دهمین کنگره ملی و دومین کنگره بین المللی علوم دامی ایران
10th National and 2nd International Animal Science Congress of Iran
August 30-31, 2023
۹-۸ شهریور ۱۴۰۲

تجزیه و تحلیل ژن‌های مرتبط با میوستاتین و افزایش عضله با استفاده از داده بیان mRNA رده سلول عضلانی C2C12

علی جوادمنش[1*]، میترا ریاسی[2]

1. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
2. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

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

چکیده

ژن میوستاتین (MSTN) عضوی از گروه TGF-β است که رشد و تمایز عضلات اسکلتی را به طور منفی تنظیم می‌کند. با این حال، مکانیسمی که توسط آن حذف کامل MSTN و تکثیر بیش از حد سلول‌های عضلانی را محدود می‌کند، نامشخص است. هدف از این مطالعه یافتن ژن‌های تاثیرگذار در زمان مهار بیان ژن میوستاتین در رده سلول عضلانی C2C12، با استفاده از داده‌های بیانی mRNA بود. از نرم افزار R، بسته LIMMA برای دست‌یابی به داده‌های بیان افتراقی ژن‌ها استفاده و در نهایت شبکه ژنی با استفاده از نرم افزار سایتواسکیپ رسم شد. نتایج نشان داد ژن‌های ACTB، LTGB1، FYN، Rem1، Mapk1، Cd44 ارتباط نزدیکی با ژن میوستاتین در زمان مهار بیان ژن دارند. همچنین مسیرهای زیستی مرتبط با کشش عضلانی، تنظیم لغزش فیلامنت عضلانی، تنظیم انقباض عضلات اسکلتی و تمایز سلولهای ماهواره‌ای عضلات اسکلتی و مسیرهای مولکولی شامل اتصال تیتین، اجزای ساختاری عضله و اتصال کواکتیواتورهای رونویسی مهم تشخیص داده شدند که توسط سایر مطالعات نیز مورد تایید بود.

کلمات کلیدی: میوستاتین، موش، شبکه ژنی

مقدمه

میوستاتین (MSTN)، به عنوان فاکتور رشد/تمایز-8 (GDF-8) شناخته می‌شود و عضوی از خانواده بزرگ TGF-β است. در مطالعات قبلی تأیید شده است که MSTN یک فاکتور رشد ترشحی است که عمدتاً در ماهیچه‌های اسکلتی بیان می‌شود و به طور منفی رشد و تمایز میوبلاست را تنظیم می‌کند [1]. علاوه بر این، MSTN همچنین موجب فعال شدن و تکثیر سلول های ماهواره‌ای و کنترل سلول‌های بنیادی ماهیچه‌های اسکلتی می‌شود [2]. MSTN ابتدا در موش کشف شد. اختلال در بیان این ژن یا ایجاد جهش‌های طبیعی، به عنوان مثال، در انسان، موش، گاو و گوسفند منجر به افزایش گسترده توده عضلانی اسکلتی و فنوتیپ ماهیچه مضاعف گردید [3]. این عمل میوستاتین به‌طور عمده به رشد ماهیچه‌ها پیش از تولد، یعنی زمان تکثیر و تمایز میوبلاست‌ها برمی‌گردد و انتظار می‌رود چنانچه جهشی بتواند باعث کاهش mRNA میوستاتین گردد، رشد عضلانی بیشتری در حیوان مشاهده شود. هدف از مطالعه پیش رو، یافتن ژن‌های تاثیرگذار در طی محدود سازی تکثیر بیش از حد در سلول عضلانی C2C12 با استفاده از داده‌های بیانی mRNA است [2].

مواد و روش‌ها

داده‌های بیان mRNA مورد استفاده در این مطالعه از پایگاه داده NCBI (GEO) گرفته شد [4]. داده‌های مورد استفاده با دستگاه Illumina HiSeq 2000 توالی‌یابی و در دو گروه سلول C2C12 موش به صورت شاهد و تیمار (رده سلولی ناک اوت برای میوستاتین) قرار گرفته بودند. برای تبدیل این داده‌ها به داده‌های بیان افتراقی ژن‌ها (DEGs) از نرم افزار R نسخه 4.0.2 و بسته LIMMA استفاده گردید [5]. معیارهای انتخاب داده به صورت p-value <0/01 و 0.5 <logFC< -0.5 در نظر گرفته شد. سپس به منظور رسم شبکه ژن‌های منتخب، از نرم افزار Cytoscape نسخه 3.7.0 با استفاده از افزونه STRING نسخه 1.5.1 و آنالیز شبکه توسط افزونه Network Analyzer نسخه 3.10.0 استفاده شد [6].

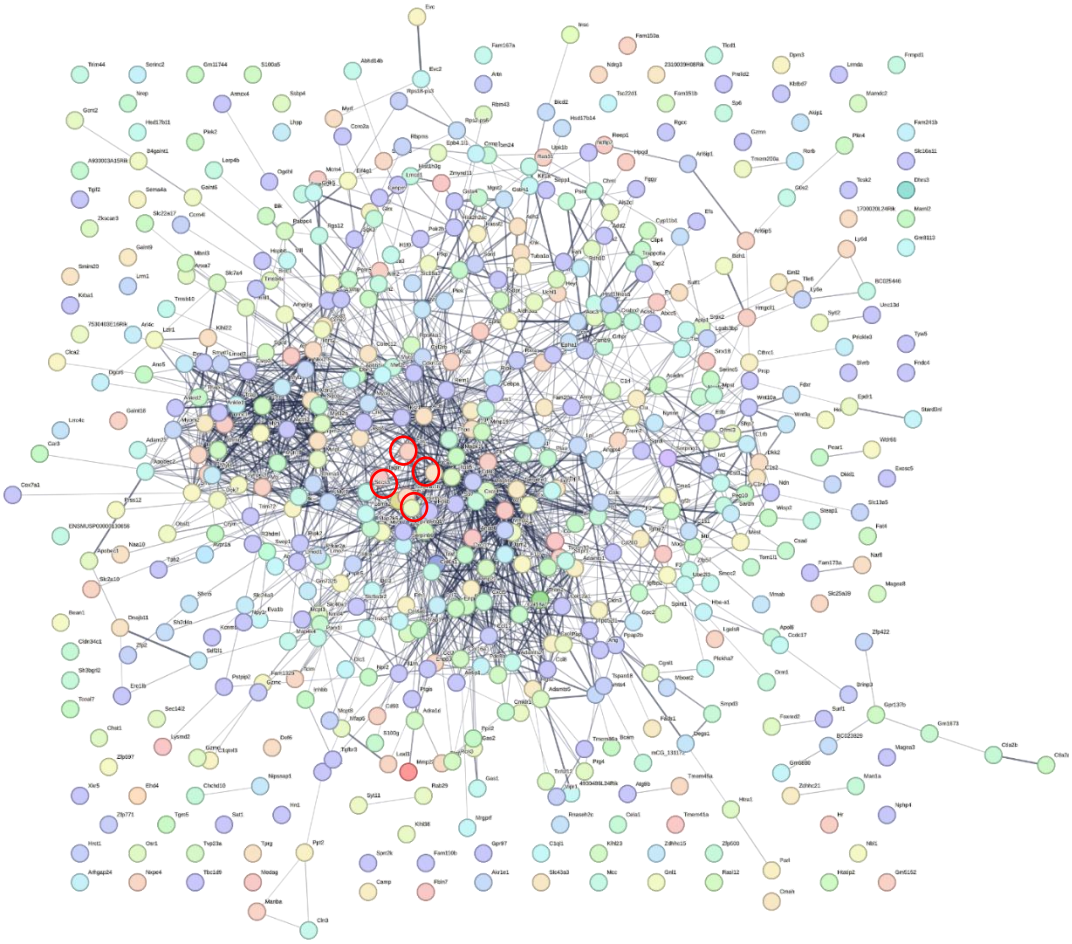
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که تعداد 558 ژن بصورت بیان افتراقی بین گروه تیمار و کنترل وجود داشتند که با معیارهای مد نظر انتخاب شدند. پس از رتبه‌بندی ژن‌های موجود در شبکه توسط Network Analyzer (جدول 1) مهم‌ترین ژن‌های موثر در فیدبک منفی میوستاتین به‌ترتیب عبارت بودند از: ACTB، CXCl12، CCL2 و CXCR4 که در زمان مهار بیان این ژن، دچار تغییر بیان معنی‌دار شدند (شکل 1). اصلی‌ترین مسیرهای زیستی مربوط به تشخیص کشش عضلانی، تنظیم لغزش فیلامنت عضلانی، تنظیم انقباض عضلات اسکلتی و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای عضلات اسکلتی بودند. اصلی‌ترین مسیرهای مولکولی شامل اتصال تیتین، اجزای ساختاری عضله و اتصال کو-اکتیواتورهای رونویسی. ژن‌های گزارش شده حاصل از این پژوهش توسط مطالعات دیگری که بر روی مهار بیان ژن میوستاتین کار کردند مشابه بود [4،7] که نشان‌دهنده روش صحیح رسم و رتبه بندی ژن‌ها در شبکه بود. علاوه بر ژن‌های ذکر شده در بالا، مشخص شده که miR-206، miR335 و miR130 نیز در تنظیم بیان اختصاصی بافت میوستاتین نقش کلیدی دارد [4]. در مطالعات آینده می‌توان با رسم شبکه هم بیان mRNA و ریز RNAها به مطالعه دقیق‌تر نقش سایر ژن‌ها و RNAهای غیرکدکننده در تنظیم بیان ژن میوستاتین پرداخت. همچنین می‌توان با بررسی بیان ژن در بافت عضله نیز به اختلاف و شباهت پروفایل بیان ژن در سلول و بافت ماهیچه پی برد.

جدول 1) 100 ژن با رتبه بالاتر در شبکه

Degree	Gene name	Degree	Gene name	Degree	Gene name	Degree	Gene name	Degree	Gene name
90	Actb	27	Mmp2	20	Flt1	15	Synpo2l	11	Cdkn1a
45	Cxcl12	26	Tnni1	19	Cxcl5	15	Serpinb1b	11	Areg
42	Ccl2	25	Cxcl1	19	Col6a2	15	Ncam1	11	Aldh3a1
39	Cxcr4	25	Myod1	18	Myom2	15	Cebpa	11	Murc
38	Itgb5	25	Myog	18	Tagln	15	Igfbp3	11	Fgf7
38	Actn2	25	Col6a1	18	Tnnc1	15	Serpinb1c	11	Apobec2
35	Rem1	25	Csrp3	17	Serpinb9	14	Col16a1	11	Mybph
31	Tnnt2	24	Tpm2	17	Lrp1	14	Nt5e	11	Fgfr4

31	Mapk1	24	Pdgfrb	17	Nkx2-5	14	Serping 1	11	Col4a6
31	Myl1	23	Myl4	17	Col12a1	14	Adamts 2	11	Casp4
31	Cav1	23	Mef2c	16	Serpinb 9b	14	Ccl17	10	Pmp22
30	Actn3	22	Bgn	16	Myl12b	14	Smyd1	10	Ang
30	Mylpf	22	Mb	16	Ccl7	13	Rxra	10	Scn5a
30	Cd80	22	Mylk	16	Lpl	13	Lmod3	10	Ccl9
29	Serpine 1	22	Plau	16	Socs3	13	Ccl24	10	Rala
28	Crkl	22	Col18a1	16	F3	13	Lamb3	10	Il4ra
28	Tcap	21	Smpx	15	Clu	12	Cxcl13	10	Traf1
27	Fos	21	Thbs2	15	Lama2	12	Mylk2	10	Enpp1
27	Myh1	21	Myoz2	15	Mgst1	12	Plek	10	Des
27	Itgb7	20	Myl9	15	Adamts 1	12	Cd47	10	Myh14



شکل 1) شبکه برهم‌کنش ژن‌ها رسم شده با سرور STRING (مهم‌ترین ژن‌ها از قبیل ACTB، CXCL12، CCL2 و CXCR4 در شبکه با دایره قرمز مشخص شدند). از این ژن‌ها می‌توان به عنوان ژن‌های کلیدی در زمان مهار بیان ژن میوستاتین نام برد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر به توسعه بنیادین علم در مورد مکانیسم عمل ژن میوستاتین و ژن های وابسته کمک می کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

منابع

1. Soleimani, S., Sekhavati, M. H., and Javadmanesh, A. (2019). Sequencing and Bioinformatic Investigation of Introducing a Repressive Micro-RNA Target Sites in the 3'UTR of Myostatin Gene in some Indigenous Sheep Breeds of Iran. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 11(1), 111-119.
2. Payande, H., Ghahramani Seno, M. M., and Javadmanesh, A. (2019). The inhibitory effect of myostatin-specific siRNA on the differentiation and growth of C2C12 cells. In The 3rd International & the 11th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran.
3. Riasi, M., Mozaffari Jovin, S., and Javadmanesh, A. (2022). Effect of Intramuscular and Intraperitoneal Injections of conjugated MSTN-siRNA-cholesterol on Inhibition of Myostatin Gene expression. *Journal of Cell and Molecular Research*, 14(1), 20-27.
4. Huang P, Pang D, Wang K, Xu A, Yao C, Li M, You W, Wang Q, and Yu H. (2019). The Possible Role of Complete Loss of Myostatin in Limiting Excessive Proliferation of Muscle Cells (C2C12) via Activation of MicroRNAs. *International Journal of Molecular Science*. 2;20(3):643.
5. Saedi, N., Aminafshar, M., Chamani, M., Honarvar, M., and Javadmanesh, A. (2022). Expression pattern and network visualization of genes involved in milk persistency in bovine mammary tissue. *Agriculture and Natural Resources*, 56(1), 23-34.
6. Zeraatpisheh, Y., Zerehdaran, S., and Javadmanesh, A. (2023). Investigation of metabolic pathways related to the QTLs of parasite resistance trait in sheep genome using gene network and gene ontology. *Veterinary Research & Biological Products*, 36(1), 83-90.
7. Ozawa, E. (2010). Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(8), 798-821.

Analysis of genes related to myostatin and muscle growth using mRNA expression data of C2C12 muscle cell line

Ali Javadmanesh[*1], Mitra Riasi[2]

[*1] Associated professor, Dep of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[2] Ph.D. Student, Dep of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

*Corresponding author e-mail: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Myostatin (MSTN), a TGF-group protein, inhibits the development and differentiation of skeletal muscle. Uncertainty persists regarding the method by which total deletion of MSTN regulates muscle cell hyperproliferation. To identify effective genes during myostatin gene expression inhibition in C2C12 muscle cells, mRNA expression data was employed in this investigation. The differential expression data of genes were obtained using the R software, Lima package, and then the gene network was shown using Cytoscape. The findings demonstrated the strong relationship between the myostatin gene and the genes ACTB, LTGB1, FYN, Rem1, Mapk1, and Cd44 during expression inhibition. Additionally, the molecular pathways involving titin binding, muscle structural components, and the binding of significant transcriptional coactivators were identified, and these were also supported by other studies. These biological pathways included those for the Detection of muscle stretch, the Regulation of muscle filament sliding, the Regulation of twitch skeletal muscle contraction, and the skeletal muscle satellite cell differentiation.

Keyword(s): Myostatin, Mouse, Gene network