



بررسی بیان افتراقی ژن‌ها و مسیرهای درگیر میان آن‌ها در بافت عضله جنین گوسفندان نژاد تکسل و اوجومکین

فهیمه محمدی^۱، علی جوادمنش^۲* و مجتبی طهمورث پور^۲

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* ایمیل نویسنده مسئول: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

رشد عضلات و متابولیسم لیپید نقش مهمی در مراحل رشد جنین دارد. گوسفند نژاد تکسل که در اصل بلژیکی است، نژادی دارای رشد قابل توجه در عضلات و فقدان چربی است که بطور طبیعی دارای جهش در ژن میوستاتین است و گوسفند نژاد چینی اوجومکین، نژادی با دنبه بزرگ است. در این مطالعه به منظور بررسی و درک بهتر ژن‌های موثر و همچنین مسیرهای درگیر بین ژن‌های بیان شده در بافت عضله قبل از تولد در گوسفند، از داده‌های خام بیان ژن مربوط به بافت عضله این دو نژاد گوسفند حاصل از روش ریزآرایه موجود در پایگاه داده‌های NCBI با شماره دسترسی GSE23563 استفاده گردید. ۵ ژن دارای بیان افتراقی ($Adj\ P\text{-Value} < 0.05$) با استفاده از بسته نرم‌افزاری LIMMA در محیط R شناسایی شد که در میان این ژن‌های شناسایی شده، ژن EEF1A2 به عنوان ژن بالقوه نامزد درگیر در توسعه عضلات و متابولیسم لیپید در طی رشد جنین تایید شد. در ادامه آنالیز ماهیت‌شناسی ژن و شناسایی مسیرهای درگیر در ژن‌های با بیان معنی‌دار توسط DAVID نشان داد که تعدادی از ژن‌های دارای بیان افتراقی شناسایی شده در بافت عضله، در فرآیندهایی مانند تکثیر سلولی، چسبندگی سلولی و همچنین مسیرهای مهمی مانند مسیر علامت‌دهی Rap1 درگیر هستند. نتایج این بررسی می‌تواند اطلاعات تکمیلی برای درک بهتر ارتباط بین ژن‌های موثر در فرآیند تشکیل بافت عضله و چربی در دوران جنینی و همچنین مسیرهایی که این ژن‌ها درگیر هستند را فراهم کند. از طرف دیگر ممکن است با بررسی‌های بیشتر در آینده، از جهش‌های موجود در این ژن‌ها به عنوان نشانگرهایی در جهت انتخاب برای وزن تولد در گوسفند استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بافت عضله، بیان افتراقی ژن، جنین گوسفند، مسیر فیزیولوژیکی

مقدمه

عضله اسکلتی عمدتاً از هزاران فیبر انقباضی تشکیل شده است که چند هسته‌ای بوده و از میوبلاست‌ها تشکیل شده است. تشکیل میوفیبریل‌های عضله، طی فرآیندی بنام میوزن (صورت می‌گیرد و حداکثر تشکیل میوفیبریل‌های عضله قبل از تولد و در دوران جنینی است. میوزن قبل از تولد شامل میوزن اولیه و ثانویه است. طی میوزن اولیه در مرحله رویانی، فیبرهای عضلانی اولیه بوجود می‌آیند و طی میوزن ثانویه در مرحله جنینی، فیبرهای عضلانی ثانویه بر روی فیبرهای عضلانی اولیه تشکیل می‌شوند (Yan et al., 2013). بنابراین مرحله‌ای که میوزن ثانویه در حال انجام است، برای رشد عضلات اسکلتی حیاتی است و یک عامل تعیین‌کننده برای عضلانی بودن به شمار می‌رود. بررسی‌ها نشان داده است که بیش از سه موج میوزن ثانویه قبل از تولد در گوسفند ظاهر می‌شود و اکثر میوفیبریل‌ها بعد از ۶۰ روزگی آبدستی تشکیل می‌شوند (McCoard et al., 2000; Wilson et al., 1992) که همزمان با اواسط دوره آبدستی است. رشد بافت‌های عضلانی بعد از تولد نیز فقط توسط هایپر تروفی رخ می‌دهد و شامل تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و بازسازی پروتئین‌ها است (Sadkowski et al., 2006) و بعد از بلوغ نیز، افزایش وزن بواسطه تجمع بافت چربی می‌باشد. لذا رشد عضلات و متابولیسم لیپید نقش مهمی در مراحل رشد جنین دارند و ژن‌ها و مسیرهای علامت‌دهی متعددی می‌توانند در فرآیند تشکیل فیبرهای عضلانی و رشد و نمو

1. Myogenesis

2. Midgestation



آن‌ها نقش داشته باشند. از این رو، در این مطالعه از دو نژاد تکسل و اوجومکین که دارای تفاوت‌های چشم‌گیری در رشد عضلات و چربی هستند استفاده شد. از جمله ویژگی‌های قابل توجه تکسل‌می‌توان به رشد قابل توجه عضلات و فقدان چربی اشاره کرد. بره‌های نر تکسل در مقایسه با سایر نژادها دارای وزن تولد بیشتری هستند. این نژاد همچنین دارای چربی کمتر لاشه به ویژه چربی‌های بین عضله‌ای است، لذا در اروپا و آمریکا از آن به عنوان پایه پدری استفاده می‌شود. این گوسفند به عنوان نژادی با صفات دارای وراثت پذیری بالا، ضریب تبدیل غذایی کم، بیماری‌های متابولیکی حداقل، میش‌های مقاوم و دارای قابلیت مادری عالی، سازگار به شرایط آب و هوایی مختلف و تنوع غذایی مشهور است. گوسفند نژاد اوجومکین نیز که نوع بزرگتر گوسفند مغولستانی است، در نواحی داخلی چین پرورش داده می‌شود. این نژاد به علت محدودیت‌هایی که در رشد گیاهان به دلیل شرایط آب و هوایی در مراتع این نواحی وجود دارد، توسعه یافته است و تمایل دارد مقدار زیادی چربی را در دنبه خود ذخیره کند تا بتواند در زمستان و بهار نیاز خود را برآورده کند. مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعات تکمیلی از ژن‌ها و مسیرهای درگیر در مکانیسم‌های رشد و نمو بافت عضله و چربی را فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه به منظور شناسایی ژن‌های بیان شده در بافت عضلانی در دوران جنینی، دو نژاد تکسل و اوجومکین که دارای عملکرد متفاوتی در رشد عضلات و متابولیسم چربی هستند انتخاب شد. داده‌های خام مربوط به ۷۰ روزگی دوران جنینی در ۳ تکرار برای هر یک از این نژادها از پایگاه داده‌های NCBI با شماره دسترسی GSE23563 دریافت شد. سپس به منظور شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی^۵ ($Adj\ P\text{-Value} < 0.05$) از بسته نرم‌افزاری LIMMA در محیط R استفاده شد. در ادامه، جهت بررسی و درک بهتر ژن‌های شناسایی شده، آنالیز ماهیت‌شناسی ژن و همچنین شناسایی مسیرهای درگیر در ژن‌های با بیان معنی‌دار به وسیله پایگاه آنالیز دیوید نسخه 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/>) انجام شد.

نتایج و بحث

بعد از آنالیز داده‌های خام برای هر دو نژاد با بسته نرم‌افزاری LIMMA، در مجموع ۱۴۹۹۸ ژن بین دو نژاد دارای تفاوت شناسایی شد که از این میان ۵ ژن دارای بیان افتراقی معنی‌دار ($Adj\ P\text{-Value} < 0.05$) بودند (جدول ۱).

جدول ۱- ژن‌های شناسایی شده دارای بیان افتراقی

| Gene Name | Adj P-Val. | Log FC | KEGG Pathway |
|---|------------|------------|--|
| Homo sapiens Selenoprotein I (SELI) | 0.000966 | -3.9398286 | lipid metabolism |
| Adducin 3 (gamma) (ADD3) | 0.000966 | 6.3731941 | Miscellaneous transport and binding events |
| Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (EEF1A2) | 0.023154 | 3.86422 | Estrogen signaling pathway, Prolactin signaling pathway |
| Estrogen receptor beta (ESR2) | 0.026574 | 1.5641185 | RNA transport, Legionellosis |
| | | | Rap1 signaling pathway, Phagosome, Cell adhesion molecules (CAMs), |
| Integrin alpha M (ITGAM) | 0.049536 | 1.3329349 | Hematopoietic cell lineage, Leukocyte transendothelial migration, Regulation of actin cytoskeleton |

³. Texel

⁴. Ujumqin

⁵. Differentially Expressed Gene (DEG)

⁶. Gene Ontology



همانگونه که مشاهده می‌شود در نژاد تکسل نسبت به نژاد دنبه‌دار چینی، ژن‌های *EEF1A2*⁷، *ESR2*⁸، *ADD3*⁹ و *ITGAM*¹ افزایش بیان و ژن *SEL1* کاهش بیان نشان داده‌اند. در میان ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند، *EEF1A2* که در روند سنتز پروتئین دخالت دارد، در مغز، عضله قلبی و اسکلتی بیان می‌شود (Vislovukh et al., 2013). اهمیت این ژن و ارتباط آن با وزن جنین تکسل گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی نمونه‌های بافت عضله‌ی جنین دو نژاد تکسل و اوچومکین و همچنین وزن جنین‌ها صورت گرفت، مشخص شد که ژن *EEF1A2* به طور مثبت با وزن جنین ارتباط دارد که نشان می‌دهد این ژن می‌تواند نقش مهمی در رشد عضلات در مراحل جنینی داشته باشد (Xu et al., 2014). همچنین گزارش شده است که با حذف ژن *EEF1A2* در موش‌ها، بافت عصبی و عضلانی تخریب و موجب مرگ موش‌ها بعد از تولد شده است (Griffiths et al., 2012). همبستگی مثبت بین تغییرات میزان بیان سلنوپروتئین‌ها در عضله با ژن‌هایی که نقش اساسی در تنظیم تری‌گلیسیرید و متابولیسم اسیدهای چرب دارند نیز گزارش شده است (Juszczuk et al., 2016). به این معنی که افزایش بیان سلنوپروتئین‌ها در عضله، همبستگی مثبتی با بیان ژن‌هایی مثل لیپوپروتئین لیپاز داشته است و این می‌تواند کاهش بیان سلنوپروتئین و در نتیجه کاهش متابولیسم اسیدهای چرب در عضله‌ی تکسل را تایید کند. سلنوپروتئین‌ها در فعالیت‌های فسفوترانسفراز و اکسیدودوکتاز دخیل هستند (Labunskyy et al., 2014). *Adducin* نیز که متعلق به خانواده پروتئین‌های اسکلتی غشایی است و در پوشش فیلامنت‌های اکتین دخالت دارد (Lanzani et al., 2005)، بطور قابل توجهی میزان بیان بالاتری نسبت به سایر ژن‌های شناسایی شده دارد و با توجه به عملکرد این ژن، می‌توان در ارتباط داشتن احتمالی این ژن با فنوتیپ تکسل توجه ویژه‌ای داشت که نیاز به بررسی بیشتر است.

در ادامه بررسی ماهیت‌شناسی ژن‌های دارای بیان افتراقی که توسط DAVID انجام شد، در جدول ۲ ارائه شده است. در این جدول ترم‌های GO در سه کلاس عملکرد مولکولی، اجزای سلولی و فرآیندهای بیولوژیکی بطور مجزا برای هر ژن دسته‌بندی شده است.

جدول ۲- نتایج ماهیت‌شناسی ژن‌های شناسایی شده دارای بیان افتراقی با DAVID

| Gene Name | Molecular Function | GO Term | |
|-----------|--|--|---|
| | | Cellular Components | Biological Processes |
| SEL1 | GTPase activity | integral component of membrane | ER-associated ubiquitin-dependent protein catabolic process, lipid particle organization |
| ADD3 | structural molecule activity | condensed nuclear chromosome, nucleoplasm, cytoskeleton, plasma membrane | cytoskeleton organization, transmembrane transport |
| EEF1A2 | translation elongation factor activity, GTPase activity, GTP binding | eukaryotic translation elongation factor 1 complex, myelin sheath | positive regulation of apoptotic process, positive regulation of lipid kinase activity |
| ITGAM | glycoprotein binding | extracellular space, integrin complex, cell surface, extracellular exosome | Cell proliferation, cell Cycle, adhesion, integrin-mediated signaling pathway, ectodermal cell differentiation |
| ESR2 | transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, steroid binding, zinc ion binding, estrogen receptor activity, estrogen response element binding | nucleus, mitochondrion | negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, transcription, intracellular estrogen receptor signaling pathway, positive regulation of transcription, DNA-templated |

⁷. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2

⁸. Estrogen Receptor 2

⁹. Adducin 3 (gamma)

¹. Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)

¹. Selenoprotein I



همچنین تجزیه و تحلیل مسیرهای درگیر در این ژن‌ها مشخص کرد که تعدادی از این DEG ها در فرآیندهایی مانند تکثیر سلولی، چسبندگی سلولی، تنظیم اسکلت سلولی آکتین و همچنین مسیرهای مهمی مانند مسیرهای علامت‌دهی Rap1 درگیر هستند (جدول ۱). این نتایج با مطالعاتی که روی بز نژاد چینی انجام شد (Zhan et al., 2017) مطابقت دارد که مسیر علامت‌دهی Rap1 را بعنوان مسیری که ژن‌های افتراقی شناسایی شده در بافت عضله در بز بیشتر غنی شده بوند، گزارش کردند. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که پروتئین Rap1 انباشته شده در سلول‌های عضلانی، متحمل تغییرات مهمی در اتصالات عصبی-عضلانی در دوره میوزن اولیه و تغییر در اتصالات عضلانی-تانومنی در طول میوزن ثانویه می‌شوند (Pizon et al., 1996). در واقع Rap1 یک GTPase کوچک است که فرآیندهای متنوعی نظیر چسبندگی سلولی، تشکیل اتصالات سلولی-سلولی و قطبش سلولی را کنترل می‌کند. علاوه بر این، Rap1 در تعامل با مسیر علامت‌دهی β -adrenergic است که نشان داده شده نقش مهمی در رشد و توسعه عضلات اسکلتی ایفا می‌کند (Lynch and Ryall 2008).

هرچند این بررسی اطلاعات پایه و محدودی از شناسایی ۵ ژن داری بیان افتراقی بویژه EEF1A2 و همچنین درگیر بودن این ژن‌ها در فرآیندهایی مانند چسبندگی سلولی و همچنین مسیرهای مهمی مانند مسیر علامت‌دهی Rap1 برای بافت عضله در ۷۰ روزگی قبل از تولد فراهم آورد، اما طبق گزارشات Xu et al. (2014)، تمام ژن‌های معنی‌دار مرتبط با رشد عضله و متابولیسم لیپید، در نژاد تکسل در اواسط مرحله جنینی و در گوسفند اوجومکین در اواخر مرحله جنینی شناسایی شدند. لذا برای تصمیم گیری نهایی و بدست آوردن اطلاعات تکمیلی بیشتر، نیاز به بررسی ژن‌ها در مقاطع زمانی مختلف بیشتری در قبل از تولد می‌باشد.

منابع

- Griffiths, L.A., Doig, J., Churchhouse, A.M., Davies, F.C., Squires, C.E., Newbery, H.J. and Abbott, C.M. 2012. Haploinsufficiency for translation elongation factor eEF1A2 in aged mouse muscle and neurons is compatible with normal function. *PLoS one*, 7:e41917.
- 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. *Biol Trace Elem Res*, 172: 336–345.
- Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. 2014. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev*, 94(3): 739–777.
- Lanzani, C., Citterio, L., Jankaricova, M., Sciarrone, M.T., Barlassina, C., Fattori, S., Messaggio, E., Serio, C.D., Zagato, L., Cusi, D., Hamlyn, J.M., Stella, A., Bianchi, G. and Manunta, P. 2005. Role of the adducin family genes in human essential hypertension. *J. Hypertens*, 23 (3): 543–9.
- Lynch, G.S. and Ryall, J.G. 2008. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*, 88:729–767.
- 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. *Reprod Fertil Dev*, 12: 319-327.
- Pizon, V., Cifuentes-Diaz, C., Mege, R.M., Baldacci, G. and Rieger, F. 1996. Expression and localization of RAP1 proteins during myogenic differentiation. *Eur J Cell Biol*, 69:224–235.
- Sadkowski, T., Jank, M., Oprzadek, J. and Motyl, T. 2006. Agedependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 7: 95–110.
- Vislovukh, A., Kratassiouk, G., Porto, E., Gralievskaya, N., Beldiman, C., Pinna, G., El'skaya, A., Harel-Bellan, A., Negrutskii, B. and Groisman, I. 2013. Proto-oncogenic isoform A2 of eukaryotic translation elongation factor eEF1 is a target of miR-663 and miR-744. *British Journal of Cancer*, 108 (11): 2304–11.



Wilson, S.J., McEwan, J.C., Sheard, P.W. and Harris, A.J. 1992. Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 13: 534-550.

Yan, X., Zhu, M.J., Dodson M.V. and Du, M. 2013. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *J Genomics*, 1: 29–38.

Xu, L., Zhao, F., Ren, H., Li, L., Lu, J., Liu, J., Zhang, Sh., Liu, G.E., Song, J., Zhang, L., Wei, C. and Du, L. 2014. Co-Expression Analysis of Fetal Weight-Related Genes in Ovine Skeletal Muscle during Mid and Late Fetal Development Stages. *Int J Biol Sci*, 10(9): 1039–1050.

Zhan, S., Zhao, W., Song, T., Dong, Y., Guo, J., Cao, J., Zhong, T., Wang, L., Li, L., Zhang, H. 2017. Dynamic transcriptomic analysis in hircine longissimus dorsi muscle from fetal to neonatal development stages. *Funct Integr Genomics*, 18 (1): 43-54.



Study of differentially expressed genes and related pathways in fetal muscle tissue of Texel and Ujumqin sheep breeds

Fahime Mohammadi¹, Ali Javadmanesh^{2*}, Mojtaba Tahmoorespur²

1. Department of Animal science, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

2. Department of Animal science, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

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

Abstract

Muscle development and lipid metabolism plays important roles during fetal development stages. Texel sheep, originally from Belgium, has remarkable muscle development and leanness that naturally caused by a mutation in the myostatin gene, Ujumqin sheep from China has a large fat tail. In this study, in order to investigate and have a better perception of differentially expressed genes and their pathways in the sheep muscle tissue in the pre-natal, the raw data of gene expression the muscle tissue of these two sheep breeds derived from the microarray method were used (GSE23563 access number). Five differentially expressed genes (Adj p-value <0.05) were identified using the LIMMA package in R. Among them, the EEF1A2 gene was confirmed as a potential candidate gene involved in the muscle development and lipid metabolism during fetal development. GO and KEGG pathway analysis for differentially expressed genes by DAVID showed that a number of identified differentially expressed genes in muscle tissue were involved in processes such as cell proliferation, cell adhesion and important pathways such as the Rap1 signaling pathway. The results of this study may provide basic information for a better understanding of the relationship between effective genes in the formation of muscle and fat tissue during fetal development and also the pathways involved in these traits. These genes might provide some evidence on DNA markers associated with birth weight in sheep which can be applied in selection programs.

Keyword: Differentially expressed genes, Muscle tissue, Physiological pathway, Sheep fetus