



مقاله علمی - پژوهشی

بازسازی شبکه ژن‌های هم‌بند مرتبط با رشد و تکامل فولیکول‌های الیاف در جنین بز کرکی

ارسلان برازنده^۱، مرتضی مختاری^۱، الهام بهدانی^۲، زهرا رودباری^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰

چکیده

فولیکول مو قسمتی از پوست است که مو را تولید و چرخه رشد مو را کنترل می‌کند. فولیکول مو مرکزی برای رشد الیاف مهم از نظر اقتصادی در صنعت دامپروری است. مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات در سطح بیان ژن‌ها در رشد و نمو فولیکول مو تاثیر دارد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در شناسایی شبکه‌های هم‌بیانی ژن‌ها و سیگنال‌های مولکولی که بر توسعه پوست و رشد فولیکول مو حاکم است، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده ساخت الیاف بز کرکی، هنوز شناسایی نشده است. از این‌رو، پژوهش کنونی برای بررسی مهمترین مولکول‌های کنترل‌کننده رشد و نمو فولیکول‌های الیاف در بز کرکی و رمزگشایی ژن‌های درگیر در رشد و نمو فولیکول‌های الیاف انجام شد. به این منظور، از داده‌های مربوط به توالی یابی رونوشت‌های پوست جنین بزهای کرکی شابی در سه مرحله رشد استفاده شد. آنالیز بیان افتراقی رونوشت‌ها نشان داد که در تمام طول روند رشد فولیکول بیان ۱۴۵ ژن افزایش و بیان ۶۵۰ ژن کاهش داشته است. از بین ژن‌هایی با بیان افتراقی، ژن‌های تنظیمی هم‌بیان بر اساس نتایج واکاوی پارامترهای آماری شبکه و مستندسازی کارکردی شناسایی شدند که شامل: SHH, KLF4, MMP9, MSX1, KRT17, COL2A1, و VEGFA بودند. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش کنونی ژن‌هایی با اثرات عمده شناسایی شدند که تنظیم‌کننده شبکه‌های بیانی ژن‌ها و سیگنال‌های مولکولی مرتبط با ساخت الیاف بز کرکی هستند. این ژن‌ها با توجه به مستندسازی عملکردی می‌توانند نقش قابل توجهی در بهبود اصلاح نژاد بز کرکی ایفا کنند.

کلمات کلیدی: آنالیز رونوشت، الیاف بز کرکی، بیان افتراقی، شبکه تنظیمی بیان

مقدمه

می‌شوند و الیاف کرک از فولیکول‌های ثانویه به وجود می‌آیند (۸ و ۳۲). عوامل متعددی بر نسبت این دو نوع فولیکول و فعالیت آنها نقش دارند. این عوامل به طور مستقیم می‌توانند بر میزان کرک تولیدی و کیفیت آن (طول و قطر الیاف) تأثیر گذارند. از جمله این عوامل می‌توان به سن دام، مدیریت تغذیه‌ای و ژنتیک آن اشاره داشت (۲).

در عرصه ژنتیک، پژوهش‌های مختلفی بر اساس ژنتیک کلاسیک و ژنتیک مولکولی انجام شده و ژن‌های مختلفی در رابطه با کیفیت و کمیته کرک تولیدی گزارش شده است. یکی از ژن‌هایی که بر خصوصیات الیاف تولیدی در بز کرکی به کمک تکنیک PCR-SSCP مؤثر شناسایی شده است، ژن KAP8.1^۳ می‌باشد (۱۷) که به عنوان یک ژن نشانگر احتمالی مرتبط با وزن کرک در بزهای کرکی معرفی شده است. در مطالعه دیگری ژن‌های KAP^۴ به عنوان مهمترین کنترل‌کننده‌های خصوصیات الیاف تولیدی در دام معرفی شده است و از این ژن‌ها به عنوان مهمترین نشانگرهای مولکولی

بز یکی از منابع مهم تامین کننده گوشت، شیر، کرک و مو برای بشر است و بنابراین نقش کلیدی در عرصه اقتصادی، اجتماعی و فرهنگی بخصوص در کشورهای درحال توسعه ایفا می‌کند، زیرا ۹۵ درصد جمعیت بز دنیا در این کشورها پرورش می‌یابند (۲۳ و ۲۷). بزهای کرکی از جمله مهمترین نژادهای بز در دنیا هستند که دارای دو پوشش کرک و مو می‌باشند. در ایران بزهای کرکی عمدتاً بومی مناطق خراسان جنوبی و کرمان هستند و بهترین نوع کشمیر را تولید می‌کنند (۲ و ۴). کرک و کلبه الیاف دامی به وسیله فولیکول‌های موجود در پوست به وجود می‌آیند. به طور کلی در پوست دو نوع فولیکول اولیه و ثانویه وجود دارد که از نظر بافت شناسی با یکدیگر متفاوتند. در بزهای کرکی الیاف مو توسط فولیکول‌های اولیه ساخته

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.
۲- دانش‌آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، خوزستان، ایران.

*- ایمیل نویسنده مسئول: (roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i2.81710

3- Keratin-associated protein 8.1

4- Keratin-associated protein

جنین‌ها و سه تکرار برای هر مرحله در نظر گرفته شده بود. توالی‌یابی با استفاده از ایلومینا HiSeq 2000 در شرکت ژن دنوو در شهر گوانگ جو در کشور چین انجام شده است. روز ۶۰ آبستنی بیانگر مرحله آغازین رشد، روز ۱۲۰ بیانگر مرحله نمو و نمونه‌های جنین متولد شده بیانگر مرحله بلوغ فولیکول‌های اولیه مو بودند (۸).

بررسی کیفیت خوانش‌ها

برای بررسی کیفیت خوانش‌ها از نسخه 11.7 نرم افزار FastQC استفاده شد. به کمک این نرم‌افزار کیفیت بازها و خوانش‌ها، میزان آلودگی به آدپتور و غیره بررسی شد. داده‌های با کیفیت پایین با نسخه 0.39 نرم افزار Trimmomatic (۶) مورد ویرایش قرار گرفتند و مجدد خوانش‌های ویرایش شده برای تعیین کیفیت با نرم افزار FastQC بررسی شدند.

واکاوی تفاوت بیان ژن‌ها

پس از حذف خوانش‌های کم کیفیت و اطمینان از کیفیت خوانش‌ها عمل هم‌ردیفی^۱ بر روی ژنوم مرجع بز (GCA_001704415.1)، دانلود شده از سایت ensemble با استفاده از نرم افزار Hisat2 نسخه 2.1.0 (۱۳) انجام شد. سپس از اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نسخه 10.0 نرم‌افزار (۱) Htseq2، تغییرات بیان ژن‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه (روز ۶۰ آبستنی، روز ۱۲۰ آبستنی و دو ساعت بعد از تولد) با استفاده از نسخه 1.24 بسته Deseq2 موجود در نرم افزار R (۱۸) مشخص شدند. در این مرحله ژن‌ها در دو دسته قرار گرفتند: ۱- ژنهایی که بیان آنها در تمام طول روند رشد و نمو جنین افزایش یافت ۲- ژنهایی که بیان آنها در تمام طول روند رشد و نمو جنین کاهش یافت.

ساخت شبکه ژنی

در این مرحله شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در ژن‌های کاهش بیان یافته و افزایش بیان یافته با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING (نسخه 11.0) به آدرس اینترنتی <https://string-db.org> جستجو شد و شبکه‌های استخراجی با استفاده از نرم افزار Cytoscape نسخه 3.6.0 (۲۵) ترسیم شدند.

هستی شناسی ژنهای تنظیم کننده

پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌هایی با بیشترین نقش تنظیم کننده در شبکه بررسی اطلاعات بیولوژیکی و آنالیز عملکردی ژن‌های مرتبط با رشد و نمو فولیکول با استفاده از پایگاه

احتمالی مرتبط با ظرافت الیاف یاد شده است (۳).

در کنار ژنتیک مولکولی و ژنتیک کلاسیک، داده‌های امیکس به همراه نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ابزار جدیدی را برای شناسایی مولکول‌های تنظیم کننده در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی فراهم آورده است. یک دسته مهم از داده‌های امیکس، داده‌های بیان ژن می‌باشند که با تحلیل این نوع داده‌ها می‌توان مهمترین سازوکارهای مولکولی و مولکول‌های تنظیم کننده در فرآیندهای فیزیولوژیکی را شناسایی کرد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ با بررسی ژن‌های متفاوت بیان شده در فولیکول‌های اولیه و ثانویه گزارش شد که ۶۱۷ ژن در دو نوع فولیکول ذکر شده به صورت متفاوتی بیان می‌شوند. این ژن‌ها به طور مؤثر در متابولیسم سیستین و متیونین، پلیمریزاسیون مولکول RNA و مسیر سیگنالدهی MAPK در فولیکول اولیه نقش دارند. به کمک این مطالعه روند تکامل فولیکول‌های اولیه و تبدیل آنها به فولیکول‌های ثانویه بررسی شد (۲۲) در پژوهش دیگری نیز برای شناسایی سازوکارهای مولکولی مؤثر بر تکامل فولیکول‌های پوست، داده‌های بیان ژن از فولیکول‌های الیاف پوست در سه مرحله تکامل آنژن، کاتاژن و تلوزن بررسی شدند (۹). در مطالعه‌ای دیگر برای شناسایی مهمترین ژن‌های کنترل کننده تولید الیاف در گونه بز کرکی پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی با استفاده از داده‌های بیان ژن بررسی شدند (۳۱).

شبکه‌های ژنی یکی از مهمترین ابزارهای بیوانفورماتیکی در شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات و مسیرهای بیولوژیکی می‌باشند. در این شبکه‌ها به کمک الگوریتم‌های مختلفی روابط بین ژن‌ها بررسی می‌شود و به این ترتیب می‌توان ژن‌هایی که در بالا دست سایر ژن‌ها قرار دارند و بیان آنها را کنترل می‌کنند و یا تحت تأثیر قرار می‌دهند، را جستجو کرد. در این مطالعه با استفاده از شبکه‌های هم‌بیان و بررسی برهمکنش‌های پروتئینی سعی بر شناسایی مهمترین ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد، شده است.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد استفاده

داده‌های مربوط به توالی‌یابی رونوشت‌های پوست جنین بزهای کرکی با کد شناسایی SRP059481 از پایگاه داده NCBI در بخش SRA دانلود شدند. داده‌ها حاصل از آزمایش بر روی بزهای کرکی شانی بود. در این آزمایش تعداد ۹ بز در مرحله یکسان آبستنی انتخاب شده بودند و تعداد سه جنین در روز ۶۰ آبستنی (E60)، تعداد سه جنین در روز ۱۲۰ آبستنی (E120) از طریق سزارین بدست آمده و سه جنین نیز دو ساعت بعد از تولد (NB) کشته شده بودند. برای انجام آنالیزهای RNA-seq نمونه برداری از سمت راست پوست

داده‌ای DAVID (نسخه 6.8) انجام شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه جهت بررسی مهمترین مولکول‌های کنترل کننده رشد و نمو فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از داده‌های بیان ژن در

سه مرحله رشد (روز ۶۰ آبستنی، روز ۱۲۰ آبستنی و دو ساعت بعد از تولد) استفاده شد. بعد از دانلود داده‌ها و ویرایش فایل داده، همردیفی آنها با ژنوم مرجع بز انجام گردید. نتایج حاصل از مراحل ویرایش فایل داده‌ها و همردیف کردن آنها با ژنوم مرجع بز در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خلاصه آنالیز آماری داده‌های حاصل از توالی یابی نسل آینده

Table1- Summary of statistical analysis from high throughput next generation sequencing

شماره دسترسی فایل داده	تعداد خوانش قبل از ویرایش کیفیت خوانش ها	تعداد خوانش بعد از ویرایش کیفیت خوانش ها	درصد خوانش نقشه یابی شده
Accession number	Row read	Clean read	Mapping reads (%)
SRR2102018(E60-1)	10673004	9973683	94.73
SRR2102019(E60-2)	15915915	14855466	93.93
SRR2102020(E60-3)	12364725	11522771	94.53
SRR2102015(E120-1)	10700614	9891507	94.60
SRR2102016(E120-2)	12341735	11454000	93.57
SRR2102017(E120-3)	11613045	10731568	94.87
SRR2102021(NB-1)	10705689	9953187	93.59
SRR2102022(NB-2)	10527961	9832093	93.77
SRR2102023(NB-3)	15768217	14642573	93.79

E60- روز ۶۰ آبستنی با سه تکرار ، E120- روز ۱۲۰ آبستنی با سه تکرار و NB - دو ساعت بعد از تولد با سه تکرار

بیان سایر ژن‌ها داشتند. این ژن‌ها در پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های گزارش شده الگوی بیان مشابهی داشتند. بنابراین می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی در القا فولیکول مو، پشم و پر به صورت محافظت شده باشند که مختصراً مورد بحث قرار گرفته‌اند.

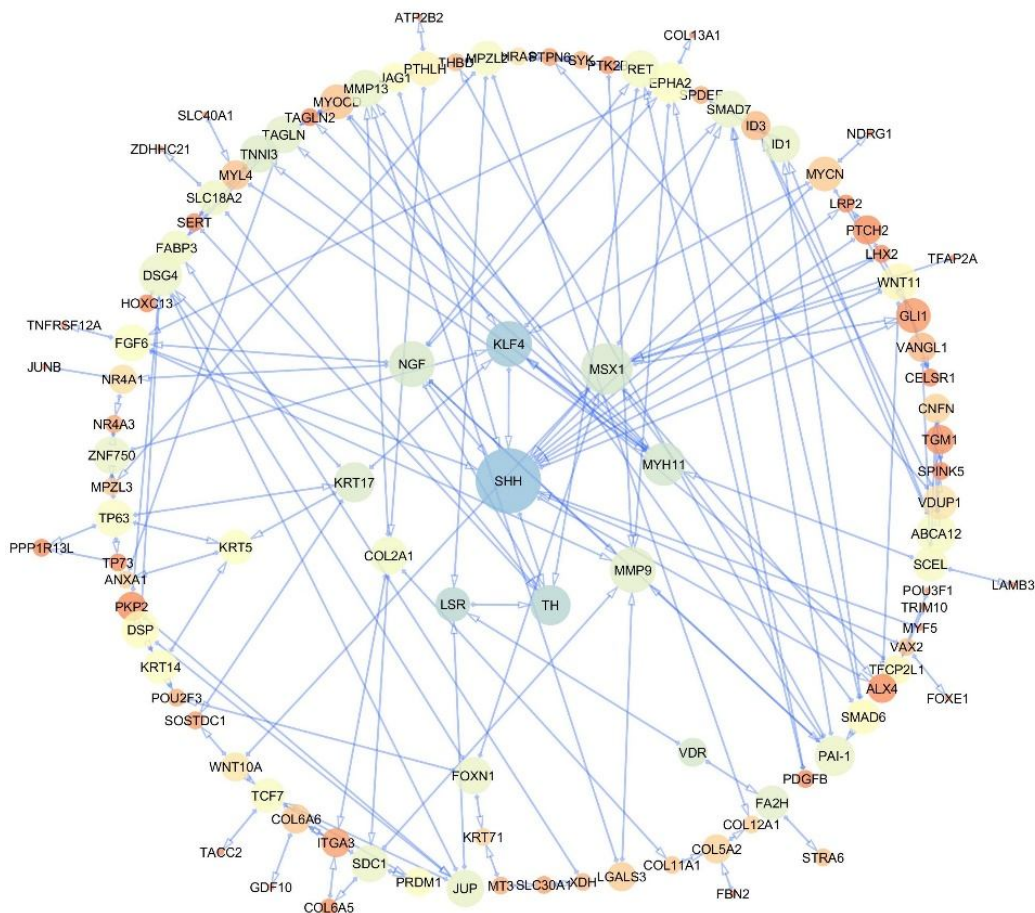
ژن SHH، ژنی است که بر اساس برآزش شبکه برهمکنش پروتئینی بالاترین درجه در شبکه و بیشترین نقش تنظیم کنندگی را نسبت به سایر ژن‌های تشکیل دهنده شبکه دارد و می‌تواند نقش مهم و مؤثرتری را در تکامل و نمو فولیکول الیاف کرک بازی کند. این ژن میتوز و محرک تکثیر سلولی در بسیاری از بافت‌ها در دوران جنینی تا بلوغ است و در دوران بلوغ در روند رشد مو نقش دارد (۱۲). همچنین گزارش شده بیان ژن نام برده شده توسط سنتز ژن‌های Wnt و Lef1 کنترل می‌شود. سنتز E-Cathedrin با Lef1 نیز بیان ژن SHH را افزایش می‌دهد (۲۸). ژن SHH ژنی است که تقریباً همه مسیرهای مرتبط با مورفوژنز مو را کنترل می‌کند و به جوانه‌های مو کمک می‌کند تا در مرحله ارگانوژنز ایجاد شوند (۲۴). در مطالعه‌ای بیان شده است این ژن به همراه ژن Cyclin-D موجب کاهش رشد سلول‌های اپیتلیال پوست به منظور شکل گیری مو بالغ قبل از تولد می‌شود و همچنین به همراه ژن Noggin سبب شروع بلوغ پایبلا درمال جهت ساخت تارهای مو می‌شود (۳۰).

بعد از تعیین سطح بیان هر ژن و میزان سطح تغییرات بیان هر ژن در مقایسات مراحل مختلف رشد (مقایسه دو ساعت بعد از تولد با ۶۰ روز آبستنی، مقایسه بعد از تولد با ۱۲۰ روز آبستنی و مقایسه روز ۱۲۰ آبستنی با روز ۶۰ آبستنی)، ژن‌هایی که در تمام مقایسات بیان آنها افزایش داشته به عنوان ژن‌هایی منظور شدند که با افزایش بیان خود، رشد و نمو فولیکول الیاف را کنترل می‌کنند. از طرفی آن دسته از ژن‌هایی که در تمام مقایسات مراحل رشد فولیکول بیانشان کاهش یافت، به عنوان ژن‌هایی منظور گردیدند که با کاهش بیان خود زمینه رشد و نمو فولیکول کرک را فراهم می‌کنند. در پایان این مرحله ۱۴۵ ژن در دسته ژن‌های افزایش بیان یافته و ۶۵۰ ژن در گروه ژن‌های کاهش بیان یافته قرار گرفتند.

روابط برهمکنش پروتئینی بین ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته به طور مجزا توسط STRING بررسی شد. در بین ژن‌های افزایش بیان یافته روابط بین ۱۴۵ ژن با ۲۰۳ کمان مورد تایید قرار گرفت (p-value < 1.0 e -16). مجسم‌سازی این شبکه توسط نرم‌افزار Cytoscape انجام شد (تصویر ۱).

همانطور که در تصویر ۱ آمده است ژن‌های SHH^۱، KLF4^۲، MMP9^۳، MSX1^۴، KRT17^۵ و COL2A1^۶ بیشترین تاثیر را بر

- 1- Sonic hedgehog
- 2- Kruppel-like factor 4
- 3- Matrix metalloproteinase 9
- 4- Homeobox protein 1
- 5- Keratin 17
- 6- Collagen type II alpha I chain



شکل ۱ - شبکه برهمکنش پروتئینی در ژن‌های افزایش بیان داشته در روند رشد و نمو کرک. افزایش میزان مرکزیت میانی که با افزایش شدت رنگ از قرمز به آبی نشان داده شده است و اندازه بزرگتر گره‌ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر آن‌ها می‌باشد.

Figure 1- The protein-protein interactions network has shown the up-regulated genes in the growth and development process. Increasing the amount of betweenness centrality shown by increasing the intensity of the color from red to blue and the larger size of the nodes indicate which is the most regulated.

خاصیت پروتئینی سلول‌های بنیادی سبب مهاجرت سلولها به محل زخم شده و تسریع بهبود پوست آسیب دیده می‌شود (۱۴). از اینرو، این پژوهشگران پیشنهاد دادند که بیان ژن KLF4 برای نگهداری سلولهای فولیکول مو ضروری است (۱۴). همچنین آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم نشان داده است که بسیاری از ژن‌های خانواده کراتین بر روی القاء KLF4 تنظیم شده‌اند. به نظر می‌رسد که مشارکت مثبت ژن KLF4 در فرآیند توسعه پوست به واسطه افزایش در بیان ژن‌های خانواده کراتین صورت می‌پذیرد. علاوه بر این، گزارش شده است که KLF4 پروموتورهای ژن‌های اپیتلیال از جمله ژن CYP1A1 را فعال می‌کند (۱۰).

ژن MMP9 از دیگر ژن‌های کلیدی در پژوهش حاضر است که می‌تواند یکی از مولکول‌های کنترل کننده رشد و نمو فولیکول‌های

ژن KLF4 نیز ژن دیگری است که بیان آن در تمامی مراحل رشد و نمو فولیکول‌های یاف، این ژن یک عامل رونویسی دخیل در پروتئینی سلول‌های بنیادی جنینی است و به همراه فاکتورهای رونویسی Sox2 و oct4، c-myc، بیان چندین هزار ژن را کنترل می‌کند (۷). ژن KLF4 به عنوان عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی Kruppel، در دستگاه گوارش و دیگر بافت‌های اپیتلیال از جمله پوست بیان می‌شود (۱۴). در پژوهشی دیگر با هدف بررسی رشد سلول‌های بنیادی اپیتلیال پوست در موش‌هایی با ژن KLF4 نابود شده، گزارش شد در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های اپیتلیال موش‌های فاقد ژن KLF4 در تعداد سلولهای بنیادی مو و توانایی تشکیل کلنی کاهش داشتند و کمبود این ژن در سلولهای بنیادی سبب تاخیر در التیام زخم شد اما بیان این ژن با توجه به

صفت اقتصادی تولید کرک ایفا کند.

ژن COL2A1 یکی دیگر از ژن‌هایی که در برازش شبکه ژنی از مقادیر بالای پارامترهای مرکزیت برخوردار بود. مشاهده افزایش بیان این ژن فقط در مرحله روز ۶۰ تا روز ۱۲۰ جنینی، به این معنی است که ژن COL2A1 احتمالاً به نمو فولیکول اولیه مو کمک می‌کند که با یافته‌های پژوهشگران دیگر هماهنگ می‌باشد (۱۹). این پژوهشگران بیان کردند که ژن COL2A1 همراه با تعامل شبکه‌ای که با رونوشت‌های SHH، KRT4، KRT15، KRT1، و COL17A1 دارد در توسعه تراکم پوست و نمو فولیکول‌های پشم گوسفند نقش مهمی دارد. در پژوهشی دیگر با استفاده از داده‌های ترانسکریپتوم پوست مرغ، گزارش گردید که بیان ژن COL2A1 همراه با سایر ژن‌های خانواده کلاژن فقط در دوره جنینی از روز ۶ تا ۸ افزایش یافته و بعد از آن سطح بیان‌شان تفاوت معنی‌دار ندارد. بنابراین خانواده ژن‌های کلاژن با توجه به نداشتن تغییرات بیانی ممتد در دوره جنینی فقط در مرحله مورفوژن فولیکول پر نقش دارند (۱۱).

شبکه برهمکنش بین ژن‌های کاهش بیان یافته نیز ارتباطات هم‌بیانی بین ۶۵۰ ژن با کمک ۱۳۰۲ کمان را تایید کرد (p-value < 1.74 e-5). مجسم‌سازی این شبکه در تصویر ۲ نمایش داده شده است.

در میان ژن‌های کاهش بیان داشته نیز، ژن VEGFA اهمیت بیولوژیکی بیشتری را از خود نشان داد. این ژن یک کلیگو پروتئین ۴۵ کیلو دالتونی است که به عنوان عضوی از خانواده فاکتورهای رشد پپتیدی در سلول‌های فولیکول مو در مرحله آناتژن در اکثر پستانداران بیان می‌شود (۳۳). ژن VEGFA یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رگ‌زایی است که به کمک دو رسپتور ویژه VEGFR1 و VEGFR2، که فقط در سلول‌های اندوتلیالی بیان می‌شوند، مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی و نیز تکثیر و نفوذ پذیری آن‌ها را تنظیم می‌کند (۲۱). این ژن همچنین یک فاکتور ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های اندوتلیالی نیز محسوب می‌شود. از آنجائیکه بازآرایی بافت به خصوص در هنگام نمو و تشکیل فولیکول اولیه مو نیاز به منبع خون مناسب دارد و تشکیل رگ‌های خونی پیش‌ساز اولیه باز آرای می‌باشد (۲۱). در مطالعه‌ای گزارش شده که گیرنده VEGFR1 از این ژن در هنگام بازسازی فولیکول‌های موی بز کشمیری نقش دارد (۱۵). از اینرو این ژن می‌تواند نقش تنظیم‌کنندگی در مراحل تکامل و رشد فولیکول الیاف بز کرکی داشته باشد.

در این مطالعه پس از بررسی روابط برهمکنش پروتئینی بین

الیاف در بز کرکی باشد. همچنین، برخی مطالعات نقش ژن MMP9 را در بازسازی ماتریکس خارج سلولی در طی توسعه پوست و شکل‌گیری تارهای مو نشان داده‌اند (۲۰). محل این بیان ژن در قسمت مرکزی کانال مو که حاوی سلول‌های هسته‌ای کراتینیزه شده است که بعدها پوست را تشکیل می‌دهند و لومن اولیه تارهای مو را ایجاد می‌کنند. بنابراین کانال مو برای ظهور ساقه مو آماده می‌کند و دیواره‌های آن را از آسیب‌القاه شده توسط فیبر مو در حال رشد محافظت می‌کند (۲۶).

یکی دیگر از ژن‌های مطرح در شبکه ژن MSX1 می‌باشد و نقش این ژن به عنوان تنظیم‌کننده اصلی در فرآیند رشد و نمو فولیکول مو در انسان، موش و بز کشمیر به اثبات رسیده است (۲۶). همچنین، در انسان ژن MSX1 در اپیدرم و فولیکول مو بیان می‌شود و افزایش بیان سبب سرکوب ژن‌های موثر در طاسی می‌شود (۲۹). در پژوهشی دیگر بیان شده، افزایش بیان این ژن به منظور ریخت‌زایی بسیاری از بافت‌های جنینی از جمله فولیکول مو، جوانه دندان و دم جنین نیاز است (۵). بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش و نتایج گزارش شده در پژوهش‌های دیگر با احتمال زیاد ساز و کار مولکولی پایه برای این ژن بین گونه‌های مختلف بصورت حفظ شده است و این ژن نقش موثری در فرآیند رشد و نمو فولیکول الیاف بز کرکی دارد.

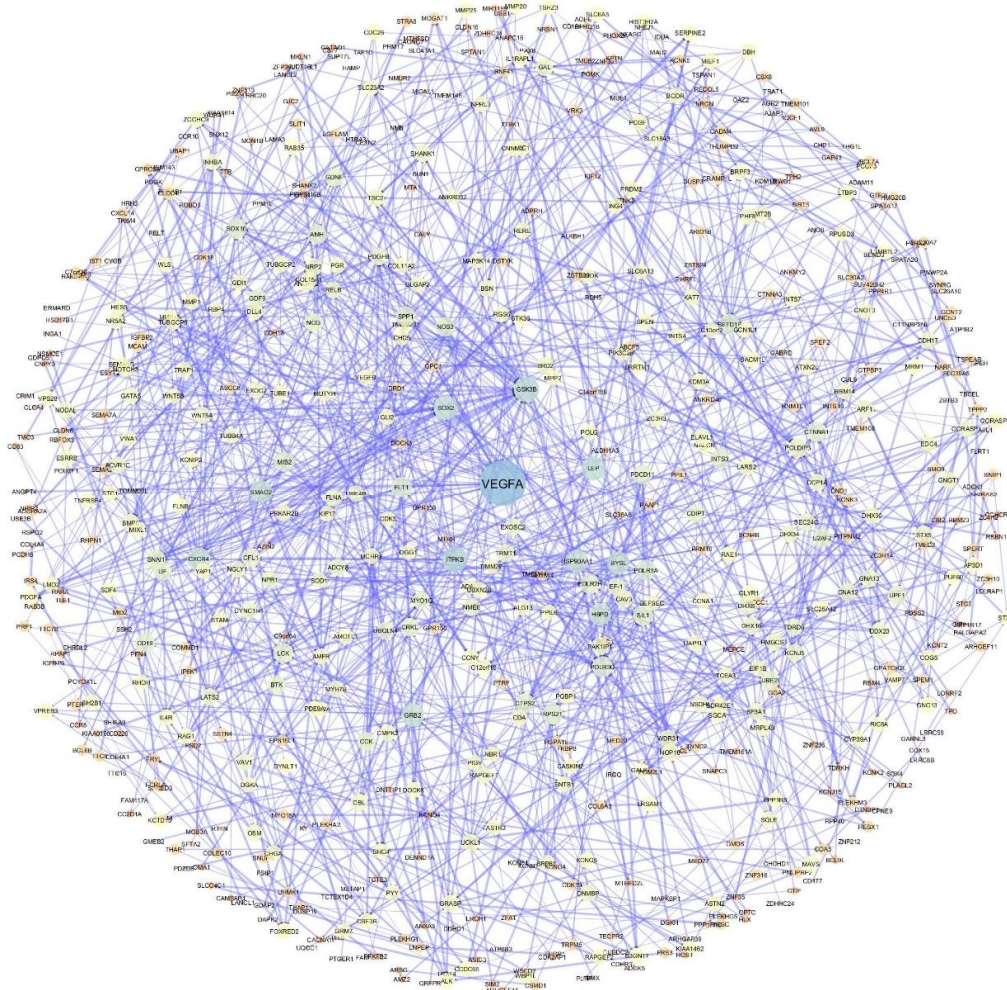
برازش شبکه ژنی در این مطالعه نشان داد دو عضو از خانواده ژنی KRT (KRT5 و KRT17) نقش مهمی در تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی دارند. خانواده ژنی KRT کدکننده پروتئین‌هایی با درصد گلايسين و تيروسين بالا هستند و به عنوان اصلی‌ترین پروتئین‌های ساختاری الیاف مو همراه با خانواده ژنی KAP می‌باشند (۳۰). ژن‌های خانواده KRT در ساختمان فولیکول‌های اولیه و ثانویه حضور دارند و معروف به کراتین مو هستند و در بسیاری پژوهش‌ها برای ارزیابی کیفیت کشمیر و پشم به عنوان نشانگر تعیین کیفیت مو سطح بیان‌شان اندازه‌گیری شده است (۳۰). در مطالعه‌ای از ژن‌های KRT31، KRT32، KRT33A، KRT34، KRT35، KRT36، KRT37، KRT38، KRT39 و KRT40 به عنوان نشانگرهای ژنی تعیین کیفیت الیاف مو بز یاد شده است. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که KRT5 و KRT17 همراه با ژن‌های KRT14، KRT25، KRT27، KAP13.1 و KAP9.2 در توسعه فولیکول مو موثرند و الگوی بیان متفاوتی در طول دوره رشد مو بز دارند (۱۶). همچنین بیان شده است که یکی از وظایف برجسته ژن KRT17 شرکت در مورفوژن مو است و این ژن در الیاف مو نیز حضور دارد (۲۴). در این پژوهش با توجه به اینکه معیارهای شبکه‌ای ژن KRT5 کم بودند، اما با توجه به نقش حائز اهمیت آن در فرآیند مرتبط با رشد و نمو فولیکول مو و افزایش بیان آن در مراحل رشد تارهای مو می‌تواند بعنوان نشانگر زیستی نقش مهمی در اصلاح نژاد

بیان یافته و ۶۵۰ ژن در گروه ژن‌های کاهش بیان یافته شد، با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها انتظار می‌رود ژن‌های کلیدی دخیل در رشد و نمو فولیکول الیاف، ژن‌های SHH، KLF4، MMP9، MSX1، COL2A1، و VEGFA باشند که دارای بیشترین اهمیت از نظر میزان تأثیرگذاری بر بیان سایر ژن‌ها بودند و این ژن‌ها در مسیرهای مرتبط با مورفوژن و ساخت تارهای مو، بازسازی فولیکول‌های مو، بهبود کیفیت مو و توسعه و تراکم پوست تأثیر گذار بودند. با توجه به نقش حائز اهمیت این ژن‌ها در فرآیندهای مرتبط با رشد و نمو فولیکول مو می‌توانند بعنوان نشانگر زیستی در اصلاح نژاد صفات اقتصادی مربوط به بهبود کمیت و کیفیت کرک مورد بهره برداری قرار گیرند.

ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته، ژن‌های تنظیم کننده در روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد، براساس نتایج واکاوی آماری مشخص شدند و براساس مستندسازی عملکردی نقش کلیدی این ژن‌ها بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تأیید شد و نتایج مستندسازی در جدول ۲ مشخص شده است.

نتیجه گیری کلی


در پژوهش حاضر، بازسازی شبکه هم بیانی ژن‌ها با استفاده از ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد، منجر به شناسایی ۱۴۵ ژن در دسته ژن‌های افزایش



شکل ۲- شبکه برهمکنش پروتئینی در ژن‌های کاهش بیان داشته در روند رشد و نمو کرک. افزایش میزان مرکزیت میانی که با افزایش شدت رنگ از قرمز به آبی

نشان داده شده است و اندازه بزرگتر گره‌ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر آن‌ها می‌باشد.

Figure 2- The protein-protein interactions network has shown the down-regulated genes in the growth and development process.

Increasing the amount of betweenness centrality shown by increasing the intensity of the color from red to blue () and the larger size of the nodes indicate which is the most regulated.

جدول ۲- ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الباف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد

Table 2- Effective gene related to development stage of hair follicle in cashmere goat from fetal to birth

نام ژن Gene Name	میانگین میزان بیان در سه مرحله Gene Expression Average in 3 Stage	عبارات بیولوژیکی GO Terms
SHH	4.3	hair follicle development (GO:0001942)
KLF4	1.8	epidermal cell differentiation(GO:0009913)
MSX1	4.7	tissue development(GO:0009888)
MMP9	4.9	system development(GO:0048731)
KRT17	3.1	epidermis development(GO:0008544)
COL2A1	2.05	Collagen trimer(GO:0005581)
VEGFA	-3.4	Growth factor activity(GO:0008083)

منابع

- Anders, S., P. T. Pyl, and W. Huber. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31 (2): 166–169.
- Ansari-renani, H. R., Z. Ebadi, S. Moradi, H. R. Baghershah, M. Y. Ansari-renani, and S. H. Ameli. 2011. Determination of hair follicle characteristics, density and activity of Iranian cashmere goat breeds. *Small Ruminant Research*, 95 (2–3): 128–132.
- Ayaz, A., Z. Iqbal, B. Ahmad, N. A. Ganai, N. Singh, A. Ali, T. Mumtaz, M. A. Dar, M. Shabir, and S. Shanaz. 2017. Impact of high glycine tyrosine KAP genes on Cashmere fibre trait characteristics. *Biotechnology Journal International*, 19 (3): 1–5.
- Barazandeh, A., S. M. Moghbeli, N. G. Hossein-Zadeh, and M. Vatankhah. 2012. Genetic evaluation of growth in Raini goat using random regression models. *Livestock Science*, 145 (1–3): 1–6.
- Blin-Wakkach, C., F. Lezot, S. Ghoul-Mazgar, D. Hotton, S. Monteiro, C. Teillaud, L. Pibouin, S. Orestes-Cardoso, P. Papagerakis, and M. Macdougall. 2001. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (13): 7336–7341.
- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30 (15): 2114–2120.
- Dosch, R. 2015. Next generation mothers: maternal control of germline development in zebrafish. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50 (1): 54–68.
- Gao, Y., X. Wang, H. Yan, J. Zeng, S. Ma, Y. Niu, G. Zhou, Y. Jiang, and Y. Chen. 2016. Comparative transcriptome analysis of fetal skin reveals key genes related to hair follicle morphogenesis in cashmere goats. *PLoS ONE*, 11 (3): 1–20.
- Geng, R., C. Yuan, and Y. Chen. 2013. Exploring differentially expressed genes by RNA-Seq in cashmere goat (*Capra hircus*) skin during hair follicle development and cycling. *PloS One*, 8 (4): e62704.
- Georgantas, R. W., V. Tanadve, M. Malehorn, S. Heimfeld, C. Chen, L. Carr, F. Martinez-Murillo, G. Riggins, J. Kowalski, and C. I. Civin. 2004. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Research*, 64 (13): 4434–4441.
- Gong, H., H. Wang, Y. Wang, X. Bai, B. Liu, J. He, J. Wu, W. Qi, and W. Zhang. 2018. Skin transcriptome reveals the dynamic changes in the Wnt pathway during integument morphogenesis of chick embryos. *PloS One*, 13 (1): e0190933.
- Jiang, J., and C. Hui. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental Cell*, 15 (6): 801–812.
- Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12 (4): 357–360.
- Li, J., H. Zheng, J. Wang, F. Yu, R. J. Morris, T. C. Wang, S. Huang, and W. Ai. 2012. Expression of Kruppel-like factor KLF4 in mouse hair follicle stem cells contributes to cutaneous wound healing. *PLoS ONE*, 7 (6): e39663–e39663.
- Liu, B., F. Gao, J. Guo, D. Wu, B. Hao, Y. Li, and C. Zhao. 2016. A microarray-based analysis reveals that a short

- photoperiod promotes hair growth in the Arbas Cashmere goat. *PloS One*, 11 (1): e0147124–e0147124.
- 16- Liu, G., R. Liu, X. Tang, J. Cao, S. Zhao, and M. Yu. 2015. Expression profiling reveals genes involved in the regulation of wool follicle bulb regression and regeneration in sheep. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (5): 9152–9166.
 - 17- Liu, H., C.-W. Yue, W. Zhang, X. Zhu, G. Yang, and Z. Jia. 2011. Association of the KAP 8.1 gene polymorphisms with fibre traits in inner mongolian cashmere goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24 (10): 1341–1347.
 - 18- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15 (12): 550.
 - 19- Nie, Y., S. Li, X. Zheng, W. Chen, X. Li, Z. Liu, Y. Hu, H. Qiao, Q. Qi, and Q. Pei. 2018. Transcriptome reveals long non-coding RNAs and mRNAs involved in primary wool follicle induction in carpet sheep fetal skin. *Frontiers in Physiology*, 9 446.
 - 20- Nothnick, W. B. 2008. Regulation of uterine matrix metalloproteinase-9 and the role of microRNAs. *Seminars in Reproductive Medicine*, 26 (6): 494–499.
 - 21- Ozeki, M., and Y. Tabata. 2003. In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials*, 24 (13): 2387–2394.
 - 22- Qiao, X., J. H. Wu, R. B. Wu, R. Su, C. Li, Y. J. Zhang, R. J. Wang, Y. H. Zhao, Y. X. Fan, and W. G. Zhang. 2016. Discovery of differentially expressed genes in cashmere goat (*Capra hircus*) hair follicles by RNA sequencing. *Genetics and Molecular Research*, 15 (3): gmr.15038589.
 - 23- Qu, B. O., Y. Qiu, Z. Zhen, and F. Zhao. 2016. Computational identification and characterization of novel microRNA in the mammary gland of dairy goat (*Capra hircus*). 95 (3): 1–31.
 - 24- Sennett, R., and M. Rendl. 2012. Mesenchymal–epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23 (8): 917–927.
 - 25- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13 (11): 2498–2504.
 - 26- Sharov, A. A., M. Schroeder, T. Y. Sharova, A. N. Mardaryev, E. M. J. Peters, D. J. Tobin, and V. A. Botchkarev. 2011. Matrix metalloproteinase-9 is involved in regulation of the hair canal formation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131 (1): 257.
 - 27- Song, S., M. Yang, Y. Li, M. Rouzi, Q. Zhao, Y. Pu, X. He, J. M. Mwacharo, N. Yang, Y. Ma, and L. Jiang. 2018. Genome-wide discovery of lincRNAs with spatiotemporal expression patterns in the skin of goat during the cashmere growth cycle. *BMC Genomics*, 19 (1): 1–12.
 - 28- St-Jacques, B., H. R. Dassule, I. Karavanova, V. A. Botchkarev, J. Li, P. S. Danielian, J. A. McMahon, P. M. Lewis, R. Paus, and A. P. McMahon. 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Current Biology*, 8 (19): 1058–1069.
 - 29- Stelnicki, E. J., M. R. Harrison, D. Holmes, N. S. Adzick, L. G. Kömüves, W. Clavin, and C. Largman. 1997. The human homeobox genes *MSX-1*, *MSX-2*, and *MOX-1* are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. *Differentiation*, 62 (1): 33–41.
 - 30- Temizkan, M. C., and A. G. Bayraktaroglu. 2017. Effective Gene on Hair Follicle Growth. *Mae Vet Fak Derg*, 2 (1): 61–73.
 - 31- Wang, L., Y. Zhang, M. Zhao, R. Wang, R. Su, and J. Li. 2015. SNP discovery from transcriptome of cashmere goat skin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28 (9): 1235.
 - 32- Yang, M., S. Song, K. Dong, X. Chen, X. Liu, M. Rouzi, Q. Zhao, X. He, Y. Pu, W. Guan, Y. Ma, and L. Jiang. 2017. Skin transcriptome reveals the intrinsic molecular mechanisms underlying hair follicle cycling in Cashmere goats under natural and shortened photoperiod conditions. *Scientific Reports*, 7 (1): 1–12.
 - 33- Yano, K., L. F. Brown, and M. Detmar. 2001. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (4): 409–417.



Reconstruction of genes co-expression network related to the growth and development of fiber follicle in Cashmere goat fetus

A. Barazandeh¹, M. Mokhtari¹, E. Behdani², Z. Roudbari^{1*}

Submitted: 04-07-2019

Accepted: 11-09-2019

Introduction In most mammals, each hair follicle is a mammalian skin organ that produces hair and controls the hair growth cycle. The hair follicle is central to most economically important fiber growth in livestock. Previous studies have shown that changes in the level of genes expression play a role in the development and growth of hair follicles. With the advent of high throughput, next-generation sequencing technology measuring the level of expression of thousands of genes was possible simultaneously. As a result, many regulatory conflicts between genes can be extracted from these data. Expression profiles are generated by combining expression levels resulting from experiments in various conditions or times. Similarities and differences between expression profiles reveal many of these regulatory relationships. Despite recent advances in the identification of the molecular signaling/co-expression networks that govern the development of the skin and hair follicle, the mechanisms controlling of fiber production in Cashmere goat still remains unclear. Therefore, the present study was conducted to investigate the most important molecules controlling the growth and development of hair follicles in cashmere goats in order to decode the genes involved in the growth and development of hair follicles in cashmere goats.

Materials and Methods Publicly available preprocessed transcript data (accession no. SRP059481) was downloaded from the NCBI database in the SRA section. In this investigation, nine goats were selected at the same stage of gestation. Three fetuses were obtained at 55-65 days' gestation (60-days old) and three fetuses were obtained at 105-125 days' gestation (120 -day- old) through cesarean operation and three fetuses were also sacrificed within two hours of birth (newborn). For analysis of RNA-seq data, a random sampling from the right mid-side of the fetal skin and each time point had three replicates. The 60 days (E60) of gestation represented the initiation stage of growth, and the 120 d (E120) represented the development stage, as well as the newborn samples, represented the primary hair follicle maturation stage. The FastQC software (Version 11.7) was used to check the quality of the readings. This software check the quality of the reads, in case of low-quality sequencing, the data were edited by Trimmomatic software (Version 0.39), and filtered reads were evaluated with FastQC software. After removing low-quality reads mapping was performed on the goat reference genome (GCA_001704415.1) downloaded from the ensemble site using the Hisat2 software (Version 2.1.0). The HTSeq2 (Version 10.0) was used to create the count matrix, changes in the expression of genes between the groups (E60, E120, and newborns) was identified using the software Deseq2 (Version 1.24). In this stage, the genes between the two groups were compared to give an expression difference 1- Genes that are expressed throughout the growth process of the follicle 2. Co-Expression networks of up and down genes were created using the STRING database (Version 11) at <https://string-db.org>. The PPI network was constructed by Cytoscape software (Version 3.6.0). Cytoscape is commonly used for analysis and visualization of biological networks. Gene ontology analysis of effective gene related to development stage of hair follicle in Cashmere goat from fetal to birth was done using DAVID database.

Results and Discussion After determining the level of expression of each gene at different stages of sampling, genes that increased expression in all comparisons were considered as up-regulated genes that, by increasing their expression, control the growth and development of hair follicle. On the other hand, those genes that have been shown to reduce expression in all of the follicle growth stages comparisons were considered as genes which by decreasing their

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran,

2- PhD Graduated, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan, Iran.

(*- Corresponding Author Email: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i2.81710

expression, causes the growth and development of the hair follicle. The interaction relations were investigated between the increased and reduced genes expressed separately by STRING database. Among the up-regulated genes, the relationships between 145 genes with 203 edge were confirmed. Also, the interaction network between the down-regulated genes confirmed between 650 genes with 1302 edge. Among the genes with differential expression, the co-expression genes (genes with the most interacting) were identified based on the results of the analysis of the statistical parameters of the network using computational algorithms in Cytoscape software. These results led to the identification of seven unique genes that were SHH, KLF4, MMP9, MSX1, KRT17, COL2A1 and VEGFA, ontology analysis of these genes showed that involved the hair cycle process, hair follicle development, skin epidermis development, epidermis morphogenesis and epidermal cell differentiation that these pathways are activated in the cashmere production process. Therefore, these genes have been used as regulators of cashmere growth and development to better understand the cashmere production process and improve its quality.

Conclusion The results have been able to introduce genes with major effects that regulate the expression of genes and molecular signals associated with the production of fiber that including KLF4, MMP9, MSX1, KRT17, COL2A1 and VEGFA in Cashmere goats. Based on functional analysis, these genes can play a significant role in the improvement of cashmere goats breeding. We hope that the obtained results would be beneficial toward finding the smart strategies for Cashmere production improvement.

Keyword: Cashmere goat, Differential expression, Regulatory network, Transcriptome analysis.