

## واکاوی فیلوژنی ژن نوروپیتید VF در برخی از گونه‌های پستانداران و پرندگان

شماره صفحات

۶۹-۷۶

سجاد رنجبر<sup>۱</sup>، زهرا بلوکی<sup>۲</sup>، محمد دادپسند<sup>۳\*</sup>

(۱) به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دکتری بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

(۲) دکتری بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

(۳) دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

\*نویسنده مسئول: dadpasand@shirazu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۱

### چکیده

در این پژوهش، روند تکامل ژن نوروپیتید VF در گوسفند، آنالیز فیلوژنی و روند انتخاب طبیعی در طی تکامل این ژن بررسی شد. توالی ژنی VF در گوسفند و سایر گونه‌ها (گاو میش آمریکایی، زبو، گاو اهلی، گاو وحشی هیمالیایی، بوفالو آبی، بز، میمون رزوس، گراز، سگ اهلی، خوک وحشی، اسب، فنچ راه راه، رت، شتر، آلاکا و مرغ جنگلی سرخ) هم‌تراز شدند. درصد جانمایی و جایگزینی نوکلئوتیدها بر اساس جستجو در بانک اطلاعاتی NCBI با روش حداکثر درست‌نمایی انجام و ترسیم درخت فیلوژنتیک و تعیین روند انتخاب طبیعی حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک تعیین شد. درصد جانمایی بازهای پیریمیدینی بیشتر از بازهای پورینی بود، هم‌چنین نسبت dN/dS نیز محاسبه شد که نشان دهنده‌ی انتخاب مثبت در طی تکامل این ژن است. این نوع dN/dS پورینی بود. درخت فیلوژنتیک برای ژن مذکور در موجودات مختلف نشان می‌دهد که پروتئین VF در موجودات مختلف بر اساس مسیر تکاملی خود به دو شاخه مجزا تقسیم می‌شود، که در یک دسته در موجودات مورد مطالعه با درصد شباهت بیشتر قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: فیلوژنی، انتخاب مثبت، ژن نوروپیتید VF

## مقدمه

هورمون آزادکننده گنادوتروپین<sup>۱</sup> (GnRH) فاکتور اصلی تنظیمی در ترشح هورمون‌های لوتئینی (LH) و تحریک‌کننده فولیکول (FSH) است (Tsutsui *et al.*, 2000a). در سال ۲۰۰۰ سوتسویی و همکاران نوروپپتید جدیدی به نام هورمون مهارکننده گنادوتروپینی که از خانواده پپتیدهای آرژنین فنیل آلانین آمید (آر-اف-آمید) است در مغز بلدرچین شناسایی کردند (Tsutsui *et al.*, 2000b) که کار اصلی آن مهار GnRH است (RFRP-1 (Ubuka *et al.*, 2006)، RFRP-2 و RFRP-3 از پپتیدهای وابسته به این خانواده هستند که در پستاندارانی مانند همستر (Kriegsfeld *et al.*, 2006)، رت (Calisi *et al.*, 2008)، موش (Kriegsfeld *et al.*, 2006)، گوسفند (Dardente *et al.*, 2008)، گاو (Kadokawa *et al.*, 2008)، و سایر پستانداران شناسایی شده‌اند و خاصیتی مشابه با پپتید GnIH دارند (Clarke *et al.*, 2009; Bentley *et al.*, 2009). این نوروپپتید علاوه بر نقش تولیدمثلی بارز، در تسهیل فاکتورهای اشتها نیز نقش دارد (Tsutsui, 2009). علاوه بر این، در ارتباط با نقش این هورمون و پپتید وابسته به آگوتی در نرون‌های هسته کمانی در میش نشان داده شد که علاوه بر تاثیر بر اشتها از طریق این پپتید می‌تواند با نقش مشترکی که با این پپتید در هسته کمانی برقرار می‌کند بر کنترل فعالیت تخمدانی در حالات مختلف اثرگذار باشد (جعفرزاده شیرازی و همکاران، ۱۳۸۹). گنادوتروپین‌های هیپوفیز که توسط هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) تحریک می‌شوند، هیچ هورمون بازدارنده شناخته شده‌ای تا زمان کشف نوروپپتید جدید RFamide [پروتئین مرتبط با RFamide (RFRP)] در پرندگان نداشتند که توسط ژن *npVF* (نوروپپتید VF) کدگذاری می‌شوند، دودکاپپتید RFRP به دلیل اثر بازدارنده آن بر GnRH و آزادسازی گنادوتروپین که برای اولین بار در بلدرچین ژاپنی *Coturnix japonica* نشان داده شد، به عنوان هورمون بازدارنده گنادوتروپین (GnIH) نیز شناخته می‌شود (Sutsui *et al.*, 2000). دو دهه پس از کشف، نوروپپتید GnIH در چندین گونه پستانداران (Clarke *et al.*, 2008; Fukusumi *et al.*, 2001) و غیرپستانداران شناسایی شده است (Sawada *et al.*, 2002; Ubuka *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). به طور کلی، GnIH و ارتولوگ‌های آن عملکردهای مشابهی را که عبارت است از تنظیم تولیدمثل از طریق مهار آزادسازی گنادوتروپین با واسطه GnRH در بین گونه‌ها انجام می‌دهند.

در این راستا با استفاده از فیلوژنی در جهت کشف ارتباطات تکاملی بین گونه‌های مختلف می‌توان به‌راه برد؛ همچنین، می‌توان زمان واگرایی موجودات از یکدیگر را نیز برآورد کرد (Nei and Kumar, 2000). در زمان آنالیز داده‌های توالی DNA با این روش به نرخ پایداری آلل‌ها در جمعیت رسیدند که نشان دهنده نرخ تکاملی جهش‌های پایدار است (Oztabak *et al.*, 2014).

<sup>1</sup>Gonadotropin Releasing Hormone

پرواضح است که طی سالیان و مواجهه با عوامل مختلف اثر بر این توالی‌ها خواهند داشت و سبب دگرگونی آن خواهد شد که منجر به ایجاد واگرایی از جد خود خواهد شد. مقدار این واگرایی را با عنوان فاصله ژنتیکی معرفی می‌کنند (Nei and Kumar, 2000). در ادامه تبدلات و تبدیلاتی که در آلل‌ها و بین ژن‌ها در فرآیند میوز اتفاق می‌افتد، عاملی بر جدایی و تفرق گونه‌ها شمرده می‌شود که همین تفرق مانند شبکه‌ای عمل می‌کند که سبب ایجاد توالی DNA مشابه در بین افراد یک گونه می‌شود. در نتیجه همین شبکه در بین گونه‌های مختلف یکسان‌سازی، یکپارچگی و انسجام توالی مورد نظر را در پی خواهد داشت (Senaris et al., 1997).

با توجه به نقش حیاتی تولیدمثل در پرورش دام و طیور، شناخت مکانیسم‌های مرتبط یا موثر بر آن، بسیار حائز اهمیت است. پپتید GnIH که نقش بارز تولیدمثلی آن بالاخص در پستانداران وضوح است نیاز به شناسایی هر چه بیشتر دارد. در این راستا درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های VF که در بانک‌های اطلاعاتی قابل دسترس هستند ترسیم می‌شود و همچنین، با استفاده از این توالی‌ها مقدار، مسیر و محل‌های حساس به تغییرات در طول تکامل شناسایی می‌شود. با توجه به نبود اطلاعات کافی در ارتباط با این ژن، بخصوص در حوزه علوم دامی هدف این پژوهش، تجزیه فیلوژنی یا نحوه انتخاب در طول تکامل ژن نوروپپتید VF در بین چند گونه اهلی و غیراهلی بود.

### مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی توالی‌های ژن نوروپپتید VF اطلاعات مربوط به توالی‌های نوکلئوتیدی DNA و mRNA ژن نوروپپتید VF برای گوسفند دانه‌دو شد (جدول ۱). همچنین، با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه NCBI، ژن‌های نوروپپتید VF برای سایر گونه‌های مورد نظر (گاو میش آمریکایی، زبو، گاو اهلی، گاو وحشی هیمالیایی، بوفالو آبی، بز، میمون رزوس، گراز، سگ اهلی، خوک وحشی، اسب، فنج راه راه، رت، شتر، آلپاکا و مرغ جنگلی سرخ) نیز به دست آمد (نگاره ۱). برای مقایسه توالی‌ها، توالی ژن مورد نظر در گوسفند با توالی دیگر گونه‌ها با استفاده از Clustal W در نرم افزار مگا ۷ (Kumar et al., 2016) هم‌تراز شدند. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار مگا ۷ و با الگوی Clustalw هم‌تراز شده و جایگاه چندشکلی‌ها در طول ژن مشخص شدند. مهم‌ترین مزیت این الگوریتم برای هم‌ردیف‌سازی، این است که هم‌ردیف‌سازی دوگانه و چندگانه را هم‌زمان انجام می‌دهد. هدف از هم‌ردیف‌سازی تعیین مقدار تشابه بین توالی‌ها، شناسایی چندشکلی موجود در توالی‌ها، جهش‌ها، نوع جهش و همچنین شناسایی جد مشترک آن‌ها است. پس از شناسایی جهش‌ها، تاثیرشان بر ساختار پروتئین بررسی شد. نگاره ۱ هم‌ردیفی توالی‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به این نگاره، می‌توان دریافت که جهش‌های موجود در توالی‌ها به صورت‌های مختلفی قابل مشاهده است. به این صورت که جهش‌های نقطه‌ای (تغییر در یک نوکلئوتید) به صورت تفاوت در حروف موجود در توالی (بازها) و جهش‌های حذفی به نگاره یک خط تیره در توالی‌ها قابل رویت هستند. همان‌طور که در نگاره مشخص است، ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، رنگ مشابهی دارند و ستون‌هایی که دارای باز جهش یافته هستند،



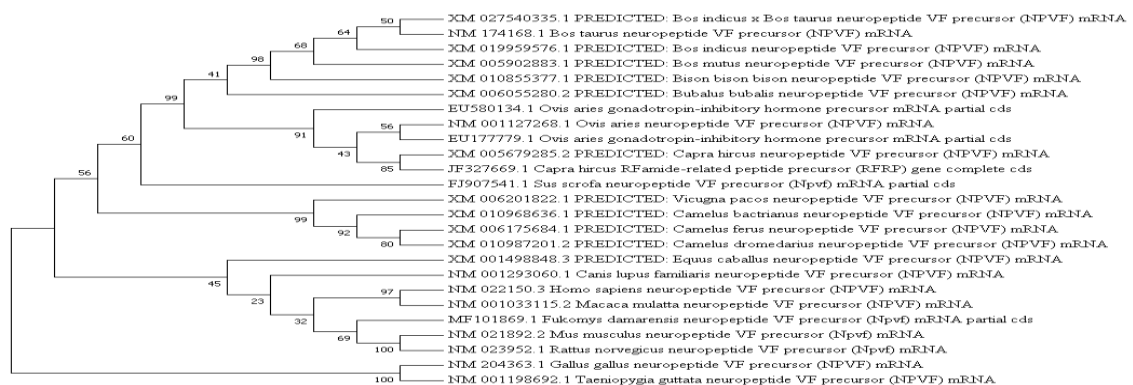
نرم افزار مگا ۷ استفاده شد. هم چنین، مقادیر  $d_N$  و  $d_S$  با روابط زیر محاسبه شدند:

$$d_N = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} P_N)$$

$$d_S = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} P_S)$$

در روابط  $P_N$ ، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و  $P_S$  نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه هستند. سپس

تعداد جهش‌ها، تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی، درصد تفرق ژنی، تبدیل ژنی و هم چنین مقدار تنوع آن‌ها با نرم افزارهای DNAsp (Rozas et al., 2017) و مگا ۷ محاسبه شد.



## نگاره ۲: ترسیم درخت فیلوژنیک توالی‌های VF در گونه‌های مورد بررسی

### جدول ۱: توالی ژن VF گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه

Table 1. Sequences of VF genes of studies species

توالی (ژن) (Sequence (Gene))	Gene Bank Accession number
<i>Ovis aries</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_001127268.1
<i>Capra hircus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_005679285.2
<i>Bubalus bubalis</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_006055280.2
<i>Bos mutus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_005902883.1
<i>Bos indicus_x_Bos taurus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_027540335.1
<i>Bos indicus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_019959576.1
<i>Bison bison</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_010855377.1
<i>Ovis aries</i> _gonadotropin-inhibitory_hormone_precursor_mRNA_partial_cds	EU580134.1
<i>Ovis aries</i> _gonadotropin-inhibitory_hormone_precursor_mRNA_partial_cds	EU177779.1
<i>Homo sapiens</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_022150.3
<i>Mus musculus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(Npvf)_mRNA	NM_021892.2
<i>Rattus norvegicus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(Npvf)_mRNA	NM_023952.1
<i>Bos taurus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_174168.1
<i>Gallus gallus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_204363.1
<i>Macaca mulatta</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_001033115.2
<i>Sus scrofa</i> _neuropeptide_VF_precursor_(Npvf)_mRNA_partial_cds	FJ907541.1
<i>Canis lupus familiaris</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_001293060.1
<i>Taeniopygia guttata</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	NM_001198692.1
<i>Fukomys damarensis</i> _neuropeptide_VF_precursor_(Npvf)_mRNA_partial_cds	MF101869.1
<i>Camelus ferus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_006175684.1
<i>Camelus bactrianus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_010968636.1
<i>Vicugna pacos</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_006201822.1
<i>Camelus dromedarius</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_010987201.2
<i>Equus caballus</i> _neuropeptide_VF_precursor_(NPVF)_mRNA	XM_001498848.3
<i>Capra hircus</i> _RFamide-related_peptide_precursor_(RFRP)_gene_complete_cds	JF327669.1

جدول ۲: تعداد کل جهش‌ها، جایگاه‌های چندشکل، هاپلوتایپ‌ها، مقدار تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپ‌ها\* موجود در توالی

### ژن نوروپپتید VF

**Table 2: Total number of mutations, polymorphic sites, nucleotide diversity and haplotypes in the VF neuropeptide gene sequence**

پارامتر	مقدار
کل جهش‌ها (Total number of mutations)	۰/۴۲۶
تعداد جایگاه‌های چندشکل (polymorphic sites)	۰/۲۶۶
تنوع نوکلئوتیدی (nucleotide diversity)	۰/۲۲۱
تنوع هاپلوتایپ‌ها (haplotype diversity)	۰/۹۹۳

\* با استفاده از نرم‌افزار DNAsp ارزیابی شدند

### نتایج و بحث

تعداد کل جهش‌های موجود در این توالی‌ها، تعداد جایگاه‌های چندشکل، تعداد هاپلوتایپ‌ها مقدار تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتایپ‌ها در جدول ۲، آورده شده است. نتایج حاصل از درخت فیلوژنی نشان داد که توالی‌های مورد نظر بر پایه مسیر تکاملی به دو دسته تقسیم می‌شوند (نگاره ۲). دسته اول شامل گونه‌های مرغ قرمز جنگلی (*Gallus gallus*) و سهره گورخری (*Taeniopygia guttata*) و دسته دوم سایر گونه‌ها را شامل می‌شود. مقادیر بالای Bootstrap در محل انشعاب‌ها نشان می‌دهد

که درخت از اطمینان بالایی برخوردار است (Mohamadai *et al.*, 2019; Nazari and Mohamadi, 2022).

نرخ جایگزینی در انشعاب‌ها ۰/۱ بود. پس از رسم درخت و مشخص کردن گروه‌ها، مقدار تفاوت نوکلئوتیدی هر گروه نسبت به گروه دیگر ۰/۳۰۸ برآورد شد. همچنین، مقدار تفاوت نوکلئوتیدی همه توالی‌ها نسبت به یکدیگر نیز محاسبه شد.

جدول ۲، نتایج حاصل از جابجایی نوکلئوتیدها در ژن‌ها در گونه‌های مورد بررسی را بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی نشان می‌دهد. مقدار بالای جابجایی مربوط به بازهای پریمیدینی است. به طوری که این مقادیر برای تبدیل تیمین به سیتوزین و سیتوزین به تیمین به ترتیب ۲۵/۴۸ و ۲۱/۱۴ به دست آمد. همچنین، کم‌ترین مقدار مربوط به جابجایی بازهای پورینی مشاهده شد. به طوری که برای تبدیل آدنین به گوانین ۱۲/۷۶ و تبدیل گوانین به آدنین ۱۹/۷۶ بود. مقدار جابجایی‌های حاصل از این پژوهش با نتایج پژوهش دیگر که بیش‌ترین جابجایی را جابجایی بازهای پریمیدینی گزارش کرده‌اند، همسو بود؛ دلیل این نوع جابجایی‌ها متیله شدن باز سیتوزین است (Vignalet *et al.*, 2002). همچنین، مقدار جابجایی بازهای پورینی با پریمیدینی و پریمیدینی با پورینی نیز در جدول ۳، آمده است. تنوع نوکلئوتیدی برای جایگاه‌ها ۰/۱۹۴ برآورد شد.

جدول ۳: درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدهای ژن نوروپپتید vf در گونه‌های مورد بررسی

**Table 3. Substitution rate of nucleotide sequence of neuropeptide VF gene in studied species**

	A	T	C	G
A	-	۱/۹	۲/۴۳	۲۱/۶۸
T	۳/۱۸	-	۱۴/۶۵	۲/۱۵
C	۳/۱۸	۱۲/۸۳	-	۲/۱۵
G	۳۲/۰۶	۱/۹	۲/۱۷	-

اعداد روی قطر معرف درصد جابجایی انتقالی و اعداد خارج از قطر معرف درصد جابجایی تقاطعی هستند. پارامترهای روند انتخاب طبیعی در ژن نوروپپتید  $vf$  نیز محاسبه شد و مقدار  $1/49$  به دست آمد. اگر نسبت  $d_N$  به  $d_S$  بیشتر از ۱ باشد انتخاب مثبت و اگر برابر با ۱ باشد انتخاب خنثی صورت گرفته است. نتایج حاصل از محاسبه تعیین روند انتخاب طبیعی با نتایج Morgan, و همکاران (۲۰۱۰) همسو بود. این نوع انتخاب باعث ایجاد واریته‌ها و پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید برای پروتئین‌ها می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، ژن  $VF$  علاوه بر نقش تولیدمثلی، وظایف بیولوژیکی مختلفی دارا است. بر اساس این نتایج، در این ژن چندشکلی بالایی وجود دارد که آن را به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش مستعد کرده است؛ در نتیجه این چندشکلی بالا عاملی بر بروز پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید آن برای سازگاری با شرایط محیطی متفاوت است این توصیفات نشان دهنده نقش بیولوژیکی موثر آن در این موجودات است.

## منابع

- Bentley, G. E., Ubuka T, McGuire N. L., Calisi R, Perfito N., Kriegsfeld L. J., et al. (2009). Gonadotrophin-Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology*. 88(1): 76-88.
- Calisi, R. M., Rizzo, N. O., & Bentley, G. E. (2008). Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *General and comparative endocrinology*, 157(3): 283-287.
- Clarke, I.J., Qi, Y., Puspita Sari, I., Smith, J.T. (2009). Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Frontier in Neuroendocrinology*. 30: 371-8.
- Clarke, I. J., Sari, I. P., Qi, Y., Smith, J. T., Parkington, H. C., Ubuka, T., & Bentley, G. E. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 149(11): 5811-5821.
- Dardente, H, Birnie, M, Lincoln, GA, Hazlerigg, D.G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *Journal of Endocrinology*. 20: 1252-9.
- Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H, Iijima, N, Kawamata, Y., Hosoya, M. (2001). Characteristics and Distribution of Endogenous RFamide-Related Peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1540(3): 221-232.
- Jafarzadeh Shirazi, M., R, Tamadon, A, Namavar, M., R. (2011). Coexpression of gonadotropin inhibitory hormone with Agouti-related peptide in the neurons of arcuate nucleus of ewe hypothalamus. 2011. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 15(2): 201. (Persian)
- Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K. & Miyamoto, A. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *Journal of Endocrinology*, 196(2):331-334.
- Kriegsfeld, LJ, Mei, DF, Bentley, GE, Ubuka, T, Mason, AO, Inoue, K. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7): 2410-2415.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Li, W.H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Makarenkov, V., Kevorkov, D., & Legendre, P. (2006). Phylogenetic network construction approaches. *Applied mycology and biotechnology*, 6: 61-97.

Morgan, C. C., Loughran, N. B., Walsh, T. A., Harrison, A. J., & O'Connell, M. J. (2010). Positive selection neighboring functionally essential sites and disease-implicated regions of mammalian reproductive proteins. *BMC Evolutionary*. 10: 39.

Mohamadi, Gh., Nazari, M., Mohamadabadi, M.R. and Heidari, R. (2019). Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. *Modern Genetic Journal*. 14(3): 209-217.

Nazari, M. and Mohamadi, Gh. (2022). Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial D-loop HVR I region in three breeds of native sheep Iran (Taleshi, Shal and Makui). *Veterinary Researches & Biological Products*. 35(1): 31-39.

Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. (pp. 51-72).

Oztabak, K., Gursel, F. E., Akis, I., Ates, A., Yardibi, H. & Turkay, G. (2014). FASN Gene Polymorphism in Indigenous Cattle Breeds of Turkey. *Folia Biologica (Krakow)*, 62: 29-35.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12): 3299-3302.

Senaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R.V., Dieguez, C. & Casanueva, F. F. (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, 138: 4501- 4504.

Sawada, K., Ukena, K., Satake, H., Iwakoshi, E., Minakata, H., Tsutsui, K. (2002) Novel Fish Hypothalamic Neuropeptide: Cloning of a cDNA Encoding the Precursor Polypeptide and Identification and Localization of the Mature Peptide. *European Journal of Biochemistry*. 269(24):6000–8.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H, Fujisawa, Y, Kikuchi, M. (2000). Novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(2): 661-667.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Yin, H., Ubuka, T., Chowdhury, V. S., Osugi, T., & Bentley, G. E. (2009). A New Key Neurohormone Controlling Reproduction, Gonadotrophin-Inhibitory Hormone in Birds: Discovery, Progress and Prospects. *Journal of neuroendocrinology*, 21(4): 271-275.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S. & Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2): 661-667.

Ubuka, T, Ukena, K, Sharp, PJ, Bentley, GE, Tsutsui, K. (2006). Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology*. 147: 1187-94.

Ubuka, T., Morgan, K., Pawson, A.J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Minakata, H. (2009) Identification of Human GnIH Homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the Cognate Receptor, GPR147 in the Human Hypothalamic Pituitary Axis. *PloS One* 4(12): e8400.

Zhang, Y., Li, S., Liu, Y., Lu, D., Chen, H., Huang, X., & Cheng, C. H. (2010). Structural diversity of the GnIH/GnIH receptor system in teleost: its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides*. 31(6): 1034-1043.