DOI: 10.22092/vj.2019.127720.1618
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

آنالیز بیان ژن ماهیچه اسکلتی به منظور شناسایی ژن‌های مؤثر در فرایند رشد گاو گوشتی

• **فریبا آنه شبه ناصری**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
• **محمدرضا بحرینی بهزادی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
• **زهرا رودباری**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
• **سعیده اسکندری نسب**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۶-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۸-۲۰
Email: bahreini@yu.ac.ir

چکیده

هدف از انجام این پژوهش شناسایی ژن‌های مؤثر در فرایند رشد و نمو گاو گوشتی با استفاده از پروفایل بیان ژن می‌باشد. رشد به عنوان تغییرات وزن زنده در هر واحد زمان یا توصیف نموداری وزن در مقابل سن حیوان بیان می‌شود. رشد حیوان نتیجه فرآیندهای زیستی متعددی است و ژنوتیپ، تعیین کننده حداکثر سطحی است که این فرآیندها می‌توانند رخ دهند. در این مطالعه داده‌های خام مربوط به سنین تولد، سه ماهگی، هفت ماهگی، ۱۲ ماهگی، ۲۰ ماهگی، ۲۵ ماهگی و ۳۰ ماهگی با فرمت TXT از پایگاه داده ArrayExpress با شماره دسترسی E-GEOD-25554 دانلود شدند. در مرحله بعد، ابتدا کنترل کیفیت داده‌های خام موجود با استفاده از بسته Limma، موجود در نرم‌افزار R با روش تحلیل مؤلفه‌های اساسی (PCA) و سپس نرمال‌سازی داخل ریزآرایه‌ها با استفاده از روش LOESS و بین نمونه‌ها به روش چندک انجام شد. معیارهای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی و معنی‌داری دو شاخص (۲- > Fold Change > ۲) و (۰/۰۵ > Adj P-Value) بودند. بررسی مسیرهای زیستی توسط پایگاه DAVID انجام شده و بازسازی شبکه تنظیم بیان ژن توسط نرم‌افزار Cytoscape صورت گرفت. نتایج آنالیز نشان داد در سنین متفاوت در مجموع ۱۰۳۰ ژن مرتبط با رشد تفاوت معنی‌داری داشتند که از این تعداد ۵۱۸ ژن افزایش بیان و ۵۱۲ ژن کاهش بیان داشتند. از جمله مسیرهای سیگنال‌دهی مؤثر بر فرایند رشد می‌توان IGF-I، Insulin، Wnt را نام برد و از مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه STAT3، CST3، SERPINE1، HMOX1، PCK1، SOD2، FN1 و HSPA1A می‌باشند. ژن FN1 در سنین ۲۵-۲۰ و ۳۰-۲۵ ماهگی، SOD2 در سن ۳-۰ ماهگی، HMOX1 در سنین ۳-۰ و ۲۰-۱۲ ماهگی، SERPINE1 در سن ۷-۳ ماهگی، PCK1 در سن ۲۵-۲۰ ماهگی، STAT3 در سن ۲۵-۲۰ ماهگی و HSPA1A در سن ۳۰-۲۵ ماهگی افزایش بیان معنی‌داری داشتند. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک بهتر ارتباط ژن‌ها و مسیرهای زیستی آن‌ها در فرایند رشد و استفاده در برنامه‌های اصلاح نژاد دام فراهم آورد.

کلمات کلیدی: آنالیز شبکه، بیوانفورماتیک، پایگاه داده، ریزآرایه، مسیر زیستی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 123-131

Gene expression analysis of skeletal muscle to identify genes that influence bovine growth process

By:Aneh Shebh Naseri, F., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University. Bahreini Behzadi, M.R., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University. Roudbari, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft. and Eskandarynasab, S., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University.

Received: 2019-09-13 **Accepted: 2019-11-11**

Email: bahreini@yu.ac.ir

The purpose of this study was to identify genes that influence bovine growth process using gene expression profile. Growth can be expressed as the change of live weight based on time unit or graph description of weight against animal age. Growth is the result of different biological processes and genetics determines the highest level that these processes can occur. In this study raw data at birth, 3, 7, 12, 20, 25, and 30 months in TXT format were obtained from ArrayExpress database with E-GEOD-2554 accession number. In the next step, the quality control assessment of the existing raw data was performed using Limma package in R environment by PCA method and then the intra array normalization was done by LOESS method and between samples by quantile method. The criteria for identifying genes with differential expression were the absolute value of fold change larger than 2 and adj P-Value < 0.05. DAVID database was used for investigation of biological pathways and reconstruction of the gene expression network were done by Cytoscape software. The results showed that there were significant differences in expression of 1030 growth-related genes at different ages. 518 genes were associated with increased expression and 512 genes with reduced expression. The Wnt, insulin and IGF-I were main signaling pathways that influences growth process. The most important genes identified in this study were FN1, SOD2, HMOX1, SERPINE1, PCK1, STAT3 and HSPA1A. FN1 gene at 20-25 and 25-30 months of age, SOD2 gene at 0-3 months of age, HMOX1 gene at 0-3 and 12-20 months of age, SERPINE1 gene at 3-7 months of age, PCK1 gene at 20-25 months of age, STAT3 gene at 20-25 months of age and HSPA1A gene at 25-30 months of age have a significant increase in expression. Therefore, the results of this study could provide additional information to better understand the relationship between genes and their biological pathways in the growth process that can be used in animal breeding programs.

Keyword: Network Analysis, Bioinformatics, Database, Microarray, Biological Pathway

مقدمه

از مزایای علم بیوانفورماتیک، شناخت ژن‌هایی است که در امر انتخاب برای صفات تولیدی مفید و سود آورند. با توجه به اینکه ارتباط برخی ژن‌ها با تنوع موجود در صفات تولیدی بسیار زیاد است از آن‌ها به عنوان ژن‌های کاندیدا استفاده می‌شود (۱۰). ژن‌های کاندیدا برای یک صفت خاص عبارتند از ژن‌های توالی‌یابی شده‌ای که فعالیت زیستی آن‌ها شناخته شده و در تکامل یا فعالیت فیزیولوژیکی آن صفت دخالت دارند (۲۰). یکی از صفات فیزیولوژیکی مهم در حیوانات اهلی صفت رشد می‌باشد. رشد به عنوان تغییرات وزن زنده در هر واحد زمان یا توصیف نموداری وزن در مقابل سن حیوان بیان می‌شود و نیز یک صفت کمی می‌باشد که توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود. رشد و نمو یک فرایند پیچیده و شامل مراحل متعدد تکثیر و تمایز است (۲۳). رشد و نمو در طول حیات هر حیوان شامل دو مرحله، قبل از تولد یا داخل رحمی و بعد از تولد (بلوغ، پیری و مرگ) می‌باشد که در حیوانات مزرعه‌ای به دلیل ماهیت اقتصادی تولید، رشد و نمو بعد از تولد بیشتر مورد توجه می‌باشد (۲۳). رشد و نمو حیوان نتیجه فرآیندهای زیستی متعددی است و ژنوتیپ، تعیین‌کننده حداکثر سطحی است که این فرآیندها می‌توانند رخ دهند. عوامل محیطی نیز بروز پتانسیل ژنتیکی حیوان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و از مهمترین عواملی هستند که کمک می‌کنند تا ژنوتیپ به صورت فنوتیپ در موجود زنده ظاهر شود (۳). پروفایل بیان ژن، میزان فعالیت ژن‌های متعدد را به طور هم‌زمان برای ایجاد تصویری جامع از عملکرد سلول نشان می‌دهد. این پروفایل می‌تواند سلول‌های دارای

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت متفاوت را تشخیص داده و یا اینکه نشان دهد چگونه سلول‌ها در مواجهه با یك تیمار خاص عمل می‌کنند (۱۴). فن‌آوری ریزآرایه DNA میزان بیان نسبی ژن‌هایی که قبلاً شناسایی شده‌اند را اندازه‌گیری می‌کند. ایجاد پروفایل بیان ژن یك مرحله بعد از تعیین توالی ژنوم محسوب می‌شود. تعیین توالی ژنوم در مورد آنچه که سلول می‌تواند انجام دهد، اطلاعات می‌دهد، در حالیکه پروفایل بیان ژن اطلاعاتی در مورد آنچه که واقعاً در سلول در حال وقوع می‌باشد، ارائه می‌دهد (۲۲). ژن‌ها حاوی دستورالعمل‌هایی برای ایجاد mRNA می‌باشند، اما در هر زمان هر سلول، mRNA را از ژن‌های فعال می‌سازد. اگر ژنی برای تولید mRNA استفاده شود، آن ژن فعال بوده و در غیر اینصورت غیر فعال می‌باشد (۱۱). اغلب آزمایش‌های پروفایل بیان ژن بر اساس اندازه‌گیری مقدار نسبی mRNA در دو یا چند شرایط محیطی می‌باشد. این کار به دلیل تغییر سطوحی از توالی mRNA خاصی می‌باشد که این تغییر، باعث کد کردن پروتئین مربوطه شده و نشان دهنده یک پاسخ هموستاتیکی یا شرایط بیماری‌زایی می‌باشد (۱۱). به کارگیری نتایج تحلیل مسیرهای زیستی و شبکه ژنی در ارزیابی‌ها و انتخاب‌های ژنومی رایج می‌تواند ابزار اصلی اصلاح‌گران دام را متحول نموده و زمینه‌ساز ورود به عصر پساژنومی در اصلاح نژاد حیوانات اهلی گردد (۹). بر این اساس، هدف از انجام این پژوهش شناسایی ژن‌های مؤثر در فرایند رشد و نمو در گاو با استفاده از پروفایل بیان ژن و تدوین استراتژی برای معرفی، ورود و تلفیق داده‌های بیان ژن و آنالیزهای بیوانفورماتیکی در فرایند ارزیابی و انتخاب حیوانات اهلی است.

مواد و روش‌کار

آماده‌سازی و تهیه اطلاعات

اولین گام در شناسایی ژن‌های مؤثر در مسیرهای زیستی، جمع‌آوری و ارزیابی داده‌های موجود می‌باشد. بر همین اساس، داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در این تحقیق که در جدول ۱ آورده شده است، مربوط به بافت ماهیچه عضلانی از گوساله گوشتی در دوران پس از تولد که دارای عملکرد متفاوتی در رشد عضلات و متابولیسم چربی هستند، انتخاب شد. داده‌های خام مربوط به سنین تولد، ۳ ماهگی، ۷ ماهگی، ۱۲ ماهگی، ۲۰ ماهگی، ۲۵ ماهگی و ۳۰ ماهگی با فرمت TXT از پایگاه داده ArrayExpress با شماره دسترسی E-GEOD-25554 دانلود شدند. بیان ژن‌ها با استفاده از پلت فرم Agilent-015354 Bovine Oligo Microarray (4x44K) اندازه‌گیری شده است. در جدول ۱ شماره دسترسی نمونه بافت ماهیچه استفاده شده در تحقیق حاضر آورده شده است.

کنترل کیفیت و نرمال‌سازی داده‌ها

قبل از آنالیز بیان ژن‌های اندازه‌گیری شده توسط تکنیک ریزآرایه، کنترل کیفیت داده‌های خام مورد نیاز است و از طرفی اطلاعات زیاد حاصل

جدول ۱- شماره دسترسی داده‌های بیان بافت ماهیچه گاو استفاده شده

گروه آزمایشی	شماره دسترسی
تولد	GSM۶۲۸۱۲۰
۳ ماهگی	GSM۶۲۸۱۴۵
۳ ماهگی	GSM۶۲۸۱۳۷
۷ ماهگی	GSM۶۲۸۱۴۶
۷ ماهگی	GSM۶۲۸۱۳۸
۱۲ ماهگی	GSM۶۲۸۱۵۵
۱۲ ماهگی	GSM۶۲۸۱۴۳
۲۰ ماهگی	GSM۶۲۸۱۵۶
۲۰ ماهگی	GSM۶۲۸۱۴۴
۲۵ ماهگی	GSM۶۲۸۱۵۷
۲۵ ماهگی	GSM۶۲۸۱۴۹
۳۰ ماهگی	GSM۶۲۸۱۶۰
۳۰ ماهگی	GSM۶۲۸۱۵۲

www.SID.ir

Archive of SID

از ریزآرایه‌ها می‌تواند باعث مشکلاتی در چگونگی آنالیز این اطلاعات گردد. برای این منظور باید داده‌های بیان ژن در آزمایشات ریزآرایه با روش‌های آماری نرمال شده و اثرات جانبی ناخواسته حذف گردند. در این تحقیق کنترل کیفیت داده‌های خام موجود با استفاده از بسته Limma موجود در نرم‌افزار R با روش تحلیل مؤلفه‌های اساسی (PCA) و سپس نرمال‌سازی داخل ریزآرایه‌ها با استفاده از روش LOESS و بین نمونه‌ها به روش چندک انجام شد.

آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها

هر آنالیز تفاوت بیان ژن دو هدف عمده را دنبال می‌نماید. ابتدا تخمینی از بزرگی تفاوت بیان ژنی بین دو یا چند وضعیت که بر اساس مقدار لگاریتم Fold Change به دست می‌آید، انجام می‌شود. سپس معنی‌دار بودن تفاوت بیان ژنی و تصحیح برای آزمون چندگانه تخمین زده می‌شود. در این مطالعه بررسی میزان تفاوت بیان ژن یا ترانسکریپت در بافت ماهیچه عضلانی بین سن تولد با سایر سنین انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل و همچنین تصویرسازی نتایج و داده حاصل از آنالیز تفاوت بیان ژن از بسته نرم‌افزاری Limma استفاده می‌شود. این بسته مبتنی بر R بوده و نتایج را به شکل قابل فهمی ارائه می‌دهد. معیارهای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی و معنی‌دار شامل (۲- > Fold Change > ۲) و (Adj P-Value < ۰،۰۵) بودند.

آنالیز مسیرهای زیستی

بررسی مسیرهای زیستی و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها به منظور شناسایی ژن‌های مؤثر در دوره‌های زمانی مختلف فرایند رشد، توسط پایگاه DAVID نسخه ۶/۸ صورت گرفت. این پایگاه داده‌ای با اتصال به پایگاه‌های دیگر مانند GO و KEGG به بررسی عملکردی و مسیرهای زیستی ژن‌های معنی‌دار می‌پردازد. نتایج بر اساس روش‌های آماری مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند که در این مطالعه بر اساس سطح معنی‌داری ۵ درصد گزارش شد.

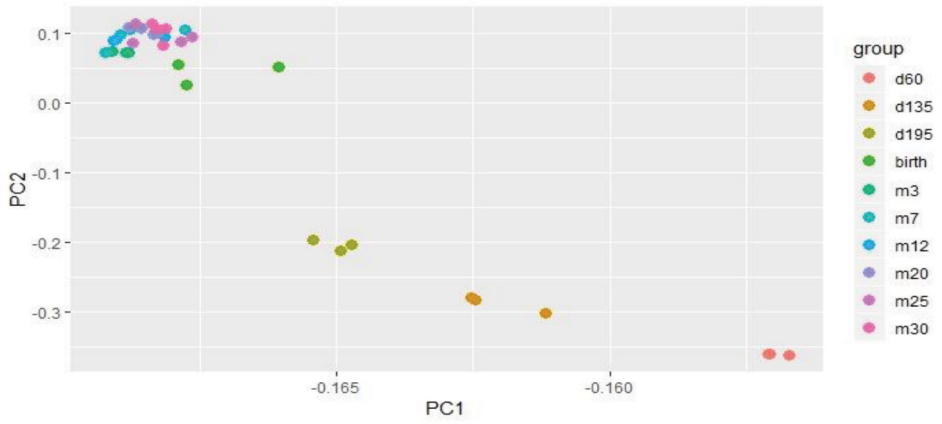
آنالیز شبکه

در این مطالعه به بازسازی شبکه تنظیم بیان ژن و مطالعه روابط بین ژن‌های دخیل در رشد و نمو ماهیچه با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape پرداخته شد که یک نرم‌افزار بیوانفورماتیکی برای تجزیه و تحلیل شبکه‌های مولکولی پیچیده و مجسم‌سازی اطلاعات می‌باشد. ژن‌هایی که بیشترین نقش بیولوژیکی را در رشد و نمو داشتند و در مرحله قبل انتخاب گردیدند به عنوان ورودی این بسته آماری مورد استفاده قرار گرفتند. این برنامه بر اساس میزان همبستگی که در ژن‌های مربوطه وجود دارد، به ترسیم شبکه بیان ژن می‌پردازد. پس از آنالیز شبکه و مشخص شدن آماره‌های شبکه با استفاده از نوار ابزار افزونه‌ها گزینه CYTONCA، شبکه بر اساس درجه ارزش ژن و مرکزیت بینابینی ویرایش شد. به این ترتیب از نظر ارزش، درجه ارتباط با گره‌های دیگر و مرکزیت درونی و میانی بزرگ، نشان دهنده ژن‌هایی هستند که درجه تنظیم کنندگی بیشتری در شبکه دارند (۱۶).

نتایج و بحث

کنترل کیفیت داده‌ها

چون شروع هر آنالیز با استفاده از خوانش‌های خام است بنابراین در اولین مرحله بایستی بررسی کیفیت کلی داده‌ها انجام شود. ایده‌آل آن است که کنترل کیفی، جامع و فعال باشد. کنترل کیفی را باید به



شکل ۱- نمودار بررسی تنوع بر اساس آنالیز PCA در بین گروه‌های آزمایشی

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان فرصتی برای شناخت داده در نظر گرفت که امکان انجام تجزیه و تحلیل‌های پایین دست و بعدی را با مفروضات و پارامترهای مناسب ایجاد می‌نماید. در این حالات حتی با وجود کشف خطاها و نقص در داده، این امکان وجود دارد که آن‌ها را برطرف نمود (۶).

در این مطالعه، بعد از دانلود پروفایل بیان ژن‌های تولید شده توسط تکنیک ریزآرایه، بررسی کیفیت داده‌ها و نرمال‌سازی داده‌ها برای دوره‌های زمانی مختلف رشد ماهیچه بعد از تولد با استفاده از روش تحلیل مؤلفه‌های اساسی (PCA) انجام شد که در این روش، کل واریانس مجموعه داده‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد و در واقع این روش برای کاهش تعداد متغیرها نسبت به تعداد متغیرهای اساسی به کار می‌رود یا به عبارتی میزان تنوع بین نمونه‌ها را بررسی می‌کند. نمودار PCA نشان دهنده نتایج آنالیز کنترل کیفیت داده‌ها بعد از نرمال‌سازی می‌باشد (شکل ۱). نتایج حاکی از توزیع مناسب این نمونه‌ها بود و بنابراین امکان انجام آنالیزهای بعدی بر روی این نمونه‌ها میسر شد.

نمودار PCA نشان دهنده تنوع در بین نمونه‌ها در بازه زمانی مختلف از رشد ماهیچه از قبل تولد تا بعد از تولد است و همچنین نتایج نشان دهنده عدم تفاوت در بین تکرارهای تیمارها (دوره زمانی مختلف) می‌باشد که فقط نمونه‌های بعد از تولد جهت بررسی بیشتر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است.

آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها

بیان ژن فرایندی است که در آن از اطلاعات درون ژن استفاده می‌شود تا یک محصول کاربردی از آن به دست آید. در علم ژنتیک، بیان ژن یکی از مهم‌ترین مسائل بنیادی است که کمک می‌کند تا ژنوتیپ به صورت فنوتیپ ظاهر شود. در واقع کدهای ژنتیکی که در رشته‌های DNA ذخیره می‌شوند به وسیله بیان ژن تفسیر می‌شوند و خصوصیات و نحوه بیان ژن، باعث بوجود آمدن فنوتیپ‌های خاص در موجود زنده خواهد شد (۱۴). در این مطالعه نتایج آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها نشان داد که در پروفایل آنالیز شده در سنین متفاوت در مجموع ۱۰۳۰ ژن مرتبط با رشد تفاوت معنی‌داری داشتند که ۵۱۸ ژن افزایش بیان و ۵۱۲ ژن کاهش بیان داشتند. تعداد ژن‌ها با بیان افتراقی در دوره‌های مختلف زمانی در جدول ۲ آورده شده است. بعضی از این ژن‌ها در دوره‌های زمانی مختلف با هم مشترک بودند که در سنین ۲۵-۲۰ و۳۰-۲۵ ماهگی بیشترین اشتراک را داشتند.

مسیرهای زیستی

نتایج آنالیز با نرم‌افزار DAVID نشان داد که ژن‌های شناسایی شده بعد از انجام آنالیز هستی‌شناسی و بر اساس مستندسازی در مسیرهای زیستی IGF-I، MAPK، Insulin، Wnt نقش دارند. مولکول‌های سیگنالی که می‌توانند به عنوان مورفوژن عمل نمایند، الگوی شبکه ژنتیکی ساختمان بافت را در تمام طول عمر از مرحله رویان در حال رشد تا ارگانیزم بالغ کنترل می‌نمایند. مورفوژن‌ها بستگی به میزان ترشح و فاصله منبع ترشح، می‌توانند واکنش‌های کیفی مختلف سلولی را ایجاد نمایند. بنابراین سیگنال‌ها ممکن است در هر مرحله‌ای به تحریک کننده و یا ممانعت کننده میوژنزی ترجمه شوند. ترکیب صحیحی از تمامی سیگنال‌های مختلف که سلول‌ها دریافت می‌کنند اجازه می‌دهد از سلول‌های آماده برای تمایزیابی و نیز از سلول‌های بنیادین در حال سکون، یک مخزن کافی و مناسب در طول دوره رشد و نمو تا دوران بلوغ وجود داشته باشد (۱۲). مسیر Wnt برای ساخت میوتوم مورد نیاز است. این سیگنال در میوبلاست‌های در حال تمایز وجود دارد و در رشد عضلات جنینی، حفظ هموستازی عضلات اسکلتی و کنترل عوامل نظارتی میوژنیک در دوران بعد از تولد نقش دارد (۲۴). IGF-I فاکتور رشد جهت تکثیر سلول‌های پستانداران می‌باشد که دارای فعالیت میتوژنی می‌باشد. IGF-I به گیرنده تیروزین کینازی خود متصل شده و باعث فعال شدن دو مسیر سیگنال‌دهی مهم MAPK/ERK و PI3K/AKT می‌شود و در نهایت منجر به فعالیت فیزیولوژی متعدد درون سلولی مانند پیشرفت چرخه سلولی، تمایز، تکثیر،

جدول ۲- تعداد ژن‌های با بیان افتراقی در دوره‌های مختلف زمانی

گروه‌های آزمایشی	تعداد ژن‌های با بیان بالا	تعداد ژن‌های با بیان پایین	تعداد ژن‌ها (بعد از انجام آنالیز هستی‌شناسی)
تولد تا ۳ ماهگی	۷۹	۶۲	۵۳
۳ تا ۷ ماهگی	۶۲	۱۰۶	۲۹
۷ تا ۱۲ ماهگی	۱۰۱	۱۲۰	۵۲
۱۲ تا ۲۰ ماهگی	۹۳	۹۴	۶۹
۲۰ تا ۲۵ ماهگی	۹۰	۲۹	۶۹
۲۵ تا ۳۰ ماهگی	۹۳	۱۰۱	۵۸

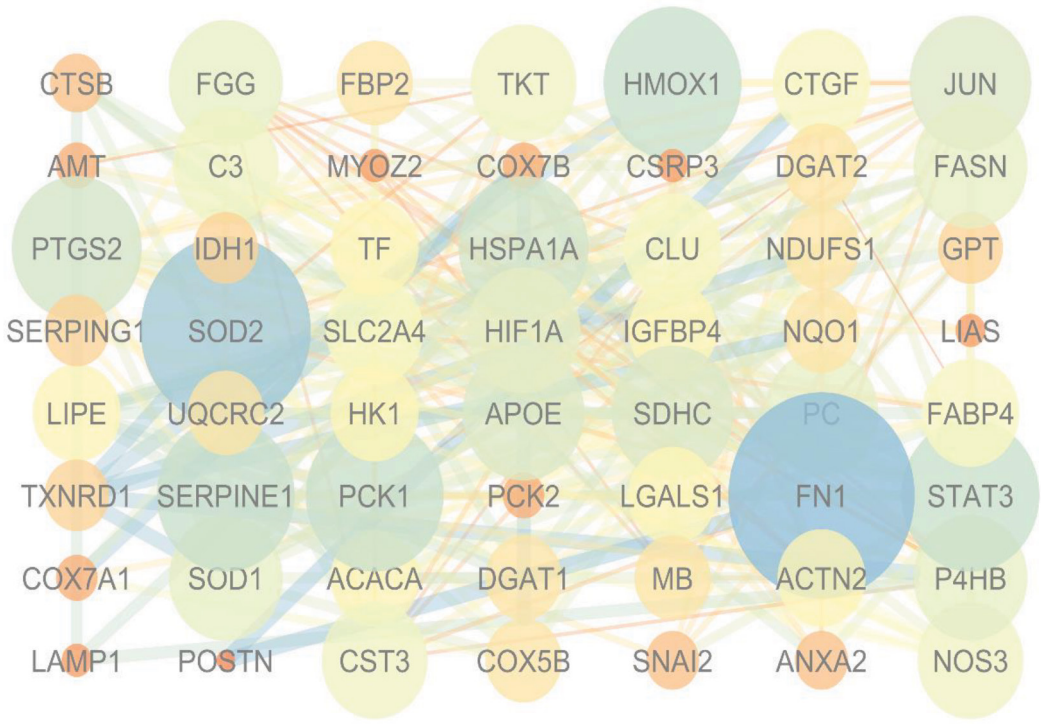
www.SID.ir

Archive of SID

حفظ بقاء سلول‌ها می‌شود. IGF-I همچنین در رشد بافت‌های مختلف (سلول‌های ماهیچه، غضروف و استخوان) تحریک سنتز پروتئین، افزایش متابولیسم قندها و چربی‌ها در بدن، محرک تقسیم میتوز و حمل گلوکز می‌باشد (۱۸). انسولین در واقع یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های بدن است. نقش اصلی که دارد به مواد مغذی اجازه می‌دهد برای ورود به بافت‌های بدن وارد جریان خون شوند. همچنین باعث می‌شود منابع انرژی بدن ذخیره شده و به تشکیل گلیکوژن، عضله‌سازی و ذخیره چربی کمک می‌کند. انسولین به صورت غیرمستقیم باعث افزایش اندازه عضلات شده و به این صورت باعث می‌شود تا رگ‌های خونی گشادتر گردند و در نتیجه جریان خون بیشتری وارد عضلات شود که باعث افزایش اندازه عضلات می‌شود (۱۳). طبق مطالعه‌ای که علی‌پناه و همکاران (۲) بر روی مسیرهای زیستی دخیل در رشد بدن گاو با استفاده از داده‌های بیان ژن داشتند، نشان دادند که مسیرهای IGF-1 و MAPK جزء مسیرهای زیستی دخیل در بدن گاو هستند که این مسیرها قبل از تولد و بعد از تولد بر روی رشد تأثیرگذار می‌باشند (۲).

نتایج ترسیم شبکه و شناسایی ژن‌های کاندیدا در مراحل مختلف رشد یکی از روش‌های درک بهتر فرایندهای فیزیولوژیکی بررسی شبکه‌های تنظیم ژنی می‌باشد و به محققین این امکان را می‌دهد تا مطالعه همه ژن‌ها در کنار یکدیگر انجام شود (۲۱). در مطالعه حاضر، شبکه تنظیمی ترسیم شده حاصل از معرفی ۵۶ ژن که بیشترین تأثیر را بر فرایند رشد و نمو داشتند توسط نرم افزار Cytoscape در شکل ۲ ارائه شده است.

در این شبکه‌ها روابط بین ژن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. برخی از پارامترها کمک می‌کنند تا از میان تمام ژن‌های شبکه، آن‌هایی که عامل اصلی ارتباط داخل شبکه هستند شناسایی شوند. برای هر گره در شبکه، آماره‌ای به نام مرکزیت بینابینی یا میانی تعریف می‌شود. این آماره نشان دهنده میزان تأثیر گره مورد نظر بر اثرات متقابل سایرگره‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر این پارامتر نشان می‌دهد گره‌هایی که دارای همسایه نیز می‌باشند دارای رتبه بالاتری هستند. آماره بعدی که در تشخیص ژن-های مؤثر در شبکه به کار می‌رود مرکزیت درونی می‌باشد. این پارامتر به تعداد گره‌هایی اشاره دارد که در نزدیکترین فاصله نسبت به گره مورد نظر قرار دارد و به سرعت می‌تواند با سایر گره‌ها ارتباط برقرار کند (۲۱). با توجه به آماره‌های توضیح داده شده ژن‌های با بیشترین اثر در



شکل ۲- شبکه برهمکنشی ژن‌های مؤثر بر فرایند رشد ماهیچه اسکلتی در گاو گوشتی. تغییر رنگ از آبی به قرمز ( ) و اندازه بزرگتر گره‌ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر آنها می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

سنین مختلف در جدول ۳ ذکر شده است. در پژوهش حاضر، ژن‌های دارای اثر تنظیم شوندگی بالاتر و معنی‌دار در مسیرهای زیستی مرتبط با صفت رشد و با درجه پیوند بالاتر از ۱۳ در جدول ۳ نشان داده شده‌اند و به صورت مختصر نیز مورد بحث قرار گرفته‌اند.

اولین ژن مطرح در شبکه، ژن FN1 با درجه پیوند ۲۳ می‌باشد که یک جزء ضروری و موجود در ماتریکس خارج سلولی است. نقش آن به عنوان تنظیم کننده فعالیت‌های سلولی و یک داربست مهم پروتئینی برای حفظ بافت است. این ژن دارای نقش گوناگونی از جمله چسبندگی سلولی، پیوند و رشد سلول و مهاجرت سلولی می‌باشد (۲۵). بر اساس نتایج مشاهده شده در این تحقیق ژن FN1 در سیگنال‌دهی اینترلوکین، ماتریکس فیبرونکتین و مسیر سیگنال‌دهی MAPK نقش دارد. دومین ژن مطرح ژن SOD2 با درجه پیوند ۱۸ می‌باشد که در تجمع چربی در ماهیچه‌های اسکلتی نقش دارد، این ژن در عضله برای زنده ماندن و افزایش طول عمر مؤثر است. طبق آزمایشاتی که انجام شده است، نشان دادند که کاهش بیان SOD2 در عضله باعث کوتاه شدن طول عمر و تسریع کاهش حرکت می‌شود (۵). ژن دیگر مورد مطالعه HMOX1 می‌باشد که در افزایش جریان خون، بازسازی سلول‌ها، ترشح هورمون هیپوفیز، رشد جنین و ترشح آنزیم تیروزین کیناز فعالیت دارد (۴). این ژن در کاتابولیک هم (آهن) و تنظیم سلولی ماهیچه صاف مؤثر می‌باشد. ژن *SERPINE1* در چندین فرایند بیولوژیکی و مسیرهای مرتبط با متابولیسم که در ماهیچه رخ می‌دهد، همچنین در مراحل اولیه رشد، تمایز و افزایش کیفیت گوشت در گاو گوشتی فعال است (۱۷). مطابق با نتایج به دست آمده از بخش شناسایی ژن‌های هدف در مطالعه حاضر، ژن *PCK1* در فرایند متابولیسم هگزوزها، گلوکونئوژنیک، فرایند بیوسنتیک تری‌گلیسروئیدها و فعالیت پروتئین‌ها نقش دارد. در مطالعات دیگر نشان داده شده است که یکی از ژن‌های تنظیم کننده گلیکوژنز و گلیسرونئوژنز بوده و جایگزینی یک اسید آمینه منفرد است که در چربی داخل عضلانی و افزایش ضخامت چربی نقش دارد. در بافت‌هایی که هیچ گونه گلوکززایی رخ نمی‌دهد نقش اساسی در گلوکونئوژنززایی دارد و گلیسرو ۳ فسفات را به عنوان یک پیشرونده برای استریل کردن اسیدهای چرب در ترکیبات تری‌گلیسرید فراهم می‌کند. از این ژن به عنوان یک ژن کاندیدا جهت تغییر محتوای چربی خوک استفاده می‌شود. این ژن همچنین در تغییرات متابولیکی بافت هم نقش دارد (۱۹). نتایج پژوهش حاضر نشان داد، ژن *STAT3* در تنظیم مثبت انتقال سیگنال و رفتار تغذیه‌ای نقش دارد. این ژن ۱۵۹۴۷ جفت باز دارد که شامل ۱۹ اگزون کد کننده است و اسید آمینه‌ای به طول ۷۹۴ زنجیره را کد می‌کند و در تنظیم بیان ژن در پاسخ به سیگنال‌های گیرنده سیتوکینین دخیل می‌باشد .همچنین در رشد و تمایز سلول‌ها نقش دارد و عامل رشد فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد پلاکتی، عامل رشد هپاتوسیت و فاکتور تحریک کننده گرانولیست‌هاست (۱). آخرین ژن مطرح در مطالعه حاضر با درجه پیوند ۱۳، HSPA1A می‌باشد که نقش مهمی در آپوپتوز سلول اندوتلیال و مسیر سیگنال‌دهی MAPK دارد که یکی از مسیرهای مهم در رشد و نمو می‌باشد (۱۵). طبق نتایج حاصل از DAVID در پژوهش حاضر، این ژن در مسیر سیگنال‌دهی MAPK، NRF2 و تنظیم مثبت اینترلوکین ۸ نقش دارد. ژن‌های دیگر ارائه شده در شبکه که جزو ژن‌های هاب نیستند ولی نقش آن‌ها در رشد و نمو در مقالات دیگر به اثبات رسیده مانند PTGS2 که باعث افزایش متابولیسم گلوکز می‌شود (۸) و SDHC که در مجموع زنجیره حمل و نقل و انتقال الکترونی میتوکندری دخیل است و مسئول انتقال الکترون‌ها از سوکسینات به کوآنزیم Q می‌باشد (۷).

نتیجه‌گیری

در بررسی پروفایل بیان ژن بافت عضله در گاو گوشتی مشخص شد

جدول ۳- ژن های هاب با درجه پیوند بالاتر از ۱۳

ژن های هاب	بیان شده در دوره زمانی	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
FN1	۲۰-۲۵ و ۲۵-۳۰ ماهگی	۲۳	۰/۱۴	۰/۵۲
SOD2	۰-۳ ماهگی	۱۸	۰/۱۶	۰/۵۲
HMOX1	۱۲-۲۰ و ۰-۳ ماهگی	۱۴	۰/۰۳۶	۰/۵۱
SERPINE1	۳-۷ ماهگی	۱۴	۰/۰۳۴	۰/۴۷
PCK1	۲۰-۲۵ ماهگی	۱۴	۰/۰۹	۰/۵۵
STAT3	۲۰-۲۵ ماهگی	۱۴	۰/۰۸	۰/۵۱
HSPA1A	۲۵-۳۰ ماهگی	۱۳	۰/۰۶۵	۰/۵۶

www.SID.ir

Archive of SID

که در مجموع ۱۰۳۰ ژن تفاوت معنی‌داری داشتند که ۵۱۸ ژن افزایش بیان و ۵۱۲ ژن کاهش بیان داشتند. اکثر این ژن‌ها در فرایندهایی مانند رشد و تکثیر سلول نقش دارند. مسیرهای زیستی شناخته شده در این مطالعه IGF-I، MAPK، Insulin، Wnt می‌باشند که ارتباط مستقیمی با صفت رشد لاشه دارند. بر اساس نتایج آنالیز شبکه ترسیم شده توسط ژن‌های مؤثر بر رشد که با درجه پیوند بالای ۱۳ مشخص شد، تعداد هفت ژن بیشترین اثر تنظیم کنندگی بر فرایند رشد را دارند. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک بهتر ارتباط ژن‌ها و مسیرهای زیستی آن‌ها در فرایند رشد فراهم آورد. امید است با استفاده از ژن‌هایی که در این مطالعه شناسایی شد به کنکاش بهتر صفت رشد به منظور بهبود آن در برنامه‌های اصلاح نژادی گاو گوشتی پرداخته شود. زیرا در بین تعداد بسیار زیاد ژن‌ها و مسیرهای زیستی دخیل در این فرایند مهم اقتصادی، معرفی آن‌ها به متخصصین ژنتیک کمک می‌کند تا در تدوین استراتژی‌های اصلاح‌نژادی برای بهبود صفت رشد با استفاده از ژن‌ها و مسیرهای زیستی مرتبط تأکید بیشتر نمایند. بدین ترتیب احتمالاً در زمان کوتاهتری اهداف اصلاح نژادی مورد نظر تحقق خواهد یافت.

منابع مورد استفاده

1-Akira, S. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 109: 1143-1148.

2-Alipanah, M., Z. Roudbari, A. Javadmanesh, M. Sataei Mokhtari, H. Seyedabadi and F. Gharari. 2018. Identification of biological pathways involved in body growth of cattle using gene expression profiles, *Animal Sciences Journal*, 31(119): 59-70.

3-Andrae, J. and C. Betsholtz. 2008. Role of derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and development* 22(10): 1276-1312.

4-Ayer, A., A. Zarjou, A. Agarwal and R. Stocker. 2016. Heme oxygenises in cardiovascular health and disease. *Physiological Reviews* 96(4): 1449-1508.

5-Barberi, L., B.M. Scicchitano, M. Rossi, A. Biogot, S. Duguez, A. Wielgosik and C. Franceschi. 2013. Age-dependent alteration in muscle regeneration the critical role of tissue. *Biogerontology* 14(3): 273-292.

6-Bolger, A., F. Scossa, M.E. Bolger, C. Lanz, F. Maumus, T. Tohge and E.A. Fich. 2014. The genome of the stress-tolerant wild tomato species solanum pennellii. *Nature Genetics* 46(9): 1034.

7-Bukurova, Y.A., S.L. Khankin, G.S. Krasnov, E.S. Grigoreva, T.D. Mashkova, N.A. Lisitsyn and V.L. Karpov. 2010. Estimation of the efficiency of 2D analysis and bioinformatics search in identification of protein markers for colon tumors. *Molecular Biology* 44(2): 334-340.

8-Caixeta, E.S., M.L. Sutton, R.B. Gilchrist, J.G. Thompson, C.A. Price, M.F. Machado and J. Buratini. 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 146(1): 1389-1399.

9-Cameron, N.D. 1997. Selection indices and prediction of genetic merit in animal breeding. First edition. CAB International.

10-Casas, E., S.D. Shackerford, J.W. Keele, R.T. Stone, S.M. Kanopes and M. Koohmareie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate from of myostatin. *Journal of Animal Science* 78: 560-569.

11-Cookson, W., L. Liang, G. Abecasis and M. Moffatt. 2009. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nature Reviews Genetics* 10(5): 184-194.

12-Druka, A., E. Potokina, Z. Luo, N. Jiang, X. Chen, M. Kearsey and R. Waugh. 2010. Expression quantitative trait loci analysis in plants. *Biotechnology* 8(1): 10-27.

13-Gerrard, D.E. and A.L. Grant. 1994. Insulin-like growth factor-II expression in developing skeletal muscle of double muscled and normal cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 11(4): 339-347.

14-Gottesfeld, J.M. and C.F. Barbas. 2003. RNA as a transcriptional activator. *Chemistry and Biology* 10(7): 584-585.

15-Gupta, S., M.R. Clarkson, J. Duggan and H.R. Brady. 2000. Connective tissue growth factor potential role in glomerulosclerosis and tubule interstitial fibrosis. *Kidney International* 58(4): 1389-1399.

16-Hessani, Z.H., M.R. Nasiri, M.R. Bakhtiarizadeh, M. Tahmourespur, A. Javadmanesh. 2018. Gene expression analysis on apoptosis network and design it in Esfahani and Ross breeds. *Iranian Journal of Animal Science Research* 10(1): 117-130 (Abstract in English).

17-Huang, W., Y. Guo, W. Du, X. Zhang, A. Li and X. Miao. 2017. Global transcriptom analysis identifies differentially expressed genes related to lipid metabolism in wagyu and Holstein cattle. *Scientific Reports* 7(1): 5278-5286.

18-Koojman, R. 2006. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF-I). *Cytokine and Growth Factor Reviews* 17(4): 305-323.

19-Latorre, P., C. Burgos, J. Hidalgo, L. Varona, J.A. Carrodeguas and P. Lopez-Buesa. 2016. C.A2456C- substitution in PCK1 changes the enzyme kinetic and functional properties modifying fat distribution pigs. *Scientific Reports* 6: 19617.

20-Lei, M., Q. Nie, X. Peng and X. Kodama. 2005. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulike factor binding protein 2 genes associated with chicken growth and carcass traits. *Poultry Science* 84(1): 1191-1198.

21-Molinelli, E.J., A. Korkut, W. Wang, M.L. Miller, N.P. Gauthier, X. Jing and C.A. Pratilas. 2013. Perturbation biology: inferring

www.SID.ir

Archive of SID

signaling networks in cellular systems. *PLOS Computational Biology* 9(12): e1003290.

22-Rosa, G.J. and B.D. Valente. 2013. Inferring causal effects from observational data in livestock. *Journal of Animal Science* 91(1): 553-564.

23-Tian, J. and S.T. Andreadis. 2009. Independent and high-level dual-gene expression in adult stem-progenitor cells from a signal lentiviral vector. *Gene Therapy* 16(7): 847-884.

24-Von Maltzahn, J., N.C. Chang, C.F. Bentzinger and M.A. Rudnicki. 2012. Wnt signaling in myogenesis. *Trends in Cell Biology* 22(11): 602-609.

25-Wang, Y.H., N.I. Bower, A. Reverter, S.H. Tan, N. Jager, R. Wang and S.A. Lehnert. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *Journal of Animal Science* 87(1): 119-130.

www.SID.ir