DOI 10.22092/VJ.2018.116827.1410
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

کاربرد شبکه‌های تلفیقی به منظور برازش شبکه تنظیم بیان ژنی مؤثر بر رشد ماهیچه اسکلتی در گاو

• **محمد حسین بناءبازی**
استادیار پژوهشی، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج
• **همایون فرهنگ‌فر**
استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
• **الهام بهدانی (نویسنده مسئول)**
دانش‌آموخته مقطع دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین- خوزستان
تاریخ دریافت: ۰۵-۱۰-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۰-۱۰-۱۳۹۶
Email: el_behdani86@yahoo.com

چکیده

فناوری توالی‌یابی رونوشت‌های سلولی ابزار قدرتمندی در جهت تجزیه و تحلیل رونوشت‌های سلولی، در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی می‌باشد. در سال‌های اخیر پیاده‌سازی شبکه جهت بررسی روابط بین ژن‌ها با استفاده از داده‌های حاصل از این فناوری به درک بهتر سازوکارهای پیچیده فیزیولوژیکی کمک نموده است. در این مطالعه به ساخت شبکه تنظیم بیان ژن و مطالعه روابط بین ژن‌های دخیل در تشکیل و رشد بافت ماهیچه اسکلتی به کمک توالی‌یابی رونوشت‌ها در بافت ماهیچه‌ای در حال رشد، پرداخته شده است. این پژوهش با پیاده‌سازی شبکه تلفیقی بر روی داده‌های ذکر شده، شش فاکتور رونویسی دخیل در تشکیل و رشد بافت ماهیچه اسکلتی را معرفی کرده است. این شش فاکتور رونویسی عبارتند از KLF_{10}، $MYBL_2$، FOS، $FOXM_1$، $KLF4$ و FOSB. نقش این فاکتورهای رونویسی در فرایندهایی مانند تکثیر سلول‌های بنیادی و تمایز آنها، افزایش طول و امتزاج سلول‌های ماهیچه‌ای، تکمیل مرحله تمایز و امتزاج سلول‌های فیبر ماهیچه و تولید میوفیبر و کمک به حفظ خاصیت خودزایی در سلول‌های بنیادی بافت ماهیچه اسکلتی مشخص شده است. هستی‌شناسی مربوط به این فاکتورهای رونویسی و ژن‌هایی که بیانشان تحت تأثیر این فاکتورهای رونویسی تغییر می‌کند، نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای تولید هگزوز و نوکلئوتیدها فعال هستند. این ژن‌ها در تنظیم فعالیت‌های پایه‌ای سلول مانند تنظیم بیان ژن و رونویسی نیز دخالت داشتند. از این ژن‌ها می‌توان به عنوان نشانگر مرتبط با افزایش تولید گوشت در برنامه‌های اصلاح نژادی بهره برد.

کلمات کلیدی: فناوری توالی‌یابی نسل جدید، شبکه تلفیقی، میوژنز

● Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 120-127

Using integrated networking for construction of a gene regulatory network involved in bovine skeletal muscle growth

By: Banabazi, M.H., Assistant Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj. Farhangfar, H., Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Birjand. and Behdani, E., (Corresponding author) Department of Animal Sciences, faculty of Animal science and Food Industry, of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan.

Email: el_behdani86@yahoo.com

Received: 2017-12-26 **Accepted: 2018-01-10**

RNA-Sequencing technique is a powerful tool for analysis of cellular transcriptome in many research areas. In recent years, network constructing on data resulted from this technique and gene relationships have been investigated for better understanding the complex physiological mechanisms. In this study, construction of gene regulatory network and surveying gene relationships which involve in skeletal muscle synthesis were discussed by growing muscle tissue's RNA-Seq data. This research introduced six transcription factors which were involved in formation and growth of skeletal muscle tissue by fitting an integrated network. These transcription factors included KLF4, FOXM1, FOS, MYBL2, KLF10 and FOSB. Their biological roles have been identified in proliferation and differentiation of stem cells, elongation and fusion of muscle cells, myofibril generation and self-renewal of satellite cells. Ontology of these transcription factors and their regulated genes showed that theyare involved in hexose pathway and nucleotides production. Theyare also involved in regulation of basic cell activities such as gene expression and transcription. These genes may be used as molecular markersfor improvement of meat production in breeding programs.

Key words: RNA-Sequencing, integrated networking, myogenesis

مقدمه

اطلاعات حاصل از اسید ریبونوکلئیک‌ها به علت اینکه حلقه ارتباط‌دهنده ژنوتیپ و فنوتیپ هستند، کمک بسزایی در فهم و درک جنبه‌های بیولوژی مرتبط با فرایندهای فیزیولوژی می‌کنند. داده‌های حاصل از فناوری توالی‌یابی اسید ریبونوکلئیک (RNA-Seq) بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است، زیرا اطلاعات دیجیتالی از رونوشت‌های داخل بافت (سلول) را مهیا می‌کند. یکی از روش‌های درک بهتر فرایندهای فیزیولوژیکی بررسی شبکه‌های تنظیم ژنی می‌باشد. شناسایی ژن‌های دخیل در صفات اقتصادی به عنوان مارکرهای مولکولی در اصلاح نژاد اهمیت ویژه‌ای دارد. شبکه‌های تنظیم ژنی به محقق این امکان را می‌دهد تا مطالعه همه ژن‌ها درکنار یکدیگر انجام گردد. در این شبکه‌ها روابط بین ژن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. مدل‌های مختلفی جهت پی بردن به روابط بین ژن‌ها پیشنهاد شده است. از جمله این مدل‌ها می‌توان به مدل‌سازی به کمک معادلات دیفرانسیل (۱۹)، مدل‌های غیر خطی(۹)، مدل بر پایه قانون فازی(۶)، مدل بر پایه قانون بیز(۸)، مدل کردن با استفاده از آمار غیرپارامتری(۱۱) و ... اشاره کرد. اکثر این روش‌های مورد استفاده در بررسی شبکه‌های تنظیم ژنی تجزیه و تحلیل خود را به کمک الگوریتم خوشه‌بندی انجام می‌دهند. در این الگوریتم ژن‌هایی که الگوی بیانی یکسانی را در نمونه‌های مختلف در کل یک آزمایش دارند، در یک خوشه قرار می‌گیرند. تمام الگوریتم‌هایی که نام برده شد روابط بین ژن‌ها را بر اساس داده‌های بیان ژنی، استنتاج می‌کنند. در شبکه‌های تلفیقی، روابط بین ژن‌ها بر پایه چندین منبع اطلاعاتی مانند الگوی بیان ژنی، برهمکنش بین پروتئین‌ها و غیره بررسی می شوند.

بررسی شبکه‌های تنظیم بیان ژنی کاربردهای مختلفی دارد. با استفاده از این شبکه می‌توان اثرات متقابل بین ژن‌ها و اثرات متقابل احتمالی که بین هر جفت پروتئین حاصل از ژن‌ها وجود دارد را مورد بحث قرار داد و ارتباطات مولکولی که از نظر آماری معنی‌دار باشند را ارایه کرد. تهیه نقشه و بررسی روابط بین ژن‌ها و مولکول‌ها از جمله ره‌آوردهای بررسی شبکه تنظیم ژنی می‌باشد و به کمک آن می‌توان پیچیدگی‌های موجود در علم زیست‌شناسی را مورد بحث قرار داد. علاوه بر این، از شبکه‌های تنظیم ژنی می‌توان جهت یافتن بیومارکرهایی برای شناسایی، تشخیص و تخمین اهداف بیولوژیکی نیز بهره برد (۵). این

شبکه‌ها ساختار اثرات متقابل مارکرها را نیز در نظر می‌گیرند که این موجب می‌شود که بررسی مارکرها در شبکه نسبت به بررسی مارکرها به صورت منفرد، بسیار کارآمدتر باشد.

یکی از صفاتی که در صنعت پرورش دام داشتی مورد توجه قرار گرفته است، افزایش رشد ماهیچه اسکلتی و کیفیت گوشت می‌باشد. صفات رشد در حیوانات مزرعه متغیرهای کمی هستند که معمولاً توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شوند. در زمینه شناسایی ژن‌های مرتبط با کمیت و کیفیت گوشت در صنعت پرورش گاو مطالعات معدودی انجام شده است. شناسایی مارکرهای مولکولی مرتبط با صفات کیفیت گوشت با استفاده از داده‌های مرتبط با ۱۵ نژاد گاو انجام شده است (۷). بررسی چندشکلی‌های مرتبط با ژن‌های دخیل در رشد در نژاد کرول کلمبیا انجام شد (۱۷). در این مطالعه از داده‌های حاصل از تکنولوژی توالی‌یابی رونوشت بافت ماهیچه در نژاد حاصل از تلاقی نژاد آنگوس و نژاد هلشتاین- فریزن که تحت رشد جبرانی قرار گرفته بودند، استفاده گردید. رشد جبرانی به فرایندی اطلاق می‌شود که پس از اعمال یک دوره محدودیت غذایی، نرخ رشد بیشتر از مواقعی می‌گردد که خوراک با کیفیت بالا در اختیار دام قرار می گیرد. بافت ماهیچه قادر است تا کاهش وزنی را که طی دوران محدودیت غذایی برای این بافت اتفاق افتاده است، در رشد جبرانی با افزایش راندمان غذایی، جبران نموده و طی آن خصوصیات و ترکیب لاشه نیز تغیر نمی‌کند (۱۶).

هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم‌های مولکولی و بیولوژیکی مربوط به رشد ماهیچه و همچنین ژن‌های مؤثر در این فرایند به کمک شبکه‌های تلفیقی و با استفاده از داده‌هایی می‌باشد که حاوی اطلاعات بیولوژیکی مرتبط با سنتز و رشد بافت ماهیچه است. با بررسی مکانیسم‌های بیولوژیکی مرتبط، ژن‌هایی معرفی شده‌اند که احتمالاً می‌توان آنها را به عنوان نشانگرهای مولکولی مؤثر بر رشد بافت ماهیچه اسکلتی در برنامه‌های اصلاح نژاد دام‌های داشتی مورد به کار برد.

مواد و روش‌ها

پیاده‌سازی، بررسی کیفیت، ویرایش و مکان‌یابی داده‌ها

داده‌های الگوی بیان ژن با کد دسترسی GSE۴۸۴۸۱ از بانک اطلاعات NCBI پیاده‌سازی گردید. این داده‌ها مربوط به ۲۴ نمونه از بافت ماهیچه گوساله‌های اخته شده حاصل از تلاقی نژاد آنگوس و نژاد هلشتاین-فریزن (۱۲ گوساله در گروه تیمار شده و ۱۲ گوساله در گروه شاهد) می‌باشند. نمونه‌برداری در دو زمان (شروع اعمال محدودیت غذایی و حداکثر رشد جبرانی) انجام گرفته است (۱۴). کیفیت این داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار trimmomatic (۲)، بازهایی که امتیاز کیفیت آنها کمتر از ۲۰ بودند، از دو انتهای خوانش‌ها حذف شدند. توالی‌هایی که در انتهای این مرحله باقی ماند دارای کیفیت قابل قبول بوده و طی مکان‌یابی، موقعیت ژنومی این خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع گاو (UMD3.1) مشخص گردید. از نرم‌افزار TopHat۲ استفاده شد که یک نرم‌افزار مکان‌یابی خوانش‌ها با در نظر گرفتن اتصالات جایگزین می‌باشد (۲۴).

شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده

برای مطالعه بیان افتراقی ژن‌ها از نرم‌افزار HTseq استفاده شد (۱). ژن‌هایی که بیان متفاوتی در اثر اعمال محدودیت غذایی داشتند، به کمک بسته EdgeR مورد بررسی آماری قرار گرفتند (۲۳). در این بسته آماری از روش مدل خطی تعمیم یافته برای آزمایشات چند عاملی استفاده می‌شود. در این بسته تحت نرم‌افزار آماری R، از روش‌های بیز تجربی برای تخمین واریانس بیولوژیکی در نمونه‌هایی با تعداد تکرار کم استفاده می‌شود. در این بسته آماری، توزیع خوانش‌ها دوجمله ای منفی فرض شده است. بدین ترتیب، بررسی تفاوت بیان در سطح ژن، اگزون و/ یا رونوشت قابل انجام است.

برازش شبکه تلفیقی بر روی ژن‌های متفاوت بیان شده

در ابتدا بررسی روابط بین ژن‌هایی که در اثر اعمال تیمار بیان متفاوتی داشتند، بر اساس الگوی بیانی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این آنالیز از بسته آماری stringgaussnet که مرتبط با نرم‌افزار R می‌باشد، استفاده شد(۳). ابتدا روابط ژنی بر اساس داده‌های بیان ژن استخراج می‌گردد. سپس روابط مربوط به پروتئین‌های حاصل از ژن‌های مزبور و یا به عبارت دیگر برهمکنش بین پروتئین‌های حاصل از شبکه ایجاد شده با داده‌های بیان ژنی به کمک اطلاعات موجود در بانک اطلاعات STRING (http://string.embl.de/) بررسی می‌شود. در نهایت یک شبکه حاصل می‌گردد که روابط بین ژن‌های این شبکه، بر اساس الگوی بیان ژن است و صحت این ارتباطات در سطح پروتئین سنجیده می شود. بعبارت دیگر این یک شبکه تلفیقی (ادغام اطلاعات بیان ژنی و برهمکنش بین پروتئین‌ها) است.

هستی‌شناسی ژن‌های شبکه تلفیقی تنظیم بیان ژن

برای بررسی هستی‌شناسی ژن‌های تشکیل دهنده شبکه تنظیم بیان ژنی از پایگاه اطلاعاتی DAVID(https://david.ncifcrf.gov/) استفاده شد. به کمک این پایگاه اطلاعاتی فرآیندهای بیولوژیکی که ژن‌های شبکه در آن‌ها نقش داشتند، بررسی گردید. نتایج این مرحله مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی را که ژن‌های شبکه می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد و در کنترل آنها مؤثر باشد، نشان داد. به بیان دیگر این ژن‌ها با اثر بر این مسیرهای ژنی و یا فرآیندهای بیولوژیکی بر رشد بافت ماهیچه تأثیرگذار می‌باشند.

نتایج و بحث

در پایان مرحله مکان‌یابی خوانش‌ها ۲۳۷۱۶ ژن شناسایی گردید که تعداد خوانش مربوط به ۱۱۷۳۵ ژن در هر ۲۴ نمونه بیشتر از ۶ بود. آنالیز بیان ژن تفریقی این ژن‌ها ناشی از اعمال تیمار محدودیت غذایی نشان داد ۱۶۵ ژن بطور معنی‌داری متفاوت بیان شده‌اند. به بیان دیگر، مکانیزم تنظیم رشد ماهیچه‌های اسکلتی پس از دوران محدودیت غذایی در سطح رونویسی، در روابط این ژن‌ها و اثرات متقابل بین آنها انعکاس می‌یابد. شبکه تنظیم بیان ژن مرتبط با صفت رشد ماهیچه‌های اسکلتی از روی الگوی بیان ژن‌های متفاوت بیان شده تشکیل شد. به نحوی که در بررسی روابط بین ژن‌ها، آنهایی که از نظر آماری الگوی بیانشان بصورت

معنی‌داری یکسان بود در یک خوشه قرار گرفتند. در این خوشه‌ها اینطور فرض می‌شود که ژن‌هایی که الگوی بیانی یکسانی با یک ژن خاص دارند؛ بیانشان تحت تأثیر آن ژن خاص قرار گرفته و آن ژن خاص به عنوان تنظیم‌کننده تلقی می‌شود. با توجه به اینکه اساساً هر ژن زمانی می‌تواند بیان سایر ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که به عنوان یک فاکتور رونویسی یا کوفاکتور فعالیت داشته باشد، از میان این خوشه‌ها فقط ۲۲ خوشه ژنی که ژن تنظیم‌کننده آنها در پایگاه animal transcription factor database به عنوان یک فاکتور رونویسی و/یا کوفاکتور در گونه گاو (*Bos Taurus*) معرفی شده بودند، در ادامه روند آنالیز مورد توجه قرار گرفتند.

در مرحله دوم بررسی شبکه، تطبیق شبکه‌های ژنی بدست آمده بر اساس الگوی بیان ژنی، با پایگاه داده موجود در بانک اطلاعاتی STRING انجام شد. این خوشه‌های ژنی مربوطبه فاکتورهای رونویسی KLF4، FOXM1، KLF10، MYBL2، FOS و FOSB بودند (شکل ۱). این دسته‌های ژنی، در حقیقت ژن‌هایی بودندکه در اثر اعمال محدودیت غذایی و سپس بر طرف شدن آن بیان متفاوت نشان داده و نقش تنظیم‌کنندگی داشتند. به عبارت دیگر، فرایند فیزیولوژیکی رشد جبرانی و سنتز ماهیچه را در سطح رونویسی می‌توان به عملکرد این خوشه‌های ژنی مرتبط دانست.

باید توجه داشت که فرایند میوژنز در بافت ماهیچه اسکلتی در حیوان بالغ بستگی به فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای دارد. این سلول‌ها در زیر لایه پایه‌ای میوفیبر قرار دارند و قادرند به فیبرهای جدید تمایز پیدا کنند. از این‌رو، این سلول‌هانقش بسیار مهمی در هایپرتروفی ماهیچه دارند. سلول‌های ماهواره‌ای در بیشتر عمر حیوان خاموش هستند و در زمانی که فعال شوند، تکثیر شده و تمایز می‌یابند و به فیبرهای ماهیچه ای اطراف ملحق می‌شوند (۱۸). این سلول‌ها برای فعال شدن نیازمند به سیگنال‌های فعال‌سازی هستند. این سیگنال‌ها به کمک هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، متابولیت‌ها و ترکیبات غذایی نیروزا القا و ارسال می‌گردند. فرایند تمایز ماهیچه‌های اسکلتی طی چند مرحله انجام می‌شود. در ابتدا سلول‌های میوبلاست تک‌هسته‌ای از طریق تقسیم سلولی تکثیر می‌شود. سپس ادغام این سلول‌ها جهت تشکیل فیبرهای ماهیچه‌ای چند هسته‌ای انجام می‌گردد. این مراحل با تأثیر فاکتورهای رونویسی بر بیان ژن‌های مؤثر بر میوژنز انجام می‌شود (۴).

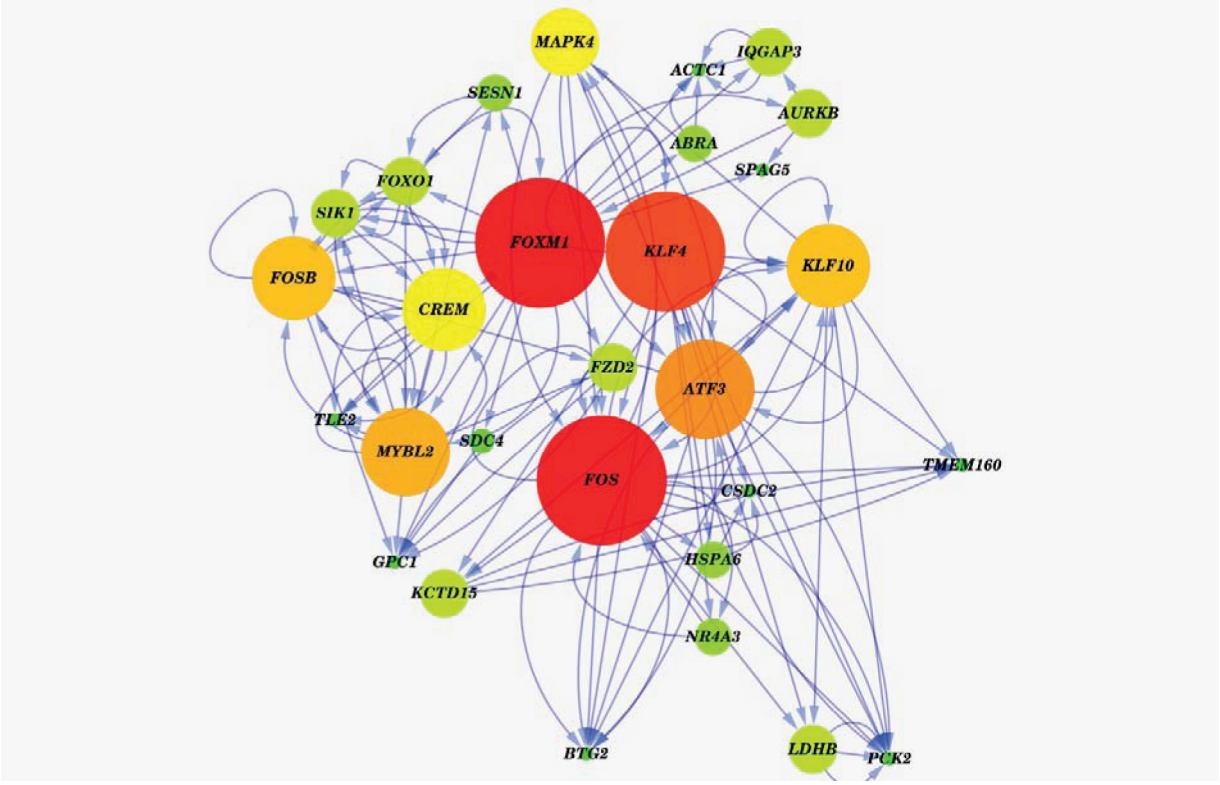
برازش شبکه ترکیبی بر روی ژن‌هایی که در اثر اعمال محدودیت غذایی و سپس بر طرف شدن آن، بیان متفاوتی در بافت ماهیچه اسکلتی داشتند، نشان داد که فاکتور رونویسی KLF4 یکی از فاکتورهای رونویسی مؤثر در فرایند میوژنز مرتبط با رشد جبرانی است. این فاکتور رونویسی متعلق به یک خانواده کینازی می‌باشد که با وجود بیش از ۸۰ درصد شباهت (همولوژی) در توالی ژنی،اعضای آن فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع و متفاوتی داشته‌اند و در سنتز اریتوسیت‌ها، سنتز بافت چربی وخود ترمیمی سلول‌های بنیادی جنینی نقش دارند (۱۲). در مطالعه انجام شده بر روی موش‌های فاقد ژن کدکننده عامل رونویسی KLF4، مشاهده شد که ادغام سلول‌های ماهیچه‌ای کاهش می‌یابد و فرایند تمایز این سلول‌ها مختل می‌شود. اثر تنظیمی ژن KLF4 بر تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای صاف به کمک موش‌هایی که این ژن در آنها غیر فعال شده بود، به اثبات رسیده است (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر اثر این فاکتور رونویسی در تمایز بافت ماهیچه اسکلتی مؤثر گزارش شده است (۲۵). آنالیز هستی‌شناسی ژنی این فاکتور رونویسی به همراه ژن‌هایی که بیان آنها تحت تأثیر آن قرار می گیرد در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که این فاکتور رونویسی و ژن‌های تحت تنظیمآن در فرایندهای مرتبط با متابولیسم هگزوز و گلوکز و فرایند گلوکونئوژنز دخالت دارند. تمامی این مسیرها تولید گلوکز را برای سلول ماهیچه مهیا می‌کنند. ارتباط تولید گلوکز با فرایند میوژنیک و رشد ماهیچه می‌تواند با مصرف شدن گلوکز تولیدی در مسیر پنتوز فسفات توجیه گردد. مسیر پنتوز فسفات با مصرف گلوکز مولکول انرژی در قالب NADPH تولید می‌کند که جهت ساخت اسید چرب یا ریبوز-۵-فسفات به کار می‌رود. ریبوز-۵-فسفات نیز در سلول صرف ساخت نوکلئوتیدها یا اسید نوکلئیک جهت سنتز DNA و یا RNA در تقسیمات سلولی می‌شود. کلیدی بودن مسیر پنتوز فسفات در سلول‌های ماهیچه‌ای که رشد سریعی دارند، گزارش شده است (۱۳). فعال بودن مسیر پنتوز فسفات در ماهیچه در حال رشد می‌تواند به این علت باشد که ریبوز-۵-فسفات به عنوان مولکول اولیه مورد نیاز جهت ساخت RNA (mRNA) است. در میوفیبرهای در حال رشد سنتز پروتئین در نتیجه افزایش تولید mRNA افزایش می‌یابد. موارد گفته شده نتایج حاصل از این مطالعه اثر ژن KLF4 به عنوان یک فاکتور رونویسی دخیل در فرایند رشد ماهیچه‌های اسکلتی در گاو را تأیید می‌کنند.

شبکه تلفیقی برازش داده شده بر روی ژن‌های مؤثر بر میوژنز در این مطالعه نشان داد که فاکتور رونویسی FOXM1 نیز بر این فرایند مؤثر است. این فاکتور رونویسی در تمام بافت‌های در حال تکثیر جنینی مانند سلول‌های ماهیچه قلب، سلول‌های ماهیچه‌ای صاف بیان می‌شود ولی بیان آن فقط در چند بافت بالغ مانند روده، تیموس و بیضه گزارش شده است. نقش این فاکتور رونویسی در چرخه سلولی و ترمیم بافت‌هایی مانند کبد و شش بعد از آسیب نیز اثبات شده است (۲۷). در مطالعه‌ای اثر این فاکتور رونویسی بر افزایش طول و ادغام سلول‌های ماهیچه‌ای گزارش شد(۲۸). مطابق با نتایج هستی‌شناسی در این مطالعه، مسیر متابولیکی پیرووات به کمک این فاکتور رونویسی و ژن‌های تحت کنترل آن فعال می‌گردند (جدول ۱). پیرووات یک مولکول مرکزی در شبکه متابولیکی می‌باشد. پیرووات می‌تواند از طریق مسیر گلوکونئوژنز به گلوکز و یا با تبدیل شدن به استیل کوآنزیم آ در سنتز اسید چرب شرکت کند. پیرووات به آلانین، والین، لوسین و اتانول نیز قابل تبدیل است. مطالعات آزماشگاهی نشان داد که حضور پیرووات و لوسین یا ایزولوسین، سنتز پروتئین را در سلول ماهیچه ای افزایش می‌دهد (۱۰). از اینرو نتایج حاصل از این مطالعه به همراه گزارشات اشاره شده حاکی از تاثیر تحریکی پروتئین حاصل از ژن FOXM1 بر رشد ماهیچه از طریق اثر بر روند تمایز و تنظیم بیان ژن‌هایی است که سنتز پروتئین در سلول ماهیچه‌ای را تحریک می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد فاکتور رونویسی FOS نیز بر میوژنز مؤثر است. بیان این فاکتور رونویسی طی اعمال تیمار محدودیت غذایی و سپس برطرف شدن آن کاهش یافت. به بیان دیگر، در این مطالعه کاهش بیان این فاکتور رونویسی به میوژنز انجامید. سایر مطالعات نیز تأثیر معکوس بیاناین فاکتور رونویسی بر روی مهمترین فاکتور تنظیم کننده ماهیچه (MyoD1) گزارش نموده‌اند. MyoD1 تمایز میوبلاست‌ها را مختل می‌کند. آنها بیان داشتند که میوژنین به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی

سنتز ماهیچه با اثر مهارکنندگی که در مراحل پایانی تمایز بر روی بیان ژن FOS دارد، باعث تکمیل مرحله تمایز و ادغام سلول‌های فیبر ماهیچه و در نهایت تولید میوفیبر می‌شود. از نظر هستی‌شناسی، ماهیت این فاکتور رونویسی و ژن‌های تنظیم شونده توسط آن شباهت زیادی به ژن KLF4 داشت.

در مطالعه حاضر، فاکتور رونویسی MYBL2 نیز بر بیان ژن‌های دخیل بر فرایند میوژنز در بافت ماهیچه اسکلتی مؤثر شناخته شد. در مطالعات قبلی، بیان این فاکتور رونویسی در کلون، مغز و سلول‌ها بنیادی خون‌ساز گزارش شده است. این فاکتور رونویسی به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی فرایند سیکل سلولی شناخته شده است. همچنین، این فاکتور رونویسی باعث کاهش مرگ سلولی می‌شود. یکی دیگر از عملکردهای آن کمک به حفظ خاصیت خودزایایی و تمایز در سلول‌های بنیادی می‌باشد (۲۹). این فاکتور رونویسی به عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های مؤثر در تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و تشکیل سلول‌های میوبلاست اسکلتی معرفی شده است(۱۵). آنالیز هستی‌شناسی این ژن به همراه ژن‌هایی که بیان آنها تحت تأثیر این فاکتور رونویسی قرار می‌گیرند نشان داد که این دسته ژنی بر فرایندهای پایه‌ای سلول مانند تنظیم رونویسی و تنظیم بیان ژن مؤثر است (جدول۱). علاوه بر این، این مطالعه نشان داد که در سلول‌های در حال رشد فرایند بیوسنتز نوکلئوتیدها هم تحت کنترل این دسته ژنی قرار گرفته است. با توجه به اینکه مهم‌ترین مسیر بیوشیمیایی داخل سلول‌های ماهیچه اسکلتی در حال رشد سنتز و ذخیره پروتئین می‌باشد، تولید نوکلئوتیدها احتمالاً مولکول‌های اولیه را جهت سنتز RNA (mRNA) و در نهایت سنتز پروتئین در اختیار سلول قرار می‌دهد. از اینرو می‌توان نتیجه گرفت پروتئین حاصل از ژن MYBL2 با تاثیر بر تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و فرایندهای بنیادی سلولی می‌تواند بر رشد ماهیچه‌های اسکلتی موثر باشد.



شکل ۱- مصورسازی شبکه تلفیقی تنظیم کننده فرایند رشد بافت ماهیچه اسکلتی در گاو. اهمیت تنظیم‌کنندگی ژن‌ها با استفاده از تغییر رنگ از قرمز به سبز (نشان‌دهنده اثرات تنظیم کنندگی بیشتر به کمتر) و نیز اندازه گره (گره‌های بزرگتر اثرات تنظیم‌کنندگی بیشتری دارند) نمایش داده شده است.

در مطالعه حاضر، بیان فاکتور رونویسی KLF10 طی اعمال محدودیت غذایی که منجر به میوژنز شده بود، کاهش یافت. در مدل حیوانی، حضور پروتئین حاصل از این ژنکه تنظیم‌کننده تکثیر و تمایز سلول‌های میوبلاست است، در سلول میوبلاست می‌تواند تا ۸۰ درصد باعث کاهش بیان و توقف عملکرد ژن FGFR1 شود (۲۱). هستی‌شناسی مربوط به این فاکتور رونویسی نیز نشان داد که این فاکتور رونویسی به همراه ژن‌های تحت تنظیم آن، همانند سایر فاکتورهای رونویسی مورد بحث در این مطالعه، بر روند ایجاد هگزوزهای میوفیبرها موثراست. این هگزوزها، همانطور که قبلاً به آن اشاره شد، به منظور تولید پروتئین مصرف می‌شود.

FOSB آخرین فاکتور رونویسی می‌باشد که بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بر روند سنتز بافت ماهیچه‌ای مؤثر می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی این فاکتور رونویسی، عملکرد بیولوژیکی پروتئین حاصل از این ژن را بر تکثیر سلولی موثر دانسته‌اند (۲۰). بیان این فاکتور رونویسی در سلول‌های استئوبلاست گزارش شده است. از عملکردهای بیولوژیکی این فاکتور رونویسی می‌توان به کاهش سنتز بافت چربی اشاره کرد. گزارش شده است که این ژن تحت تأثیر فاکتور رونویسی Foxd3، باعث حفظ خاصیت خودزایایی در سلول‌های بنیادی موش و توسعه بافت

جدول ۵- جدول مقایسه میانگین ارتفاع موج R در اشتقاق‌های اندامی (میلی‌متر) در انتهای دوره آزمایش.

نماد فاکتور رونویسی	شناسه هستی‌شناسی	شرح هستی‌شناسی	احتمال تصحیح شده
KLF۴	۶۰۰۶	فرایند متابولیکی گلوکز	۰/۰۰۱۸
	۶۰۹۴	گلوکونئوژنز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۸	فرایند متابولیکی هگزوز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۹	فرایند بیوسنتز هگزوز	۰/۰۰۱۸
FOXM۱	۶۰۹۰	فرایند متابولیکی پیرووات	۰/۰۰۱۸
FOS	۶۰۰۶	فرایند متابولیکی گلوکز	۰/۰۰۱۸
	۶۰۹۴	گلوکونئوژنز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۸	فرایند متابولیکی هگزوز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۹	فرایند بیوسنتز هگزوز	۰/۰۰۱۸
	۶۰۹۰	فرایند متابولیکی پیرووات	۰/۰۰۱۸
MYBL۲	۴۵۴۴۹	تنظیم رونویسی	۰/۰۴
	۱۰۴۶۸	تنظیم بیان ژن	۰/۰۴
	۵۱۱۷۱	تنظیم فرایندهای متابولیکی نوکلئیک اسید، نوکلئوتید و نوکلئوزید	۰/۰۴
KLF۱۰	۶۰۰۶	فرایند متابولیکی گلوکز	۰/۰۰۱۸
	۶۰۹۴	گلوکونئوژنز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۸	فرایند متابولیکی هگزوز	۰/۰۰۱۸
	۱۹۳۱۹	فرایند بیوسنتز هگزوز	۰/۰۰۱۸
	۶۰۹۰	فرایند متابولیکی پیرووات	۰/۰۰۱۸
FOSB	۶۰۵۳۸	توسعه اندام ماهیچه اسکلتی	۰/۰۰۱
	۷۵۱۹	توسعه بافت ماهیچه اسکلتی	۰/۰۰۱

ماهیچه اسکلتی می‌شود (۲۲). تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی این فاکتور رونویسی و ژن‌های تحت کنترل آن (جدول۱) حاکی از اثر مستقیم این دسته از ژن‌ها بر بافت ماهیچه‌ای است.

نتیجه‌گیری

توسعه و تکامل بافت ماهیچه اسکلتی فرایندی پیچیده و چند مرحله‌ای است. در دام‌ها و بویژه دام‌های داشتی و پرواری می‌توان به کمک مطالعات ترانسکریپتومی و ژنومی مکانیزم این فرایند بیولوژیکی را بهتر درک نمود. همچنین با شناسایی نشانگرهای مولکولی و جایگاه‌های صفات کمی مرتبط می‌توان مستقیماً این فرایند را در برنامه‌های اصلاح نژادی وارد نمود و بهبود ژنتیکی این صفات کمک نمود. در این مطالعه با استفاده از شبکه‌های تلفیقی برازش شده بر روی ژن‌هایی که بیان متفاوتی در دو حالت شاهد و رشد جبرانی داشتند، فاکتورهای رونویسی دخیل در فرایند بیولوژی رشد ماهیچه‌های اسکلتی و ژن‌های تحت تنظیم این فاکتورهای رونویسی بررسی گردید. آنالیز هستی‌شناسی مربوط به این فاکتورهای رونویسی و ژن‌های تحت تنظیم آنها نشان داد در فرایند رشد ماهیچه، مسیرهای تولید هگزوزها (گلوکز) و تنظیم فرایندهای پایه‌ای سلول (مانند تنظیم بیان ژن و توسعه بافت ماهیچه) فعال می‌گردد. هگزوزهای تولید شده در سلول ماهیچه برای تولید مولکول‌های پر انرژی مانند NADPH، سنتز اسیدهای چرب و همچنین تولید مولکول‌های پیش‌ساز جهت سنتز مولکول‌هایDNA و RNA (پروتئین) استفاده می‌گردند. در صنعت پرورش دام‌های گوشتی، از این فاکتورهای رونویسی به عنوان عوامل تنظیم کننده صفت رشد در ماهیچه‌های اسکلتی می‌توان برای درک بهتر فرایند تولید گوشت و بهبود آن بهره برد.

منابع مورد استفاده

1. Anders, S., P.T. Pyl and W. Huber. 2014. HTSeq–a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* btu638.

2. Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformaticsbtu* 170.

3. Chaplais, E., H.J. Garchon, M.E. Chaplais and G. AnnotationDbi. 2015. Package 'stringgaussnet. http://www.et.bs.ehu.es/cran/web/packages/stringgaussnet/stringgaussnet.pdf. Accessed 25 March 2017

4.Deato, M.D.E., M.T. Marr, T. Sottero, C. Inouye, P. Hu and R. Tjian. 2008. MyoD targets TAF3/TRF3 to activate myogenin transcription. *Molecular cell* 32(1): 96-105.

5. Dehmer, M., L.A. Mueller and F. Emmert-Streib. 2013. Quantitative network measures as biomarkers for classifying prostate cancer disease states: a systems approach to diagnostic biomarkers. *PloS One* 8(11): e77602.

6. Du, P., J. Gong, E.S. Wurteleand J.A. Dickerson. 2005. Modeling gene expression networks using fuzzy logic.IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B (Cybernetics) 35(6): 1351-1359.

7. Dunner, S., N. Sevane, D. García, O. Cortés, A. Valentini, J. Williams, B. Mangin, J. Cañón, H. Levéziel and G. Consortium. 2013. Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. *Livestock Science* 154(1): 34-44.

8. Friedman, N., M. Linial, I. Nachman and D. Pe'er. 2000. Using Bayesian networks to analyze expression data. *Journal of computational biology* 7(4): 601-620.

9. Glass, L. and S.A. Kauffman. 1973. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *Journal of theoretical Biology* 39(1): 103-129.

10. Hedden, M.P. and M.G. Buse. 1982. Effects of glucose, pyruvate, lactate, and amino acids on muscle protein synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 242(3): E184-E192.

11. Imoto, S., T. Goto and S. Miyano. 2001. Estimation of genetic networks and functional structures between genes by using Bayesian networks and nonparametric regression. In:Pacific symposium on Biocomputing. Kauai, Hawaii.Volume. 7, pp. 175-186.

12. Jiang, J., Y.-S. Chan, Y.-H. Loh, J. Cai, G.-Q. Tong, C.-A. Lim, P. Robson, S. Zhong and H.-H. Ng. 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature cell biology* 10(3): 353-360.

13. Johansen, K.A. and K. Overturf. 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout.Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 144(1): 119-127.

14. Keogh, K., D.A. Kenny, P. Cormican, M.S. McCabe, A.K. Kelly and S.M. Waters. 2016. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of bovine skeletal muscle. *PloSOne* 11(2): e0149373.

15. Li, Z., J.A. Gilbert, Y. Zhang, M. Zhang, Q. Qiu, K. Ramanujan, T. Shavlakadze, J.K. Eash, A. Scaramozza and M.M. Goddeeris. 2012. An HMGA2-IGF2BP2 axis regulates myoblast proliferation and myogenesis. *Developmental cell* 23(6): 1176-1188.

16. Mangadzuwa, D.A., J. Thiengtham and S. Prasanpanich. 2016. A case study on compensatory growth of emaciated cattle fed on total mixed ration. *African Journal of Agricultural Research* 11(27): 2397-2402.

17. Martinez, R., J.F. Rocha, D. Bejarano, Y. Gomez, Y. Abuabara and J. Gallego. 2016. Identification of SNPs in growth-related genes in Colombian creole cattle. *Genetics and molecular research*

15(3).
18. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers.The *Journal of biophysical and biochemical cytology* 9(2): 493-495.
19. Molinelli, E.J., A. Korkut, W. Wang, M.L. Miller, N.P. Gauthier, X. Jing, P. Kaushik, Q. He, G. Millsand D.B. Solit. 2013. Perturbation biology: inferring signaling networks in cellular systems. *PLoS Computational Biology* 9(12): e1003290.
20. Na, H.H., H.M. Cheong and K.C. Kim. 2016. BMB Reports: SETDB1 mediated FosB expression increases the cell proliferation rate during anticancer drug therapy. *BMB reports* 49(4): 238-243.
21. Parakati, R. and J.X. DiMario. 2013. Repression of myoblast proliferation and fibroblast growth factor receptor 1 promoter activity by KLF10 protein. *Journal of Biological Chemistry* 288(19): 13876-13884.
22. Plank, J.L., M.T. Suflita, C.L. Galindo and P.A. Labosky. 2014. Transcriptional targets of Foxd3 in murine ES cells. *Stem cell research* 12(1): 233-240.
23. Robinson, M.D., D.J. McCarthy and G.K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1): 139-140.
24. Trapnell, C., L. Pachter and S.L. Salzberg. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9):1105-1111.
25. Woo, D.-H., S.-J. Yun, E.-K. Kim, J.-M. Ha, H.-K. Shin and S.-S. Bae. 2012. Regulation of Skeletal Muscle Differentiation by Akt. *Journal of Life Science* 22(4): 447-455.
26. Yoshida, T., K.H. Kaestner and G.K. Owens. 2008. Conditional deletion of Krüppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury. *Circulation research* 102(12): 1548-1557.
27. Yoshida, Y., I.C. Wang, H.M. Yoder, N.O. Davidson and R.H. Costa. 2007. The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology* 132(4): 1420-1431.
28. Yu, Y., L. Qi, J. Wu, Y. Wang, W. Fang and H. Zhang. 2013. Kindlin 2 regulates myogenic related factor myogenin via a canonical Wnt signaling in myogenic differentiation. *PloS One* 8(5): e63490.
29. Zhan, M., D.R. Riordon, B. Yan, Y.S. Tarasova, S. Bruweleit, K.V. Tarasov, R.A. Li, R.P. Wersto and K.R. Boheler. 2012. The B-MYB transcriptional network guides cell cycle progression and fate decisions to sustain self-renewal and the identity of pluripotent stem cells. *PloS One* 7(8): e42350.