

# شناسایی سازوکارهای تنظیمی درگیر در بلوغ جنسی و باروری بزهای ماده براساس رویکرد تجزیه و تحلیل شبکه‌های تنظیمی و مسیرهای عملکردی

## چکیده

بلوغ جنسی و باروری در حیوانات ماده از مؤلفه‌های کلیدی در افزایش بهره‌وری تولیدمثل و راهبردهای اصلاح‌نژادی در دامپروری به شمار می‌روند؛ با این حال، سازوکارهای تنظیمی ژنی مؤثر بر این فرآیندها همچنان به طور کامل شناسایی نشده‌اند. در مطالعه حاضر، به منظور بررسی تنظیمات مولکولی مرتبط با بلوغ جنسی و باروری در بز، داده‌های RNA-Seq از بافت تخمدان بزهای ماده نژاد خاکستری سیاه جینینگ در چهار بازه زمانی (روز تولد، دو ماهگی، چهار ماهگی و شش ماهگی) تجزیه و تحلیل شد. ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان به صورت مستقل تفکیک شدند و برای هر گروه، شبکه‌های تنظیمی miRNA-mRNA و ماژول‌های عملکردی مرتبط بازسازی شدند. شناسایی ژن‌های هاب بر پایه دو رویکرد صورت گرفت: تجزیه و تحلیل شبکه‌های تنظیمی چندبخشی، منجر به شناسایی ژن‌های هاب *CCDC39*، *CCDC40*، *CCDC65*، *DNAH1*، *DNAI2*، *LRGUK* و *LOC102177295* شد. همچنین با بررسی رویکرد میزان مشارکت ژن‌ها در مسیرهای بیولوژیکی، ژن‌های *DNAH2*، *DNAH6*، *DNAH7*، *DNAH5*، *ENSCHIP00000030934* و *DNAI2* به عنوان ژن‌های هاب معرفی شدند. ژن *DNAI2* در هر دو روش، به عنوان ژن هاب شناسایی و معرفی شد. همچنین دو miRNA هاب شامل *mir-187-5p* و *mir-147a* در شبکه ژن‌های دارای افزایش بیان شناسایی شدند که تعاملات برجسته‌ای با ژن‌های هدف خود داشتند. ژن‌های مذکور در فرآیندهای زیستی مختلفی از جمله حرکت مژکی، موتاژ بازوی داینین، سازمان‌دهی اندامک‌ها، پویایی ریزلوله‌ها، تمایز سلول‌های جنسی و فعال‌سازی آکروزوم مشارکت دارند. یافته‌های این پژوهش، شناخت دقیق‌تری از تنظیمات ژنی مرتبط با بلوغ و باروری بز ماده ارائه می‌دهد و زمینه‌ساز بهبود مدیریت تولیدمثل است.

واژگان کلیدی: باروری، بلوغ جنسی، ترانسکریپتوم، *DNAI2*، شبکه تنظیمی miRNA-mRNA

## Identification of Regulatory Mechanisms Involved in Sexual Maturity and Fertility of Female Goats Based on Regulatory Network Analysis and Functional Pathway Approaches

### Abstract

Sexual maturity and fertility in female animals are key components for enhancing reproductive efficiency and breeding strategies in livestock production; however, the gene regulatory mechanisms underlying these processes remain incompletely characterized. In the present study, to investigate the molecular regulations associated with fertility in goats, RNA-Seq data from the ovarian tissue of female Jining Black Grey goats at four developmental stages (birth, two months, four months, and six months old) were analyzed. Genes exhibiting upregulation and downregulation were separately classified. For each group, miRNA-mRNA regulatory networks and related functional modules were reconstructed. Hub genes were identified based on two approaches: multi-partite regulatory network analysis, which led to the identification of hub genes *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *DNAH1*, *DNAI2*, *LRGUK*, and *LOC102177295*. Additionally, by assessing gene participation levels in biological pathways, *DNAH2*, *DNAH6*, *DNAH7*, *DNAH5*, *ENSCHIP00000030934*, and *DNAI2* emerged as hub genes. The gene *DNAI2* was identified as a hub gene by both methods. Moreover, two hub miRNAs, *mir-187-5p* and *mir-147a*, were identified within the upregulated gene network, demonstrated prominent interactions with their target genes. These genes are involved in various biological processes including ciliary motility, dynein arm assembly, organelle organization, microtubule-based transport, germ cell differentiation, and acrosome activation. The findings of this study provide deeper insights into the genetic regulation affecting sexual maturity and fertility in female goats and may serve as a foundation for developing improved strategies for reproductive management in female goat populations.

**Keywords:** *DNAI2*, Fertility, miRNA-mRNA regulatory network, Sexual maturation, Transcriptome

صنعت دامپروری نقش کلیدی در تأمین پروتئین حیوانی برای جمعیت رو به رشد جهان دارد (Shivakumar, 2025). با رشد جمعیت و افزایش درآمدها، تقاضا برای محصولات دامی افزایش یافته و پیش‌بینی می‌شود که مصرف جهانی گوشت تا سال ۲۰۵۰ دو برابر شود (Gil et al., 2024). در میان نشخوارکنندگان، بز به دلیل شرایط تولیدمثلی و سازگاری بالا، سریع‌ترین نرخ رشد جمعیتی را به خود اختصاص داده‌اند. طی دهه گذشته، جمعیت این گونه دامی ۲۹ درصد افزایش یافته است (Olmo et al., 2024). بیش از ۷۳ درصد از تولید جهانی گوشت بز در کشورهای آسیایی انجام می‌شود (Popescu et al., 2021). این روند نشان‌دهنده اهمیت اقتصادی و تغذیه‌ای بز در زنجیره تأمین مواد غذایی جهان است. در میان نژادهای بز، بز خاکستری سیاه جینینگ (JBG<sup>1</sup>) با ویژگی‌هایی همچون بلوغ زودرس، باروری بالا و سازگاری محیطی، به عنوان گزینه‌ای برجسته در صنعت دامپروری معرفی می‌شود (Su et al., 2018; Wang et al., 2024a).

بلوغ جنسی در حیوانات ماده با اولین فحلی همراه با تخمک‌گذاری آغاز شده و تأثیر مستقیمی بر باروری دارد. این فرآیند تحت هدایت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG<sup>2</sup>) قرار گرفته و با تنظیم ترشح استروژن و پروژسترون، رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری را حفظ می‌کند (Li et al., 2025). عوامل محیطی، تغذیه‌ای و ژنتیکی نیز در تنظیم بلوغ نقش دارند و مدیریت صحیح آن موجب بهبود عملکرد تولیدمثلی می‌شود (Zhu et al., 2023b). در آستانه بلوغ، کاهش اثر مهاری استرادیول موجب تحریک ترشح GnRH و افزایش FSH و LH شده که به رشد تخمدان و آغاز فحلی منجر می‌گردد (Wang et al., 2023; Lin et al., 2024). بلوغ زودرس با کاهش فاصله بین‌نسلی، عملکرد تولیدمثلی و بهره‌وری اقتصادی را افزایش می‌دهد. با وجود اهمیت سن بلوغ در بزها، مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده آن هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند (Bedenbaugh et al., 2020; Zhang et al., 2025). بهینه‌سازی تولیدمثل در بزها علاوه بر افزایش سودآوری، در اصلاح ژنتیکی نیز مؤثر است (Upreti et al., 2025). با این حال، بررسی‌های ژنومی و ترانسکریپتومی بیشتری برای شناخت دقیق مکانیسم‌های تنظیم مولکولی و مسیرهای متابولیکی-سیگنالی مرتبط مورد نیاز است.

تجزیه و تحلیل پروفایل‌های ترانسکریپتومی با استفاده از تکنولوژی RNA-Seq ابزار قدرتمندی برای بررسی الگوهای بیان ژنی در بافت‌های تولیدمثلی محسوب می‌شود. این روش با پوشش جامع ژنوم و دقت بالا، امکان شناسایی مکانیسم‌های پیچیده تنظیم ژنی را فراهم می‌سازد، هر چند که تجزیه و تحلیل داده‌ها چالش‌برانگیز است. مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در میزان بیان ژن‌های مرتبط با رشد تخمدان می‌تواند بر تخمک‌گذاری، تنظیم هورمون‌ها و ارتباطات بین‌سلولی اثرگذار باشد (Sánchez-Torres et al., 2019; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2023). در همین راستا، Zhu و همکاران (۲۰۲۳b) با مقایسه تخمدان بزهای بالغ نسبت به بزهای نابالغ، ۷۵ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار را شناسایی کردند که در میان آن‌ها ژن‌های *PRLR*<sup>۳</sup> و *THBS1*<sup>۴</sup> در بزهای بالغ افزایش بیان و ژن‌های *ZP3*<sup>۵</sup>، *ZP4* و *ASTL*<sup>۶</sup> کاهش بیان معنی‌داری از خود نشان دادند. این الگوهای بیانی احتمالاً در رشد فولیکولی و تشکیل جسم زرد مؤثر هستند. با این حال، بررسی‌های متمرکز بر پروفایل‌های ترانسکریپتومی تخمدان در مراحل مختلف بلوغ هنوز محدود هستند و انجام مطالعات گسترده‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

در این مطالعه، داده‌های RNA-Seq از بافت تخمدان بز ماده خاکستری سیاه جینینگ در چهار مرحله رشدی که توسط Wang و همکاران (۲۰۲۴) تهیه شده بودند، جهت بررسی تغییرات بیان ژنی مرتبط با تکامل تخمدان و مسیرهای زیستی مؤثر بر بلوغ جنسی تجزیه و تحلیل شدند. برخلاف رویکردهای غالب در مطالعات پیشین که عمدتاً به مقایسه کلی مراحل رشد (بالغ و نابالغ) و همچنین استخراج فهرست ژنی جامع بسنده کرده‌اند؛ در این مطالعه، به مقایسه نمونه‌ها در زمان تولد با سه بازه زمانی تا بلوغ (دو ماهگی، چهار ماهگی و شش ماهگی)، تجزیه و تحلیل ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار ( $\geq 2$  and  $\leq -2$ ) (fold change (FC)) به صورت دو فهرست

<sup>1</sup> Jining Black Grey

<sup>2</sup> Hypothalamic–Pituitary–Gonadal

<sup>3</sup> Prolactin Receptor

<sup>4</sup> Thrombospondin 1

<sup>5</sup> Zona Pellucida Glycoprotein 3

<sup>6</sup> Astacin Like Metalloendopeptidase

ژنی شامل ژن‌های دارای افزایش بیان و ژن‌های دارای کاهش بیان معنی‌دار طبقه‌بندی و به طور مستقل از هم تجزیه و تحلیل شدند. در این راستا، با ترسیم شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین (PPI<sup>1</sup>) و شناسایی اثرات متقابل miRNA-mRNA، ارتباطات مولکولی، ماژول‌های عملکردی و همچنین مسیرهای تنظیمی مرتبط با رشد تخمدان شناسایی و استخراج شدند. سپس ژن‌های هاب براساس موقعیت مرکزی آن‌ها در شبکه‌های تنظیمی بازسازی شده و میزان مشارکت آن‌ها در مسیرهای زیستی (متابولیکی- سیگنالی) مرتبط با تکامل تخمدان و بلوغ جنسی، شناسایی و معرفی شدند. بنابراین، هدف از ارائه این مطالعه، شناسایی ژن‌ها و miRNAهای کاندیدای مؤثر بر بلوغ جنسی و باروری با توجه به رویکرد آنالیز شبکه‌های تنظیمی و مسیرهای زیستی و همچنین ارائه دیدگاه ژنتیکی دقیق‌تری نسبت به مکانیسم‌های تنظیم ژنی درگیر در بلوغ جنسی بزهای ماده بود.

### پیشینه پژوهش

تخمدان، یکی از مهم‌ترین اندام‌های تولیدمثلی در بز ماده است که نقش کلیدی در بلوغ جنسی و نرخ باروری دارد. رشد و تکامل این بافت به طور مستقیم بر عملکرد تولیدمثلی تأثیر می‌گذارد و مجموعه‌ای از فرآیندهای زیستی پیچیده، فعالیت‌های سلولی و تنظیم هورمونی آن را هدایت می‌کنند (Li *et al.*, 2025). Wang و همکاران (۲۰۲۳) به منظور بررسی نقش تنظیمی miRNAها در رشد تخمدان بز، مطالعه‌ای روی ۲۰ رأس بز ماده خاکستری سیاه جینینگ در چهار مرحله‌ی رشدی انجام دادند. نتایج نشان داد که سطح هفت هورمون تولیدمثلی در زمان تولد (یک روزگی) کمتر بود و در چهار ماهگی به بیشترین میزان ممکن رسید ( $P < 0.05$ ). در مجموع ۶۶۷ miRNA شناسایی کرده بودند که چند مورد از آن‌ها مانند chi-miR-1343 و chi-miR-34a میزان بیان متفاوتی نسبت به سایر miRNAها نشان دادند؛ به گونه‌ای که آن‌ها نقش بالقوه‌ای در تکثیر سلولی، تنظیم هورمون‌ها و متابولیسم داشتند. در این میان با توجه به حاشیه‌نویسی ژن‌ها و آنالیز عملکردی، مسیرهای سیگنالی معنی‌داری همچون PI3K-AKT، MAPK و استروژن که در مکانیسم‌های تنظیمی رشد تخمدان نقش دارند، شناسایی شده بودند.

Wang و همکاران (۲۰۲۴b) با هدف بررسی مراحل فیزیولوژیکی بلوغ جنسی در بزهای ماده نژاد خاکستری سیاه جینینگ، نمونه‌های تخمدان و رحم را در چهار بازه‌ی زمانی رشدی جمع‌آوری کرده بودند. با استفاده از داده‌های متابولومیکس و ترانسکریپتومیکس، تغییرات متابولیت‌ها، شاخص‌های هورمونی خون و مکانیسم‌های رونویسی مرتبط با تنظیم مکانیسم‌های تولیدمثلی در طول بلوغ جنسی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که این داده‌ها می‌توانند به عنوان مرجع ارزشمندی برای درک تنظیم تولیدمثل و متابولیسم در بزهای ماده طی بلوغ جنسی مورد استفاده قرار گیرند.

Wang و همکاران (2024a) با تلفیق داده‌های فنوتیپی، هورمونی، متابولومیکس و ترانسکریپتومیکس در چهار بازه‌ی زمانی رشدی بزهای ماده خاکستری سیاه جینینگ، ۵۴۳ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار را شناسایی کردند. این ژن‌ها به طور عمده در مسیرهای سنتز هورمون‌های استروئیدی، متابولیسم آمینواسیدها و پیام‌رسانی PI3K/AKT نقش داشتند. ژن‌های کلیدی دارای تفاوت بیان معنی‌دار مانند *SCARB1*<sup>۲</sup>، *CYP11A1*<sup>۳</sup> و *3BHSD*<sup>۴</sup> در تنظیم بلوغ تخمدان مؤثر بودند. همچنین، تغییرات بیانی پروژسترون، استرادیول و L-فنیل آلانین با تنظیم بیان ژن‌ها مرتبط بود که نشان‌دهنده‌ی تعامل میان تنظیم متابولیت‌ها و فرآیندهای بلوغ جنسی است.

Li و همکاران (۲۰۲۵) با استفاده از داده‌های RNA-Seq، تغییرات بیان lncRNAها را در تخمدان بزهای Meigu در دو مرحله‌ی نابالغ (۳ ماهگی) و بالغ (۶ ماهگی) بررسی کردند. از میان ۹۶۶ lncRNA شناسایی شده، ۹۵ مورد براساس حد آستانه تعریف شده

<sup>1</sup> Protein-Protein Interaction

<sup>2</sup> Scavenger Receptor Class B Member 1

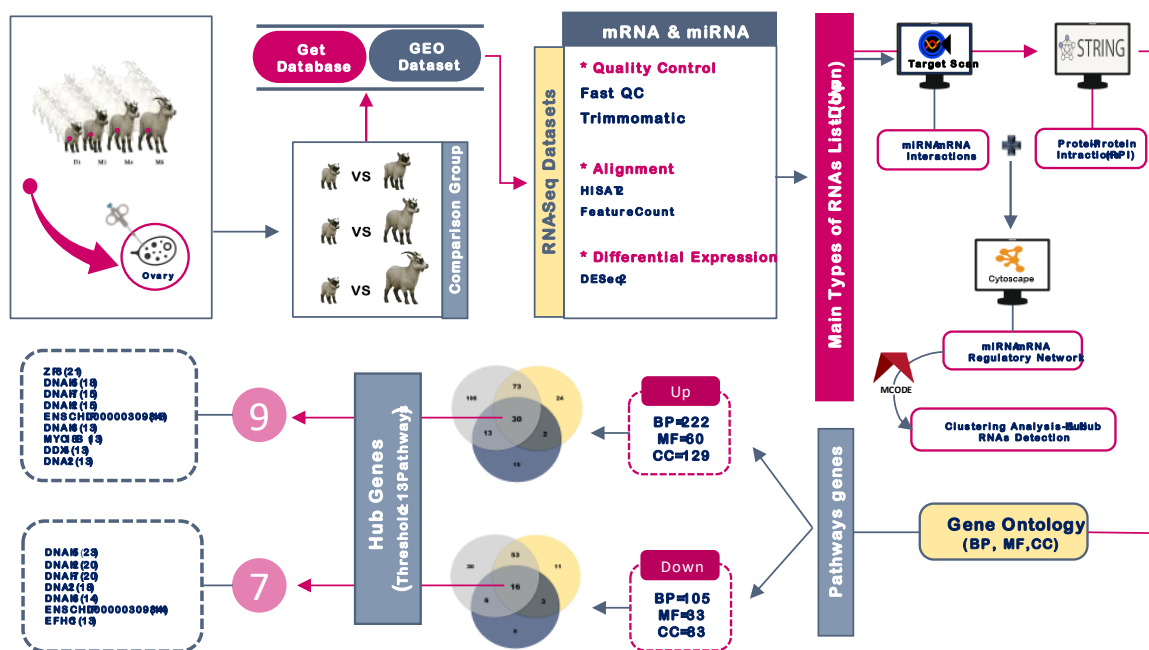
<sup>3</sup> Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1

<sup>4</sup> 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase

دارای تفاوت بیان معنی‌دار بودند. تجزیه و تحلیل‌های GO<sup>1</sup> و KEGG<sup>2</sup> نشان داد که ژن‌های هدف این lncRNAها در مسیرهای مرتبط با تولیدمثل، سیگنالینگ JAK-STAT، بلوغ اووسیت تحت تأثیر پروژسترون، مسیر Wnt و تعامل سیتوکین-گیرنده نقش دارند. همچنین، lncRNAهای MSTRG.15120.9 و MSTRG.15110.2 به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در تکامل تخمدان شناسایی و معرفی شده بودند.

## روش‌شناسی پژوهش

داده‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از پایگاه داده آنالین GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) که زیرمجموعه پایگاه داده NCBI است، استخراج شدند. در این راستا، متناسب با هدف تعیین شده کد دسترسی GSE262297 شناسایی شد که بر تغییرات بیان ژنی تخمدان گونه بز (*Capra hircus*) از زمان تولد (یک روزگی) تا بلوغ تمرکز دارد. در این کد دسترسی، ۲۰ نمونه بافت تخمدان از بزهای ماده نژاد خاکستری سیاه جینینگ جمع‌آوری شد که براساس سن به چهار بازه زمانی: روز اول (D1)، دو ماهگی (M2)، چهار ماهگی (M4) و شش ماهگی (M6) دسته‌بندی شده‌اند؛ به گونه‌ای که هر بازه زمانی شامل پنج نمونه بود تا الگوهای بیان ژن در مراحل مختلف رشد به صورت دقیق بررسی شوند. در این مطالعه بیوانفورماتیکی، به طور متفاوت با مطالعه اصلی منتشر شده (Wang et al., 2024b) و متناسب با هدف تعیین شده، مقایسه نمونه‌های بعد از تولد (یک روزگی) با نمونه‌های سه بازه زمانی دیگر یعنی دو ماهگی، چهار ماهگی و شش ماهگی به صورت سه گروه مقایسه‌ای (یک روزگی در مقابل دو ماهگی، یک روزگی در مقابل چهار ماهگی و یک روزگی در مقابل شش ماهگی) انجام شده است (شکل ۱).



شکل ۱. نمای کلی روند مطالعه حاضر، شامل استخراج داده‌های RNA-Seq از بافت تخمدان بز ماده در چهار بازه زمانی (مرحله رشدی)، پردازش داده‌ها، شناسایی ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار، بازسازی شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین و تنظیمی miRNA-mRNA، تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی مرتبط با فرایندهای تولیدمثل و بلوغ تخمدان.

<sup>1</sup> Gene Ontology

<sup>2</sup> Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes

## تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq

برای تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq، مجموعه‌ای از ابزارهای تخصصی به کار گرفته شد تا مراحل پردازش، ارزیابی کیفیت، نقشه‌یابی و بررسی تفاوت‌های بیان ژنی به دقت انجام شوند. ابتدا، خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC (v0.74) ارزیابی شد تا کیفیت داده‌ها مشخص شود (Andrews, 2010). سپس، بر اساس نتایج این ارزیابی، توالی‌های خام با کمک نرم‌افزار Trimmomatic (v0.39) اصلاح شدند و آداپتورها، پرایمرهای PCR و خوانش‌های با کیفیت پایین حذف شدند (Bolger *et al.*, 2014). پس از پردازش اولیه، خوانش‌های اصلاح‌شده با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 (v2.1.1) روی ژنوم مرجع گونه بز ( ) هم‌ردیف شدند تا امکان مقایسه دقیق بین نمونه‌ها فراهم شود (Kim *et al.*, 2015). سپس، برای کمی‌سازی تعداد کل خوانش‌های نقشه‌برداری شده، از نرم‌افزار FeatureCounts (v2.0.3) استفاده شد (Liao *et al.*, 2014). در مرحله نهایی، تفاوت‌های معنی‌دار در میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار DESeq2 (v2.11.40.8) بررسی شد تا ژن‌های کلیدی مرتبط با فرآیند رشد و بلوغ تخمدان شناسایی شوند (Love *et al.*, 2014).

## هستی‌شناسی ژن (GO) و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌ها

برای بررسی فرآیندهای زیستی، عملکردهای مولکولی، اجزای سلولی و مسیرهای سیگنالی مرتبط، فهرست‌های ژنی نهایی شده (دارای افزایش و کاهش بیان معنی‌دار) با استفاده از پایگاه داده‌های آنلاین تخصصی بررسی شدند. در این راستا، وب‌سایت DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) و پایگاه داده STRING (<https://string-db.org>) مورد استفاده قرار گرفتند تا حاشیه‌نویسی و مسیرهای ژنی معنی‌دار کدشده توسط فهرست ژنی معرفی شده تجزیه و تحلیل شوند. علاوه بر این، برای شناسایی تعاملات میان ژن‌های هدف و miRNAهای شناسایی‌شده، از پایگاه‌های داده STRING (<https://string-db.org>) و TargetScan (<https://www.targetscan.org/>) استفاده شد.

## بازسازی شبکه‌های ژنی

داده‌های مربوط به اثر متقابل پروتئین-پروتئین از پایگاه داده آنلاین STRING استخراج گردید تا تعاملات میان ژن‌ها بررسی شود (Szkarczyk *et al.*, 2019). در این راستا، پس از شناسایی تعاملات پروتئین-پروتئین و داده‌های هم‌بیان ژنی، شبکه تنظیم ژن ( $GRN^1$ ) برای تجزیه و تحلیل ارتباطات مولکولی و تنظیمات ژنی در گونه بز (*Capra hircus*) ترسیم شد. برای درک بهتر مکانیسم‌های تنظیمی، ارتباط میان miRNA و mRNA مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله، مدل شبکه تنظیمی miRNA-mRNA به عنوان چارچوب تحلیلی به کار گرفته شد تا نحوه تعامل این مولکول‌ها مشخص شود و تأثیر آن‌ها بر بیان ژن ارزیابی گردد. در ادامه، با استفاده از پلاگین MCODE که زیرمجموعه نرم‌افزار Cytoscape (v3.10.3) است، ماژول‌های عملکردی و گره‌های کلیدی شبکه تنظیمی شناسایی شدند (Nepusz *et al.*, 2012). این ابزار امکان تعیین ساختارهای مؤثر در شبکه‌های تنظیمی ژنی را فراهم کرد.

## یافته‌های پژوهش و بحث

### تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq

در این پژوهش، الگوی بیان ژنی در بافت تخمدان بز در سه گروه مقایسه‌ای (D1-M2, D1-M4, D1-M6) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل دقیق‌تر، ژن‌های دارای افزایش بیان و ژن‌های دارای کاهش بیان به‌طور جداگانه به صورت دو فهرست ژنی تفکیک و ارزیابی شدند. در مجموع ۲۷۲۱۵ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شد. براساس حد آستانه تعریف شده ( $|\log_2 \text{fold}|$ )، ۷۱۲ رونوشت دارای افزایش بیان و ۲۱۴ رونوشت دارای کاهش بیان حاصل تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به کد دسترسی GSE262297 شناسایی و استخراج شد. در این مرحله از پژوهش، به منظور شناسایی ژن‌های مشترک میان

<sup>1</sup> Gene regulator network

گروه‌های مقایسه‌ای بین فهرست‌های ژنی دارای افزایش و کاهش بیان، نمودار ون ترسیم شد. نتایج نشان داد که در میان سه گروه مقایسه‌ای، ۲۷ رونوشت مشترک میان ژن‌های دارای افزایش بیان وجود دارد، در حالی که هیچ رونوشت مشترکی میان ژن‌های دارای کاهش بیان، مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲. نمودار ون رونوشت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار در گروه‌های مقایسه‌ای (D1-M2, D1-M4, D1-M6) تخمدان بزهای ماده

#### ترسیم شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های هاب

به منظور بررسی تعاملات میان پروتئین‌های کدشده توسط mRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار، شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده آنالین STRING برای ژن‌های مشترک میان هر سه گروه مقایسه‌ای و دو به دو در هر نمودار ون ترسیم شد. این شبکه به طور مجزا برای ژن‌هایی دارای افزایش بیان و ژن‌های دارای کاهش بیان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در شبکه مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان، تعداد ۳۷۴ گره<sup>۱</sup> و ۱۱۷۹ لبه<sup>۲</sup> مشاهده شد که نشان‌دهنده تعاملات گسترده میان این پروتئین‌ها است. در مقابل، شبکه مربوط به ژن‌هایی دارای کاهش بیان شامل ۱۷۲ گره و ۶۳۸ لبه بود. اطلاعات مرتبط با ژن‌های هاب (براساس تعاملات در شبکه یا درجه مرکزی) دارای افزایش بیان، در جدول ۱ و ژن‌های هاب دارای کاهش بیان، در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

جدول ۱. ژن‌های هاب مشترک دارای افزایش بیان در شبکه پروتئین-پروتئین تخمدان بزهای ماده طی مراحل مختلف رشد (زمان تولد تا شش ماهگی)

| ژن     | اسم کامل                                                    | کروموزوم | گروه مقایسه‌ای | Fold Changes (FC) | افزایش/کاهش بیان (logFC) | p-Value                | FDR                    |
|--------|-------------------------------------------------------------|----------|----------------|-------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| CCDC65 | Coiled-Coil Domain Containing 65                            | ۵        | D1 vs. M2      | ۲/۵۶۶۴            | افزایش                   | $1/58 \times 10^{-5}$  | $8/47 \times 10^{-7}$  |
| CCDC40 | Coiled-Coil Domain 40 Molecular Ruler Complex Subunit       | ۱۹       | D1 vs. M2      | ۴/۱۷۹۳            | افزایش                   | $2/92 \times 10^{-9}$  | $1/85 \times 10^{-7}$  |
| CCDC39 | Coiled-Coil Domain 39 Molecular Ruler Complex Subunit       | ۱        | D1 vs. M2      | ۲/۸۳۱۱            | افزایش                   | $2/42 \times 10^{-12}$ | $1/82 \times 10^{-10}$ |
| DNAH1  | Dynein Axonemal Heavy Chain 1                               | ۲۲       | D1 vs. M2      | ۴/۰۶۵۷            | افزایش                   | $8/84 \times 10^{-8}$  | $3/76 \times 10^{-6}$  |
| LRGUK  | Leucine Rich Repeats And Guanylate Kinase Domain Containing | ۴        | D1 vs. M2      | ۴/۴۵۹۳            | افزایش                   | $2/21 \times 10^{-9}$  | $1/44 \times 10^{-7}$  |

<sup>1</sup> Nodes

<sup>2</sup> Edges

|              |                                      |    |           |        |        |                        |                        |
|--------------|--------------------------------------|----|-----------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| LOC102177295 | LOC102177295                         | ۲۵ | D1 vs. M2 | ۴/۵۲۴۸ | افزایش | ۰/۰۰۰۴                 | ۰/۰۰۴۹                 |
| DNAI2        | Dynein Axonemal Intermediate Chain 2 | ۱۹ | D1 vs. M2 | ۵/۴۳۵۶ | افزایش | ۲/۱۸×۱۰ <sup>-۱۷</sup> | ۶/۱۴×۱۰ <sup>-۱۵</sup> |

جدول ۲. ژن‌های هاب مشترک دارای کاهش بیان در شبکه پروتئین-پروتئین تخمدان بزهای ماده طی مراحل مختلف رشد (زمان تولد تا شش ماهگی)

| ژن     | اسم کامل                                              | کروموزوم | گروه مقایسه‌ای | Fold Changes (FC) | افزایش / کاهش بیان (logFC) | p-Value               | FDR                   |
|--------|-------------------------------------------------------|----------|----------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| CCDC65 | Coiled-Coil Domain Containing 65                      | ۵        | D1 vs. M4      | -۲/۸۹۹۶           | کاهش                       | ۴/۳۳×۱۰ <sup>-۵</sup> | ۰/۰۰۱۸                |
| CCDC40 | Coiled-Coil Domain 40 Molecular Ruler Complex Subunit | ۱۹       | D1 vs. M4      | -۳/۹۷۶۶           | کاهش                       | ۳/۳۸×۱۰ <sup>-۷</sup> | ۴/۸۰×۱۰ <sup>-۵</sup> |
| DNAH1  | Dynein Axonemal Heavy Chain 1                         | ۲۲       | D1 vs. M4      | -۴/۲۶۴۸           | کاهش                       | ۳/۰۰×۱۰ <sup>-۷</sup> | ۴/۴۸×۱۰ <sup>-۵</sup> |
| CCDC39 | Coiled-Coil Domain 39 Molecular Ruler Complex Subunit | ۱        | D1 vs. M4      | -۳/۸۰۶۱           | کاهش                       | ۲/۷۱×۱۰ <sup>-۷</sup> | ۴/۲۴×۱۰ <sup>-۵</sup> |
| DNAI2  | Dynein Axonemal Intermediate Chain 2                  | ۱۹       | D1 vs. M4      | -۴/۳۹۸۳           | کاهش                       | ۸/۰۸×۱۰ <sup>-۶</sup> | ۰/۰۰۰۵                |

### تجزیه و تحلیل حاشیه‌نویسی mRNAها؛ شناسایی مسیرها و ژن‌های هاب مرتبط

فرآیندهای متابولیکی نقش کلیدی در تنظیم فعالیت‌های سلولی و مسیرهای زیستی دارند. در این مطالعه، به منظور بررسی مسیرهای زیستی مرتبط با فرآیند رشد از زمان تولد تا سن بلوغ در بزهای ماده، ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان به طور جداگانه به پایگاه داده‌ی STRING معرفی شدند و مسیرهای عملکردی مرتبط با هر دسته‌بندی استخراج شدند. عملکردهای متابولیکی، شامل فرآیندهای زیستی (BP<sup>۱</sup>)، عملکردهای مولکولی (MF<sup>۲</sup>) و اجزای سلولی (CC<sup>۳</sup>)، در ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفتند. این تجزیه و تحلیل، براساس تغییرات بیان ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان در بافت تخمدان بزهای ماده در سه گروه مقایسه‌ای (D1-M2، D1-M4، D1-M6) انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که تعدادی از مسیرهای زیستی در هر دو دسته از ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان به صورت مشترک حضور دارند؛ اطلاعات تکمیلی در رابطه با تعداد مسیرهای زیستی در هر گروه و مسیرهای مشترک میان آن‌ها در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. بررسی تعداد مسیرهای زیستی در ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان، به همراه مسیرهای مشترک در سطوح BP، MF و CC

| افزایش | کاهش | اشتراک | مسیرهای مشترک |
|--------|------|--------|---------------|
| BP     | ۲۶   | ۱۴     | ۶             |
| CC     | ۱۴   | ۱۱     | ۷             |

فرآیند رشد و نمو دخیل در تولیدمثل، سازمان‌دهی اسکلت سلولی، توانایی حرکت سلول، فرآیند تولیدمثل، فرآیند مبتنی بر میکروتوبول، فرآیند رشد و نمو

بازوی بیرونی داینین<sup>۴</sup>، بازوی درونی داینین کمپلکس داینین، اسکلت سلولی کمپلکس مرتبط با میکروتوبول، اسکلت سلولی مبتنی بر میکروتوبول، اندامک داخل سلولی فاقد غشای محدودکننده<sup>۵</sup>

<sup>1</sup> Biological Process

<sup>2</sup> Molecular Function

<sup>3</sup> Cellular Component

<sup>4</sup> Outer dynein arm

<sup>5</sup> Intracellular non-membrane-bounded organelle

فارغ از مسیرهای زیستی مشترکی که در جدول شماره ۳ گزارش شده‌اند، تعدادی از مسیرها تنها در ژن‌های دارای افزایش بیان معنی‌دار شناسایی شده‌اند؛ مسیرهایی مانند فعالیت موتورهای مرتبط با اسکلت سلولی، اتصال به آکروزین، عنصر ساختاری پوشش تخم<sup>۳</sup>، فعالیت وابسته به آدنوزین‌تری فسفات که در دسته عملکردهای مولکولی کُد شده‌اند. در دسته اجزای سلولی مسیرهایی مانند فیبر پلیمری اسکلت سلولی، کمپلکس میوزین دو، هسته سلول جنسی، هسته سلول جنسی ماده، پوشش تخمک، وزیکول آکروزومی و کمپلکس میوزین شناسایی شدند. از نظر فرایندهای بیولوژیکی نیز، این ژن‌ها با مسیرهایی همچون تولیدمثل جنسی، تولید گامت، رشد سلول‌های جنسی، رشد سلول، تمایز سلولی، تولید گامت ماده، تخمک‌زایی، تنظیم فرآیند تولیدمثل، لقاح، تنظیم منفی فرآیند تولیدمثل، رشد بافت، تمایز تخمک، لقاح تک‌گانه<sup>۴</sup>، چرخه سلولی میوزی، متیلاسیون DNA درگیر در تولید گامت<sup>۵</sup>، رشد جنینی منتهی به تولد یا بیرون آمدن از تخم<sup>۶</sup>، رشد تخمک، تنظیم میوز یک، تنظیم تقسیم هسته‌ای در میوز، فرآیند وابسته به موجود زنده چندسلولی<sup>۷</sup> مرتبط هستند؛ مسیرهایی که بیانگر نقش‌های تخصصی این ژن‌ها در عملکردهای تولیدمثل و رشد تخمک بودند. در ادامه بررسی مسیرهای زیستی، گروهی از مسیرها نیز تنها در ژن‌های دارای کاهش بیان شناسایی شدند. در دسته عملکرد مولکولی مسیرهایی مانند اتصال به زنجیره میانی سبک پروتئین داینین، اتصال به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۸</sup> فعال هستند. در دسته اجزای سلولی مسیرهای آکسونوم<sup>۹</sup>، زائده سلولی محصور در غشای سلولی<sup>۱۰</sup>، کمپلکس داینین آکسونومی، کمپلکس اتصال راسی<sup>۱۱</sup> معنی‌دار بودند. همچنین در دسته فرایندهایی بیولوژیکی مسیرهای معنی‌داری همچون مونتاژ اجزای سلولی، سازمان‌دهی اجزای سلولی، فرآیند سیستم تنفسی<sup>۱۲</sup>، مونتاژ کمپلکس‌های حاوی پروتئین، رشد ساختارهای آناتومیکی، رشد بافت اپی‌تلیال، فرآیند سوخت‌وساز نوکلئوزید دی‌فسفات<sup>۱۳</sup> و سازمان‌دهی اندامک‌های سلولی شناسایی شدند.

به منظور شناسایی ژن‌های هاب براساس آنالیز مسیرها، در گروه مسیرهای مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان، ۲۲۲، ۶۰ و ۱۲۹ ژن و در گروه مسیرهای مرتبط با ژن‌های دارای کاهش بیان نیز ۱۰۵، ۳۳ و ۸۳ ژن به ترتیب در دسته‌های MF، BP و CC کد شده بودند. برای شناسایی ژن‌های مشترک در هر سه دسته‌بندی MF، BP و CC مربوط به مسیرهای کدشده توسط ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان نمودار ون ترسیم گردید که نشان داد در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان ۳۰ ژن و در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان ۱۶ ژن مشترک وجود دارد (شکل ۳). در ادامه تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی، برای شناسایی ژن‌های کلیدی (هاب) در هر گروه، تعداد مسیرهایی که ژن‌های مشترک در آن‌ها مشارکت داشتند، محاسبه گردید. در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان، ژن‌های مشترک در بازه‌ای بین ۴ تا ۲۱ مسیر زیستی مشارکت داشتند، و در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان، این مشارکت بین ۶ تا ۲۳ مسیر متغیر بود. برای شناسایی ژن‌های هاب، حد آستانه‌ای برابر با حداقل مشارکت در ۱۳ مسیر تعیین شد. در این راستا تعداد ۹ و ۷ ژن به ترتیب برای گروه ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان شناسایی شدند. در این میان شش ژن شامل *DNAH5*، *DNAH2*، *DNAH7*، *DNAI2*،

<sup>1</sup> Minus-end-directed microtubule motor activity

<sup>2</sup> Dynein intermediate chain binding

<sup>3</sup> Structural constituent of egg coat

<sup>4</sup> Single fertilization

<sup>5</sup> DNA methylation involved in gamete generation

<sup>6</sup> Embryo development ending in birth or egg hatching

<sup>7</sup> Multicellular organismal process

<sup>8</sup> Epidermal growth factor receptor binding

<sup>9</sup> Axoneme

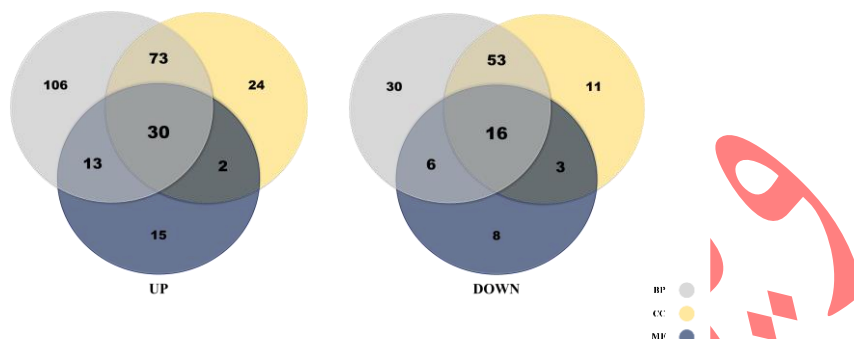
<sup>10</sup> Plasma membrane bounded cell projection

<sup>11</sup> Apical junction complex

<sup>12</sup> Respiratory system process

<sup>13</sup> Nucleoside diphosphate metabolic process

*DNAH6* و *ENSHIP00000030934* در هر دو گروه به عنوان ژن‌های هاب مشترک شناسایی شدند. افزون بر آن، ژن‌های *ZP3*، *MYO18B*<sup>۱</sup> و *DDX4*<sup>۲</sup> منحصراً در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان به عنوان هاب معرفی شدند و ژن *EFHC1*<sup>۳</sup> نیز تنها در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان نقش تنظیمی برجسته‌ای داشت.



شکل ۳. نمودار ون ژن‌های مرتبط با مسیرهای زیستی (BP و CC و MF) در شرایط بیانی متفاوت

در بررسی عملکردی ژن‌های منتخب مرتبط با باروری، مسیرهای زیستی مشترکی همچون حرکت مژکی، انتقال میکروتوبولی، سازمان‌دهی اندامک‌ها و تنظیم اسکلت سلولی برجسته شدند. ژن‌های *DNAH5*، *DNAH6*، *DNAH7*، *EFHC1*<sup>۳</sup> و *ENSHIP00000030934* در تعامل با اجزای کمپلکس داینئین و ریزلوله‌ها، در فرآیندهایی مانند جابجایی اووسیت، پایداری ساختاری بافت اپی‌تلیال و سازمان‌دهی درون سلولی نقش دارند. این فرآیندها برای عملکرد صحیح اپی‌تلیوم تولیدمثلی و موفقیت لقاح ضروری هستند. همچنین، ژن‌های *MYO18B* و *DDX4* با ایفای نقش در سامان‌دهی اندامک‌ها و تمایز سلولی، در مراحل رشد جنینی و بلوغ گامت‌ها مشارکت دارند. الگوی بیان مرحله‌ای ژن *DDX4* در گونه‌های کیسه‌دار، از جمله پوسوم، نشان‌دهنده مشارکت فعال این ژن در تمایز سلول‌های جنسی و آغاز فرآیند میوز است (Laird & Hore, 2021)؛ الگوی مذکور با بیان محافظت‌شده این ژن در سایر پستانداران نیز هماهنگ است. ژن *ZP3* در بز ماده با ساخت زونا پلوسیدا، اتصال اسپرم و فعال‌سازی اکروزوم و سامان‌دهی اندامک‌ها موجب بلوغ موفق اووسیت و لقاح می‌شود؛ همچنین اختلال در آن با بروز ناباروری مرتبط است. بیان بالای ژن *ZP3* (مقایسه نمونه‌ها در زمان تولد (یک روزگی) در با نمونه‌ها در زمان بلوغ) در مطالعه حاضر، در توافق با الگوی بیان پایین آن (مقایسه نمونه‌های بزهای بالغ با نمونه‌های بزهای قبل از بلوغ) در بزهای بالغ گزارش شده توسط Zhu و همکاران (۲۰۲۳b) است؛ این تفاوت در میزان بیان، ناشی از تفاوت در نحوه مقایسه بین دو گروه نمونه‌ها در دو مطالعه و تأثیر آن بر مثبت و منفی بودن میزان Fold Change برآورد شده می‌باشد.

#### بازسازی شبکه تنظیمی miRNA-mRNA

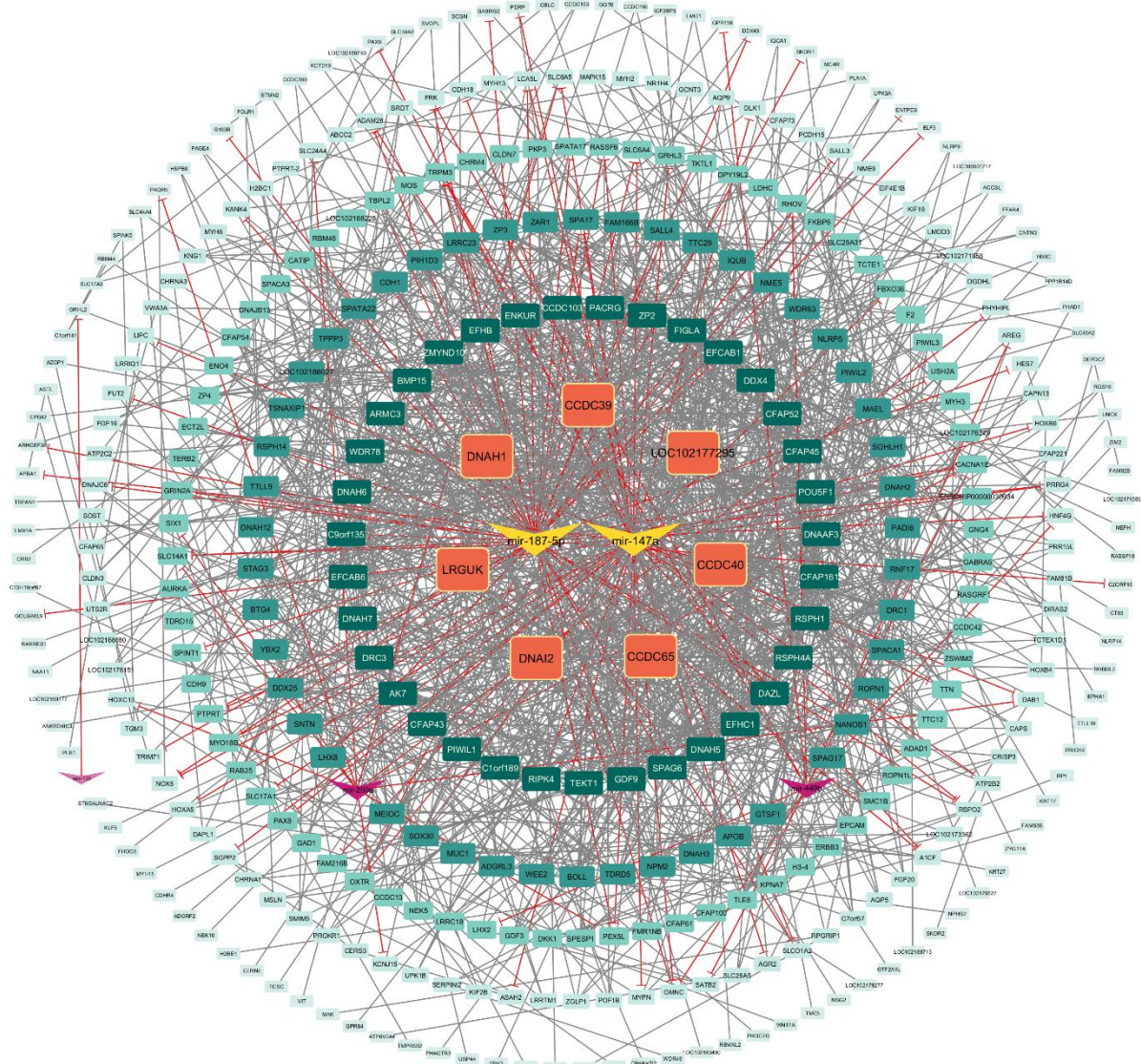
برای بررسی تعاملات مولکولی مرتبط با تغییرات بیان ژن در مراحل مختلف رشد تخمدان (از زمان تولد تا شش ماهگی)، ابتدا شبکه‌های اثر متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده‌ی آنلاین STRING ترسیم شدند. این شبکه‌ها ارتباطات عملکردی میان mRNA‌های شناسایی شده را نمایش می‌دهند و امکان شناسایی ژن‌های مرکزی بر اساس تعداد یال‌های آن‌ها در ساختار شبکه فراهم می‌سازند. در مرحله بعد، ژن‌ها در دو گروه با افزایش بیان و کاهش بیان تفکیک شده و برای هر گروه، شبکه تنظیمی مستقلی از نوع mRNA-miRNA بازسازی گردید. این شبکه‌ها شامل تعاملات مستقیم میان ژن‌های هدف و miRNA‌های تنظیم‌کننده هستند. در شبکه تنظیمی بازسازی شده مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان، دو miRNA به عنوان گره‌های هاب شامل mir-187-5p و mir-

<sup>1</sup> Myosin XVIII B

<sup>2</sup> DEAD-Box Helicase 4

<sup>3</sup> EF-Hand Domain Containing 1

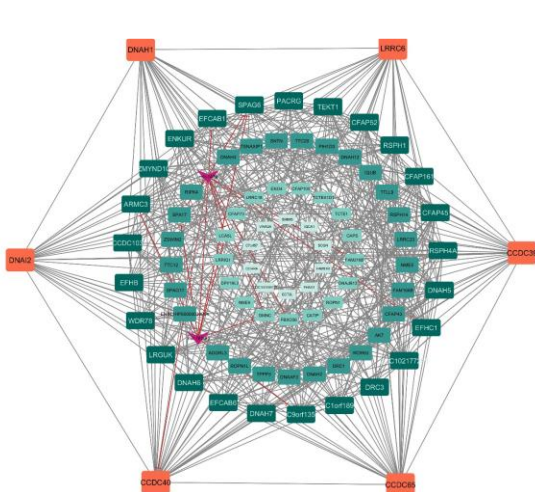
147a شناسایی شدند که تعاملات برجسته‌ای با ژن‌های هدف خود دارند. این شبکه شامل ۳۸۰ گره و ۱۲۶۱ یال است (شکل ۴). همچنین، شبکه تنظیمی بازسازی شده مربوط به ژن‌های دارای کاهش بیان نیز به صورت مستقل طراحی شده که شامل ۱۷۷ گره و ۶۵۸ یال است (شکل ۵).



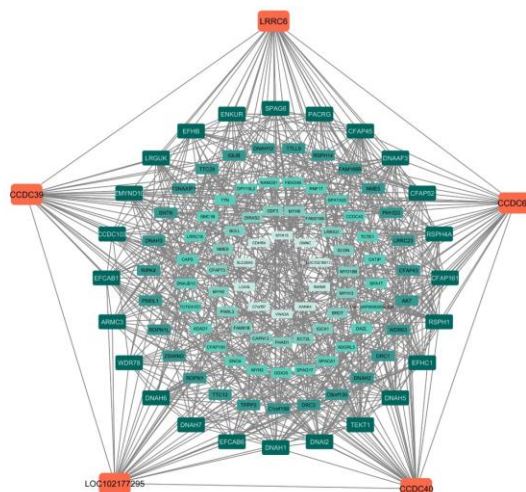
شکل ۴. شبکه تنظیمی miRNA-mRNA در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان که شامل ۵ miRNA و ۳۷۵ mRNA می‌باشد.



زیستی خاص مرتبط با سرکوب یا تعدیل فعالیت‌های ژنی در مراحل مختلف رشد تخمدان از زمان تولد تا شش ماهگی (سن بلوغ) بودند (شکل‌های ۷، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴).



شکل ۷. ماژول یک، در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان. در این ماژول، ۲ miRNA و ۸۵ mRNA درگیر هستند.



شکل ۶. ماژول یک، در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان. در این ماژول، ۱۱۰ mRNA درگیر هستند.

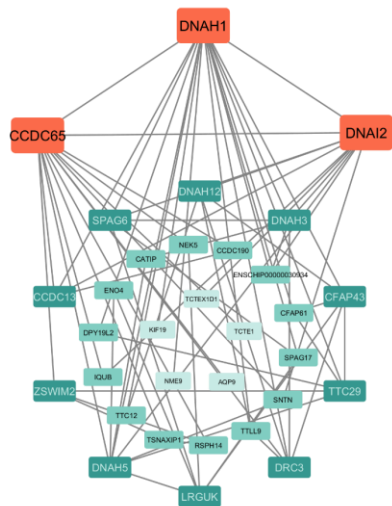
در ماژول یک گروه ژن‌های دارای افزایش بیان، پنج mRNA شامل *CCDC40*<sup>۱</sup>، *CCDC65*، *CCDC39*، *LRR6* و *LOC102177295* و در ماژول یک گروه ژن‌های دارای کاهش بیان شش mRNA شامل *DNAH1*، *DNAI2*، *CCDC39*، *LRR6*، *CCDC65* و *CCDC40* به عنوان هاب شناسایی شدند که در این میان، ژن‌های *CCDC39*، *CCDC40*، *CCDC65* و *LRR6* در هر دو ماژول مشترک بودند. این ژن‌ها از اجزای کلیدی در مونتاژ و تنظیم کمپلکس‌های داینئین آکسونمال هستند و نقش حیاتی در حرکت مژک‌ها و فلاژل‌ها ایفا می‌کنند؛ به گونه‌ای که در انتقال تخمک در دستگاه تولیدمثلی ماده مؤثر هستند. در این راستا، سه ژن *CCDC39*، *CCDC40* و *CCDC65* در گروه مقایسه‌ای *D1-M2* افزایش بیان و در گروه مقایسه‌ای *D1-M4* کاهش بیان معنی‌دار از خود نشان دادند؛ به این معنی که در زمان تولد میزان بیان آن‌ها نسبت به دو ماهگی بیشتر بوده است و مجدداً از دو ماهگی تا چهار ماهگی میزان بیان این ژن‌ها افزایش پیدا کرده است تا بدن شرایط لازم برای رسیدن به سن بلوغ و تکامل کامل دستگاه تولیدمثلی را فراهم کند. در بز، ژن *CCDC40* به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در بافت تخمدان شناسایی شده و در مسیرهای مرتبط با انتقال خارج‌سلولی و حرکت مژک‌ها فعال است. این ژن برای عملکرد صحیح مژک‌های متحرک ضروری است و با تنظیم مونتاژ بازوی داخلی داینئین، در حرکت مژک‌ها نقش دارد؛ این فرآیند برای جابجایی مایعات در مسیرهای تولیدمثلی، حفظ باروری و نقش‌های تنظیمی کلیدی در بافت‌های تخمدان اهمیت دارد (Ren et al., 2025). ژن *CCDC39* نیز با ساختار مژک‌ها و فلاژل‌ها مرتبط بوده و اگر چه بیشتر در اسپرم بررسی شده، شواهد انسانی نشان می‌دهند که جهش در این ژن با اختلال در حرکت مژک‌های لوله‌ای فالوپ و ناباروری در زنان مرتبط است (Schreck et al., 2024). ژن *CCDC65* به عنوان جزء اصلی کمپلکس نکسین-داینئین، در حفظ ساختار آکسونم و تنظیم ضربان مژک‌ها نقش دارد. در مطالعه‌ای انسانی، تعامل عملکردی این ژن با *DRC1* در دو خواهر نابارور گزارش شده بود که نشان‌دهنده نقش آن در حرکت مژک‌های تولیدمثلی زنان است (Pereira et al., 2023). در گوسفند نژاد Lacaine، بروز جهش در ژن *CCDC65* موجب اختلال در عملکرد مژک‌ها و نارسایی تنفسی در بره‌های هموزیگوت شده و با افزایش مرگ‌ومیر نوزادان مرتبط

<sup>۱</sup> Coiled-Coil Domain 40 Molecular Ruler Complex Subunit

<sup>۲</sup> Leucine Rich Repeat Containing 6

است (Ben Braiek *et al.*, 2022). براساس مطالعات انسانی و حیوانی، ژن *LRR6* نقش بنیادی در عملکرد مژک‌ها و باروری دارد (Xu *et al.*, 2022). در مطالعه Kott و همکاران (۲۰۱۲)، شش بیمار از پنج خانواده‌ی اروپایی با جهش‌های دو آلی در ژن *LRR6* بررسی شدند. در میان این بیماران، دو زن حضور داشتند که به دلیل اختلال در حرکت مژک‌ها، دچار ناباروری بودند. این نتایج نشان‌دهنده نقش مستقیم *LRR6* در عملکرد مژک‌های لوله فالوپ و انتقال تخمک است. همچنین، این ژن نقش کلیدی در مونتاژ و انتقال بازوهای داینین به آکسون مژک‌ها دارد و جهش در آن منجر به اختلال در حرکت مژک‌ها و بروز دیس‌کینزیای اولیه مژکی می‌شود؛ این عملکرد در سلول‌های اپیتلیال تنفسی انسان و در طی مژک‌زایی به صورت <sup>۱</sup>FOXJ1 وابسته تنظیم می‌شود (Horani *et al.*, 2013). براساس آنالیز مسیرهای انجام شده در این مطالعه، ژن *LOC102177295* در مسیرهایی همچون اسکلت سلولی مبتنی بر ریزلوله، رشته‌های پلیمری اسکلت سلولی، اندامک‌های فاقد غشاء، تحرک سلولی، فرآیند تولیدمثل و فرآیندهای موجودات چندسلولی حضور دارد که نشان می‌دهد این ژن ممکن است در ساختار مژک‌ها و عملکرد تولیدمثلی بز ماده نقش ایفا کند.

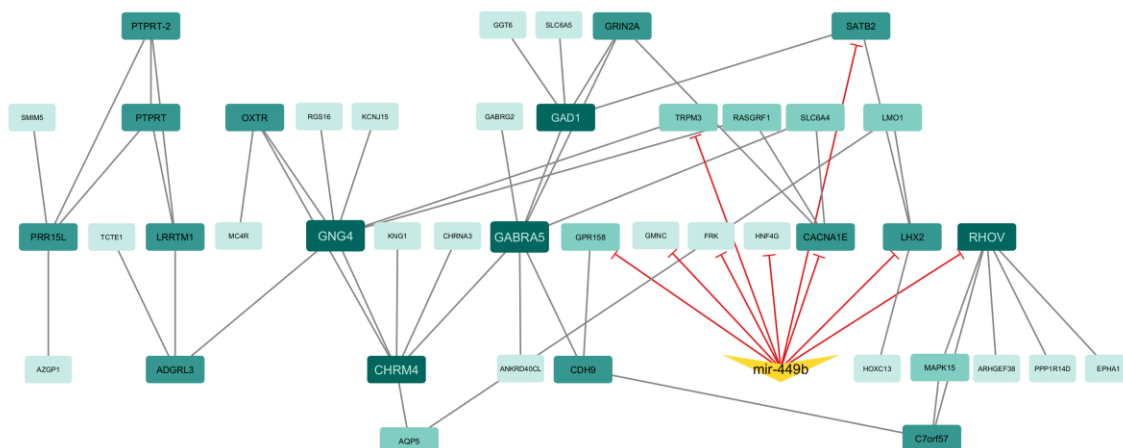
ژن‌های *DNAH1* و *DNAI2* به واسطه مشارکت در ساختار بازوی داینین و تنظیم حرکت مژکی، احتمالاً نقش محوری در انتقال گامت، لقاح و لانه‌گزینی ایفا می‌کنند. این دو ژن به طور هم‌زمان در ماژول‌های دارای افزایش و کاهش بیان شناسایی شدند؛ هر دو در ماژول یک گروه ژن‌های دارای کاهش بیان و ماژول دو گروه ژن‌های دارای افزایش بیان درگیر هستند. از نظر عملکردی، ژن *DNAI2* با قرارگیری در بازوی داخلی مژک‌ها، در سازمان‌دهی اندامک‌ها و یکپارچگی سلولی مؤثر بوده و جهش در آن با دیس‌کینزیای اولیه نوع ۹ مرتبط است؛ به گونه‌ای که کاهش بیان آن در موش‌های ماده که دچار دیابت شده‌اند، منجر به کاهش تراکم مژک‌ها و اختلال در آکسونم شده که انتقال گامت را مختل کرده است (Shorter *et al.*, 2016)، در حالی که در آندومتریوم زنان یائسه تحت درمان با تیبولون، بیان فعال یا افزایش بیان این ژن در مسیر حرکت مژک‌ها مشاهده شده است (Lv *et al.*, 2021). ژن *DNAH1* در ساختار حرکتی اسپرم و تخمک نقش دارد (Muhetapa *et al.*, 2025). این ژن در بزهای ماده نژاد Shaanbei، با افزایش نرخ زایش مرتبط بوده و بیان آن در مادران چندقلوزا بیشتر از مادران تک‌قلوزا گزارش شده است (Wang *et al.*, 2022).



شکل ۸. ماژول دو، در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان. در این ماژول، ۳۲ mRNA درگیر هستند.

سه *DNAH1*، *CCDC65*، *DNAI2* در ماژول دو گروه ژن‌های دارای افزایش بیان به عنوان ژن هاب معرفی شدند. این ژن‌ها در این ماژول به ترتیب با ۱۷، ۱۴ و ۱۱ گره در ارتباط می‌باشند.

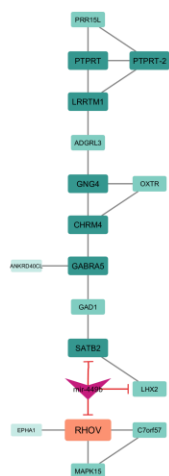
<sup>1</sup> Forkhead Box J1



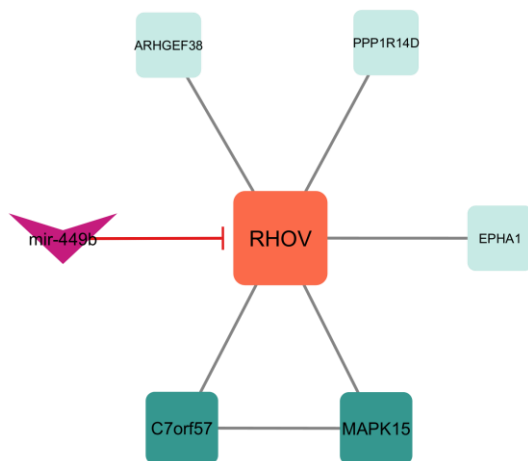
شکل ۹. ماژول سه، در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان. در این ماژول، یک miRNA و ۴۳ mRNA درگیر هستند.

در ماژول ۳ مرتبط با گروه ژن‌های دارای افزایش بیان، miR-499b به عنوان miRNA هاب با ۹ گره شناسایی شد. براساس مطالعات انجام‌شده، این miRNA در فرآیندهای متابولیکی، تولیدمثلی و بیماری‌ها در گونه‌های مختلف نقش دارد: در انسان، پلی‌مورفیزم rs3746444 با miR-499 با سندرم تخمدان پلی‌کیستیک ارتباط معناداری دارد (Li *et al.*, 2022). همچنین، نقش محافظتی آن در عملکرد قلبی از طریق تنظیم آپوپتوز سلولی گزارش شده است (Wang *et al.*, 2011). در طیور، miR-499 به عنوان یکی از عوامل تنظیمی در تولیدمثل معرفی شده است و با تنظیم ژن‌های دخیل در رشد مجرای تخم‌بر و تشکیل تخم، ممکن است در بلوغ و عملکرد تولیدمثلی نقش داشته باشد (Fatima & Morris, 2013). در بز، مطالعه Ling و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که miR-499 در رشد عضله اسکلتی در دوره‌های پیش و پس از تولد فعال است و احتمالاً با بلوغ متابولیکی و تولیدمثلی مرتبط است. ژن *RHOV*<sup>۱</sup> در این ماژول با miR-499b در ارتباط است. همچنین در ماژول چهار گروه ژن‌های دارای افزایش بیان و ماژول دو گروه ژن‌های دارای کاهش بیان به عنوان mRNA هاب معرفی شده است. این ژن از خانواده Rho GTPase‌ها است و در سازمان‌دهی اسکلت سلول، قطبیت سلول، اندوسیتوز و مسیرهای سیگنالینگ نقش دارد. این ژن در غشای اندوزوم و پلاسمایی فعال است و با کینازهای پروتئینی تعامل دارد. *RHOV* به عنوان یکی از عوامل محرک متاستاز در سرطان پستان شناسایی شده است و بیان بالای آن با کاهش بقاء در موش‌های ماده مرتبط بوده است. اگرچه داده‌ای مستقیم از نقش این ژن در باروری ماده‌ها وجود ندارد، اما عملکرد آن در تنظیم قطبیت سلولی می‌تواند به طور غیرمستقیم در فرآیندهای تولیدمثلی مؤثر باشد (Hodge & Ridley, 2017; Jin *et al.*, 2023).

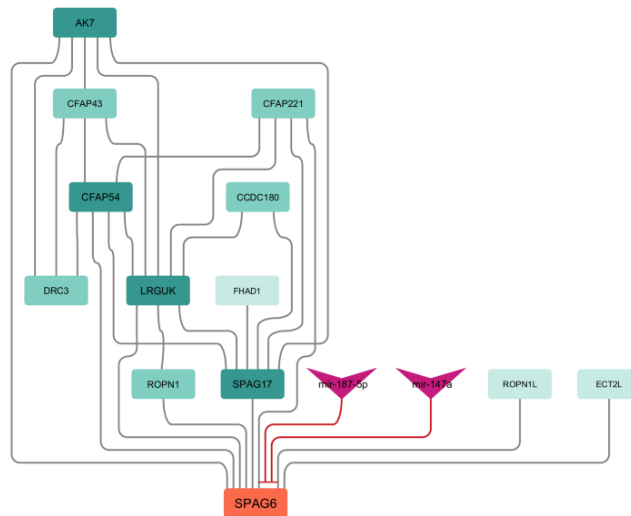
<sup>1</sup> Ras Homolog Family Member V



شکل ۱۰. ماژول چهار، در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان. در این ماژول، یک miRNA و ۱۷ mRNA درگیر هستند.

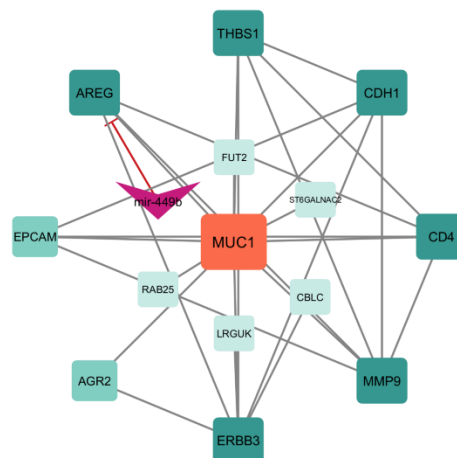


شکل ۱۱. ماژول دو، در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان. در این بازسازی، یک miRNA و ۶ mRNA درگیر هستند.



شکل ۱۲. ماژول سه در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان. در این ماژول، ۲ miRNA و ۱۳ mRNA درگیر هستند.

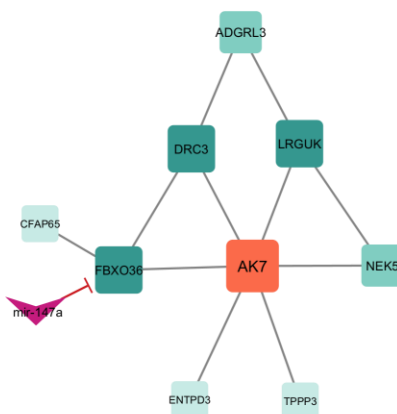
در ماژول ۳ مرتبط با گروه ژن‌های دارای کاهش بیان، ژن *SPAG6*<sup>۱</sup> به عنوان یک ژن هاب، با ۱۰ گره مرتبط شناسایی شد. شواهد پژوهشی نشان می‌دهند که این ژن در گونه‌های مختلف نقش مهمی در حفظ ساختار و حرکت سلول‌های تاژک‌دار و مژک‌دار دارد. در موش‌ها، حذف ژن *SPAG6* در جنس نر موجب ناباروری و اختلالات شدید در ساختار و حرکت اسپرم شد، در حالی که ماده‌ها فاقد چنین نقص‌هایی بودند؛ این تفاوت نشان می‌دهد که نقش *SPAG6* در تولیدمثل ماده‌ها، دست‌کم در شرایط پایه، یا غیرضروری است یا توسط مسیرهای جایگزین جبران می‌شود (Sapiro *et al.*, 2002). در خروس‌ها نیز، کاهش بیان *SPAG6* در نمونه‌های دارای تحرک ضعیف اسپرم، با نقص در آکسونم، اختلال در اسپرم‌سازی و کاهش رشد بیضه همراه بود؛ با این حال، عملکرد مستقیم آن در تولیدمثل ماده‌ها در پرندگان همچنان مبهم باقی مانده است (Jarrell *et al.*, 2020).



شکل ۱۳. ماژول چهار در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان. در این ماژول، یک miRNA و ۱۴ mRNA درگیر هستند.

<sup>1</sup> sperm associated antigen 6

در ماژول ۴ مرتبط با گروه ژن‌های دارای کاهش بیان،  $MUC1$ <sup>۱</sup> به عنوان ژن هاب شناسایی شده است و با ۱۱ گره دیگر در ارتباط می‌باشد. شواهد بیانگر نقش آن در تنظیم سطح اپی‌تلیال و فرآیندهای مرتبط با موفقیت بارداری در گونه‌های مختلف می‌باشد. در انسان، ژن  $MUC1$  پروتئینی از خانواده موسین‌ها را تولید می‌کند که تنها موسین شناسایی شده در لوله‌ی فالوپ و یکی از موسین‌های اصلی در اندومتر، واژن و دهانه رحم است؛ این پروتئین نقش حفاظتی و ضدچسبندگی در سطح سلولی دارد و می‌تواند در انتقال جنین و بارداری مؤثر باشد (Gipson *et al.*, 1999). در بزهای ماده، بیان ژن  $MUC1$  تحت تنظیم lncRNA به نام XLOC\_029185 قرار دارد و تغییرات آن ممکن است با موفقیت بارداری و اختلالاتی مانند بارداری خارج رحمی مرتبط باشد (Sun *et al.*, 2022). در گوسفندان ماده نیز، بیان این ژن در اپی‌تلیوم آندومتر، مشاهده شده و عملکرد ضدچسبندگی آن مطرح است؛ به طوری که کاهش تنظیم بیان در مراحل ابتدایی بارداری برای تسهیل لانه‌گزینی جنین ضروری تلقی می‌شود (Wang *et al.*, 2018).



شکل ۱۴. ماژول پنج، در گروه ژن‌های دارای کاهش بیان. در این ماژول، یک miRNA و ۹ mRNA درگیر هستند.

در ماژول پنج مرتبط با گروه ژن‌های دارای کاهش بیان،  $AK7$ <sup>۲</sup> به عنوان ژن هاب با ۶ گره شناسایی شد. شواهد پژوهشی نشان می‌دهند که این ژن در گونه‌های مختلف در فرآیندهایی مانند تنظیم انرژی سلولی، ساختار مژک‌ها و بروز ویژگی‌های تولیدمثلی نقش دارد. در انسان، ژن  $AK7$  در سلول‌های مژک‌دار دستگاه تولیدمثلی بیان می‌شود و با توجه به عملکرد آن در تنظیم انرژی، احتمالاً در انتقال تخمک یا جنین و پذیرش در آندومتر مؤثر است (Lorès *et al.*, 2018).

به طور کلی باید عنوان کرد که اثرات محیطی نیز می‌توانند نقشی برجسته و فراتر از تغییرات ژنتیکی ساده در بروز صفات تولیدمثلی به ویژه در گونه بز ایفا می‌کنند. مسیرهای زیستی مانند مسیرهای متابولیکی و سیگنالی به شدت تحت تأثیر این عوامل محیطی قرار می‌گیرند و بیان ژن‌ها به تنهایی بدون در نظر گرفتن مکانیسم‌های تنظیمی، به ویژه اپی‌ژنتیک، نمی‌تواند تغییرات فنوتیپی را به درستی بیان و ارائه کند. مکانیسم‌هایی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و نقش RNAهای غیرکدکننده در پاسخ به شرایط محیطی، بدون شک از جمله سازوکارهای کلیدی تنظیم بیان ژن‌ها هستند که سازگاری با شرایط متغیر را تسهیل می‌کنند. مطالعات اخیر گزارش کرده‌اند که این فرآیندهای اپی‌ژنتیکی نقش مهمی در کنترل صفات باروری بز دارند؛ به گونه‌ای که تأکید بر ترکیب داده‌های چند اُمیکس برای فهم بهتر این پیچیدگی‌ها مهم است و باید به آن‌ها توجه ویژه‌ای داشت (Tada & Mashamaite, 2025; Lu *et al.*, 2025).

<sup>1</sup> Mucin 1, Cell Surface Associated

<sup>2</sup> Adenylate Kinase 7

در جمع‌بندی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل حاشیه‌نویسی mRNAها، شبکه‌های پروتئین-پروتئین و همچنین شبکه‌های تنظیمی مرتبط جهت تعیین ژن(های) هاب، ژن *DNAI2* به طور مستقل در هر دو رویکرد تحلیلی (تجزیه و تحلیل شبکه‌های تنظیمی و مسیرهای زیستی) به عنوان ژن هاب شناسایی و معرفی گردید. این ژن یکی از اجزای اصلی بازوی داخلی داینئین محسوب می‌شود و در فرآیندهای مرتبط با تحرک وابسته به ATP، سازمان‌دهی اسکلت سلولی و ضربان مؤثر مژک‌ها در سلول‌های اپی‌تلیالی تولیدمثلی نقش حیاتی دارد. جایگاه آن در مسیرهای تنظیم‌کننده دینامیک مژک‌ها و انتقال گامت، حاکی از احتمال نقش بنیادین ژن *DNAI2* در حفظ انسجام عملکردی بافت‌های تولیدمثلی و ارتقاء موفقیت باروری در بز ماده است. این شواهد ارزش عملکردی این ژن را به عنوان یکی از نقاط اتکای زیستی در تبیین سازوکارهای باروری تقویت می‌کند و بدون شک انجام بررسی‌های اعتبارسنجی تجربی و آزمون‌های مرتبط جهت تأیید اعتبار علمی و کاربردی نتایج گزارش شده در قالب مطالعات آینده ضروری به نظر می‌رسد.

### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، با بررسی پروفایل‌های ترانسکریپتومی تخمدان بزهای ماده نژاد خاکستری سیاه جینینگ در چهار بازه زمانی (از تولد تا شش ماهگی) و بازسازی شبکه‌های تنظیمی miRNA-mRNA، مجموعه‌ای از ژن‌ها و miRNAهای کلیدی مرتبط با بلوغ جنسی و باروری شناسایی شد. براساس تجزیه و تحلیل شبکه‌های تعاملی بازسازی شده ژن‌های هاب *CCDC65*، *CCDC40*، *CCDC39*، *DNAI2*، *DNAH1*، *LRGUK* و *LOC102177295* شناسایی و معرفی شدند. همچنین با استفاده از تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی، ژن‌های *DNAH2*، *DNAH6*، *DNAH7*، *DNAH5*، *ENSCHIP00000030934* و *DNAI2* به عنوان ژن‌های هاب در تنظیم فرآیندهای تولیدمثلی مرتبط شناسایی شدند. در این میان، ژن *DNAI2* در میان دو روش تجزیه و تحلیل به صورت مشترک شناسایی شد. همچنین در شبکه تنظیمی، دو miRNA هاب شامل *mir-187-5p* و *mir-147a* در گروه ژن‌های دارای افزایش بیان شناسایی شدند و تعاملات قابل توجهی با ژن‌های هدف خود در شبکه داشتند. مسیرهای معنی‌دار مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان شامل تخمک‌زایی، رشد فولیکول، تشکیل آکروزوم و سامان‌دهی اندامک‌های سلولی بودند. در مقابل، مسیرهای مربوط به ژن‌های دارای کاهش بیان بیشتر در سرکوب حرکت مژک‌ها، انتقال آکسونمی، تنظیم اپی‌تلیال و متابولیسم نوکلئوزیدها نقش داشتند. تفکیک مسیرهای فعال در گروه‌های با افزایش و کاهش بیان، دیدگاه روشن‌تری نسبت به فرآیندهای زیستی مؤثر بر بلوغ تخمدان ارائه کرد. نتایج این مطالعه بیوانفورماتیکی نشان می‌دهند که تجزیه و تحلیل پروفایل‌های ترانسکریپتومی و حاشیه‌نویسی ژن‌های کلیدی در مسیرهای معنی‌دار کد شده در بافت‌های مرتبط با باروری در کنار سایر لایه‌های تکنولوژی آمیکس، همراه با بازسازی شبکه‌های تنظیمی چند بخشی برهمکنشی، می‌تواند درک عمیق‌تری از تنظیمات مولکولی تولیدمثل بز ماده فراهم آورد تا بتوان از آن‌ها در راهبردهای اصلاح‌نژادی جهت بهبود عملکرد تولیدمثلی و افزایش نرخ باروری بزها استفاده کرد. در این راستا، مطالعات بیشتری برای اعتبارسنجی این نتایج در گروه‌های بزرگ‌تر و انجام مطالعات عملکردی روی RNAهای کاندیدا ضروری است.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

### منابع

- Andrews, S. (2010). *FastQC*: A quality control tool for high throughput sequence data. Retrieved December 5, 2023, from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bedenbaugh, M. N., Bowdridge, E. C., & Hileman, S. M. (2020). Role of neurokinin B in ovine puberty. *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106442. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106442>
- Ben Braiek, M., Moreno-Romieux, C., Allain, C., Bardou, P., Bordes, A., Debat, F., Drögemüller, C., Plisson-Petit, F., Portes, D., Sarry, J., Tadi, N., Woloszyn, F., & Fabre, S. (2022). A nonsense variant in *CCDC65* gene causes respiratory failure associated with increased lamb mortality in French Lacaune dairy sheep. *Genes*, 13(1), 45. <https://doi.org/10.3390/genes13010045>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Fatima, A., & Morris, D. G. (2013). MicroRNAs in domestic livestock. *Physiological Genomics*, 45(16), 685–696. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00008.2013>

- Gil, M., Rudy, M., Duma-Kocan, P., Stanisławczyk, R., Krajewska, A., Dziki, D., & Hassoon, W. H. (2024). Sustainability of alternatives to animal protein sources: A comprehensive review. *Sustainability*, 16(17), 7701. <https://doi.org/10.3390/su16177701>
- Gipson, I. K., Ho, S. B., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S., Zhan, Q., Torlakovic, E., ... Hill, J. A., III. (1997). Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of Reproduction*, 56(4), 999–1011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.999>
- Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2020). Regulation and functions of RhoU and RhoV. *Small GTPases*, 11(1), 8–15. <https://doi.org/10.1080/21541248.2019.1636104>
- Horani, A., Ferkol, T. W., Shoseyov, D., Wasserman, M. G., Oren, Y. S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymberknob, M., Dutcher, S. K., Brody, S. L., Elpeleg, O., & Kerem, E. (2013). *LRRC6* mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. *PLoS ONE*, 8(3), e59436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059436>
- Jarrell, Z. R., Ahammad, M. U., Sweeney, K., Wilson, J. L., & Benson, A. P. (2020). Characterization of sperm-associated antigen 6 expression in the reproductive tract of the domestic rooster (*Gallus domesticus*) and its impact on sperm mobility. *Poultry Science*, 99(11), 6188–6195. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.029>
- Jin, M. L., Gong, Y., Ji, P., Hu, X., & Shao, Z. M. (2023). In vivo CRISPR screens identify RhoV as a pro-metastasis factor of triple-negative breast cancer. *Cancer Science*, 114(6), 2375–2385. <https://doi.org/10.1111/cas.15769>
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., ... & Amselem, S. (2012). Loss-of-function mutations in *LRRC6*, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 91(5), 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.014>
- Laird, M. K., & Hore, T. A. (2021). Primordial germ cell expression of SSEA1 and DDX4 (VASA) in female *Trichosurus vulpecula* (Marsupialia) reveals conserved and unique molecular patterns during marsupial germ cell development. *Reproduction, Fertility and Development*. <https://doi.org/10.1071/RD21100>
- Li, J., Xue, Y., Zhong, T., Wang, L., Li, L., Zhang, H., & Zhan, S. (2025). Differential expression of lncRNAs in ovarian tissue of Meigu goats during the sexually immature and mature periods. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(6), 395. <https://doi.org/10.3390/cimb47060395>
- Li, R., Yu, Y., Jaafar, S. O., Baghchi, B., Farsimadan, M., Arabipour, I., & Vaziri, H. (2022). Genetic variants miR-126, miR-146a, miR-196a2, and miR-499 in polycystic ovary syndrome. *British Journal of Biomedical Science*, 79, 10209. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2021.10209>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, Y., Sun, L., Dai, J., Lv, Y., Liao, R., Shen, X., & Gao, J. (2024). Characterization and comparative analysis of whole-transcriptome sequencing in high- and low-fecundity Chongming White goat ovaries during the estrus phase. *Animals*, 14(7), 988. <https://doi.org/10.3390/ani14070988>
- Ling, Y., Zheng, Q., Jing, J., Sui, M., Zhu, L., Li, Y., ... & Zhang, X. (2020). RNA-Seq reveals miRNA role shifts in seven stages of skeletal muscles in goat fetuses and kids. *Frontiers in Genetics*, 11, 684. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00684>
- Liu, Y., Cao, G., Xie, Y., & Chu, M. (2023). Screening of puberty related differentially expressed genes from ovary tissues of Jining Grey goat based on suppression subtractive hybridization. *Pakistan Journal of Zoology*, 55(4), 1637. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20210720100705>
- Lorès, P., Coutton, C., El Khouri, E., Stouvenel, L., Givélet, M., Thomas, L., Rode, B., Schmitt, A., Louis, B., Sakheli, Z., Chaudhry, M., Fernandez-Gonzales, A., Mitsialis, A., Dacheux, D., Wolf, J. P., Papon, J. F., Gacon, G., Escudier, E., Arnoult, C., ... Touré, A. (2018). Homozygous missense mutation L673P in adenylate kinase 7 (AK7) leads to primary male infertility and multiple morphological anomalies of the flagella but not to primary ciliary dyskinesia. *Human Molecular Genetics*, 27(7), 1196–1211. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy034>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, Y., Ma, R., Li, D., Gao, Y., Sheng, Z., Shi, J., ... & He, X. (2025). Genomic and Molecular Mechanisms of Goat Environmental Adaptation. *Biology*, 14(6), 654. <https://doi.org/10.3390/biology14060654>
- Lv, Y., Liu, Y., Wang, Y., Kong, F., Pang, Q., & Hu, G. (2021). CCDC114, DNAI2, and TOP2A involvement in the effects of tibolone treatment on postmenopausal endometrium. *BMC Women's Health*, 21(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12905-021-01353-0>
- Muhetapa, M., Zhu, M., Qi, A., & Yiming, S. (2025). Identification of genomic variants and candidate genes for reproductive traits and growth traits in Pishan Red sheep using whole-genome resequencing. *Biology*, 14(6), 636. <https://doi.org/10.3390/biology14060636>

- Nepusz, T., Yu, H., & Paccanaro, A. (2012). Detecting overlapping protein complexes in protein–protein interaction networks. *Nature Methods*, 9(5), 471–472. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1938>
- Olmo, L., Nguyen, H. V., Nguyen, X. B., Bui, T. N., Ngo, C. T. K., Nguyen, V. D., Hoang, N., Morales, L. E., & Walkden-Brown, S. (2024). Goat meat supply and demand in Vietnam: Global context and opportunities and risks for smallholder producers. *Animal Production Science*, 64, AN23416. <https://doi.org/10.1071/AN23416>
- Pereira, R., Piva, I., Campos, M., Fernandes, R., Baldini, A., & Barbosa, M. (2023). Characterization of a DRC1 null variant associated with primary ciliary dyskinesia and female infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40, 1234–1242. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02755-6>
- Popescu, A., Marcuta, A., Marcuta, L., & Tindeche, C. (2021). Trends in goats' livestock and goat milk, meat, and cheese production in the world in the period 1990–2019: A statistical approach. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture & Rural Development*, 21(1), 531–536.
- Qin, P., Pan, Z., Zhang, W., Wang, R., Li, X., Lu, J., ... & Fang, F. (2024). Integrative proteomic and transcriptomic analysis in the female goat ovary to explore the onset of puberty. *Journal of Proteomics*, 301, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2024.105183>
- Ren, Y., He, J., Liu, G., Wei, C., Li, X., Mao, J., & Huang, X. (2025). Construction of coexpression networks affecting litter size in goats based on transcriptome analysis. *Animals*, 15(11), 1505.
- Sánchez-Torres, J. D., Hernández-Sánchez, J. P., & González-Domínguez, A. (2019). RNA-seq transcriptome analysis in ovarian tissue of Pelibuey breed to explore the regulation of prolificacy. *Genes*, 10(5), 358. <https://doi.org/10.3390/genes10050358>
- Sapiro, R., Kostetskii, I., Olds-Clarke, P., Gerton, G. L., Radice, G. L., & Strauss, J. F., III. (2002). Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), 6298–6305. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.17.6298-6305.2002>
- Schreck, L., et al. (2024). Infertility and pregnancy outcomes among adults with primary ciliary dyskinesia. *Human Reproduction Open*, 2024(3), hoae039. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoae039>
- Shivakumar, P. (2024). Role of livestock in a changing world: Implications for human health, nutrition, and global wellness. *The Scientific Frontiers*, 1(1), 32–35.
- Shorter, S. L., Albaghdadi, A. J., & Kan, F. W. (2016). Alterations in oviductal cilia morphology and reduced expression of axonemal dynein in diabetic NOD mice. *Tissue and Cell*, 48(6), 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.08.001>
- Su, F., Guo, X., Wang, Y., Wang, Y., Cao, G., & Jiang, Y. (2018). Genome-wide analysis on the landscape of transcriptomes and their relationship with DNA methylomes in the hypothalamus reveals genes related to sexual precocity in Jining Gray goats. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 501. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00501>
- Sun, Z., Hong, Q., Liu, Y., Ren, C., He, X., Jiang, Y., Ouyang, Y., Chu, M., & Zhang, Z. (2022). Oviduct transcriptomic reveals the regulation of mRNAs and lncRNAs related to goat prolificacy in the luteal phase. *Animals*, 12(20), 2823. <https://doi.org/10.3390/ani12202823>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tada, O., & Mashamaite, P. K. (2025). Phenotypic plasticity in trait performance of common dairy goat breeds under diverse environments: a systematic review. *Frontiers in Animal Science*, 6, 1640241. <https://doi.org/10.3389/fanim.2025.1640241>
- Upreti, D., & Ansari, S. (2025). Fertility management in sheep and goats: Best practices for breeding success. *Agri Roots*, 3(1), 22–27.
- Wang, J. X., Jiao, J. Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J. P., ... & Li, P. F. (2011). miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature Medicine*, 17(1), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nm.2298>
- Wang, T., Zhang, Y., Zhao, Y., & Li, J. (2020). Identification of key genes and potential new biomarkers for ovarian aging: A study based on RNA-sequencing data. *Frontiers in Genetics*, 11, 590660. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.590660>
- Wang, X., Zhu, B., Xiong, S., Sheng, X., Qi, X., Huang, Q., ... & Ni, H. (2018). Expression and function of MUC1 in uterine tissues during early pregnancy in sheep after natural oestrous or artificially-induced oestrous. *Theriogenology*, 108, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.030>
- Wang, Y., Chao, T., Li, Q., He, P., Zhang, L., & Wang, J. (2024a). Metabolomic and transcriptomic analyses reveal the potential mechanisms of dynamic ovarian development in goats during sexual maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 9898. <https://doi.org/10.3390/ijms25189898>

- Wang, Y., Wang, J., Li, Q., Xuan, R., Guo, Y., He, P., & Chao, T. (2023). Characterization of microRNA expression profiles in the ovarian tissue of goats during the sexual maturity period. *Journal of Ovarian Research*, 16, 234. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01318-8>
- Wang, Y., Wang, J., Li, Q., Xuan, R., Guo, Y., He, P., Duan, Q., Du, S., & Chao, T. (2024b). Transcriptomic and metabolomic data of goat ovarian and uterine tissues during sexual maturation. *Scientific Data*, 11, 777. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03565-w>
- Wang, Z., Wang, R., Pan, C., Chen, H., Qu, L., Wu, L., Guo, Z., Zhu, H., & Lan, X. (2022). Genetic variations and mRNA expression of goat DNAH1 and their associations with litter size. *Cells*, 11(8), 1371. <https://doi.org/10.3390/cells11081371>
- Xu, H., Sun, W., Pei, S., Li, W., Li, F., & Yue, X. (2022). Identification of key genes related to postnatal testicular development based on transcriptomic data of testis in Hu sheep. *Frontiers in Genetics*, 12, 773695. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.773695>
- Zhang, B., Zhu, G., Wu, J., Xie, H., Cui, J., Qian, W., ... & Liu, Y. (2025). Transcriptome and DNA methylation analysis of the goat pineal gland during puberty. *Scientific Reports*, 15(1), 2269. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-84559-x>
- Zhang, H., Bao, S., Zhao, X., Bai, Y., Lv, Y., Gao, P., Li, F., & Zhang, W. (2024). Genome-wide association study and phenotype prediction of reproductive traits in large white pigs. *Animals*, 14(23), 3348. <https://doi.org/10.3390/ani14233348>
- Zhang, L., Liu, X., & Xu, H. (2023). Application of single-cell RNA sequencing in ovarian development. *Biomolecules*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.3390/biom13010047>
- Zhu, M., Guo, H., Li, X., Zhao, Y., Jin, Y., Wang, Y., ... & He, X. (2023a). Changes in serum hormones and ovarian transcriptome profiles in pubertal goats. *Journal of Ovarian Research*, 16, 92. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01150-0>
- Zhu, Y., Ye, J., Qin, P., Yan, X., Gong, X., Li, X., ... & Fang, F. (2023b). Analysis of serum reproductive hormones and ovarian genes in pubertal female goats. *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01150-0>

## **Identification of Regulatory Mechanisms Involved in Sexual Maturity and Fertility of Female Goats Based on Regulatory Network Analysis and Functional Pathway Approaches**

### **Extended Abstract**

#### **Introduction**

The global increase in protein demand has made livestock a crucial component of food security. Among livestock, goats have the fastest population growth due to their high reproductive efficiency and resilience to environmental challenges, with over 73% of the world's goat meat production coming from Asia. The Jining Black Grey (JBG) breed is notable for its early puberty and high fertility, making it a valuable candidate for genetic improvement programs. Female puberty is regulated by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, initiating reproductive capacity through the body's hormonal regulation of folliculogenesis and ovulation. While optimizing the age at first estrus can boost reproductive output, the molecular mechanisms involved are still not fully understood. RNA sequencing (RNA-Seq) allows for high-throughput, transcriptome-wide profiling of reproductive tissues, uncovering regulatory elements such as mRNAs and miRNAs. However, systematic analyses across different stages of puberty are limited. This study aims to analyze transcriptome profiles from ovarian samples of female goats at four crucial developmental stages (D1, M2, M4, and M6) to characterize gene expression dynamics, reconstruct miRNA-mRNA interaction networks, and identify functional modules that support sexual maturation.

#### **Materials and Methods**

This study utilized an ovarian RNA-Seq dataset from JBG female goats, collected at four developmental stages: D1, M2, M4, and M6. The dataset is available in the GEO database under accession number GSE262297, with each age group comprising five biological replicates. Raw reads were assessed for quality using FastQC and subsequently trimmed with Trimmomatic software. The processed sequences were aligned to the genome reference using HISAT2, quantified with FeatureCounts, and analyzed for differential expression with DESeq2. Functional enrichment analyses for detecting biological processes, molecular functions, and cellular components were performed utilizing the DAVID and STRING databases, with KEGG pathway analysis also integrated. For the reconstruction of regulatory networks, protein-protein interaction (PPI) and predicted miRNA-mRNA interactions were sourced from STRING and TargetScan. Functional modules, hub genes and hub miRNAs were identified using the MCODE plugin in Cytoscape, which facilitated the characterization of the molecular frameworks associated with ovarian maturation.

## Results and Discussion

Transcriptomic analysis of ovarian tissue at four developmental stages identified a total of 27,215 genes. Among these, 712 genes were significantly upregulated, and 214 were downregulated ( $\log_2$  fold change  $\geq 2$ , FDR  $\leq 0.05$ ). Comparative analysis revealed that 27 transcripts were commonly upregulated across all groups, while no overlap was found among the downregulated transcripts. Reconstruction of the protein-protein interaction (PPI) network showed four modules in the upregulated group and five modules in the downregulated group. Key hub genes such as *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *DNAH1*, *DNAI2*, *LRGUK*, and *LOC102177295* demonstrated extensive connectivity. Further analysis identified additional hub genes based on their participation in biological pathways, which included *DNAH2*, *DNAH6*, *DNAH7*, *DNAH5*, *ENSCHIP00000030934*. The gene *DNAI2* was identified as a hub gene by both methods. Additionally, two hub miRNAs, mir-187-5p and mir-147a, were identified in the upregulated gene network, showing significant interactions with their target genes. These genes were enriched in pathways associated with dynein arm assembly, ciliary motility, cytoskeletal organization, oocyte maturation, and organelle regulation. Upregulated modules were linked to reproductive processes including folliculogenesis, acrosome activation, oocyte development, and gamete transport. In contrast, downregulated modules indicated a suppression of ciliary assembly, axonemal transport, epithelial organization, and nucleoside metabolism. These findings suggest that coordinated regulation of cilia-related genes and cytoskeletal components is fundamental to ovarian maturation, with implications for oocyte competence and fertilization potential.

## Conclusion

The findings indicate that combining ovarian transcriptomic profiling with miRNA-mRNA network reconstruction and pathway-based enrichment analysis provides a strong method for investigating key molecular regulators of sexual maturation in female goats. By concentrating on different developmental stages and utilizing bioinformatic tools, this study identified several key genes and interaction modules that play roles in folliculogenesis, ciliary motion, and oocyte maturation. This integrative approach offers valuable insights into the gene regulatory mechanisms that influence fertility and supports the creation of targeted breeding strategies in goat reproductive systems.

### ***Author Contributions***

Conceptualization, Zeynab Aslzare Razlighi, Seyed Reza Miraei Ashtiani, Mostafa Sadeghi and Farzad Ghafouri; methodology, Zeynab Aslzare Razlighi; formal analysis, Zeynab Aslzare Razlighi and Farzad Ghafouri; writing—original draft preparation, Zeynab Aslzare Razlighi; supervision, Mostafa Sadeghi, Seyed Reza Miraei Ashtiani, and Farzad Ghafouri. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### ***Data Availability Statement***

The datasets analyzed during the current study are publicly available in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) repository under accession number GSE262297. Additional details are available upon request from the corresponding author.

### ***Acknowledgements***

The authors would like to thank all participants of the present study.

### ***Ethical considerations***

The study did not involve human or animal subjects and therefore did not require ethical approval. The authors confirm that no data fabrication, falsification, plagiarism, or misconduct occurred.