

مقاله پژوهشی:

مقایسه پروفایل بیان افتراقی ژن‌های کاندیدا مرتبط با صفت باروری در گاوهای هلستاین با استفاده از دیدگاه ترانسکرپتوم و مبتنی بر فناوری RNA-Seq

فرزاد غفوری^{۱*}، مصطفی صادقی^{۲*}، ابوالفضل بهرامی^۳، رستم عبداللهی آرپناهی^۴، آرش جوانمرد^۵ و سیدرضا میرائی آشتیانی^۶
۱، ۲، ۳ و ۶. دانشجوی دکتری تخصصی، دانشیار، دانش‌آموخته دکتری و استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،
دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. محقق، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و علوم محیط زیست، دانشگاه جورجیا، جورجیا، ایالات متحده آمریکا

۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۱)

چکیده

انتخاب ژنتیکی برای افزایش تولید شیر و سودآوری اقتصادی در صنعت گاوهای شیری با کاهش عملکرد تولیدمثلی از جمله کاهش زنده‌مانی رویان و افزایش از دست رفتن آبستنی همراه بوده است. در پژوهش حاضر، هدف اصلی، استفاده از پروفایل ترانسکرپتوم بافت آندومتریم و جسم زرد دو دسته از گاوهای شیری هلستاین با باروری بالا و پایین، به منظور شناسایی ژن‌های مؤثر در حفظ باروری به‌ویژه اوایل دوره آبستنی است. در تجزیه داده‌های RNA-Seq برای مقایسه بیان ژنی، ۴۵۳۸ ژن استخراج شد که در مجموع ۱۴۶۶ ژن تفاوت بیانی معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.000001$, Fold change < 0.5). سپس با مقایسه ژن‌های مربوطه در میان پروفایل‌های ترانسکرپتوم، ژن‌های مشترک بین بافت آندومتریم (روزهای هفت و ۱۳ چرخه فعلی) و جسم زرد (در روز ۱۳ چرخه فعلی) شامل ژن‌های *SYNM*, *PARM1*, *NXPE2*, *NT5DC3*, *COL4A3*, *COL12A1*, *ALPK3*, *ADAMDEC1*, *SERPINA14*, *S100A9*, *MSTN*, *OAS1X*, *PI16*, *CD83*, *CA2*, *C2*, *C5*, *JSP.1* و *SAA3* مشخص شدند. بررسی نتایج حاشیه‌نویسی این ژن‌ها ثابت کرد که در فرآیند اصلی مسیرهای متابولیک و سیگنالینگ مرتبط با سیستم حمل‌ونقل یونی، التهاب، عملکرد سیستم ایمنی بدن و ساختار ماتریس سلولی دارای نقش می‌باشند. پژوهش حاضر می‌تواند بینش جدیدی از شواهد مولکولی در راستای سازوکارهای زیستی پروفایل ترانسکرپتوم در محیط رحم و بیومارکرهای مرتبط با باروری در گاوهای شیری ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: آندومتریم، باروری، ترانسکرپتوم، جسم زرد، گاوهای هلستاین.

Comparison of differential expression profiles of candidate genes related to fertility traits using transcriptome perspective based on RNA-Seq in Holstein dairy cows

Farzad Ghafouri^{1*}, Mostafa Sadeghi^{2*}, Abolfazl Bahrani³, Rostam Abdollahi-Arpanahi⁴, Arash Javanmard⁵ and Seyed Reza Miraei-Ashtiani⁶

1, 2, 3, 6. Ph.D. Candidate, Associate Professor, Ph.D. Graduate and Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Researcher, Department of Animal and Dairy Sciences, University of Georgia, Georgia, USA

5. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: Apr. 25, 2021 - Accepted: Oct. 3, 2021)

ABSTRACT

Genetic selection for increasing milk production and economic profitability in the dairy industry has been associated with reduction in reproductive performance, including lower embryo survival and pregnancy loss. The main purpose of this study was to use the transcriptome profiles of endometrial tissue and *Corpus luteum* of two groups of high and low fertility Holstein dairy cows to identify genes that are effective in reproductive rate, especially in early pregnancy. By the analysis of RNA-Seq data to express the gene differences, 4538 genes were extracted, which a total of 1466 genes showed significant expression differences ($P < 0.000001$, Fold change < 0.5). Then, by comparing the relevant genes among transcriptome profiles, common genes between endometrial tissue (on days 7 and 13 of the estrous cycle) and *Corpus luteum* (on day 13 of the estrous cycle) including *SYNM*, *PARM1*, *NXPE2*, *NT5DC3*, *COL4A3*, *COL12A1*, *ALPK3*, *ADAMDEC1*, *SERPINA14*, *S100A9*, *PI16*, *OAS1X*, *MSTN*, *MASPI*, *CD83*, *CA2*, *C2*, *C5*, *JSP.1* and *SAA3* were identified. Annotation results of these genes indicated that they have a role in the main process of metabolic and signaling pathways related to the ion transport system, inflammation, immune system function, and cell-matrix structure. Overall, the present study can provide new insights into the molecular evidence for the biological mechanisms of transcriptome profiling in the uterine environment and biomarkers related to fertility in dairy cows.

Keywords: *Corpus luteum*, Endometrium, Fertility, Holstein cows, Transcriptome.

* Corresponding author E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir; farzad.ghafouri@ut.ac.ir

مقدمه

وضعیت باروری و بازده تولیدمثلی، به عنوان مهمترین فاکتور تأثیرگذار بر سودآوری در پرورش گاوهای شیری محسوب می‌شود (De Vries, 2006). در این راستا، برآوردهای اقتصادی انجام شده، نشان می‌دهد که میانگین ارزش وقوع آبستنی در گاوهای شیری ۲۷۸ دلار سودآوری و برعکس از دست دادن آن ۵۵۵ دلار ضرر مالی، به مدیران فارم تحمیل می‌کند (Butler, 2003). جمع‌بندی مطالعات پیشین به روشنی نشان می‌دهد که گله‌های گاوهای شیری امروزی به جهت تمرکز اهداف انتخاب بر روی تولید شیر، از لحاظ ژنتیکی وضعیت باروری افت معنی‌داری را دارند (Pritchard *et al.*, 2013). همچنین، مطالعات پیشین به دفعات وجود همبستگی منفی (۰/۶۰-۰/۳۵) بین تولید شیر و باروری را گزارش کرده‌اند (VanRaden *et al.*, 2004). مکانیسم اثر منفی پلیوتروپیک بین افزایش تولید شیر و به دنبال آن کاهش نرخ باروری در گاوهای شیری نیز در مطالعات زیادی گزارش شده است (Walsh *et al.*, 2011; Kadri *et al.*, 2014). مطالعات گسترده‌ای انجام شده در ایالات متحده نشان می‌دهد که طی سال‌های بین ۱۹۵۱ تا ۲۰۰۱ میزان آبستنی ۳۶ درصد افت داشته است (Lucy *et al.*, 2001). در راستای همین مطالعات، میزان حذف حیوان از گله به دلایل تولیدمثلی ۲۶ درصد گزارش شده است (Walsh *et al.*, 2011; Thatcher *et al.*, 2010). بنابراین، شواهد علمی موجود نشان می‌دهد که انگیزه‌های مطالعاتی برای بهبود ژنتیکی باروری در گاوهای شیری باید تقویت شود (Royal *et al.*, 2000).

در خصوص بهبود ژنتیکی باروری دو شناسه مهم وجود دارد: اول این صفت، طبیعت پلی‌ژنیک دارد و جزء صفات کمی با تعداد ژن‌های زیاد کوچک اثر دسته‌بندی می‌شود و دوم وراثت‌پذیری آن پایین است (Berry *et al.*, 2014) و سهم ژن‌های افزایشی در آن قابل توجه نمی‌باشد؛ در نتیجه پاسخ به انتخاب این صفات چشمگیر نمی‌باشد (Butler, 2014; Bisinotto *et al.*, 2014). لذا، تکنیک‌های مولکولی پیشرفته مانند انتخاب به کمک نشانگرها و ویرایش ژن (Gene Editing) می‌توانند با پرده‌برداری از سیمای ژنوم و ترانسکریپتوم به بهبود ژنتیکی صفات تولیدمثلی کمک قابل توجهی داشته باشند.

به طور کلی، عملکرد تولیدمثلی تحت تأثیر سه عامل مهم باروری، رشد و تکامل رویانی و همچنین زنده‌مانی آن است. بروز اختلال و تضعیف عملکرد در هر کدام از موارد ذکر شده موجب از بین رفتن آبستنی و کاهش بازده تولیدمثلی می‌شود (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008). تداوم فرآیند آبستنی شامل یک برهمکنش پیچیده میان جنین، بافت آندومترיום و جسم زرد ماده آبستن (CL) است (Robinson *et al.*, 2008). بافت آندومترיום، غشای مخاطی پوشاننده لومن رحم است که از طریق ترشحات هیستوتروف، میزان رشد جنین را تسریع می‌بخشد (Forde *et al.*, 2014) و در تنظیم چرخه فحلی، نیز نقش دارد. بافت آندومترיום رحم در روز هفتم چرخه فحلی، فرآیند مهمی برای بازسازی رحم و شروع ترشح هیستوتروف را برعهده دارد (Spencer *et al.*, 2008). بلوغ جسم زرد و افزایش سریع غلظت پروژسترون در مدت زمان بسیار کوتاهی پس از تخمک‌گذاری از بقایای فولیکولار صورت می‌پذیرد. در تولیدمثل پستانداران، وجود جسم زرد (CL) نقش مهمی را در چرخه تولیدمثل و فحلی برعهده دارد (Gecaj *et al.*, 2017). در واقع، جسم زرد به عنوان بافتی بسیار پویا، دارای رشد دوره‌ای و عملکردی و همچنین نمونه‌ای ایده‌آل برای مطالعه فرآیندهای مختلف سلولی است که در آن تکثیر سلولی و آپوپتوز، فعال‌سازی سیستم ایمنی بدن، تنظیم پایین پروتئین‌های عملکردی و ماتریس سلولی رخ می‌دهد (Davis *et al.*, 2003; Sugino & Okuda, 2007; Yoshioka *et al.*, 2013). مختلف حاکی از شواهدی است که تحلیل رویان قبل از لانه‌گزینی با عملکرد جسم زرد در ارتباط است (Mondal & Prakash, 2002).

بسیاری از مطالعات پیشین، تغییرات رونویسی تنظیم شده در تخمدان، آندومترיום و جسم زرد گاو را با جزئیات قابل توجهی توصیف کرده‌اند (Berisha *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2004; Neuvians *et al.*, 2000). این در حالی است که همزمان مطالعات پویش کل ژنوم (GWAS) نیز برای صفات باروری در گاوهای شیری هلشتاین انجام شده است (Sahana *et al.*, 2010; Höglund *et al.*, 2014). به عنوان مثال در گاو، نواحی ژنومی مرتبط با صفات باروری در کروموزوم‌های شماره

(باروری بالا) و تعدادی نیز شایستگی ژنتیکی بسیار ضعیفی برای باروری (باروری پایین) داشته باشند. همچنین فرض شد که گاوهای شیری با باروری بالا در مقایسه با گاوهای شیری با باروری پایین تفاوت قابل تشخیصی در بیان ژن بافت آندومتریموم دارند. نتایج حاکی از آن است که در تجزیه و تحلیل عملکرد مبتنی بر شبکه برای بافت آندومتریموم، ۱۲۳ ژن در عملکردهای اکتین و اجزای اسکلت سلولی، سیستم ایمنی بدن و حمل و نقل یونی نقش دارند (Moran et al., 2017). در مطالعه‌ای مشابه نیز نتایج حاصل، اشاره به سهم قابل توجه بافت‌های آندومتریموم و جسم زرد در تفاوت فنوتیپی باروری و افزایش فهم نسبت به معماری ژنتیکی باروری در گاوهای شیری دارد (Moore et al., 2016).

مطالعات در دسترس پیرامون شناسایی ژن‌های بالا و پایین دست دخیل در باروری گاوهای شیری به ویژه مقایسه دو بافت آندومتریموم در بازه زمانی متفاوت (هفت و ۱۳ روزگی چرخه فحلی) و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی بسیار محدود هستند (Moore et al., 2016). لذا بررسی دو بافت آندومتریموم و جسم زرد به ویژه میان دو گروه از گاوهای شیری با باروری بالا و گروه با باروری پایین می‌تواند اهدافی آشکار و کاربردی جهت مطالعات بیان ژن برای تشخیص ژن‌های متفاوت بیان‌شده (DEG) را فراهم کند (Robinson et al., 2010). تفاوت این مطالعه با مطالعات پیشین انجام شده، استفاده از داده‌های RNA-Seq مختص بافت آندومتریموم رحم در دو بازه زمانی متفاوت (روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی) و همچنین بافت جسم زرد تخمدان در روز ۱۳ چرخه فحلی برای شناسایی ژن‌های مشترک با بیان افتراقی معنی‌دار در بازه‌های زمانی مختلف میان بافت‌های متفاوت دخیل در عملکرد تولیدمثلی گاوهای هلشتاین است. همچنین سعی شده است با گزارش افزایش و یا کاهش بیان ژن‌های شناسایی شده در دو بافت آندومتریموم و جسم زرد برای بازه‌های زمانی متفاوت و مقایسه آن‌ها، نتایج مطالعات قبلی تکمیل شود.

بنابراین، هدف اصلی از پژوهش حاضر، شناسایی ژن‌های کاندیدا و مشترک با استفاده از تجزیه و تحلیل نمونه‌های مبتنی بر فناوری پیشرفته RNA-Seq مربوط

یک، پنج، سیزده، شانزده و هجده گاو شناسایی شده است (Khatkar et al., 2014). نتایج متنوعی با استفاده از مطالعات مرتبط با ژنومیکس و ترانسکریپتوم روی اندام‌های مرتبط با باروری در گاو و بررسی جنبه‌های متابولیکی-سیگنالینگ و عملکردی مربوط به هر ژن در تولیدمثل گونه‌های دامی حاصل شده است (Moore et al., 2016; Moran et al., 2017). بر پایه بررسی‌های پیشین مربوط به عملکرد تولیدمثلی و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با باروری و انتقال آن در گونه‌های آزمایشگاهی و نیز گاوهای شیری فرض شد که در دو دسته از گاوهای شیری با باروری بالا و باروری پایین، تفاوت بیانی مختلفی در ژن‌های مرتبط با باروری در آندومتریموم و جسم زرد از خود نشان می‌دهند (Moore et al., 2016; Moran et al., 2017).

امروزه با کمک علم بیوانفورماتیک و سیستم بیولوژی می‌توان با کمک انواع داده‌ها (ژنومیک، پروتئومیک، ترانسکریپتومیکس و متابولومیکس) ژن‌های کلیدی و سیستم سلولی مربوط به باروری را شناسایی کرد (Ghafouri et al., 2020). طی دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای روی ژن‌های مرتبط با باروری و میزان تأثیر آن‌ها صورت گرفته است (Moore et al., 2016; Moran et al., 2017; Gecaj et al., 2017; Bahrami et al., 2019; Locatelli et al., 2017).

تولید اقتصادی شیر در صنعت گاوهای شیری نیاز به عملکرد مناسب و بهبود نرخ باروری دارد و فاصله آبدستی خصوصیتی است که برای برآورد کارایی تولیدمثلی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rodriguez-Martinez et al., 2008). بررسی دو بافت آندومتریموم و جسم زرد به ویژه میان دو گروه از گاوهای شیری با باروری بالا و گروه با باروری پایین می‌تواند جهت مطالعات بیان ژن برای شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده (Robinson et al., 2010) و مطالعه مسیرهای متابولیکی و سیگنالینگ برای تمرکز بر مناطق خاص ژنومی صورت گیرد (Cochran et al., 2013; Raven et al., 2014). بر این اساس Moran et al. (2017) در مطالعه‌ای در نظر گرفته بودند زمانی که در یک گله، گاوها از نظر صفت تولید شیر از شایستگی ژنتیکی مشابهی برخوردار باشند، تعدادی از آن‌ها می‌توانند شایستگی ژنتیکی بسیار خوبی برای باروری

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پیش‌پردازش داده‌ها پس از اطمینان از انتخاب مناسب‌ترین داده‌های خام با حداقل واریانس در شرایط محیطی حاکم، تجزیه و تحلیل و محاسبات بیوانفورماتیکی به شرح و جزئیات ذیل برای پیش‌پردازش داده‌های خام صورت گرفت. در گام اول، جهت کنترل کیفیت داده‌ها از دو نرم‌افزار معروف FastQC (Andrews, 2010) نسخه ۰,۷۲ و FastQ Groomer (Blankenberg et al., 2010) نسخه ۱,۱,۵ برای تبدیل فرمت Fastq شرکت ایلومینا به فرمت Fastq سازگار با توالی سانگر استفاده شد تا بتوان در نرم‌افزارهایی که در ادامه مورد استفاده می‌گیرند (مانند Mapping)، مشکلی پیشرو نباشد. سپس، براساس نتایج کنترل کیفیت داده‌های خام و تبدیل فرمت فایل‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger et al., 2014) نسخه ۰,۳۸,۰ ویرایش خوانش‌ها شامل حذف آداپتورها و خوانش‌های بی‌کیفیت انجام شد. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار TopHat2 (Kim et al., 2013) نسخه ۲,۱,۱ نقشه‌یابی قطعه‌های خوانش شده روی ژنوم مرجع گونه بوس تاروس (*Bos Taurus*) انجام شد. همچنین در پایان برای ارزیابی میزان تفاوت در بیان ژن‌ها از نرم‌افزار CuffDiff (Sherman & Lempicki, 2010) نسخه ۲,۲,۱,۶ استفاده گردید.

آنتولوژی ژن‌ها

در این مرحله، برای جمع‌آوری اطلاعات آنتولوژی ژن‌ها، از پایگاه داده‌های مختلفی همچون g: Profiler (DAVID <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)، GeneCards (Hung et al., 2009) و STRING (<https://www.genecards.org/>) و (https://string-db.org) استفاده شد.

به بافت آندومتریم رحم در دو بازه زمانی متفاوت (روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی) و همچنین بافت جسم زرد تخمدان در روز ۱۳ چرخه فحلی در دو گروه از گاوهای شیری با باروری بالا و باروری پایین، بررسی میزان بیان آن‌ها به صورت افزایش و یا کاهش بیان معنی‌دار در گروه با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین و همچنین در مرحله بعدی شناسایی مسیرهای متابولیکی و سیگنالینگ مرتبط با آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی با تفاوت بیانی و درک بیشتر و بهتر فرآیندهای زیستی مرتبط با عملکرد تولیدمثلی در گاوهای شیری هلشتاین به خصوص در بافت‌های آندومتریم در دو بازه زمانی متفاوت (روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی) و جسم زرد از ادغام دو مجموعه داده‌های مطالعه مستقل استفاده گردید. جهت انجام تجزیه و تحلیل دو مجموعه داده و شناسایی ژن‌های کاندیدای مؤثر در باروری دو گروه از گاوهای شیردهی با باروری بالا و باروری پایین از ابزارهای محاسباتی و نرم‌افزارهای مختلف که در زیر ارائه شده است، استفاده شد.

منشأ داده‌های خام جمع‌آوری شده

در گام اول، با توجه به هدف و فرضیات تعیین شده پیشین و بافت‌های مورد نظر، با جستجو در دو پایگاه داده ژنومی GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) و Array Express (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) برای بافت آندومتریم و جسم زرد در گونه بوس تاروس (*Bos taurus*) دو مجموعه کد دسترسی گردآوری شد. کدهای دسترسی GEO و اطلاعات مربوط به مجموعه داده‌های RNA-Seq به شرح جدول ۱ هستند.

جدول ۱. جزئیات اطلاعات مربوط به کدهای دسترسی GEO برای مجموعه داده‌های RNA-Seq

Table 1. Details of Information on GEO access codes for the RNA-Seq data sets

No.	Data Type	GSE	Platforms	Read Count	Tissue	No. Sample(s)	Contributor(s)
1	RNA-Seq	GSE52438	GPL15750 (Illumina Genome Analyzer Iix)	41508749	Endometrium (Day 7 of Oestrous Cycle)	14 (HF ¹ :7, LF ² :7)	Moran et al., 2017
2	RNA-Seq	GSE74076	GPL15749 (Illumina HiSeq 2000)	19268010	Endometrium (Day 13 of Oestrous Cycle) <i>Corpus luteum</i> (CL)	14 (HF: 8, LF:6) 12 (HF:7, LF: 5)	Moore et al., 2016

1. HF: High Fertility

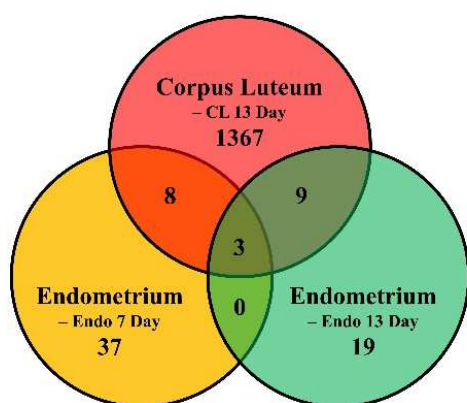
2. LF: Low Fertility

۱. باروری بالا

۲. باروری پایین

گاوهای شیری مرحله‌ای مهم برای بازسازی رحم و شروع ترشح هیستوتروف است، نمونه‌برداری از بافت آندومتریوم روز هفت چرخه فحلی انجام و در نهایت با تجزیه داده‌های RNA-Seq، تفاوت بیان ژنی قابل توجهی از ۴۰۳ ژن میان گاوهای شیری با باروری بالا و باروری پایین شناسایی شد. از جمله ژن‌هایی که مهم تلقی می‌شوند می‌توان به COL4A3، C5، SAA3، MASP1، TPM1 و MHC اشاره کرد که نقش قابل توجهی در باروری گاوهای شیری دارند. پس از آنتولوژی ژن‌های کلیدی و هاب در شبکه، مشخص شد که از نظر فیزیولوژیکی در عملکرد ایمنی بدن، اکتین و اجزای اسکلت سلولی دارای نقش می‌باشند (Moran et al., 2017).

با مقایسه سه مجموعه ژنی مربوط به داده‌های RNA-Seq بافت آندومتریوم در روز هفت چرخه فحلی، بافت‌های آندومتریوم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی، ژن‌های مشترک در میان بافت‌های مختلف با هم شناسایی شدند (شکل ۱، جدول‌های ۲-۴). در نتایج حاصل از این مطالعه، با مقایسه دو لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریوم و جسم زرد به ترتیب در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی در گاوهای شیری، هشت ژن به صورت مشترک شناسایی شد (جدول ۲).



شکل ۱. نمودار ون بیان افتراقی ژن‌ها در میان بافت آندومتریوم در دو روز هفت و ۱۳ چرخه فحلی و بافت جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی در گاوهای شیری

Figure 1. The Venn diagram of differential expression genes among endometrial tissue on days 7 and 13 of the estrous cycle and Corpus luteum on day 13 of the estrous cycle in dairy cows

استخراج فهرست ژنی مشترک

در این بخش، با تجزیه جداگانه داده‌های RNA-Seq مربوط به هر کدام از بافت‌ها تعداد ژن‌هایی که تفاوت معنی‌دار داشتند، شناسایی شد. در گام نخست، تجزیه مجموعه داده‌های هر کدام از بافت‌های آندومتریوم (در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی به صورت جداگانه) و جسم زرد (در روز ۱۳ چرخه فحلی) انجام شد و ژن‌هایی که در بیان تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.000001$) و نیز میزان بیان آن‌ها در مجموعه‌های داده از خود افزایش یا کاهش بیان نشان داده بودند، استخراج شدند. در نهایت سه مجموعه ژنی شامل ژن‌های مشترک میان آندومتریوم در روز هفتم چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی، آندومتریوم و جسم زرد هر دو در روز ۱۳ چرخه فحلی، و همچنین آندومتریوم در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی شناسایی شد.

نتایج و بحث

تجزیه داده‌های RNA-Seq

با استفاده از پردازش پروفایل بیانی آندومتریوم رحمی در دو بازه هفت و ۱۳ روزگی چرخه فحلی و همچنین جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی در گاوهای شیرده، در مجموع ۴۵۳۸ ژن معنی‌دار شناسایی شد و در نهایت پس از در نظر گرفتن حد آستانه تغییر بیان دسترسی GSE52438 (Moran et al., 2017) -بافت آندومتریوم در روز هفتم چرخه فحلی- و GSE74076 (Moore et al., 2016) -بافت آندومتریوم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی- به ترتیب تعداد ۴۸، ۳۱ و ۱۳۸۷ ژن شناسایی گردید. در کل تعداد ۱۴۶۶ ژن به عنوان ژن‌های دارای بیان متفاوت حاصل از تجزیه داده‌های RNA-Seq انتخاب شدند. با مقایسه سه فهرست ژنی اشاره شده، ژن‌هایی که در میان بافت‌های متفاوت مشترک بودند، مشخص و به عنوان فهرست‌های ژنی مشترک در نظر گرفته شدند (جدول‌های ۲-۴).

با توجه به اینکه، روز هفت چرخه فحلی در

جدول ۲. مشخصات ژن‌های مشترک بین لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریم و جسم زرد به ترتیب در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی، در گاوهای شیری با باروری بالا در مقایسه با گروه باروری پایین

Table 2. Characteristics of common genes between the gene list of endometrium and *Corpus luteum* tissues on days 7 and 13 of the estrous cycle, respectively, in high-fertility dairy cows compared to low-fertility dairy cows

Tissue	Gene	Annotation	Chromosome	Log2 (FC)	Down/Up Regulation (logFC)	p_value	q_value
Endo7	SYNM	Synemin, intermediate filament protein	21	-0.8912	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	SYNM	Synemin, intermediate filament protein	21	1.0562	Up	0.00035	0.0061
Endo7	PARM1	<i>Bos taurus</i> prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	6	-0.7740	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	PARM1	<i>Bos taurus</i> prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	6	0.9592	Up	0.0004	0.0067
Endo7	NXPE2	Neurexophilin and PC-esterase domain family, member 2	15	3.0231	Up	5.00E-05	0.0176
CL13	NXPE2	Neurexophilin and PC-esterase domain family, member 2	15	4.2796	Up	0.0001	0.0022
Endo7	NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3	5	-1.4843	Down	0.0001	0.0317
CL13	NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3	5	-0.9580	Down	0.0004	0.0067
Endo7	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain	2	-1.1041	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain	2	-1.4816	Down	5.00E-05	0.0012
Endo7	COL12A1	Collagen alpha-1(XII) chain	9	-0.9184	Down	0.00015	0.0433
CL13	COL12A1	Collagen alpha-1(XII) chain	9	0.7023	Up	0.0001	0.0022
Endo7	ALPK3	Alpha-Protein Kinase 3	21	-0.8557	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	ALPK3	Alpha-Protein Kinase 3	21	-0.9628	Down	5.00E-05	0.0012
Endo7	ADAMDEC1	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Like Protein Decysin-1	8	0.9665	Up	5.00E-05	0.0176
CL13	ADAMDEC1	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Like Protein Decysin-1	8	1.2788	Up	5.00E-05	0.0012

ALPK3 در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت آندومتریم و جسم زرد به ترتیب در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی کاهش پیدا کرده است (جدول ۲). (NT5DC3 (5'-Nucleotidase) Domain Containing 3) یک ژن کدکننده پروتئین در کروموزوم پنج گاوهای شیری است که آنتولوژی آن شامل فعالیت هیدرولاز و فعالیت ۵-نوکلئوتیداز است و پارالوگ مهم این ژن NT5DC2 می‌باشد (Collagen) COL4A3 (<https://www.genecards.org>) (Type IV Alpha 3 Chain) ژن کدکننده پروتئین در کروموزوم دو گاوهای شیری است که مسیرهای مربوط به اینتگرین (Integrin) و اصلاح زنجیره کلاژن را کد می‌کند و آنتولوژی آن شامل فعالیت مولکول ساختاری و جزء اصلی ساختار ماتریس خارج سلولی است (<https://www.genecards.org>) کلاژن نوع IV، اصلی‌ترین جزء ساختاری غشای پایه و یک پروتئین چند بخشی است که از سه زیر واحد آلفا تشکیل شده است. مولکول‌های کلاژن نوع IV به یکدیگر متصل می‌شوند و شبکه‌های پیچیده پروتئین را تشکیل می‌دهند. این شبکه‌ها بخش بزرگی از غشاهای پایه را تشکیل می‌دهند که ساختارهایی نازک مانند هستند و سلول‌ها را در بسیاری از بافت‌ها جدا و پشتیبانی می‌کنند (Pescucci *et al.*, 2004). (Alpha Kinase 3) ALPK3 یک ژن

نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NXPE2 و ADAMDEC1 در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت آندومتریم و جسم زرد به ترتیب در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی افزایش پیدا کرده است (جدول ۲). همچنین در گاوها ژن NXPE2 در کروموزوم ۱۵ قرار دارد و در این مطالعه به عنوان ژن کاندیدا مرتبط با باروری شناخته شده است. عملکرد این ژن هنوز هم ناشناخته باقی مانده است. این در حالی است که آن‌ها پروتئین‌های ترشح شده‌ای هستند که شباهت خود را با اعضای خانواده پروتئین‌های نورکسوفیلین (Neurexophilin) نشان می‌دهند و مکانیسم‌های اساسی این ژن نیاز به توضیح و مطالعه بیشتر دارد (Yassin *et al.*, 2018). (ADAMDEC1 (A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Like Protein Decysin-1) یک ژن مهم متعلق به خانواده متالوپروتئینازها است که نقش مهمی در پاسخ ایمنی ایفا می‌کند. همچنین علاوه بر بیان در ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک، در اوایل آبستنی گونه موش (Baran *et al.*, 2003) و در طویل‌شدگی، ترشح مایع مجرای رحمی و زنده‌مانی رویان در گاوهای شیری به عنوان ژن کلیدی شناخته می‌شود (Zonuzagh *et al.*, 2020). میزان بیان سه ژن NT5DC3، COL4A3 و

(Pelagio *et al.*, 2015). یکی از ژن‌هایی که همزمان با فعال شدن ژنوم جنینی در گاو بیان شده است، ژن Prostate Androgen-Regulated Mucin-1 (PARM1) است و ممکن است نقش مهمی در رشد اولیه جنین قبل از لانه‌گزینی داشته باشد. این ژن برای یک گلیکوپروتئین غشایی نوع ۱ موسین رمزگذاری می‌شود که در غشای شبکه آندوپلاسمی (Endoplasmic reticulum) قرار دارد و اولین ژن رمزگذار پروتئین ER است که در تمایز سلولی بلاستوسیست نقش دارد (Zolini *et al.*, 2019). ژن COL12A1 کلاژن نوع XII از زنجیره آلفا که عضوی از خانواده کلاژن FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) را کد می‌کند. از جمله مسیرهای مربوط به آن می‌توان به مسیر اینتگرین (Integrin) و اصلاح زنجیره کلاژن اشاره کرد. آنتولوژی این ژن شامل اصلاح ساختاری ماتریس خارج سلولی است که مقاومت کششی را ایجاد می‌کند (Connor *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2014). با مقایسه دو لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی در گاوهای شیری نیز ۹ ژن به صورت مشترک شناسایی شدند (جدول ۳).

کدکننده پروتئین است که عملکرد آن شامل فعالیت ترانسفراز، انتقال گروه‌های حاوی فسفر و فعالیت پروتئین سرین/ترونتین است. پارالوگ مهم این ژن HMCN1 است که در معماری اتصالات سلول‌های اپی‌تلیال دارای نقش می‌باشد. گزارش شده است که این ژن در انواع زیادی از فرآیندهای سلولی مانند ترجمه پروتئین، هموستاز Mg^{2+} ، حمل و نقل درون سلولی، مهاجرت سلولی، چسبندگی و تکثیر نیز نقش دارد و به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در فرآیند تولیدمثل گوسفندان نیز معرفی شده است (Hernández-Montiel *et al.*, 2020).

میزان بیان سه ژن PARM1، SYNم و COL12A1 در گاوهای شیرده با باروری بالا نسبت به گروه باروری پایین برای بافت آندومتریم در روز هفت چرخه فحلی کاهش و برای بافت جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی افزایش پیدا کرده است (جدول ۲). پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن SYNم (Synemin) یکی از اعضای خانواده فیلامنت میانی (IF) است. از جمله مسیرهای مرتبط با آن، می‌توان به سلول‌های عصبی در زمینه اصلاح اسکلت سلولی و همچنین فعالیت اصلاح ساختاری عضله و ایجاد مقاومت در برابر فشار مکانیکی اشاره کرد (Granger & Lazarides, 1980; García-

جدول ۳. مشخصات ژن‌های مشترک بین لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی، در گاوهای شیری با باروری بالا در مقایسه با گروه با باروری پایین

Table 3. Characteristics of common genes between the gene list of endometrium and *Corpus luteum* tissues on day 13 of the estrous cycle, in high-fertility dairy cows compared to low-fertility dairy cows

Tissue	Gene	Annotation	Chromosome	Log2 (FC)	Down/Up Regulation (logFC)	p_value	q_value
Endo13	SERPINA14	Uterine Serpins; Belongs to the serpin family, UTMP subfamily	21	-1.6412	Down	5.00E-05	0.0196
CL13	SERPINA14	Uterine Serpins; Belongs to the serpin family, UTMP subfamily	21	3.5901	Up	5.00E-05	0.0012
Endo13	S100A9	S100 Calcium Binding Protein A9	3	2.3236	Up	5.00E-05	0.0196
CL13	S100A9	S100 Calcium Binding Protein A9	3	1.3729	Up	0.0031	0.0324
Endo13	PI16	Peptidase inhibitor 16	23	1.7261	Up	5.00E-05	0.0196
CL13	PI16	Peptidase inhibitor 16	23	0.8826	Up	5.00E-05	0.0012
Endo13	OAS1X	<i>Bos taurus</i> 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (OAS1Z)	17	-1.2593	Down	5.00E-05	0.0196
CL13	OAS1X	<i>Bos taurus</i> 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (OAS1Z)	17	-1.9272	Down	5.00E-05	0.0012
Endo13	MSTN	Growth/differentiation factor 8	2	1.2434	Up	0.0001	0.0355
CL13	MSTN	Growth/differentiation factor 8	2	2.2680	Up	5.00E-05	0.0012
Endo13	MASP1	<i>Bos taurus</i> mannan-binding lectin serine peptidase 1	1	2.0196	Up	5.00E-05	0.0196
CL13	MASP1	<i>Bos taurus</i> mannan-binding lectin serine peptidase 1	1	-1.0804	Down	5.00E-05	0.0012
Endo13	CD83	<i>Bos taurus</i> CD83 molecule	23	-1.6778	Down	5.00E-05	0.0196
CL13	CD83	<i>Bos taurus</i> CD83 molecule	23	0.7106	Up	0.0002	0.0046
Endo13	CA2	Carbonic anhydrase 2	14	1.3947	Up	0.0001	0.0355
CL13	CA2	Carbonic anhydrase 2	14	1.2930	Up	5.00E-05	0.0012
Endo13	C2	Complement C2	23	-1.2997	Down	5.00E-05	0.0196
CL13	C2	Complement C2	23	1.2235	Up	0.0002	0.0046

لیازها هستند و در درجه اول مسئول کاتالیز هیدراتاسیون برگشت‌پذیر دی‌اکسیدکربن برای تشکیل یون‌های بی‌کربنات (HCO_3^-) و هیدروژن (H^+) هستند (<https://www.genecards.org>). گزارش شده است که آنیدراز کربنیک در دستگاه تولیدمثلی پستانداران ماده به ویژه در بافت‌های آندومتریوم رحم، بافت جفت و لوله‌های فالوپ به عنوان مکان اصلی فعالیت آنیدراز کربنیک در مراحل اولیه آبستنی افزایش می‌یابد (Lutwak-Mann, 1995).

میزان بیان ژن OASIX در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت کاهش پیدا کرده است (جدول ۳). ژن OASIX (Oligoadenylate Synthetase 1) یک ژن کدکننده پروتئین است که از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به مسیر سیگنالینگ پرولاکتین و سیگنالینگ گاما اینترفرون اشاره کرد. همچنین در اتصال RNA و فعالیت ترانسفرز نقش دارد و گزارش شده است که ممکن است برای تنظیم پاسخ ایمنی طحال مادر در اوایل بارداری در گوسفندان مفید باشد (Wang *et al.*, 2019).

میزان بیان سه ژن SERPINA14، CD83 و C2 در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین برای بافت آندومتریوم در روز ۱۳ چرخه فعلی کاهش و برای بافت جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فعلی افزایش پیدا کرده است (جدول ۳). سرپین‌های رحمی یا SERPINA14، پروتئین‌هایی هستند که در مقادیر زیادی توسط اپی‌تلیوم آندومتر در دوران بارداری ترشح می‌شوند. این ژن در گروه محدودی از پستانداران مانند نشخوارکنندگان و اسب‌ها وجود دارد و نقش مهمی در بارداری دارد. ژن SERPINA14 ممکن است عملکرد ایمنی بدن در گوسفندان را تنظیم کند (Padua & Hansen, 2010). ژن CD83 (CD83 Molecule) کدکننده پروتئینی است که در مسیرهای مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز و مسیر سیگنالینگ گیرنده‌های سلول T نقش دارند. همچنین ممکن است نقش مهمی در ارائه آنتی‌ژن یا فعل و انفعالات سلولی که به دنبال فعال شدن لنفوسیت‌ها ایجاد می‌شود، داشته باشد (Otto *et al.*,

مقایسه دو فهرست ژنی بافت‌های آندومتریوم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فعلی نشان داد که میزان بیان چهار ژن S100A9، PI16، MSTN و CA2 در گاوهای شیرده با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت افزایش پیدا کرده است (جدول ۳). ژن S100A9 (S100 Calcium Binding Protein) به عنوان کالگرانولین B نیز شناخته می‌شود و در سلول‌های ایمنی بدن از جمله نوتروفیل، مونوسیت و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود. این ژن همچنین می‌تواند پاسخ‌های التهابی را فعال کرده و آپوپتوز را در انواع مختلف سلول‌ها تنظیم کند. دوز بیش از حد S100A9 با ایجاد التهاب و اختلال در عملکرد بافت، ممکن است اثر سوئی بر دستگاه تولیدمثل داشته باشد (Funeshima *et al.*, 2020). PI16 (Peptidase Inhibitor 16) یک ژن کدکننده پروتئین است که آنتولوژی آن شامل فعالیت بازدارنده پیتیداز است و ممکن است رشد قلب را مهار کند. این ژن از زیرخانواده CAP (پروتئین‌های ترشحی غنی از سیستئین، آنتی ژن ۵ و پروتئین مرتبط با پاتوژن ۱) می‌باشد که در تولیدمثل، سرطان و سیستم ایمنی بدن نقش دارند (Gibbs *et al.*, 2008). ژن MSTN (Myostatin) یک لیگاند ترشح شده از خانواده TGF-beta (تبدیل‌کننده فاکتور رشد بتا) از پروتئین‌ها را رمزگذاری می‌کند. لیگاندهای این خانواده گیرنده‌های مختلف TGF-beta را متصل می‌کنند و منجر به جذب و فعال‌سازی عوامل رونویسی خانواده SMAD می‌شود که بیان ژن را تنظیم می‌کنند. این پروتئین به طور منفی تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی اسکلتی را تنظیم می‌کند. جهش در این ژن با افزایش توده عضلانی اسکلتی در انسان و سایر پستانداران به ویژه گاوها ارتباط دارد. همچنین ژن MSTN (میوستاتین) به عنوان عامل اصلی بروز فنوتیپ ماهیچه مضاعف در گاو شناسایی شده است (Fiems, 2012). پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن CA2 (Carbonic Anhydrase 2)، یکی از چندین ایزوزیم کربنیک آنیدراز است که هیدراتاسیون برگشت‌پذیر دی‌اکسیدکربن را کاتالیز می‌کند. آنیدرازهای کربنیک (EC 4.2.1.1) آنزیم‌های حاوی روی متعلق به خانواده

است (جدول ۴). SAA3 (Serum Amyloid A3) یک ژن کدکننده پروتئین است. اگرچه ایزوفرم‌های یک تا چهار ژن SAA در گاو شناسایی شده‌اند، عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها کاملاً شناخته نشده است. در گزارشی نشان داده شده است که در گاوها، SAA3 نقش ایمونولوژیک در برابر عفونت باکتریایی در بافت‌های اپیتلیال، از جمله روده کوچک، غده پستانی، ریه و رحم دارد، همچنین بیان آن ممکن است یک پاسخ اولیه از سیستم ایمنی ذاتی باشد (Murata *et al.*, 2020).

میزان بیان ژن JSP.1 در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت آندومتریوم در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی کاهش پیدا کرده است (جدول ۴). ژن JSP.1 (MHC Class I JSP.1) متعلق به کلاس I است که تقریباً گلیکوپروتئین‌های بیان شده در تمام سلول‌های هسته را رمزگذاری می‌کند و به وسیله سایر سلول‌های سیستم ایمنی توانایی از بین بردن سلول‌هایی را دارد که آنتی‌ژن‌های خاصی را در بدن نشان می‌دهند (Fonseca *et al.*, 2020). همچنین گزارش شده است که پس از بارداری بیشترین میزان بیان برای JSP.1 بوده است (Mansouri-Attia *et al.*, 2009).

همچنین میزان بیان ژن C5 در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در بافت آندومتریوم در روز هفت چرخه فحلی کاهش و در بافت آندومتریوم و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی افزایش پیدا کرده است (جدول ۴).

(Complement C2) C2 (2018) نیز یک ژن کدکننده پروتئین است که از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به پاسخ ایمنی مسیر مکمل ناشی از لکتین و سیستم ایمنی ذاتی اشاره کرد. همچنین آنتولوژی این ژن شامل فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین است (Ceri *et al.*, 201).

میزان بیان ژن MASP1 (Mannan Binding Lectin Serine Peptidase 1) در گاوهای شیری با باروری بالا نسبت گروه باروری پایین برای بافت آندومتریوم در روز ۱۳ چرخه فحلی افزایش و برای بافت جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی کاهش پیدا کرده است (جدول ۳). از جمله مسیرهای مربوط به این ژن، پاسخ ایمنی مسیر مکمل ناشی از لکتین و اتصال و جذب لیگاند توسط گیرنده‌های ناخالص است. حاشیه‌نویسی مربوط به این ژن شامل اتصال یون کلسیم و فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین است. گزارش شده است که MASP1 می‌تواند در برنامه تولیدمثل برای بهبود عملکرد تولید گاوهای هلشتاین چینی اجرا شود (Zhang *et al.*, 2019).

با مقایسه سه لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریوم در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی در گاوهای شیری سه ژن SAA3، JSP.1 و C5 به صورت مشترک شناسایی شدند (جدول ۴).

میزان بیان ژن SAA3 در گاوهای شیرده با باروری بالا نسبت به گروه با باروری پایین در هر دو بافت آندومتریوم در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی افزایش پیدا کرده

جدول ۴. مشخصات ژن‌های مشترک بین لیست ژنی مربوط به دو بافت آندومتریوم در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فحلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فحلی، در گاوهای شیری با باروری بالا در مقایسه گروه با باروری پایین

Table 4. Characteristics of common genes between the gene list of endometrial tissues on days 7 and 13 of the estrous cycle and *Corpus luteum* on day 13 of the estrous cycle in high-fertility dairy cows compared to low-fertility dairy cows

Tissue	Gene	Annotation	Chromosome	Log2 (FC)	Down/Up Regulation (logFC)	p_value	q_value
Endo 7	SAA3	Serum amyloid A3 protein	29	1.2942	Up	5.00E-05	0.0176
CL13	SAA3	Serum amyloid A3 protein	29	2.5438	Up	5.00E-05	0.0012
Endo 13	SAA3	Serum amyloid A3 protein	29	1.5153	Up	5.00E-05	0.0196
Endo 7	JSP.1	<i>Bos taurus</i> MHC Class I JSP.1	23	-0.9428	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	JSP.1	<i>Bos taurus</i> MHC Class I JSP.1	23	-0.9603	Down	0.0001	0.0030
Endo 13	JSP.1	<i>Bos taurus</i> MHC Class I JSP.1	23	-1.5950	Down	5.00E-05	0.0196
Endo 7	C5	Complement C5	8	-1.8153	Down	5.00E-05	0.0176
CL13	C5	Complement C5	8	1.6559	Up	0.0011	0.0156
Endo 13	C5	Complement C5	8	2.1418	Up	5.00E-05	0.0196

و فرآیندهای زیستی مشابه می‌توانند از ژن‌های مورد هدف در این مطالعه باشند.

نتیجه‌گیری کلی

آنالیز بیان ژن افتراقی در بافت آندومترיום در روزهای هفت و ۱۳ چرخه فعلی و جسم زرد در روز ۱۳ چرخه فعلی در دو دسته از گاوهای شیری هلشتاین با باروری بالا و گروه با باروری پایین، ۱۴۶۶ ژن شناسایی شد که ژن‌های مشترک شناسایی شده در میان بافت‌های آندومترיום و جسم زرد در مسیرهای مختلف متابولیسمی و سیگنالینگ مرتبط با باروری مانند سیستم حمل و نقل یون‌های متعدد، کانال‌های ولتاژ دریچه‌دار و همچنین اسکلت سلولی دخالت دارند. ژن‌های دسته‌بندی شده در بین گونه‌های مختلف یکسان و مشترک هستند. به طور کلی نتایج حاکی از شناسایی ۲۰ ژن مشترک مرتبط با التهاب، عملکرد سیستم ایمنی بدن و همچنین اکتین و اجزای اصلی ساختار ماتریس سلولی است که می‌توانند در افزایش درک ما نسبت به نقش عملکردی دو بافت آندومترיום و جسم زرد در عملکرد تولیدمثلی و همچنین معماری ژنتیکی مؤثر بر صفت باروری در پستانداران مفید بوده و شواهد مولکولی و محکمی جهت ارتباط بین میزان بیان ژن در محیط رحم و بهبود ژنتیکی برای صفت باروری در گاوهای شیری را ارائه دهند.

ژن C5 (Complement C5)، یک ژن کدکننده پروتئین است که از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به پاسخ ایمنی مسیر مکمل ناشی از لکتین و مسیر سیگنالینگ توسط GPCR اشاره کرد. حاشیه‌نویسی آن نیز شامل اتصال به گیرنده‌های سیگنالینگ و فعالیت بازدارنده اندوپتیداز است (<https://www.genecards.org>). برخی از نتایج نشان می‌دهند که بسیاری از فاکتورها در سیستم مکمل (از جمله اجزای مکمل C1، C3، C5، C6، C7، C8 و C9 و همچنین فاکتور مکمل B و فاکتور H) در استرس حرارتی در خون تنظیم می‌شوند (Min et al., 2016). سیستم مکمل بخشی از سیستم ایمنی بدن است که علاوه بر تقویت پاسخ‌های ایمنی سازگار، نقشی اساسی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کند و خط اصلی دفاع در برابر عفونت است (Carroll, 2008).

در مجموع استفاده از اطلاعات پایگاه‌های داده‌های مختلف به ویژه داده‌های RNA-Seq، روشی مناسب و قابل اتکا برای ارزیابی تفاوت بیان ژن‌های مختلف و کلیدی در بافت‌های متفاوت از جمله آندومترיום و جسم زرد در گاوهای شیری هلشتاین است. آنزیم‌ها و هورمون‌های مرتبط (شناسایی شده) با باروری در پستانداران به ویژه در اوایل لانه‌گزینی و آبستنی می‌توانند بر روی مسیرهای مختلف متابولیسمی و سیگنالینگ و همچنین سیستم ایمنی بدن کنترل و نقش بسزایی داشته باشند. ژن‌های کدشده در شبکه‌ها

REFERENCES

- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bahrami, A., Miraie-Ashtiani, S.R., Sadeghi, M. & Najafi, A. (2017). Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during different stages of folliculogenesis. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(3), 463-471. (In Farsi)
- Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W. & Einspanier, R. (2000). Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, 167(3), 371-382.
- Berry, D.P., Wall, E. & Pryce, J.E. (2014). Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal*, 8(s1), 105-121.
- Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S. & Santos, J.E.P. (2014). Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *Animal*, 8(s1), 151-159.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A. & Galaxy Team. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Butler, S.T. (2014). Nutritional management to optimize fertility of dairy cows in pasture-based systems. *Animal*, 8(s1), 15-26.

9. Butler, W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83(2-3), 211-218.
10. Carroll, M.C. (2008). Complement and humoral immunity. *Vaccine*, 26, I28-I33.
11. Cerri, R.L.A., Thompson, I.M., Kim, I.H., Ealy, A.D., Hansen, P.J., Staples, C.R., Li, J.L., Santos, J.E.P. & Thatcher, W.W. (2012). Effects of lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17 of the estrous cycle or pregnancy. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5657-5675.
12. Cochran, S.D., Cole, J.B., Null, D.J. & Hansen, P.J. (2013). Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC Genetics*, 14(1), 1-23.
13. Connor, E.E., Siferd, S., Elsasser, T.H., Evock-Clover, C.M., Van Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Fernandes, V.M. & Capuco, A.V. (2008). Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC Genomics*, 9(1), 1-14.
14. Davis, J.S., Rueda, B.R. & Spanel-Borowski, K. (2003). Microvascular endothelial cells of the *Corpus luteum*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 1-15.
15. De Vries, A. (2006). Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3876-3885.
16. Fiems, L.O. (2012). Double muscling in cattle: genes, husbandry, carcasses and meat. *Animals*, 2(3), 472-506.
17. Fonseca, L.F.S., dos Santos Silva, D.B., Gimenez, D.F.J., Baldi, F., Ferro, J.A., Chardulo, L.A.L. & de Albuquerque, L.G. (2020). Gene expression profiling and identification of hub genes in Nelore cattle with different marbling score levels. *Genomics*, 112(1), 873-879.
18. Forde, N., Simintiras, C.A., Sturmey, R., Mamo, S., Kelly, A.K., Spencer, T.E., Bazer, F.W. & Lonergan, P. (2014). Amino acids in the uterine luminal fluid reflects the temporal changes in transporter expression in the endometrium and conceptus during early pregnancy in cattle. *PLoS One*, 9(6), e100010.
19. Funeshima, N., Tanikawa, N., Yaginuma, H., Watanabe, H., Iwata, H., Kuwayama, T., Hamano, S. & Shirasuna, K. (2020). Adverse reproductive effects of S100A9 on bovine sperm and early embryonic development in vitro. *Plos One*, 15(1), e0227885.
20. García-Pelagó, K.P., Muriel, J., O'Neill, A., Desmond, P.F., Lovering, R.M., Lund, L., Bond, M. & Bloch, R.J. (2015). Myopathic changes in murine skeletal muscle lacking synemin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 308(6), C448-C462.
21. Gecaj, R.M., Schanzenbach, C.I., Kirchner, B., Pfaffl, M.W., Riedmaier, I., Tweedie-Cullen, R.Y. & Berisha, B. (2017). The dynamics of microRNA transcriptome in bovine corpus luteum during its formation, function, and regression. *Frontiers in Genetics*, 8, 213.
22. Ghafouri, F., Sadeghi, M., Bahrami, A. & Miraei Ashtiani, S.R. (2020). Identification of genes affecting the amount of abdominal fat in broiler chickens using microarray and RNA sequencing data. *Iranian Journal of Animal Science*, 50(4), 259-269. (In Farsi)
23. Gibbs, G.M., Roelants, K. & O'bryan, M.K. (2008). The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine Reviews*, 29(7), 865-897.
24. Granger, B.L. & Lazarides, E. (1980). Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. *Cell*, 22(3), 727-738.
25. Hernández-Montiel, W., Martínez-Núñez, M.A., Ramón-Ugalde, J.P., Román-Ponce, S.I., Calderón-Chagoya, R. & Zamora-Bustillos, R. (2020). Genome-wide association study reveals candidate genes for litter size traits in Pelibuey sheep. *Animals*, 10(3), 434.
26. Höglund, J.K., Sahana, G., Guldbandsen, B. & Lund, M.S. (2014). Validation of associations for female fertility traits in Nordic Holstein, Nordic Red and Jersey dairy cattle. *BMC Genetics*, 15(1), 1-7.
27. Kadri, N.K., Sahana, G., Charlier, C., Iso-Touru, T., Guldbandsen, B., Karim, L., Nielsen, U.S., Panitz, F., Aamand, G.P., Schulman, N. & Georges, M. (2014). A 660-Kb deletion with antagonistic effects on fertility and milk production segregates at high frequency in Nordic Red cattle: additional evidence for the common occurrence of balancing selection in livestock. *PLoS Genet*, 10(1), e1004049.
28. Khatkar, M.S., Randhawa, I.A.S. & Raadsma, H.W. (2014). Meta-assembly of genomic regions and variants associated with female reproductive efficiency in cattle. *Livestock Science*, 166, 144-157.
29. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. & Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), 1-13.
30. Locatelli, Y., Forde, N., Blum, H., Graf, A., Piégu, B., Mermillod, P., Wolf, E., Lonergan, P. & Saint-Dizier, M. (2019). Relative effects of location relative to the corpus luteum and lactation on the transcriptome of the bovine oviduct epithelium. *BMC Genomics*, 20(1), 1-13.
31. Lucy, M.C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1277-1293.

32. Lutwak-Mann, CE. (1955). Carbonic anhydrase in the female reproductive tract. Occurrence, distribution and hormonal dependence. *Journal of Endocrinology*, 13(1), 26-38.
33. Mansouri-Attia, N., Aubert, J., Reinaud, P., Giraud-Delville, C., Taghouti, G., Galio, L., Everts, R.E., Degrelle, S., Richard, C., Hue, I. & Yang, X. (2009). Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics*, 39(1), 14-27.
34. Min, L., Cheng, J., Zhao, S., Tian, H., Zhang, Y., Li, S., Yang, H., Zheng, N. & Wang, J. (2016). Plasma-based proteomics reveals immune response, complement and coagulation cascades pathway shifts in heat-stressed lactating dairy cows. *Journal of Proteomics*, 146, 99-108.
35. Mondal, S. & Prakash, B.S. (2002). Comparison of luteal function between cows and buffaloes during estrous cycle. *Indian Journal of Dairy Science*, 55(3), 142-144.
36. Moore, S.G., Pryce, J.E., Hayes, B.J., Chamberlain, A.J., Kemper, K.E., Berry, D.P., McCabe, M., Cormican, P., Lonergan, P., Fair, T. & Butler, S.T. (2016). Differentially expressed genes in endometrium and corpus luteum of Holstein cows selected for high and low fertility are enriched for sequence variants associated with fertility. *Biology of Reproduction*, 94(1), 19-1.
37. Moran, B., Butler, S.T., Moore, S.G., MacHugh, D.E. & Creevey, C.J. (2017). Differential gene expression in the endometrium reveals cytoskeletal and immunological genes in lactating dairy cows genetically divergent for fertility traits. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(2), 274-282.
38. Murata, E., Kozaki, S., Murakami, T., Shimizu, K., Okada, A., Ishiguro, N. & Inoshima, Y. (2020). Differential expression of serum amyloid A1 and A3 in bovine epithelia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 19-0473.
39. Neuvians, T.P., Berisha, B. & Schams, D. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 67(4), 389-395.
40. Otto, P.I., Guimarães, S.E., Verardo, L.L., Azevedo, A.L.S., Vandenplas, J., Soares, A.C., Sevillano, C.A., Veroneze, R., Maria de Fatima, A.P., de Freitas, C. & Prata, M.C.A. (2018). Genome-wide association studies for tick resistance in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle: A deeper look into this intricate mechanism. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11020-11032.
41. Padua, M.B. & Hansen, P.J. (2010). Evolution and function of the uterine serpins (SERPINA14). *American Journal of Reproductive Immunology*, 64(4), 265-274.
42. Pescucci, C., Mari, F., Longo, I., Vogiatzi, P., Caselli, R., Scala, E., Abaterusso, C., Gusmano, R., Seri, M., Miglietti, N. & Bresin, E. (2004). Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney International*, 65(5), 1598-1603.
43. Pritchard, T., Coffey, M., Mrode, R. & Wall, E. (2013). Genetic parameters for production, health, fertility and longevity traits in dairy cows. *Animal*, 7(1), 34-46.
44. Raven, L.A., Cocks, B.G., Goddard, M.E., Pryce, J.E. & Hayes, B.J. (2014). Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genetics Selection Evolution*, 46(1), 1-13.
45. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
46. Robinson, R.S., Hammond, A.J., Wathes, D.C., Hunter, M.G. & Mann, G.E. (2008). *Corpus luteum*–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 104-112.
47. Rodriguez-Martinez, H., Hultgren, J., Båge, R., Bergqvist, A.S., Svensson, C., Bergsten, C., Lidfors, L., Gunnarsson, S., Algers, B., Emanuelson, U. & Berglund, B. (2008). *Reproductive Performance in High-Producing Dairy Cows*. R01:R0108. 1-23
48. Royal, M., Mann, G.E. & Flint, A.P.F. (2000). Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 160(1), 53-60.
49. Sahana, G., Gulbrandsen, B., Bendixen, C. & Lund, M.S. (2010). Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41(6), 579-588.
50. Sarkar, M., Schilffarth, S., Schams, D., Meyer, H.H.D. & Berisha, B. (2011). The expression of thrombopoietin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(5), 757-762.
51. Sherman, B.T. & Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44.
52. Spencer, T.E., Sandra, O. & Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* (Cambridge, England), 135(2), 165-179.
53. Sugino, N. & Okuda, K. (2007). Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *Journal of Reproduction and Development*, 53(5), 977-986.

54. Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., Silvestre, F.T., Kim, I.H. & Staples, C.R. (2010). Perspective on physiological/endocrine and nutritional factors influencing fertility in post-partum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 2-14.
55. VanRaden, P.M., Sanders, A.H., Tooker, M.E., Miller, R.H., Norman, H.D., Kuhn, M.T. & Wiggans, G.R. (2004). Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2285-2292.
56. Walsh, S.W., Williams, E.J. & Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123(3-4), 127-138.
57. Wang, Y., Han, X., Zhang, L., Cao, N., Cao, L. & Yang, L. (2019). Early pregnancy induces expression of STAT1, OAS1 and CXCL10 in ovine spleen. *Animals*, 9(11), 882.
58. Yassin, M., Kissow, H., Vainer, B., Joseph, P.D., Hay-Schmidt, A., Olsen, J. & Pedersen, A.E. (2018). Cytochrome affects tumorigenesis and the expression of ulcerative colitis-associated genes under chemically induced colitis in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1-16.
59. Yoshioka, S., Abe, H., Sakumoto, R. & Okuda, K. (2013). Proliferation of luteal steroidogenic cells in cattle. *PLoS One*, 8(12), e84186.
60. Zhang, H., Wei, Y., Zhang, F., Liu, Y., Wang, H., Li, Y. & Li, G. (2019). Polymorphisms of mannose-binding lectin-associated serine protease 1 (MASP1) and its relationship with milk performance traits and complement activity in Chinese Holstein cattle. *Research in Veterinary Science*, 124, 346-351.
61. Zolini, A.M., Negrón-Pérez, V.M. & Hansen, P.J. (2019). Importance of prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 in development of the bovine blastocyst. *BMC Developmental Biology*, 19(1), 1-12.
62. Zonuzagh, J.J., Shahrabak, M.M. & Nejati-Javaremi, A. (2020). Transcriptome profile of endometrium for growth and elongation of dairy cattle embryo. *Animal Production Research*, 9(2), 1-13. (In Farsi)
63. Zou, Y., Zwolanek, D., Izu, Y., Gandhi, S., Schreiber, G., Brockmann, K., Devoto, M., Tian, Z., Hu, Y., Veit, G. & Meier, M. (2014). Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(9), 2339-2352.