

پروفایل ترانسکریپتوم یاخته‌های گرانولوزای تخمدان گاو در مراحل مختلف فولیکولوژنسیز

ابوالفضل بهرامی^۱، سید رضا میرایه آشتیانی^{۲*}، مصطفی صادقی^۳ و علی نجفی^۴
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. کرج
۴. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم، تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۲)

چکیده

آخرین مرحله فولیکولوژنسیز در فولیکول تخمدان پستانداران شامل بیشترین توسعه و اوج فعالیت لایه‌های بافت پوششی (اپیتلیال) یاخته‌های گرانولوزا است که حفره آنترال را احاطه کرده‌اند. در طول رشد و توسعه فولیکول، یاخته‌های گرانولوزا تکثیر می‌شوند و هورمون‌های لازم برای رشد اووسیت را ترشح می‌کنند. در گاو، فولیکول نیاز به رشد تا قطر بالای ۱۰ میلی‌متر دارد تا آماده برای تخم‌ریزی شود و پس از این مرحله یاخته‌های گرانولوزا تغییر کرده و تبدیل به توده یاخته‌های ویژه‌ای بنام جسم زرد می‌شوند. برای درک بهتر اساس مولکولی رشد فولیکولی و بلوغ یاخته‌های گرانولوزا، پروفایل ترانسکریپتوم یاخته‌های گرانولوزا از کوچک (<5mm) تا بزرگ (>10mm) با استفاده از روش داده‌کاوی بررسی شد. در مجموع با مقایسه ترانسکریپتوم یاخته‌های گرانولوزای بزرگ و کوچک در مجموع ۲۸۳ ژن شناسایی شدند. با بازسازی شبکه و تجزیه آن موفق به شناسایی آثار متقابل آن‌ها و در نهایت با استفاده از ابزارهای مختلف در زمینه پیدا کردن ماژول‌های مهم و عملکردی، شش ماژول شناسایی شد که مهم‌ترین ژن‌های مرتبط شامل TNF α ، NR1H4، LHCGR، FSHR، PTHLH، LHB، CAD، HSD3B1، CYP17A1، DICE1، MCE1، COX و آروماتاز بودند. این مشاهدات توصیه می‌کند که شش ماژول شناسایی شده در بررسی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهایی برای مرحله نهایی تمایز فولیکول و آغاز مرگ یاخته باشند.

واژه‌های کلیدی: تخمدان، ترانسکریپتوم، داده‌کاوی، شبکه، ماژول عملکردی.

Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during different stages of folliculogenesis

Abolfazl Bahrami¹, Seyed Reza Miraie-Ashtiani^{2*}, Mostafa Sadeghi³ and Ali Najafi⁴

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: Feb. 7, 2017 - Accepted: Jan. 2, 2018)

ABSTRACT

At the later stage of folliculogenesis, the mammalian ovarian follicle contains layers of epithelial granulosa cells surrounding an antral cavity. During follicle development, granulosa cells replicate, secrete hormones and support the growth of the oocyte. In cattle, the follicle needs to grow over 10 mm in diameter to allow an oocyte release in ovulation process, following which the granulosa cells cease dividing and differentiate into the specialized cells of the *corpus luteum*. To better understand the molecular basis of follicular growth and granulosa cell maturation, we undertook the transcriptome profiling of granulosa cells from small (< 5 mm; n = 10) and large (> 10 mm, n = 4) healthy bovine follicles, using data mining. In this regard, we have studied important genes that are included in folliculogenesis process using data, freely available in the different databases. In total 283 genes were identified with the comparison of transcriptome profiling of large and small granulosa cells. With construction and analysis of network, we became able to identify the interaction between them and finally we have found 6 important and functional modules using various software. The most important genes involved, were TNF α , NR1H4, LHCGR, FSHR, PTHLH, LHB, CAD, HSD3B1, CYP17A1, DICE1, MCE1, COX and Aromatase. These results suggest that identified modules can be used as markers for follicle differentiation and apoptosis process.

Keywords: Data mining, functional modules, network, ovary, transcriptome.

* Corresponding author E-mail: ashtiani@ut.ac.ir

مقدمه

سازوکار تنظیم رشد فولیکول‌های تخمدان که با نرخ بالای پس‌روی یاخته‌های گرانولوزا همراه است از بعد فرآیندهای زیستی بسیار کم بررسی شده است. اگرچه در گونه‌هایی مانند گاو و گونه‌های دیگر که گونه‌های تک تخمکی (اغلب) هستند، شمار زیاد فولیکول‌های آنترال در هر چرخه فحلی رشد می‌کنند ولی در بیشتر موارد تنها یک فولیکول به مرحله تخمک‌ریزی می‌رسد (Baerwald *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 1989; Ireland *et al.*, 2000). یک موج فولیکولی همزمان با مرحله (فاز) فولیکولی از دوره قاعدگی یا چرخه فحلی منجر به توسعه یک فولیکول چیره می‌شود، درحالی‌که فولیکول‌هایی که همراه با آن در مرحله فولیکولی توسعه پیدا کرده‌اند به توده یاخته‌های پس‌رونده یا آنترزا تبدیل می‌شوند. هر موج فولیکولی با افزایش غلظت FSH سرم آغاز می‌شود. در مورد ژن‌های مؤثر بر چگونگی سازوکار در هنگامی که غلظت FSH در فرآیند انتخاب فولیکول غالب کاهش می‌یابد و اینکه چگونه فولیکول‌های دیگر تبدیل به فولیکول زیردست شده و در نهایت پس‌روی می‌کنند، بررسی‌ها و دانش کمی وجود دارد (Ireland *et al.*, 2000; Goodman & Hodgen, 1983). از سویی در ارزیابی بررسی‌های مختلف ثابت شده است که پس‌روی فولیکول‌های تخمدان در مهره‌داران از طریق فرآیند مرگ یاخته‌ای مهار (کنترل) می‌شوند (Tilly, 2001).

ژن‌های مرتبط با غده (تومور)، مرگ و زنده‌مانی و تعادل بین عامل‌های پیش- یا پس از مرگ یاخته‌ای موجود درون یاخته را تنظیم می‌کنند (Amsterdam *et al.*, 1999)، و این ژن‌ها در بررسی‌های *in vitro* گونه‌های مختلف و به‌ویژه بررسی بر پایه *in vivo* در گونه‌های آزمایشگاهی، توصیف شده‌اند (Tilly, 2001; Johnson, 2003; Pru and Tilly, 2001). در نتیجه، انتخاب شامل فرآیند جلوگیری و یا فعال‌سازی مسیرهای مرگ یاخته‌ای است که منجر به رشد فولیکول غالب و در کنار آن پس‌روی دیگر فولیکول‌های آنترال در موج فولیکولی می‌شوند.

گاو و گونه‌های تک تخمک‌زا می‌توانند به‌عنوان حیوانات مدل برای شناسایی عامل‌های بین فولیکولی

که انتخاب و زنده‌مانی فولیکول غالب را در طول موج‌های فولیکولی تنظیم می‌کنند، استفاده شوند. در مراحل اولیه موج فولیکولی و پیش از اینکه فولیکول غالب توسط سونوگرافی مشخص شود، فولیکولی که غالب می‌شود به‌طور معمول در مقایسه با فولیکول‌های کوچکی که بدون تخمک‌ریزی آغاز به پس‌روی می‌کنند، غلظت بالایی از استرادیول دارد (Mihm *et al.*, 2000). بعلاوه غلظت استرادیول در سراسر رشد فولیکول‌های غالب پایدار می‌ماند و استرادیولی که توسط فولیکول‌های دیگر در یک موج تولید می‌شود پیش از تکه‌تکه شدن DNA (نشانگر مرگ یاخته) که در یاخته‌های گرانولوزا رخ می‌دهد کاهش می‌یابد (Austin *et al.*, 2001). با این اوصاف یافته‌ها این مفهوم را می‌رسانند که استرادیول نقش کلیدی در انتخاب و رشد پایدار فولیکول غالب ایفا می‌کند. برای دفاع از این نظر مشاهده شده است که گیرنده‌های استرادیول در یاخته‌های گرانولوزا و تیکا افزایش بیان دارند (Richards, 2001). افزون بر این، بررسی‌های فراوان *in vitro* نقش‌های کلیدی و مثبتی برای استرادیول در تقسیم میتوزی یاخته‌های گرانولوزا، فعالیت گنادوتروپین و همچنین استرادیول برای القای گنادوتروپین در رشد فولیکولی و تمایز نشان داده‌اند (Richards *et al.*, 1976; Ireland *et al.*, 1978).

با این وجود ژن‌های پایین و بالادست که مورد هدف استرادیول در زنده‌مانی یا مرگ یاخته‌های گرانولوزا، که در رشد یا پس‌روی فولیکول می‌دهد، هستند، تاکنون شناسایی نشده‌اند. افزون بر این ژن‌های مرتبط با مرگ یاخته‌ای که در زنده‌مانی و پس‌روی فولیکول‌های غالب و زیردست در طول موج‌های فولیکولی مؤثرند، هنوز شناخته نشده‌اند.

بر پایه بررسی‌های پیشین مربوط به مرگ یاخته‌ای در فرآیند فولیکولوژنسیز در گونه‌های آزمایشگاهی و همچنین در گاو، فرض شد که یاخته‌های گرانولوزا در فولیکول غالب در حال رشد با غلظت بالای استرادیول، تفاوت بیانی مختلفی در ژن‌های مرتبط با القا و یا بازدارنده مرگ یاخته‌ای ضد خود، نشان می‌دهند. در این تحقیق برای آزمایش این

فرضیه با استفاده از داده‌های مربوط به بررسی‌های ریزآرایه DNA و توالی یابی نسل بعدی (Nest Generation Sequencing)، در فولیکول‌های غالب و زیردست به شناسایی ژن‌های مهم که تغییر بیانی از خود نشان داده‌اند، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام تجزیه‌های لازم و یافتن ماژول‌های عملکردی مرتبط با پدیدگان (فنوتیپ)‌های موردنظر در این تحقیق، یعنی اندازه فولیکول‌های پیش‌رونده به‌سوی بلوغ و تخمک‌ریزی و فولیکول‌های پس‌رونده آنترال، داده‌ها و ریزآرایه مرتبط به شرحی که به دنبال می‌آید و نرم‌افزارهای بسیار زیاد و متعدد به کار گرفته شدند.

داده‌کاوی

با جستجو در پایگاه GEO و ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) بافت تخمدان از گونه گاو، نژاد هلشتاین (*Bos Taurus*)، شمار زیادی داده گردآوری شد که از بین این داده‌ها، داده‌های با کیفیت مربوط به کد دسترسی GSE34317 (Walsh et al., 2012) و پلتفرم GPL11153 (Illumina Genome Analyzer II) مرتبط با داده‌های RNA-Seq که در مجموع شامل ۶۵ نمونه مرتبط با فرآیند رشد و توسعه یاخته‌های گرانولوزا در تخمدان گاو نژاد هلشتاین بودند و همچنین کدهای دسترسی GSE39589 (Hatzirodos et al., 2014) و GSE11312 (Rao et al., 2011) که هر دو با پلتفرم GPL2112 (Affymetrix Bovine Genome Array) مرتبط با داده‌های ریزآرایه و به ترتیب شامل ۱۹ و ۹ نمونه مربوط به رشد و توسعه یاخته‌های گرانولوزا در فرآیند فولیکولوژنسیز بودند، استفاده شدند.

تجزیه مربوط به داده‌های ریزآرایه و RNA-Seq

داده‌های ریزآرایه شامل GSE39589 (Hatzirodos et al., 2014) و GSE11312 (Rao et al., 2011) بودند که در آغاز با استفاده از بسته نرم‌افزاری Lumi (Du et al., 2008) در R پیش‌پردازش شدند و در نهایت داده‌های پردازش‌شده با بسته نرم‌افزاری Limma

برای پردازش داده‌های مربوط به کدهای دسترسی GSE34317 مرتبط با RNA-Seq از نرم‌افزارهای مختلفی استفاده شد که در زیر به آن‌ها پرداخته شده است.

در آغاز برای کنترل کیفیت داده‌های موجود از نرم‌افزار کنترل کیفیت FastQC (Andrews, 2010) و برای تبدیل فرمت فایل‌ها به فرمت سنگر و ایلومینا از FastQ Groomer (Blankenberg et al., 2010) استفاده شد. پس از این مرحله داده‌ها نیاز به پیرایش سازگارکننده (آداپتور)‌ها داشتند که برای این منظور نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger et al., 2014) به کار گرفته شد. در مرحله بعدی که مربوط به نقشه یابی قطعه‌های خوانده‌شده روی ژنگان (ژنوم) مرجع گاوی بود از نرم‌افزار TopHat2 (Kim et al., 2013) بهره گرفته شد. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای CuffLink و CuffCompare (Trapnell et al., 2010) خوانش‌های انجام‌گرفته ادغام و ترانسکرپتوم واحد تشکیل شد و در پایان میزان تفاوت در بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار CuffDiff (Trapnell et al., 2010) ارزیابی شد.

حاشیه‌نویسی ژن‌ها

برای حاشیه‌نویسی ژن‌ها پایگاه‌های مختلفی از جمله DAVID (Huang et al., 2009)، g:Profiler، PANTHER و (http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/) (Paul et al., 2003) استفاده شدند.

بازسازی شبکه و تجزیه آن

با ترکیب مجموعه‌های ژنی شماره ۲۰۱ فهرست اصلی

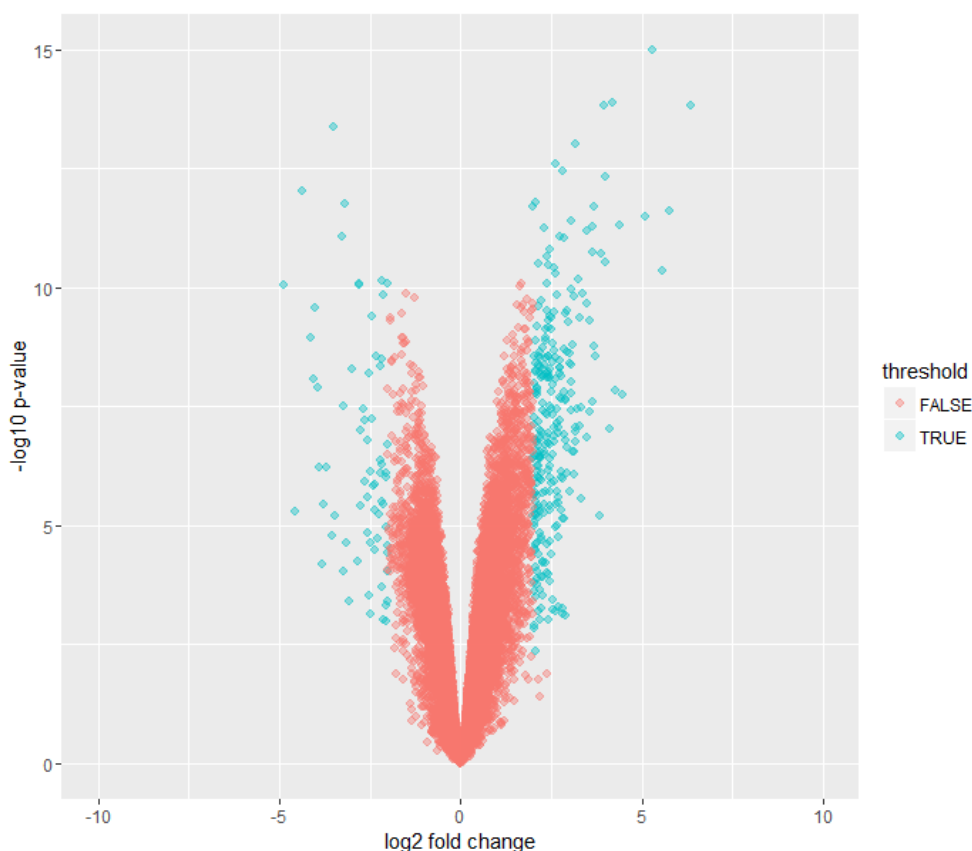
نتیجه و بحث

تفاوت بیانی ژن‌ها در یاخته‌های گرانولوزای فولکول‌های غالب و زیردست می‌تواند به تشخیص ژن‌های مؤثر در فرآیند و رسیدن به ماژول‌های عملکردی در مسیرهای مختلف یاخته‌ای، کمک کند که در بخش‌های زیر جزئیات یافته‌ها آورده بحث می‌شود.

تجزیه داده‌های ریزآرایه

با تجزیه داده‌های ریزآرایه پس از پیش‌پردازش و درنهایت پردازش برای بیان متفاوت ژنی، شمار ۲۵۳۴ ژن که تفاوت بیانی معنی‌داری داشتند، شناسایی شد. نمودار ggPlot داده‌هایی مربوطه در شکل ۱ آورده شده است. در این نمودار ژن‌های انتخاب‌شده به صورت نقاط آبی‌رنگ دیده می‌شوند. این فهرست ژنی به‌عنوان مجموعه شماره ۱ که حاصل از داده‌های ریزآرایه هستند در نظر گرفته شدند.

برای ترسیم شبکه آماده شد. به‌منظور بازسازی شبکه، به یافتن اثرهای متقابل بین ژنی نیاز است. بنابراین در این راستا از پایگاه‌های داده‌ای String (<http://string->) و GeneMania (*db.org/* Montojo *et al.*, 2014) بهره گرفتیم و همه اثرهای متقابل از جمله اثرهای متقابل بین پروتئین‌ها (PPI)، اثرهای متقابل ناشی از یافته‌های آزمایشگاهی (Experiment)، داده‌های هم‌بیان ژنی (Co-Expression) و داده‌های مربوط به مسیرهای سوخت‌وسازی (متابولیکی) بررسی و درنهایت شبکه موردنظر با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (*Shannon et al.*, 2003) بازسازی شد. گام بعدی تجزیه شبکه با استفاده از نرم‌افزار Network Analyzer (*Assenov et al.*, 2008) بود و درنهایت با استفاده از الگوریتم‌های مختلف از جمله ClusterOne (*Nepusz & Paccanaro*, 2012) و MCOD (*Bader & Hogue*, 2003) ماژول‌های مهم عملکردی شناسایی شد.



شکل ۱. نمودار ggPlot مربوط به نتایج تجزیه داده‌های ریزآرایه (GSE34317) با استفاده از زبان R.

Figure 1. ggPlot related to microarray analysis (GSE34317) using R language.

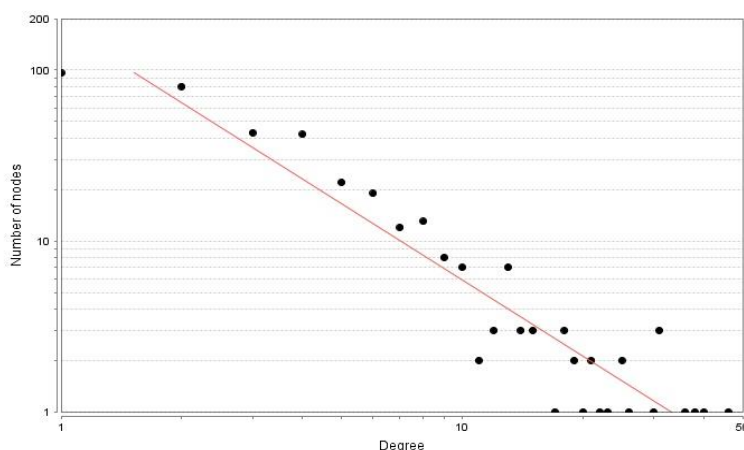
در شکل ۲ آورده شده است. شکل ۲ نشان‌دهنده Scale-Free بودن شبکه بازسازی شده است، چراکه شبکه‌هایی که به صورت تصادفی بازسازی می‌شوند توزیع درجه آزادی گره‌ها به سمت نمودار زنگوله‌ای یا نرمال میل می‌کند. گام بعد یافتن ماژول‌های عملکردی این شبکه بود، چراکه داشتن شبکه کامل و کلی اطلاعات چندانی به دست نمی‌دهد. در مجموع ۲۴ ماژول شناسایی و از این بین ماژول‌هایی که شمار گره‌های بالای ۱۰ و P-value کوچک‌تر از ۰/۰۱ بودند انتخاب شدند. نتیجه به دست آمده شامل شش ماژول اصلی بود. ماژول ۴ به دلیل اینکه نشان‌دهنده مهم‌ترین ماژول و نیز همه ژن‌های موجود در این ماژول در مسیر مولکولی فولیکولونسیز دخیل هستند، انتخاب و در شکل ۳ آورده شده است.

تجزیه داده‌های RNA-Seq

در قسمت تجزیه داده‌های مربوط به RNA-Seq پس از کنترل کیفیت، نقشه یابی، ترکیب خوانش‌ها و بخش سنجش تفاوت بیانی، شمار ۶۵۳ ژن تفاوت بیانی از خود نشان دادند، که پس از در نظر گرفتن حد آستانه تغییر بیان مانند داده‌های ریزآرایه شمار ۱۶۳ ژن شناسایی شدند. این فهرست به‌عنوان مجموعه ژنی شماره دو در نظر گرفته شد.

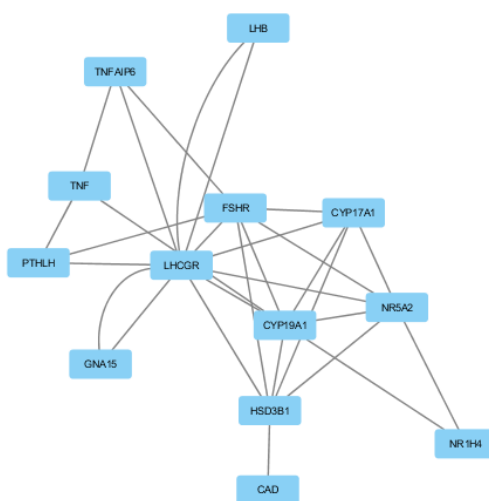
بازسازی شبکه و یافتن ماژول‌های عملکردی

شبکه بازسازی شده در مجموع شامل ۵۳۱ گره و ۹۵۹ یال بود. با تجزیه شبکه میزان ضریب طبقه‌بندی ۰/۱۰۸، قطر ۱۲ و توزیع درجه آزادی گره‌ها شبکه بازسازی شده



شکل ۲. توزیع درجه آزادی گره‌های مربوط به شبکه ژنی اصلی.

Figure 2. Degree of freedom distribution related to main gene network.



شکل ۳. ماژول شماره چهار که ژن‌ها گره‌های ماژول و یال‌ها بیانگر اثرهای متقابل بین گره‌هاست.

Figure 3. Module 4, nodes of module represent the genes and edges represent the interaction between nodes.

برتری‌های استفاده از فولیکول غالب برای شناسایی ژن‌های درگیر در توسعه و رشد فولیکول این است که می‌تواند به‌عنوان مدل در دیگرگونه‌ها و افراد یک‌گونه باشد. فرضیه ما برای شناسایی ژن‌هایی که تفاوت بیان ژنی دارند، به تأیید آماری نرخ بیان ژن‌هایی که تفاوت معنی‌دار ($P < 0.01$) داشتند، متکی است. با استفاده از این معیار در داده‌های مربوط به ریزآرایه DNA شمار ۱۸۴ ژن و در داده‌های مربوط به RNA-Seq، شمار ۱۶۳ ژن تفاوت بیان از خود نشان دادند. در بررسی ما داده‌ها برای فولیکول‌های غالب و زیردست در یک موج فولیکولی گردآوری شده بودند. غلظت بالای مایع فولیکولی استرادیول در فولیکول‌های غالب به‌طور مثبتی با بیان به نسبت بالای mRNA برای ژن‌های گیرنده استروژن، گیرنده LH، آروماتاز، DICE-1 و MCE-1 در یاخته‌های گرانولوزای فولیکول غالب در مقایسه با فولیکول‌های زیردست مرتبط بود. این یافته که mRNA برای ژن آروماتاز و گیرنده LH بسیار بالا بود، برای فولیکول غالب در مقایسه با فولیکول زیردست و سطح mRNA برای گیرنده FSH از یاخته‌های گرانولوزا، یافته‌های گذشته را حمایت می‌کند (Mihm *et al.*, 2003).

کارهای پژوهشی خوبی در حیوانات آزمایشگاهی در زمینه اینکه استرادیول نقش مثبتی در تنظیم فعالیت گنادوتروپین دارد گزارش شده است که شامل افزایش ساخت (سنتز) گیرنده‌های LH هستند (Mihm *et al.*, 2003). در گاو، غلظت استرادیول در فولیکول‌هایی که غالب می‌شوند در مقایسه با دیگر فولیکول‌های زیردست در آغاز موج فولیکولی، بالاست و کمبود تولید استرادیول منجر به مرگ یاخته‌ای در یاخته‌های گرانولوزایی است که پس‌روی می‌کنند (Mihm *et al.*, 2003). غلظت به نسبت پایین استرادیول در فولیکول‌های زیردست همچنین شمار زیاد ژن‌هایی که به‌طور مستقیم در مرگ یاخته‌ای دخیل‌اند در یاخته‌های گرانولوزا از خود بیان بالایی نشان دادند.

در یاخته‌های گرانولوزا تغییر میزان بیان ژن CAD که در تخمدان انسان شناسایی شده است (Mukae *et al.*, 1998) و مسئول تکه‌تکه شدن DNA است، مشاهده شد. از سویی TNF α نقش‌های زیادی درون تخمدان‌ها دارد و یک عامل ابتدایی مرگ یاخته‌ای است که پاسخگویی فولیکول‌های در حال توسعه را نسبت به گنادوتروپین سرکوب می‌کند (Terranova, 1997) و استرادیول وابسته به تولید FSH در یاخته‌های گرانولوزای گاو را محدود می‌سازد (Spicer *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 1994) و همچنین مرگ یاخته‌های گرانولوزای گاو را تسریع می‌کند (Basini *et al.*, 2002). در یاخته‌های گرانولوزای موش و انسان، TNF α (Tumor necrosis Factor α) سطح BCL-2 را کاهش می‌دهد (Sasson *et al.*, 2002) و منجر به افزایش فعالیت کاسپاز و مرگ یاخته‌ای می‌شود. اگرچه سازوکار مرگ یاخته‌ای به‌صورت آبشاری هنوز مشخص نیست، ولی ممکن است شامل تغییر در سیتوکین‌هایی مانند TNF α و شامل مرگ یاخته‌ای تنظیم شونده توسط میتوکندری باشد (Johnson *et al.*, 2002).

افزون بر عامل‌های مرگ یاخته‌ای بالا در یاخته‌های گرانولوزای زیردست، سطح دو عامل COX-1 و P58 (IPK) که بیان بالاتری در فولیکول زیردست نسبت به غالب داشتند، شناسایی شدند. دو هم‌جور (ایزوفرم) برای COX با نام‌های COX-1 و COX-2 وجود دارد که در ساخت پروستاگلاندین نقش دارند. این مشاهده‌ها توصیه می‌کند که شش ماژول شناسایی شده در بررسی ما به‌عنوان نشانگرهایی برای مرحله نهایی تمایز فولیکول و آغاز مرگ یاخته باشد. نتایج بررسی نشان می‌دهد، ژن‌های شناسایی شده به‌عنوان بیان متفاوت در یاخته‌های گرانولوزا تنها ژن‌های مورد هدف استرادیول ممکن است نباشند، اما این ژن‌ها می‌توانند دیگر مسیرهای مهم در فرآیند فولیکولوژنسیز را نیز درگیر سازند. با این وجود یافته‌های ما ممکن است به‌طور مستقل از استرادیول، توسط عامل‌ها و دیگر ژن‌های مؤثر در بلوغ فولیکول مانند ژن‌های گنادوتروپین، اینهیبین و IGF-1 نقش داشته باشند (Rivera *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 2003). به‌طور خلاصه ترکیب اطلاعات

برتری‌های استفاده از فولیکول غالب برای شناسایی ژن‌های درگیر در توسعه و رشد فولیکول این است که می‌تواند به‌عنوان مدل در دیگرگونه‌ها و افراد یک‌گونه باشد. فرضیه ما برای شناسایی ژن‌هایی که تفاوت بیان ژنی دارند، به تأیید آماری نرخ بیان ژن‌هایی که تفاوت معنی‌دار ($P < 0.01$) داشتند، متکی است. با استفاده از این معیار در داده‌های مربوط به ریزآرایه DNA شمار ۱۸۴ ژن و در داده‌های مربوط به RNA-Seq، شمار ۱۶۳ ژن تفاوت بیان از خود نشان دادند. در بررسی ما داده‌ها برای فولیکول‌های غالب و زیردست در یک موج فولیکولی گردآوری شده بودند. غلظت بالای مایع فولیکولی استرادیول در فولیکول‌های غالب به‌طور مثبتی با بیان به نسبت بالای mRNA برای ژن‌های گیرنده استروژن، گیرنده LH، آروماتاز، DICE-1 و MCE-1 در یاخته‌های گرانولوزای فولیکول غالب در مقایسه با فولیکول‌های زیردست مرتبط بود. این یافته که mRNA برای ژن آروماتاز و گیرنده LH بسیار بالا بود، برای فولیکول غالب در مقایسه با فولیکول زیردست و سطح mRNA برای گیرنده FSH از یاخته‌های گرانولوزا، یافته‌های گذشته را حمایت می‌کند (Mihm *et al.*, 2003).

کارهای پژوهشی خوبی در حیوانات آزمایشگاهی در زمینه اینکه استرادیول نقش مثبتی در تنظیم فعالیت گنادوتروپین دارد گزارش شده است که شامل افزایش ساخت (سنتز) گیرنده‌های LH هستند (Mihm *et al.*, 2003). در گاو، غلظت استرادیول در فولیکول‌هایی که غالب می‌شوند در مقایسه با دیگر فولیکول‌های زیردست در آغاز موج فولیکولی، بالاست و کمبود تولید استرادیول منجر به مرگ یاخته‌ای در یاخته‌های گرانولوزایی است که پس‌روی می‌کنند (Mihm *et al.*, 2003). غلظت به نسبت پایین استرادیول در فولیکول‌های زیردست همچنین شمار زیاد ژن‌هایی که به‌طور مستقیم در مرگ یاخته‌ای دخیل‌اند در یاخته‌های گرانولوزا از خود بیان بالایی نشان دادند.

در یاخته‌های گرانولوزا تغییر میزان بیان ژن CAD که در تخمدان انسان شناسایی شده است (Mukae *et al.*, 1998) و مسئول تکه‌تکه شدن DNA است، مشاهده شد. از سویی TNF α نقش‌های زیادی درون تخمدان‌ها دارد و یک عامل ابتدایی مرگ یاخته‌ای است که پاسخگویی فولیکول‌های در حال توسعه را نسبت به گنادوتروپین سرکوب می‌کند (Terranova, 1997) و استرادیول وابسته به تولید FSH در یاخته‌های گرانولوزای گاو را محدود می‌سازد (Spicer *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 1994) و همچنین مرگ یاخته‌های گرانولوزای گاو را تسریع می‌کند (Basini *et al.*, 2002). در یاخته‌های گرانولوزای موش و انسان، TNF α (Tumor necrosis Factor α) سطح BCL-2 را کاهش می‌دهد (Sasson *et al.*, 2002) و منجر به افزایش فعالیت کاسپاز و مرگ یاخته‌ای می‌شود. اگرچه سازوکار مرگ یاخته‌ای به‌صورت آبشاری هنوز مشخص نیست، ولی ممکن است شامل تغییر در سیتوکین‌هایی مانند TNF α و شامل مرگ یاخته‌ای تنظیم شونده توسط میتوکندری باشد (Johnson *et al.*, 2002).

افزون بر عامل‌های مرگ یاخته‌ای بالا در یاخته‌های گرانولوزای زیردست، سطح دو عامل COX-1 و P58 (IPK) که بیان بالاتری در فولیکول زیردست نسبت به غالب داشتند، شناسایی شدند. دو هم‌جور (ایزوفرم) برای COX با نام‌های COX-1 و COX-2 وجود دارد که در ساخت پروستاگلاندین نقش دارند. این مشاهده‌ها توصیه می‌کند که شش ماژول شناسایی شده در بررسی ما به‌عنوان نشانگرهایی برای مرحله نهایی تمایز فولیکول و آغاز مرگ یاخته باشد. نتایج بررسی نشان می‌دهد، ژن‌های شناسایی شده به‌عنوان بیان متفاوت در یاخته‌های گرانولوزا تنها ژن‌های مورد هدف استرادیول ممکن است نباشند، اما این ژن‌ها می‌توانند دیگر مسیرهای مهم در فرآیند فولیکولوژنسیز را نیز درگیر سازند. با این وجود یافته‌های ما ممکن است به‌طور مستقل از استرادیول، توسط عامل‌ها و دیگر ژن‌های مؤثر در بلوغ فولیکول مانند ژن‌های گنادوتروپین، اینهیبین و IGF-1 نقش داشته باشند (Rivera *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 2003). به‌طور خلاصه ترکیب اطلاعات

جمله این ژن‌ها برخی در فرآیند تنظیم مرگ یاخته‌ای در دیگر بافت‌ها نیز دخالت دارند. این دسته ژن‌ها ممکن است نشانگرهایی برای مرحله نهایی تمایز فولیکول و پس از آن انتخاب فولیکول‌های غالب در فرآیند موج‌های فولیکولی باشند. در این تحقیق ماژول‌های مهمی مرتبط با ژن‌هایی که در مسیرهای مرگ یاخته‌ای هستند شناسایی شدند، همچنین سازوکار ژن‌ها که ممکن است توسط عامل‌های اندوکرین داخل تخمدان‌ها نیز تنظیم شوند، تا حدودی روشن شد. نتیجه کلی به‌دست‌آمده از این تحقیق شامل شناسایی ۲۸۳ ژن یا گروه در شبکه اصلی تنظیم فولیکولوژنسیز و شمارش ماژول مهم و عملکردی با ژن‌هایی است که در مسیرهای مختلف یاخته‌ای مانند تکثیر، تمایز، مرگ یاخته‌ای و غیره می‌توانند نقش داشته باشند.

از پایگاه داده‌ای مختلف راهی سریع و قابل اتکا برای ارزیابی تفاوت بیان ژن‌های متنوع در بافت‌های مختلف از جمله تخمدان و فولیکول است. هورمون‌های LH و FSH به گیرنده‌هایشان روی یاخته‌های گرانولوزای فولیکول غالب باند می‌شوند که در نتیجه آن میزان آروماتاز و تولید استرادیول و گیرنده‌های استرادیول را افزایش می‌دهند. ژن‌های درگیر در فرآیندهای از این قبیل می‌توانند از جمله ژن‌های هدف در این بررسی باشند.

نتیجه‌گیری کلی

ترکیب اطلاعات ریزآرایه و RNA-Seq در به دست آوردن ژن‌هایی که تفاوت بیانی نشان داده‌اند، به‌طور موفقیت‌آمیزی ۲۸۳ ژن را در یاخته‌های گرانولوزای فولیکول‌های غالب و زیردست شناسایی کرد، که از

REFERENCES

1. Amsterdam, A., Gold, R. S., Hosokawa, K., Yoshida, Y., Sasson, R., Jung, Y. & Kotsuji, F. (1999). Crosstalk among multiple signaling pathways controlling ovarian cell death. *Trends Endocrinology Metabolism*, 10, 255-262.
2. Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
3. Assenov, Y., Ram, F., Schelhorn, S.E., Lengauer, T. & Albrecht, M. (2008). Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 24, 282-284.
4. Austin, E. J., Mihm, M., Evans, A. C. O., Knight, P. G., Ireland, J. L. H., Ireland, J. J. & Roche, J. F. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 64, 839-848.
5. Bader, G. D. & Hogue, C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2.
6. Baerwald, A. R., Adams, G. P. & Pierson, R. A. (2003). Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction*, 69, 11-31.
7. Basini, G., Mainardi, G. L., Bussolati, S. & Tamanini, C. (2002). Steroidogenesis, proliferation and apoptosis in bovine granulosa cells: role of tumour necrosis factor- α and its possible signalling mechanisms. *Reproduction and Fertility Development*, 14, 141-150.
8. Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J. & Nekrutenko, A. (2010). Galaxy Team. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-5.
9. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-2120.
10. Du, P., Kibbe, W. A. & Lin, S. M. (2008). 'lumi: a pipeline for processing Illumina microarray', *Bioinformatics*, 24, 1547-1548
11. Ginther, O. J., Kastelic, J. P. & Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 20, 187-200.
12. Ginther, O. J., Beg, M. A., Donadeu, F. X. & Bergfelt, D. R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, 78, 239-257.
13. Goodman, A. L. & Hodgen, G. D. (1983). The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Hormone Research*, 39, 1-67.
14. Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Harland, M. L. & Morris, S. E. (2014). Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. *BMC Genomics*, 15, 40.
15. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocol*, 4(1), 44-57.

16. Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G. & Roche, J. F. (2000). Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science*, 83, 1648-1658.
17. Ireland, J. J. & Richards, J. S. (1978). Acute effects of estradiol and follicle-stimulating hormone on specific binding of human [125I]iodo-follicle-stimulating hormone to rat ovarian granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology*, 102, 876-883.
18. Johnson, A. L. (2003). Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, 78, 185-201.
19. Johnson, A. L. & Bridgham, J. T. (2002). Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*, 124, 19-27.
20. Kim, D., Perteau, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), pp. R36.
21. Mihm, M. & Bleach, E. C. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 217-237.
22. Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E., Ireland, J. L., Knight, P. G., Roche, J. F. & Ireland, A. J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, 63, 811-819.
23. Montojo, J., Zuberi, K. & Rodriguez, H. (2014). GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *FI000Research*, 3, 153.
24. Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H. & Nagata, S. (1998). Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9123-9128.
25. Nepusz, T., Yu, H. & Paccanaro, A. (2012). Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks. *Nature Methods*, 9, 471-472.
26. Paul, D., Thomas, M. J., Campbell, A., Kejarawal, H. M., Brian, K., Robin, D., Karen, D., Anushya, M. & Apurva N. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, 13, 2129-2141.
27. Pru, J. K. & Tilly, J. L. (2001). Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Molecular Endocrinology*, 15, 845-853.
28. Rao, J. U., Shah, K. B., Puttaiah, J. & Rudraiah, M. (2011). Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events. *PLoS ONE*, 6:e20754.
29. Rice, V. M., Williams, V. R., Limback, S. D. & Terranova, P. F. (1996). Tumour necrosis factor- α inhibits follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell oestradiol secretion in the human: dependence on size of follicle. *Human Reproduction*, 11, 1256-1261.
30. Richards, J. S. (2001). Perspective: the ovarian follicle—a perspective in 2001. *Endocrinology*, 142, 2184-2193.
31. Richards, J. S., Ireland, J. J., Rao, M. C., Bernath, G. A., Midgley, A. R. Jr. & Reichert, L. E. Jr. (1976). Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology*, 99, 1562-1570.
32. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.
33. Rivera, G. M. & Fortune, J. E. (2003). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*, 144, 2977-2987.
34. Sasson, R., Winder, N., Kees, S. & Amsterdam, A. (2002). Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF α and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 51-59.
35. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-504.
36. Spicer, L. J. & Alpizar, E. (1994). Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells *in vitro*: dependence on size of follicle. *Domestic Animal Endocrinology*, 11, 25-34.
37. Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 838-848.
38. Terranova, P. F. (1997). Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology*, 14, 1-15.

39. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J. & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511-515.
40. Walsh, S. W., Mehta, J. P, McGettigan, P. A. & Browne, J. A. (2012). Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiology Genomics*, 44, 504-17.