیت مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید در این مطالعه به تعداد ژن‌های هدفشان مربوط است. به عبارت دیگر ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهایی که تعداد بیشتری از ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند و فعالیت آنها را تحت کنترل دارند، بر تولید شیر به‌طور قابل توجه‌تری می‌توانند مؤثر باشند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ جهت شناسایی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای بافت پستانی در پاندا انجام شده بود مشخص شد که miR-93-5p جزء ۱۰ مولکول ریز ریبونوکلئیک‌اسید می‌باشد که بیان بالایی در اواخر آبستنی و اوایل شیردهی دارد (۳۸). miR-27b-3p دومین ریز ریبونوکلئیک‌اسید مهم در شبکه مورد بررسی بود. گزارش شده است که میزان این ریز ریبونوکلئیک‌اسید در طول دوران شیردهی در موش تغییر می‌کند بطوری که غلظت آن در آغوز بیشتر از سایر زمان‌ها می‌باشد (١٤). علاوه براین نقش این ریز ریبونوکلئیک‌اسید در شناسایی و معرفی آنتی‌ژن‌ها در مطالعات متعددی مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (۲۷). مطابق با نتایج این مطالعه miR-27a-3p سومین ریز ریبونوکلئیک‌اسید مهم در شبکه برهمکنش ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدف می‌باشد. این ریز ریبونوکلئیک‌اسید بر بیان ۳۷ ژن هدف مؤثر است. نقش miR-27a-3p در مسیر بیولوژیکی تولید و ترشح چربی در بافت پستانی بز تأیید شده است (۲۳). مطالعات بیان کردند این ریز ریبونوکلئیک-اسید در سنتز ملانین در موش نیز نقش کلیدی دارد و باعث کاهش تولید ملانین در ملاتوسیت‌ها می‌گردد (٤۲). در شبکه مورد بررسی miR-200c-3p دارای ۳٤ ژن هدف بود و چهارمین مولکول ریز ریبونوکلئیک‌اسید از نظر اهمیت بیولوژیکی در این شبکه برهمکنش مشخص شد. مطالعات نشان داده‌اند این ریز ریبونوکلئیک‌اسید به همراه چند ریز ریبونوکلئیک‌اسید دیگر بر اندوسیتوز، اگزوسیتوز و عملکرد اپیتلیال به‌طور مستقیم تأثیرگذار است و این فرآیندها را کنترل می‌کند (۵). در مطالعات دیگر این ریز ریبونوکلئیک-

اسید به‌عنوان یکی از مولکول‌های موجود در شیر معرفی شد که می‌تواند بر سیستم ایمنی مؤثر باشد و بیان ژن‌های و پروتئین‌های مسئول پاسخ ایمنی را کنترل کند. در رابطه با چگونگی تأثیر این ریز ریبونوکلئیک‌اسید بر سیستم ایمنی گزارش شده است که این مولکول تمایز سلول‌های نوع T و CD4 را کنترل می‌کند (۱۱).

مطابق با نتایج بدست آمده از این مطالعه در شبکه برهمکنش بین مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدفشان چهار ژن وجود داشت که بیانشان توسط بیش از چهار ریز ریبونوکلئیک‌اسید کنترل می‌شد. احتمالاً این ژن‌ها از مهمترین ژن‌های موجود در پایین دست فرآیند تولید شیر می‌باشند زیرا تحت تأثیرتعداد بیشتری از ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای مؤثر در تولید شیر قرار گرفته‌اند. مهمترین این ژن‌ها Pten است که ژن هدف برای ۷ مولکول ریز ریبونوکلئیک‌اسید در شبکه بود. بیان این ژن در تمام بافت‌ها گزارش شده است. این ژن در فرآیندهای مختلف سلولی اثر گذار است. بیان بیش از حد این ژن در موش نشان داد که عملکرد فیزیولوژیکی این ژن در فرآیندهایی مانند متابولیسم انرژی، چربی و بهبود حساسیت به انسولین می‌باشد (۲۹). این ژن نقش مهمی در اپیتلیوم غدد پستانی با اثرگذاری بر مسیرهای سیگنال‌دهی دارد. این ژن با اثر بر مسیر سیگنال‌دهی AKT باعث شروع شیردهی و ترشح اتوکرین پرولاکتین می‌گردد. اثر بر تمایز، تکثیر و زنده مانی سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی، ترشح لاکتوز، بتا-کازیین و تری‌گلیسرید توسط این ژن در مطالعات مختلفی بررسی و تأیید گردیده است (٤١). در مطالعه دیگر با هدف بررسی miR-486 به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های تولید شیر در غدد پستانی گاو گزارش شد که این مولکول با اثر بر ژن Pten باعث توسعه بافت پستانی، تقویت سنتز و ترشح شیر می‌شود (۲۱). دومین ژن هدف مهم در این مطالعه ژن Rlim بود. این ژن در شبکه مورد بررسی تحت کنترل شش ریز ریبونوکلئیک‌اسید قرار داشت. اولین بار نقش این ژن در توسعه جنین جوجه شناسایی شد (۲). مطالعات بسیار اندکی بر نقش این ژن در فرآیندهای مربوط به سنتز شیر در گونه‌های مختلف پرداخته است. نقش این ژن در تمایز سلول‌های آلوئول تولید کننده شیر در موش‌های آبستن و شیرده مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷). این مطالعه بیان کرد که Rlim در فعال‌سازی گروهی از ژن‌ها دخالت دارد که تمایز آلوئول‌ها را باعث می‌شوند. علاوه‌براین باعث کاهش بیان ژن‌هایی می‌گردد که اثر خاموش‌کنندگی بر پرولاکتین و IGF-1 دارند. مطالعه یاد شده و مطالعه حاضر تنها مطالعات انجام شده می‌باشند که به نقش این ژن در فرآیند تولید شیر اشاره دارند. ژن Pdik1l یکی دیگر از ژن‌های مهم شناسایی شده توسط این مطالعه می‌باشد که در فرآیند تولید شیر بسیار مؤثر می‌باشد. در مورد این ژن نیز مطالعات کمی به چگونگی اثر آن بر تولید شیر و یا بیوسنتز ترکیبات شیر پرداخته‌اند. گزارشی که با هدف شناسایی لوکوس‌های مرتبط با حضور عناصر معدنی در شیر دو نژاد هلشتاین و جرسی انجام شده بود، بیان کرد این ژن می‌تواند به‌عنوان مارکری در رابطه با تعیین غلظت عنصر روی در شیر در کارهای اصلاح نژادی به کار آید (۸). آخرین ژن مهم و مطرح در این مطالعه Setd5 بود. مطابق با نتایج این مطالعه این ژن توسط پنج مولکول ریز ریبونوکلئیک‌اسید مورد هدف قرار می‌گیرد. نقش این ژن در توسعه و تکامل جنین پستانداران مؤثر گزارش شده است و این اثر را با تنظیم استیلاسیون هیستون‌ها طی بیان ژن اعمال می‌کند (۳۰). این ژن در تنظیم فعالیت و مهاجرت لوکوسیت‌ها در پاسخ‌های التهابی نیز مؤثر است (۳۱).

با این وجود مطالعات بسیار اندکی به نقش این ژن در تکامل غدد پستانی و یا تولید شیر پرداخته‌اند.

نتایج آنالیز مسیرهای ژنی مرتبط با ژن‌های هدف در شبکه مورد بررسی نشان داد که مهمترین مسیر ژنی فعال شده، مسیر چسبندگی کانونی بود. سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی مانند تمام سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال لازم است تا برای تکثیر و زنده‌مانی به ماتریس خارج سلولی از طریق انتگرین‌ها متصل گردد. اختلال در این چسبندگی در سلول‌های اپیتلیال باعث نقص در توسعه آلوئول‌ها و تمایز سلول‌های اپیتلیال پستانی می‌گردد. مهمترین مسیرمولکولی برقراری این چسبندگی مسیر چسبندگی کانونی می‌باشد که یک کیناز تنظیم می‌شود و این مسیر در تکامل و توسعه بافت پستانی نقش حائز اهمیتی دارد. همچنین این اتصالات و چسبندگی با برقراری مسیرهای سیگنالدهی بر رفتار و عملکرد سلول مانند تولید شیر بسیار مؤثر است (۱۸). در نتیجه ژن‌های هدف در شبکه مورد بررسی از طریق اثر و فعال سازی این مسیر ژنی بر توسعه بافت پستانی و مورفولوژی سلول‌های تولید کننده شیر اثرگذار هستند. مسیر ژنی دیگری که بر اساس آنالیز مسیر مشخص گردید توسط ژن‌های هدف می‌تواند فعال گردد مسیر سیگنالدهی PI3K-Akt بود. مطالعات نشان داده‌اند این مسیر سیگنال‌دهی برای سنتز ترکیبات شیر مانند چربی، پروتئین و لاکتوز بسیار حیاتی می‌باشد (۱). در مطالعه دیگری بیان شد این مسیر ژنی باعث القای ترشح اتوکرین پرولاکتین شده و بر تولید شیر اثرگذار است (۲۸). یکی از تنظیم کننده‌های این مسیر سیگنالدهی ژن Pten می‌باشد (۱۲) که این ژن مهمترین ژن هدف در شبکه مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد. اثر این مسیر سیگنالدهی در مهاجرت، تنظیم متابولیکی، تکثیر سلول، سیکل سلولی و برخی بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. اثر مسیر سیگنالدهی PI3K-Akt در توسعه بافت پستانی و مسیر سیگنال‌دهی پرولاکتین نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۳۲). مسیر ژنی دیگری که مطابق با نتایج این مطالعه در فرآیند تولید شیر برجسته شده است مسیر سیگنال‌دهی MAPK می‌باشد. کلیدی‌ترین مسیر در فرآیند توسعه غدد پستانی و افزایش تولید شیر را این مسیر سیگنال‌دهی معرفی کرده‌اند که با اثرگذاری بر تکثیر سلول‌های آلوئول و افزایش انشعابات این فرآیندها را کنترل می‌کند (٤). مطالعه یاد شده جزء معدود مطالعاتی بود که به نقش این مسیر سیگنال‌دهی در تولید شیر چرداخته بود. نقش این مسیر سیگنال‌دهی در فرآیندهایی مانند تکثیر، تمایز و مرگ سلولی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۷). مسیر سیگنال‌دهی mTOR، از دیگر مسیرهایی بود نتایج این مطالعه نشان داد ژن‌های هدف در شبکه مورد بررسی از ژن‌های سازنده و فعال کننده این مسیر هستند. متابولیسم اسیدهای آمینه با اثر بر نرخ جریان خون عبوری از غدد پستانی، اثر بر سیستم اندوکرینی و مسیرهای سیگنال‌دهی نقش مهمی در تولید شیر دارد. تعداد زیادی از مطالعات بیان کرده‌اند که القای سنتز پروتئین‌های شیر از طریق مکمل‌های اسیدآمینه‌ای با فعال شدن این مسیر سیگنال‌دهی ارتباط مستقیم دارد. ارتباط اسیدآمینه ها با مسیر سیگنادهی mTOR از طریق مسیر ژنی WISP3 انجام می‌شود و این مجموعه علاوه بر اثر بر سنتز پروتئین‌های شیر بر رشد سلولی نیز مؤثر است (١٦). در مطالعه دیگری بیان شده است این مسیر سیگنال‌دهی بر تمایز و تکثیر سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی در گاو اثر زیادی دارد (۱۵). با توجه به اثر این مسیر ژنی در متابولیسم انرژی، تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیال، ارتباط این مسیر ژنی با برخی بیماری‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (٢٤). مطابق با نتایج این مطالعه مسیر سیگنال‌دهی

نروتروفین نیز بر تولید شیر و مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات شیر می‌تواند تأثیرگذار باشد. نروتروفین گروهی از مولکول‌ها هستند که در حیات و تکثیر سلول‌های عصبی نقش دارند و عملکرد درست سیستم عصبی سمپاتیک و پاراسمپاتیک به آنها بستگی دارد. نقش مسیر سیگنالدهی نروتروفین به عنوان تنظیم کننده تکامل مغز، زنده‌مانی نرون‌ها و برخی حالات پاتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات بسیار اندکی اثر مولکول‌های نروتروفین را در مکانیسم‌های تولید شیر مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه‌ای غلظت این مولکول‌ها و گیرنده‌هایشان در دو نمونه بافت پستانی (در حال تولید شیر و عدم تولید شیر) در گاو را مورد پژوهش قرار دادند (۱۳). این مطالعه نشان داد سنتز نروتروفین‌ها در بافت پستانی نیز انجام می‌شود و در فرآیندهای توسعه این بافت اثرات مهمی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه این مطالعه بر روی داده‌های بیان دیجیتالی مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید بافت پستان در سه گونه از پستانداران انجام گردیده است، نتایج جامعی در رابطه با ریز ریبونوکلئیک‌اسیدهای مؤثر در فرآیند تولید شیر را می‌توان از آن استخراج کرد. بر اساس نتایج مولکول‌های مهم ریز ریبونوکلئیک‌اسید در شبکه، مهمترین ژن‌های هدف و مسیرهای سیگنالدهی به طور عمده در فرآیندهایی مانند رشد، توسعه، مورفولوژی بافت پستانی و همچنین تولید و ترشح چربی و پروتئین شرکت دارند. برخی ریز ریبونوکلئیک‌اسیدها و ژن‌های هدفشان در رابطه با تولید شیر و یا فرآیند بیوسنتز ترکیبات شیر در مطالعات قبلی نیز مورد توجه قرار گرفته بودند ولی برخی دیگر (Setd5) برای اولین بار در این مطالعه به نقش آنها در مجموعه فرآیندهای تولید شیر اشاره شده است. با توجه به اینکه تولید شیر با توسعه و تکامل بافت پستانی همراه است، مولکول‌های ریز ریبونوکلئیک‌اسید و ژن‌های هدفی که در این مطالعه به آن پرداخته شده است؛ می‌توانند کاندید مناسبی در فرآیندهای تکامل و تمایز نیز مطرح گردند.

منابع

1. Anderson, S.M., Rudolph, M.C., McManaman, J.L., and Neville, M.C. 2007. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis. Breast. Cancer. Res. 9: 1-7.
2. Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carrière, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D.W., Glass, C.K., Andersen, B., Belmonte, J.C.I., and Rosenfeld, M.G. 1999. RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone *deacetylase complex*. Nat. Genet. 22: 394-399.
3. Baghizadeh, A., Bahaaddini, M., Mohamadabadi, M., and Askari, N. 2009. Allelic variations in exon 2 of Caprine MHC Class II DRB3 Gene in Raeini Cashmere goat. Am-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 6: 445-454.
4. Bao, Z., Lin, J., Ye, L., Zhang, Q., Chen, J., Yang, Q., and Yu, Q. 2016. Modulation of Mammary Gland Development and Milk Production by Growth Hormone Expression in GH Transgenic Goats. Front. Physiol. 7: 74-79.
5. Bar-Sagi, D., Fernandez, A ,.and Feramisco, J.R. 1987. Regulation of membrane turnover byras proteins. Bioscience. Rep. 7: 427-434.

6. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30: 2114-2120.
7. Booth, A.K. and Gutierrez-Hartmann, A. 2015. Signaling pathways regulating pituitary lactotrope homeostasis and tumorigenesis, in Recent Advances in Prolactin Research. Springer. p. 37-59.
8. Buitenhuis, B., Poulsen, N.A., Larsen, L.B., and Sehested, J. 2015 .Estimation of genetic parameters and detection of quantitative trait loci for minerals in Danish Holstein and Danish Jersey milk. BMC. Genet. 16: 19-25.
9. Fndrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 175-176.
10. Friedman, R.C., Farh ,K.K.H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome. Res. 19: 92-105.
11. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat. Cell. Biol. 10: 593-601.
12. Gu, Y., Li, M., Wang, T., Liang, Y., Zhong, Z., Wang, X., Zhou, Q., Chen, L., Lang, Q., and He, Z. 2012. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. PLoS. One. 7: e43691.
13. Hassiotou, F., Twigger, A.-J., Pundavela, J., Roselli, S., Hartmann, P., Geddes, D., and Hondermarck, H. 2014. Neurotrophin synthesis by mammary cells during lactation (623.19). FASEB. J. 28: 619-623.
14. Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., and Takase, M. 2014. Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. PLoS. One. 9: e88843.
15. Jankiewicz, M., Groner, B., and Desrivières, S. 2006. Mammalian target of rapamycin regulates the growth of mammary epithelial cells through the inhibitor of deoxyribonucleic acid binding Id1 and their functional differentiation through Id2. Mol. Endocrinol. 20: 2369-2381.
16. Jiang, N., Wang, Y., Yu, Z., Hu, L., Liu, C., Gao, X., and Zheng, S. 2015. WISP3 (CCN6) regulates milk protein synthesis and cell growth through mTOR signaling in dairy cow mammary epithelial cells. DNA Cell. Biol. 34: 524-533.
17. Jiao, B., Ma, H., Shokhirev, M.N., Drung, A., Yang, Q., Shin, J., Lu, S., Byron, M., Kalantry, S., and Mercurio, A.M. 2012. Paternal RLIM/Rnf12 is a survival factor for milk-producing alveolar cells. Cell. 149: 630-641.
18. Katz, E .and Streuli, C.H. 2007. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 39: 715-726.
19. Kharrati, K.H., Mohammad, A.M., Ansari, M.S., Esmaili, Z.K.A., Tarang ,A., and Nikbakhti, M. 2011. Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. IJASR. 3: 185-192.
20. Kharrati Koopaei, H., Mohammadabadi, M.R., Ansari Mahyari, S., Esmailizadeh, A.K., Tarang, A. and Nikbakhti, M 2012. Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. Iran. J. Anim. Sci. Res. 3: 185-192. (In Persian).
21. Li, D., Xie, X., Wang, J., Bian, Y., Li, Q., Gao, X., and Wang, C. 2015. MiR-486 regulates lactation and targets the PTEN gene in cow mammary glands. PloS one. 10: e0118284.
22. Li, Z., Liu, H., Jin, X., Lo, L., and Liu, J. 2012. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. BMC Genomics. 3: 12-22.
23. Lin, X.Z., Luo, J., Zhang, L.P., Wang, W., Shi, H.B., and Zhu, J.J. 2013. MiR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. Gene. 521: 15-23.
24. Melnik, B.C., John, S.M., Carrera-Bastos, P., and Cordain, L. 2012. The impact of cow's milk-mediated mTORC1-signaling in the initiation and progression of prostate cancer. Nutr. Metab. 9: 21-32.

25. Moghadaszadeh, M., Mohammadabadi, M.R., and Esmailizadeh, A.K. 2015. Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. G3M. 13: 4062-4067.
26. Naeem, A., Zhong, K., Moisá, S., Drackley, J., Moyes, K., and Loor, J. 2012. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with Streptococcus uberis. J. Dairy. Sci. 95: 6397-6408.
27. O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., and Baltimore, D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nat. Rev. Immunol. 10: 111-122.
28. Oliver, C.H. and Watson, C.J. 2013. Making milk: A new link between STAT5 and Akt1. JAK-STAT. 2: 2154-2168.
29. Ortega-Molina, A. and Serrano, M. 2013. PTEN in cancer, metabolism, and aging. Trends Endocrinol. Metab. 24: 184-189.
30. Osipovich, A.B., Gangula, R., Vianna, P.G., and Magnuson, M.A. 2016. Setd5 is essential for mammalian development and co-transcriptional regulation of histone acetylation. Development. 14: 146-155.
31. Poissonnier, L., Villain ,G., Soncin, F., and Mattot, V. 2014. miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. Cardiovasc. Res. cvu040.
32. Raven, L.A., Cocks, B.G., Goddard, M.E., Pryce, J.E., and Hayes, B.J. .2014. Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. Genet. Select. Evol. 46: 110-117.
33. Shamsalddini, S., Mohammadabadi, M.R., and Esmailizadeh, A.K. 2016. Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. Russ. J. Genet. 52: 405-408.
34. Takahashi, R.U., Miyazaki, H., and Ochiya, T. 2015. The roles of microRNAs in breast cancer. Cancers. 7: 598-616.
35. Tanaka, T., Haneda, S., Imakawa, K., Sakai, S., and Nagaoka, K. 2009. A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. Differentiation. 77: 181-187.
36. Ucar, A., Vafaizadeh, V., Jarry, H., Fiedler, J., Klemmt, P.A., Thum, T., Groner, B., and Chowdhury, K. 2010. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. Nat. Genet. 42: 1101-1108.
37. Urbich, C., Kuehbacher, A., and Dimmeler, S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation and angiogenesis. Cardiovas. Res. 4: 581-588.
38. Wang, C., Long, K., Jin, L., Huang, S., Li, D., Ma, X., Wei, M., Gu, Y., Ma, J., and Zhang, H. 2015. Identification of conserved microRNAs in peripheral blood from giant panda: expression of mammary gland-related microRNAs during late pregnancy and early lactation. Genet. Mol. Res. 14: 14216-14228.
39. Warnefors, M., Liechti, A., Halbert, J., Valloton, D., and Kaessmann, H. 2014. Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease. Genome Biol. 15: 1.
40. Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J.J., O'Donnell, J.D., Wang, J., Wenham, R.M., Coppola, D., Kruk, P.A., and Nicosia, S.V. 2008. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. Cancer Res. 68: 425-433.
41. Zhang, C., Zhao, Y., Wang, Y., Wu, H., Fang, X., and Chen, H. 2014. Deep RNA sequencing reveals that microRNAs play a key role in lactation in rats. J. Nutr. 144: 1142-1149.
42. Zhao, Y., Wang, P., Meng, J., Ji, Y., Xu, D., Chen, T., Fan, R., Yu, X., Yao, J., and Dong, C. 2015. MicroRNA-27a-3p Inhibits Melanogenesis in Mouse Skin Melanocytes by Targeting Wnt3a. Int. J. Mol. Sci. 16: 10921-10933.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 5(4), 2018
http://ejrr.gau.ac.ir

Identification of the major miRNAs, target genes and signaling pathways associated with milk production using miRNA-Seq

H. Farhangfar[1] and *E. Behdani[2]
[1]Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Birjand,
[2]PhD Graduated, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Animal science and Food Industry, Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan,
Received: 09/07/2017; Accepted: 12/20/2017

Abstract

Background and objectives: miRNA molecules are short sequences (with an average length of 22 nucleotides) that affect many biological processes by regulating gene expression. Milk production is a physiological process that influence by a large number of genes, miRNAs and signaling pathways. In this study, identification of miRNAs, their target genes, and signaling pathways were done by investigation of interspecies conserved miRNAs in mouse, cattle and goat.

Materials and methods: In this study, to investigate the molecular mechanism of miRNA's effect on milk production, firstly data were downloaded with accession number GSM1295115 for mouse species, GSM1295118 for cattle species and GSM969927 for goat species from GEO database. miRNAs was identified by mirDeep2. In this study, mirwalk database was used to detect target genes of miRNA which expressed in all three species. The mirwalk database is also able to estimates target genes based on the other ten databases' algorithms. Visualization of miRNA and their target genes' interaction was performed by cytoscape. DAVID database was used to study target genes-related gene and signaling pathways.

Results: According to these results miR-93-5p, miR-27b-3p, miR-27a-3p and miR-200c-3p genes are the most important miRNA and Pten, Rlim, Pdik1l and Setd5 genes are the most important target genes on the process of milk production and pathways of milk components biosynthesis. One of the most important results of this study was detected Setd5 as the novel milk production process-related gene. Gene pathway analysis showed Focal adhesion pathway, MAPK signaling pathway, mTOR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway and Neurotrophin signaling pathway were the most important of gene pathways which activated by target genes and have a vital role in milk production biosynthesis and development of mammary glands. These gene pathways could affect milk production physiologically and biologically by influencing on the development of alveolar cells, increasing branches, developing of mammary tissue, amino acid metabolism, influencing on the endocrine system, prolactin signaling pathway and influencing on the milk compounds synthesis such as fat, protein, and lactose.

Conclusion: According to critical role of the important miRNA in the studied network and target genes of these molecules and also investigated gene pathways, it could be used in breeding programs as the most important regulators in milk production process. This information could be used to introduce and apply candidate genes for the gene assisted selection method or genomic selection. Given that milk production is along with development and differentiation of breast tissue, miRNA molecules and target genes which investigate in this study could be the good candidates in all developmental and differential processes.

Keywords: Interspecies comparison, miRNA-Seq, Milk production

*Corresponding author: PhD.Behdani@ramin.ac.ir