

شناسایی عناصر تنظیمی رونویسی جدید درگیر در کاهش سرعت رشد پستانداران

Identification of novel regulatory elements involved in growth rate reduction in mammals

مریم بذرافشان^۱، محمدرضا بختیاریزاده^{۱*}، فاطمه مهدوی^۱، عبدالرضا صالحی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران

Bazrafshan M¹, Bakhtiarizadeh MR^{*1}, Mahdavi F¹, Salehi A¹

1- MSc Student, Assistant Professor, MSc Student, Associate Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrbakhtiari@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

رشد سریع در پستانداران به طور چشمگیری در دوران جنینی و اوایل تولد رخ می دهد اما با افزایش سن، نرخ رشد کاهش یافته یا تقریباً متوقف می شود. با این وجود سازوکار بیولوژیکی این کاهش سرعت رشد به طور کامل شناخته نشده است. این مطالعه به منظور درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در سرعت رشد پستانداران انجام شد. بدین منظور در ابتدا با استفاده از تجزیه و تحلیل داده های ریزآرایه، فهرستی از ژن هایی با بیان متفاوت در اندام هایی که الگوی زمانی مشابه برای کاهش رشد پس از تولد دارند در سه گونه موش، موش صحرایی و گاو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش منجر به شناسایی ۲۱ ژن مشترک شد که در هر سه گونه با افزایش سن، بیان آن ها کاهش یافت. در مطالعات مختلف نقش اغلب این ژن ها در تنظیم رشد و پیشرفت چرخه سلولی به اثبات رسیده است. با تجزیه و تحلیل پروموتور این ژن ها، ۱۸ فاکتور رونویسی مشترک شناسایی شد که اغلب آن ها در تنظیم رشد و پیشرفت چرخه سلولی نقش دارند. هم چنین با هدف ترسیم شبکه ی ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده از بانک اطلاعاتی STRING استفاده شد. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی چهار فاکتور رونویسی جدید شد که می توانند به عنوان کاندیدای جدید در تنظیم سرعت رشد پستانداران مورد بررسی قرار گرفته و زمینه جدیدی را برای درک سازوکار تنظیمی مسئول کاهش سرعت رشد در پستانداران ایجاد نمایند.

واژه های کلیدی

پروموتور
ریزآرایه
سرعت رشد
شبکه ژنی

مقدمه

در جنین پستانداران تغییرات پیچیده‌ای در بیان ژن‌ها برای توسعه و شکل‌گیری اندام‌ها مورد نیاز است (Kobayashi and Kronenberg 2005). با این حال رشد و نمو پستانداران به طور ناگهانی در هنگام تولد متوقف نمی‌شود و پس از تولد، بلوغ در اندام‌ها ادامه می‌یابد، اما با افزایش سن، روند رشد کاهش یافته و به سمت صفر میل می‌کند. رشد جسمی نتیجه تکثیر سلولی (هایپرپلازی)^۱ و بزرگ شدن سلول (هایپرتروفی)^۲ است. رشد بدن در اوایل دوران نوجوانی در درجه اول به علت تکثیر سلولی است که منجر به افزایش تعداد سلول‌ها می‌شود. با افزایش سن، هایپرپلازی کاهش می‌یابد ولی هایپرتروفی در اکثر بافت‌ها ادامه یافته و سپس کاهش می‌یابد (Patterson and Potter 2004). بنابراین بخش بزرگی از کاهش رشد جسمی با افزایش سن، ناشی از کاهش سرعت تکثیر است. اگر تکثیر سلولی با یک نرخ ثابت صورت می‌گرفت، باعث می‌شد وزن بدن به صورت نمایی افزایش یابد، بر این اساس، کاهش تکثیر سلولی برای توجیه افزایش خطی در وزن پیشنهاد شده و بیان شده که در بزرگسالی بیش‌تر بافت‌ها وارد مرحله خاموشی تکثیر سلولی است و تنها در صورت نیاز به جایگزینی سلول‌های در حال مرگ تکثیر می‌شوند (DeChiara et al. 1991).

در پستانداران کوچک، سرکوب تکثیر سلولی به سرعت و در طی چند هفته رخ می‌دهد و در نتیجه، اندازه‌ی بدن در این گونه‌ها کوچک است، در حالی که در پستانداران بزرگ، سرکوب تکثیر سلولی به تدریج و در طول چند سال رخ می‌دهد و در نتیجه، دارای اندازه بدن بزرگ‌تری هستند (Bogin 1999). این نظریه که بین کاهش سرعت رشد و پیری ارتباطی وجود دارد، ممکن است به طور کلی، هر چند ناقص، ارتباط مثبت بین اندازه‌ی بدن و طول عمر را در گونه‌های مختلف پستانداران توضیح دهد (Austad 2005). به‌طورکلی، پستانداران کوچک مانند موش، نسبت به پستانداران بزرگ مانند انسان و فیل، طول عمر کوتاه‌تری دارند (Rollo 2002; de Magalhães and Church 2005). اگر سازوکار پاسخ‌گویی به سرکوب رشد سریع در پستانداران تا زمان

¹ hyperplasia² hypertrophy

بزرگسالی ادامه یابد، یکی از اثرات آن کاهش ظرفیت بازسازی بافت‌ها در پستانداران کوچک است. در مقابل، در پستانداران بزرگ، سازوکار کاهش رشد روند تدریجی دارد و با ادامه یافتن این سازوکار انتظار می‌رود کاهش ظرفیت تکثیر با سرعت کمتری پیش رود، بنابراین ممکن است ادامه این روند کاهشی، منجر به افزایش طول عمر شود. لذا در قسمت‌هایی از بدن، افزایش سن با کنترل اندازه بدن معاوضه می‌شود که پستانداران کوچک هزینه زیادی به علت افزایش میزان کاهش تکثیر می‌پردازند. این فرضیه زمانی قوت گرفت که مشاهده شد در میان گونه‌های مختلف پستانداران با اندازه‌ی بدن یکسان، گونه‌هایی که دارای سرعت رشد آهسته‌تری در یک دوره زمان طولانی هستند دارای طول عمر بیش‌تری می‌باشند و پستانداران و پرندگانی که دارای سرعت رشد بیش‌تر در زمان جنینی هستند دارای طول عمر کوتاه‌تری هستند (De Magalhães et al. 2007). یکی دیگر از عواملی که روی پیری سلول و طول عمر یک موجود زنده تأثیر می‌گذارد، طول تلومرایی است که در انتهای کروموزوم‌های خطی قرار دارد. با افزایش سن طول توالی تلومری کاهش یافته و به موازات آن قدرت رشد و تقسیم سلولی کاهش می‌یابد. در یک فعالیت طبیعی سلول، در هر تقسیم سلولی قسمت کوچکی از تلومر از بین می‌رود. زمانی که طول تلومر به حد نهایی خود برسد سلول متحمل آپوپتوز و یا عدم فعالیت سلولی می‌شود (Donate and Blasco 2011). از این‌رو، به نظر می‌رسد شناسایی سازوکارهای درگیر در کاهش سرعت رشد پستانداران بتواند به افزایش طول عمر و اندازه‌ی بدن آن‌ها در بزرگسالی کمک کند (Lui et al. 2010b). تا به حال مطالعات متعددی به منظور درک سازوکار تنظیمی و شناسایی ژن‌های مهم درگیر در کاهش سرعت رشد صورت گرفته است. نتایج حاصل از این مطالعات که با روش‌های مختلفی هم‌چون RT-PCR و ریزآرایه صورت گرفته منجر به شناسایی ژن‌های متعددی در طی کاهش رشد سلولی با افزایش سن شده که عمدتاً منجر به شناسایی ژن‌های درگیر در تنظیم پیشرفت و تکثیر چرخه سلولی شده‌است. به عنوان مثال نقش ژن‌هایی مانند *Peg3*, *plagl1*, *Mest*, *Igf2*, *c-Myc* (Lui et al. 2008; Nie et al. 2012) و فاکتورهای رونویسی مانند *SP1*, *NF-κB* و خانواده *KLF* در تنظیم رشد و تکثیر سلولی گزارش شده‌است (Black et

شده در این حوزه، سازوکارهای تنظیمی و ژنی درگیر در کاهش سرعت رشد هنوز به طور دقیق شناسایی نشده اند. شواهد اخیر نشان می دهد که سازوکار مسئول این کاهش در تکثیر سلولی شامل یک برنامه ژنتیکی است که بین اندام ها مشترک بوده و شامل مهار چند ژن با افزایش سن است. بر اساس این استدلال فرض شده که در اوایل تولد پستانداران یک برنامه بیان ژن وجود دارد که مشترک بین اندام هاست و مسئول هماهنگی کاهش سرعت رشد جسمی می باشد (Lui et al. 2010b).

کنترل سازوکار رونویسی برای بیان ژن ها عمدتاً از طریق فاکتورهای رونویسی انجام می شود. این پروتئین ها به محل های تنظیمی توالی DNA به نام مکان های اتصال فاکتورهای رونویسی (TFBSs)¹ متصل می شوند. معمولاً فعالیت رونویسی یک ژن به اتصال فاکتورهای رونویسی مختلفی که با همکاری هم رونویسی را فعال یا سرکوب می کنند نیاز دارد. از آنجایی که ژن های با بیان مشابه احتمالاً دارای ساختار پروموتوری مشابه و عوامل تنظیمی مشترک می باشند، بنابراین، یک راهکار مناسب برای درک بهتر سازوکار تنظیمی درگیر در یک مرحله بیولوژیکی خاص، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتوری ژن های با بیان مشابه در آن مرحله می باشد. با توجه به کامل نبودن سازوکارهای تنظیمی درگیر در سرعت رشد می توان از این روش برای درک بهتر سازوکار تنظیمی درگیر در کاهش سرعت رشد و شناسایی فاکتورهای تنظیمی بیش تر استفاده کرد (Bakhtiarizadeh et al. 2014). هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی فاکتورهای تنظیمی مؤثر در کاهش سرعت رشد در پستانداران می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از داده های موجود در بخش GEO² بانک اطلاعاتی NCBI³ جهت مقایسه بیان داده های ریزآرایه بین بافت های چند پستاندار در سنین مختلف استفاده شد. بخش GEO یک پایگاه داده بوده که داده های مرتبط به مطالعات بیان ژن با روش های

¹ transcription factor binding sites

² Gene Expression Omnibus

³ National Center for Biotechnology Information

مختلف را ذخیره کرده و دارای ابزاری جهت تجزیه و تحلیل آن ها به منظور تشخیص ژن های با بیان متفاوت است (Barrett et al. 2013). در این بررسی از چهار مطالعه ریز آرایه مربوط به سرعت رشد استفاده شد، در این مطالعات از بافت هایی مانند کلیه، قلب، ریه و استخوان که الگوی زمانی مشابه برای کاهش رشد پس از تولد (به بیان دیگر کاهش رشد این بافت ها پس از تولد از الگوی مشابهی پیروی می کنند) در پستانداران دارند، استفاده شده است. اطلاعات مربوط به این مطالعات در جدول ۱ آرایه شده است. مطالعه اول تا سوم مربوط به بافت های کلیه، ریه و قلب به ترتیب در موش خانگی، گاو و موش صحرایی است. مطالعه چهارم مربوط به بافت استخوان موش صحرایی است که صفحه رشد استخوان را به سه منطقه شامل منطقه استراحت⁴، منطقه پرولیفراتیو⁵ و منطقه هیپرتروفیک⁶ تقسیم کرده است. منطقه استراحت شامل سلول های غضروفی است که در بستری از ماتریکس غضروف پراکنده بوده و پس از تولد به ندرت تقسیم می شود. در منطقه پرولیفراتیو سلول های غضروفی به موازات محور طولی استخوان ازدیاد می یابند بنابراین باعث رشد طولی استخوان می شود. در منطقه هیپرتروفیک تکثیر سلول ها متوقف می شود و سلول ها فقط بزرگ می شوند. برای این مطالعه، داده های مربوط به استخوان پرولایفراتیو⁷ در سن یک تا شش هفتگی در نظر گرفته شد، زیرا رشد طولی استخوان مدنظر بود و موش صحرایی در این سن بیش ترین سرعت رشد را دارد. داده های هر مطالعه شامل پنج نمونه برای هر بافت در سنین مختلف بود. هم چنین برای هر گونه، سنی انتخاب شد که در آن بیش ترین سرعت رشد اتفاق می افتد.

این داده ها به وسیله نرم افزار Geo2R به منظور شناسایی ژن هایی که در هر بافت بیان شان به طور معنی دار ($\text{adjP} < 0.05$)⁸ تغییر کرده بود به طور مجزا تجزیه و تحلیل شدند. Geo2R نرم افزاری بر اساس نرم افزار R است که به کاربران اجازه می دهد تغییر بیان ژن های دو یا چند نمونه را با هم مقایسه کنند. این نرم افزار برای

⁴ Resting zone

⁵ proliferative zone

⁶ Hypertrophic zone

⁷ proliferative

⁸ Adjust P-values

تشخیص فاکتورهای رونویسی موجود در ژنهای مشترک شناسایی شده، توالی پروموتور ژنهای گاو استخراج شد. بدین منظور از بسته نرم افزاری Genomatix و نرم افزار Gene2Promoter استفاده شد. برای ژنهایی با بیش از یک توالی پروموتری، بهترین توالی بر اساس پیشنهاد خود نرم افزار انتخاب شد. جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی مشابه در توالیهای پروموتری ژنها از نرم افزار MatInspector استفاده شد. این نرم افزار با استفاده از ماتریسهای وزنی-مکانی (PWM)^۲، فاکتورهای رونویسی را در توالیهای DNA شناسایی می کند. برای این مطالعه ناحیه پروموتور به وسیله مناطقی شامل ۱۰۰۰ جفت باز در بالادست و ۲۰۰ جفت باز در پایین دست مناطق رونویسی تعریف شد و تشابه بین هسته مرکزی PWM و توالی پروموتری ۱۰۰ درصد و تعداد توالیهای دارای فاکتورهای رونویسی مشابه ۸۰ درصد در نظر گرفته شد. در نهایت فاکتورهای رونویسی معنی دار ($P < 10^{-5}$) انتخاب و به عنوان کاندیدای درگیر در تنظیم سرعت رشد معرفی شدند.

برای ترسیم شبکه ی ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در این مطالعه، از پایگاه اطلاعاتی STRING استفاده شد. در این پایگاه برای یک مجموعه ژنی با استفاده از چهار نمره اطمینان شامل اطمینان کم، متوسط، زیاد و خیلی زیاد می توان شبکه ژنی را ترسیم کرد. در مطالعه حاضر برای افزایش صحت شبکه ی ترسیم شده، نمره اطمینان بالا (۰/۷) انتخاب شد، سپس گروههای کارکردی و مسیرهای بیولوژیکی ژنهایی که وارد شبکه شدند مورد بررسی قرار گرفت ($P < 0/01$). برای بررسی مسیرهای بیولوژیکی از بانک اطلاعاتی KEGG^۳ استفاده شد.

انجام این تجزیه و تحلیلها از بسته های نرم افزاری Geoquary و Limma موجود در نرم افزار R استفاده می کند (Barrett et al. 2013). در این مطالعه همه مراحل استانداردسازی و شناسایی ژنهای معنی دار توسط پیش فرض خود نرم افزار صورت گرفت. بدین منظور ابتدا داده ها با روش rma و بسته نرم افزاری affy نرمال شده و سپس با بسته نرم افزاری limma ژنهای با بیان متفاوت شناسایی شدند (جدول ۱). پس از تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار Geo2R، داده های حاصل از هر مطالعه به نرم افزار excel منتقل و ژنهایی که بیان آنها به طور معنی دار کاهش یافته بود ($adjP < 0/05$) و بین چهار مطالعه مشترک بود شناسایی و انتخاب شد.

در ادامه از نرم افزار DAVID^۱ به منظور بررسی گروههای کارکردی ژنهای مشترک شناسایی شده حاصل از تجزیه و تحلیل داده های ریزآرایه استفاده شد. DAVID یک پایگاه داده شامل مجموعه ای کامل از ابزار شناسایی برای فهم عملکرد بیولوژیکی ژنها می باشد (Huang et al. 2007). ژنهای معنی دار حاصل از تجزیه و تحلیل داده های ریزآرایه به نرم افزار معرفی و عبارات بیولوژیکی معنی دار ($P < 0/05$) مرتبط با گروههای کارکردی شناسایی شد.

اخیراً مطالعات مربوط به رشد و اندازه بدن که تحت تأثیر برنامه ی تنظیم کاهشی طیف گسترده ای از ژنها در بافت های مختلف جوندگان قرار دارد انجام شده است. پیش بینی شده است که این برنامه ی تنظیمی در پستانداران بزرگتر مانند گاو نیز به صورت محافظت شده وجود دارد (Delaney et al. 2014). بر طبق این پیش بینی، با هدف انجام تجزیه و تحلیل توالیهای پروموتری و

^۲ Position Weight Matrix^۳ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes^۱ Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

جدول ۱- اطلاعات مربوط به مطالعات ریزآرایه مورد استفاده در این مطالعه

گونه	سن	بافت	شماره دستیابی	مطالعه
موش خانگی	۴-۱ هفته	کلیه، ریه، قلب	GSE38754	(Finkelstein et al. 2009)
گاو	۹۰ روزگی جنینی-۱۰ هفته پس از تولد	کلیه، ریه	GSE48916	(Delaney et al. 2014)
موش صحرایی	۱-۵ هفته	کلیه، ریه	GSE16792	(Lui et al. 2010b)
موش صحرایی	۶-۱ هفته	استخوان پرولاپراتیو	GSE16981	(Lui et al. 2010a)

نتایج

در مطالعه حاضر برای درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در کاهش سرعت رشد در پستانداران ابتدا ژن‌هایی با بیان متفاوت در چهار مطالعه ریزآرایه مربوط به اندام‌هایی مانند قلب، کلیه، ریه و استخوان که الگوی زمانی مشابه برای کاهش رشد پس از تولد دارند (به عبارت دیگر مقدار کاهش رشد این بافت‌ها بعد از تولد از یک الگوی مشابه پیروی می‌کند)، در سه گونه موش، موش صحرایی و گاو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه -ی اول (GSE38754) در اندام‌های کلیه، ریه و قلب، به ترتیب منجر به شناسایی ۱۰۵۲، ۲۰۱۱ و ۶۱۰ ژن شد که با افزایش سن، بیان آن‌ها به طور معنی‌دار افزایش و از طرفی منجر به شناسایی ۵۱۸۲، ۳۴۹۵ و ۳۶۷۱ ژن شد که با افزایش سن، بیان آن‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$). در مطالعه‌ی دوم (GSE48916) در اندام‌های کلیه و ریه، به ترتیب ۲۶۲۰ و ۱۳۳۴ ژن شناسایی شد که بیان آن‌ها به طور معنی‌دار با افزایش سن، افزایش نشان داد و همچنین ۲۲۷۱ و ۱۲۳۷ ژن شناسایی شد که به طور معنی‌داری بیان آن‌ها کاهش یافته بود ($P < 0.05$). در مطالعه‌ی سوم (GSE16792) در اندام‌های کلیه و ریه، با افزایش سن، به ترتیب ۳۶۴۷ و ۳۱۰۵ ژن شناسایی شد که بیان آن‌ها به طور معنی‌دار افزایش و ۱۷۱۸ و ۱۷۱۷ ژن شناسایی شد که به طور معنی‌دار کاهش بیان داشتند ($P < 0.05$). در مطالعه‌ی چهارم (GSE16981) نیز در استخوان پرولاپراتیو، با افزایش سن ۱۸۳۰ ژن به طور معنی‌دار افزایش بیان و ۲۳۳۹ ژن به طور معنی‌دار کاهش بیان نشان دادند ($P < 0.05$).

پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها و شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت توسط نرم‌افزار GO2R، در مجموع ۲۱ ژن شناسایی شد که در هر چهار مطالعه مشترک بوده و با افزایش سن بیان آن‌ها به طور معنی‌دار ($P < 0.05$) کاهش یافته است. این ژن‌ها عبارتند از: *Igf2*, *Igf2bp3*, *Thbs2*, *KIF20A*, *TACC3*, *Ints7*, *MCM-4*, *NUP155*, *Myh10*, *Plagl1*, *Cdca2*, *Tead2*, *Zwilch*, *Ezh2*, *Mfap2*, *Ubtd2*, *Tia2*, *Marcks1*, *Lrrc17*, *Tcf7l1*, *Zcchc3*. نقش اکثر ژن‌های مذکور در تنظیم تکثیر و چرخه سلولی در گزارشات متعددی به اثبات رسیده است که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره شده است (Finkielstain et al. 2009; Liao et al.).

2005; Bornstein et al. 199; Zhang et al. 2014; Still et al. 2009; Capelson and Hetzer 1999)، اما برای ژن *Zcchc3* هیچ مطالعه‌ای در این مورد یافت نشد، بنابراین از قرار دادن این ژن‌ها در تجزیه‌های بعدی صرف‌نظر شد. به بیان دیگر تنها ژن‌هایی که علاوه بر بیان مشابه عملکرد مشابهی نیز برای آن‌ها گزارش شده بود، انتخاب شدند.

پس از شناسایی ژن‌های مشترکی که بیان آن‌ها با افزایش سن به طور معنی‌دار ($P < 0.05$) کاهش یافته بود، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها به وسیله نرم‌افزار DAVID بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی عملکرد این ژن‌ها توسط نرم‌افزار DAVID منجر به شناسایی چهار گروه کارکردی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با تقسیم و تنظیم چرخه سلولی شد. به بیان دیگر گروه‌های کارکردی شناسایی شده به نحوی مرتبط با تقسیم و تنظیم چرخه سلولی بودند که نتایج حاصل از این بخش در جدول ۲ ارائه شده است. در موجودات پسرلوی، طول توالی‌های تنظیمی می‌تواند به اندازه هزاران نوکلئوتید از محل پروموتور، هم به سمت بالادست و هم پایین دست، فاصله داشته و از ده‌ها جایگاه اتصال تنظیمی تشکیل شده باشد. فاکتورهای رونویسی به توالی‌های تنظیمی ژن‌ها متصل شده و بیان یک ژن را در زمان و مکان مختلف در پاسخ به پیام‌های متفاوت کنترل می‌کنند (Bakhtiarizadeh et al. 2014). از آنجایی که فرض بر این است که ژن‌های با بیان مشابه دارای توالی پروموتوری مشابه نیز هستند، بنابراین ساختار پروموتوری این ۲۰ ژن جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی توسط نرم‌افزار MatInspector مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بخش منجر به شناسایی ۱۸ فاکتور رونویسی معنی‌دار ($P < 10^{-5}$) شد که هر یک دارای محل اتصال روی حداقل ۱۶ توالی پروموتوری از ۲۰ ژن مورد بررسی بودند.

جدول ۲- عبارات بیولوژیکی معنی‌دار حاصل از گروه‌های کارکردی ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه

عبارات بیولوژیکی معنی‌دار	سطح معنی‌داری
تقسیم سلولی	۰/۰۰۵
فرآیند چرخه‌ی سلولی	۰/۰۱۲
چرخه‌ی سلولی	۰/۰۲۴
تنظیم چرخه‌ی سلولی میتوز	۰/۰۴۵

اطلاعات مربوط به این فاکتورهای رونویسی در جدول ۳ ارائه شده است. توصیف عملکرد یک پروتئین نیازمند آن است که همه پروتئین‌هایی که در تعامل با آن می‌باشند شناخته شوند. از لحاظ عملکردی مشارکت به معنای اتصال مستقیم است اما می‌توان رابطه غیر مستقیم مثل شرکت در یک مسیر متابولیکی را نیز به حساب آورد (Huynen et al. 2003). هدف بانک اطلاعاتی STRING دسترسی آسان و گسترده به این اطلاعات و کنترل کیفیت تعاملات پروتئین-پروتئین در بسیاری از جانداران است. این تعاملات به صورت جستجوی گسترده در داده‌های آزمایشگاهی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی و مقالات و فرضیات برگرفته شده از تجزیه‌های ژنومیکی است. بانک اطلاعاتی STRING مشاهدات را به صورت مستقیم برای کاربر ارائه می‌دهد (Von Mering et al. 2005)، بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک منبع اطلاعاتی مناسب برای شناسایی تعاملات بین پروتئین‌ها استفاده کرد. در این مطالعه با هدف توصیف عملکردی فاکتورهای رونویسی شناسایی شده، شبکه ژنی مرتبط با این فاکتورها به وسیله این بانک اطلاعاتی

ترسیم و بررسی شد. از بین ۱۸ فاکتور رونویسی شناسایی شده هشت فاکتور (شامل MAZR, INSM1, VMYB, MAZ, SP1, RREB1, ZBP89 و ZBTB7) وارد شبکه‌ی ژنی شده که با ۳۰ ژن دیگر ارتباط داشتند. در شبکه ژنی بدست آمده، فاکتورهای رونویسی SP1 و VMYB (نام دیگر این ژن MYBL2 می‌باشد) و ژن‌های HDAC1, HDAC2, TP53, CREBBP, MDM2, E2F4, TFDP1 دارای بیش‌ترین تعداد گره با دیگر ژن-های موجود در شبکه بودند که دارای عملکرد مرتبط با تنظیم رشد و تکثیر سلولی هستند. شبکه ترسیم شده به وسیله STRING در شکل ۱ ارائه شده است.

در ادامه ژن‌هایی که با دیگر ژن‌ها اثر متقابل نشان داده و وارد شبکه شدند استخراج و گروه‌های کارکردی مرتبط با آن‌ها به-منظور شناسایی عملکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ۱۰۳۰ عبارت معنی‌دار مرتبط با مراحل مختلف بیولوژیکی را نشان داد که اغلب این عبارات مرتبط با تنظیم رشد، توسعه و چرخه‌ی سلولی است.

جدول ۳- فاکتورهای رونویسی شناسایی شده دارای مکان اتصال بر روی توالی‌های پرموتوری ژن‌های کاهش بیان یافته با افزایش سن.

نام فاکتور رونویسی	توصیف	سطح معنی داری	مشترک*
ELK4	ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	۸/۵E-۰۸	۱۷
GABP	GA binding protein	۲/۷۷E-۰۶	۱۸
INSM1	Zinc finger protein insulinoma-associated 1	۵/۰۹E-۰۶	۱۷
KKLF	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	۶/۴E-۰۷	۱۸
MAZ	Myc associated zinc finger protein	۷/۱۳E-۰۵	۱۶
MAZR	MAZ-related factor, Protein Patz1	۱/۷E-۰۸	۱۹
MOK2	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2	۶/۸۶E-۰۵	۱۶
MZF1	Myeloid zinc finger protein MZF1	۴/۰۸E-۰۶	۱۸
PLAG1	Pleomorphic adenoma gene 1	۳/۳۸E-۰۶	۱۷
RREB1	Ras-responsive element binding protein 1	۶/۰۹E-۰۶	۱۶
SP1	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	۱/۶۵E-۰۶	۱۶
VMYB	viral myb variant from transformed BM2 cells	۳/۰۷E-۰۶	۱۶
WHN	Winged helix protein	۱/۶۵E-۰۷	۱۶
ZBED4	Zinc finger, BED-type containing 4; polyG binding sites	۳/۰۷۵E-۰۶	۱۶
ZBP89	Zinc finger transcription factor ZBP-89	۱/۰۷E-۰۵	۱۶
ZBTB7	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokemon	۴/۲۶E-۰۶	۱۸
ZNF219	Zinc finger protein 219	۱/۶E-۰۵	۱۶
ZNF263	Zinc finger protein 263	۱/۳۶E-۰۶	۱۷

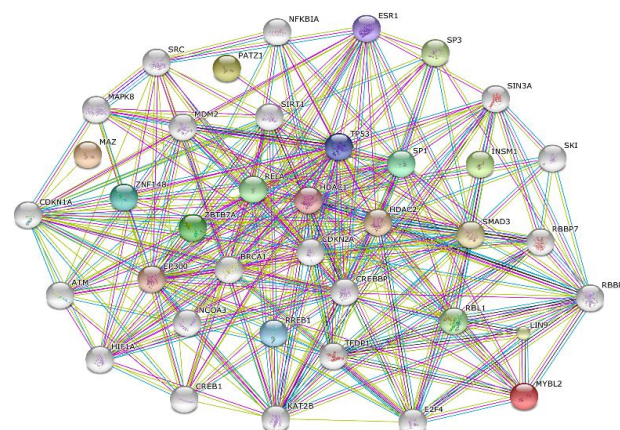
جدول ۴- برخی از گروه‌های کارکردی معنی‌دار مرتبط با تنظیم سرعت رشد در پستانداران (مربوط به ژن‌های شبکه ژنی).

ژن‌های مرتبط	تعداد ژن	P ارزش	گروه‌های کارکردی
<i>BRCA1, SKI, CDKN1A, E2F4, MDM2, RREB1, INSM1, KAT2B, SRC, SIRT1, ESR1, NFKB1A, SMAD3, RBBP4, HDAC1, ATM, TFDP1, CDKN2A</i>	۱۸	$2/43E-12$	تنظیم تکثیر سلولی
<i>BRCA1, CDKN1A, INSM1, EP300, KAT2B, LIN9, SIRT1, RBL1, SMAD3, RBBP4, HDAC1, MYBL2, HDAC2, SIN3A, CDKN2A</i>	۱۵	$3/43E-12$	تنظیم چرخه‌ی سلولی
<i>CDKN1A, MDM2, ATM, CDKN2A, BRCA1, INSM1</i>	۶	$9/93E-09$	تنظیم توقف چرخه‌ی سلولی
<i>SKI, CDKN1A, SMAD3, RBBP4, ATM, INSM1, HDAC2, TFDP1, KAT2B, CDKN2A</i>	۱۰	$7/07E-08$	تنظیم منفی تکثیر سلولی
<i>CDKN2A, TP53, SIRT1</i>	۳	$1/18E-07$	تنظیم مثبت پیری سلول
<i>SIRT1, RBBP7, TP53, CDKN1A, SMAD3, CDKN2A</i>	۶	$3/59E-07$	تنظیم منفی رشد سلول
<i>BRCA1, MDM2, EP300, SRC, NFKB1A, ATM, TFDP1, CDKN2A</i>	۸	$4/16E-04$	مرگ سلولی

جدول ۵- برخی از مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار مرتبط با تنظیم سرعت رشد در پستانداران (مربوط به ژن‌های شبکه ژنی).

ژن‌های مرتبط	تعداد ژن	سطح معنی‌داری	مسیر بیولوژیکی
<i>HDAC2, EP300, TFDP1, ATM, CREBBP, TP53, CDKN1A, RBL1, E2F4, HDAC1, MDM2, CDKN2A</i>	۱۲	$2/49E-18$	چرخه سلولی
<i>SIRT1, EP300, ATM, CREBBP, CDKN1A, MAPK8, MDM2</i>	۷	$2/17E-09$	سیگنال FoxO
<i>RBL1, EP300, SP1, TFDP1, E2F4, CREBBP</i>	۶	$5/85E-09$	سیگنال TGF- β
<i>CDKN1A, MDM2, ATM, CDKN2A, TP53</i>	۵	$1/38E-07$	سیگنال P53
<i>NFKB1A, RELA, ATM, TP53</i>	۴	$1/76E-05$	مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول
<i>EP300, CREBBP, TP53, MAPK8</i>	۴	$1/12E-04$	سیگنال Wnt

به‌طور مشابه، مسیرهای بیولوژیکی که ژن‌های وارد شده به شبکه در آن درگیر هستند به‌وسیله بانک اطلاعاتی KEGG مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی ۷۴ مسیر بیولوژیکی معنی‌دار شناسایی شد که برخی از مسیرهای مهم و مرتبط با تنظیم سرعت رشد در جدول ۵ ارائه شده‌است.



شکل ۱- شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده درگیر در تنظیم سرعت رشد پستانداران.

برخی از عبارات مهم و مرتبط با تنظیم سرعت رشد در جدول ۴ ارائه شده‌است. نتایج جالب این بخش حاکی از معنی‌دار شدن عباراتی مانند تنظیم مثبت پیری سلول، تنظیم منفی رشد سلولی و مرگ سلول است که همگی نشان دهنده‌ی ارتباط بین فاکتورهای رونویسی شناسایی‌شده در این مطالعه با تنظیم سرعت رشد در بزرگسالی است.

بحث

رشد سریع در پستانداران به‌طور چشمگیری در دوران جنینی و اوایل زندگی پس از تولد رخ می‌دهد، اما با افزایش سن، روند رشد کاهش می‌یابد. سازوکارهای مورد نیاز برای کاهش سرعت رشد جسمی کمتر شناخته شده هستند. به‌همین منظور، در مطالعه‌ی حاضر برای درک بهتر این سازوکارها، از مطالعات ریزآرایه مربوط به چند بافت در اوایل زندگی سه پستاندار استفاده شد که این امر منجر به شناسایی ۲۱ ژن شد که بین اندام‌های این سه گونه مشترک بود و بیان آن‌ها با افزایش سن کاهش می‌یافت. در مطالعات مختلف نقش اغلب این ژن‌ها در تنظیم تکثیر و پیشرفت چرخه سلولی به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال کاهش *Igf2* باعث عقب ماندگی رشد قبل از تولد می‌شود و کاهش

مشاهده شده در بیان این ژن در اوایل زندگی پس از تولد ممکن است به کاهش سرعت رشد جسمی منجر شود (Finkielstein et al. 2009). عملکرد فیزیولوژیکی ژن *Igf2bp3* شناخته نشده است، با این حال، بیان آن در روز ۱۲ جنینی موش به اوج می‌رسد و پس از آن به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Liao et al. 2005). از آنجایی که بیان این ژن در زندگی پس از تولد هم با افزایش سن به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد ممکن است به کاهش رشد جسمی کمک کند. ژن *Thbs2* پروتئین‌های TSP را کد می‌کند و این پروتئین نقش مهمی در رشد جنین و توسعه پستانداران دارد (Bornstein et al. 1991). ژن *KIF20A* که *MKLP2* نیز خوانده می‌شود برای تنظیم چرخه‌ی سلولی در طی سیتوکینز موفق ضروری است (Zhang et al. 2014). به دلیل بیان بالای ژن *TACC3* در سرطان‌های مختلف و در جنین پستانداران پیشنهاد شده است که این ژن در کنترل رشد و تمایز سلول نقش دارد (Still et al. 1999). ژن *Ints7* دارای اهمیت ویژه برای رشد طبیعی است و در توسعه، تکثیر و سیگنال طبیعی سلول ایفای نقش می‌کند (Rutkowski and Warren 2009). ژن *MCM-4* به شکل پویا بر سراسر چرخه سلولی و توسعه سلول نظارت دارد و باعث رشد و بقای ارگانسیم می‌شود (Korzeliuss et al. 2011). ژن *Nup155* یک جزء اصلی از کمپلکس منافذ هسته‌ای (NPC)^۱ است که در سیستم حمل و نقل هسته-سیتوپلاسم سلول نقش دارد و با توجه به نقش منحصر به فرد NPC در کانال‌های انتقال سیتوپلاسمیک ارتباط آن با رشد و نمو سلول تعجب آور نیست. یافته‌ها نشان می‌دهد که اجزای منافذ سلولی به عنوان تنظیم کننده مهم بیان ژن‌هایی عمل می‌کنند که در تمایز سلول و انتقال سیگنال نقش دارند (Capelson and Hetzer 2009). ژن *MYH10* در سیتوکینز نقش دارد و کاهش آن باعث مهار سیتوکینز می‌شود، با مهار سیتوکینز سلول دارای هسته‌های متعدد می‌شود و متعاقب آن تکثیر سانترومرها باعث اختلال در جدایی کروموزوم در مرحله M چرخه سلولی می‌شود و در نتیجه باعث مرگ سلولی میتوزی خواهد شد (Matsuoka et al. 2010). برای ژن *plagl1* شواهد متضادی در مورد نقش آن در تنظیم رشد وجود دارد. گزارش

¹ Nuclear Pore Complex² kinetochore

شده است که این ژن سرکوب کننده تومور است و موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و مهار چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شود (Spengler et al. 1997)، این نشان می‌دهد که این ژن سرکوب کننده رشد است. با این حال مدل‌های حذفی این ژن نشان داد که وزن بدن کاهش یافته است (Varrault et al. 2006)، هم‌چنین این ژن به عنوان ژن تنظیم کننده سرعت رشد معرفی شده است (Lui et al. 2008). ژن *Cdca2* در کنترل چرخه سلولی نقش دارد و کاهش آن باعث کاهش رشد می‌شود (Uchida et al. 2013). ژن *Tead2* در پیشرفت چرخه سلولی و مهار مرگ سلول نقش دارد (Sawada et al. 2008). ژن *Ezh2* باعث رشد سلول و پیشرفت چرخه سلولی می‌شود (Lu et al. 2011). ژن *Zwilch* به عنوان بخش جدیدی از کمپلکس ZW10/ROD شناخته شده که برای عمل کینه‌توکور^۲ نیاز است. وجود این کمپلکس برای جداسازی کروموزوم در طی تقسیم سلولی ضروری می‌باشد (Williams et al. 2003). به نظر می‌رسد ژن *MFAP2* یا *MAGP1* در تنظیم فاکتورهای رشد مثل $TGF-\beta$ نقش داشته باشد. نشان داده شده که کاهش *MFAP2* باعث افزایش $TGF-\beta$ می‌شود (Moses et al. 1990). ژن *Ubtd2* ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است و کاهش آن باعث افزایش مرگ سلولی می‌شود (Harun et al. 2013b). کاهش *Tia-1* به طور قابل توجهی رونویسی $TNF-\alpha$ که مرتبط با پلی زوم است را افزایش می‌دهد، افزایش $TNF-\alpha$ رشد سلول‌ها را مهار می‌کند (Fräter-Schröder et al. 1987). ژن *Marcks1* چرخه سلولی و پروتئین‌های تنظیم کننده مرگ سلولی را تنظیم می‌کند و مهار این ژن باعث القای مرگ سلولی می‌شود (Kim et al. 2014). ژن *Tcf7l1* در بلوغ و تکثیر سلول‌های غضروفی نقش دارد و جهش در این ژن باعث کوتولگی می‌شود (Mikasa et al. 2011)، اما برای ژن *Zcchc3* مطالعه‌ای مبنی بر نقش آن در تنظیم چرخه سلولی و سرعت رشد یافت نشده است. نتایج حاصل از گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها منجر به شناسایی چهار عبارت بیولوژیکی معنی‌دار شد. همه عبارات شناسایی شده مرتبط با تقسیم و تنظیم چرخه سلولی بود. از آنجایی که در مرحله رشد نیاز به تقسیم سلول‌ها زیاد است، در نتیجه معنی‌دار شدن عبارتی هم‌چون چرخه سلولی و تقسیم، بیانگر نقش مؤثر این ژن‌ها در

تنظیم رشد پستانداران است (Harun et al. 2013a). بنابراین بر اساس بررسی گروه‌های کارکردی، مجموعه ژنی حاضر که حاصل بررسی چهار مطالعه ریزآرایه متفاوت است، مجموعه مناسبی برای بررسی شبکه تنظیمی در این زمینه است، زیرا علاوه بر مشابهت بیان، این ژن‌ها دارای عملکرد مشابه نیز می‌باشند. در نتیجه احتمال شناسایی عوامل تنظیمی مشترک در توالی‌های پروموتری این ژن‌ها بالا می‌باشد. باید توجه داشت که یکی از فرضیات مهم تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتری به‌منظور درک بهتر شبکه‌های تنظیمی درگیر در مراحل بیولوژیکی مختلف، این است که ژن‌های دارای بیان مشابه که دارای عملکرد مشابه نیز می‌باشند، دارای ساختار پروموتری مشابه نیز می‌باشند. در نتیجه بررسی توالی‌های پروموتری این ژن‌ها می‌تواند به درک بهتر سازوکارهای تنظیمی که این ژن‌ها در آن دخیل می‌باشند، کمک کند.

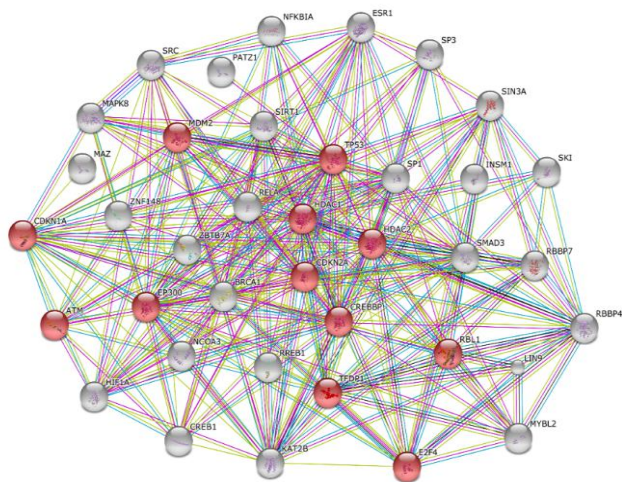
با تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتری این ۲۰ ژن (یکی از ژن‌ها به‌علت اینکه گزارشی مبنی بر عملکرد آن در تنظیم تکثیر و چرخه سلولی و رشد وجود نداشت حذف شد)، در کل ۱۸ فاکتور رونویسی معنی‌دار ($P < 10^{-9}$) شناسایی شد که دارای محل اتصال روی حداقل ۱۶ توالی پروموتری از ۲۰ ژن مورد بررسی بودند. بر اساس عملکردهای گزارش شده برای این فاکتورها در مطالعات قبلی، فاکتورهای رونویسی شناسایی شده به دو دسته تقسیم‌بندی شدند: دسته اول شامل ۱۴ فاکتور رونویسی است که نقش آن‌ها به‌طور مستقیم در تکثیر و تنظیم چرخه سلولی گزارش شده‌است. به عنوان مثال، PLAG1 یکی از مهم‌ترین سیگنال دهنده‌های رشد است و با توجه به نقش این فاکتور، بیان بالای آن باعث ایجاد انواع مختلفی از سرطان می‌شود (Lui et al. 2008). فاکتور ZBP89 دارای عملکردهای متفاوتی در بافت‌های مختلف است به‌طوری‌که هم باعث رشد سلول شده و هم مرگ آن را رقم می‌زند. این فاکتور باعث پایداری P53 می‌شود، اما در صورتی‌که میزان P53 افزایش یابد مرگ سلولی اتفاق می‌افتد، لازم به ذکر است که بیان این فاکتور در کبد با توجه به سن، متفاوت می‌باشد (Bai et al. 2004). حضور ۱۴ فاکتور رونویسی درگیر در تنظیم چرخه سلولی در پروموتر این ژن‌ها تعیین‌کننده اهمیت و نقش این ژن‌ها در تنظیم سرعت رشد پستانداران است و همچنین نشان

دهنده این مطلب است که این ژن‌ها دارای ساختار پروموتری مشابه هستند. دسته دوم شامل فاکتورهای RREB1، ZBTB7، MOK-2 و ZBED4 هستند که نقش مستقیم آن‌ها در چرخه سلولی گزارش نشده است، اما دارای نقش مرتبط در این زمینه می‌باشند، به‌عنوان مثال بیان آن‌ها باعث رشد انواع سلول‌های سرطانی می‌شود. در همین راستا نقش ZBTB7 در رشد سرطان سینه مورد تأیید قرار گرفته است (Qu et al. 2010). فاکتور RREB1 نیز از فاکتورهای شناسایی‌شده در رشد سلول‌های سرطانی دستگاه ادراری و تیروئید است (Nitz et al. 2011). نقش ZBED4 فقط در عملکرد سلول‌های شبکه چشم بررسی شده‌است (Saghizadeh et al. 2011). برای MOK-2 عنوان شده که ممکن است در توسعه و به‌طور خاص توسعه سلول‌های عصبی نقش داشته باشد (Dreuillet et al. 2002)، با این وجود نقش قطعی آن ذکر نشده‌است.

بر اساس کنترل کیفی صورت گرفته طی این مطالعه انتظار بر این بود که اکثر فاکتورهای رونویسی شناسایی شده نیز مرتبط با سرعت رشد باشند. شناسایی ۱۴ فاکتور رونویسی مرتبط و تأیید شده با رشد نیز مؤید صحت نتایج حاصل از این مطالعه است. همچنین چهار فاکتور رونویسی جدید که به‌عنوان کاندیدا در این زمینه معرفی شدند، پتانسیل بالایی به‌عنوان فاکتورهای رونویسی جدید در تنظیم سرعت رشد دارند، زیرا هم دارای نقش مرتبط با رشد بوده، هم در توالی‌های پروموتری ژن‌های درگیر در سرعت رشد و با بیان مشابه شناسایی شدند، به‌علاوه، همراه فاکتورهای رونویسی می‌باشند که دارای نقش شناخته شده در زمینه شبکه تنظیمی سرعت رشد می‌باشند.

در ادامه به‌منظور توصیف عملکردی فاکتورهای رونویسی شناسایی شده، شبکه ژنی مرتبط با این فاکتورها ترسیم و بررسی شد. از بین ۱۸ فاکتور رونویسی شناسایی شده هشت فاکتور (شامل SP1، RREB1، MAZ، VMYB، JNSM1، MAZR، ZBP89 و ZBTB7) وارد شبکه‌ی ژنی شده که با ۳۰ ژن دیگر ارتباط داشتند. قابل ذکر است دو فاکتور رونویسی RREB1 و ZBTB7 که به‌عنوان کاندیدا معرفی شده بودند نیز وارد شبکه شدند. از بین این‌ها، فاکتورهای رونویسی SP1 و MYBL2 (VMYB) و ژن‌های HDAC1، TP53، HDAC2

مسیرهای متعددی مرتبط با ژن‌های موجود در شبکه‌ی ژنی بود که همه‌ی این عبارات و مسیرها نشان دهنده‌ی نقش احتمالی این ژن‌ها در تنظیم سرعت رشد پستانداران است. یکی از مسیرهای معنی‌دار شناسایی‌شده مسیر چرخه سلولی است. همان‌طور که عنوان شد، رشد جسمی نتیجه تکثیر سلولی (هایپرپلازی) و بزرگ شدن سلول (هایپرتروفی) است. با افزایش سن، تکثیر سلولی کاهش می‌یابد، بنابراین بخش بزرگی از کاهش رشد جسمی با افزایش سن، ناشی از کاهش سرعت تکثیر است (DeChiara et al. 1991). از آنجایی که تکثیر سلولی وابسته به ژن‌هایی است که در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش دارند، بنابراین معنی‌دار شدن مسیری مثل چرخه‌ی سلولی دور از انتظار نبود. در شکل ۲-ژن‌های مرتبط با مسیر چرخه سلولی در شبکه‌ی ژنی نشان داده شده‌است.



شکل ۲-ژن‌های درگیر در مسیر چرخه‌ی سلولی.

دایره‌های با رنگ قرمز مربوط به ژن‌های مرتبط با مسیر چرخه‌ی سلولی می‌باشند که در شبکه ژنی مشخص شده‌اند.

دیگر مسیر معنی‌دار شناسایی شده، مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. بعد از آن که دانشمندان متوجه شدند که موجودات زنده از سلول ساخته شده‌اند، متوجه این موضوع نیز شدند که مرگ سلول در تکثیر و رشد حیوانات اهمیت به سزایی دارد. مرگ طبیعی سلول‌ها در بسیاری از بافت‌های مهره داران و بی مهرگان در هنگام رشد و تکثیر مشاهده شده‌است (Jacobson et al. 1997). حال این سؤال مطرح می‌شود که چرا مرگ

تعداد گره با دیگر ژن‌های موجود در شبکه بودند که اغلب آن‌ها دارای عملکرد مرتبط با تنظیم رشد و تکثیر سلولی هستند. به عنوان مثال ژن *HDAC1* بر روی چرخه سلولی و تکثیر آن در موش نقش ویژه‌ای دارد. کمپلکس *HDAC1* به‌صورت آنزیمی فعال می‌شود و موجب یک کاهش اختصاصی در چرخه سلولی در ابتدای رونویسی rDNA می‌شود که بر روی rRNA اثر گذاشته و موجب کاهش در فاز *G2* چرخه‌ی سلولی می‌شود. تغییر در بیان ژن‌های ریپوزومی بر روی رشد مؤثر است. در سلول‌های پستانداران رونویسی rDNA تحت تأثیر مرحله چرخه سلولی است و در فاز *S1* و *G2* به بالاترین حد رسیده و در اوایل *G1* کاهش می‌یابد (Meraner et al. 2008). سرکوب کننده‌هایی که با هم عمل می‌کنند، مانند *mSIN1*، *N-COR* و *SMRAT* موجب تولید *HDAC1* و تحت تأثیر قرار گرفتن رونویسی می‌شوند. ممانعت آنزیمی از این عملیات موجب توقف چرخه سلولی و کاهش رشد و حتی مرگ سلول می‌شود (Roy et al. 2005). ژن *E2F* به وسیله‌ی خانواده‌ای از هتروداایمرها کد می‌شود. نشان داده شده است که علاوه بر آن که خانواده *E2F* برای تنظیم چرخه سلولی و رشد مهم هستند، موجب افزایش فعالیت سایر پروتئین‌های درگیر در تنظیم چرخه سلولی و رشد نیز می‌شوند. خانواده *E2F* بر روی فاز *S* چرخه سلولی اثرگذار است که عمل *E2F4* در جهت برانگیختگی این فاز در چرخه سلولی می‌باشد (DeGregori et al. 1997). فاکتورهای *EP300* و *CREBBP* هر دو در روابط پروتئینی شناسایی شده‌اند، مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول و تکثیر سلولی از عملکردهای اصلی‌شان هست. عملکرد رشدی این دو، به‌وسیله واکنش آن‌ها با *TP53* نشان داده شده است. مطالعات نشان می‌دهد که *TP53* به ناحیه کربوکسیله *EP300*/*CREBBP* متصل شده و موجب فعال شدن رونویسی *P53* می‌شود (Goodman and Smolik 2000)، افزایش این پروتئین سبب کاهش رشد و مرگ سلول می‌شود (Luo et al. 2000).

علاوه بر گروه‌های کارکردی، به‌طور جالبی نتایج حاصل از بررسی مسیرهای بیولوژیکی مربوط به ژن‌های وارد شده به شبکه نیز مرتبط با رشد بود. نتایج حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی و مسیرهای بیولوژیکی، حاکی از معنی‌دار شدن عبارات و

برنامه‌ریزی شده سلول برای رشد و تکثیر مهم است؟ در آزمایشی که روی نماتدها و مگس‌ها انجام گرفت، مشاهده شد که نماتدهای فاقد مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول، طول عمر و عملکردشان شبیه نماتدهای نرمال بود (Ellis and Horvitz 1986)؛ اما این مورد در مگس‌ها صادق نبود. بررسی‌های انجام شده در ژنوم مگس‌ها نشان داد مگس‌هایی که فاقد این قطعه جهت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بودند در همان اوایل رشد و تکثیر می‌مردند. این مگس‌ها گرچه ژن‌های لازم برای زنده ماندن، دسترسی به منبع تغذیه و پروتئین مناسب برای رشد را دارا بودند اما به علت حذف این قطعه در همان اوایل جنینی از بین می‌رفتند (White et al. 1994). مهره‌داران هم مانند مگس‌ها، اگر در همان اوایل رشد و تکثیر تحت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول قرار نگیرند، می‌میرند. مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول از جهات گوناگون بر روی رشد اثرگذار است که از آن جمله می‌توان زدودن سلول‌های ناخواسته، پاک کردن ساختارهای غیر ملزوم، کنترل تعداد سلول‌ها و حذف سلول‌های غیرطبیعی را نام برد (Jacobson et al. 1997).

یکی دیگر از مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده مسیر سیگنال FoxO است. پروتئین‌های خانواده FoxO به دنبال اتصال هورمون انسولین به گیرنده‌اش در غشای سلول که سبب به راه افتادن واکنش‌های آبشاری فسفریلاسیون پروتئین‌های مختلف می‌شود، فسفریله شده، اجازه‌ی ورود به هسته را می‌یابند. پروتئین‌های FoxO در هسته‌ی سلول سبب تنظیم رونویسی ژن‌های مؤثر در متابولیسم می‌شوند. همچنین در عملکرد عامل رهاسازی فاکتورهای رشد دخالت می‌کنند. این پروتئین ظاهراً در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از طریق دخالت در رونویسی ژن‌های P53 و Bim نقش دارد. از این رو خانواده پروتئین‌های FoxO در بسیاری از عملکردهای سلول از جمله تمایز، تکثیر سلولی، متابولیسم، کنترل حیات و مرگ سلولی نقش دارند (Barthel et al. 2005). سیگنال wnt نیز که جزء مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده‌است در بسیاری از مراحل رشد در پستانداران شامل تکثیر، تمایز و واکنش‌های اپیتلیال-مزانشیمی که در راستای گسترش بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌باشد، درگیر است. پروتئین‌های Wnt خانواده بزرگی هستند که لیگاند‌های گلیکوسیل

شده که برای رشد در پستانداران نیاز است را ترشح می‌کنند. این سیگنال از بدو تولد تا گسترش کامل اندام‌ها فعال است (Smalley and Dale 1999). یکی دیگر از مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده مسیر P53 است. هنگامی که سن افزایش می‌یابد و یا سلول تحت محدودیت انرژی قرار می‌گیرد ژن‌های زیادی به وسیله این مسیر تنظیم می‌شوند. افزایش بیان یکی از ایزوفرم‌های P53 به نام P44 بر روی طول عمر و اندازه بدن موش مؤثر است. اثر سیگنال IGF بر روی P44 موجب تنظیم آبشار کینازی می‌شود که بر روی رشد مؤثر است. P53 مانند IGF و سایر سیگنال‌های رشد در کنترل طول عمر پستانداران مؤثر است. به طور کلی رشد سلول به معنای افزایش تکثیر و کاهش میزان مرگ سلول است، بنابراین اگر افزایش تکثیر یا کاهش مرگ یا هر دو رخ دهد موجب رشد می‌شود. عملکرد طبیعی P53 در فاز G1 سلولی در مواقع آسیب به DNA است و بیان آن، با ممانعت سلول از ورود از فاز G1 به S، مانع رشد می‌شود (Maier et al. 2004). با افزایش سن، طول تلومر کاهش یافته و سبب فعال شدن سیگنال‌هایی می‌شود که در پی آن ژن P53 فعال می‌شود و به دنبال آن چرخه سلولی متوقف و موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود. از طرفی، در صورت فقدان P53 اختلال عملکرد تلومر مکانیسم مهمی در ایجاد ناپایداری ژنومی است که معمولاً در سلول‌های سرطانی مشاهده می‌شود (Deng and Chang 2007). بنابراین معنی‌دار شدن مسیر P53 در این تحقیق مؤید نقش ژن‌های شناسایی شده در تنظیم کاهش سرعت رشد است. مسیر سیگنال TGF- β نیز یکی دیگر از مسیرهای شناسایی شده در این مطالعه است. این مسیر یک مرکز کنترلی مهم در رشد و تمایز می‌باشد. ۳۰ عضو از این خانواده در انسان، موش و سایر مهره‌داران شناسایی شده‌است. TGF- β می‌تواند ژن‌های سرکوب‌گر را طی چرخه‌ی سلولی برانگیخته کند (Massagué et al. 2000). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، بین بخش‌های مختلف و نتایج به دست آمده پیوستگی وجود داشته و همه نتایج مؤید نقش این ژن‌ها در چرخه سلولی و رشد است. همچنین چهار فاکتور رونویسی جدید که به عنوان کاندیدا در این زمینه معرفی شد، پتانسیل بالایی به عنوان فاکتورهای رونویسی جدید در تنظیم سرعت رشد دارد، زیرا هم دارای نقش مرتبط با رشد بوده، هم در

جدید در تنظیم سرعت رشد پستانداران در سطح آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته و زمینه جدیدی را برای درک سازوکار کاهش سرعت رشد پستانداران با استفاده از ابزارهای بیولوژیکی ایجاد نماید.

توالی‌های پروموتوری ژن‌های درگیر در سرعت رشد و با بیان مشابه شناسایی شد. به علاوه، همراه فاکتورهایی می‌باشد که دارای نقش شناخته شده در زمینه شبکه تنظیمی سرعت رشد است، بنابراین این فاکتورهای رونویسی می‌توانند به عنوان یک کاندیدای

منابع

- Austad SN (2005) Diverse Aging Rates in Metazoans: Targets for Functional Genomics. *Mechanisms of ageing and development* 126: 43-49.
- Bai L, Yoon S, King P, Merchant J (2004) Zbp-89-Induced Apoptosis Is P53-Independent and Requires Jnk. *Cell Death & Differentiation* 11: 663-673.
- Bakhtiarzadeh MR, Moradi-Shahrbabak M, Ebrahimie E (2014) Transcriptional Regulatory Network Analysis of the over-Expressed Genes in Adipose Tissue. *Genes & Genomics* 36: 105-117.
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, et al. (2013) Ncbi Geo: Archive for Functional Genomics Data Sets—Update. *Nucleic acids research* 41: D991-D995.
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005) Foxo Proteins in Insulin Action and Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16: 183-189.
- Bazrafshan M, Bakhtiarzadeh MR, Mahdavi F (2015) A Bioinformatics Identification of Novel Transcription Factors Involved in Growth Rate Reduction in Mammals (by Using Microarray Data). First International and 9th National Biotechnology Congress, Iran, Tehran. (in farsi)
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J (2001) Sp1 and Krüppel-Like Factor Family of Transcription Factors in Cell Growth Regulation and Cancer. *Journal of cellular physiology* 188: 143-160.
- Bogin B (1999) Evolutionary Perspective on Human Growth. *Annual Review of Anthropology*: 109-153.
- Bornstein P, O'Rourke K, Wikstrom K, Wolf FW, Katz R, et al. (1991) A Second, Expressed Thrombospondin Gene (Thbs2) Exists in the Mouse Genome. *Journal of Biological Chemistry* 266: 12821-12824.
- Capelson M, Hetzer MW (2009) The Role of Nuclear Pores in Gene Regulation, Development and Disease *EMBO reports* 10: 697-705.
- De Magalhães JoP, Costa J, Church GM (2007) An Analysis of the Relationship between Metabolism, Developmental Schedules, and Longevity Using Phylogenetic Independent Contrasts. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 62: 149-160.
- de Magalhães JP, Church GM (2005) Genomes Optimize Reproduction: Aging as a Consequence of the Developmental Program. *Physiology* 20: 252-259.
- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A (1991) Parental Imprinting of the Mouse Insulin-Like Growth Factor Ii Gene. *Cell* 64: 849-859.
- DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR (1997) Distinct Roles for E2f Proteins in Cell Growth Control and Apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 7245-7250.
- Delaney A, Padmanabhan V, Rezvani G, Chen W, Forcinito P, et al. (2014) Evolutionary Conservation and Modulation of a Juvenile Growth-Regulating Genetic Program. *Journal of molecular endocrinology* 52: 269-277.
- Deng Y, Chang S (2007) Role of Telomeres and Telomerase in Genomic Instability, Senescence and Cancer. *Laboratory investigation* 87: 1071-1076.
- Donate LE, Blasco MA (2011) Telomeres in Cancer and Ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 366: 76-84.
- Dreuillet C, Tillit J, Kress M, Ernoult-Lange M (2002) In Vivo and in Vitro Interaction between Human Transcription Factor Mok2 and Nuclear Lamin a/C. *Nucleic Acids Res* 30: 4634-4642.
- Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. Elegans*. *Cell* 44: 817-829.
- Finkelstein GP, Forcinito P, Lui JC, Barnes KM, Marino R, et al. (2009) An Extensive Genetic Program Occurring During Postnatal Growth in Multiple Tissues. *Endocrinology* 150: 1791-1800.
- Fräter-Schröder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Böhlen P (1987) Tumor Necrosis Factor Type Alpha, a Potent Inhibitor of Endothelial Cell Growth in Vitro, Is Angiogenic in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 5277-5281.
- Goodman RH, Smolik S (2000) Cbp/P300 in Cell Growth, Transformation, and Development. *Genes & development* 14: 1553-1577.
- Harun MS, Kuan CO, Selvarajah GT, Wei TS, Arshad SS, et al. (2013a) Transcriptional Profiling of Feline Infectious Peritonitis Virus Infection in Crfk Cells and in Pbmcs from Fip Diagnosed Cats. *Virol J* 10: 329.
- Harun MSR, Kuan CO, Selvarajah GT, Wei TS, Arshad SS, et al. (2013b) Transcriptional Profiling of Feline Infectious Peritonitis Virus Infection in Crfk Cells and in Pbmcs from Fip Diagnosed Cats. *Virology journal* 10:1-9.
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, et al. (1999) Nf-Kb Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition. *Molecular and cellular biology* 19: 2690-2698.
- Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, et al. (2007) David Bioinformatics Resources: Expanded

- Annotation Database and Novel Algorithms to Better Extract Biology from Large Gene Lists. *Nucleic acids research* 35: W169-W175.
- Huynen MA, Snel B, von Mering C, Bork P (2003) Function Prediction and Protein Networks. *Current opinion in cell biology* 15: 191-198.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88: 347-354.
- Kim B-R, Dong SM, Seo SH, Lee J-H, Lee JM, et al. (2014) Lysyl Oxidase-Like 2 (Loxl2) Controls Tumor-Associated Cell Proliferation through the Interaction with Marcksl1. *Cellular signalling* 26: 1765-1773.
- Kobayashi T, Kronenberg H (2005) Minireview: Transcriptional Regulation in Development of Bone. *Endocrinology* 146: 1012-1017.
- Korzeliuss J, The I, Ruijtenberg S, Portegijs V, Xu H, et al. (2011) C. Elegans Mcm-4 Is a General DNA Replication and Checkpoint Component with an Epidermis-Specific Requirement for Growth and Viability. *Developmental biology* 350: 358-369.
- Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005) The Rna-Binding Protein Imp-3 Is a Translational Activator of Insulin-Like Growth Factor Ii Leader-3 Mrna During Proliferation of Human K562 Leukemia Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 18517-18524.
- Lu J, He M-L, Wang L, Chen Y, Liu X, et al. (2011) Mir-26a Inhibits Cell Growth and Tumorigenesis of Nasopharyngeal Carcinoma through Repression of Ezh2. *Cancer research* 71: 225-233.
- Lui JC, Andrade AC, Forcinito P, Hegde A, Chen W, et al. (2010a) Spatial and Temporal Regulation of Gene Expression in the Mammalian Growth Plate. *Bone* 46: 1380-1390.
- Lui JC, Chen W, Barnes KM, Baron J (2010b) Changes in Gene Expression Associated with Aging Commonly Originate During Juvenile Growth. *Mechanisms of ageing and development* 131: 641-649.
- Lui JC, Finkielstein GP, Barnes KM, Baron J (2008) An Imprinted Gene Network That Controls Mammalian Somatic Growth Is Down-Regulated During Postnatal Growth Deceleration in Multiple Organs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295: R189-R196.
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000) Deacetylation of P53 Modulates Its Effect on Cell Growth and Apoptosis. *Nature* 408: 377-381.
- Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, et al. (2004) Modulation of Mammalian Life Span by the Short Isoform of P53. *Genes & development* 18: 306-319.
- Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000) Tgf β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell* 103: 295-309.
- Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M, Nakahara T, Kondo T, et al. (2010) Lenalidomide Induces Cell Death in an Mds-Derived Cell Line with Deletion of Chromosome 5q by Inhibition of Cytokinesis. *Leukemia* 24: 748-755.
- Meraner J, Lechner M, Schwarze F, Gander R, Jesacher F, et al. (2008) Cell Cycle Dependent Role of Hdac1 for Proliferation Control through Modulating Ribosomal DNA Transcription. *Cell biology international* 32: 1073-1080.
- Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, Ito K, Tsang YS, et al. (2011) Regulation of Tcf7 by Runx2 in Chondrocyte Maturation and Proliferation. *Journal of bone and mineral metabolism* 29: 291-299.
- Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA (1990) Tgf-B Stimulation and Inhibition of Cell Proliferation: New Mechanistic Insights. *Cell* 63: 245-247.
- Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, et al. (2012) C-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell* 151: 68-79.
- Nitz MD, Harding MA, Smith SC, Thomas S, Theodorescu D (2011) Rreb1 Transcription Factor Splice Variants in Urologic Cancer. *The American journal of pathology* 179: 477-486.
- Patterson LT, Potter SS (2004) Profiling Gene Expression in Kidney Development. *Nephron Exp Nephrol* 98: e109-113.
- Qu H, Qu D, Chen F, Zhang Z, Liu B, et al. (2010) Zbtb7 Overexpression Contributes to Malignancy in Breast Cancer. *Cancer investigation* 28: 672-678.
- Rollo CD (2002) Growth Negatively Impacts the Life Span of Mammals. *Evolution & development* 4: 55-61.
- Roy S, Packman K, Jeffrey R, Tenniswood M (2005) Histone Deacetylase Inhibitors Differentially Stabilize Acetylated P53 and Induce Cell Cycle Arrest or Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cell Death & Differentiation* 12: 482-491.
- Rutkowski RJ, Warren WD (2009) Phenotypic Analysis of Deflated/Ints7 Function in Drosophila Development. *Developmental Dynamics* 238: 1131-1139.
- Saghizadeh M, Gribanova Y, Akhmedov NB, Farber DB (2011) Zbed4, a Cone and Müller Cell Protein in Human Retina, Has a Different Cellular Expression in Mouse. *Molecular vision* 17.
- Sawada A, Kiyonari H, Ukita K, Nishioka N, Imuta Y, et al. (2008) Redundant Roles of Tead1 and Tead2 in Notochord Development and the Regulation of Cell Proliferation and Survival. *Molecular and cellular biology* 28: 3177-3189.
- Smalley MJ, Dale TC (1999) Wnt Signalling in Mammalian Development and Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 18:230-215.
- Spengler D, Villalba M, Hoffmann A, Pantaloni C, Houssami S, et al. (1997) Regulation of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Zac1, a Novel Zinc Finger Protein Expressed in the Pituitary Gland and the Brain. *The EMBO Journal* 16: 2814-2825.
- Still IH, Vince P, Cowell JK (1999) The Third Member of the Transforming Acidic Coiled Coil-Containing Gene Family, Tacc3, Maps in 4p16, Close to Translocation Breakpoints in Multiple Myeloma, and Is Upregulated in Various Cancer Cell Lines. *Genomics* 58: 165-170.
- Uchida F, Uzawa K, Kasamatsu A, Takatori H, Sakamoto Y, et al. (2013) Overexpression of Cdca2 in Human Squamous Cell Carcinoma: Correlation with Prevention of G1 Phase Arrest and Apoptosis. *PLoS One* 8: e56381.
- Varrault A, Gueydan C, Delalbre A, Bellmann A, Houssami S, et al. (2006) Zac1 Regulates an Imprinted Gene Network Critically Involved in the Control of Embryonic Growth. *Developmental cell* 11: 711-722.

Von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, et al. (2005) String: Known and Predicted Protein-Protein Associations, Integrated and Transferred across Organisms. *Nucleic acids research* 33: D433-D437.

White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, et al. (1994) Genetic Control of Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Science* 264: 677-683.

Williams BC, Li Z, Liu S, Williams EV, Leung G, et al. (2003) Zwilch, a New Component of the Zw10/Rod Complex Required for Kinetochores Functions. *Molecular biology of the cell* 14: 1379-1391.

Zhang Y, Liu J, Peng X, Zhu C-C, Han J, et al. (2014) Kif20a Regulates Porcine Oocyte Maturation and Early Embryo Development.