

بررسی بیان افتراقی ژن‌ها، مسیرها و شبکه ژنی در بافت عضله جنین گوسفند در دو نژاد دنبه‌دار و بی‌دنبه

- فهیمه محمدی
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
- مجتبی طهمورث پور
عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
- علی جواد منش (نویسنده مسئول)
عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۵۱۳۸۸۰۵۸۹۹

Email: javadmanesh@um.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.122913.1749

چکیده

فرآیندهای رشد عضلات و متابولیسم لیپید که نقش مهمی در مراحل رشد و نمو جنین دارند، در گوسفندان بی‌دنبه و دنبه‌دار متفاوت است. از این رو برای درک بهتر ژن‌های افتراقی و مسیرهای آن‌ها در بافت عضله قبل از تولد، داده‌های بیان ژن حاصل از یک آزمایش ریز آرایه مربوط به بافت عضله‌ی دو نژاد گوسفند دنبه‌دار اوجومکین و بی‌دنبه تکسل در ۳ تکرار بیولوژیکی در ۵ مقطع سنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در سن‌های ۷۰، ۸۵، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۳۵ روزگی جنینی بترتیب ۶۹۱، ۴۱۰، ۴۰۴، ۲۹۰ و ۱۵۵ ژن دارای بیان افتراقی با استفاده از بسته نرم‌افزاری LIMMA در محیط R شناسایی شدند. همچنین، شناسایی خوشه‌های ژنی معنی‌دار با استفاده از Cytoscape برای هر مقطع سنی انجام گرفت. در نهایت ۱۲ ژن افتراقی در مجموع پنج مرحله جنینی معرفی شد که در میان آن‌ها ژن‌های EEF1A2، SEL1، ITGAM، NINL و RPL39 به‌عنوان ژن‌هایی که بطور مستقیم با وزن جنین، رشد و نمو عضلات جنینی و تنظیم متابولیسم چربی درگیر هستند. همچنین، آنالیز مسیرهای KEGG و ماهیت‌شناسی ژن‌های افتراقی توسط DAVID منجر به شناسایی مسیرهای مرتبط با ماهیچه زایی، متابولیسم چربی، سیستم ایمنی و عصبی در ترانسکریپتوم عضلات در حال رشد شد. نتایج این بررسی می‌تواند اطلاعات تکمیلی از تأثیرات قابل توجه ژن‌ها بر تشکیل بافت عضله و چربی در مراحل رشد جنینی فراهم آورد. همچنین این ژن‌ها ممکن است به‌عنوان نشانگرهای مولکولی مرتبط با برخی صفات اقتصادی مانند وزن تولد، صفات لاشه و کیفیت گوشت در گوسفند معرفی شوند که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی به کار رود.

واژه‌های کلیدی: گوسفند، ماهیت‌شناسی، ماهیچه زایی، متابولیسم چربی، Cytoscape

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 123 pp: 301-312

Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin- and fat-tailed breeds

By: Fahime Mohammadi, Mojtaba Tahmoorespur, Ali Javadmanesh*

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding Author's Email: javadmanesh@um.ac.ir – Phone: 05138805899

Received: August 2018

Accepted: October 2018

Processes of muscle development and lipid metabolism that plays important roles during fetal growth and development stages, are different in thin- and fat-tailed sheep breeds. Therefore, in order to have a better perception of differentially expressed genes and their pathways in ovine prenatal muscle tissue, the gene expression data from muscle tissue of two breeds of thin-tailed, Texel and fat-tailed sheep, Ujumqin in 3 biological replicates for 5 age groups derived from the expression array experiment were analyzed. The LIMMA package in R used to identify 691, 410, 404, 290 and 155 differentially expressed genes at 70, 85, 100, 120, and 135 days from gestation, respectively. Also, identification of significant gene clusters was performed for each fetal stage using Cytoscape. Finally, 12 genes were recognized as differentially expressed at all 5 stages of sampling; among them, EEF1A2, ITGAM, NINL and RPL39 were confirmed as genes related directly to fetal weight, fetal muscle growth and development and lipid metabolism regulation. Also the KEGG pathway and Gene Ontology analysis by DAVID led to identification of pathways associated with myogenesis, lipid metabolism and nervous and immune system in the developing muscle tissue transcriptome. The results of this study could provide supplementary information revealing genes with significant impact on the formation of muscle and fat tissues during fetal development. These genes might provide some evidence on DNA markers associated with some economic traits including birth weight, carcass and meat quality traits in sheep which can be applied in selection and breeding programs.

Key words: Cytoscape, Gene Ontology, Lipid Metabolism, Myogenesis, Ovine.

مقدمه

گوشت قرمز یکی از رایج‌ترین منابع تأمین پروتئین برای جامعه انسانی به شمار می‌رود. در ایران، گوشت گوسفند به دلیل استفاده در مراسم‌های مذهبی، اعیاد و جشن‌ها، دارای مصرف بالاتری بوده و در مقایسه با گوشت گاو و بز، سازگاری بیشتری با ذائقه و طبع مردم ایران دارد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۴). ایران با دارا بودن حدود ۶۰ میلیون رأس گوسفند از حدود ۲۷ نژاد مختلف (جوادمنش و همکاران، ۲۰۱۷)، رتبه‌ی چهارمین کشور در بخش پرورش گوسفند در جهان را به خود اختصاص داده است. در بین جمعیت گوسفندان جهان، حدود ۲۶٪ از نوع دنبه‌دار و مابقی بی-دنبه‌اند و این در حالی است که حدود ۹۶٪ از گوسفندان ایرانی از

نوع دنبه‌دار و تنها ۴٪ مابقی بی‌دنبه‌اند (Mohapatra and Shinde, 2018).

بهبود رشد عضله در گوسفندان یکی از اقداماتی است که می‌تواند تولید گوشت گوسفند را افزایش دهد. تاکنون تحقیقات زیادی جهت پیدا کردن ژن‌های کاندید مرتبط با رشد و تولید گوشت در گوسفند انجام شده است (Arora و همکاران، ۲۰۱۴؛ Nassiry و همکاران، ۲۰۰۷؛ Nassiry و همکاران، ۲۰۱۰). عضله اسکلتی حاوی هزاران فیبر انقباضی است که از ادغام میوبلاست‌ها تشکیل شده‌اند. تشکیل میوفیبریل‌های عضله، طی فرآیندی بنام ماهیچه-زایی^۱ صورت می‌گیرد و حداکثر تشکیل میوفیبریل‌های عضله قبل

مواد و روش

در این مطالعه جهت شناسایی ژن‌های بیان شده در بافت عضلانی گوسفند در دوران جنینی، دو نژاد بی‌دنبه و عضله‌ای تکسل^۲ و نژاد دنبه‌دار اوجومکین^۳ که دارای عملکرد متفاوتی در رشد عضلات و متابولیسم چربی هستند انتخاب شدند. بدین منظور از داده‌های خام مربوط به ۷۰، ۸۵، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۳۵ روزگی دوران جنینی در ۳ تکرار بیولوژیکی برای هر یک از این نژادها مربوط به طرح پروفایل بیان ژن در ماهیچه اسکلتی در گوسفند که در سال ۲۰۱۰ در پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی GSE23563 ثبت شده است، استفاده شد. در پژوهش مذکور، ابتدا ۷۸ میش خالص اوجومکین و ۵۴ میش خالص تکسل در شرایط سنی ۵-۳ سالگی و وزن بدنی ۵۵-۵۰ کیلوگرم انتخاب شدند و سپس به مدت ۴۵ روز با جیره مشابه پیش‌تغذیه شدند. بعد از همزمان‌سازی فحلی و تزریق داخل عضلانی گنادوتروپین، تلقیح مصنوعی با استفاده از تزریق اسپرم‌های مربوط به هر نژاد صورت گرفت. سپس ۳ میش آبستن از هر نژاد برای ۵ مقطع سنی ۷۰، ۸۵، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۳۵ روزگی آبستنی بصورت تصادفی برای سزارین انتخاب شدند تا جنین‌ها (نر و ماده) را در ۷۰، ۸۵، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۳۵ روزگی آبستنی جمع‌آوری نموده و عضله لائوسیموس دورسی آن‌ها نمونه‌برداری شود. تمامی مراحل پرورش و نمونه‌برداری در ایالت شانسی (Shanxi) چین انجام شد. به منظور شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی^۴ ($P\text{-Value} < 0.01$) بین دو نژاد در هر مقطع سنی، از بسته نرم‌افزاری LIMMA (Smyth و همکاران، ۲۰۰۲) در محیط R استفاده شد. سپس جهت شناسایی ارتباط بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده، شبکه ژنی بین آن‌ها توسط نرم افزار Cytoscape نسخه 3.6.0 (Shannon و همکاران، ۲۰۰۳) و برنامه String رسم شد. در ادامه به دلیل وسیع بودن شبکه ژنی، خوشه‌بندی هر شبکه با برنامه CytoCluster و الگوریتم ClusterOne صورت گرفت و خوشه‌های معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) شناسایی شدند. همچنین جهت بررسی و درک بهتر ماهیت و عملکرد ژن-های افتراقی شناسایی شده، آنالیز ماهیت‌شناسی^۵ ژن و شناسایی

از تولد و در دوران جنینی است. ماهیچه‌زایی قبل از تولد شامل ماهیچه‌زایی اولیه و ثانویه است. طی ماهیچه‌زایی اولیه در مرحله رویانی، فیبرهای عضلانی اولیه بوجود می‌آیند و طی ماهیچه‌زایی ثانویه در مرحله جنینی، فیبرهای عضلانی ثانویه بر روی فیبرهای عضلانی اولیه تشکیل می‌شوند (Yan و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین مرحله‌ای که ماهیچه‌زایی ثانویه در حال انجام است، یک عامل تعیین‌کننده برای عضلانی بودن به شمار می‌رود. بررسی‌ها نشان داده است که اکثر میوفیبریل‌ها بعد از ۶۰ روزگی آبستنی تشکیل می‌شوند (McCoard و همکاران، ۲۰۰۰). رشد بافت‌های عضلانی بعد از تولد نیز فقط توسط هایپرتروفی رخ می‌دهد. با این وجود بررسی‌ها نشان داده است که ادغام میوبلاست‌ها و تشکیل میوفیبریل‌ها در نژادهای دنبه‌دار و بی‌دنبه با یکدیگر متفاوت است (Li و همکاران، ۲۰۱۶) و رشد عضلات و متابولیسم چربی نقش مهمی در مراحل رشد جنین در این نژادها دارد. لذا ژن‌ها و مسیرهای علامت‌دهی متعددی می‌توانند در فرآیند تشکیل فیبرهای عضلانی و رشد و نمو آن‌ها نقش داشته باشند. از این رو، در این مطالعه از دو نژاد دنبه‌دار و بی‌دنبه که دارای تفاوت‌های چشم‌گیری در رشد عضلات و چربی هستند استفاده شد. در مطالعات قبلی ویژگی‌های بافت شناسی و ترنسکریپتومی میوفیبریل‌های جنینی در طول نیمه دوم آبستنی دو نژاد اوجومکین و تکسل توسط Ren و همکاران مشخص شدند (Ren و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین ویژگی‌ها و مکانیسم‌های عضلانی دو نژاد اوجومکین و تکسل در سنین ۷۰ تا ۱۳۵ روزگی جنینی توسط Li و همکاران مورد مقایسه قرار گرفتند (Li و همکاران، ۲۰۱۶). با این وجود، شبکه ژنی ژن‌های افتراقی در بافت عضله جنینی این دو نژاد مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، فراهم آوردن اطلاعات تکمیلی از ژن‌ها و مسیرهای درگیر در فرآیندهای رشد و نمو بافت عضله و چربی و همچنین معرفی ژن-های افتراقی کلیدی در مراحل مختلف رشد و نمو عضله در دوران جنینی می‌باشد.

مهمترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای معنی‌دار در جدول ۱ آورده شده است. در بین کلاس‌های موجود در جدول ۱، ژن گیرنده لپتین (LEPR) به عنوان پروتئینی که از بافت چربی ترشح می‌شود و مسئول تنظیم مقادیر چربی از طریق لپتین در هیپوتالاموس می‌باشد (Kielar و همکاران، ۱۹۹۸) به چشم می‌خورد که میزان بیان آن در جنین ۷۰ روزه اوجومکین بالاتر از جنین ۷۰ روزه تکسل بود. این که آیا بیان بالاتر LEPR در مراحل قبل از تولد می‌تواند با رسوب زیاد چربی پس از تولد همراه باشد یا خیر، باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

در ادامه با بررسی معنی‌دارترین ژن‌های شناسایی شده، پنج ژن برتر ($Adj P < 0.05$) شناسایی شد (جدول ۶) که ژن‌های *ADD3*، *ESR2*، *EEF1A2* و *ITGAM* افزایش بیان و ژن *SELI* کاهش بیان در تکسل نشان دادند. همبستگی مثبت ژن *EEF1A2* با وزن جنین تکسل گزارش شده است که نشان می‌دهد این ژن نقش مهمی در رشد عضلات و افزایش وزن جنین در مراحل جنینی دارد (Xu و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین، گزارش شده است که با حذف ژن *EEF1A2* در موش‌ها، بافت عصبی و عضلانی آن‌ها تخریب و موجب مرگ موش‌ها بعد از تولد شده است (Griffiths و همکاران، ۲۰۱۲). همبستگی مثبت بین تغییرات میزان بیان سلنوپروتئین‌ها (SEL) در عضله که در تکثیر و آپوپتیز سلولی دخیل هستند و برای عملکرد سلول‌های عصبی حیاتی هستند (Labunskyy و همکاران، ۲۰۱۴)، با ژن‌هایی که نقش اساسی در تنظیم تری‌گلیسیرید و متابولیسم اسیدهای چرب دارند، گزارش شده است (Juszczuk- Kubiak و همکاران، ۲۰۱۶). به این معنی که افزایش بیان سلنوپروتئین‌ها در عضله، همبستگی مثبتی با بیان ژن‌هایی مثل لیوپروتئین لیپاز داشته است و این می‌تواند کاهش بیان سلنوپروتئین و در نتیجه کاهش متابولیسم اسیدهای چرب در عضله تکسل را تایید کند.

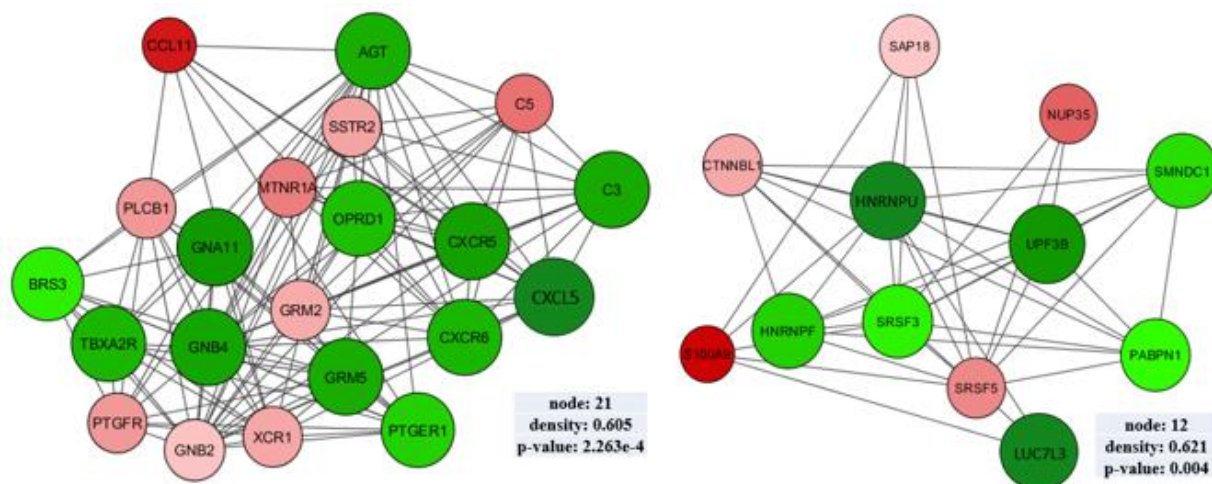
مسیرهای درگیر بین آن‌ها به وسیله پایگاه برخط DAVID نسخه 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) و KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) انجام شد. بدین منظور ژن‌های افتراقی شناسایی شده به DAVID معرفی شد و بعد از دریافت نتایج ماهیت‌شناسی و مسیرهای درگیر، عبارات ماهیت‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شد. لازم به ذکر است که برای هر مقطع سنی جداگانه نتایج خوشه‌های معنی‌دار شبکه‌های ژنی، طبقه‌بندی ماهیت‌شناسی ژن‌ها در سه کلاس عملکرد مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و اجزای سلولی و همچنین مسیرهای معنی‌دار ژن‌های افتراقی مورد بررسی قرار گرفت که برخی از مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای معنی‌دار در جداول مربوطه آورده شده است و در نهایت نیز ژن‌های برتر ($Adj P\text{-Value} < 0.05$) در هر مقطع سنی شناسایی و معرفی شدند.

نتایج و بحث

از تجزیه داده‌های خام هر دو نژاد در مجموع ۶۹۱ ژن در ۷۰ روزگی، ۴۱۰ ژن در ۸۵ روزگی، ۴۰۴ ژن در ۱۰۰ روزگی، ۲۹۰ ژن در ۱۲۰ روزگی و ۱۵۵ ژن در ۱۳۵ روزگی، بیان افتراقی معنی‌دار ($P < 0.01$) داشتند.

از مجموع ۶۹۱ ژن شناسایی شده دارای بیان افتراقی در ۷۰ روزگی جنینی، ۳۵۷ ژن افزایش و ۳۳۴ ژن کاهش بیان در نژاد تکسل نسبت به اوجومکین داشتند. دو خوشه‌ی معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده شبکه ژنی برای این مقطع سنی در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

نتایج بدست‌آمده از DAVID، حاکی از شناسایی ۱۵ فرآیند بیولوژیکی، ۱۰ اجزای سلولی، سه عملکرد مولکولی و ۱۷ مسیر معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با این ژن‌ها بود. بیشتر اجزای سلولی شناسایی شده مرتبط با آگزوزوم خارج سلولی، سیتوزول و سیتوپلاسم بودند. همچنین، عملکردهای مولکولی معنی‌دار، بیشتر مرتبط با اتصال یون مس و اتصال RNA دو رشته‌ای بودند.



شکل ۱- خوشه‌های ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با شبکه ژنی میان ژن‌های افتراقی در ۷۰ روزگی جنینی. در این شبکه، طیف سبز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان بالا و طیف قرمز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان کم است بطوریکه ژن‌هایی با گره‌های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره‌های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

جدول ۱ - خلاصه نتایج ماهیت‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده با DAVID در ۷۰ روزگی جنینی

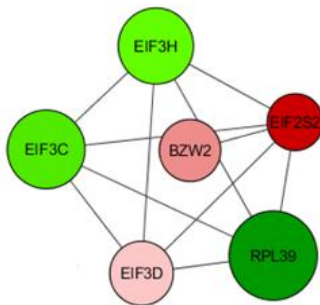
ژن‌ها	P-Value	ماهیت شناسی	دسته
SPHK2, ARNT2, BRCA2, ROBO2, EPOR	0.049483	GO:0007420 - توسعه مغز	فرآیند بیولوژیکی
IL3, TNF, IL2RA, FLT1, LEPR, IL13, IL6R, IL15, IL10RB, IFNG, EPOR, IL13RA1, XCR1	0.002462	oas04060 - تعامل گیرنده سیتوکین - سیتوکین	مسیر KEGG
PTGER1, THRB, PTGER4, LEPR, BRS3, TSHB, GRM5, ADRB3, SSTR2, LHB, PRL, MTNR1A	0.015600	oas04080 - تعامل گیرنده - لیگاند بافت عصبی	مسیر KEGG
ALDOA, PFKL, HK3, ENO3, PDHA1	0.027058	oas00010 - گلیکوژن / گلوکونوژن	مسیر KEGG

بودند. همچنین، عملکردهای مولکولی معنی‌دار، بیشتر مرتبط با اتصال یون آهن و منیزیم بودند. مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای معنی‌دار در جدول ۳ آورده شده است. در میان ژن‌های افتراقی در جدول ۲، ژن ALDOA که مسئول فعال‌سازی تمایز میوبلاست‌های اولیه است و نقش مهمی در رونویسی ژن‌های عضلانی دارد (Walsh و همکاران، ۱۹۸۰)، در جنین ۷۵ و ۸۵ روزه اوجومکین نسبت به تکسل دارای بیان بالاتری است که این امر حاکی از خروج بیشتر میوبلاست‌ها از چرخه سلولی و ورود به مرحله تمایز در این نژاد است.

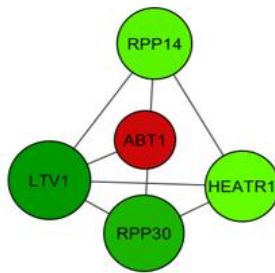
از مجموع ۴۱۰ ژن افتراقی شناسایی شده در ۸۵ روزگی جنینی، ۲۰۵ ژن افزایش و ۲۰۵ ژن کاهش بیان در نژاد تکسل نسبت به اوجومکین داشتند. چهار خوشه‌ی ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده توسط CytoCluster در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

نتایج بدست‌آمده از DAVID، حاکی از شناسایی ۹ فرآیند بیولوژیکی، ۸ اجزای سلولی، ۳ عملکرد مولکولی و ۱۲ مسیر معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با این ژن‌ها بود. بیشتر اجزای سلولی شناسایی شده مرتبط با آگزوزوم خارج سلولی و جسم گلژی

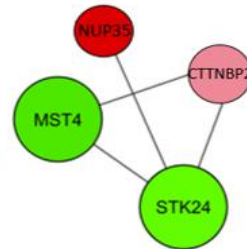
عنوان یک تنظیم کننده کلیدی تقسیم سلولی، نقش تنظیمی در میوز داشته باشد (Soung و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش بیان این ژن به همراه افزایش بیان پروتئین ریپوزومی RPL39 که درگیر در مسیر علامت دهی Rap1 است و در فرآیندهای چسبندگی سلولی مؤثر است، می تواند ادامه روند تشکیل و رشد فیبرهای عضلانی در تکسل در اواسط آبستنی را تایید کند. طبق گزارشات زو و همکاران (Xu و همکاران، ۲۰۱۴)، تمام ژن های معنی دار مرتبط با رشد عضله و متابولیسم لیپید، در نژاد تکسل در اواسط مرحله جنینی و در نژاد اوجومکین، بعد از مرحله اواسط جنینی شناسایی شدند. لازم به ذکر است که ژن RPL39 در اولین خوشه ژنی رسم شده در همین مقطع سنی نیز شناسایی شد که مؤید اهمیت این ژن در این مقطع سنی می باشد.



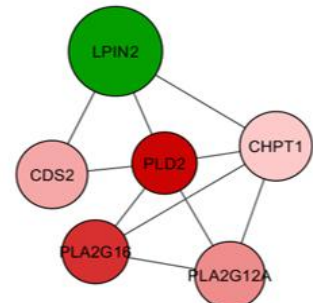
node: 6
density: 0.733
p-value: 0.003



node: 5
density: 0.700
p-value: 0.008



node: 4
density: 0.667
p-value: 0.018



node: 6
density: 0.667
p-value: 0.025

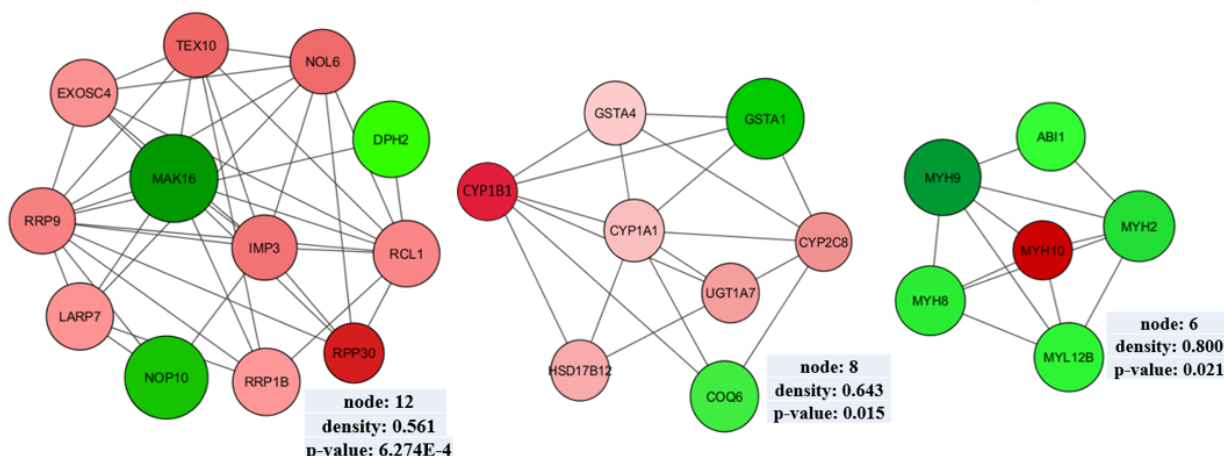
شکل ۲- خوشه های ژنی معنی دار ($P < 0.05$) مرتبط با شبکه ژنی میان ژن های افتراقی در ۸۵ روزگی جنینی. در این شبکه، طیف سبز رنگ مربوط به ژن های با بیان بالا و طیف قرمز رنگ مربوط به ژن های با بیان کم است بطوریکه ژن هایی با گره های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

جدول ۲- خلاصه نتایج ماهیت شناسی و مسیرهای معنی دار ($P\text{-Value} < 0.05$) شناسایی شده با DAVID در ۸۵ روزگی جنینی

ژن ها	P-Value	ماهیت شناسی	دسته
CDKN1A, ESR1, PDGFC, MYC	0.038632	GO: 0048146 - تنظیم مثبت تکثیر فیرو بلاست	فرآیند بیولوژیکی
ALDOA, LDHB, TPI1, LDHA, AKR1A1, FBP2	0.000419	oas00010 - گلیکوژن / گلوکونوزن	مسیر KEGG
PLD2, PLA2G12A, PAFAH1B1, CHPT1	0.018697	oas00565 - متابولیسم لیپید	مسیر KEGG
SDHB, ACO2, MDH2	0.03329	oas00020 - چرخه سترات	مسیر KEGG

معنی‌دار در جدول ۵ آورده شده است. در میان ژن‌های دسته‌بندی شده در جدول ۳، میزان بیان ژن PON1 در جنین ۱۰۰ روزه اوجومکین نسبت به تکسل در همین مقطع سنی بیشتر بود. مطالعات قبلی درگیر بودن این ژن در متابولیسم چربی و توسعه بافت چربی را تایید کرده‌اند (Zafiroopoulos و همکاران، ۲۰۱۰).

در ادامه با بررسی معنی‌دارترین (Adj P < 0.05) ژن‌ها، ژن EIF2S2 که در مراحل اولیه سنتز پروتئین دخالت دارد، شناسایی شد (جدول ۶). منطبق بر مطالعات قبلی (Ren و همکاران، ۲۰۱۱)، این ژن در نژاد تکسل نسبت به نژاد دنبه‌دار چینی افزایش بیان نشان داد.



شکل ۳- خوشه‌های ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با شبکه‌های ژنی میان ژن‌های افتراقی در ۱۰۰ روزگی جنینی. در این شبکه، طیف سبز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان بالا و طیف قرمز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان کم است بطوریکه ژن‌هایی با گره‌های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره‌های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

جدول ۳- خلاصه نتایج ماهیت‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده با DAVID در ۱۰۰ روزگی جنینی

ژن‌ها	P-Value	ماهیت شناسی	دسته
MAP3K7, CARD11, CASP8, RIPK2, MAP3K14, GPRC5B	0.036506	GO: 0043123 - تنظیم مثبت علامت‌دهی I-kappaB kinase / NF-kappaB	فرآیند بیولوژیکی
ELP3, SPAG9, PTK2, LEF1, COL1A1, CCL26	0.044942	GO: 0030335 - تنظیم مثبت مهاجرت سلولی	فرآیند بیولوژیکی
TM7SF2, EBP, DHCR7, LSS	0.011057	oas00100 - بیوسنتز استروئید	مسیر KEGG

اجومکین داشتند. چهار خوشه ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده توسط CytoCluster در شکل ۴ نشان داده شده‌اند.

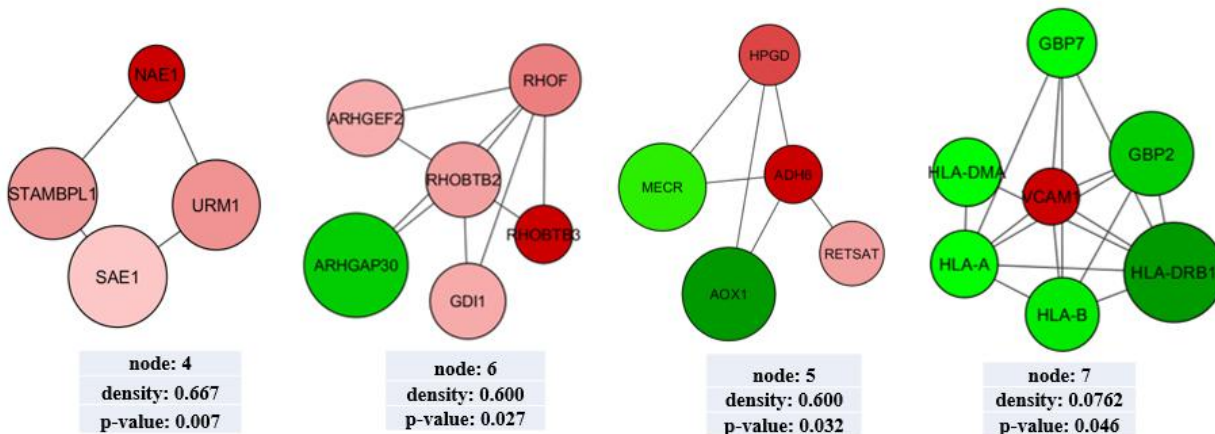
از مجموع ۴۰۴ ژن افتراقی شناسایی شده در ۱۰۰ روزگی جنینی، ۲۵۳ ژن افزایش و ۱۵۱ ژن کاهش بیان در نژاد تکسل داشتند. سه خوشه ژنی معنی‌دار ($P\text{-Value} < 0.05$) شناسایی شده توسط CytoCluster در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

نتایج بدست‌آمده از DAVID، حاکی از شناسایی ۱۳ فرآیند بیولوژیکی، ۱۱ اجزای سلولی، ۲ عملکرد مولکولی و ۱۰ مسیر معنی‌دار ($P\text{-Value} < 0.05$) مرتبط با این ژن‌ها بود. بیشتر اجزای سلولی شناسایی شده مرتبط با میتوکندری و هستک بودند. همچنین عملکردهای مولکولی معنی‌دار، بیشتر مرتبط با اتصال دم poly A RNA بود. مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای

از مجموع ۲۹۰ ژن افتراقی شناسایی شده در ۱۲۰ روزگی جنینی، ۲۰۱ ژن افزایش و ۸۹ ژن کاهش بیان در نژاد تکسل نسبت به

در ادامه با بررسی معنی دارترین ژن‌های شناسایی شده، چهار ژن برتر ($Adj P < 0.05$) شناسایی شدند (جدول ۶) که ژن NINL در مرحله ۸۵ روزگی جنینی نیز شناسایی شده بود. در میان این ژن‌ها، ژن XIST، MT-ND1 و NINL افزایش بیان و ژن TM9SF2 کاهش بیان چشمگیری در نژاد تکسل نسبت به نژاد دنبه دار چینی نشان دادند.

نتایج بدست آمده از DAVID، حاکی از شناسایی ۱۲ فرآیند بیولوژیکی، ۱۹ اجزای سلولی، ۲ عملکرد مولکولی و ۱۶ مسیر معنی-دار ($P < 0.05$) مرتبط با این ژن‌ها بود. بیشتر اجزای سلولی شناسایی شده مرتبط با آگزوزوم خارج سلولی و سیتوزول بودند. همچنین، عملکردهای مولکولی معنی دار، بیشتر مرتبط با اتصال ATP و GTP بودند. مهم ترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای معنی دار در جدول ۴ آورده شده است.



شکل ۴- خوشه‌های ژنی معنی دار ($P < 0.05$) مرتبط با شبکه ژنی میان ژن‌های افتراقی در ۱۲۰ روزگی جنینی. در این شبکه، طیف سبز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان بالا و طیف قرمز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان کم است بطوریکه ژن‌هایی با گره‌های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره‌های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

جدول ۴- خلاصه نتایج ماهیت شناسی و مسیرهای معنی دار ($P < 0.05$) شناسایی شده با DAVID در ۱۲۰ روزگی جنینی

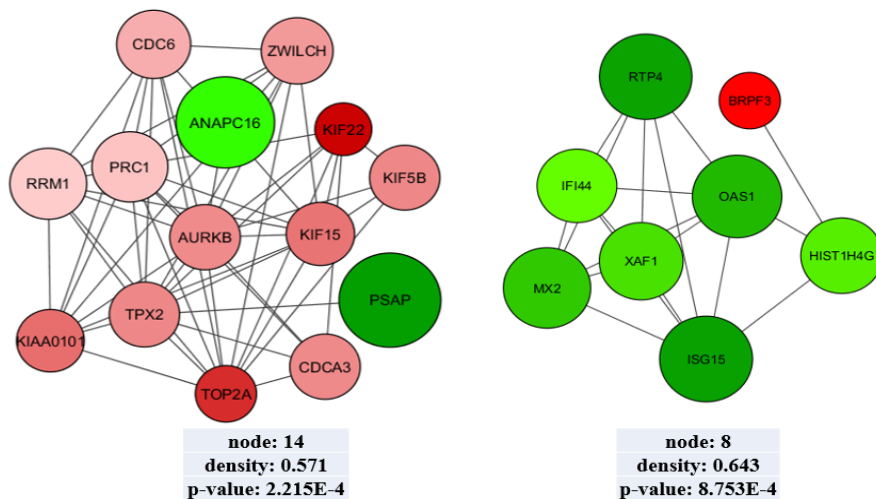
ژن‌ها	P-Value	ماهیت شناسی	دسته
AKT1, SNAP25, DISC1	0.022060	GO: 0010975 - تنظیم توسعه برآمدگی نورو	فرآیند بیولوژیکی
LAMA4, CXCR4, PAX6, THY1	0.022888	GO: 0030334 - تنظیم مهاجرت سلولی	فرآیند بیولوژیکی
AKT1, FGFR1, FGF18, ITGAM	0.022354	oas04015 - مسیر علامت‌دهی Rap1	مسیر KEGG
AKT1, PIK3CB, TSHB, PRKACA	0.036276	oas04923 - تنظیم لیپولیز در سلول‌های چربی ^۶	مسیر KEGG

نتایج بدست آمده از DAVID، حاکی از شناسایی ۹ فرآیند بیولوژیکی معنی دار، ۳ اجزای سلولی معنی دار، ۴ عملکرد مولکولی معنی دار و ۴ مسیر معنی دار ($P < 0.05$) مرتبط با این ژن‌ها بود. بیشتر اجزای سلولی شناسایی شده مرتبط با

از مجموع ۱۵۵ ژن افتراقی شناسایی شده در ۱۳۵ روزگی جنینی، ۸۱ ژن افزایش و ۷۴ ژن کاهش بیان در نژاد تکسل داشتند. دو خوشه ژنی معنی دار ($P < 0.05$) شناسایی شده در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

در ادامه با بررسی معنی‌دارترین ژن‌های شناسایی شده، ژن TMEM87B به عنوان ژن برتر ($Adj P < 0.05$) در این مقطع جنینی شناسایی شد (جدول ۶) که در نژاد تکسل نسبت به نژاد دنبه‌دار چینی افزایش بیان نشان داد.

اگزوزوم خارج سلولی بودند. همچنین عملکردهای مولکولی معنی‌دار، بیشتر مرتبط با اتصال کلوگز و کلاسترول بودند. مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای معنی‌دار در جدول ۵ آورده شده است.



شکل ۵ - خوشه‌های ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با شبکه‌های ژنی میان ژن‌های افتراقی در ۱۳۵ روزگی جنینی. در این شبکه، طیف سبز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان بالا و طیف قرمز رنگ مربوط به ژن‌های با بیان کم است بطوریکه ژن‌هایی با گره‌های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره‌های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

جدول ۵ - خلاصه نتایج ماهیت‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار ($P < 0.05$) شناسایی شده توسط DAVID در ۱۳۵ روزگی جنینی

ژن‌ها	P-Value	ماهیت شناسی	دسته
ACSM1, HNF1A, CH25H	0.013688	GO: 0006633 - فرآیند بیوسنتز اسیدچرب	فرآیند بیولوژیکی
APOA2, HNF1A, CH25H	0.028636	GO: 0008203 - فرآیند متابولیسم کلاسترول	فرآیند بیولوژیکی
SLC2A5, HK2, HK1	0.030244	oas04973 - هضم و جذب کربوهیدرات	مسیر KEGG

جدول ۶- ژن‌های برتر ($Adj P < 0.05$) شناسایی شده دارای بیان افتراقی در سنین مختلف جنینی

Adj P-val.	مرحله نمو (روز) (روزگی)	نام ژن
0.00097	70	(Homo sapiens selenoprotein I) SELI
0.00097	70	(adducing 3 (gamma)) ADD3
0.02315	70	(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2) EEF1A2
0.02657	70	(estrogen receptor 2 (ER beta)) ESR2
0.04954	70	(integrin, alpha M) ITGAM
0.00077	85	(ninein-like) NINL
0.01027	85	(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2) EEF1A2
0.02761	85	(ribosomal protein L39) RPL39
0.01540	100	(eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2) EIF2S2
0.00034	120	(X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)) XIST
0.00406	120	(mitochondrially encoded NADH dehydrogenase1) MT-ND1
0.00532	120	(ninein-like) NINL
0.02503	120	(transmembrane 9 superfamily member 2) TM9SF2
0.00477	135	(transmembrane protein 87B) TMEM87B

پیچیده بین عضله اسکلتی و سیستم ایمنی است که باززایی عضله و ماهیچه‌زایی را تنظیم می‌کند و فاکتورهای ایمنی زیادی مانند TNF- α ، NF- κ B و اعضای خانواده اینترلوکین در تمایز و تکثیر سلول‌های عضلانی دخیل هستند (Tidball and Villalta, 2010). همچنین، فرآیندها و مسیرهای مربوط به رشد و نمو و عملکرد سیستم عصبی در مراحل ۷۰، ۱۲۰ و ۱۳۵ روزگی جنینی بروز یافتند. نوروها برای حفظ عملکرد فیزیولوژیکی عضله‌ی نرمال ضروری اند و تعامل وسیع و نزدیکی بین عضله و سیستم عصبی در طول رشد و نمو وجود دارد (Bayline و همکاران، ۲۰۰۱). بطوریکه تنظیم رشد و نمو عضله توسط سیستم عصبی مرکزی در خوک گزارش شده است. در این رابطه، جنین‌هایی که قسمتی از نخاع واقع در مهره‌های گردن آن‌ها تخریب شده بود نسبت به جنین‌های سالم، درصد سلول‌های ماهواره‌ای و میوفیبریل‌های کمتری داشتند. همچنین، سیتوپلاسم سلول‌های ماهواره‌ای جنین‌های سالم نسبت به جنین‌های آسیب دیده نخاعی، غنی از اندام‌های نشان‌دهنده فعالیت‌های متابولیکی و میتوزی بود

در مجموع در میان پنج مرحله مورد بررسی قبل از تولد، بیشترین مقدار ژن‌های افتراقی بیان شده مربوط به مرحله‌ی ۷۰ روزگی جنینی بود. این امر نشان‌دهنده این است که در فرآیند میوزونیک تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها درگیر هستند. ۱۲ ژن افتراقی برتر در مجموع مراحل جنینی معرفی شد که در میان آن‌ها ژن‌هایی مانند ژن EEF1A2 به عنوان ژن درگیر در توسعه عضلات و مرتبط با وزن جنین، ژن SELI به عنوان تنظیم‌کننده متابولیسم اسیدهای چرب، ژن ITGAM به عنوان ژن درگیر در رشد و نمو عضله، ژن NINL به عنوان ژن مؤثر در لقاح و تکوین جنینی و ژن RPL39 به عنوان ژن مؤثر در تشکیل و رشد فیبرهای عضلانی که اهمیت آن در خوشه‌های ژنی نیز مشخص شد، به چشم می‌خورد. همچنین ژن‌هایی مانند ژن ALDOA که در فعالسازی تمایز میوبلاست‌های اولیه و ژن LEPR که در تنظیم مقادیر چربی و تنظیم تمایز آدیپوسیت‌ها در طی فرآیند آدیپوزنز نقش دارند، تایید شد. فرآیندها و مسیرهای مرتبط با سیستم ایمنی در همه مقاطع سنی مورد بررسی مشاهده شد. یافته‌ها حاکی از تعامل

فردوسی مشهد (گرت: ۳/۴۶۶۱۳) و همچنین دکتر زهرا رودباری ابراز می‌دارند.

پاورقی

1. Myogenesis
2. Texel
3. Ujumqin
4. Differential Expressed Gene
5. Gene Ontology
6. Adipocytes

منابع

تولایی، م.، پریر، ک.، جوادیان الیادری، س. و نصرافهانی، م.ح. (۱۳۹۵). ساتروزوم و نقش آن در گامتوزن و تکوین جنینی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. دوره ۱۸، شماره ۲، ص ص. ۱۶۹-۱۴۳.

جوادمش، ع.، نصیری، م. ر. و ازغندی، م. (۱۳۹۶). بررسی ناحیه HVR-III ژنوم میتوکندری گوسفندان ایرانی با روش توالی‌یابی. دوره ۲۷، شماره ۲، ص ص. ۱۴۱-۱۳۳.

محمدی، ف. رحیمی میانجی، ق. فرهادی، ا. و قلی زاده، م. شناسایی فرم‌های مختلف آللی در ناحیه جانبی ' ۵ ژن EDG1 موثر بر صفت ماربلینگ در گوسفندان نژاد زل. (۱۳۹۴). دومین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و کشاورزی ارگانیک.

Arora, R., Singh Yadav, H. and Kumar Yadav, D. (2014). Identification of novel single nucleotide polymorphisms in candidate genes for mutton quality in Indian sheep. *Animal Molecular Breeding*. 4(4): 1-5.

Bayline, R.J., Duch, C. and Levine, R.B. (2001). Nerve-muscle interactions regulate motor terminal growth and myoblast distribution during muscle development. *Developmental biology*. 231 (2): 348-363.

Campion, D.R., Richardson, R.L., Kraeling, R.R. and Reagan, J.O. (1978). Regulation of skeletal muscle development by the central nervous system in the fetal pig. *Growth*. 42 (2):189-204.

Griffiths, L.A., Doig, J., Churchhouse, A.M., Davies, F.C., Squires, C.E., Newbery, H.J. et al. (2012). Haploinsufficiency for translation elongation factor eEF1A2 in aged mouse muscle and neurons is compatible with normal function. *PloS one*. 7:e41917.

(Campion و همکاران، ۱۹۷۸). همچنین گزارش شده است که حیوانات با فنوتیپ‌های عضلانی مختلف در طول رشد و نمو جنینی تحت تاثیر الگوهای عصب‌رسانی گوناگونی قرار می‌گیرند بطوریکه گاوهای دارای عضله مضاعف تقریباً ۲۶-۱۳ انشعابات اضافی در انتهای آکسون‌های خود در مقایسه با گاوهای معمولی دارند که منجر به افزایش تعداد میوفیبرها می‌شود (Swatland and Cassens, 1974). همچنین، مطابق با گزارش رن و همکاران (Ren و همکاران، ۲۰۱۱)، چندین مسیر اصلی مانند مسیر Rap1 و مسیر گلیکولیز/گلوکونوژنز که به طور مستقیم با ماهیچه‌زایی و تکثیر میوبلاست‌ها در ارتباط هستند و نیز مسیرهایی مانند مسیر بیوستنز استروئیدها، متابولیسم اسیدچرب و کلسترول که در متابولیسم چربی عضلات دخیل هستند، در مراحل مورد بررسی شناسایی شد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با مقایسه ترنسکرپتوم بافت عضله پنج مرحله جنینی در دو نژاد دنبه‌دار و بی‌دنبه گوسفند، ۱۲ ژن شناسایی شد که در میان آن‌ها ارتباط ۵ ژن با فرآیندهای ماهیچه‌زایی و متابولیسم چربی در جنین قبلا گزارش شده بود. با توجه به غالب بودن جمعیت گوسفندان دنبه‌دار در ایران، می‌توان به این ۱۲ ژن توجه ویژه‌ای داشت و با بررسی‌های بیشتر در آینده، از جهش‌های موجود در این ژن‌ها به عنوان نشانگرهایی جهت انتخاب برای وزن تولد، صفات لاشه از قبیل چربی لاشه و کیفیت گوشت در گوسفند استفاده کرد. همچنین نتایج این بررسی می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک ارتباط بین ژن‌های موثر و مسیرهای آن‌ها در فرآیند رشد و نمو بافت عضله و چربی در دوران جنینی را فراهم کند که به سایر نژادهای دنبه‌دار و بی‌دنبه قابل تعمیم باشد. البته اعتبار سنجی آزمایشگاهی با استفاده از تعداد نمونه بیشتر جهت تایید نتایج این تحقیق در مطالعات آینده ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت دانشگاه

- Juszczuk-Kubiak, E., Bujko, K., Cymer, M., Wicińska, K., Gabryszuk, M. and Pierzchała, M. (2016). Effect of Inorganic Dietary Selenium Supplementation on Selenoprotein and Lipid Metabolism Gene Expression Patterns in Liver and Loin Muscle of Growing Lambs. *Biological Trace Element Research*. 172: 336–345.
- Kielar, D., Clark, J.S., Ciechanowicz, A., Kurzawski, G., Sulikowski, T. and Naruszewicz, M. (1998). Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism: clinical and experimental*. 47 (7): 844-847.
- Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N. (2014). Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews*. 94(3): 739–777.
- Li, L., Hongwei, S., Caihong, W., Hangxing, R., Lingyang, X., Fuping, Zh. et al. (2016). Comparison of muscle characteristics and underpinning mechanisms between Texel and Ujumqin sheep aged from day 70 to 135 of gestation. *Livestock Science*. 192: 8–16.
- McCoard, S.A., McNabb, W.C., Peterson, S.W., McCutcheon, S.N. and Harris, P.M. (2000). Muscle growth, cell number, type and morphometry in single and twin fetal lambs during mid to late gestation. *Reproduction, Fertility and Development*. 12: 319-327
- Mohapatra, A. and Shinde, A.K. (2018). Fat-tailed sheep - an important sheep genetic resource for meat production in tropical countries. *Indian Journal of Small Ruminants*. 24(1): 1-17.
- Nassiry, M.R., Shahroudi, F.E., Tahmorespur, M. and Javadmanesh, A. (2007). Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(7): 1062-1067.
- Nassiry, M.R., Valizadeh, R., Tahmorespur, M., Javadmanesh, A. and Foroutani, S. (2010). Study of Genetic diversity of Calpastatin, Calpain and Beta-lactoglobulin loci in Kurdi sheep of North Khorasan. *Iranian Journal of Animal Science Research*. 2 (2): 163-170.
- Ren, H., Li, L., Su, H., Xu, L., Wei, C., Zhang, L. et al. (2011). Histological and transcriptome-wide level characteristics of fetal myofiber hyperplasia during the second half of gestation in Texel and Ujumqin sheep. *BMC Genomics*. 12:411.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D. et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 13(11):2498-504.
- Smyth, G. K., Ritchie, M., Thorne, N., Wettenhall, J., Shi, W., and Hu, Y. (2002). Limma: Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data User's Guide.
- Soung, N.K., Park, J.E., Yu, L.R., Lee, K.H., Lee, J.M., Bang, J.K. et al. (2009). Plk1-dependent and -independent roles of an ODF2 splice variant, hCenexin1, at the centrosome of somatic cells. *Developmental Cell*. 16 (4): 539–50.
- Swatland, H.J. and Cassens, R.G. (1974). The role of innervation in muscle development and function. *Journal of animal science*. 38 (5): 1092-1102.
- Tidball, J.G. and Villalta, S.A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology-Regulatory integrative and comparative physiology*. 298: R1173-R1187.
- Walsh, T.P., Winzor, D.J., Clarke, F.M., Masters, C.J. and Morton, D.J. (1980). Binding of aldolase to actin-containing filaments. Evidence of interaction with the regulatory proteins of skeletal muscle. *The Biochemical journal*. 186 (1): 89-98.
- Yan, X., Zhu, M.J., Dodson, M.V. and Du, M. (2013). Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Journal of Genomics*. 1: 29–38.
- Xu, L., Zhao, F., Ren, H., Li, L., Lu, J., Liu, J. et al. (2014). Co-Expression Analysis of Fetal Weight-Related Genes in Ovine Skeletal Muscle during Mid and Late Fetal Development Stages. *International Journal of Biological Sciences*. 10(9): 1039–1050.
- Zafiroopoulos, A., Linardakis, M., Jansen, E.H., Tsatsakis, A.M., Kafatos, A. and Tzanakakis, G.N. (2010). Paraoxonase 1 R/Q alleles are associated with differential accumulation of saturated versus 20:5n3 fatty acid in human adipose tissue. *Journal of lipid research*. 51(7): 1991–2000.

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □