مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢٠٣-١٨٩

مطالعه شبکه ژنی موثر بر رشد ماهیچه سینه جوجه راس تحت داده‌های RNA-Seq

Study of the genetic network that affecting the growth of pectoralis muscle in Ross chickens under RNA-Seq data

سید نادر آلبوشوکه[١]، مجتبی طهمورث‌پور[٢*]، محمدرضا بختیاری‌زاده[٣]، محمدرضا نصیری[٢]، سعید اسماعیل خانیان[٤]

Seyed Nader Albooshoke[1], Mojtaba Tahmoorepur[2*], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[3], Mohammadreza Nassiri[2], Saied Esmaeilkhanian[4]

١- مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

٢- گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

٣- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه تهران، واحد ابوریحان، ایران

٤- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1- Department of Animal Science, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahwaz, Iran.
2- Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, College of Aburaihan, Iran.
4- Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Tahmoores@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٦/٢٣ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١١/١٩)

چکیده

جوجه های بومی جز مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی هستند که به شرایط محیطی بخوبی سازگاری یافته‌اند. اما بطور معمول سرعت رشد و راندمان غذایی آنها در مقایسه با جوجه‌های امروزی نامناسب است. مطالعات مقایسه‌ای بین جوجه‌های امروزی و جوجه بومی امکان درک علل این تفاوت‌های ژنتیکی را مهیا می‌سازد. جهت بررسی تفاوت‌های ترانسکریپتومی ژن‌ها و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با رشد ماهیچه سینه در دو گروه جوجه بومی و جوجه تجاری از مطالعات ژنومی تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل آینده استفاده شد. در این پژوهش تعداد ٢٠٠ قطعه پرنده از سویه راس ٧٠٨ و ٢٠٠ قطعه جوجه بومی اصفهان در یک شرایط مشابه مدیریتی و تغذیه استاندارد پرورش داده شدند. در بررسی تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq بین دو گروه آزمایشی، پروفایل بیان ژن در ٤ نمونه ماهیچه سینه ٢٨ روزگی عمر جوجه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. مقایسه آماری بیان ژن‌های توالی‌یابی شده در این دو گروه، ٦٠٦ ژن با تفاوت معنی‌دار را مشخص کرد. در جوجه تجاری از این تعداد ٣٥٧ ژن افزایش بیان و ٢٤٩ ژن کاهش بیان نشان دادند. شبکه برهم کنش پروتئین- پروتئین با استفاده از ٢٦٧ ژن تشکیل و از این تعداد ٧٥ ژن در قالب سه ماژول با حداکثر سطح معنی‌داری شناسایی شد. بررسی‌های هستی شناسی ژنی نشان داد هر سه ماژول در رشد ونمو ماهیچه سینه نقش موثری را ایفا کرده و ژن‌های شاخص آن‌ها JUN، EGR1، THBS1، ITGA4 و ACTA2 بودند.

واژه‌های کلیدی

جوجه راس،
شبکه ژنی،
ماهیچه،
هستی‌شناسی ژن،
توالی یابی RNA

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

مقدمه

مرغ اهلی از جمله مهم‌ترین و با راندمان‌ترین حیوان‌های پرورشی است. نژادهای جوجه بومی بعنوان ذخایر مهم ژنتیکی که در طی هزاران سال ایجاد شده، شناخته شده‌اند در مقایسه با نژادهای امروزی، جوجه بومی با شرایط محیطی محلی سازگاری بالاتری داشته و نسبت به بیماری‌ها مقاومت بالاتری نشان میدهند (Hall & Bradley, 1995).

با این حال سرعت رشد کمتر و راندمان غذایی نامناسب جوجه بومی در ثبات عرضه و تولید آن مشکلاتی را ایجاد کرده است. بنابراین اصلاح نژاد جوجه بومی و افزایش سرعت رشد یکی از اهداف مراکز پرورش این نوع مرغ است. تولید و تکثیر مرغان بومی ایران در یک چهارچوب طرح ملی در سال ۱۹۸٤ میلادی در شش ایستگاه اصلاح نژادی در استانهای مختلف کشور (مازندران،فارس، اصفهان، آذربایجان غربی، یزد و خراسان) آغاز شد. مرکز اصلاح نژاد جوجه بومی اصفهان از جمله این ایستگاه‌ها است که با دو هدف اصلی اصلاح نژاد و تکثیر جوجه بومی دومنظوره‌ای که قادر به تولید مناسب گوشت و تخم مرغ باشد، تشکیل شد(Yousefi Zonuz, Alijani, Mohammadi, Rafat, & Daghigh Kia, 2013). جوجه بومی اصفهان دارای سرعت رشد پایین، اندازه بدن نسبتا کوچک بوده ولی در مقابل بیماری‌ها و شرایط محیطی مقاومت بالایی دارد. برخی خصوصیات این مرغ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است (Yousefi Zonuz et al., 2013) . افزایش وزن ماهیچه و بخصوص ماهیچه سینه مرغ نقشی مهم در رشد بدن و به همان ترتیب اقتصادی کردن تولید گوشت و سودآوری صنعت پرورش مرغ گوشتی ایفا می‌کند. بنابراین شناسایی مکانیزم‌های ژنتیک مولکولی و ژن‌های کاندیدا در رشد و نمو ماهیچه مرغ اهلی می‌تواند در سرعت بخشیدن به اصلاح نژاد جوجه بومی اصفهان سودمند شود.

جدول ۱ – خصوصیات آماری برخی صفات جوجه بومی اصفهان

Table 1. Descriptive statistics for the traits in Isfahani's native chickens

Trait صفت	N تعداد	Mean متوسط	SD انحراف معیار	CV ضریب تغییر
Bw0[a]	52034	37.75	3.57	9.47
BW8[a]	46310	820.82	181.96	21.13
BW12[a]	42201	1461.37	287.35	19.66
WSM[b]	15269	1875.60	211.10	11.25
ASM[c]	15380	179.26	17.23	9.61
EN[d]	14456	48	13.69	20.43

[a]وزن بدن در روز هچری، ۸ و ۱۲ هفتگی به ترتیب با Bw0، Bw8، Bw12 نمایش داده شده‌اند.

[b]سن در بلوغ جنسی با WSM،[c] سن نخستین تخمگذاری با ASM،

[d]تعداد تخم مرغ با EN نشان داده شده‌اند.

اگرچه رشد و نمو یک فرایند پیچیده و شامل مراحل متعدد تکثیر و تمایز است (Oksbjerg, Gondret, & Vestergaard, 2004) منتهی گزارش شده در طی رشد و نمو و با مقایسه پروفایل بیان ژنی ماهیچه‌های بین نژادهایی که از نظر سرعت رشد ماهیچه تفاوت دارند می‌توان این مکانیزم‌های مولکولی را شناسایی کرد (Xu et al., 2012). از طرفی دیگر جوجه راس ۷۰۸ یکی از جوجه های گوشتی پرورشی امروزی است که می‌تواند در عرض ۸ هفته دوره پرورش از وزن ٤۰ گرمی در روز نخست عمر به وزنی بیش از ٤ کیلوگرم برسد و بنابراین جزء مرغان با سرعت رشد بسیار بالا محسوب می‌شود. توده ماهیچه در نتیجه یک تعادل بسیار دقیق مابین فرایندهای ساخت و تجزیه پروتئین‌های فیبر ماهیچه‌ای، کنترل و حفظ می‌شود. افزایش ساخت پروتئین موجب هایپرتروفی و افزایش تجزیه پروتئین ها موجب آتروفی می‌شوند. بازگردش (Turn over) پروتئین بوسیله مسیرهای سیگنالی مختلفی تنظیم می‌شود. گزارشات متعددی نشان می‌دهند که بازگردش کل پروتئین بدن در

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

جوجه های گوشتی کمتر از مرغ تخمگذار است (Muramatsu, Hiramoto, & Okumura, 1990; Saunderson & Leslie, 1988). دو مسیر سیگنالی اصلی کنترل ساخت پروتئین را انجام می‌دهند و عبارتند از IGF-Akt-mTOR که تنظیم کننده مثبت و myostatin-Smad2/3 تنظیم کننده منفی ساخت پروتئین هستند (Schiaffino, Dyar, Ciciliot, Blaauw, & Sandri, 2013). اغلب مطالعات انجام شده در مرغ اهلی ژن‌های بسیار مهم و مسیرهای دخیل مرتبط با رشد ناشی از هایپرتروفی ماهیچه را گزارش کرده‌اند. در جوجه های گوشتی بهگزین شده برای تولید حجم سینه بالاتر بیان ژن IGF-1 و MSTN دو عامل مهم کنترل کننده رشد و نموی فیبرهای ماهیچه است (Guernec et al., 2003). در یک تحقیق با استفاده از آزمایش ریزآرایه (Microarray) و بررسی بیان ژنی دو گروه خروس با راندمان‌های غذایی بالا و پایین گزارش شد ۲۷ ژن با اختلاف بیان معنی‌دار بین این دو گروه وجود دارد (Bottje et al., 2012). از این تعداد ١٤ ژن در گروه با راندمان غذایی بالا غنی شده (Enriched) که در مسیرهای انتقال سیگنال و حسگرهای وضعیت انرژی سلول و محرک تولید انرژی دخالت داشته و ۱۳ ژن نیز در گروه با راندمان غذایی پایین غنی شده که در ساختمان اسکلت سلولی (نظیر فیلامنت های اکتین و میوزین)، اکسیداسیون چربی، عوامل رشد و پاسخ به تنش اکسیداتیو دخالت دارند. مقایسه و تجزیه و تحلیل ژن‌های بیان شده در شش و ۲۱ روزگی ماهیچه سینه در جوجه گوشتی و جوجه اصلاح نژاد شده نشان داد برخی تنظیم‌کننده‌های رشد میوژنی با اثر مثبت (IGF-1، IGF1R و WFIKKN2) و یا اثر منفی (ACE و MSTN) در رشد میوفیبرهای ماهیچه‌ای در دوره پس از هچری موثر هستند (Davis & Austic, 1997). همچنین در یک تحقیق دیگر با استفاده از روش ریزآرایه و مقایسه پروفایل بیان ژنی جوجه گوشتی آربور آکرس (Arbor Acres) و جوجه تخم‌گذار لگهورن (Leghorn) در سنین مختلف تا ۸ هفتگی گزارش شد بیان ژن‌های مرتبط با تجزیه پروتئین در جوجه گوشتی کمتر از تخم‌گذار بوده و همین موضوع موجب تجمع بیشتر پروتئین در بافت ماهیچه و بزرگتر شدن بدن جوجه گوشتی می‌شود (Zheng et al., 2009). مقایسه پروفایل بیان ژنی ماهیچه سینه نمونه‌های مختلف مراحل نمو مربوط به جوجه بومی بیجینگ (نژاد چینی با سرعت رشد کم) و جوجه گوشتی آربور آکرس (جوجه تجارتی با سرعت رشد بالا) ۱۹ ژن با بیان متفاوت معنی‌دار مرتبط به نمو ماهیچه را نشان داد (Cui et al., 2012). یک گزارش دیگر نشان داد بهگزینی درازمدت برای رشد، موجب تغییر الگوی بیان ژن‌های ماهیچه‌ای می‌شود (Yin et al., 2014).

پیچیدگی در گزارشات انجام شده در خصوص رشد و نموی ماهیچه اسکلتی و عوامل موثر در آن که به تبع آن تعداد ژن‌های دخیل در بروز این پدیده را نیز افزایش می دهد دلایلی است که هدف این پژوهش را به استفاده از مقایسه ترانسکریپتومی و تعیین شبکه ژنی و ماژول‌های معنی‌دار و موثر بر آن سوق داده تا بدین وسیله مسیر مطالعات آتی و خط مشی اصلاح نژادی جوجه بومی تدوین و تسهیل شود.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری: برای انجام این آزمایش از ۲۰۰ قطعه جوجه یک روزه سویه تجاری راس ۷۰۸ و ۲۰۰ قطعه جوجه یک روزه از نژاد بومی اصفهان استفاده شد. جوجه‌ها به سالن مرغداری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول انتقال و تا پایان آزمایش با شرایط یکسان و مشابه از نظر تغذیه و مدیریت پرورش نگهداری شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

تمامی جوجه‌ها از یک جیره غذایی متعادل بر مبنای ذرت و سویا با ۳۰۰۰ کیلوکالری انرژی در کیلوگرم وزن خشک و ۲۰درصد پروتئین خام تغذیه شدند. دسترسی به آب آشامیدنی و خوراک آزاد بود. در پایان ۲۸ روزگی از هر گروه ٦ قطعه جوجه خروس بطور تصادفی انتخاب، توزین و کشتار شد. در هر جوجه از یک مکان مشابه در ماهیچه سمت چپ سینه (Pectoralis major muscle) یک نمونه تقریبا دوگرمی گرفته شده و در کرایوتیوب‌های استریل و فاقد RNase قرار داده شد. نمونه‌های گرفته شده بلافاصله به تانک ازت مـایع منتقـل و سپس در آزمایشگاه تا زمان استخراج RNA در فریزر دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج و خالص سازی RNA: با استفاده از ترایزول (Invitrogen, USA) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از نمونه ها RNA استخراج شد. خلوص RNA با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) بررسی شد. نسبت جذب 260 به 280 نانومتر در نمونه های RNA در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود. سه نمونه RNA مربوط به هر گروه به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شده تا در کل و به ازا هر یک از دو گروه آزمایشی، ۲ تکرار از نمونه‌های ادغام شده (Pooled) بدست آید. چهار نمونه حاصل با دستگاه Illumina Hiseq 2000 و مطابق دستورالعمل مربوطه در شرکت BGI چین توالی‌یابی شد.

بررسی کمی و کیفی داده‌ها: قبل از انجام همترازی (Alignment) کیفیت توالی خوانش های خام با استفاده از نرم افزار Fastqc (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) بررسی شد. برای حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و یا خوانش‌های خام حاوی توالی های مربوط به آداپتور و پرایمر و Poly-N از نرم افزار Trimmomatic (Lohse et al., 2012) استفاده شد. خوانش‌های پیرایش شده جهت تایید کیفیت، مجددا با نرم افزار Fastqc بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل بیان ژن: از سایت Ensembl به آدرس http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html ژنوم مرجع و فایل حاوی رفرنس‌دهی ژنوم [Ensembl Galgal4 (GCA_000002315.2)] دریافت شد. با استفاده از نرم افزار HISAT2 (نسخه 2.0.4) (Kim, Langmead, & Salzberg, 2015) خوانش‌ها به ژنوم مرجع همردیف شده و با استفاده از نرم افزار Cufflinks (نسخه 2.2.1) (Trapnell et al., 2010) و با استفاده از فایل رفرنس‌دهی ژنوم (حاوی ۱۷۹۵٤ ژن در بانک دانسته‌های Ensembl) به رونوشت-های بیان شده اسمبل شده تا بدین ترتیب رونوشت‌های شناخته شده و جدید تشخیص داده شوند. سپس با استفاده از ابزار Cuffdiff تفاوت معنی‌داری بیان ژن‌ها (Differential Expressed Genes : DEGs) بررسی شد. بدین منظور نرخ تشخیص اشتباه در سطح ۵ درصد (False Discovery Rate: FDR <0.05) به عنوان سطح معنی‌دار DEGs در نظر گرفته شد. بیان ژن‌ها به صورت FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) در نظر گرفته شد.

هستی‌شناسی ژن‌ها (Gene ontology): پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌های با تفاوت معنی‌دار (بیش و کم بیان) جهت تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (فرایندهای بیولوژیکی) و نیز مسیر KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) از پایگاه داده دیوید (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) استفاده شد (Dennis et al., 2003). در آنالیز نهایی مسیرهای غنی شده مرتبط به هر یک از دو گروه، از P-value تصحیح شده در سطح ۵ درصد ارائه شده توسط بنجامین-هوچبرگ استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

تشکیل شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین (Protein- PPIs protein interaction networks): اکنون معلوم شده است که پروتئین‌ها برای انجام یک عمل خاص در سلول به صورت یکپارچه با یکدیگر همکاری می‌کنند. بنابراین، برای بررسی بیشتر روابط DEGها در سطح پروتئین، با استفاده از پایگاه داده STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) شبکه PPI مرتبط با آن‌ها با استفاده از مجموعه داده‌های Gallus gallus ترسیم شد. این پایگاه داده حاوی مقادیر PPI تجربی، پیش‌بینی شده، انتقال یافته و متنی در میان پروتئین‌ها است (Szklarczyk et al., 2014). شبکه‌های ژنی PPI و ماژول‌ها همگی بر اساس ژن‌های با افزایش بیان در جوجه تجاری ترسیم شدند. در STRING هر تعامل با یک نمره ترکیبی از ۰ تا ۱ همراه است. در این پژوهش برای دریافت نتایج تعاملات قوی‌تر، فقط نمرات ترکیبی بالاتر از ۰/٤ درنظر گرفته شدند. در ادامه، افزونه ClusterONE از نرم افزار Cytoscape (https://Cytoscape.org/ نسخه 3.5.1) با حداقل اندازه = ٦، حداقل تراکم = ۰/۰۵ و وزن لبه = "نمرات ترکیبی" برای کشف ماژول‌های کاربردی (زیر شبکه) در شبکه PPI استفاده شد. با استفاده از این ابزار، می‌توان پروتئین‌های مرتبط به یکدیگر را در شبکه های وزنی با استفاده از روش گسترش همسایگی (neighborhood expansion method) تشخیص داد. سه ماژول مهم برای تحلیل بیشتر انتخاب شدند .علاوه بر این، غنی سازی عملکرد ژن‌ها در ماژول‌ها با استفاده از روش توصیف شده برای شناسایی فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با هر یک از ماژول انجام شد.

نتایج

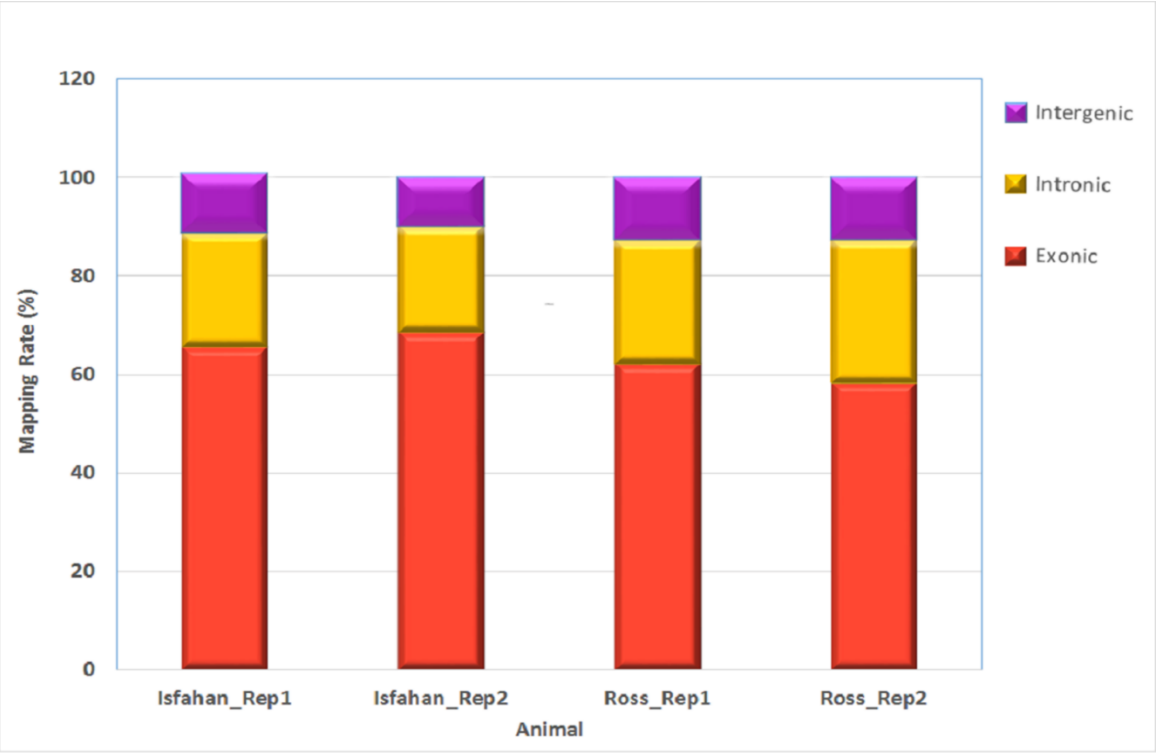
شناسایی ژن‌های بیان شده در ترانسکریپتوم ماهیچه سینه: با استفاده از نمونه‌ی بافت سینه مربوط به شش جوجه خروس از هر یک از دوگروه بومی و تجاری، به صورت خوانش‌های جفتی (2 x 150 bp) توالی‌یابی شد. توالی‌یابی RNA برای چهار نمونه ماهیچه درحدود ۱۳۱ میلیون خوانش جفت بازی ۱۵۰ نوکلئوتیدی تولید کرد که از این مقدار حدود ۹٤ میلیون در جوجه بومی و ۳۷ میلیون در جوجه تجاری بود. پس از فیلتر کیفی خوانش‌های با کیفیت بالا برای هرنمونه به ژنوم مرجع نقشه‌یابی و برای تجزیه و تحلیل بیان ژن استفاده شد. بر اساس گزارش بررسی کیفی پس از ترایمینگ داده‌های خام، میانگین امتیاز کیفی خوانش‌های توالی‌یابی شده برابر ۳۸ و میانگین میزان GC بین ۵۲ تا ٥٤ درصد بود. بنابراین می‌توان استنتاج کرد که کیفیت خوانش‌ها بسیار مطلوب بوده و با حداقل خطا توالی‌یابی شده‌اند. این نتایج نشانه مناسب بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل‌های بعدی بود. با استفاده از برنامه Hisat2 بیش از ۷۲ درصد از خوانش های تمیز به ژنوم مرجع Galgal4 نقشه‌یابی شد. بعلاوه حدود ۹۰ درصد خوانش‌ها نیز به طور صحیح و در فاصله معقولی نسبت به جفت خود بر روی ژنوم همترازی (الاین) شدند. جزئیات خوانش‌های تمیز (Clean reads) و خصوصیات نقشه‌یابی در جدول شماره (۲) آورده شده است. اغلب خوانش‌های توالی‌یابی شده (۵۸/۳ تا ٦۸/٤۳ درصد) در ناحیه اگزونی و ۲۱/۷ تا ۲۹/۰۸ درصد در ناحیه اینترونی و فقط ۹/۸٦ تا ۱۲/۷۸ درصد در ناحیه بین ژنی قرار داشتند (شکل شماره ۱). پس از انجام تجزیه و تحلیل آماری ٦۰٦ ژن Log2FC (0.8 < و P-adjusted ≤ 0.05) به عنوان ژن‌های با تفاوت معنی‌دار DEGs شناسایی شد. از این تعداد ۲٤۹ ژن در جوجه بومی و ۳۵۷ ژن در جوجه تجاری بیان بالاتر داشتند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

جدول ۲- خلاصه دانسته‌های آماری داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل آینده

Table 2- Summary of reads from high throughput next generation sequencing

خصیصه Statitics/ گروه Group	Isfahanii-rep1 تکرار اول بومی	Isfahanii-rep2 تکرار دوم بومی	Ross-rep1 تکرار اول راس	Ross-rep2 تکرار دوم راس
Raw reads خوانش خام	21,502,417	72,981,014	19,102,055	18,005,150
Clean reads خوانش تمیز	21,502,238	72,980,361	19,101,872	18,004,990
Mapped reads خوانش نقشه یابی شده	15,473,010	51,057,061	13,957,738	13,429,922
Concordantly mapped reads خوانش جفتی نقشه یابی شده	14,357,292	47,029,073	12,965,304	12,569,816
Mapping rate (%) درصد نقشه یابی	71.96	69.96	73.07	74.59
Read min/max/mean length حداقل، حداکثر، میانگین طول خوانش	50 / 150 / 133.3	50 / 150 / 133.76	50 / 150 / 132.97	50 /150 /133.9



شکل ۱- درصد خوانش‌های نقشه‌یابی شده به نواحی اگزونی، اینترونی و بین ژنی.

Figure 1. The percentage of reads mapped to exonic, intronic and intergenic regions.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

تجزیه‌وتحلیل هستی‌شناسی ژن: جهت تجزیه‌وتحلیل هستی‌شناسی (GO) و مسیرهای غنی شده KEGG از ابزار DAVID استفاده شد. از میان فرایندهای بیولوژیکی هستی‌شناسی معنی‌دار مرتبط با ژن‌های بیش بیان شده در جوجه تجاری، ۱۷ فرایند ارتباط مستقیم با ماهیچه و ۱۵ مسیر نیز مرتبط با رشد بودند. همچنین ژن‌های با بالاترین سطح بیان در جوجه تجاری در ۱۲ مسیر KEGG نظیر hsa04510:Focal adhesion با ۲٤ ژن و نیز hsa04512:ECM-receptor interaction با ۱۷ ژن شرکت داشتند. این دو مسیر در برهم کنش گیرنده‌های برون یاخته‌ایی و فرآیند رشد بافت‌های پیرامونی و محافظتی ماهیچه‌ای نقش بسیار مهمی ایفا می‌نمایند. در جوجه تجاری مسیرهای hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway با ۲۱ ژن و hsa03320:PPAR signaling pathway با ۸ ژن از جمله مهم‌ترین مسیرهای موثر در رشد ماهیچه بودند. مسیر نخست در فرآیندهای رشد هایپرتروفی و رشد ماهیچه‌های اسکلتی دخالت داشته و افزایش فعالیت آن موجب افزایش ساخت پروتئین و اندازه ماهیچه شده (Shiojima & Walsh, 2002) و کاهش فعالیت این مسیر سیگنالی موجب افزایش تجزیه پروتئین‌های ماهیچه‌ای و منفی شدن تعادل بازگردش پروتئینی می‌شود (Song et al., 2015). مسیر دوم نیز مرتبط به سوخت وساز چربی‌ها است (Kokta, Dodson, Gertler, & Hill, 2004). همچنین این مسیر در تمایز سلولی، رشدونمو و سوخت وساز کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نیز نقش حیاتی ایفا می‌کند (Dunning, Anastasi, Zhang, Russell, & Robker, 2014). اکنون بخوبی معلوم شده است که در جوجه های گوشتی افزایش رشد توام با افزایش بافت‌های چربی در بدن است (Zhao et al., 2011). همچنین در جوجه‌های با سرعت رشد بالا، ذخیره‌سازی چربی سریع‌تر و زودتر از جوجه‌های با سرعت رشد پائین انجام می‌شود (Havenstein, Ferket, & Qureshi, 2003). بنابراین فعال شدن این مسیر لازمه رشدونمو سریع‌تر ماهیچه‌ها در جوجه تجاری است. بطور کلی غنی شدن این دو مسیر در جوجه تجاری نشانه رشد و نمو ماهیچه‌ای بیشتر و سوخت‌وساز فعال‌تر انرژی در مقایسه با جوجه بومی است. برخی از مهم‌ترین مسیرها و فرآیندهای بیولوژیکی معنی‌دار در جوجه تجاری در جدول ۳ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل شبکه PPI و ماژول‌ها: شبکه PPI با استفاده از پایگاه داده STRING و مجموعه داده Gallus gallus تشکیل شد. از مجموع ۳۲۱ ژن بیش بیان شده در جوجه تجاری، ۲٦۷ ژن با ٥٤۸ اثر متقابل در این شبکه شرکت داشتند. شبکه موجود نشان داد ۲۳ ژن دارای بالاترین درجه اثر متقابل با دیگر ژن‌ها هستند و بنابراین می‌توانند بعنوان ژن‌های هاب (Hub) در شبکه به شمار آیند (جدول ٤).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

جدول ۳- برخی مسیرهای KEGG و فرایندهای بیولوژیکی معنی دار در جوجه تجاری

Table 3. Some enriched GO and KEGG pathway of DEGs in commercial chickens.

Term ID شماره مسیر	Term مسیر	Genes ژن‌ها	P - Benj. سطح معنی‌دار بنجامینی
Some Enriched KEGG Pathways for DEGs in commercial broiler برخی از مسیرهای غنی شده در جوجه تجاری			
hsa04510	Focal adhesion	CAV1, PGF, TNC, ACTN1, ITGA4, MYL12A, COL5A2, COL5A1, COL4A6, COL4A5, MYL9, ITGA6, RAC2, JUN, COMP, ITGA8, COL6A3, COL6A2, COL6A1, PDGFRB, THBS1, PIK3R3, COL11A1, FN1	4.82E-09
hsa04512	ECM-receptor interaction	TNC, ITGA4, COL5A2, COL4A6, COL5A1, COL4A5, SDC1, CD36, ITGA6, COMP, ITGA8, COL6A3, COL6A2, COL6A1, THBS1, COL11A1, FN1	5.56E-09
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	SGK1, PGF, TNC, FGF16, ITGA4, COL5A2, COL5A1, COL4A6, COL4A5, ITGA6, COMP, ITGA8, COL6A3, COL6A2, PDGFRB, COL6A1, THBS1, PIK3R3, COL11A1, FN1, CSF1R	0.001635
hsa03320	PPAR signaling pathway	LPL, CD36, PLIN1, SCD, PPARG, FADS2, FABP4, PLTP	0.011706
Some Enriched GO Terms for DEGs in commercial broiler برخی از فرآیندهای بیولوژیکی معنی دار در جوجه تجاری			
GO:0061061	muscle structure development	MEF2B, CAV1, UCHL1, MYBPC3, SOX9, TGFB2, FOS, COL6A3, NFATC2, LMOD2, COL11A1, CSF1R, EGR1, ACTC1, LGALS1, CENPF, MSTN, CHODL, RCAN1, MYOZ2, MYH9, TNNI1, TNNT2, SDC1, ATF3, COL19A1, ATP2A2, CXCL14, ITGA8, FHOD3, HOPX, PDGFRB, ADAM12	2.10E-07
GO:0003012	muscle system process	ACTC1, CAV1, PTGS2, ACTA2, MYBPC3, MSTN, NR4A3, MYL12A, TPM2, DOCK5, TNNI1, MYL9, TNNT2, SSTR2, ATP2A2, CTGF, HMOX1, MYH13, LMOD2, KLF4, CHRNG	3.02E-04
GO:0055001	muscle cell development	ACTC1, SDC1, ATP2A2, UCHL1, FHOD3, PDGFRB, MYOZ2, LMOD2, NFATC2	0.041549137
GO:0001525	angiogenesis	CAV1, NRP1, PTGS2, PGF, FGF16, ITGB2, TGFB2, CTGF, ROBO1, FAP, HMOX1, CCBE1, PLXND1, THBS1, RUNX1, FN1, CYR61, COL18A1, TNMD, MYH9, MCAM, SLIT2, ANXA2, SRPX2, SFRP2, F3, JUN, PDGFRB, HSPB1, KLF4	4.33E-09

جدول ٤- ژن‌های هاب با بالاترین مقدار درجه اثرمتقابل (۱۰<)

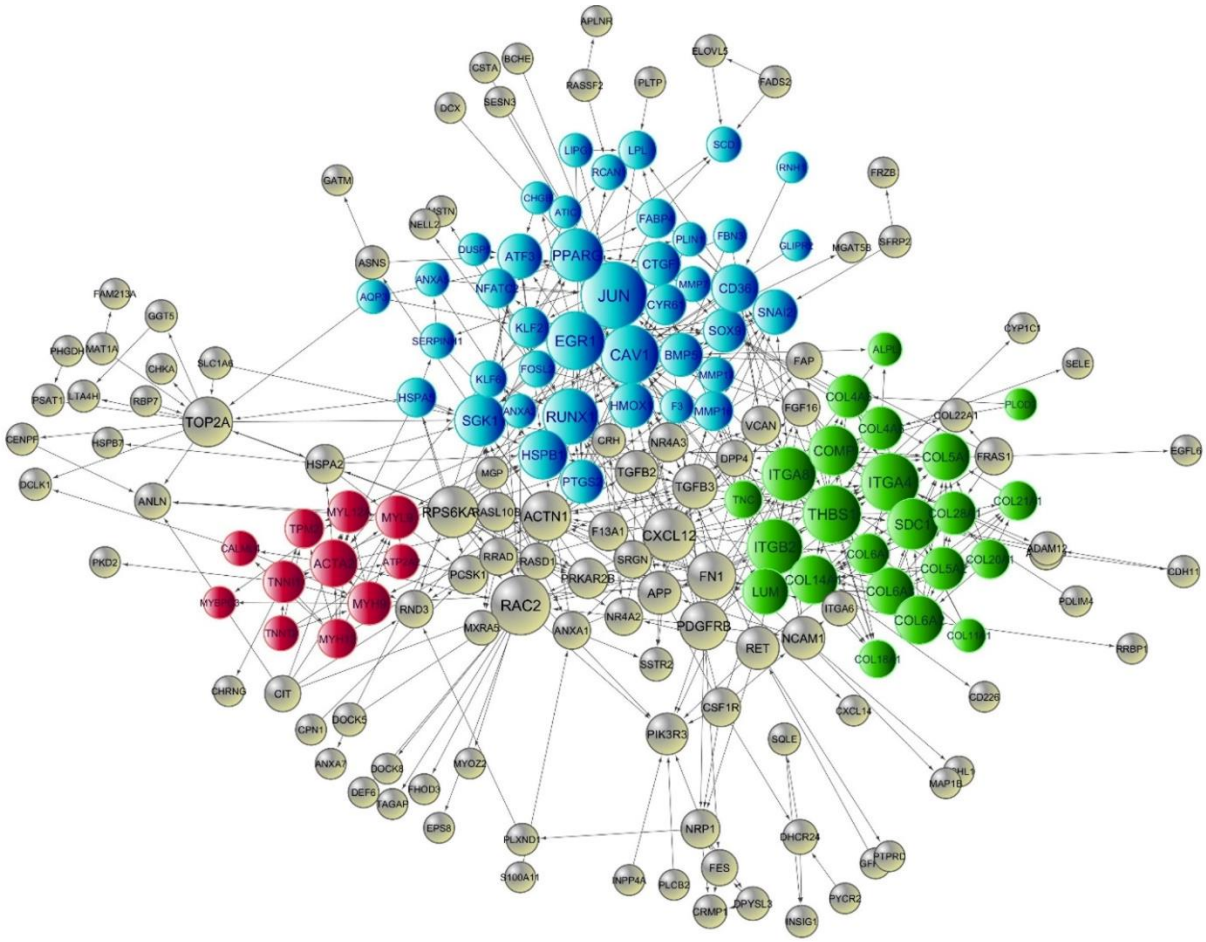
Table 4. Hub genes with highest connective degree (degree > 10)

Gene name نام ژن	Degree درجه	Module ماژول	Gene name نام ژن	Degree درجه	Module ماژول
JUN	27	1	HSPB1	14	1
EGR1	21	1	COL14A1	14	2
CAV1	21	1	COL6A2	14	2
THBS1	21	2	CD36	13	1
ITGA4	21	2	COL5A1	13	2
RUNX1	19	1	COL6A3	13	2
ITGβ2	19	2	ACTA2	13	3
ITGA8	18	2	LUM	12	2
PPARG	17	1	HMOX1	11	1
SGK1	16	1	SNAI2	11	1
SDC1	16	2	ATF3	11	1
COMP	15	2	-	-	-

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

با استفاده از ابزار ClusterONE سه ماژول با بیشترین سطح معنی‌داری در شبکه شناسایی شد (شکل شماره ۲). در ماژول A با ٤١ گره (Node) و ۱۱۸ لبه (Edges) ژن JUN با ۲۷ لبه بالاترین درجه اثرمتقابل را داشت. در ماژول B با ۲۳ گره و ۹٦ لبه، ژن‌های THBS1 و ITGA4 با ۲۱ لبه بالاترین درجه را داشتند. همچنین در ماژول C با ۱۱ گره و ۲۹ لبه ژن ACTA2 بالاترین میزان درجه را داشت. در این مطالعه نتایج تشکیل شبکه PPI منجر به شناسایی ماژول‌های مهمی در ارتباط با فرآیندهای رشد و نمو ماهیچه شد. بر اساس تجزیه و تحلیل غنی‌شدگی DEGها در ماژول A، فرایندهایی نظیر سوخت وساز چربی‌ها، رشد ونمو، رشد سیستم عروقی و کنترل مثبت سوخت وساز پروتئین و پاسخ به سطح مواد مغذی معنی دار بودند (جدول شماره ۵). این فرایندها همگی در رشد هایپرتروفی موثر هستند.



شکل ۲- شبکه PPI و سه ماژول (خوشه) معنی‌دار. گره‌ها بیانگر ژن‌های با تفاوت معنی‌دار هستند (DEGs) و خطوط نشان‌دهنده اثرهای متقابل بین دو پروتئین. ماژول A به رنگ آبی، ماژول B به رنگ سبز و ماژول C به رنگ قرمز نمایش داده شده اند. اندازه هر گره متناسب با مقدار درجه آن است.

Figure 2. The PPI network and three significant sub-networks

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

در ماژول A ژن هاب JUN که جزء خانواده فاکتورهای محرک رونویسی ITFs (Inducible transcriptional factors) است با یکی دیگر از اعضای این خانواده یعنی ژن FOSL2 پروتئینی را کد می‌کنند که می‌تواند منجر به ساخت کمپلکس رونویسی به نام پروتئین فعال کننده AP-1 (activating protein-1) شود. این پروتئین میانجی تعدادی از فرآیندهای سلولی تمایز و تکثیر است (Ameyar, Wisniewska, & Weitzman, 2003). معلوم شده است که محصول کدینگ پروتوآنکوژن‌هایی نظیر JUN، FOSL2 و FOS بطور معمول موجب تحریک رشد و تکثیر سلولی می‌شوند (Weinberg, 1996). یکی دیگر از اعضای این ماژول ژن EGR1 بود. پروتئین حاصل از کددهی این ژن، تنظیم‌کننده رونویسی برخی ژن‌های هدف دیگری است که محصولات کدینگ آن‌ها مورد نیاز تمایزیابی و فرایند میتوژنز است. همچنین این ژن در ساخت سلولی و تمایز کلاژن‌ها نیز دخالت می‌کند. دیگر نقش مهم این ژن تنظیم واکنش به فاکتورهای رشد است.

یکی دیگر از ژن‌های مهم این ماژول کاوئولین (CAV1) بود. این ژن که بخصوص در بافت‌های ماهیچه‌ای به وفور یافت می‌شود و پروتئین ساختمانی اصلی مورد نیاز برای ساخت کاوئولا در سلول‌های اندوتلیالی است. گزارش شده CAV1 در نفوذپذیری عروقی، تنظیم تبادلات بین خون و بافت‌های پیرامونی (Fernández-Hernando, Yu, Dávalos, Prendergast, & Sessa, 2010) و آنژیوژنز (رگزایی) موثر است (Chidlow et al., 2009). همچنین در این ماژول سه عضو خانواده آنزیم‌های متالوپروتئینازهای ماتریکسی Matrix metalloproteinases (MMPs)) حضور داشتند. این‌ها عبارت بودند از MMP7، MMP16 و MMP17 . ژن‌های این خانواده در حفظ هومئوستاز فیبرهای ماهیچه‌ای و ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی ایفا می‌نمایند (Carmeli, Moas, Reznick, & Coleman, 2004). این‌ها در پاسخ به محرک‌هایی نظیر تنش اکسیداتیو می‌توانند فعال شوند. این تنش در پاسخ به افزایش تقاضای اکسیژن بدلیل رشد و نموی بافت‌های ماهیچه‌ای می‌تواند ایجاد شده باشد. همچنین گزارش شده ژن‌های خانواده MMPs می‌توانند با تخریب بافت‌های همبند و کلاژنی اطراف فیبرهای ماهیچه‌ای موجب بازسازی ماتریکس خارج سلولی فیبرهای ماهیچه‌ای شوند (Alameddine, 2012). بطور کلی نتایج بدست آمده از بررسی ژن های این ماژول نشان می‌دهد این مجموعه در فرایندهای مهمی نظیر سوخت وساز چربی، آنژیوژنز، واکنش‌های ایمنی و رشدونمو بافت ماهیچه‌ای شرکت کرده‌اند.

جدول ۵- خصوصیات آماری ماژول‌های شناسایی شده با بالاترین سطح معنی‌داری در شبکه PPI

Table 5. Description statistics for identified modules with the highest significance in the PPI network

Module ماژول	Size اندازه	P-value سطح معنی دار	Genes ژن‌ها	Some of significant GO terms and KEGG pathways برخی مسیرها و فرایندهای بیولوژیکی معنی‌دار
A	41	1.35E-07	RUNX1, HSPA5, CAV1, MMP16, FOSL2, SNAI2, EGR1, KLF6, SCD, FABP4, PPARG, BMP5, MMP17, CTGF, FBN3, CHGB, RCAN1, NFATC2, CD36, MMP7, ATF3, CYR61, SERPINH1, ANXA5, HSPB1, HMOX1, JUN, KLF2, ATIC, AQP3, PTGS2, SGK1, ANXA2, F3, DUSP5, SOX9, GLIPR2, PLIN1, RNH1, LIPG, LPL	PPAR signaling pathway (P-adj<0.0007), developmental process (P-adj<5.68E-08), circulatory system development (P-adj <3.74E-07), positive regulation of protein metabolic process (P-adj<2.60E-06), regulation of apoptotic process (P-adj<3.74E-06), and response to nutrient levels (P-adj<2.90E-06)
B	23	1.90E-06	THBS1, COMP, COL6A2, TNC, ITGA4, COL18A1, ITGβ2, ITGA8, LUM, ALPL, COL4A5, COL4A6, COL6A3, SDC1, COL20A1, COL5A2, COL28A1, COL21A1, PLOD2, COL11A1, COL14A1, COL5A1, COL6A1	ECM-receptor interaction (P-adj<2.09E-19), Protein digestion and absorption (P-adj<2.05E-13), focal adhesion (P-adj<4.51E-13), PI3K-Akt signaling pathway (P-adj<1.62E-10), extracellular matrix organization (P-adj<1.93E-21), collagen metabolic process (P-adj <6.36E-11) and endodermal cell differentiation (P-adj <2.13E-7)
C	11	0.000801155	TNNI1, ATP2A2, TNNT2, MYL9, MYBPC3, MYL12A, MYH9, ACTA2, MYH13, ANLN, TPM2	tight junction (P-adj<0.006), Hypertrophic cardiomyopathy (P-adj<0.02), muscle contraction (P-adj<8.60E-11), muscle system process (P-adj<2.18E-10), actin filament-based movement (P-adj<5.29E-7) and muscle structure development (P-adj<0.005)

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

در ماژول B دو ژن THBS1 و ITGA4 دارای بالاترین میزان درجه بودند. THBS1 یک گلیکوپروتئین مدولار (Medullar) بوده و در فرآیندهای مختلفی نظیر رشد، چسبندگی آندوتلیالی و آنژیوژنز می‌تواند هم نقش میانجی مثبت و هم میانجی منفی را ایفا نماید (Tan, Tercero, Arnett, Wang, & Chakraborty, 2003). اینتگرین‌هایی (Integrin) نظیر ITGA4، ITGA8 و ITGB2 که در این ماژول وجود داشتند پروتئین‌هایی متشکل از زیرواحدهای آلفا و بتا بوده و در انتقال سیگنال‌های فعال‌کننده فرآیندهای سلولی نظیر تکثیر و تمایز شرکت دارند (Danen & Sonnenberg, 2003). بعلاوه گزارش شده ITGA4 در تمایز میوژنی (Rosen et al., 1992)، تمایز ماهیچه اسکلتی و آنژیوژنز دخالت دارد (Sheppard, Onken, Rosen, Noakes, & Dean, 1994).

ژن‌های با تفاوت معنی‌دار موجود در ماژول B، در فرایندهایی نظیر سازماندهی ماتریکس خارج سلولی، ساخت و تجزیه کلاژن، سیگنال رشد هایپرتروفی PI3K/Akt، focal adhesion و تمایز سلولی اندودرمی شرکت داشتند. ماتریکس خارج سلولی یک شبکه کمپلکس از پروتئین‌های فیبری نظیر کلاژن‌ها، لامینین و الاستین بوده و نقش مهمی در حفظ ساختار بافتی ماهیچه دارد (Engel, Efimov, & Maurer, 1994). کلاژن جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی بوده و فاکتور کلیدی در چسبندگی سلولی، مهاجرت سلولی، آنژیوژنز و مورفوژنز بافتی به شمار می‌آید (Tsang, Cheung, Chan, & Cheah, 2010). دراین ماژول همچنین ۹ ژن کلاژنی نیز شرکت داشتند (جدول شماره ۵). از جمله آن‌ها، ژن COL4A5 (کلاژن نوع ٤) بود که از جمله فراوان‌ترین عناصر غشای پایه (basement membrane) است و یکی از فاکتورهای کلیدی ساخت آن به شمار می‌آید (Kühn et al., 1981). پروتئین های حاصل از کددهی ژن‌های COL5A1 (کلاژن نوع ۵) و COL11A1 (کلاژن نوع ۱۱) جز کلاژن‌های فیبری محسوب شده و در حدود ۹۰ درصد کل کلاژن را تشکیل می‌دهند. علاوه بر ژن‌های کلاژنی ژن‌های مرتبط با پروتئین ماتریکس دیگری نظیر تنانسین (TNC)، COMP، ALPA، LUM و PLOD2 نیز در این ماژول حضور داشتند. ژن TNC یک گلیکوپروتئین خارج سلولی را کد می‌کند که به عنوان لیگاند اینتگرین‌ها عمل کرده و در مهاجرت، چسبندگی سلولی، تمایز و تکثیر نقش تنظیم‌کننده ایفا می‌کند (Achouri, RIDER, VAN SCHAFTINGEN, & Robbi, 1997). بیان این ژن محدود به مکان‌هایی با بازگردش بالای سلولی نظیر لیگامنت‌ها و تاندون‌ها و فیبرهای ماهیچه‌ای صاف است (Walsh & Sallach, 1965). محصول ژن COMP در ساختار غضروف شرکت دارد. پروتئین حاصل از کددهی ژن ALPL در فرآیندهای کلسیمی شدن بافت‌های منیرالی مختلف شرکت کرده (Thur et al., 2001) و فعالیت خارج سلولی این ژن جهت منیرالیزه شدن استخوان و غضروف ضروری است (de BERNARD, 1982). یکی از پروتئوگلیکن‌های ماتریکس خارج سلولی LUM است که در فرایندهای مختلفی نظیر فیبری شدن بافتی، تنظیم آنژیوژنز و تکثیر سلولی نقش دارد (Krishnan et al., 2012). ژن PLOD2 نیز یکی از اجزا سازنده ماتریکس خارج سلولی بوده و در سفت و سخت شدن بافت‌های کلاژنی نقش دارد (van der Slot et al., 2003). همچنین در مسیر بیوسنتزی کلاژن، نخستین آنزیم کلیدی را کد می‌کند (Saha, Ghosh, Konar, Bhattacharya, & Roy, 2005).

فراوان بودن ژن‌های مرتبط با ماتریکس خارج سلولی، سیتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های رشدونمویی و همچنین معنی‌دار شدن مسیرهای PI3K/Akt و Focal adhesion در این ماژول، همگی موید پتانسیل مرتبط این ماژول با فرآیند رشدونمو ماهیچه‌ای است.

در ماژول سوم ACTA2 تنها ژن هاب بود. این ژن از خانواده اکتین‌ها بوده و پروتئینی را کد می‌کند که بعنوان جزء اصلی دستگاه انقباضی نقش مهمی را در ماهیچه‌های اسکلتی ایفا می‌کند. گزارش شده سطح آلفا اکتین همبستگی مثبت با میزان ساخت پروتئین‌های فیبرهای ماهیچه‌ای و رشد آن دارد (Helferich et al., 1990). تجزیه و تحلیل نتایج معنی‌دار مشخص نمود ژن‌های این ماژول در انقباضات ماهیچه‌ای، انقباض سلولی و نیز نمو ساختمان ماهیچه اسکلتی دخالت دارند. در واقع انقباض ماهیچه‌ای معنی‌دارترین فرایند بیولوژیکی در این ماژول بود. تروپومیوزین ۲ (TPM2) یکی از اعضای این ماژول است که تروپومیوزین بتا را کد می‌کند. این پروتئین از اجزا سارکومری

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

فیلامنت نازک ماهیچه بوده و با باند شدن به فیلامنت اکتین در تنظیم انقباضات وابسته به کلسیم ماهیچه نقش مهمی را ایفا می‌کند (Palmieri et al., 2016). برای انجام انقباض، تحرک سلولی و شرکت در ساختمان پروتئین‌های میوفیبریل سلول‌های ماهیچه‌ای، وجود میوزین ضروری است (Smith, 1963). در این خصوص دو ژن میوزینی زنجیره سنگین (MYH13 و MYH9) دو ژن زنجیره سبک (MYL12A و MYL9) در این ماژول حضور داشتند. . یکی از مهم‌ترین ژن‌های این ماژول TNNI1 بود که یک ایزوفرم از تروپونین I نوع فیبر کند ماهیچه‌ای را کد می‌کند. همچنین ژن ATP2A2 نیز در فیبرهای ماهیچه‌ای کند بیان شده و پروتئینی بنام SERCA2 را کد می‌کند که در انقباض و انبساط میوفیبریل‌ها و پمپ کلسیمی دخالت دارد (Periasamy et al., 1999). بیان ژن MYBPC3 در فیبرهای نوع کند ماهیچه اسکلتی و قلبی گزارش شده است (Lin et al., 2013). این ژن جزء خانواده‌ای از ژن‌هایی است که کدکننده پروتئین‌های اجزاء اصلی ساختمان سارکومری در ماهیچه‌های مخطط به شمار می‌آیند (Tajsharghi et al., 2010). با توجه به اینکه اغلب فیبرهای ماهیچه سینه در جوجه از نوع سریع هستند بیش بیان شدن این ژن‌ها در ۲۸ روزگی نشانه شیفت در ساخت نوع فیبرهای سریع به کند در این سن از عمر جوجه راس است. این نتایج نشان داد ماژول سوم در شکل‌گیری ساختمان و نمو پروتئین‌های ماهیچه‌ای شرکت دارد.

نتیجه گیری

مطالعه شبکه ژن‌های مرتبط به بافت ماهیچه سینه جوجه تجاری راس و مقایسه آن با جوجه بومی اصفهان نشان داد که فعال‌تر بودن فرآیندهای سوخت وساز و رشد هایپرتروفی در جوجه تجاری در مقایسه با جوجه بومی، منجر به بیش بیان شدن تعداد ژن‌های بیشتری شده است. بیش بیان شدن این ژن‌ها بویژه در فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با رشد هایپرتروفی (PI3K/Akt) و متابولیسم چربی (PPAR signaling pathway)، منجر به برتری سرعت رشد این جوجه در مقایسه با جوجه بومی شد. با بررسی شبکه و ماژول‌های مرتبط با آن مشخص شد برای اصلاح نژاد جوجه بومی اصفهان و افزایش سرعت رشد ماهیچه سینه در این مرغ باید به روابط متقابل ژنی در هر ماژول و افزایش بیان ژن‌های هر سه ماژول و بخصوص ژن‌های هاب توجه خاص مبذول داشت.

منابع

Achouri, Y., RIDER, M. H., VAN SCHAFTINGEN, E., & Robbi, M. 1997. Cloning, sequencing and expression of rat liver 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, *323*(2), 365-370.

Alameddine, H. S. 2012. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiology of disease*, *48*(3), 508-518.

Ameyar, M., Wisniewska, M., & Weitzman, J. 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, *85*(8), 747-752.

Bottje, W. G., Kong, B. W., Song, J. J., Lee, J. Y., Hargis, B. M., Lassiter, K., . . . Hardiman, J. 2012. Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K microarray. II. Differentially expressed focus genes. *Poultry Science*, *91*(10), 2576-2587. doi: 10.3382/ps.2012-02204

Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A. Z., & Coleman, R. 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & nerve*, *29*(2), 191-197.

Chidlow, J. H., Greer, J. J., Anthoni, C., Bernatchez, P., Fernadez–Hernando, C., Bruce, M., . . . Sessa, W. C. 2009. Endothelial caveolin-1 regulates pathologic angiogenesis in a mouse model of colitis. *Gastroenterology*, *136*(2), 575-584. e572.

Cui, H.-X., Liu, R.-R., Zhao, G.-P., Zheng, M.-Q., Chen, J.-L., & Wen, J. 2012. Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat deposition in pectoralis major tissues of fast-and slow-growing chickens. *BMC genomics*, *13*(1), 1.

Danen, E. H., & Sonnenberg, A. 2003. Erratum: Integrins in regulation of tissue development and function. J Pathol; 200: 471–480. *The Journal of pathology*, *201*(4), 632-641.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

Davis, A. J., & Austic, R. E. 1997. Dietary protein and amino acid levels alter threonine dehydrogenase activity in hepatic mitochondria of Gallus domesticus. *The Journal of nutrition, 127*(5), 738-744.

de BERNARD, B. 1982. Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clinical orthopaedics and related research, 162*, 233-244.

Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology, 4*(9), 1.

Dunning, K. R., Anastasi, M. R., Zhang, V. J., Russell, D. L., & Robker, R. L. 2014. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *PloS one, 9*(2), e87327.

Engel, J., Efimov, V. P., & Maurer, P. 1994. Domain organizations of extracellular matrix proteins and their evolution. *Development, 1994*(Supplement), 35-42.

Fernández-Hernando, C., Yu, J., Dávalos, A., Prendergast, J., & Sessa, W. C. 2010. Endothelial-specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of pathology, 177*(2), 998-1003.

Guernec, A., Berri, C., Chevalier, B., Wacrenier-Cere, N., Le Bihan-Duval, E., & Duclos, M. 2003. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. *Growth hormone & IGF research, 13*(1), 8-18.

Hall, S. J. G., & Bradley, D. G. 1995. Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution, 10*(7), 267-270. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(95)90005-5

Havenstein, G., Ferket, P., & Qureshi, M. 2003. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science, 82*(10), 1509-1518.

Helferich, W., Jump, D., Anderson, D., Skjaerlund, D., Merkel, R., & Bergen, W. 1990. Skeletal muscle α-actin synthesis is increased pretranslationally in pigs fed the phenethanolamine ractopamine. *Endocrinology, 126*(6), 3096-3100.

Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Meth, 12*(4), 357-360. doi: 10.1038/nmeth.3317

http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n4/abs/nmeth.3317.html#supplementary-information

Kokta, T., Dodson, M., Gertler, A., & Hill, R. 2004. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domestic animal endocrinology, 27*(4), 303-331.

Krishnan, A., Li, X., Kao, W.-Y., Viker, K., Butters, K., Masuoka, H., . . . Charlton, M. 2012. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Laboratory investigation, 92*(12), 1712-1725.

Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T., & Glanville, R. W. 1981. Macromolecular structure of basement membrane collagens: Identification of 7 S collagen as a crosslinking domain of type IV collagen. *FEBS letters, 125*(1), 123-128.

Lin, B., Govindan, S., Lee, K., Zhao, P., Han, R., Runte, K. E., . . . Sadayappan, S. 2013. Cardiac myosin binding protein-C plays no regulatory role in skeletal muscle structure and function. *PloS one, 8*(7), e69671.

Lohse, M., Bolger, A., Nagel, A., Fernie, A. R., Lunn, J. E., Stitt, M., & Usadel, B. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic acids research*, gks540.

Muramatsu, T., Hiramoto, K., & Okumura, J. 1990. Strain differences in whole-body protein turnover in the chicken embryo. *Br Poult Sci, 31*. doi: 10.1080/00071669008417234

Oksbjerg, N., Gondret, F., & Vestergaard, M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic animal endocrinology, 27*(3), 219-240.

Palmieri, O., Mazza, T., Merla, A., Fusilli, C., Cuttitta, A., Martino, G., . . . Palumbo, O. 2016. Gene expression of muscular and neuronal pathways is cooperatively dysregulated in patients with idiopathic achalasia. *Scientific Reports, 6*.

Periasamy, M., Reed, T. D., Liu, L. H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R. J., . . . Doetschman, T. 1999. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco (endo) plasmic reticulum Ca2+-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *Journal of Biological Chemistry, 274*(4), 2556-2562.

Rosen, G. D., Sanes, J. R., LaChance, R., Cunningham, J. M., Roman, J., & Dean, D. C. 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell, 69*(7), 1107-1119.

Saha, S. K., Ghosh, P., Konar, A., Bhattacharya, S., & Roy, S. S. 2005. Differential expression of procollagen lysine 2-oxoglutarate 5-deoxygenase and matrix metalloproteinase isoforms in hypothyroid rat ovary and disintegration of extracellular matrix. *Endocrinology, 146*(7), 2963-2975.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

Saunderson, C. L., & Leslie, S. 1988. Muscle growth and protein degradation during early development in chicks of fast and slow growing strains. *Comp Biochem Physiol A, 89*. doi: 10.1016/0300-9629(88)91035-3

Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal, 280*(17), 4294-4314. doi: 10.1111/febs.12253

Sheppard, A. M., Onken, M. D., Rosen, C. D., Noakes, P. G., & Dean, D. C. 1994. Expanding roles for α4 integrin and its ligands in development. *Cell Communication & Adhesion, 2*(1), 27-43.

Shiojima, I., & Walsh, K. 2002. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation research, 90*(12), 1243-1250.

Smith, J. H. 1963. Relation of Body Size to Muscle Cell Size and Number in the Chicken 1, 2. *Poultry Science, 42*(2), 283-290.

Song, H. K., Kim, J., Lee, J. S., Nho, K. J., Jeong, H. C., Kim, J., . . . Park, W. J. 2015. Pik3ip1 modulates cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K pathway. *PloS one, 10*(3), e0122251.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., . . . Tsafou, K. P. 2014. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, gku1003.

Tajsharghi, H., Leren, T. P., Abdul-Hussein, S., Tulinius, M., Brunvand, L., Dahl, H. M., & Oldfors, A. 2010. Unexpected myopathy associated with a mutation in MYBPC3 and misplacement of the cardiac myosin binding protein C. *Journal of medical genetics, 47*(8), 575-577.

Tan, F. K., Tercero, G. M., Arnett, F. C., Wang, N., & Chakraborty, R. 2003. Examination of the possible role of biologically relevant genes around FBN1 in systemic sclerosis in the Choctaw population. *Arthritis & Rheumatism, 48*(11), 3295-3296.

Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D. P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., . . . Maurer, P. 2001. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *Journal of Biological Chemistry, 276*(9), 6083-6092.

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., . . . Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology, 28*(5), 511-515.

Tsang, K. Y., Cheung, M. C., Chan, D., & Cheah, K. S. 2010. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell and tissue research, 339*(1), 93-110.

van der Slot, A. J., Zuurmond, A.-M., Bardoel, A. F., Wijmenga, C., Pruijs, H. E., Sillence, D. O., . . . Verzijl, N. 2003. Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *Journal of Biological Chemistry, 278*(42), 40967-40972.

Walsh, D., & Sallach, H. 1965. Purification and properties of chicken liver D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry, 4*(6), 1076-1085.

Weinberg, R. A. 1996. How cancer arises. *Scientific American, 275*(3), 62-71.

Xu, Y., Qian, H., Feng, X., Xiong, Y., Lei, M., Ren, Z., . . . Yuan, H. 2012. Differential proteome and transcriptome analysis of porcine skeletal muscle during development. *Journal of proteomics, 75*(7), 2093-2108.

Yin, H., Zhang, S., Gilbert, E., Siegel, P., Zhu, Q., & Wong, E. 2014. Expression profiles of muscle genes in postnatal skeletal muscle in lines of chickens divergently selected for high and low body weight. *Poultry Science, 93*(1), 147-154.

Yousefi Zonuz, A., Alijani, S., Mohammadi, H., Rafat, A., & Daghigh Kia, H. 2013. Estimation of genetic parameters for productive and reproductive traits in Esfahan native chickens. *Journal of Livestock Science and Technologies, 1*(2), 34-38.

Zhao, X., Mo, D., Li, A., Gong, W., Xiao, S., Zhang, Y., . . . Liu, X. 2011. Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. *PloS one, 6*(5), e19774.

Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X.-J., & Zhu, D. 2009. Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC genomics, 10*(1), 87.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]

Study of the genetic network that affecting the growth of pectoralis muscle in Ross chickens under RNA-Seq data

Seyed Nader Albooshoke[1], Mojtaba Tahmoorepur[2*], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[3], Mohammadreza Nassiri[2], Saied Esmaeilkhanian[4]

1- Department of Animal Science, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahwaz, Iran.

2- Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, College of Aburaihan, Iran.

4- Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Email corresponding author: Tahmoores@um.ac.ir

Abstract

Native chicken breeds are important genetic resource and well adapted to the local environmental conditions. However, growth rate and feed efficiency of these breeds are not appropriate. Comparative studies of commercial and native chickens provide an opportunity to characterize the biological basis of differences between them. Here, RNA-Seq technology was used to investigate differences in the transcriptomes of breast muscle-related genes and associated pathways between Ross and Isfahani's native breed. In this study, 200 birds of the Ross 708 strain and 200 native chicks of Isfahani native were reared in a similar standard management and feeding manner. In analyzing RNA-Seq data between two experimental groups, the gene expression profile was compared in 4 chicken breast samples of 28 days of life of the chicks. Statistical comparison of the gene expressions in two groups revealed, 606 significantly DEGs (differentially expressed genes). In commercial breed, 357 DEGs were upregulated and 249 down-regulated, P-adjusted $\leq$ 0.05). PPI (Protein-protein interaction) network of DEGs (up regulated in commercial) was constructed and 267 genes were included in the resulted PPI network of which 75 genes were identified in the form of three modules with a maximum level of significance. Gene ontology studies showed that all three modules played an effective role in the growth of pectoralis muscle and their hub genes with maximum degree were JUN, EGR1, THBS1, ITGA4 and ACTA2.

Keywords: Ross chicken, Gene network, Muscle, Gene Ontology, RNA-Seq

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.10.4]