

مقاله پژوهشی:

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی غنی سازی مجموعه های ژنی در حد فاصل مراحل تسهیم و بلاستوسیت توسعه جنینی گاو با استفاده از داده های ریز آرایه DNA

پیمان خواجه غیائی^۱، مهدی امین افشار^{۲*}، مصطفی قادری-زفراهی^{۳*}، ناصر امام جمعه کاشان^۴ و محمودهنرور^۵
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۴. استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸)

چکیده

به منظور درک علل مرگ و میر و همچنین قابلیت زنده مانی جنین گاو، شناخت مسیرهای متابولیکی و الگوهای بیان مجموعه ژنی مرتبط با مراحل حد فاصل تسهیم و بلاستوسیت ضروری به نظر می رسد. با این انگیزه در این پژوهش مجموعه های ژنی غنی سازی شده از یک سلول تخم تا مرحله ۱۶ سلولی و بلاستوسیت در توسعه جنینی گاو مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، داده های خام ریز آرایه DNA از پایگاه داده GEO با دسترسی آزاد، پیاده سازی شدند. سپس، کاوشگرهای متفاوت بیان، با استفاده از نرم افزار برخط agriGO v2.0 و به روش تحلیل غنی سازی تکین (SEA)، غنی سازی شدند. نتایج این تحقیق به طور خلاصه، نشان داد که در مجموع، تعداد ۵ ژن: KRT8، CLDN6، PLAC8، FN1، KRT18 با الگوی کاهش بیان، بیشترین میزان تفاوت بیان را نشان دادند ($P \leq 0.05$). همچنین، در تجزیه و تحلیل SEA، ۳۹ مجموعه ژنی در مسیر فرآیندهای زیستی از جمله متابولیسم مولکولی مختلف شامل یون منگنز، tRNA، فعالیت های اکسیداسیون سیتوکروم C، فاکتور آغازین ترجمه، ATP و فعالیت ATPase و در سطح مولفه های سلولی ۱۲ مجموعه ژنی از جمله غشای وزیکول های سیتوپلاسم، غشای شبکه اندوپلاسمیک، میکروتوبول و اسپیندل ها و غشای پلاسمائی بیشترین غنی سازی ($P \leq 0.05$) را نشان دادند. به عنوان نتیجه گیری کلی، مجموعه های ژنی غنی سازی شده در بلاستوسیت نشان دهنده، آغاز فرآیند تمایز بین سلول ها و انتقال از حالت بلاستوسیت به سمت فرآیند لانه گزینی است. در نهایت، چنین به نظر می رسد که تفاوت الگوی بیان مجموعه های ژنی و برهمکنش آن ها در این مرحله احتمالاً به زنده ماندن یا تحلیل جنین ختم می شود.

واژه های کلیدی: بلاستوسیت، تسهیم، غنی سازی مجموعه های ژنی، گاو، لقاح.

Bioinformatics analysis of gene sets enrichment between bovine embryonic cleavage and development blastocysts using DNA microarray data

Peyman Khajeh Ghiassi¹, Mehdi Amin Afshar^{2*}, Mostafa Ghaderi-Zefrehei^{3*}, Nasser Emam Jomeh Kashan⁴ and Mahmood Honarvar⁵

1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

4. Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

5. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Qods City Branch, Tehran, Iran

(Received: Nov. 28, 2021 - Accepted: Jan. 8, 2022)

ABSTRACT

In order to understand the causes of bovine embryo mortality and viability, it is necessary to identify different pathways between the embryonic fission and the blastocyst. The enriched sets of genes from a bovine embryonic cell to a 16-cell and blastocyst stage were examined. The raw DNA microarray data was downloaded from the GEO database. Then differentially expressed probes were enriched with the online software agriGO v2 by means of singular enrichment analysis (SEA). The results of this study showed that a total of 5 genes with increased expression, including KPNA7, RGS2, TESC, MLLT11, BMP15 and 5 genes with decreased expression, including KRT8, CLDN6, PLAC8, FN1, KRT18 had the highest differentially expressed pattern ($P \leq 0.05$). In addition, 39 gene sets in various molecular metabolic pathways, including NADP metabolism, tRNA, ATP, phospholipid catabolism, apoptosis and cell growth, glycolysis, mitosis; 13 gene sets on the path of molecular functions, including manganese ion, RRNA, cytochrome C oxidation activities, translation primers, ATP and ATPase activity and at the level of the cellular components of 12 gene sets on the path of the cytoplasmic caveosicle membrane, endoplasmic reticulum membrane, microtubules and Spindles and plasma membrane showed the highest enrichment ($P \leq 0.05$). As a result, the gene sets enriched with blastocysts indicate the beginning of cell differentiation and the transition from the blastocyst state to the implantation process. Ultimately, at this stage, gene sets are expressed, the interaction of which is likely to result in the survival or analysis of the embryo.

Keywords: Blastocyst, Cleavage, Gene Sets Enrichment, Cattle, Fertilization.

* Corresponding author E-mail: mghaderi@yu.ac.ir

مقدمه

امروزه، از مفهوم قابلیت رشد و بلوغ یک تخمک پس از لقاح و تولید فرزندان طبیعی، زنده و بارور به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Duranthon *et al.*, 2001). از آنجاییکه، تخمک‌گذاری و لقاح آزمایشگاهی به راحتی در گونه‌های متعدد انجام می‌شود، این مفهوم، نشان‌دهنده ویژگی‌هایی است که در مراحل نهایی تمایز تخمک اتفاق می‌افتد و برای رشد و توسعه در فرآیندهای بعدی ضروری است (Duranthon *et al.*, 2001). در واقع، بلوغ تخمک در مراحل تسهیم از پروفاز I میوز تا متافاز II میوز رخ می‌دهد. بلوغ هسته-ای، توانایی هسته تخمک برای آغاز تقسیم میوز و رسیدن به مرحله متافاز II میوز است (Duranthon *et al.*, 2001). این مراحل، به راحتی در زیر میکروسکوپ معمولی قابل مشاهده است. اما، توانایی بلوغ سیتوپلاسمی را نمی‌توان تنها با نوع سازماندهی اندامک‌های سیتوپلاسمی مشخص نمود. بلوغ سیتوپلاسمی هنوز، در سطح مولکولی به خوبی درک نشده است (Adjaye *et al.*, 2007). با این وجود، مفهوم بلوغ سیتوپلاسمی اغلب، در انتخاب یک تخمک مناسب برای تبدیل شدن به جنین استفاده می‌شود. پیشرفت‌های زیست‌شناسی مولکولی امکان اندازه-گیری‌های کمی برای تعیین صلاحیت یک سلول تخم برای تبدیل شدن به جنین را فراهم نموده است (Adjaye *et al.*, 2007). هم‌اکنون روش‌ها و ابزارهای مناسبی برای تعیین سهم سیتوپلاسم تخمک در سرنوشت جنین وجود دارد، اما این ابزارها به دلیل مقدار کم مواد موجود در تخمک‌ها و تهاجمی بودن روش‌های اندازه‌گیری، دارای محدودیت‌هایی هستند. رشد جنین قبل از لانه‌گزینی^۱ (PED) در پستانداران با لقاح شروع و با لانه‌گزینی رویان در آندومتر رحم خاتمه می‌یابد (Adjaye *et al.*, 2007). در لحظه لقاح، سیتوپلاسم رویان شامل ترانسکریپتوم باقی مانده مادری است. پس از چند تقسیم سلولی، ترانسکریپتوم مادری به‌طور ویژه تخریب می‌شود و با رونویسی توسط هسته دیپلوئید جدید که شامل ژن‌های والدینی

است، جایگزین می‌شود. این مرحله گذار، فعال‌شدن ژنوم رویان^۲ (ZGA) نام دارد. زمان ZGA و تخریب ترانسکریپتوم مادری در بین گونه‌ها متفاوت است، در انسان و گاو بین مرحله چهار و هشت سلولی رخ می‌دهد، در حالیکه در موش، این انتقال بین مرحله یک و دو سلولی اتفاق می‌افتد (Adjaye *et al.*, 2007; Kues *et al.*, 2008).

پس از لقاح و هنگام عبور رویان از لوله رحم، تسهیم اتفاق می‌افتد. در اولین تقسیم، رویان دو سلولی است. در تقسیمات بعدی با افزایش تعداد، اندازه سلول‌ها کوچک‌تر شده و سلول‌های حاصل را بلاستومر می‌نامند. پس از سه بار تسهیم بلاستومر هشت سلولی می‌شود تا این مرحله سلول‌ها آزاد هستند. پس از این مرحله بلاستومرها متراکم شده و با اتصالات محکم به یکدیگر می‌چسبند. این رویداد در اکثر پستانداران معمولاً بین مرحله ۸ و ۱۶ سلولی اتفاق می‌افتد (Ogawa *et al.*, 2008). پس از تراکم، رویان را مورولا می‌نامند. رویداد مهم دیگری که در این زمان اتفاق می‌افتد، در واقع، اولین تمایز و تخصصی شدن سلول‌ها است. نتیجه تراکم و تمایز سلول‌ها تشکیل کره‌ای است که از دو نوع سلول و یک حفره داخلی بنام حفره‌ی بلاستوسیست تشکیل شده است. حداقل دو نوع سلول را می‌توان در بلاستوسیست متمایز کرد: توده سلولی داخلی^۳ و یک لایه بیرونی به نام تروفوبلاست که منشا تشکیل جفت خواهد بود. توده سلولی داخلی منشأ تشکیل هر سه لایه موجود در بافت‌های حیوانات است. سلول‌های بنیادی جنین از توده سلولی داخلی مشتق می‌شوند. در تجزیه و تحلیل سازوکارهای مولکولی از سلول‌های بنیادی جنین به‌عنوان سلول‌های جایگزین توده سلولی داخلی و جنین قبل از جایگزینی استفاده می‌شود (Ogawa *et al.*, 2008). سپس، تروفوبلاست به بافت آندومتر رحم متصل می‌شود و در آن فرو می‌رود به این فرآیند لانه‌گزینی می‌گویند. در زمان لانه‌گزینی، بلاستوسیست از حدود ۱۵۰ سلول تشکیل شده است (Gossler, 1992). فرآیند PED در بین

2. Zygote Genome Activation
3. Inner Cell Mass - Embryoblast

1. Preimplantation Embryonic Development

زیست‌شناسی (از جمله فرایند بیوساخت سلولی، اکسیداسیون و احیا، فرایند متابولیک چربی سلولی، رونویسی و تنظیم فرآیند متابولیک RNA) بیش بیانی حاصل شده است. در جنین‌های درون تنی ۱۳ روزه ۱۳۳ ژن افزایش بیان و ۱۵۵ ژن کاهش بیان داشتند. تجزیه و تحلیل اصطلاحات GO برای DEGs، ژن‌های بیشتری را در فرآیند موجودات چند سلولی، سازوکار تکامل، فرایند تکامل سلولی، تنظیم کاهشی فرآیند سلولی و پاسخ به محرک‌های خارجی، نشان داد (Clemente *et al.*, 2011).

ژن PHLDA2 (یا TSSC3) در جنین‌های در حال تحلیل، با الگوی بیان متفاوت ظاهر می‌شود (Huang *et al.*, 2010). این ژن، با مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) مرتبط است و از نظر سلسله مراتبی با توسعه سرطان ارتباط دارد. البته هنوز به درستی نقش PHLDA2 در گاو شناسایی نشده اما، بیش بیانی این ژن در موش سبب نارس ماندن جفت جنین می‌شود (Salas *et al.*, 2004) و از طرفی حذف ژن PHLDA2 در موش، رشد بیش از حد جفت را در پی خواهد داشت (Frank *et al.*, 2002). ژن دیگری که در جنین‌های در حال تحلیل نسبت به بلاستوسیست‌ها تفاوت بیان نشان داد، TGFBR3 بود. این ژن یکی از سه نوع گیرنده TGF-beta و تنظیم‌کننده پیوند لیگاند TGF-beta به گیرنده‌های نوع ۱ و ۲ است. اگرچه در این پژوهش TGFBR3 از نقطه برش FDR عبور نکرد. اما، در پژوهش‌های دیگر مسیر پیام‌دهی TGF-beta به طور معنی‌داری با رشد طبیعی جنین‌ها در ارتباط است (Jones *et al.*, 2006). نقش ارتباطات سلولی و مسیرهای ساخت استروئیدها در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، فضای بین اتصالات و ارتباطات سلولی تأثیر معنی‌داری بر رشد اولیه جنین دارد (Wei *et al.*, 1999; Boni *et al.*, 2004). اما، برای گذر از مرحله مرولا به بلاستوسیست چندین هورمون استروئیدی (از جمله استروژن و پروژسترون) مورد نیاز است (Paria *et al.*, 1984; Niemann & Elsaesser, 1986). استفاده از حیوانات به‌عنوان دهنده تخمک قبل از بلوغ، پتانسیل قابل توجهی در کوتاه کردن فاصله نسل، بهبود ژنتیکی

پستانداران بسیار محافظت شده است و از نظر ریخت‌شناسی اتفاقات یکسانی رخ می‌دهد. شاید مهمترین تفاوت بین گونه‌های مختلف، زمان رخداد هر مرحله است. تفاوت‌های بین گونه‌ای قابل توجه بعد از مرحله بلاستوسیست ظاهر می‌شود (Gossler, 1992). به‌طور مثال، در گاو بلاستوسیست‌ها فرایند گاسترولاسیون را قبل از لانه‌گزینی و تشکیل جفت و کیسه زرده آغاز می‌کنند. رشد و توسعه سلول تخم تا مرحله بلاستوسیست و قبل از لانه‌گزینی در گونه‌های مختلف به سهولت در شرایط آزمایشگاهی قابل اجرا است. اما، رسیدن به این مرحله شامل رویدادهای بیولوژیکی بسیار پیچیده‌ای است (Gossler, 1992). اولین مورد پیوستن سلول‌ها به یکدیگر و تراکم در مرحله تسهیم است که در همه گونه‌ها با بیان پروتئین کاده‌رین E (Cadherin E) اتفاق می‌افتد (Fleming *et al.*, 1994). کاده‌رین E مولکولی وابسته به کلسیم است که نقش اتصالات و متراکم شدن توده سلولی را برعهده دارد. موقعیت سلول تخم در طول دوره تسهیم و ارتباطات سلولی امکان تخصیص سلول‌های بیرونی به تروفوبلاست (Johnson *et al.*, 1981) و سلول‌های داخلی به توده سلولی داخلی را فراهم می‌سازد. به نظر می‌رسد موقعیت مکانی توده سلولی داخلی نقش اساسی در فرایندهای تمایز به عهده دارد (Weber *et al.*, 1999). این رویدادها بر بیان متفاوتی از ژن‌ها توسط ژنوم جنینی و تا حدودی بر توارث سیتوپلاسمی مادر تکیه دارند (Brunet *et al.*, 2001). در پژوهشی الگوی بیان ژن در بلاستوسیست‌ها، در دو حالت درون‌تنی (*in Vivo*) و برون‌تنی (*in Vitro*) مورد مقایسه قرار گرفته است. در این پژوهش تعداد ۵۰ ژن در بلاستوسیست ۷ روزه و تعداد ۲۲۸ ژن در بلاستوسیست ۱۳ روزه تفاوت الگوی بیان^۱ (DEG) نشان دادند. از مجموع، ۵۰ ژن DEG، ۱۹ ژن در جنین درون تنی افزایش بیان و ۳۱ ژن کاهش بیان داشتند. در همین پژوهش، تجزیه و تحلیل اصطلاحات هستی‌شناسی ژن (GO) با استفاده از فهرست DEG‌های به‌دست آمده، نشان داد که در ۲۶ فرآیند

بستر Affymetrix به نرم‌افزار برخط (v2.0) agriGO منتقل و غنی‌سازی به روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی تکین (SEA) با استفاده از توزیع فوق هندسی انجام شد ($P \leq 0.05$).

نتایج و بحث

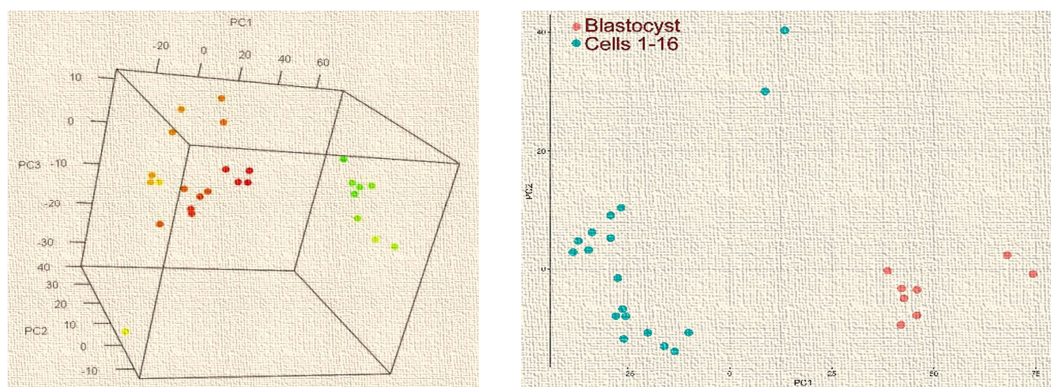
ابزارهای غنی‌سازی را میتوان به سه گروه شامل تجزیه و تحلیل غنی‌سازی تکین^۱ (SEA)، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی (GSEA) و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مدولار (MEA) تقسیم نمود (Huang *et al.*, 2009). مرسوم‌ترین روش غنی‌سازی، SEA است که واژگان حاشیه نویسی را به‌صورت چرخشی و یک به یک در برابر فهرستی از ژن‌های مورد نظر برای غنی‌سازی آزمون می‌کند. مقدار p غنی‌سازی از مقایسه فراوانی مشاهده شدن یک عبارت حاشیه نویسی، با فراوانی مورد انتظار آن محاسبه می‌شود. هر اصطلاحی که شرایط نقطه برش (به‌عنوان مثال $p\text{-value} < 0.05$) را داشته باشد غنی شده تلقی می‌شود. SEA یک روش ساده و کارآمد برای استفاده است (Huang *et al.*, 2009). ابزارهایی که از SEA استفاده می‌کنند (به‌عنوان مثال Onto-Express، GStat 2.0، FuncAssociate، BiNGO، EasyGO و agiGO v2.0) بیشتر از پایگاه هستی‌شناسی ژن GO به‌عنوان منبع واژگان حاشیه نویسی بهره می‌برند. با توجه به این مطلب که تعداد کم حیوانات یا نمونه‌ها می‌تواند نتایج تحقیق را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین، در این تحقیق احتمال افزایش تشخیص ژن‌های مثبت کاذب و از دست رفتن ژن‌های پاسخ دهنده در مراحل حیات رویان وجود دارد.

در نتیجه، آزمون t بین دو گروه مورد بررسی (رویان ۱ تا ۱۶ سلولی و بلاستوسیست) و غربال کاوشگرها با دو معیار $FDR \leq 0.05$ و (fold change) $|\log_2FC| \geq 1$ ، در مجموع ۱۹۵۶ کاوشگر در مرحله بلاستوسیست نسبت به مرحله تسهیم (۱ تا ۱۶ سلول) بیان متفاوت نشان دادند ($FDR \leq 0.05$). از این تعداد ۵۸۱ کاوشگر افزایش بیان و ۱۳۷۵ کاوشگر کاهش بیان داشتند (شکل ۲).

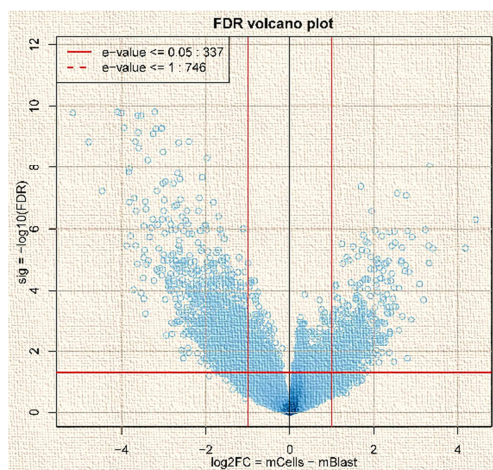
سریعتر و افزایش طول دوره تولید در دام‌های اهلی فراهم می‌کند. در این پژوهش، ما مجموعه‌های ژنی غنی‌سازی شده در مراحل PED را از یک سلول تخم تا مرحله ۱۶ سلولی و بلاستوسیست مورد بررسی قرار می‌دهیم. از طرفی، اینگونه پژوهش‌ها درک بهتری از سازوکارهای تولید مثلی در سطح مولکولی در اختیار پژوهش‌گر قرار می‌دهد و به‌عنوان یک ابزار کمک تولید مثلی، پژوهش‌هایی از این دست می‌تواند به کاهش فاصله ژنتیکی و در نهایت بهبود پیشرفت ژنتیکی کمک کند.

مواد و روش‌ها

برای انجام پژوهش مورد نظر، ابتدا داده‌های خام ریزآرایه DNA مربوط به رویان گاو از پایگاه داده با دسترسی آزاد GEO از زیرمجموعه تارنمای NCBI، با شماره دسترسی‌های: GSE18290 و GSE24596 در بستر GPL2112 (Affymetrix Bovine Genome Array)، پیاده‌سازی و با استفاده از بسته Limma در نرم‌افزار R (version 4.1.1) خوانش شدند. بعد از پیش‌ویرایش داده‌ها، از مجموع ۲۸ نمونه ۱۸ نمونه رویان ۱ تا ۱۶ سلولی و ۸ نمونه در مرحله بلاستوسیست انتخاب شدند. داده‌های مزبور با استفاده از روش توسعه داده شده توسط Beiki *et al.*, 2016 با یکدیگر تلفیق شدند. کاوشگرهای متفاوت بیان شده با استفاده از آزمون t بین دو گروه مورد بررسی در نرم‌افزار R و دو معیار $FDR \leq 0.05$ و $|\log_2FC| \geq 1$ به‌دست آمدند. به منظور بررسی الگوهای بیان ژن مشابه، تحلیل خوشه‌بندی سلسله مراتبی پس از محاسبه فاصله اقلیدسی با استفاده از تابع K-Means در R و با ۷ خوشه بر روی کاوشگرهای متفاوت بیان انجام شد. تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) برای کنترل کیفی نمونه‌ها و بررسی تفاوت بین نیم‌رخ دو گروه سلول رویان در مرحله یک تا ۱۶ سلول (تسهیم) و مرحله بلاستوسیست انجام شد (شکل ۱). با استفاده از نرم‌افزار برخط DAVID 6.8 کاوشگرهای متفاوت بیان بر روی فایل حاشیه نویسی ژنوم گاو نگاشت داده شد و نام و شناسه ژن‌ها استخراج شدند (۲۰۷ کاوشگر شناسایی نشد). فهرست کاوشگرهای متفاوت بیان بر



شکل ۱. نمودار پراکنش تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA)
Figure 1. Distribution diagram of principal component analysis (PCA)



شکل ۲. نمودار آتشفشانی مربوط به شناسایی کاوشگرهای متفاوت بیان ($P \leq 0.05$).
Figure 2. Volcano diagram for the identification of different expression probes ($P \leq 0.05$).

بزرگ مولکول‌ها از طریق این منافذ به پروتئین‌های حامل موسوم به کاریوفرین (Karyopherin) شامل ایمپرتین (Importins) و اکسپرتین (Exportins) نیاز دارد. از اعضای این خانواده، ایمپرتین آلفا، می‌تواند با ایمپرتین بتا، هتروداایمر تشکیل دهند. در این هتروداایمر، ایمپرتین بتا واسطه ارتباط با منافذ هسته است، در حالی که ایمپرتین آلفا به‌عنوان یک رابط پروتئینی به پیام‌های محلی هسته (NLS) متصل می‌شود (Moroianu *et al.*, 1996). تفاوت الگوی بیان این ژن احتمالاً نشان‌دهنده شدت نقل و انتقال ماکرومولکول‌ها در غشای هسته در مرحله بلاستوسیست است. ژن RGS2 (regulator of G protein signaling) ۱۱ اگزون (2) ۵ اگزون داشته و روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد. این ژن کد کننده پروتئینی با ۲۱۱ آمینو اسید است.

با نداشت کاوشگرهای متفاوت بیان بر روی فایل حاشیه نویسی ژنوم گاو با استفاده از نرم‌افزار برخط DAVID 6.8 نام و شناسه ۱۷۴۹ ژن استخراج شد (۲۰۷) کاوشگر شناسایی نشد). این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کاندید در نظر گرفته شدند. فهرست ۱۰ ژن با بیشترین تفاوت بیان (۵ ژن با افزایش بیان RGS2, KPNA7, BMP15, MLLT11, TESC و ۵ ژن با کاهش بیان KRT18, FN1, PLAC8, CLDN6, KRT8 در مرحله بلاستوسیست در جدول ۱، ارائه شده است. ژن KPNA7 (karyopherin subunit alpha 7) کدکننده پروتئین با ۵۲۲ آمینو اسید و ۱۱ اگزون است که بر روی کروموزوم ۲۵ قرار دارد. نقش اصلی آن نقل و انتقال بزرگ مولکول‌ها بین هسته و سیتوپلاسم از طریق منافذ هسته است. انتقال فعال

جدول ۱. ژن‌های با الگوی بیان متفاوت (n=10) در مرحله بلاستوسیسیت.

Table 1. Different expression genes (n = 10) in the blastocyst stage.

ProbeName	Gene	Description	log2FC	AdjP-Value
Bt.25374.1.A1_at	KPNA7	Karyopherin subunit alpha 7	4.423798	5.09E-07
Bt.10855.1.S1_at	RGS2	Regulator of G-protein signaling 2	4.178549	4.19E-06
Bt.18080.3.A1_at	TESC	Tescalcin	3.40824	4.39E-06
Bt.3735.1.A1_at	MLLT11	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage Leukemia; translocated to, 11	3.329412	8.54E-09
Bt.22954.1.S1_at	BMP15	Bone morphogenetic protein 15	3.314015	1.29E-05
Bt.23608.1.S1_s_at	KRT8	Keratin 8	-5.16312	1.64E-10
Bt.24617.1.A1_at	CLDN6	Claudin 6	-4.78228	1.44E-09
Bt.21883.1.S1_at	PLAC8	Placenta-specific 8	-4.4626	5.91E-08
Bt.23418.1.S1_at	FN1	Fibronectin 1	-4.09489	1.50E-10
Bt.1745.1.S1_at	KRT18	Keratin 18	-4.01235	1.64E-10

مقادیر مثبت نشان‌دهنده افزایش بیان و مقادیر منفی نشان‌دهنده کاهش بیان است.

Positive values indicated upregulate and negative values indicate down regulate.

(Levay & Slepak, 2010). در واقع اولین تمایز سلولی در مرحله بلاستوسیسیت اتفاق می‌افتد و افزایش بیان چنین ژن‌هایی دور از انتظار نیست.

ژن MLLT11 (transcription factor 7 cofactor) دارای ۴ اگزون است، روی کروموزوم ۳ قرار دارد و پروتئینی با ۹۰ اسید آمینه را کد می‌کند. در سطح پروتئین، AF1q/MLLT11 به شدت در تیموس و تمام رده‌های سلولی سرطان خون بیان می‌شود و در هنگام تمایز عصبی تفاوت بیان فاحشی نشان می‌دهد (Co et al., 2010). عملکرد دقیق AF1q هنوز مشخص نشده اما به طور خاص به TCF7 (T-cell-factor-7) در مسیر پیام‌دهی Wnt متصل می‌شود و منجر به فعال شدن رونویسی CD44 (یک گلیکوپروتئین سطح سلولی است که در برهم‌کنش‌های سلولی، چسبندگی سلولی و نقل و انتقال نقش دارد) و همچنین چندین هدف پایین دست TCF7/LEF1 می‌شود (Park et al., 2015). مسیرهای Wnt تکثیر و تمایز سلولی را تنظیم می‌کنند. فاکتورهای سلول T (T-cell factor-TCF) و فاکتورهای افزایش‌دهنده لنفوئید (lymphoid enhancer factor-LEF) از خانواده فاکتورهای رونویسی هستند و واسطه‌های هسته‌ای مهم در پیام‌دهی متعارف Wnt/ β -catenin در زمان رشد قلب هستند. اعضای خانواده TCF/LEF با تنظیم زمانی و مکانی در بلوغ قلب نقش دارند (Ye et al., 2019).

ژن BMP15 (Bone morphogenetic protein) بر روی کروموزوم x قرار گرفته، ۲ اگزون دارد و ۳۹۴ آمینو اسید را کد می‌کند. BMP بخشی از فوق خانواده فاکتور رشد بتا (Transforming growth

عضوی از خانواده RGS و زیرخانواده B/R4 است و گروهی از پروتئین‌ها با عملکردهای متنوع را تشکیل می‌دهند که رویدادهای پیام‌دهی سلولی را در پایین دست گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G (GPCRs) تنظیم می‌کنند (Abramow et al., 2006). پیام‌دهی زمانی آغاز می‌شود که GPCRها به لیگندهای خود متصل می‌شوند و باعث جایگزینی GDP باند شده به زیر واحد G-alpha (زیر واحد پروتئین هتروتراپمیریک G) با GTP می‌شود. RGSها پیام‌های انتقال الکترون را از طریق افزایش فعالیت GTPase موجود در زیر واحد آلفای پروتئین G، مهار می‌کنند. در نتیجه آن‌ها را به شکل غیرفعال به فرم باند شده با GDP تبدیل می‌کنند. به همین علت، آن‌ها را پروتئین‌های فعال کننده GTPase (GAPs) می‌نامند.

ژن تسکالین (Tescalcin-TESC) از ۸ اگزون تشکیل شده و بر روی کروموزوم ۱۷ قرار گرفته است. ژن TESC، ۲۳۴ آمینو اسید را رمزگذاری می‌کند و یک-EF-hand است که به خانواده بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم تعلق دارد. EF-hand یک دومین مارپیچ-حلقه-مارپیچ است و ساختار آن شبیه دو انگشت شست و اشاره انسان است. این پروتئین، یون‌های کلسیم را توسط لیگندهای داخل حلقه خود احاطه می‌کند. تسکالین در تمایز سلول‌های بنیادی و تبدیل آن‌ها به سلول‌های تولیدکننده پلاکت در مغز استخوان (Megakaryocyte) نقش مهمی ایفا می‌کند (Ukarapong et al., 2012). در مجموع، تسکالین یکی از محصولات ژنی کلیدی است که در تغییر برنامه تمایز در برخی از انواع سلول‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند

همچنین هتروپلیمرها را با یکدیگر، در داخل و بین رشته‌ها به صورت مستحکم متصل می‌کنند (Furuse *et al.*, 1999) یکی از رویدادهای مرحله بلاستوسیت برقراری اتصالات محکم بین سلول‌ها است.

ژن PLAC8 (Placenta associated 8) روی کروموزوم ۶ قرار داشته، ۵ اگزون دارد و ۱۱۶ آمینو اسید را کد می‌کند و گروهی از پروتئین‌های غنی از سیستئین، از جمله کورنیفلین (cornifelin) و PLAC8 را تولید می‌کند (Guo *et al.*, 2010). کورنیفلین بخشی از پوشش شاخی نامحلول سلول (CE) است که قطعات پولکی اپیتلیوم را تشکیل می‌دهند (Michibata *et al.*, 2004). PLAC8 برای تمایز سلول‌های تخصصی ذخیره چربی در شرایط آزمایشگاهی و کنترل تعداد سلول‌ها در موجود زنده مورد نیاز است (Jimenez *et al.*, 2012).

ژن FN1 (fibronectin 1) روی کروموزوم ۲ قرار داشته، ۴۶ اگزون دارد و ۲۴۷۸ آمینو اسید را کد می‌کند. تا کنون ۱۲ رونوشت برای این ژن شناسایی شده است. این ژن، فیبرونکتین را کد می‌کند، گلیکوپروتئینی که به شکل دایمر و محلول در پلاسما و همچنین به صورت دایمری یا چندمری در سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی حضور دارد. فیبرونکتین در چسبندگی و فرایندهای مهاجرت سلول‌ها از جمله رویان‌زایی، ترمیم زخم، انعقاد خون، و متاستاز نقش دارد. این ژن دارای سه ناحیه قابل جایگزینی است و پتانسیل تولید ۲۰ نوع رونوشت مختلف را دارد و حداقل یکی از آن‌ها ایزوفرمی که در فرایندهای پروتئولیتیکی شرکت می‌کند را رمزگذاری می‌کند. ماهیت کامل برخی از واریانت‌ها مشخص نشده است (Pankov & Yamada, 2002).

ژن KRT18 (Keratin 18) روی کروموزوم ۵ قرار داشته، دارای ۷ اگزون است و ۴۲۹ آمینو اسید را کد می‌کند. کراتین نوع یک اسکلت سلولی (Keratin-18)، یکی از مهمترین پروتئین‌های فیلامنت‌های میانی در اپیتلیوم روده انسان است. هنگامی که فسفوریله می‌شود، در سازماندهی مجدد رشته‌ها نقش دارد (Wang *et al.*, 2007).

در پژوهشی الگوی بیان ژن در بلاستوسیت-

فاکتور رشد بتا یک (TGF-beta - factor-beta) است. فاکتور رشد بتا یک پپتید چند منظوره است که تکثیر، تمایز و چندین عملکرد را در بسیاری از سلول‌های مختلف تنظیم می‌کند. TGF-beta به طور معنی‌داری با وضعیت رشد طبیعی جنین‌ها در ارتباط است (Jones *et al.*, 2006). BMP-15 (یا GDF-9B) در موش و انسان شناسایی شده است (Dube *et al.*, 1998). رونویسی GDF9B در غدد جنسی اتفاق می‌افتد و پژوهش‌های هیبریداسیون نشان می‌دهد که GDF9B در مراحل اولیه تشکیل فولیکول بیان نمی‌شود بلکه در انتهای مرحله تشکیل فولیکول‌ها در تخمک بیان می‌شود (Aaltonen *et al.*, 1999). BMP-15 در تشکیل و توسعه سلول‌های گرانولوزا تا مرحله بلوغ نقش دارد اما در سرنوشت سلول‌های گرانولوزا نقشی ندارد (Burt, 1992).

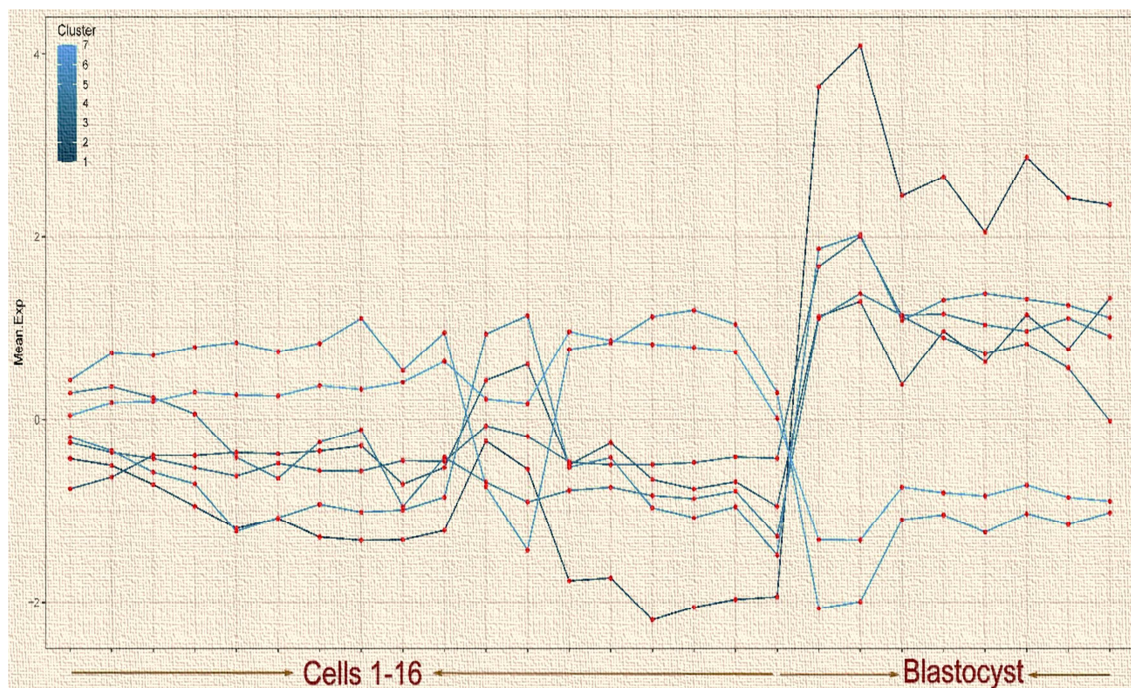
ژن KRT8 (Keratin-II) روی کروموزوم ۵ قرار داشته و دارای ۹ اگزون است و ۴۷۸ آمینو اسید را کد می‌کند. کراتین‌های نوع II، هم‌تای بازی یا خنثی کراتین‌های نوع اسیدی هستند. هر کراتین نوع II با یک کراتین اسیدی خاص هتروداایمر تشکیل می‌دهد و هتروداایمرها به صورت تترامر و سپس به صورت زنجیره-ای سازماندهی می‌شوند (Inai *et al.*, 2010). کراتین‌های نوع II شامل ساختارهای سر، میله و دم هستند و رشته-های میانی (Intermediate Filaments-IF) را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌هایی هستند که اجزای اولیه اسکلت سلولی و پوشش هسته‌ای را تشکیل می‌دهند، آن‌ها عموماً ساختارهای رشته‌ای با عرض ۸ تا ۱۴ نانومتر دارند (Steinert & Roop, 1988).

ژن CLDN6 (Claudin-6) روی کروموزوم ۲۵ قرار داشته و دارای دو اگزون است و ۲۲۱ آمینو اسید را کد می‌کند. کلاودین ۶ در مجموع دارای ۲۵ تا ۷۰ درصد شباهت با سایر اعضای خانواده کلاودین در سطح اسید آمینه است و بیشترین شباهت را با کلاودین ۹ نشان می‌دهد. کلاودین‌ها برقراری اتصالات محکم سلولی را در بافت‌های پوششی به عهده دارند. در انسان ۲۴ کلاودین شناسایی شده است. توانایی آن‌ها در پلیمریزاسیون و تشکیل فیلامنت‌ها تحت تأثیر نوع سلول است (Inai *et al.*, 2010; Van Itallie & Anderson, 2013; Yamazaki *et al.*, 2011). آن‌ها

تفاوت بیان این مجموعه از ژن‌ها را ناشی از حرکت بلاستوسیست (در روز ۷) به سمت دگرگونی و لانه‌گزینی (در روز ۱۳) دانستند. این پژوهشگران ۳۸ گروه از فرآیندهای زیستی را با توجه به لیست DEGها (از جمله: فرایند اندام‌های چند سلولی، سیستم رشد، تنظیم کاهشی فرآیند بیولوژیکی، متابولیسم چربی سلولی فرایند، نقل و انتقال کاتیون‌ها و سازوکار ریخت‌زائی) بیش بیان اعلام نمودند. آن‌ها با این ۴۶۵ DEG تحلیل مسیر (نرم‌افزار IPA) انجام داده و ژن‌ها را در پنج مسیر: پیام‌دهی IL10، مسیر تقویت شبکه اندوپلاسمی، نقش NFAT در هیپرتروفی قلب، پیام‌دهی IL6 و متابولیسم نیتروژن ترسیم نمودند.

شکل ۳، خوشه‌بندی سلسله مراتبی ژن‌های کاندید در هفت گروه را نشان می‌دهد. نمودار به وضوح افزایش تغییرات بیان ژن را در خوشه‌های مختلف در مرحله بلاستوسیست نسبت به مرحله تسهیم نشان می‌دهد. همچنین این وضعیت وجود خوشه‌هایی که احتمالاً دارای الگوهای بیان مشابهی هستند را نشان می‌دهد. چنین خوشه‌های بیانی ممکن است عملکردهای زیستی مشترکی داشته باشند.

های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) با بلاستوسیست‌های در حال تحلیل مورد مقایسه قرار گرفت (Huang et al., 2010). در آن پژوهش همبستگی پیرسون بین میانگین بیان ژن در بلاستوسیست‌ها و جنین‌های در حال تحلیل ۰/۹۸۶ برآورد شد. این میزان همبستگی بالا، نشان‌دهنده شباهت زیاد بین الگوی بیان ژن بین این دو گروه بلاستوسیست‌های IVF و بلاستوسیست‌های در حال تحلیل است. به عبارت دیگر اگرچه نتایج فنوتیپی کاملاً متمایز بود، اما اختلاف اندکی بین رونویسی ژن در جنین‌های در حال تحلیل و بلاستوسیست‌ها رخ داده بود. آن‌ها در تجزیه و تحلیل معنی‌داری ریزآرایه‌ها (SAM) ۶۷ رونوشت متفاوت بیان بین بلاستوسیست‌ها و جنین‌های در حال تحلیل شناسایی کردند. از این تعداد ۳۳ مورد (FC Fold Change) بیشتر از ۲ برابر داشتند و ۳ مورد (PHLDA2, LOC540268, C14H8ORF70) از این ۳۳ رونوشت، در جنین‌های در حال تحلیل افزایش بیان و مابقی رونوشت‌ها کاهش بیان داشتند. Clemente et al. (2011) ۴۶۵ DEG بین روزهای ۷ و ۱۳ جنین شناسایی نمودند. آن‌ها



شکل ۳. خوشه‌بندی سلسله مراتبی بر مبنای میانگین بیان هر نمونه

Figure 3. Hierarchical clustering based on the mean expression of each sample

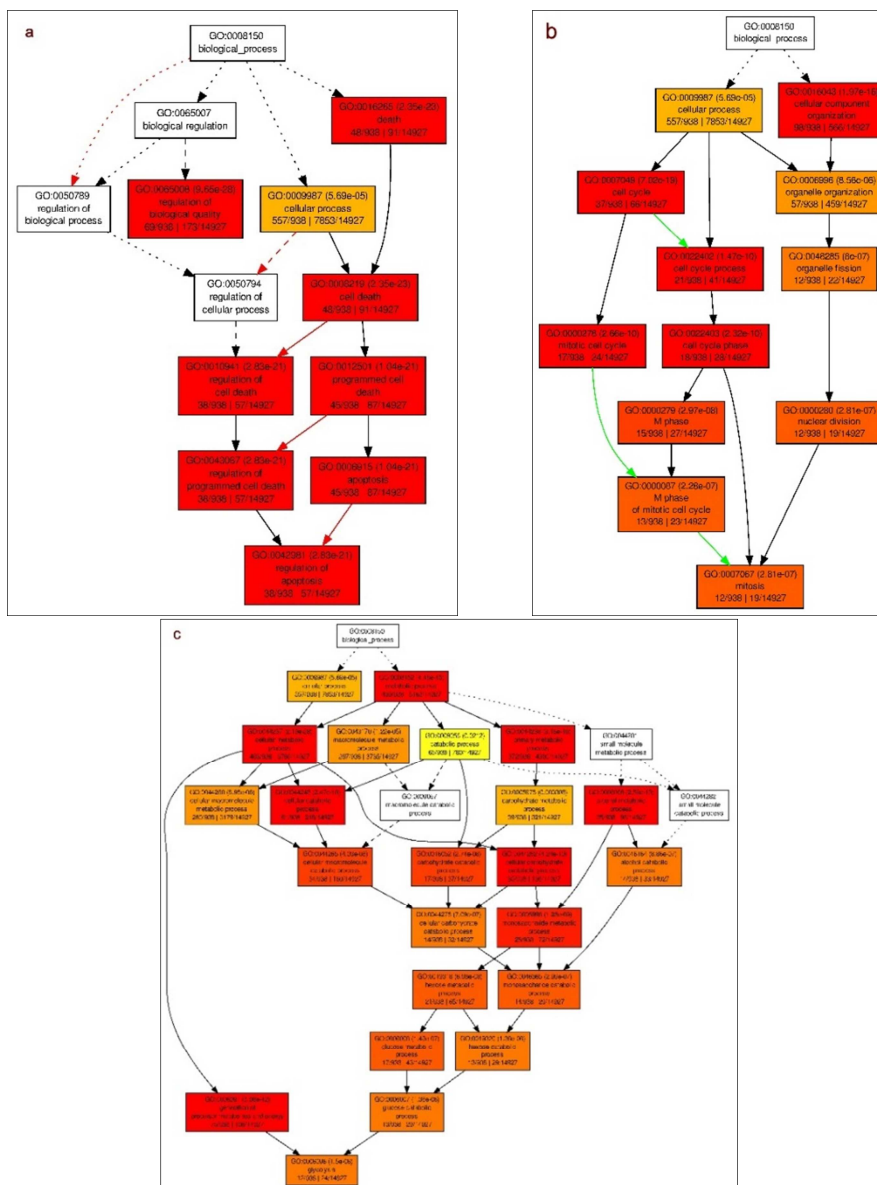
فعالیت پروتئین کیناز، تنظیم فسفریلاسیون آمینواسیدهای پروتئینی، تنظیم کاهشی بیوساخت سلول، تنظیم کاهشی ترجمه DNA و (۵) فرایندهای: گلايکولیز (شکل ۴c)، میتوز (شکل ۴b)، یوبیکوئیتینیت شدن پروتئین، ورود پروتئین به هسته، ویرایش RNA، هموستازی کاتیون‌های معدنی ۲ یا ۳ ظرفیتی، ترجمه آغازگر RNA پلیمراز II، تغییر پپتیدیل- آمینواسید، آمینواسیل شدن tRNA برای ترجمه پروتئین، متیله کردن درشت مولکول‌ها که در اغلب موارد اصطلاحات غنی شده با گزارش‌های منتشر شده (Bermejo *et al.*, 2010; Dorji *et al.*, 2012; Gad *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010) مطابقت دارد.

در تجزیه و تحلیل SEA، ۳۹ مسیر فرایندهای زیستی (حاوی حداقل ۵ ژن) غنی‌سازی معنی‌داری (P-value < ۰/۰۵) نشان دادند (جدول ۲)، از جمله (۱) متابولیسم‌های: آمینواسیدهای آروماتیک، NADP، آمینواسید سرین، آمینواسید گلوتامین، اسفنگولیپید، گلايکوفسولپید، tRNA، گلوکان سلولی، اسیدفولیک، (۲) بیوساخت‌های: اسیدهای آمینه، ATP در انتقال پروتون، اسیدهای چرب، استروئیدها، فسفولیپیدها، کربوهیدرات‌ها، (۳) کاتابولیسم‌های: فسفولیپیدها، پروتئین‌های متصل به یوبیکوئیتین، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها، (۴) تنظیم‌کننده‌های: پلیمریزاسیون اکتین فیلامنت‌ها، آپوپتوز سلول (شکل ۴a)، رشد سلول،

جدول ۲. مسیرهای غنی‌سازی شده در سطح فرایندهای زیستی با استفاده از تارنمای agriGO V2 و تجزیه و تحلیل SEA

Table 2. Enriched pathways at the level of biological processes using agriGO V2 website and SEA analysis

GO_acc	Term	Item	Percent	AdjP-Value
GO:0006915	Apoptosis	45	4.80	1.00E-21
GO:0009069	Serine family amino acid metabolic process	19	2.03	2.10E-12
GO:0006366	Transcription from RNA polymerase II promoter	17	1.81	1.50E-08
GO:0007067	Mitosis	12	1.28	2.80E-07
GO:0031327	Negative regulation of cellular biosynthetic process	12	1.28	4.00E-07
GO:0044275	Cellular carbohydrate catabolic process	14	1.49	7.10E-07
GO:0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	11	1.17	1.00E-06
GO:0006096	Glycolysis	12	1.28	1.50E-06
GO:0009064	Glutamine family amino acid metabolic process	9	0.96	5.10E-06
GO:0006633	Fatty acid biosynthetic process	9	0.96	7.70E-06
GO:0006073	Cellular glucan metabolic process	8	0.85	8.60E-06
GO:0006606	Protein import into nucleus	10	1.07	1.50E-05
GO:0001558	Regulation of cell growth	8	0.85	2.00E-05
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	9	0.96	2.10E-05
GO:0008652	Cellular amino acid biosynthetic process	8	0.85	2.90E-05
GO:0006694	Steroid biosynthetic process	7	0.75	8.10E-05
GO:0008380	RNA splicing	7	0.75	0.00012
GO:0009072	Aromatic amino acid family metabolic process	6	0.64	0.00022
GO:0006760	Folic acid and derivative metabolic process	6	0.64	0.00022
GO:0009395	Phospholipid catabolic process	5	0.53	0.00023
GO:0009063	Cellular amino acid catabolic process	9	0.96	0.00038
GO:0006739	NADP metabolic process	5	0.53	0.00038
GO:0030833	Regulation of actin filament polymerization	5	0.53	0.00038
GO:0018193	Peptidyl-amino acid modification	7	0.75	0.00041
GO:0045892	Negative regulation of transcription, DNA-dependent	5	0.53	0.00061
GO:0055066	di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	12	1.28	0.00065
GO:0001932	Regulation of protein amino acid phosphorylation	5	0.53	0.0009
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	12	1.28	0.0011
GO:0008654	Phospholipid biosynthetic process	7	0.75	0.0017
GO:0006665	Sphingolipid metabolic process	5	0.53	0.0018
GO:0043414	Macromolecule methylation	5	0.53	0.0025
GO:0007596	Blood coagulation	5	0.53	0.0043
GO:0016567	Protein ubiquitination	5	0.53	0.0043
GO:0033674	Positive regulation of kinase activity	5	0.53	0.0054
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	9	0.96	0.0054
GO:0006511	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	14	1.49	0.014
GO:0006650	Glycerophospholipid metabolic process	6	0.64	0.028
GO:0006754	ATP biosynthetic process	12	1.28	0.044
GO:0006399	tRNA metabolic process	9	0.96	0.044



شکل ۴. مجموعه‌های ژنی غنی شده در مسیرهای منتهی به آپوپتوز سلولی (a)، تقسیم سلولی میتوز (b) و گلیکولیز (c)

Figure 4. Enrichment of genes in the pathways leading to apoptosis (a), mitotic (b) and glycolysis (c)

تحلیل (Monoamine GPCRs, Nuclear receptors), تحلیل GPCRs class A rhodopsin, Cell communication, Cytokine pathway, like Met, Biosynthesis of steroids, Linoleic acid, N-glycan biosynthesis pathway, آن‌ها (metabolism) شناسایی نمود (FDR < 0.05). برای نشان دادن بیش بیانی در میان ژن‌های متفاوت بیان، تحلیل اصطلاحات GO با استفاده از آزمون فوق هندسی انجام دادند و در سطح فرایندهای زیستی: Steroid, Cholesterol metabolic process

در پژوهشی برای درک بهتر تغییرات رونویسی در جنین‌های در حال تحلیل، غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (GO) و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی (GSEA) انجام شد (Huang et al., 2010). GSEA مسیرهای پیام‌دهی از پیش تعیین شده‌ای را مشخص می‌کند که ژن‌های اعضای آن با وضعیت رشد جنین در ارتباط هستند. آن‌ها مجموعه‌ای از ۶۴۹ مسیر پیام‌رسانی در پایگاه داده MsigDB که از منابع مختلف انتخاب شده بود، مورد بررسی قرار دادند. GSEA، پنج مسیر غنی شده در جنین‌های در حال

در سطح مولفه‌های سلولی ۱۲ مسیر بیشترین غنی‌سازی ($P\text{-value} < 0.05$) را نشان دادند (جدول ۴) که شامل (۱) اتصالات و کورتکس سلول، (۲) غشای وزیکول‌های سیتوپلاسم، (۳) غشای شبکه اندوپلاسمیک (شکل ۵b)، (۴) میکروتوبول و اسپیندل‌ها، (۵) کل غشای پلاسمایی و سطح بیرونی آن، (۶) فضای بین غشایی میتوکندری و کمپلکس انتقال پروتون ATP در میتوکندری، (۷) غشای هسته، (۸) کمپلکس فاکتور رونویسی (شکل ۵a) می‌شوند.

بقا و رشد جنین پستانداران به رحم بستگی دارد. در اوایل بارداری، آندومتر تولید می‌شود و ترشح انجام می‌دهد و به صورت انتخابی انواع مختلفی از مواد را که هیستوتروف نامیده می‌شوند به دیواره رحم منتقل می‌کند (Bazer *et al.*, 1979). ترشحات رحمی به دلیل طولانی بودن زمان لانه‌گزینی و ماهیت سطح رحم، برای بقا و رشد جنین در نشخوارکنندگان اهمیت ویژه‌ای دارد. کیفیت جنین به اندازه محیط رحم اهمیت داشته و روی پیام‌های صادره از آندومتر تأثیر قابل توجهی دارد (Bauersachs *et al.*, 2009; Mansouri *et al.*, 2009).

Small GTPase mediated biosynthetic process signal transduction در سطح مولفه‌های سلولی: Endoplasmic reticulum membrane Transferase activity, transferring عملکرد مولکولی: (alkyl or aryl groups) را گزارش نمودند (Huang *et al.*, 2010). نتایج غنی‌سازی GO و GSEA ارتباط قابل توجهی را بین وضعیت رشد جنین و بیوساخت استروئیدها و ارتباطات سلولی، نشان داد. این شواهد به شدت دخالت این مسیرها را در رشد غیرطبیعی جنین نشان می‌دهند.

در پژوهش حاضر ۱۳ مسیر در سطح عملکردهای مولکولی، بیشترین غنی‌سازی را نشان دادند (جدول ۳) که شامل (۱) برقراری پیوندهای اکتین، کلسیم متصل به فسفولیپید، یون منگنز، فسفوانیزوتید، rRNA ساختار ویژه DNA، (۲) فعالیت‌های اکسیداسیون سیتوکروم C، فسفوترانسفراز (کیناز) پروتئین سرین/ترئونین، اندوپیتیداز ترئونین، فاکتور آغازین رونویسی، احیای یوبیکوئینول- سیتوکروم C، (۳) مکانیزم چرخشی انتقال یون هیدروژن برای تولید ATP و انتقال پروتون برای فعالیت ATPase بودند.

جدول ۳. مسیرهای غنی‌سازی شده در سطح عملکردهای مولکولی با استفاده از تارنمای agriGO V2 و تجزیه و تحلیل SEA

Table 3. Enriched pathways at the level of molecular functions using agriGO V2 website and SEA analysis

GO acc	Term	Item	Percent	AdjP-Value
GO:0003779	Actin binding	17	1.81	0.00065
GO:0005544	Calcium-dependent phospholipid binding	5	0.53	0.016
GO:0004129	Cytochrome-c oxidase activity	8	0.85	0.0045
GO:0046933	Hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	10	1.07	2.90E-05
GO:0030145	Manganese ion binding	7	0.75	0.00014
GO:0035091	Phosphoinositide binding	8	0.85	0.032
GO:0004674	Protein serine/threonine kinase activity	16	1.71	0.0047
GO:0046961	Proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	10	1.07	0.00017
GO:0019843	rRNA binding	7	0.75	0.0012
GO:0043566	Structure-specific DNA binding	5	0.53	0.018
GO:0004298	Threonine-type endopeptidase activity	7	0.75	0.004
GO:0003743	Translation initiation factor activity	9	0.96	0.00094
GO:0008121	Ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	6	0.64	0.00094

جدول ۴. مسیرهای غنی‌سازی شده در سطح مولفه‌های سلولی با استفاده از تارنمای agriGO V2 و تجزیه و تحلیل SEA

Table 4. Enriched pathways at the level of cellular components using agriGO V2 website and SEA analysis

GO acc	Term	queryitem	Percent	AdjP-Value
GO:0044448	Cell cortex part	5	0.53	0.00056
GO:0030054	Cell junction	10	1.07	0.0032
GO:0030659	Cytoplasmic vesicle membrane	6	0.64	0.001
GO:0005789	Endoplasmic reticulum membrane	20	2.13	7.50E-10
GO:0019897	Extrinsic to plasma membrane	7	0.75	0.001
GO:0005887	Integral to plasma membrane	25	2.67	3.20E-06
GO:0005874	Microtubule	7	0.75	0.021
GO:0005758	Mitochondrial intermembrane space	5	0.53	0.0012
GO:0005753	Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	8	0.85	0.0001
GO:0005635	Nuclear envelope	10	1.07	0.00042
GO:0005819	Spindle	5	0.53	0.00021
GO:0005667	Transcription factor complex	30	3.20	8.40E-19

جدول ۵. فهرست ژن‌های مشترک در مسیرهای توسعه سلولی، متابولیسم چربی‌ها، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و گلیکولیز

Table 5. List of common genes in cell development pathways, fat metabolism, amino acids, carbohydrates and glycolysis

Probe	Gene	Description	Log2FC	AdjP-Value
Bt.1552.1.S1_at	SARS	Seryl-tRNA synthetase	-1.14748	0.000974
Bt.10013.1.S1_at	ASL	Argininosuccinate lyase	-1.68481	0.000304
Bt.5345.1.S1_at	MDH1	Malate dehydrogenase 1	-3.15913	5.91E-08
Bt.10437.1.S1_at	IARS2	Isoleucyl-tRNA synthetase 2, Mitochondrial	-1.84686	0.002316
Bt.20281.2.S1_a_at	PGM1	Phosphoglucomutase 1	-1.05743	0.047369
Bt.20193.1.S1_at	GARS	Glycyl-tRNA synthetase	-1.35532	0.016346
Bt.9095.1.S1_at	HSD17B4	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4	-1.33895	0.041724
Bt.23569.1.S1_at	ACAA2	Acetyl-CoA acyltransferase 2	-1.53185	0.009337
Bt.24576.1.A1_at	BPGM	Bisphosphoglycerate mutase	2.403531	4.84E-05
Bt.8077.1.S1_at	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	-1.56586	0.014985
Bt.5231.1.S1_at	HSD17B10	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10	-1.28335	0.006111
Bt.1229.1.S1_at	APOA1	Apolipoprotein A1	-1.35003	0.008129
Bt.17910.1.A1_at	CORO2A	Coronin 2A	-1.29764	0.000612
Bt.7915.1.S1_at	MDH2	Malate dehydrogenase 2	-1.69465	0.001373
Bt.20265.1.A1_at	ECD	Ecdysoneless cell cycle regulator	-1.31495	0.026784
Bt.19087.1.A1_at	MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	1.019277	0.044583
Bt.2973.2.S1_a_at	PDHB	Pyruvate dehydrogenase	-3.6069	7.02E-10
Bt.7283.1.S1_at	TALDO1	transaldolase 1	-1.79361	5.03E-05
Bt.18637.1.A1_at	PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	-1.30818	0.011795
Bt.13505.1.S1_at	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	-1.41699	0.013255
Bt.20919.2.A1_at	GNMT	Glycine N-methyltransferase	-2.03987	0.000571
Bt.22783.1.S1_at	ENO1	enolase 1	-1.54494	4.04E-05
Bt.5252.1.S1_at	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	-1.21819	0.001
Bt.22533.1.S1_at	ALDOA	Aldolase, fructose-bisphosphate A	-1.4058	0.000859
Bt.20604.1.S1_at	TARS	Threonyl-tRNA synthetase	-1.32657	0.000521
Bt.2173.1.S1_at	ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family member A1	-1.71	0.006605
Bt.2428.1.S1_at	EPRS	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	-1.63346	0.000451
Bt.3005.1.S1_at	LDHB	Lactate dehydrogenase B	-1.65213	0.004291
Bt.7849.1.S1_at	KARS	Lysyl-tRNA synthetase	-1.19524	0.005977

در گاوهای نابالغ بیان متفاوت داشتند. ژن‌های DEG حاصل در چرخه سلولی، تقسیم سلولی، ترجمه، رونویسی، اتصال ATP و سایر عملکردهای مهم در تنظیم رشد سلول نقش داشتند. با بررسی پروفایل بیان در گاوهای نابالغ، در جنین ۸ تا ۱۶ سلولی نسبت به بلاستوسیست در مجموع، ۱۰۳۰ رونوشت تفاوت بیان معنی‌دار داشتند که ۳۶۱ رونوشت افزایش بیان و ۶۶۹ رونوشت کاهش بیان داشتند. در گروه گاوهای بالغ، در مجموع ۱۱۶۳ رونوشت متفاوت بیان ظاهر شدند که ۵۳۶ مورد افزایش بیان و ۶۲۷ رونوشت کاهش بیان داشتند. در جنین‌های ۸ تا ۱۶ سلولی، در سطح فرآیندهای زیستی GO، چرخه سلولی، نقل و انتقال، تقسیم سلولی، چرخه یوبیکوتین، ترجمه و رونویسی در گروه گاوهای بالغ و انتقال پیام، فرایند متابولیک، انتقال یون و انتقال پروتئین در گروه گاوهای نابالغ غنی‌سازی شدند. در سطح عملکرد مولکولی GO، در گروه گاوهای بالغ، رونوشت‌های متصل به پروتئین، اتصال DNA و اتصال یون فلزی و در گروه گاوهای نابالغ ترانسکریپتوم متصل به اسید نوکلئیک، فعالیت لیگاز و فعالیت اکسیداسون و احیا غنی‌سازی شدند. در سطح اجزای

ژن GPI یکی از اعضای خانواده پروتئین گلوکز فسفات ایزومراز را کد می‌کند. ویرایش‌های مختلف این ژن سبب تولید واریانت‌های متفاوت می‌شود. این ژن در اکثر سازواره‌های برتر مانند پستانداران در گلیکولیز و گلوکونئوزنز نقش دارد. پروتئین چند منظوره PGI، به‌عنوان نورولوکین (Neuroleukin) (یک واسطه در تمایز نورون‌ها)، فاکتور حرکتی اتوکراین (Autocrine)، مداخله در تمایز و بلوغ و مهارکننده سرین پروتئیناز متصل به میوفیبریل نیز شناخته شده است. نقص در این ژن سبب کم خونی همولیتیک غیرسفروسیستیک می‌گردد و کمبود شدید این آنزیم با ادم جنین، مرگ فوری نوزادان و اختلال عصبی همراه است (Chou *et al.*, 2000; Jeffery *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1999).

در پژوهشی (Dotji *et al.*, 2012) پروفایل بیان ژن جنین‌های تولید شده (۸ تا ۱۶ سلولی و بلاستوسیست) در شرایط آزمایشگاهی حاصل از تخمک گاوهای بالغ و نابالغ با یکدیگر مقایسه شدند. در این پژوهش جنین‌های مرحله ۸ تا ۱۶ سلولی، در گاوهای بالغ ۳۷۳ رونوشت و در گاوهای نابالغ ۲۱۸ رونوشت بیان متفاوت نشان دادند. در بلاستوسیست‌ها، ۲۴۲ ژن در گاوهای بالغ و ۲۴۸ ژن

به‌عنوان نتیجه‌گیری، مجموعه‌های ژنی غنی‌سازی شده در بلاستوسیست آغاز تمایز بین سلول‌ها و انتقال از حالت بلاستوسیست به سمت فرآیند لانه‌گزینی را هدایت می‌کنند. شناسایی این مجموعه‌های ژنی به انتخاب حیوانات به‌عنوان دهنده تخمک قبل از بلوغ، کمک شایانی می‌کند و مجموعه این دانسته‌ها افزایش قابل توجهی در کوتاه کردن فاصله نسل، بهبود ژنتیکی سریعتر و بهبود طول دوره تولید را به همراه خواهد داشت. در نهایت داده‌های ارائه شده در این بررسی در سطح mRNA است اما این پروتئین‌ها هستند که عملکردهای زیستی را هدایت می‌کنند و بررسی‌ها در سطح پروتئین می‌تواند راهگشای مناسبتری در این زمینه باشد.

سلولی GO، در گروه گاوهای نابالغ هسته، داخل سلول و میتوکندری و در گروه گاوهای بالغ، کل غشا، غشا و سیتوپلاسم غنی شده بود. در مورد بلاستوسیست‌ها، در سطح فرآیندهای زیستی GO، فسفوریلاسیون آمینو اسیدهای پروتئین، نقل و انتقال، چرخه یوبیکوتین و ژن‌های مرتبط با حمل و نقل ووزیکول، در گروه بالغین و انتقال پیام، تنظیم رونویسی وابسته به DNA و تنظیم آپوپتوز مرتبط با ژن‌ها در گروه گاوهای نابالغ غنی شد. در سطح عملکردهای مولکولی، اتصال ATP، اتصال نوکلئوتید، فعالیت ترانسفراز و ژن‌های اتصال یون کلسیم در گروه بالغین و اتصال اسید نوکلئیک، اتصال پروتئین، اتصال DNA و ژن‌های اتصال یون روی در گروه گاوهای نابالغ غنی شد.

REFERENCES

1. Aaltonen, J., Laitinen, M. P., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Horelli-Kuitunen, N., Seppä, L., Louhio, H., Tuuri, T., Sjöberg, J., Bützow, R., Hovata, O., Dale, L., & Ritvos, O. (1999). Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(8), 2744-2750.
2. Abramow-Newerly, M., Roy, A. A., Nunn, C., & Chidiac, P. (2006). RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cellular Signalling*, 18(5), 579-591.
3. Adjaye, J., Herwig, R., Brink, T. C., Herrmann, D., Greber, B., Sudheer, S., Groth, D., Carnwath, J. W., Lehrach, H., & Niemann, H. (2007). Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiological Genomics*, 31(2), 315-327.
4. Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Zakhartchenko, V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., Blum, H., Spencer, T. E., & Wolf, E. (2009). The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5681-5686.
5. Bazer, F. W., Roberts, R. M., & Thatcher, W. W. (1979). Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. *Journal of Animal Science*, 49 Suppl 2, 35-45.
6. Beiki H., Nejati A. J., Pakdel A., Masoudi A. N., Hu Z. and Reecy J. M. 2016, Large-scale gene co-expression network as a source of functional annotation for cattle genes. *BMC Genomics*, 201617:846.
7. Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., & Gutierrez-Adan, A. (2010). Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3394-3399.
8. Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., & Dale, B. (1999). Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 61(4), 1050-1055.
9. Brunet-Simon, A., Henrion, G., Renard, J. P., & Duranthon, V. (2001). Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 127-136.
10. Burt D. W. (1992). Evolutionary grouping of the transforming growth factor-beta superfamily. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(2), 590-595.
11. Chou, C. C., Sun, Y. J., Meng, M., & Hsiao, C. D. (2000). The crystal structure of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin complexed with its carbohydrate phosphate inhibitors suggests its substrate/receptor recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23154-23160.
12. Clemente, M., Lopez-Vidriero, I., O'Gaora, P., Mehta, J. P., Forde, N., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2011). Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biology of Reproduction*, 85(2), 285-295.

13. Co, N. N., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Yeung, C. L., Yau, P. L., Kong, S. K., & Kwok, T. T. (2010). AF1q enhancement of gamma irradiation-induced apoptosis by up-regulation of BAD expression via NF-kappaB in human squamous carcinoma A431 cells. *Oncology Reports*, 24(2), 547-554.
14. Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 2, 260-267.
15. Dorji, Ohkubo, Y., Miyoshi, K., & Yoshida, M. (2012). Gene expression profile differences in embryos derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during in vitro development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 24(2), 370-381.
16. Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J., & Matzuk, M. M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), 12(12), 1809-1817.
17. Duranthon, V., & Renard, J. P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55(6), 1277-1289.
18. Fleming, T. P., Butler, L., Lei, X., Collins, J., Javed, Q., Sheth, B., Stoddart, N., Wild, A., & Hay, M. (1994). Molecular maturation of cell adhesion systems during mouse early development. *Histochemistry*, 101(1), 1-7.
19. Frank, D., Fortino, W., Clark, L., Musalo, R., Wang, W., Saxena, A., Li, C. M., Reik, W., Ludwig, T., & Tycko, B. (2002). Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene Ipl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7490-7495.
20. Furuse, M., Sasaki, H., & Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *The Journal of Cell Biology*, 147(4), 891-903.
21. Gad, A., Besenfelder, U., Rings, F., Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Hossain, M. M., Tesfaye, D., Lonergan, P., Becker, A., Cinar, U., Schellander, K., Havlicek, V., & Hölker, M. (2011). Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(7), 1693-1707.
22. Gossler, A. (1992). Early Embryonic Development of Animals. (pp.151-201) Springer, Berlin.
23. Guo, M., Rupe, M. A., Dieter, J. A., Zou, J., Spielbauer, D., Duncan, K. E., Howard, R. J., Hou, Z., & Simmons, C. R. (2010). Cell Number Regulator1 affects plant and organ size in maize: implications for crop yield enhancement and heterosis. *The Plant Cell*, 22(4), 1057-1073.
24. Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X., & Renard, J. P. (2002). Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction*, 66(1), 6-13.
25. Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1-13.
26. Huang, W., Yandell, B. S., & Khatib, H. (2010). Transcriptomic profiling of bovine IVF embryos revealed candidate genes and pathways involved in early embryonic development. *BMC Genomics*, 11, 23.
27. Inai, T., Kamimura, T., Hirose, E., Iida, H., & Shibata, Y. (2010). The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *European Journal of Cell Biology*, 89(7), 547-556.
28. Jeffery, C. J., Bahnson, B. J., Chien, W., Ringe, D., & Petsko, G. A. (2000). Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry*, 39(5), 955-964.
29. Jimenez-Preitner, M., Berney, X., & Thorens, B. (2012). Plac8 is required for white adipocyte differentiation in vitro and cell number control in vivo. *PLoS one*, 7(11), e48767.
30. Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24(1), 71-80.
31. Jones, R. L., Stoikos, C., Findlay, J. K., & Salamonsen, L. A. (2006). TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(2), 217-232.
32. Kues, W. A., Sudheer, S., Herrmann, D., Carnwath, J. W., Havlicek, V., Besenfelder, U., Lehrach, H., Adjaye, J., & Niemann, H. (2008). Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19768-19773.
33. Levay, K., & Slepak, V. Z. (2010). Up- or downregulation of tescalcin in HL-60 cells is associated with their differentiation to either granulocytic or macrophage-like lineage. *Experimental Cell Research*, 316(7), 1254-1262.
34. MacLean, J. A., 2nd, Chakrabarty, A., Xie, S., Bixby, J. A., Roberts, R. M., & Green, J. A. (2003). Family of Kunitz proteins from trophoblast: expression of the trophoblast Kunitz domain proteins (TKDP) in cattle and sheep. *Molecular Reproduction and Development*, 65(1), 30-40.

35. Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R. E., Giraud-Delville, C., Heyman, Y., Galio, L., Hue, I., Yang, X., Tian, X. C., Lewin, H. A., & Renard, J. P. (2009). Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5687-5692.
36. Michibata, H., Chiba, H., Wakimoto, K., Seishima, M., Kawasaki, S., Okubo, K., Mitsui, H., Torii, H., & Imai, Y. (2004). Identification and characterization of a novel component of the cornified envelope, cornifelin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), 803-813.
37. Mitko, K., Ulbrich, S. E., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., & Bauersachs, S. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(2), 225-240.
38. Moroianu, J., Blobel, G., & Radu, A. (1996). The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6572-6576.
39. Niemann, H., & Elsaesser, F. (1986). Evidence for estrogen-dependent blastocyst formation in the pig. *Biology of Reproduction*, 35(1), 10-16.
40. Ogawa, Y., Sun, B. K., & Lee, J. T. (2008). Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881), 1336-1341.
41. Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 20), 3861-3863.
42. Paria, B. C., Sengupta, J., & Manchanda, S. K. (1984). Role of embryonic oestrogen in rabbit blastocyst development and metabolism. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(2), 429-436.
43. Park, J., Schleder, M., Schreiber, M., Ice, R., Merkel, O., Bilban, M., Hofbauer, S., Kim, S., Addison, J., Zou, J., Ji, C., Bunting, S. T., Wang, Z., Shoham, M., Huang, G., Bago-Horvath, Z., Gibson, L. F., Rojanasakul, Y., Remick, S., Ivanov, A., ... Tse, W. (2015). AF1q is a novel TCF7 co-factor which activates CD44 and promotes breast cancer metastasis. *Oncotarget*, 6(24), 20697-20710.
44. Roberts, R. M., Chen, Y., Ezashi, T., & Walker, A. M. (2008). Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 19(2), 170-177.
45. Salas, M., John, R., Saxena, A., Barton, S., Frank, D., Fitzpatrick, G., Higgins, M. J., & Tycko, B. (2004). Placental growth retardation due to loss of imprinting of Phlda2. *Mechanisms of Development*, 121(10), 1199-1210.
46. Steinert, P. M., & Roop, D. R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 593-625.
47. Stewart M. (1990). Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 2(1), 91-100.
48. Sun, Y. J., Chou, C. C., Chen, W. S., Wu, R. T., Meng, M., & Hsiao, C. D. (1999). The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5412-5417.
49. Ukarapong, S., Bao, Y., Perera, E. M., & Berkovitz, G. D. (2012). Megakaryocyte development is normal in mice with targeted disruption of Tescalcin. *Experimental Cell Research*, 318(5), 662-669.
50. Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2013). Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers*, 1(3), e25247.
51. Wang, L., Srinivasan, S., Theiss, A. L., Merlin, D., & Sitaraman, S. V. (2007). Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8219-8227.
52. Weber, R. J., Pedersen, R. A., Wianny, F., Evans, M. J., & Zernicka-Goetz, M. (1999). Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation. *Development (Cambridge, England)*, 126(24), 5591-5598.
53. Wei, C. J., Xu, X., & Lo, C. W. (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 811-838.
54. Xie, D., Chen, C. C., Ptaszek, L. M., Xiao, S., Cao, X., Fang, F., Ng, H. H., Lewin, H. A., Cowan, C., & Zhong, S. (2010). Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Research*, 20(6), 804-815.
55. Yamazaki, Y., Tokumasu, R., Kimura, H., & Tsukita, S. (2011). Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9), 1495-1504.
56. Ye, B., Li, L., Xu, H., Chen, Y., & Li, F. (2019). Opposing roles of TCF7/LEF1 and TCF7L2 in cyclin D2 and Bmp4 expression and cardiomyocyte cell cycle control during late heart development. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 99(6), 807-818.