

Integrated network-based analysis of miRNA-gene regulation and transcription factors in hub genes associated with subfertility in cattle

Zahra Roudbari 

*Corresponding author: Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

Morteza Mokhtari 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: msmokhtari@ujiroft.ac.ir

Rouhollah Mirmahmoudi 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: mirmahmoudi@ujiroft.ac.ir

Arsalan Barazandeh 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: mabrazandeh@gmail.com

Saideh Eskandri Nasab 

PhD of animal breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail address: saideh.skandary68@gmail.com

Abstract

Objective

Subfertility in cattle, arising from complex interactions among genetic, metabolic, immune, and developmental factors, represents a major bio-economic challenge for the livestock industry and threatens the sustainability of production systems. This study aimed to identify hub genes associated with subfertility in cattle and to clarify their underlying molecular mechanisms within multilayer miRNA-gene-transcription factor regulatory networks using a network-based systems biology framework.

Materials and methods

In the present study, gene expression data from six fertile and five subfertility samples were obtained from the GEO database (accession number GSE107741). After normalization, differential gene expression analysis was performed. Fertility-related genes were selected using functional enrichment analysis, and a protein-protein interaction network was constructed. Hub genes were identified based on centrality indices, and regulatory networks including miRNAs and their promoter motifs were extracted and integratively combined.

Results

Network analysis led to the identification of hub genes IGF1, CD4, SPP1, ACAN, and TGFB3, which play key roles in regulating immune pathways, follicular growth, corpus luteum function, extracellular matrix remodeling, metabolism, and embryonic development. Post-transcriptional regulatory analysis showed that the expression of these genes is simultaneously controlled by

several fertility-related miRNAs, and the strength of regulation depends on the cumulative effect of these miRNAs, enabling gradual and precise modulation of gene expression. Furthermore, the identification of key transcription factors including PATZ1, PBX3, ZNF454, CTCF, and FEZF2 indicates the presence of an upstream regulatory layer that ensures coordinated expression of hub genes through transcriptional control and chromatin architecture organization.

Conclusions

Overall, the findings of the present study indicate that subfertility in cattle results from disruptions in multilayer and interconnected miRNA-gene-transcription factor regulatory networks. The proposed network framework may provide a valuable basis for identifying molecular biomarkers and for developing targeted breeding and management strategies aimed at improving reproductive efficiency in cattle.

Keywords: cattle infertility, gene regulatory network, hub genes, miRNA, transcription factors

Paper Type: Research Paper.

Citation: Roudbari, Z., Mokhtari, M., Mirmahmoudi, R., Barazandeh, A., & Eskandri Nasab, S. (2026). Integrated Network-Based Analysis of miRNA-Gene Regulation and Transcription Factors in Hub Genes Associated with Subfertility in Cattle. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(4), 161-186.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 161-186.

DOI: 10.22103/jab.2026.26970.1879

Received: June 01, 2026.

Received in revised form: August 13, 2026.

Accepted: August 14, 2026.

Published online: August 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Subfertility is one of the most significant biological, managerial, and economic challenges in the dairy cattle industry. Despite continuous improvements in genetics, nutrition, health management, and reproductive technologies, fertility has not improved at the expected pace and in some regions has even declined. Subfertility results in lower conception rates, prolonged calving intervals, increased insemination numbers, higher culling rates, and a substantial economic burden on dairy operations. A major proportion of subfertility originates during the early phases of pregnancy, particularly due to early embryonic mortality. Successful establishment of pregnancy is dependent on complex molecular communication between the embryo and the endometrium, efficient secretion of interferon-tau (IFNT), optimal endometrial receptivity, appropriate modulation of immune and inflammatory responses, and precise synchronization of molecular pathways involved in implantation and embryo development. From a biological perspective, fertility is regulated by a network of interacting metabolic, endocrine, environmental, and genetic factors. Metabolic stress, oxidative imbalance, and chronic inflammatory conditions can impair oocyte quality, follicular maturation, embryo viability, and the maternal uterine environment. At the molecular level, key signaling cascades such as Wnt, Notch, MAPK, and mTOR play essential roles in cell fate determination, proliferation, differentiation, and maternal recognition of pregnancy. Misregulation of these pathways can result in defective embryo-maternal crosstalk and predispose cattle to pregnancy failure. The

regulation of gene expression in reproductive tissues occurs primarily through transcriptional and post-transcriptional layers. miRNAs are now established as fundamental regulators of reproductive function, controlling oogenesis, spermatogenesis, corpus luteum function, uterine receptivity, and early embryonic development. Dysregulation of miRNA expression has been strongly associated with infertility in diverse mammalian species. Furthermore, transcription factors (TFs) interact with specific DNA motifs within promoter regions to regulate chromatin accessibility, epigenetic states, and expression levels of fertility-related genes. Alterations in promoter motifs or TF-binding affinity can interfere with gene expression programs, potentially leading to subfertility. Given this complexity, subfertility is not the result of a single defective gene but rather a consequence of disrupted interaction within a multilayer regulatory network, involving genes, miRNAs, and TFs. Integrated multi-omics and network-based analyses offer a powerful strategy to uncover key regulators, hub genes, and regulatory modules that underpin reproductive success or failure. Therefore, the aim of this study was to identify central hub genes associated with subfertility in cattle and to construct a comprehensive multilayer regulatory network integrating miRNA-gene and TF-gene interactions. This approach provides new mechanistic insights and establishes potential molecular biomarkers for improving reproductive performance.

Materials and methods

Expression data for bovine reproductive tissues were retrieved from the GSE107741 dataset, consisting of 11 samples (six fertile and five subfertile cows). Quality control, background correction, and normalization were performed to ensure the reliability of the expression matrix. Sample distribution and overall data quality were assessed using boxplots. Additionally, UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) analysis was applied to visualize the global transcriptomic patterns and to evaluate the biological similarity and clustering of samples between the fertile and subfertile groups. Differential gene expression analysis was performed using the limma package. Genes were considered differentially expressed when they met two thresholds: $P\text{-value} < 0.05$ and $|\log_2 \text{fold change}| \geq 0.48$. Functional enrichment analysis was conducted using DAVID, and genes associated with reproductive processes and fertility-related pathways were extracted for subsequent protein-protein interaction (PPI) analysis. Reproductive biological process genes were used to construct a PPI network with STRING (confidence score ≥ 0.4). The network was analyzed in Cytoscape, and hub genes were identified using the CytoHubba plugin. Four centrality algorithms were applied Degree, MNC, DMNC, and MCC and genes repeatedly appearing among top-ranked candidates across algorithms were defined as hub genes. To explore post-transcriptional regulation, miRNAs targeting each of the hub genes were predicted using two major databases: miRWalk and TargetScan. Only miRNAs shared by both databases were considered reliable and were used to construct the miRNA-gene regulatory network. For transcriptional regulatory analysis, 1000 bp promoter regions upstream of each hub gene were extracted using BioMart. De novo motif discovery was performed using MEME Suite under optimized motif width settings and occurrence parameters. Identified motifs were compared against the JASPAR core database using Tomtom to determine corresponding transcription factors. Motif functional annotation was carried out using the GoMo tool, and biological relevance was determined based on enrichment in reproductive and developmental processes. Finally, all regulatory layers including the PPI network, miRNA-gene interactions, and TF-gene interactions derived from promoter motifs were merged to construct an integrated multilayer network. This unified network allowed visualization of how hub genes are simultaneously regulated at

transcriptional and post-transcriptional levels and how they interact within broader reproductive pathways.

Results

A total of 715 differentially expressed genes (DEGs) were identified between fertile and subfertile cows, indicating substantial transcriptomic differences associated with reproductive performance. Of these DEGs, 154 genes were enriched in reproductive biological processes and were used to establish the PPI network. Analysis of network topology across four centrality indices converged on five hub genes IGF1, CD4, SPP1, ACAN, and TGFB3 each of which occupied a structurally important position in the reproductive gene network. IGF1 was moderately upregulated (fold change ≈ 1.4) and exhibited the highest centrality rankings. IGF1 is a key factor in follicular development, oocyte maturation, embryonic growth, uterine receptivity, and developmental traits, and its dysregulation is frequently associated with subfertility. CD4 showed a pronounced increase in expression (fold change ≈ 3.6) and served as a major immunological node linking inflammatory, metabolic, and reproductive pathways. SPP1 gene, also upregulated, is known to participate in endometrial remodeling, embryo-maternal communication, implantation, and modulation of the uterine immune environment. In contrast, ACAN and TGFB3 were significantly downregulated in subfertile cows (fold changes ≈ -1.7 and -1.6 , respectively). ACAN plays a central role in extracellular matrix composition, endometrial structural integrity, and embryo implantation, while TGFB3 is involved in tissue remodeling, immune regulation, and developmental signaling. Downregulation of these genes indicates impaired extracellular matrix dynamics and altered TGF- β signaling, which may negatively impact uterine receptivity and embryo survival. The miRNA-gene interaction network showed that each hub gene was targeted by multiple miRNAs. IGF1 was the most heavily targeted gene, followed by CD4. Notably, bta-miR-181b and bta-miR-1260b were linked to SPP1; bta-miR-184 and bta-miR-764 were associated with ACAN; and bta-miR-2412 was associated with TGFB3. These miRNAs are implicated in key reproductive processes including oocyte quality, follicular health, embryo development, sperm viability, and reproductive tract physiology. Their collective targeting patterns suggest fine post-transcriptional tuning of hub genes and demonstrate the complexity of regulatory interactions underlying fertility. Promoter motif analysis identified high-confidence TFs associated with each hub gene. IGF1 motifs corresponded to PATZ1, which is involved in chromatin remodeling and germ-cell development. CD4 motifs were linked to PBX3, a TF associated with immune cell differentiation and developmental regulation. SPP1 was associated with ZNF454, ACAN with the insulator protein CTCF, and TGFB3 with FEZF2, known for roles in transcriptional repression and developmental signaling. This reveals a strong transcriptional regulatory layer governing hub gene expression and indicates biological relevance across immune, reproductive, and developmental pathways. The integrated multilayer network comprised 47 nodes and 51 edges, connecting PPI clusters with miRNA-mediated and TF-mediated regulation. IGF1 emerged as the principal central node, while CD4, SPP1, ACAN, and TGFB3 also functioned as essential connectors between immune, developmental, extracellular matrix, and metabolic pathways. This integration highlights how dysregulation across multiple regulatory layers may collectively contribute to subfertility.

Conclusions

This study reveals that subfertility in cattle arises from disruption of a complex multilayer regulatory network rather than isolated malfunction of individual genes. The five identified hub genes IGF1, CD4, SPP1, ACAN, and TGFB3 represent key regulators of fundamental reproductive processes including follicular development, immune modulation, endometrial

remodeling, embryo-maternal communication, and early embryogenesis. miRNAs and transcription factors associated with these hub genes create additional layers of regulation that fine-tune reproductive function and may become dysregulated in subfertile animals. The integrated multi-omic approach applied here provides a powerful framework for identifying molecular markers and regulatory modules associated with fertility status. These findings offer potential targets for genomic selection, precision breeding, biomarker discovery, and development of diagnostic tools aimed at improving reproductive efficiency in cattle. Furthermore, the results emphasize the need to consider transcriptional and post-transcriptional regulation, extracellular matrix remodeling, immune signaling, and metabolic pathways when investigating the biological basis of subfertility.

Author contributions

Z.R., Funding acquisition: Z.R.; Methodology: Z.R., S.E.; Formal analysis: Z.R., S.E., M.M., R.M., A.B.; Resources: Z.R.; Investigation: Z.R., M.M., R.M., A.B.; Writing original draft preparation: Z.R., S.E.; Writing review and editing: Z.R., M.M., R.M.; Project administration: Z.R. All authors have read and approved the final manuscript.

Data availability statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Acknowledgements

The authors would like to express their sincere gratitude to Jiroft University for the financial support of this research project (Grant No. 2812-04-3-3 12272). This support was essential for the successful completion of this study.

Ethical considerations

The authors declare that this study was conducted in accordance with ethical research standards and that no fabrication, falsification, plagiarism, or other forms of scientific misconduct occurred.

Funding

The authors received no specific funding for this work.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

واکاوی یکپارچه مبتنی بر شبکه از تنظیم miRNA- ژن و فاکتورهای رونویسی در ژن‌های هاب مرتبط با کاهش باروری در گاو

زهرا رودباری ^{ID}

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه:
roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

مرتضی مختاری ^{ID}

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: msmokhtari@ujiroft.ac.ir

روح اله میرمحمودی ^{ID}

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: mirmahmoodi@ujiroft.ac.ir

ارسلان برازنده ^{ID}

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: mabrazandeh@gmail.com

سعیده اسکندری نسب ^{ID}

دکتری اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه:
saideh.skandary68@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۲

چکیده

هدف: کاهش باروری در گاو، که ناشی از برهم‌کنش پیچیده عوامل ژنتیکی، متابولیکی، ایمنی و تکوینی است، یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیستی - اقتصادی در صنعت دامپروری به‌شمار می‌رود و تهدیدی جدی برای پایداری سامانه‌های تولیدی محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش، شناسایی ژن‌های هاب مرتبط با افت باروری گاو و تبیین سازوکارهای مولکولی آن‌ها در چارچوب شبکه‌های تنظیمی چندلایه miRNA - ژن-فاکتور رونویسی با رویکرد سیستم‌زیستی مبتنی بر شبکه بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش کنونی، داده‌های بیان ژنی ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه با باروری کم از پایگاه داده GEO (شماره دسترسی GSE107741) استخراج و پس از نرمال‌سازی، تحلیل بیان تفاضلی انجام شد. ژن‌های مرتبط با باروری با استفاده از تحلیل غنی‌سازی عملکردی انتخاب شده و شبکه تعامل پروتئین-پروتئین برای آن‌ها ساخته شد. ژن‌های هاب بر اساس شاخص‌های مرکزیت شناسایی و شبکه‌های تنظیمی شامل miRNAها و موتیف‌های پروموتری آن‌ها استخراج و به‌صورت یکپارچه ادغام شدند.

نتایج: تحلیل شبکه‌ای منجر به شناسایی ژن‌های هاب IGF1، CD4، SPP1، ACAN و TGFB3 شد که نقش محوری در تنظیم مسیرهای ایمنی، رشد فولیکولی، عملکرد جسم زرد، بازسازی ماتریکس خارج‌سلولی، متابولیسم و تکوین جنینی ایفا می‌کنند. تحلیل تنظیم پسا‌رونویسی نشان داد که بیان این ژن‌ها تحت کنترل هم‌زمان چندین miRNA مرتبط با باروری قرار دارد و شدت این تنظیم به اثر تجمعی این miRNAها وابسته است، که امکان تنظیم تدریجی و دقیق بیان ژن را فراهم می‌کند. همچنین، شناسایی فاکتورهای رونویسی کلیدی شامل PATZ1، PBX3، ZNF454، CTCF و FEZF2 نشان‌دهنده وجود یک لایه

تنظیمی بالادستی بالقوه است که می‌تواند از طریق کنترل رونویسی و سازمان‌دهی معماری کروماتین، در تنظیم بیان ژن‌های هاب نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که ژن‌های هاب IGF1، CD4، SPP1، ACAN و TGFB3 در مرکز یک شبکه تنظیمی چندلایه قرار دارند که از طریق تعامل هم‌زمان miRNA ها و فاکتورهای رونویسی، مسیرهای کلیدی مرتبط با ایمنی، بازسازی بافتی و تکوین جنینی را تنظیم می‌کند. این یافته‌ها بیانگر آن است که اختلال در هماهنگی این شبکه تنظیمی می‌تواند یکی از سازوکارهای مولکولی مؤثر در کم‌باروری گاو باشد و ژن‌ها و تنظیم‌کننده‌های شناسایی شده می‌توانند به‌عنوان اهداف بالقوه برای مطالعات عملکردی و برنامه‌های به‌نژادی آینده مدنظر قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: ژن‌های هاب، ریزآران‌ای، شبکه تنظیمی ژن، فاکتورهای رونویسی، ناباروری گاو.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رودباری زهرا، مختاری مرتضی، روح اله میرمحمودی، برازنده ارسلان، اسکندری نسب سعیده (۱۴۰۵) واکاوی یکپارچه مبتنی بر شبکه از تنظیم miRNA- ژن و فاکتورهای رونویسی در ژن‌های هاب مرتبط با کاهش باروری در گاو. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۴)، ۱۶۱-۱۸۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

کاهش باروری یکی از چالش‌های اصلی و پرهزینه در صنعت گاو‌داری جهان است و علیرغم پیشرفت‌های چشمگیر در مدیریت، تغذیه و ژنتیک، نرخ باروری طی دهه‌های اخیر بهبود قابل توجهی نداشته است (Luecke et al., 2022). این مسئله پیامدهای اقتصادی گسترده‌ای از جمله کاهش نرخ آبستنی، افزایش فاصله گوساله زایی و حذف زود هنگام دام‌ها از چرخه تولید به همراه دارد و در نهایت بر پایداری سیستم‌های تولیدی تأثیر می‌گذارد (Bragança & Zangirolamo, 2018). از این رو، شناخت دقیق عوامل زیستی مؤثر بر کاهش باروری از اولویت‌های اصلی پژوهش در علوم دامی محسوب می‌شود. کم باروری نتیجه برهم‌کنش پیچیده، مجموعه‌ای از عوامل فیزیولوژیک، محیطی و ژنتیکی است. بخش بزرگی از ناباروری گاو‌ها ناشی از مرگ‌ومیر جنینی در مراحل اولیه آبستنی است که به واسطه تعامل ناکافی جنین و آندومتر، اختلال در ترشح اینترفرون تائو (IFNT) و شکست لانه‌گزینی ایجاد می‌شود (Vasconcelos, 2020). علاوه بر این، استرس‌های اکسیداتیو، پیری بیولوژیکی و تغییرات متابولیک ناشی از مدیریت فشرده می‌توانند ظرفیت تولید مثلی را کاهش داده و محیط رحم را برای حفظ آبستنی تأثیر سوء می‌گذارد (Matsuno & Imakawa, 2025). در سطح مولکولی، پایداری بارداری تحت کنترل شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالینگ کلیدی نظیر Wnt، MAPK، Notch و mTOR قرار دارد که نقش اساسی در رشد جنینی، تنظیم پاسخ آندومتر و برقراری تعامل جنین-مادر ایفا می‌کنند. اختلال در عملکرد این مسیرها با کاهش باروری و افزایش خطر از دست رفتن بارداری مرتبط گزارش شده است (Sigdel et al., 2021). مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که بخشی از ویژگی‌های مربوط به بارداری و سقط جنین، وراثت‌پذیر بوده و ترکیب ژنتیکی مادر و جنین نقش مهمی در تداوم و حفظ بارداری دارد (Amorim et al., 2025). این یافته‌ها ضرورت بررسی عمیق‌تر شبکه‌های تنظیمی دخیل در تولیدمثل و استفاده از رویکردهای سیستم‌زیستی مبتنی بر شبکه را برجسته می‌کنند. در همین راستا،

مطالعات ترنسکریپتومی در دام‌های اهلی نشان داده‌اند که تحلیل داده‌های بیان ژن و بازسازی شبکه‌های تعاملی می‌تواند به شناسایی ژن‌های هاب و مسیرهای زیستی کلیدی در صفات پیچیده و مهم اقتصادی کمک کند (Nejad et al., 2024). در این میان، miRNAs به عنوان یکی از مهم‌ترین لایه‌های تنظیمی پسارونویسی، نقش اساسی در کنترل بیان ژن‌های مرتبط با باروری ایفا می‌کنند. تغییرات نابجای miRNA می‌تواند فرآیندهایی چون اسپرم‌سازی، تمایز سلول‌های جنسی، پذیرندگی آندومتر، رشد اولیه جنین و تعامل جنین مادر را مختل کرده و به ناباروری نر یا ماده منجر شود (Asadpour & Mofidi Chelan, 2022). تفاوت در الگوی بیان miRNA های کلیدی در بافت‌های بیضه، تخمدان و آندومتر، و نیز حضور miRNA ها با منشأ جفتی در گردش خون، نشان می‌دهد که این مولکول‌ها می‌توانند هم در بروز و پیشرفت ناباروری نقش داشته باشند و هم به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی مورد استفاده قرار گیرند (Jamwal et al., 2023). علاوه بر miRNA ها، فاکتورهای رونویسی (TFs) و موتیف‌های DNA، RNA و پروتئینی نیز لایه‌های مهمی از تنظیم ژن‌ها را تشکیل می‌دهند. موتیف‌های ساختاری و تنظیمی موجود در ژن‌های تولیدمثلی، مانند branch point motifs در اسپلاسیسینگ mRNA یا موتیف‌های حیاتی موجود در ژن‌هایی نظیر TMEM95، DAZL، RPRM و Dmc1، نقش مستقیمی در تنظیم فرآیندهای سلولی مرتبط با باروری دارند و جهش یا حذف آن‌ها می‌تواند موجب اختلال عملکرد و بروز ناباروری شود (Shireesha et al., 2021). همچنین افزایش بیان مولکول‌های دارای موتیف‌های التهابی مانند CXCL5 در تلیسه‌های نابارور، اهمیت مسیرهای ایمنی و التهابی را در کاهش باروری نشان می‌دهد (Phillips et al., 2018). در یک مطالعه جامع پیشین، با ادغام چندین مجموعه داده ترنسکریپتومیک آندومتر و بهره‌گیری از روش‌های یادگیری ماشین، مجموعه‌ای از ژن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پذیرندگی رحم در گاو شناسایی شدند. تمرکز اصلی آن پژوهش بر توسعه مدل‌های پیش‌بینی برای تعیین وضعیت پذیرندگی رحم بود (Rabaglino & Haja, 2020). در مقابل، مطالعه حاضر با تمرکز بر پدیده کم‌باروری در گاو، فراتر از شناسایی ژن‌های کلیدی، به بازسازی شبکه‌های تنظیمی شامل miRNA-ژن-فاکتورهای رونویسی می‌پردازد. از این رو، رویکرد این پژوهش بر تفسیر شبکه‌ای و تبیین سازوکارهای مولکولی دخیل در کم‌باروری متمرکز است و می‌تواند دیدگاهی مکمل نسبت به مطالعات مبتنی بر پیش‌بینی ارائه دهد. با توجه به اینکه کم‌باروری حاصل برهم‌کنش‌های چندلایه میان عناصر تنظیمی نظیر miRNA ها، فاکتورهای رونویسی و موتیف‌های توالی در ژن‌های کلیدی است، به کارگیری یک رویکرد تحلیل یکپارچه مبتنی بر شبکه برای بررسی روابط miRNA-ژن و فاکتور رونویسی-ژن می‌تواند درک جامع‌تری از سازوکارهای مولکولی این اختلال فراهم سازد. چنین رویکردی نه تنها روابط پیچیده میان تنظیم‌کننده‌ها و ژن‌های هدف را آشکار می‌کند، بلکه مسیرهای کلیدی مرتبط با کم‌باروری را نیز مشخص ساخته و زمینه را برای توسعه ابزارهای تشخیصی دقیق‌تر و راهبردهای به‌نژادی هدفمند فراهم می‌سازد. بر این اساس، هدف پژوهش حاضر شناسایی ژن‌های هاب مرتبط با کم‌باروری در گاو و بازسازی شبکه تنظیمی چندلایه miRNA-ژن-فاکتورهای رونویسی به منظور تبیین مکانیسم‌های مولکولی مؤثر بر باروری بوده است.

مواد و روش‌ها

داده‌های بیان ژنی مرتبط با کم‌باروری در ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم‌بارور گاو از پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE107741 دریافت شدند. این مجموعه داده مربوط به گاوهای شیری (*Bos taurus*) بوده و نمونه‌های بیوپسی آندومتر در

روز هفتم چرخه فعلی جمع‌آوری شده‌اند. نمونه‌ها شامل ۶ گاو بارور و ۵ گاو کم‌بارور بودند. گاوهای بارور حیواناتی بودند که حداکثر طی سه نوبت انتقال جنین یا تلقیح مصنوعی آبستن شده و در چرخه بعدی نیز در اولین انتقال جنین آبستن شدند. گاوهای کم‌بارور با وجود چرخه فعلی طبیعی و عدم ناهنجاری قابل تشخیص در دستگاه تناسلی، در سه نوبت متوالی انتقال جنین یا تلقیح مصنوعی آبستن نشدند. نمای کلی مراحل تحلیل در شکل ۱ ارائه شده است. پس از نرمال‌سازی و کنترل کیفیت، آنالیز بیان تفاضلی با استفاده از بسته limma در محیط نرم افزار R انجام شد. بسته limma یکی از ابزارهای متداول برای تحلیل داده‌های بیان ژن در مطالعات ریزآرایه است که بر پایه مدل‌های خطی برای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی عمل می‌کند (Ritchie et al., 2015) و ژن‌های با بیان افتراقی براساس معیارهای آماری و زیستی انتخاب شدند، به طوری که مقدار $\text{adjP-value} < 0.05$ برای کنترل خطای ناشی از آزمون‌های متعدد و $|\log_2\text{FC}| \geq 0.48$ (معادل $\text{FoldChange} \pm 1.4$) به عنوان آستانه‌ای برای شناسایی تغییرات بیان دارای اهمیت زیستی در نظر گرفته شد. این آستانه با هدف ایجاد تعادل میان حساسیت تحلیل و کاهش یافته‌های کاذب و نیز حفظ ژن‌های دارای تغییرات متوسط اما بالقوه مرتبط با باروری انتخاب شد. استفاده هم‌زمان از معنی‌داری آماری و اندازه اثر، از انتخاب ژن‌هایی با تغییرات بسیار کوچک اما صرفاً معنادار از نظر آماری جلوگیری کرده و تعادلی میان حساسیت تحلیل و کاهش نتایج کاذب ایجاد می‌کند (McCarthy & Smyth, 2009). ژن‌های به دست آمده برای تحلیل غنی‌سازی عملکردی به پایگاه DAVID (Knowledgebase (v2026_1; <https://davidbioinformatics.nih.gov>) بر اساس دسته‌بندی‌های بیولوژیکی مرتبط با تولیدمثل، ژن‌های مرتبط با باروری استخراج گردیدند. سپس این ژن‌ها در پایگاه STRING وارد شدند. پایگاه STRING یک پایگاه داده شناخته‌شده برای بررسی تعاملات پروتئین-پروتئین است که اطلاعات تعاملات تجربی، پیش‌بینی‌شده و مبتنی بر پایگاه‌های داده را یکپارچه می‌کند. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با حداقل امتیاز اطمینان ۰.۴ در پایگاه (version Cytoscape (version 3.10.4; <https://string-db.org>) STRING ساخته شد و برای تجسم و تحلیل شبکه به نرم‌افزار Cytoscape (version 3.10.4) منتقل گردید. به منظور شناسایی ژن‌های هاب و افزایش پایداری نتایج شبکه، از افزونه CytoHubba (version 0.1) و چهار شاخص مرکزیت شامل Degree، MCC، DMNC و MNC استفاده شد. در هر یک از این شاخص‌ها، ۱۰ ژن با بالاترین امتیاز انتخاب شدند و در نهایت ژن‌هایی که در میان چندین شاخص به صورت مشترک تکرار شده بودند به عنوان ژن‌های هاب نهایی در نظر گرفته شدند. استفاده از چندین معیار مرکزیت و انتخاب ژن‌های مشترک میان آن‌ها به منظور کاهش سوگیری ناشی از یک شاخص منفرد و افزایش قابلیت اطمینان تحلیل شبکه انجام شد. در مراحل بعدی از این ژن‌های کلیدی برای تحلیل شبکه‌های تنظیمی چندلایه شامل miRNAها و فاکتورهای رونویسی استفاده شد. برای شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده، ژن‌های هاب در دو پایگاه miRWalk و TargetScan بررسی شدند و miRNAهایی که این ژن‌ها را هدف قرار می‌دادند استخراج گردیدند. در نهایت، تنها miRNAهای مشترک بین دو پایگاه به عنوان miRNAهای معتبر و نهایی انتخاب شدند. برای بررسی لایه‌های تنظیمی در سطح فاکتورهای رونویسی، ناحیه پروموتوری ژن‌های هاب مورد تحلیل قرار گرفت. برای هر ژن، ناحیه ۱۰۰۰ جفت‌باز بالادست از محل شروع رونویسی که به طور متداول به عنوان ناحیه پروموتور در مطالعات تنظیم ژن در نظر گرفته می‌شود، با استفاده از سرویس BioMart در پایگاه Ensembl استخراج شد (Lenhard et al., 2012). این نواحی به عنوان بخش‌های غنی از عناصر تنظیمی در نظر گرفته شدند و برای شناسایی موتیف‌های تنظیمی بررسی شدند. برای شناسایی de novo motifs، توالی‌های پروموتوری در نرم‌افزار MEME Suite (v5.4.1) با معیارهای آماری سختگیرانه ($E\text{-value} < 0.01$ و $P\text{-value} < 0.01$) و سایر پارامترهای پیش‌فرض تحلیل شدند. موتیف‌های حاصل سپس با پایگاه JASPAR CORE 2022 در ابزار Tomtom

مقایسه شدند تا عناصر تنظیمی شناخته شده و فاکتورهای رونویسی احتمالی شناسایی و موتیف‌های تکراری حذف شوند. در نهایت، تفسیر عملکردی موتیف‌های معتبر با استفاده از ابزار GoMo انجام شد تا نقش‌های بیولوژیکی احتمالی آن‌ها در تنظیم رونویسی و فرآیندهای مؤثر بر باروری مشخص گردد. در نهایت، با ادغام نتایج شبکه PPI، شبکه miRNA-ژن و شبکه فاکتور رونویسی-ژن، یک شبکه تنظیمی یکپارچه miRNA-ژن-فاکتور رونویسی بازسازی شد که روابط چندلایه میان ژن‌های هاب، miRNAها و موتیف‌های تنظیمی را در سطحی سیستماتیک نشان می‌دهد.



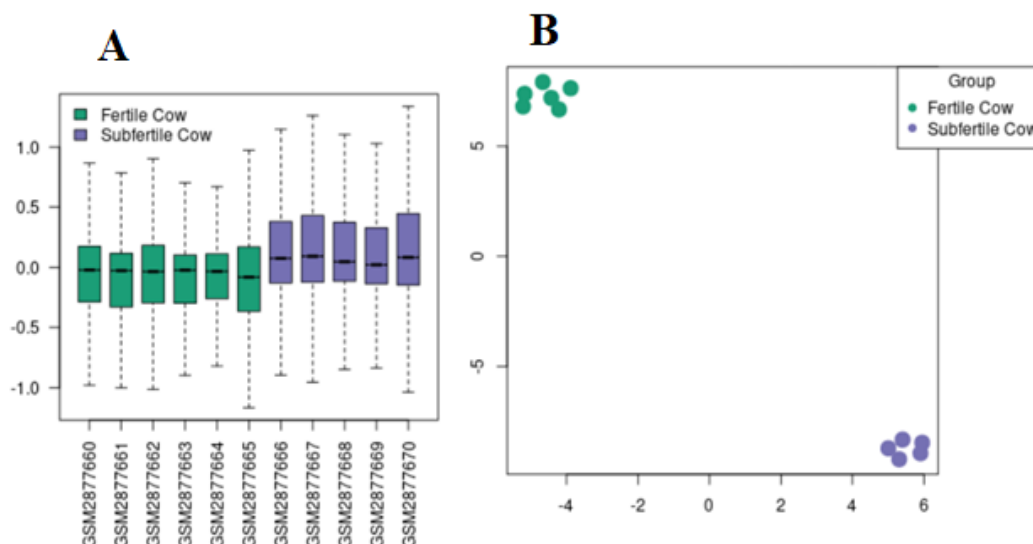
شکل ۱. فلوچارت مراحل تحلیل داده‌های بیان ژن مرتبط با کم‌باروری در گاو، شامل دریافت داده از پایگاه GEO، کنترل کیفیت و نرمال‌سازی، شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی با استفاده از limma، تحلیل غنی‌سازی عملکردی در DAVID، ساخت شبکه تعامل پروتئین-پروتئین در STRING و شناسایی ژن‌های هاب می‌باشد.

Figure 1. Flowchart of the gene expression analysis pipeline associated with subfertility in cows, including GEO data retrieval, quality control and normalization, identification of differentially expressed genes using limma, functional enrichment analysis in DAVID, construction of the protein-protein interaction network in STRING, and hub gene identification

نتایج و بحث

برای ارزیابی تفاوت‌های بیان ژنی بین گاوهای بارور و کم‌بارور، مجموعه داده GSE107741 مورد تحلیل قرار گرفت. بررسی توزیع مقادیر بیان ژن پس از نرمال‌سازی با استفاده از نمودار جعبه‌ای (شکل ۲- A) نشان داد که داده‌ها از پراکندگی یکنواختی در میان تمام نمونه‌ها برخوردار هستند؛ این امر بیانگر حذف موفقیت‌آمیز سوگیری‌های فنی و مناسب بودن داده‌ها برای تحلیل‌های

پایین‌دستی است. در ادامه، به منظور تجسم الگوی کلی بیان ژن و ارزیابی شباهت بیولوژیکی بین نمونه‌ها، از الگوریتم UMAP استفاده شد (شکل ۲-B). نتایج این تحلیل نشان داد که نمونه‌های بارور و کم‌بارور به‌طور کاملاً مجزا از یکدیگر خوشه‌بندی می‌شوند. این تفکیک واضح در فضای دوبعدی UMAP نشان‌دهنده تفاوت‌های بنیادی در پروفایل ترنسکریپتومی دو گروه بر اساس وضعیت باروری است و تایید می‌کند که تفاوت‌های مولکولی معناداری میان گاوهای بارور و کم‌بارور وجود دارد.

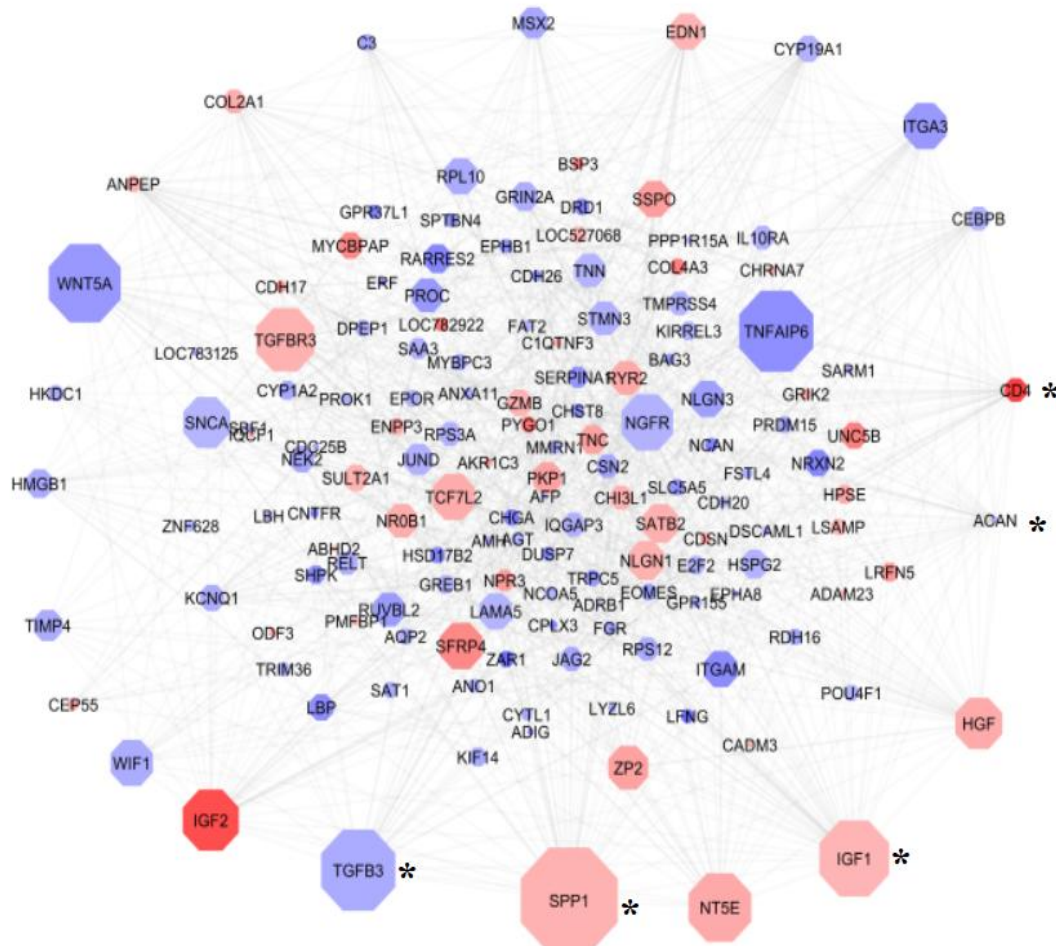


شکل ۲. کنترل کیفیت داده‌ها و تفکیک نمونه‌ها. (A) نمودار جعبه‌ای مقادیر بیان ژن‌های نرمال‌سازی شده در مقیاس $\log_2$. توزیع یکنواخت میانه‌ها در بین تمامی نمونه‌ها (۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم‌بارور)، نشان‌دهنده حذف موفقیت‌آمیز سوگیری‌های فنی و کیفیت بالای نرمال‌سازی داده‌ها است. (B) نمودار UMAP که بر اساس پروفایل ترنسکریپتومی کل، نمونه‌ها را در فضای دوبعدی نمایش می‌دهد. تفکیک کامل و خوشه‌بندی مجزای گروه‌های بارور و کم‌بارور نشان‌دهنده تفاوت بیولوژیکی معنادار در بیان ژن‌های این دو گروه است. (محورها بدون بُعد بوده و نمایان‌گر فواصل توپولوژیک بین نمونه‌ها هستند)

Figure 2. Quality control of data and separation of samples; (A) Boxplot of $\log_2$ transformed normalized gene expression values. The consistent distribution of medians across all samples (Six fertile and five subfertile cows) confirms effective normalization and the removal of technical biases. (B) UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) plot based on global transcriptomic profiles. The distinct clustering and clear separation between fertile and subfertile groups validate the significant biological variation associated with fertility status. (The axes are dimensionless, representing relative topological distances between samples)

بر اساس مقایسه ۶ نمونه بارور و ۵ نمونه کم‌بارور، در مجموع ۷۱۵ ژن با بیان افتراقی معنی‌دار شناسایی شد که از میان آن‌ها ۵۰۲ ژن کاهش بیان و ۲۱۳ ژن افزایش بیان داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات بیان ژنی قابل توجهی در سطح سلولی میان دو گروه وجود دارد که می‌تواند نقش مهمی در بروز کم‌باروری داشته باشد و بستر مناسبی برای شناسایی مسیرهای زیستی و شبکه‌های تنظیمی دخیل در این پدیده فراهم می‌کند. در مرحله بعد، ژن‌های با بیان افتراقی برای تحلیل عملکردی به پایگاه DAVID معرفی شدند. بر اساس غنی‌سازی GO و مسیرهای مرتبط، در مجموع ۱۵۴ ژن مرتبط با باروری شناسایی شد. این ژن‌ها عمدتاً در فرآیندهایی مانند تنظیم تولیدمثل، رشد فولیکولی، پاسخ‌های هورمونی و مسیرهای سیگنالینگ تنظیم‌کننده باروری نقش

داشتند که اهمیت آنها در تفاوت‌های فیزیولوژیکی میان گروه‌های بارور و کم‌بارور را تأیید می‌کند. پس از شناسایی ژن‌های مرتبط، داده‌ها به پایگاه STRING معرفی و شبکه تعاملات پروتئینی ساخته شد. شبکه حاصل شامل تعداد زیادی ژن و اتصالات بین آنها بود که ساختار پیچیده‌ای از تعاملات مولکولی را نشان می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۳. شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های مرتبط با باروری در گاوهای کم‌بارور. ژن‌های با بیان افزایش‌یافته و کاهش‌یافته به ترتیب با طیف رنگ‌های قرمز و آبی نمایش داده شده‌اند. گره‌های بزرگ‌تر نشان‌دهنده ژن‌هایی با درجه اتصال بالاتر هستند و ژن‌هایی که بالاترین میزان تکرار را در میان شاخص‌های مرکزیت (Degree، MNC، DMNC و MCC) داشتند، به عنوان ژن‌های هاب نهایی با علامت ستاره (*) مشخص شده‌اند.

Figure 3. Protein-protein interaction (PPI) network of genes associated with fertility in subfertile cows. Up-regulated and down-regulated genes are illustrated in red and blue spectrum, respectively. Nodes with larger sizes represent genes with higher connectivity degrees. Genes that showed the highest occurrence across the centrality measures (Degree, MNC, DMNC, and MCC) are indicated by an asterisk (*) and considered the final hub genes

برای شناسایی ژن‌های کلیدی در شبکه، چهار شاخص مرکزیت شامل Degree، MNC، DMNC و MCC محاسبه شد. از هر شاخص، ۱۰ ژن برتر بر اساس مقدار امتیاز مربوطه انتخاب و موقعیت آن‌ها در شبکه در نواحی پیرامونی نمایش داده شد. در

ادامه، ژن‌هایی که بیشترین میزان تکرار را در میان شاخص‌های مختلف نشان دادند، به عنوان ژن‌های هاب با نقش کلیدی در مسیرهای بیولوژیکی مهم شناسایی شدند. این ژن‌ها در شبکه با علامت ستاره مشخص شده و فهرست آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. برای بررسی دقیق‌تر اهمیت عملکردی، در بخش بعدی تمرکز بر ژن‌هایی خواهد بود که بالاترین میزان تکرار را در بین شاخص‌های مرکزیت داشته و شواهد عملکردی بیشتری در مطالعات پیشین برای آن‌ها گزارش شده است.

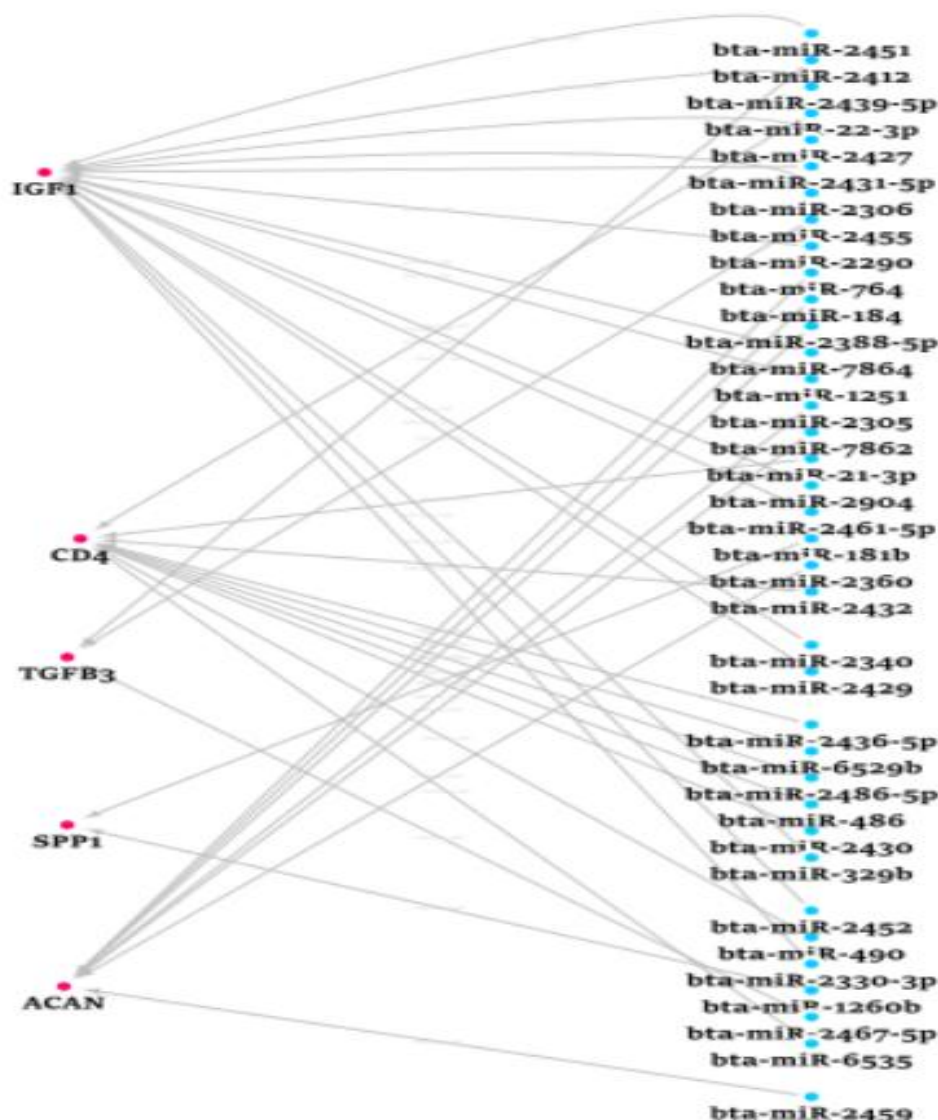
جدول ۱. ژن‌های هاب شناسایی‌شده بر اساس شاخص‌های مرکزیت Degree، MNC، DMNC، MCC و PPI شبکه ژن‌های مرتبط با باروری

Table 1. Hub genes identified based on the centrality indices Degree, MNC, DMNC, and MCC in the PPI network of fertility-related genes

MCC	RANK	FC	DMNC	RANK	FC	DEGREE	RANK	FC	MNC	RANK	FC
CD4*	1	3.6	HKDC1	1	-1.5	CD4*	1	3.6	CD4*	1	3.6
HGF	2	1.6	HMGB1	2	-1.5	SPP1*	2	1.4	SPP1*	2	1.4
NT5E	3	1.6	TIMP4	3	-1.5	ACAN*	3	-1.7	ACAN*	3	-1.7
SPP1*	4	1.4	CEP55	4	1.8	EDN1	4	1.4	HGF	4	1.6
ACAN*	5	-1.7	NT5E	5	1.6	IGF2	5	3.3	EDN1	5	1.4
TGFB3*	6	-1.6	WIF1	6	-1.5	HGF	5	1.6	IGF2	5	3.3
IGF1*	7	1.4	WNT5A	7	-1.9	TGFB3*	7	-1.6	TGFB3*	7	-1.6
COL2A1	8	1.5	C3	8	-1.6	CYP19A1	7	-1.4	CYP19A1	7	-1.4
WNT5A	9	-1.9	MSX2	9	-1.6	IGF1*	9	1.4	IGF1*	9	1.4
ANPEP	10	1.5	EDN1	10	1.4	ITGA3	10	-1.9	CEBPB	10	-1.4

ژن‌هایی که در چندین شاخص مرکزیت رتبه بالایی داشتند و بیشترین میزان تکرار را نشان دادند، به عنوان ژن‌های هاب نهایی در نظر گرفته شده و با علامت ستاره () مشخص شده‌اند.

برای بررسی سازوکارهای تنظیمی پسارونویسی ژن‌های هاب، شبکه تنظیمی miRNA-ژن ترسیم و تحلیل شد. مطابق با شکل (۴)، چندین ژن هاب از جمله IGF1، CD4، ACAN، SPP1 و TGFB3 توسط تعداد قابل توجهی miRNA هدف‌گیری می‌شوند که نشان‌دهنده دخالت گسترده تنظیم miRNAها در کنترل بیان این ژن‌ها است. در میان ژن‌های مورد بررسی، ژن IGF1 بیشترین تعداد miRNAهای متصل را به خود اختصاص داده و به عنوان مرکزی‌ترین گره در شبکه ظاهر شده است. همچنین ژن CD4 نیز تعامل‌های گسترده‌ای با miRNAهای مختلف نشان می‌دهد که بیانگر نقش تنظیمی قابل توجه آن در این شبکه است. در مقابل، ژن‌های ACAN، SPP1 و TGFB3 اگرچه با تعداد کمتری از miRNAها هدف‌گیری شده‌اند، اما به دلیل جایگاه هاب‌گونه خود می‌توانند در تنظیم مسیرهای زیستی مرتبط نقش مؤثری ایفا کنند. در مجموع، ساختار شبکه نشان می‌دهد که تنظیم پسارونویسی ژن‌های هاب از طریق miRNAها می‌تواند یکی از سازوکارهای کلیدی مؤثر در فرآیندهای مولکولی مرتبط با وضعیت باروری باشد.



شکل ۴- شبکه تنظیمی ژن miRNA- مربوط به ژن های هاب. گره های قرمز نشان دهنده ژن های هاب و گره های آبی نمایانگر miRNA های شناسایی شده هستند. یال ها بیانگر تعاملات ژن miRNA- بوده و بر اساس miRNA های مشترک پیش بینی شده در پایگاه های miRWalk و TargetScan ترسیم شده اند

Figure 4. miRNA-gene regulatory network associated with the hub genes. Red nodes represent hub genes, and blue nodes represent the identified miRNAs. Edges indicate miRNA-gene interactions and were constructed based on miRNAs commonly predicted by the miRWalk and TargetScan databases

برای بررسی سازوکارهای تنظیمی در سطح رونویسی ژن های هدف، تحلیل شناسایی موتیف های توالی DNA انجام شد، زیرا این موتیف ها به عنوان نواحی اتصال فاکتورهای رونویسی نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن ایفا می کنند. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، چندین موتیف تنظیمی شامل CTCF, ZNF454, PBX3 و PATZ1 در ژن های مورد بررسی شناسایی شدند. بررسی توالی این موتیف ها الگوهای مشخصی از بازهای غالب را نشان می دهد که بیانگر تمایل اتصال اختصاصی فاکتورهای رونویسی به این نواحی است. افزون بر این، پیش بینی های عملکردی مبتنی بر ژن های هدف مرتبط با هر

موتیف، نقش آن‌ها را در فرآیندهای زیستی متنوعی از جمله تنظیم رونویسی وابسته به DNA، ترجمه، سازمان‌دهی ساختارهای سلولی و مسیرهای متابولیکی نشان می‌دهد. مشاهده موتیف‌های مشترک میان چندین ژن هدف حاکی از وجود الگوهای تنظیم رونویسی مشترک است که می‌تواند به هماهنگی بیان ژن‌ها در مسیرهای زیستی مختلف منجر شود. به منظور بررسی الگوی تنظیمی چندلایه ژن‌های مرتبط با کم‌باروری در گاو، یک شبکه تنظیمی یکپارچه miRNA-ژن-فاکتور رونویسی ترسیم شد (شکل ۵). این شبکه شامل ۴۷ گره و ۵۱ یال یکتا بود که از این تعداد، ۵ گره به ژن‌ها، ۳۷ گره به miRNA ها و ۵ گره به موتیف‌های تنظیم‌کننده اختصاص داشت. نتایج نشان داد تمامی ژن‌های حاضر در شبکه به‌طور هم‌زمان تحت تنظیم پسارونویسی توسط miRNA ها و تنظیم رونویسی توسط موتیف‌های تنظیم‌کننده قرار دارند که بیانگر وجود یک سازوکار تنظیمی چندسطحی در کنترل بیان این ژن‌ها است. تحلیل توپولوژیک شبکه حاکی از آن بود که ژن‌های IGF1، ACAN، TGFB3، SPP1 و CD4 به‌عنوان گره‌های مرکزی شناسایی شدند. در این میان، ژن IGF1 بیشترین تعداد اتصالات را به خود اختصاص داد و به‌عنوان هاب اصلی شبکه شناخته شد؛ به‌طوری‌که توسط تعداد زیادی miRNA تنظیم شده و تحت کنترل رونویسی موتیف PATZ1 قرار داشت. در ادامه ژن CD4 به‌عنوان یکی از گره‌های مرکزی شبکه، تحت تنظیم گسترده پسارونویسی توسط چندین miRNA قرار داشته و تنظیم رونویسی آن نیز با حضور موتیف PBX3 همراه بود. ژن SPP1 نیز تحت تنظیم miRNA های miR-181b و miR-1260b قرار داشته و تنظیم رونویسی آن با موتیف ZNF454 مشاهده شد، همچنین، ژن TGFB3 به‌طور هم‌زمان توسط miRNA های اختصاصی و موتیف FEZF2 تنظیم می‌شود که نشان‌دهنده نقش مهم تنظیم هماهنگ رونویسی و پسارونویسی در کنترل بیان این ژن است. در نهایت، ژن ACAN که در بخش پایینی شبکه قرار دارد، تحت تنظیم چندین miRNA و موتیف CTCF قرار داشته و پیچیدگی بالای الگوی تنظیمی این ژن را منعکس می‌کند. به‌طور کلی، تجمع miRNA ها و موتیف‌های تنظیم‌کننده پیرامون ژن‌های کلیدی شبکه نشان‌دهنده وجود یک سازوکار تنظیمی همگرا و چندسطحی است که احتمالاً نقش مهمی در تنظیم مسیرهای زیستی مرتبط با رشد، تمایز سلولی، پاسخ ایمنی و فرآیندهای تولیدمثلی در گاو دارد. نتایج تحلیل شبکه تنظیمی miRNA-ژن-فاکتورهای رونویسی نشان داد که ژن‌های هاب شناسایی شده در این مطالعه به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مرکزی مسیرهای تولید مثلی، ایمنی و رشد سلولی عمل می‌کنند و اختلال در تنظیم آن‌ها می‌تواند با بروز کم‌باروری در گاو مرتبط باشد. در ادامه، نقش زیستی این ژن‌ها در چارچوب شبکه‌های تنظیمی مورد بحث قرار می‌گیرد. ژن IGF1 به‌عنوان ژن هاب اصلی شبکه شناسایی شد که نقش اساسی در باروری گاو‌ها دارد و با تنظیم رشد فولیکول‌ها، کیفیت اووسیت و زنده‌مانی جنین در ماده‌ها عمل می‌کند (Yazdanpanah et al., 2013). در نرها، پلی‌مورفیسم‌های این ژن با سطح IGF1 خون و دور بیضه، شاخص مهم باروری، مرتبط است (Fortes et al. 2012). علاوه بر این، IGF1 به دلیل نقش در رشد و متابولیسم می‌تواند به طور غیرمستقیم عملکرد تولید مثلی را تحت تأثیر قرار دهد (Rotwein 2017). ارتباط این ژن با وزن تولد، وزن از شیرگیری و بلوغ جنسی نشان می‌دهد که بر رشد و بلوغ جنسی اثرگذار است و حتی گزارش شده است که یک جهش در آن با کاهش سن اولین زایش همراه است (Begenova et al., 2025). در مطالعه حاضر، ژن IGF1 با افزایش بیان متوسط (fold change = 1.4) مشاهده شد که می‌تواند بیانگر فعال شدن مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به IGF و فراهم شدن محیط متابولیکی و هورمونی مساعد برای رشد فولیکولی، بلوغ جنسی و بقای جنین در شرایط مورد بررسی باشد.

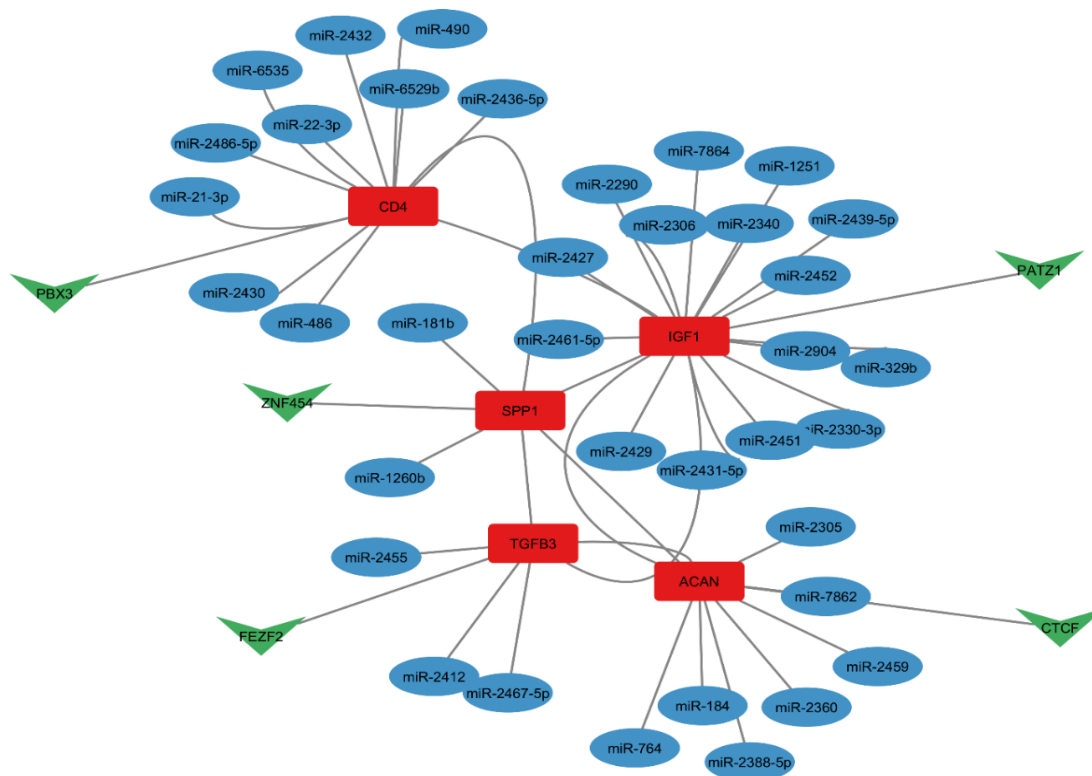
جدول ۲. موتیف‌های تنظیمی شناسایی شده در ژن‌های هدف و پیش‌بینی‌های عملکردی مرتبط با آن‌ها. ستون Motif شامل شناسه پایگاه داده JASPAR و نام فاکتور رونویسی مرتبط با هر موتیف است. ستون Logo الگوی توالی غالب هر موتیف را نمایش می‌دهد. ستون Predictions تعداد پیش‌بینی‌های عملکردی مرتبط با هر موتیف را نشان می‌دهد. ستون Top 5 specific predictions پنج پیش‌بینی برتر Gene Ontology را شامل مؤلفه سلولی (CC)، فرآیند بیولوژیکی (BP) و عملکرد مولکولی (MF) ارائه می‌کند. ستون Gene symbol نماد ژن‌های هدف مرتبط با هر موتیف را نشان می‌دهد

Table 2. Identified regulatory motifs in target genes and their associated functional predictions. The Motif column includes the JASPAR database ID and the name of the transcription factor associated with each motif. The Logo column displays the consensus sequence pattern for each motif. The Predictions column indicates the number of functional predictions associated with each motif. The Top 5 specific predictions column presents the five most significant Gene Ontology predictions, including Cellular Component (CC), Biological Process (BP), and Molecular Function (MF). The Gene symbol column lists the symbols of the target genes associated with each motif

Motif	Logo	Predictions	Top 5 specific predictions	Gene symbol
MA1114.2(PBX3)		3	CC intermediate filament MF structural constituent of cytoskeleton	CD4
MA1712.2(ZNF454)		42	CC nucleus BP translation MF structural constituent of ribosome CC ribosome MF 6-phosphofructokinase activity	SPP1
MA1929.2(CTCF)		12	BP generation of precursor metabolites and energy BP protein transport BP alcohol metabolic process BP small GTPase mediated signal transduction MF GTP binding	ACAN
MA1961.2(PATZ1)		38	CC nucleus BP regulation of transcription, DNA-dependent MF sequence-specific DNA binding MF transcription factor activity CC cytoplasmic part	IGF1
MA2341.1(FEZF2)		11	CC intermediate filament MF structural constituent of cytoskeleton BP glycolysis BP behavior	TGFB3

در سطح تنظیم رونویسی، فاکتور رونویسی PATZ1 به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های بالقوه ژن هاب IGF1 است که در شبکه تنظیمی شناسایی شد. PATZ1 یک فاکتور رونویسی دخیل در تنظیم چرخه سلولی و پاسخ به آسیب DNA است. در موش‌ها، حذف PATZ1 سبب اختلال شدید در اسپرماتوژنز، افزایش آپوپتوز سلول‌های زایا و ناباروری نر می‌شود و بیان آن در سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی نقش مستقیم آن را در گامتوژنز موش‌های نر نشان می‌دهد (Fedele et al., 2008). با توجه به حفاظت تکاملی مسیرهای اسپرماتوژنز در پستانداران، این یافته‌ها احتمال می‌دهد که PATZ1 ممکن است در گاو نیز در تنظیم مسیرهای مرتبط با باروری نقش داشته باشد، هرچند این موضوع نیازمند بررسی تجربی است. علاوه بر این، نقش PATZ1 در حفظ چندتوانی سلول‌های بنیادی و رشد اولیه جنین از طریق تنظیم ژن‌های Oct4 و Nanog حاکی از مشارکت بالقوه آن در کیفیت جنین و موفقیت تولید مثلی در انسان است (Huang et al., 2024). از دیدگاه شبکه‌ای، قرارگیری IGF1 در مرکز شبکه تنظیمی می‌تواند بیانگر نقش بالقوه آن به عنوان یک گره واسط میان مسیرهای متابولیکی، تکوینی و هورمونی باشد. هم‌پوشانی تنظیمی IGF1 با سایر ژن‌های هاب نظیر SPP1، TGFB3 و ACAN بیانگر مشارکت آن‌ها در یک ماژول تنظیمی مشترک است که

فرایندهایی مانند رشد فولیکولی، بازسازی ماتریکس خارج سلولی، تنظیم پاسخ‌های سلولی و بقای جنین را به صورت هماهنگ کنترل می‌کند.



شکل ۵. شبکه تنظیمی یکپارچه miRNA - ژن - فاکتور رونویسی. این شبکه روابط تنظیمی میان ژن‌ها، miRNAها و فاکتورهای رونویسی را به صورت یکپارچه نمایش می‌دهد. در این شبکه، گره‌های قرمز نمایانگر ژن‌ها، گره‌های آبی نمایانگر miRNAها و گره‌های سبز نشان‌دهنده موتیف‌های تنظیم‌کننده رونویسی هستند. یال‌ها نوع ارتباط بین گره‌ها را مشخص می‌کنند و شامل تنظیم پسارونویسی miRNA - ژن (regulates)، تنظیم رونویسی موتیف-ژن (transcriptional regulation) و تعامل ژن-ژن (interacts) می‌باشند که بیانگر یک سازوکار تنظیمی چندلایه در سطح رونویسی و پسارونویسی است.

Figure 5. Integrated miRNA-gene-transcription factor regulatory network. This network illustrates the regulatory relationships among genes, miRNAs, and transcription factors in an integrated framework. In this network, red nodes represent genes, blue nodes represent miRNAs, and green nodes indicate transcriptional regulatory motifs. Edges specify the type of interaction between nodes, including post-transcriptional miRNA-gene regulation (regulates), motif-gene transcriptional regulation (transcriptional regulation), and gene-gene interactions (interacts), reflecting a multilayered regulatory mechanism at both the transcriptional and post-transcriptional levels

هدف‌گیری IGF1 توسط چندین miRNA در شبکه حاضر، بیانگر وجود یک سازوکار تنظیم دقیق برای کنترل سطح بیان این ژن است؛ سازوکاری که می‌تواند امکان تنظیم دوز وابسته به شرایط فیزیولوژیک را فراهم آورد. چنین الگویی نشان می‌دهد که miRNAها با مهار نسبی یا تعدیلی IGF1، از نوسانات شدید در سیگنال‌دهی IGF جلوگیری کرده و پایداری عملکرد مسیرهای مرتبط با باروری را، به‌ویژه در بافت‌هایی با نیازهای متغیر متابولیکی مانند تخمدان و رحم، تضمین می‌کنند. ترکیب تنظیم رونویسی

IGF1 توسط PATZ1 و تنظیم پسارونویسی آن توسط miRNAها، وجود یک سازوکار کنترلی چندلایه را در سطح پیش‌بینی بیوانفورماتیکی پیشنهاد می‌کند که برای تأیید عملکردی نیازمند مطالعات تجربی است. این معماری تنظیمی چندسطحی می‌تواند انعطاف‌پذیری لازم برای پاسخ‌گویی IGF1 به تغییرات متابولیکی، هورمونی و محیطی را فراهم سازد و نقش آن را به‌عنوان یکی از عناصر کلیدی شبکه تنظیم باروری در گاو تقویت نماید. ژن CD4 دومین ژن هاب مورد مطالعه است که در گاو نقش بنیادی در پاسخ ایمنی سلولی ایفا می‌کند و از طریق حفظ سلامت عمومی دام، به طور غیرمستقیم می‌تواند بر کارایی تولیدمثلی تأثیرگذار باشد. سلول‌های CD4⁺ T در دفاع علیه پاتوژن‌ها و بیماری‌هایی نظیر ماستیت نقش کلیدی داشته و برای این ویژگی‌ها وراثت‌پذیری نسبتاً بالایی گزارش شده است (Denholm et al., 2017). اگرچه تاکنون ارتباط مستقیمی میان CD4 و صفات تولیدمثلی گزارش نشده است، بهبود وضعیت ایمنی و کاهش بروز بیماری‌ها می‌تواند از طریق کاهش استرس فیزیولوژیک و افزایش آمادگی متابولیکی، شرایط مساعدتری برای عملکرد تولید مثلی فراهم کند. در مطالعه حاضر، ژن CD4 با افزایش بیان قابل‌توجه (fold change = 3.6) مشاهده شد که بیانگر فعال شدن مسیرهای ایمنی مرتبط در شرایط مورد بررسی است. این افزایش بیان می‌تواند به طور بالقوه با تغییر در تنظیم پسارونویسی توسط miRNAهای هدف از جمله bta-miR-21-3p و bta-miR-22-3p که در این مطالعه به وسیله هر دو نرم‌افزار هدف‌یابی تأیید شدند مرتبط باشد. bta-miR-21-3p از طریق تنظیم اتوفاژی سلول‌های گرانولوزا، دینامیک جسم زرد و تغییرات بیان ژن طی بلوغ اووسیت، در رشد فولیکولی و عملکرد تخمدان نقش دارد (Ma et al., 2019). همچنین bta-miR-22-3p با مهار عوامل پایین‌دست فولیکول‌ژن و کاهش التهاب آندومتر و سرکوب مسیر MAPK، در بهبود رشد فولیکول، سلامت رحم و فرآیند لانه‌گزینی مؤثر گزارش شده است (Wang et al., 2024). علاوه بر این، شناسایی موتیف مرتبط با PBX3 می‌تواند بیانگر یک تعامل تنظیمی بالقوه باشد. PBX3 یک فاکتور رونویسی حاوی هومئودومین است که نقش گسترده‌ای در توسعه و حفظ ویژگی‌های سلولی دارد (Morgan and Pandha 2020). اگرچه CD4 به طور کلاسیک به عنوان یک ژن ایمنی شناخته می‌شود، نقش سیستم ایمنی در بافت‌های تولید مثلی و حفظ شرایط مناسب برای فعالیت‌های باروری، از جمله لانه‌گزینی و بقای جنین، به خوبی مستند شده است (Nilsson & Hviid, 2022) از این رو، تنظیم این ژن توسط فاکتورهای رونویسی مانند PBX3 می‌تواند به صورت غیرمستقیم بر کارایی تولید مثلی اثرگذار باشد، به ویژه با توجه به ارتباط PBX3 با تنظیم ساختارهای سلولی و اجزای اسکلت سلولی (Mok et al., 2025)، که می‌تواند بر عملکرد سلول‌های ایمنی در بافت‌های تولید مثلی تأثیر بگذارد. در مجموع، نتایج حاضر نشان می‌دهد که CD4، فراتر از نقش کلاسیک ایمنی خود، ممکن است به‌عنوان یک ژن هاب تحت کنترل چندلایه miRNAها و فاکتورهای رونویسی مانند PBX3، به‌طور غیرمستقیم و از طریق تنظیم هموستاز ایمنی در شکل‌دهی محیط تولیدمثلی نقش داشته باشد. در ادامه تحلیل شبکه تنظیمی ژن‌های هاب مرتبط با کم‌باروری، ژن SPP1 به عنوان یکی از ژن‌های هاب برجسته، به دلیل نقش چند وجهی خود در تنظیم عملکرد جسم زرد و پاسخ‌های ایمنی موضعی، بررسی شد. این ژن در جسم زرد گاو بیان می‌شود و عملکرد سلولی را در طول فرآیندهای لوتئینیزاسیون و رگرسیون جسم زرد تنظیم می‌کند و با کموتاکسی (جذب جهت‌دار) لنفوسیت‌ها و تعدیل پاسخ‌های ایمنی در این بافت مرتبط است (Poole et al., 2013). این ژن همچنین نقش مهمی در رشد و تولید مثل داشته و مرتبط با صفاتی نظیر مرده‌زایی و سخت زایی است (Chakraborty et al., 2010). در پژوهش کنونی، این ژن با افزایش بیان (fold change = 1.4) مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با بقا و عملکرد جسم زرد باشد. افزایش بیان SPP1 به طور بالقوه می‌تواند از طریق تعامل با miRNAهای تنظیمی، از جمله bta-miR-181b و bta-miR-1260b که توسط هر دو نرم‌افزار هدف‌یابی در این

مطالعه تأیید شدند بر پویایی تنظیم پسا رونویسی اثر بگذارد. به طور خاص، افزایش بیان این ژن ممکن است با کاهش مهار miRNAها همراه باشد و در نتیجه منجر به تقویت بیان SPP1 و ژن‌های پایین‌دستی مرتبط با پاسخ ایمنی، رشد اولیه جنین و لانه‌گزینی شود. bta-miR-181b با افزایش در مایع رحم طی فاز میانی لوتئال، احتمالاً در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و رشد اولیه جنین نقش دارد و حضور آن در وزیکول‌های خارج‌سلولی پلاسما و پلاسمای منی حاکی از تأثیر بالقوه بر کیفیت اسپرم و باروری است (Mazzarella et al., 2024). در مقابل، bta-miR-1260b در تلیسه‌های گوشتی با پتانسیل تولید مثلی متفاوت به طور افتراقی بیان شده و می‌تواند در تنظیم پیامدهای تولید مثلی نقش داشته باشد (Banerjee et al., 2023). علاوه بر این، بیان SPP1 با نیازهای بالای متابولیکی از قبیل متابولیسم لیپید و پاسخ‌های ایمنی مرتبط است. شناسایی یک موتیف ZNF454 در ژن SPP1 توسط مطالعه حاضر، یک مکانیسم تنظیمی بالقوه و مهم را برای بیان این ژن نشان می‌دهد. پروتئین‌های انگشت روی (Zinc Finger Proteins - ZNFs) خانواده بزرگی از عوامل رونویسی هستند که با اتصال به توالی‌های DNA خاص، بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. این تنظیم می‌تواند اختصاصی بافت و مرحله بوده و بر فرآیندهای بیولوژیکی مختلف از جمله رشد و تمایز تأثیر بگذارد (Jen & Wang, 2016). بنابراین، این یافته پیشنهاد می‌کند که ZNF454 ممکن است به عنوان یک عامل رونویسی کلیدی عمل کند که بیان SPP1 را کنترل می‌کند. هرگونه تغییر در فعالیت ZNF454 می‌تواند به طور مستقیم بر سطح SPP1 تأثیر بگذارد و در نتیجه بر فرآیندهایی که SPP1 در آنها نقش دارد، مانند چسبندگی سلولی جنین به رحم، تعاملات جنین-مادری، و توانایی دام برای پاسخگویی به نیازهای متابولیکی بالا، تأثیرگذار باشد. (Polstein Gersbach, 2012) این ارتباط کشف شده، پلی بین تنظیم ژنتیکی و عملکرد بیولوژیکی SPP1 ایجاد می‌کند و درک ما را از اینکه چگونه SPP1 به طور دقیق در دام‌ها برای باروری، به ویژه تحت شرایط متابولیکی خاص، تنظیم می‌شود، عمیق‌تر می‌سازد (Perdomo-Sabogal & Nowick, 2019). این الگوی پیش‌بینی‌شده بیانگر آن است که SPP1 ممکن است تحت کنترل چندلایه رونویسی و پسا رونویسی قرار داشته باشد و به صورت بالقوه در هماهنگی میان پاسخ‌های ایمنی، متابولیسم و فرآیندهای مرتبط با تولیدمثل نقش داشته باشد. قرارگیری ACAN در تقاطع تنظیم پسا رونویسی توسط miRNAها (bta-miR-184 و bta-miR-764) و تنظیم رونویسی توسط فاکتور CTCF، نقش این ژن را به عنوان یک نقطه اتصال کلیدی میان بازسازی ماتریکس خارج سلولی (ECM) و تنظیم اپی ژنتیکی در فرآیندهای تولیدمثلی برجسته می‌سازد. شناسایی ACAN به عنوان یکی از ژن‌های هاب در شبکه-miRNA ژن-فاکتور رونویسی نشان می‌دهد که تغییرات در بیان و کنترل آن می‌تواند پیامدهای گسترده‌ای بر پویایی ساختاری و عملکردی بافت‌های تولیدمثلی داشته باشد. در میان miRNAهای شناسایی شده، bta-miR-184 به عنوان یک تنظیم کننده مهم رشد فولیکولی و سلامت تخمدان شناخته می‌شود که از طریق فعال سازی مسیر TGF- β /SMAD3 در انتخاب فولیکول، مهار آترزی و بقای سلول‌های گرانولوزا نقش دارد (Shan et al., 2024). همچنین، بیان افتراقی آن در آگروزوم‌های داخل رحمی و ارتباط با مسیر Rap1 نقش بالقوه این miRNA را در لانه‌گزینی جنین و توسعه آندومتر نشان می‌دهد (Zhai et al., 2022). در مطالعه حاضر، ژن ACAN به عنوان یکی از اهداف bta-miR-184 شناسایی شد و کاهش بیان آن (fold change = -1.7) مشاهده گردید که می‌تواند بیانگر تنظیم پسا رونویسی فعال این ژن باشد. با توجه به نقش اساسی ACAN در سازمان دهی ECM و حفظ ویژگی‌های مکانیکی بافت‌ها (Tong et al., 2024)، کاهش بیان آن ممکن است در بازسازی بافتی مرتبط با مراحل حساس تولیدمثلی مؤثر واقع شود. علاوه بر این، bta-miR-764 نیز به عنوان یکی دیگر از miRNAهای هدف گیرنده ACAN شناسایی شد. این miRNA در اووسیت گاو بیان می‌شود و کاهش بیان آن در شرایط بلوغ *in vitro* نسبت به *in vivo* نشان می‌دهد که می‌تواند از طریق تنظیم

مسیرهایی نظیر $TGF-\beta$, $mTOR$ و متابولیسم اسیدهای آمینه، در کیفیت و بلوغ اووسیت نقش داشته باشد (Del Collado et al., 2016). در سطح تنظیم رونویسی، تحلیل موتیف‌ها حضور فاکتور رونویسی CTCF را به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی ژن هاب ACAN آشکار ساخت. فاکتور اتصال CTCF یک تنظیم‌کننده کلیدی معماری کروماتین است که از طریق سازماندهی سه بعدی ژنوم و کنترل بیان ژن، نقش مهمی در باروری ایفا می‌کند (Del Moral-Morales et al., 2023). CTCF برای تنظیم نواحی ایمپرینت شده ژنومی، از جمله جایگاه $Igf2/H19$ ، ضروری است؛ فرآیندی که برای رشد طبیعی جنین و موفقیت تولید مثل حیاتی محسوب می‌شود (Gillen & Harris, 2011). علاوه بر این، CTCF با مشارکت در ترمیم شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA از طریق نوترکیبی همولوگ، پایداری ژنومی سلول‌های زایا را حفظ می‌کند و از بروز اختلالات ژنتیکی مؤثر بر باروری جلوگیری می‌نماید (Hwang et al., 2019). همچنین، نقش CTCF در تنظیم پیرایش جایگزین رونوشت‌ها می‌تواند در کنترل بیان ژن‌های دخیل در گامتوژن و مراحل اولیه تکوین جنین مؤثر باشد (Alharbi et al., 2021). در مجموع، تنظیم چندلایه ACAN توسط miRNA های کلیدی و فاکتور معماری کروماتین CTCF، این ژن را به عنوان یک هاب شبکه‌ای معرفی می‌کند که می‌تواند هماهنگی میان بازسازی ماتریکس خارج سلولی، تنظیم اپی ژنتیکی و نیازهای دینامیک بافت‌های تولیدمثلی را تضمین نماید؛ الگویی که با سایر ژن‌های هاب شناسایی شده در این مطالعه هم‌راستا بوده و بر اهمیت شبکه‌های تنظیمی یکپارچه در حفظ باروری گاو تأکید می‌کند. در میان ژن‌های هاب شناسایی شده در شبکه تنظیمی miRNA - ژن-موتیف، $TGF\beta 3$ به عنوان یکی از اعضای کلیدی خانواده $TGF-\beta$ ، به دلیل نقش‌های گسترده در فرآیندهای تولید مثلی و تکوینی مورد توجه قرار گرفت. مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف نشان می‌دهند که این ژن در مسیرهای اساسی مرتبط با رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت و توسعه جنینی-جفتی نقش دارد، به طور مثال، $TGF\beta 3$ در گوسفند به عنوان ژن متیله شده مرتبط با پرباروری شناخته شده است (Zhang et al., 2017). YanLi et al., 2017، در خوک با بلوغ اووسیت و رشد فولیکولی ارتباط دارد (Jackowska et al., 2013)، در مرغ در تنظیم بلوغ جنسی نقش ایفا می‌کند (Chen et al., 2020) و در انسان کاهش بیان آن با محدودیت رشد جنین گزارش شده است (Nguyen et al., 2018). گرچه تاکنون شواهد مستقیمی از نقش $TGF\beta 3$ در باروری گاو گزارش نشده است، عملکردهای محافظت شده آن در گونه‌های مختلف، وجود نقش بالقوه این ژن در تنظیم مسیرهای تولیدمثلی گاو را تأکید می‌کند. در پژوهش کنونی، $TGF\beta 3$ با کاهش بیان متوسط ($\text{fold change} = -1.6$) مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده تضعیف نسبی مسیرهای سیگنال دهی وابسته به $TGF-\beta$ در شرایط مورد بررسی باشد. با توجه به نقش محوری سیگنالینگ $TGF-\beta$ در تنظیم تکثیر، تمایز و بقای سلولی در سیستم تولیدمثلی، این کاهش بیان ممکن است پیامدهای عملکردی قابل توجهی بر کیفیت گامت، رشد جنینی و برهم کنش جنین-مادر داشته باشد. چنین تغییری به‌ویژه در چارچوب یک شبکه تنظیمی یکپارچه، اهمیت بیشتری می‌یابد و نشان می‌دهد که اختلال در یک ژن هاب می‌تواند بر چندین مسیر زیستی اثرگذار باشد. شواهد حاصل از تحلیل شبکه‌ای نشان داد که کاهش بیان $TGF\beta 3$ می‌تواند، حداقل به‌طور بالقوه، تحت تأثیر تنظیم پسارونویسی توسط miRNA ها قرار گیرد. در این راستا، bta-miR-2412 به عنوان یکی از miRNA های هدف‌گیرنده $TGF\beta 3$ در مطالعه حاضر شناسایی شد. این miRNA پیش‌تر در اسپرم گاو هولشتاین بررسی شده و افزایش بیان آن در گاوهای نر با اسپرم طبیعی (NS) در مقایسه با گاوهای مبتلا به آستنوزواسپرمی (AS) گزارش شده است. علاوه بر این، در نمونه‌های AS، سطح bta-miR-2412 با یکپارچگی غشای اسپرم، شکست DNA و آپوپتوز همبستگی معناداری نشان داده است؛ امری که بیانگر نقش بالقوه این miRNA در تنظیم فرآیندهای مرتبط با بقای سلولی و تحرک اسپرم است (Taravat et al., 2024). هم‌زمانی شناسایی miRNA های مرتبط با باروری و کاهش

بیان TGFB3، الگوی از یک کنترل دوز-وابسته را پیشنهاد می‌کند که می‌تواند شدت سیگنال‌های TGF- β را متناسب با وضعیت فیزیولوژیک سیستم تولیدمثلی تنظیم نماید. از دیدگاه شبکه تنظیمی miRNA - ژن-TF، شناسایی TGFB3 به‌عنوان یک ژن هاب نشان می‌دهد که این ژن می‌تواند به‌عنوان یک گره مرکزی در اتصال مسیرهای تکوینی، تنظیم رشد بافتی و کنترل بقای سلولی عمل کند. تنظیم هم‌زمان این ژن در سطح پسا رونویسی توسط miRNAهای مرتبط با کیفیت اسپرم و در سطح رونویسی توسط فاکتورهای تنظیم کننده، بیانگر وجود یک مکانیسم چندلایه است که امکان تنظیم دقیق سیگنالینگ TGF- β را در مراحل حساس تولیدمثلی فراهم می‌سازد. در سطح تنظیم رونویسی، فاکتور رونویسی FEZF2 به‌عنوان یکی از عناصر تنظیمی در شبکه شناسایی شد، FEZF2 یک فاکتور رونویسی حفاظت شده است که نقش اساسی در تکوین مغز پیشین و تمایز نورونی در مراحل اولیه جنین‌زایی ایفا می‌کند (Clare et al., 2017). اگرچه تاکنون نقش مستقیمی برای FEZF2 در باروری گاو گزارش نشده است، تکوین مناسب مغز پیشین برای تنظیم عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد که کنترل ترشح هورمون‌های تولیدمثلی را بر عهده دارد، ضروری محسوب می‌شود (Clare et al., 2017). همچنین، بیان FEZF2 در مراحل اولیه رشد جنین و نقش آن در برنامه‌ریزی تمایزی سلول‌ها می‌تواند با کیفیت جنین و بقای جنینی، که از عوامل تعیین کننده موفقیت باروری در گاو هستند، ارتباط داشته باشد (Wang et al., 2011). از این منظر، حضور موتیف مربوط به فاکتور رونویسی FEZF در ناحیه پروموتری TGFB3 می‌تواند نشان دهنده یک تعامل تنظیمی بالقوه میان این دو ژن باشد. با این حال، از آنجا که این نتیجه بر اساس پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی حاصل شده است، وجود چنین ارتباطی در گاو نیازمند تأیید در مطالعات تجربی آینده است. در مجموع، TGFB3 به‌عنوان یک ژن هاب در شبکه تنظیمی miRNA - ژن-موتیف، تحت کنترل هم‌زمان سازوکارهای پسا رونویسی و رونویسی قرار دارد و می‌تواند نقش هماهنگ کننده‌ای در تنظیم مسیرهای تکوینی، بقای سلولی و سیگنالینگ وابسته به TGF- β ایفا نماید. این الگوی تنظیمی، مشابه با ژن‌های هاب ACAN، IGF1، SPP1 و CD4، بر اهمیت شبکه‌های تنظیمی چندلایه در حفظ عملکرد طبیعی سیستم تولیدمثلی گاو تأکید می‌کند. در نهایت، ژن‌های هاب شناسایی شده در این شبکه، از طریق تعامل پیچیده مسیرهای ایمنی، متابولیسمی و تکوینی، می‌توانند در تنظیم فرآیندهای مرتبط با باروری نقش داشته باشند و می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه یا اهداف اصلاح نژادی در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: کم‌باروری در گاو حاصل برهم‌کنش پیچیده و چندلایه میان ژن‌ها، miRNAها و فاکتورهای رونویسی است که به‌صورت هماهنگ فرآیندهای کلیدی تولیدمثلی، از جمله رشد فولیکولی، کیفیت اووسیت، هموستاز ایمنی بافت‌های تولیدمثلی، سلامت رحم و لانه‌گزینی جنین را تنظیم می‌کنند. نتایج این پژوهش، با بهره‌گیری از یک رویکرد یکپارچه مبتنی بر شبکه، ژن‌های هاب مهمی شامل IGF1، CD4، SPP1، TGFB3 و ACAN را شناسایی کرد که در مرکز شبکه‌های تنظیمی miRNA - ژن-TF قرار دارند و از طریق سازوکارهای رونویسی و پسا رونویسی به‌طور دقیق کنترل می‌شوند. تحلیل تنظیم پسا رونویسی نشان داد که این ژن‌های هاب تحت هدفگیری miRNAهایی قرار دارند که پیش‌تر ارتباط آن‌ها با کیفیت گامت، پاسخ‌های ایمنی، پذیرش اندومتر، لانه‌گزینی و بقای جنین گزارش شده است؛ الگوی که بیانگر وجود سازوکارهای کنترل دوز وابسته برای تنظیم شدت و پایداری سیگنال‌های زیستی در شرایط فیزیولوژیک مختلف است. علاوه بر این، شناسایی فاکتورهای رونویسی کلیدی نظیر CTCF، FEZF2، PATZ1، PBX3 و ZNF454 بر وجود یک لایه تنظیمی بالادستی تأکید می‌کند که از طریق سازمان‌دهی معماری کروماتین، تنظیم برنامه‌های تکوینی اولیه و یکپارچه‌سازی مسیرهای متابولیسمی و ایمنی، به حفظ تعادل عملکرد سیستم تولیدمثلی کمک می‌نماید. در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که کم‌باروری گاو نه نتیجه تغییر در یک ژن

منفرد، بلکه پیامد اختلال در شبکه‌های تنظیمی چندلایه، پویا و به هم پیوسته است. چارچوب شبکه‌ای ارائه شده در این مطالعه می‌تواند مبنایی ارزشمند برای درک عمیق‌تر سازوکارهای مولکولی کم‌باروری، شناسایی نشانگرهای زیستی قابل اعتماد و توسعه راهبردهای به‌نژادی و مدیریتی هدفمند در جهت بهبود کارایی تولیدمثلی گاو فراهم سازد.

سپاسگزاری: نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از دانشگاه جیرفت به دلیل حمایت مالی از این طرح پژوهشی با شماره گرنت ۳۱۲۲۷۲-۰۴-۲۸۱۲ اعلام می‌کنند. این حمایت زمینه انجام و تکمیل موفق این پژوهش را فراهم ساخت.

References

- Alharbi, A. B., Schmitz, U., Bailey, C. G., & Rasko, J. E. (2021). CTCF as a regulator of alternative splicing: New tricks for an old player. *Nucleic Acids Research*, 49(14), 7825–7838. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab520>
- Amorim, S. T., Stafuzza, N. B., Cardona Cifuentes, D., Moraes, J. G., Roqueto dos Reis, B., Messmann, R., & Baldi, F. (2025). Genomic study for pregnancy loss in Brahman cattle. *Journal of Animal Science*, 103, Article skaf326. <https://doi.org/10.1093/jas/skaf326>
- Asadpour, R., & Mofidi Chelan, E. (2022). Using microRNAs as molecular biomarkers for the evaluation of male infertility. *Andrologia*, 54(2), Article e14298. <https://doi.org/10.1111/and.14298>
- Banerjee, P., Diniz, W. J., Rodning, S. P., & Dyce, P. W. (2023). miRNA expression profiles of peripheral white blood cells from beef heifers with varying reproductive potential. *Frontiers in Genetics*, 14, Article 1174145. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1174145>
- Begenova, A., Bissengaliyev, R., Kulmagambetov, T., Nurgulsim, K., Bekenova, A., Otepova, G., & Akhatayeva, Z. (2025). Molecular markers associated with growth, meat, and carcass traits in sheep: A review. *Animal Biotechnology*, 36(1), Article 2526458. <https://doi.org/10.1080/10495398.2025.2526458>
- Bragança, L. G., & Zangirolamo, A. F. (2018). Strategies for increasing fertility in high productivity dairy herds. *Animal Reproduction*, 15(3), 256. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0079>
- Chakraborty, D., Sharma, A., Tantia, M. S., Singh, A., & Yathish, H. M. (2010). Role of secreted phosphoprotein 1 (*spp1*) gene in bovines: A review. *Agricultural Reviews*, 31(3), 184–193.
- Chen, B., Liang, G., Zhu, X., Tan, Y., Xu, J., Wu, H., & Liu, S. (2020). Gene expression profiling in ovaries and association analyses reveal *HEP21* as a candidate gene for sexual maturity in chickens. *Animals*, 10(2), Article 181. <https://doi.org/10.3390/ani10020181>
- Clare, A. J., Wicky, H. E., Empson, R. M., & Hughes, S. M. (2017). RNA-sequencing analysis reveals a regulatory role for transcription factor Fezf2 in the mature motor cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, Article 283. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00283>
- Del Collado, M. B., Silveira, J. C. D., De Bem, T. H. C., Oliveira, M. D. L. F., Alves, B. M. D. S. M., Castro Netto, A. D., ... & Perecin, F. (2016). In vitro maturation of bovine oocytes alters expression of miRNAs. *Animal Reproduction*, 13(3), 475. <https://doi.org/10.3390/ijms17030396>
- Del Moral-Morales, A., Salgado-Albarrán, M., Sánchez-Pérez, Y., Wenke, N. K., Baumbach, J.,

- & Soto-Reyes, E. (2023). CTCF and its multi-partner network for chromatin regulation. *Cells*, 12(10), Article 1357. <https://doi.org/10.3390/cells12101357>
- Denholm, S. J., McNeilly, T. N., Banos, G., Coffey, M. P., Russell, G. C., Bagnall, A., & Wall, E. (2017). Estimating genetic and phenotypic parameters of cellular immune-associated traits in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2850–2862. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11679>
- Fedele, M., Franco, R., Salvatore, G., Paronetto, M. P., Barbagallo, F., Pero, R., & Chieffi, P. (2008). *PATZ1* gene has a critical role in the spermatogenesis and testicular tumours. *The Journal of Pathology*, 215(1), 39–47. <https://doi.org/10.1002/path.2323>
- Fortes, M. R., Reverter, A., Hawken, R. J., Bolormaa, S., & Lehnert, S. A. (2012). Candidate genes associated with testicular development, sperm quality, and hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in Brahman bulls. *Biology of Reproduction*, 87(3), Article 58. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101089>
- Gillen, A. E., & Harris, A. (2011). The role of CTCF in coordinating the expression of single gene loci. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(5), 489–494. <https://doi.org/10.1139/o11-040>
- Huang, M., Liao, X., Wang, X., Qian, Y., Zhang, W., Chen, G., & Wu, Q. (2024). POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1 (*PATZ1*) suppresses differentiation and regulates metabolism in human embryonic stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, 20(4), 1142. <https://doi.org/10.7150/ijbs.83927>
- Hwang, S. Y., Kang, M. A., Baik, C. J., Lee, Y., Hang, N. T., Kim, B. G., & Lee, J. S. (2019). CTCF cooperates with CtIP to drive homologous recombination repair of double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9160–9179. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz639>
- Jackowska, M., Kempisty, B., Woźna, M., Piotrowska, H., Antosik, P., Zawierucha, P., & Brüssow, K. P. (2013). Differential expression of *GDF9*, *TGFB1*, *TGFB2* and *TGFB3* in porcine oocytes isolated from follicles of different size before and after culture in vitro. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61(1), 99–115. <https://doi.org/10.1556/avet.2012.061>
- Jamwal, S., Jena, M. K., Tyagi, N., Kancharla, S., Kolli, P., Mandadapu, G., & Mohanty, A. K. (2023). Proteomic approaches to unravel the molecular dynamics of early pregnancy in farm animals: An in-depth review. *Journal of Developmental Biology*, 12(1), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jdb12010002>
- Jen, J., & Wang, Y. C. (2016). Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), Article 53. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>
- Lenhard, B., Sandelin, A., & Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: Emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 233–245. <https://doi.org/10.1038/nrg3163>
- Luecke, S. M., Webb, E. M., Dahlen, C. R., Reynolds, L. P., & Amat, S. (2022). Seminal and vagino-uterine microbiome and their individual and interactive effects on cattle fertility. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 1029128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1029128>
- Ma, L., Zheng, Y., Tang, X., Gao, H., Liu, N., Gao, Y., ... & Jiang, Z. (2019). miR-21-3p inhibits autophagy of bovine granulosa cells by targeting VEGFA via PI3K/AKT signaling.

- Reproduction*, 158(5), 441–452. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0285>
- Matsuno, Y., & Imakawa, K. (2025). Biological aging and uterine fibrosis in cattle: Reproductive trade-offs from enhanced productivity. *Cells*, 14(13), Article 955. <https://doi.org/10.3390/cells14130955>
- Mazzarella, R., Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Hamdi, M., González, E. M., da Silveira, J. C., & Rizos, D. (2024). Extracellular vesicles-coupled miRNAs from oviduct and uterus modulate signaling pathways related to lipid metabolism and bovine early embryo development. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), Article 51. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01035-2>
- McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 25(6), 765–771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp053>
- Mok, C. H., Hu, D., Losa, M., Risolino, M., Selleri, L., & Marcucio, R. S. (2025). PBX1 and PBX3 transcription factors regulate SHH expression in the frontonasal ectodermal zone through complementary mechanisms. *PLoS Genetics*, 21(5), Article e1011315. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011315>
- Morgan, R., & Pandha, H. S. (2020). PBX3 in cancer. *Cancers*, 12(2), Article 431. <https://doi.org/10.3390/cancers12020431>
- Nejad, F. M., Mohammadabadi, M., Roudbari, Z., Gorji, A. E., & Sadkowski, T. (2024). Network visualization of genes involved in skeletal muscle myogenesis in livestock animals. *BMC Genomics*, 25(1), Article 294. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10196-3>
- Nguyen, T. P., Yong, H. E., Chollangi, T., Brennecke, S. P., Fisher, S. J., Wallace, E. M., & Murthi, P. (2018). Altered downstream target gene expression of the placental vitamin D receptor in human idiopathic fetal growth restriction. *Cell Cycle*, 17(2), 182–190. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1405193>
- Nilsson, L. L., & Hviid, T. V. F. (2022). HLA class Ib-receptor interactions during embryo implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, 28(3), 435–454. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac007>
- Perdomo-Sabogal, Á., & Nowick, K. (2019). Genetic variation in human gene regulatory factors uncovers regulatory roles in local adaptation and disease. *Genome Biology and Evolution*, 11(8), 2178–2193. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz131>
- Phillips, K. M., Read, C. C., Kriese-Anderson, L. A., Rodning, S. P., Brandebourg, T. D., Biase, F. H., & Dyce, P. W. (2018). Plasma metabolomic profiles differ at the time of artificial insemination based on pregnancy outcome, in *Bos taurus* beef heifers. *Scientific Reports*, 8(1), Article 13196. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31605-0>
- Polstein, L. R., & Gersbach, C. A. (2012). Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *Journal of the American Chemical Society*, 134(40), 16480–16483. <https://doi.org/10.1021/ja3065667>
- Poole, D. H., Ndiaye, K., & Pate, J. L. (2013). Expression and regulation of secreted phosphoprotein 1 in the bovine corpus luteum and effects on T lymphocyte chemotaxis. *Reproduction*, 146(6), 527–537. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0190>

- Rabaglino, M. B., & Kadarmideen, H. N. (2020). Machine learning approach to integrated endometrial transcriptomic datasets reveals biomarkers predicting uterine receptivity in cattle at seven days after estrous. *Scientific Reports*, 10(1), Article 16981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72988-3>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D. I., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), Article e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rotwein, P. (2017). Diversification of the insulin-like growth factor 1 gene in mammals. *PLoS ONE*, 12(12), Article e0189642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189642>
- Shan, B., Huo, Y., Guo, Z., Li, Q., Pan, Z., Li, Q., & Du, X. (2024). miR-184, a downregulated ovary-elevated miRNA transcriptionally activated by SREBF2, exerts anti-apoptotic properties in ovarian granulosa cells through inducing SMAD3 expression. *Cell Death & Disease*, 15(12), Article 892. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07286-1>
- Shireesha, S., Sudhakar, K., Vinoo, R., Seshaiiah, C. V., & Metta, M. (2021). Bioinformatic characterization of the transmembrane protein95 gene (*TMEM95*) in Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinarski Arhiv*, 91(1), 11–18. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0705>
- Sigdel, A., Bisinotto, R. S., & Peñagaricano, F. (2021). Genes and pathways associated with pregnancy loss in dairy cattle. *Scientific Reports*, 11(1), Article 13329. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92525-0>
- Taravat, M., Roshanzamir, A., Rahbar, M., Topraggaleh, T. R., Asadpour, R., & Bucak, M. N. (2024). Apoptotic-related miRNAs correlated with functional and flow cytometric parameters in asthenozoospermic Holstein bulls after freeze-thaw process. *Biopreservation and Biobanking*, 22(6), 616–627. <https://doi.org/10.1089/bio.2023.0135>
- Tong, X., Poramba-Liyanage, D. W., van Hoolwerff, M., Riemers, F. M., Montilla-Rojo, J., Warin, J., & Shang, P. (2024). Isolation and tracing of matrix-producing notochordal and chondrocyte cells using ACAN-2A-mScarlet reporter human iPSC lines. *Science Advances*, 10(43), Article eadp3170. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adp3170>
- Vasconcelos, J. L. M. (2020). New approaches to diagnose and target reproductive failure in cattle. *Animal Reproduction*, 17(3), Article e20200057. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0057>
- Wang, S., Liu, R., Ren, X., Sang, M., Dong, H., Wu, Q., & Li, A. (2024). The bta-miR-22-3p can alleviate LPS-induced inflammatory response in yak endometrial epithelial cells by targeting *KSR2*. *Microbial Pathogenesis*, 197, Article 107090. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107090>
- Wang, Z. B., Boisvert, E., Zhang, X., Guo, M., Fashoyin, A., Du, Z. W., & Li, X. J. (2011). Fezf2 regulates telencephalic precursor differentiation from mouse embryonic stem cells. *Cerebral Cortex*, 21(9), 2177–2186. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr006>
- Yazdanpanah, A., Roshanfekr, H., Mirzadeh, K., Mamouei, M., & Khederzadeh, S. (2013). Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene in Najdi cattle populations.
- Zhai, Y., Shi, Q., Chu, Q., Chen, F., Feng, Y., Zhang, Z., & Lyu, S. (2022). miRNA profiling in

intrauterine exosomes of pregnant cattle on day 7. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, Article 1078394. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1078394>

Zhang, Y., Li, F., Feng, X., Yang, H., Zhu, A., Pang, J., ... & Wang, F. (2017). Genome-wide analysis of DNA methylation profiles on sheep ovaries associated with prolificacy using whole-genome bisulfite sequencing. *BMC Genomics*, 18(1), Article 759. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4068-9>