

# Meta-analysis of RNA-Seq and microarray expression data to identify genes effective in sheep muscle growth and development

Fahime Mohammadi, Mojtaba Tahmoorespur, Ali Javadmanesh

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding Author's Email: [tahmoores@um.ac.ir](mailto:tahmoores@um.ac.ir)

**Introduction** Among different sheep breeds in the world, the Texel breed is known as a meaty and muscular breed. Skeletal muscle growth is a step-by-step and exponential process from differentiation, development and maturation, which is regulated by gene networks and cell signaling pathways, and several genes and factors are involved in the process of muscle fiber formation and their growth and hypertrophy (Badday Betti *et al.* 2022). The study of gene expression is done with several methods, and this gene expression information is used in breeding programs as a tool to improve phenotypic choices. Databases are a large source of expression data that can be used by bioinformatics methods to integrate heterogeneous data from different studies and platforms. In this study, by integrating the microarray and RNA-Seq data available in the database belonging to the muscle tissue of Texel breed sheep, the transcriptomic profile of the muscle was compared at two ages of embryonic and adult.

**Materials and Methods** Microarray data related to longissimus dorsi muscle tissue with three replicates d-70 embryos from GEO database with accession number GSE23563 and RNA-Seq data related to muscle tissue from six samples with two replicates from adult individuals from ArrayExpress database were selected. Limma, Biobase and GEOquery software packages were used to calculate the expression values of the microarray data related to the embryonic age in the R environment, and Tuxedo, HTSeq and DESeq2 packages were used in the Linux and R environment to calculate the expression values of the RNA-Seq data (Kamali *et al.* 2022; Sahraei *et al.* 2019). Then two types of expression values were integrated and to eliminate non-biological effects, the batch effects were also removed. Next, differential genes were identified with the limma software package. In order to identify the relationship between the identified differential genes, the gene network was drawn between them by software of Cytoscape version 3.7.1 and String 1.5.1 program. next, due to the vastness of the gene network, each network was clustered with MCODE 1.6.1 and CytoCluster 2.1.0 programs (ClusterOne algorithm) and significant clusters (P-value < 0.05) were identified (Saedi *et al.* 2022). In order to better understand the ontology and function of the identified differential genes, the Gene Ontology of the genes was investigated using software of Cytoscape version 3.7.1 and ClueGO 2.5.9 and CluePedia 1.5.9 programs. After receiving the Gene Ontology results, significant Gene Ontology terms (P-Value < 0.05) related to functional groups were identified. Finally, the selected genes (Adj P-Value < 0.05) were identified and introduced in these two age groups.

**Results and Discussion** After quality control, correcting and normalizing the microarray data, the GPL10778 platform annotation file with 1042520 Probe ID was used to calculate their expression values. After relevant analyzes of 9289 Probe ID identified related to the data of this study, 7918 Gene Symbol was identified finally. After quality control, trimming and normalizing the RNA-Seq data in total, the number of Ensembl\_Genes based on which the reading values were calculated by HTSeq was 27056. After removing IDs that had zero readings in all 6 samples, 10855 IDs remained. Then, these 10855 Ensembl ID were merged with the annotation file to obtain Gene Symbol, and finally 9417 common genes were identified between the six samples of adult age. The results of differential expression analysis showed that there were significant differences in the expression of 62 genes (37 increased and 25 decreased) in the muscle tissue between adult and embryonic age. By creating a gene network between differential genes, 15 selected genes were identified, including MYH1, ACTN3, CASQ1, TMOD4, FBP2, SLC2A4, MX1, COX4I1, SOD2, MFN2, UQCRB, UCP3, PRKAB2, PHKG2, PPP1R3C. The function of these genes has been proven in cell proliferation, protein synthesis, myofibril formation, and lipid metabolism. Differential gene enrichment analysis revealed some biological processes such as Vasculogenesis, positive regulation of ossification, positive regulation of muscle tissue development, regulation of muscle contraction, contractile fiber part, calcium signaling, calcineurin-NFAT signaling cascade and regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT, the molecular function of regulating cation channel activity and the cellular components of the contractile fiber.

**Conclusion** This study in addition to confirming the accuracy of the integration method of two types of heterogeneous data, provided a general view of the transcriptomic differences of Texel sheep muscle tissue at two important age points to be a useful source for biological investigations of genes related to muscle growth and development in sheep.

**Keywords:** Data Integration, Differential Gene Expression, Gene Network, Gene Ontology

# فرا تحلیل داده‌های بیانی RNA-Seq و Microarray برای شناسایی ژن‌های مؤثر در رشد و نمو عضله گوسفند

فهیمة محمدی، مجتبی طهمورث پور، علی جوادمنش

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل نویسنده مسئول: [tahmoores@um.ac.ir](mailto:tahmoores@um.ac.ir)

## چکیده

امروزه می‌توان با روش‌های بیوانفورماتیکی می‌توان داده‌های حاصل از مطالعات و پلتفرم‌های مختلف را ادغام و از آن‌ها بهره برد. در این مطالعه با ادغام داده‌های ریزآرایه و RNA-Seq بافت عضله‌ی گوسفند نژاد تکسل موجود در پایگاه داده به مقایسه پروفایل ترنسکرپتومی عضله در دو مقطع سنی جنینی و بلوغ پرداخته شد. برای محاسبه مقادیر بیانی داده‌ی ریزآرایه مربوط به دوران جنینی از بسته‌های نرم‌افزاری Limma، BioBase و GEOquery در محیط R و برای محاسبه مقادیر بیانی داده‌ی RNA-Seq از پروتکل Tuxedo و بسته‌ی نرم‌افزاری HTSeq در محیط لینوکس و بسته‌ی نرم‌افزاری DESeq2 در محیط R استفاده شد. سپس دو نوع مقادیر بیانی ادغام شدند. نتایج نشان داد در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش و ۲۵ ژن کاهش بیان) اختلاف معناداری داشتند. با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی، ۱۵ ژن منتخب MYH1، ACTN3، CASQ1، TMOD4، FBP2، SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB، UCP3، PRKAB2، PHKG2، PPP1R3C شناسایی شدند. عملکرد این ژن‌ها در تکثیر سلولی، تشکیل میوفیبریل‌ها و متابولیسم‌های چربی‌زایی ثابت شده‌است. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی نقش برخی از این ژن‌ها مثل ACTN3 و CASQ1 را در فرآیندهای زیستی مثل توسعه سلول عضلانی مخطط، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و JAK-STAT آشکار کرد. این مطالعه علاوه بر تایید روش ادغامی داده‌های ناهمگن، دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکرپتومی بافت عضله‌ی گوسفند تکسل در دو مقطع مهم سنی را فراهم آورد تا ژن‌های منتخب معرفی شده منبع مفیدی برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد و نمو عضله باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ادغام داده‌های ناهمگن، بیان افتراقی ژن‌ها، شبکه‌ی ژنی، هستی‌شناسی ژن‌ها.

## مقدمه

تشکیل میوفیبریل‌های عضله، طی فرآیندی بنام میوژنز<sup>۱</sup> صورت می‌گیرد و در گونه‌هایی مانند گوسفند، حداکثر تشکیل میوفیبریل عضله در دوران جنینی است. میوژنز قبل از تولد شامل میوژنز اولیه و ثانویه است. میوژنز اولیه در مرحله رویانی و میوژنز ثانویه در مرحله جنینی رخ می‌دهد و موجب تشکیل فیبرهای عضلانی ثانویه می‌شود. بنابراین دورانی که میوژنز ثانویه در حال انجام است، برای رشد عضلات اسکلتی حیاتی است (Yan *et al.*, 2013). بیش از سه موج میوژنز ثانویه قبل از تولد در گوسفند ظاهر می‌شود و اکثر میوفیبریل‌ها بعد از ۶۰ روزگی آبستنی تشکیل می‌شوند (Rashidian *et al.*, 2020). رشد بافت‌های عضلانی بعد از تولد نیز فقط توسط هایپرتروفی رخ می‌دهد و شامل تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای، تمایز و تجزیه و بازسازی پروتئین‌ها است (Sadkowski *et al.*, 2006). امروزه از اطلاعات بیان ژن در برنامه‌های اصلاح‌نژادی به عنوان ابزاری برای بهبود انتخاب‌های فنوتیپی استفاده می‌شود. تا کنون چندین گزارش از بررسی ترنسکرپتوم بافت عضله در گوسفند ثبت شده است (Mohammadi *et al.*, 2019; Betti *et al.*, 2022). در سال ۲۰۱۳ ژانگ و همکارانش (Zhang *et al.*, 2013) روش RNA-Seq را برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ترنسکرپتوم عضله یک ماده ۱۱ ماهه در دو نژاد دورپر<sup>۲</sup> و دنبه کوچک هان<sup>۳</sup> به کار بردند. در نهایت ۱۳۰۰ ژن بطور معنی‌داری تفاوت بیان نشان دادند. همچنین پروفایل ترنسکرپتوم بافت عضله از سه ماده یک‌ساله در دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا<sup>۴</sup> و دنبه کوچک هان هم توسط سون و همکارانش (Sun *et al.*, 2016) مورد مطالعه قرار گرفت که در نهایت ۹۶۰ ژن تفاوت بیان معنی‌داری نشان دادند. نتایج نشان داد که برخی از ژن‌های افتراقی شناسایی شده از جمله MRFs، GXP1 و STAC3، نقش مهمی در روند رشد و تکامل عضلات بازی می‌کنند. مقایسه ترنسکرپتوم بافت عضله اسکلتی در دوران قبل از تولد در دو نژاد گوسفند دورست و دنبه کوچک هان توسط لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2015) انجام شد. در این مطالعه با روش ریزآرایه از بافت عضله در سنین ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روزگی جنینی نمونه‌برداری شد و بعد از آنالیزهای مربوطه به ترتیب ۸۸، ۱۲۸ و ۳۴۰ ژن بین دو نژاد شناسایی شد. در ادامه با تولید و انباشت مجموعه‌ی زیادی از داده‌ها، متآنالیز برای ترکیب چندین مطالعه برای افزایش قدرت آماری محبوبیت زیادی پیدا کرد (Bakhshalizadeh *et al.*, 2021; Zerehdaran *et al.*, 2020). تا جایی که در سال ۲۰۱۷ چندین مطالعه در زمینه ادغام داده‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNA-Seq (Ma *et al.*, 2017) و (Jung *et al.*, 2017) منتشر شد که نتایج این مطالعات حاکی از صحت بالای روش ادغامی و بهبود دقت و قدرت نتایج بود. ادغام روش‌های مختلف با در نظر گرفتن اصول صحیح آنالیز، کمک شایان توجهی نیز به افزایش تعداد نمونه‌های مطالعه می‌کند که خود ممکن است باعث افزایش صحت نتایج می‌شود. از آنجایی که بررسی پروفایل ترنسکرپتومی بافت عضله طی مراحل جنینی تا بعد از تولد و بلوغ توسط فن‌آوری‌هایی مثل ریزآرایه و RNA-seq، بررسی جامع‌تری از ژن‌ها، عوامل تنظیم‌کننده‌ای که بر رشد عضلات موثرند را ارائه خواهد داد، هدف مطالعه حاضر تهیه تصویر جامعی از مراحل کلیدی رشد و نمو گوسفند نژاد تکسل به عنوان یک گوسفند گوشتی با فنوتیپ عضلانی است. همچنین دانش بهتر از معماری مولکولی و ژنتیکی بافت عضله، ممکن است منجر به ایجاد فرصت‌های جدیدی در زمینه اصلاح‌نژاد برای پرورش گوسفند گوشتی شود.

1. Myogenesis

2. Dorper

3. Small-Tailed Han Sheep

4. Qianhua

## مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از دو مجموعه داده‌ی ریزآرایه و RNA-Seq در نژاد تکسل استفاده شد. داده‌های ریزآرایه مربوط به بافت عضله‌ی لانژیسیموس دورسی با ۳ تکرار در دوران ۷۰ روزگی جنینی از پایگاه GEO با شماره دسترسی GSE23563 به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE23563> انتخاب شد. بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال‌سازی و محاسبه مقادیر بیانی ژن‌ها همگی در محیط R4.2.1 و توسط بسته نرم‌افزاری Biobase Limma، GEOquery انجام شد. داده‌های RNA-Seq مربوط به بافت عضله از شش نمونه با دو تکرار مربوط به دوران بلوغ از پایگاه ArrayExpress به آدرس <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-3838/samples/> انتخاب شدند. آنالیز داده‌های RNA-Seq در محیط لینوکس اوبنتو انجام شد. بررسی کیفیت داده‌های RNASeq با نرم‌افزار <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> انجام شد. سپس برای پیرایش و فیلتر خوانش‌های نامطلوب از نرم‌افزار Trimmomatic-0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36.zip>) استفاده شد. دستور پیرایش بر اساس حذف خوانش‌های با نمره کمتر از 33 phred، حذف یک باز را از ابتدای خوانش، حذف خوانش‌هایی با طول کمتر از ۳۶ باز، شناسایی آلودگی آداپتوری با ۲ باز غیر منطبق بود. برای نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم و ترنسکرپتوم مرجع گوسفند ([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-99/fasta/ovis\\_aries/dna](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-99/fasta/ovis_aries/dna)) از نرم‌افزار HISAT2 2.2.0 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) استفاده شد. با توجه به اینکه نرم‌افزار HISAT2 ژنوم مرجع ایندکس‌شده را به عنوان ورودی می‌پذیرد، بدین منظور از نرم‌افزار Bowtie2 (<http://bowtiebio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) استفاده شد. فرمت فایل خروجی hisat2، sam است و چون برای ادامه مراحل فرمت بصورت bam موردنیاز است، از نرم‌افزار samtools-1.9 (<https://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/>) استفاده شد. در ادامه برای محاسبه مقادیر خوانش‌های نقشه‌یابی شده در هر ناحیه از نرم‌افزار <https://pypi.org/project/HTSeq/> HTSeq-0.6.1 استفاده شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها و محاسبه‌ی مقادیر بیانی داده‌های RNASeq نیز از بسته‌ی DESeq2 استفاده شد. جهت ادغام دو نوع مقادیر بیانی حاصل از داده‌های ریزآرایه و RNASeq، ابتدا دو مجموعه داده فراخوانی و در نهایت هر دو مجموعه با هم ادغام شد. در ادامه جهت حذف اثرات غیر بیولوژیکی، اثرات دسته<sup>۱</sup> هم حذف و ژن‌های افتراقی محاسبه شدند. جهت شناسایی ارتباط بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده، شبکه ژنی بین آن‌ها توسط نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و برنامه 1.5.1 STRING رسم شد. سپس به دلیل وسیع بودن شبکه ژنی، خوشه‌بندی هر شبکه با افزونه‌های MCODE 1.6.1 و CytoCluster 2.1.0 (الگوریتم ClusterOne) صورت گرفت و خوشه‌های معنی‌دار ( $P\text{-value} < 0.05$ ) شناسایی شد. جهت بررسی و درک بهتر ماهیت و عملکرد ژن‌های افتراقی شناسایی شده، هستی‌شناسی<sup>۲</sup> ژن‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و افزونه‌های ClueGO 2.5.9 و CluePedia 1.5.9 بررسی شد. بدین منظور ژن‌های افتراقی شناسایی شده به افزونه ClueGO معرفی شد و بعد از دریافت نتایج هستی‌شناسی، عبارات هستی‌شناسی معنی‌دار ( $P\text{-Value} < 0.05$ ) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. در نهایت نیز ژن‌های منتخب ( $\text{Adj } P\text{-Value} < 0.05$ ) در این دو مقطع سنی شناسایی و معرفی شد.

<sup>1</sup> batch effect

<sup>2</sup> Gene Ontology

## نتایج و بحث

بعد از بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال سازی و محاسبه مقادیر بیانی داده‌های ریزآرایه با استفاده از فایل حاشیه نویسی پلت فرم GPL10778، در نهایت ۷۹۱۸ ژن شناسایی شد. همچنین بررسی کیفیت داده‌های RNA-Seq مشخص کرد که کیفیت همه خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی تا حدود بسیاری مناسب بود و متوسط کیفیت بازهای خوانده‌شده بالای ۲۵ (احتمال وجود یک باز اشتباه در هر ۳ خوانش ۱۰۰ بازی) بود. در جدول ۱ اطلاعات آماری خوانش‌ها قبل و بعد از آنالیز برای نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش گزارش شده است.

جدول ۱- اطلاعات آماری خوانش‌ها (نقشه‌یابی شده بر روی ژنوم مرجع و محاسبه شده توسط HTSeq)

Table1- Statistical information of the reads (mapped on the reference genome and calculated by HTSeq)

Samples نمونه‌ها	Total seq. of raw data مجموع توالی داده‌های خام	GC% درصد GC	Total seq. of trimmed data مجموع توالی داده‌های پیرایش شده	overall alignment rate% نرخ هم‌ردیفی کلی	Ensembl Gene تعداد ژن	Total counts خوانش کل
A <sup>1</sup> -F <sup>2</sup> -1	19697023	46 & 46	15023092	94.04	5882	113446
A-F-2	19792913	46 & 46	10350142	94.22	4981	78175
A-M <sup>3</sup> -3	9016506	46 & 46	7220274	91.87	3937	63936
A-M-4	5771315	45 & 45	4633682	89.71	3077	39784
A-M-5	9285314	46 & 46	7445816	91.85	3968	65933
A-M-6	5852296	45 & 45	4703164	89.99	3061	39651

شش نمونه از 1 تا 6 نامگذاری شده اند

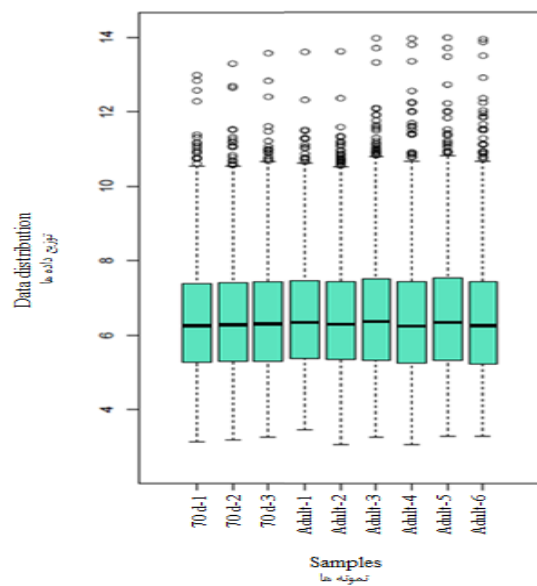
<sup>1</sup> Adult (بالغ)

<sup>2</sup> Female (ماده)

<sup>3</sup> Malle (نر)

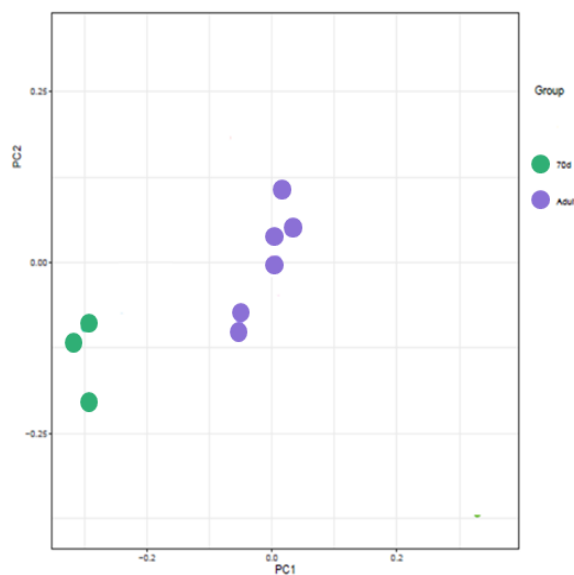
تعداد ژن‌هایی که بر مبنای آن‌ها مقادیر خوانش‌ها توسط HTSeq محاسبه شد، ۲۷۰۵۶ بود. بعد از حذف شناسه‌های ژنی که دارای مقدار خوانش صفر در هر ۶ نمونه بودند، ۱۰۸۵۵ آیدی باقی ماند. سپس این ۱۰۸۵۵ Ensembl ID با فایل حاشیه‌نویسی جهت بدست آوردن علامت اختصاری ژن ادغام شدند که در نهایت ۹۴۱۷ ژن مشترک بین شش نمونه‌ی مقطع بلوغ شناسایی شد. در ادامه بعد از اینکه برای محاسبه بیان افتراقی ژن‌ها، هر دو نوع مقادیر بیانی داده‌های ریزآرایه و RNASeq حاصل از مراحل قبلی با یکدیگر ادغام شدند، اثرات دسته نیز که به دلیل متفاوت بودن تکنیک تولید دو نوع داده وجود داشت حذف و نمودار آن‌ها رسم شد. شکل ۲ نمودار جعبه‌ای داده‌های ادغام شده و شکل ۳ نمودار PCA داده‌های ادغام شده را نشان می‌دهد.

در مجموع بین مقطع جنینی و بلوغ، ۶۲ ژن افتراقی ( $FDR\text{-}adj.P.Val < 0.05$ ) شناسایی شد که از این میان ۳۷ ژن افزایش بیان ( $\log FC > 1$ ) و ۲۵ ژن کاهش بیان ( $\log FC < -1$ ) داشتند. جدول‌های ۳ و ۴ به ترتیب ژن‌های با افزایش و کاهش بیان در این مقطع سنی را نشان می‌دهد.



شکل ۲. نمودار جعبه‌ای پراکنش مقدار بیان ژن‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته. نواحی سبز رنگ شامل چارک اول، چارک میانی و چارک سوم است.

**Figure 2-** Boxplot of the distribution of gene expression values obtained from microarray and RNASeq methods after integration and removing batch effects. The green areas include the first quartile, the middle quartile, and the third quartile.



شکل ۳- نمودار PCA داده‌های ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته. داده‌های مربوط به هر مقطع سنی با رنگ جداگانه (رنگ سبز برای مقطع ۷۰ روزگی و رنگ بنفش برای مقطع بلوغ) مشخص شده‌اند.

**Figure 3-** PCA plot of microarray and RNASeq data after integration and removing batch effects. The data related to each age group are marked with a separate color (green color for the 70-day age and purple color for the adult).

جدول ۳- ژن‌های با افزایش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی.

**Table 3-** Genes with increased expression between adult and 70 days of embryonic age.

Gene Symbol	logFC	AveExpr	T-test	P.Value	adj.P.Val	Bonferroni
FBP2	3.034244	7.453365	5.539103	8.48E-06	0.001991	3.670732
PPP1R3C	2.823403	10.138	3.91733	0.000589	0.024217	-0.32517
HSD11B1	2.782934	6.12764	6.866368	2.92E-07	0.000161	6.835957
MYH1	2.260161	11.59883	8.366309	8.3E-09	1.36E-05	10.13162
ACTN3	2.178041	8.273333	4.354317	0.000189	0.012926	0.744079
SLC2A4	2.054425	7.460889	5.582893	7.57E-06	0.001914	3.777934
KLF9	1.963932	5.503618	7.091172	1.68E-07	0.00015	7.350841
COX4I1	1.927319	9.562411	5.445294	1.08E-05	0.002093	3.440628
FGL2	1.924955	6.438032	5.259021	1.76E-05	0.002754	2.982131
TMOD4	1.863128	8.802091	4.765696	6.41E-05	0.006388	1.761543
MX1	1.846713	6.704768	3.995615	0.000481	0.021306	-0.13506
MBP	1.795783	7.179845	4.716971	7.29E-05	0.007046	1.640821
UQCRB	1.719672	9.54251	5.127208	2.48E-05	0.003055	2.656649
PLN	1.705074	7.953816	3.671922	0.001108	0.036073	-0.91539
CAV1	1.674279	6.466443	4.671898	8.2E-05	0.007491	1.529168
ALDH1A1	1.581084	6.428051	5.793099	4.4E-06	0.001204	4.290455

NOSTRIN	1.453875	5.335228	6.130006	1.85E-06	0.000554	5.10352
AASS	1.40669	5.367752	5.088528	2.75E-05	0.003227	2.561013
UCP3	1.391164	4.897552	3.749894	0.000908	0.032785	-0.72891
CTSL1	1.378055	7.631864	4.188295	0.000291	0.016767	0.335773
NFAT5	1.320186	7.125953	4.058485	0.000409	0.019385	0.018143
AFF1	1.30939	6.417712	5.037472	3.14E-05	0.003562	2.434704
SOD2	1.278101	6.632185	4.075197	0.000391	0.019196	0.058941
C1orf21	1.276609	6.198659	3.73043	0.000954	0.033723	-0.77556
AMOT	1.274326	7.106552	3.860116	0.000683	0.027392	-0.4636
CASQ1	1.269251	8.953483	3.686058	0.001069	0.036073	-0.88166
PECAM1	1.26162	8.528891	3.988622	0.00049	0.021306	-0.15208
NAMPT	1.252677	6.575231	3.677914	0.001092	0.036073	-0.9011
CA2	1.24611	5.798616	4.286247	0.000226	0.014539	0.576431
VEGFA	1.216136	6.898503	4.331761	0.0002	0.013164	0.688492
PRKCZ	1.18494	5.038701	4.110057	0.000357	0.018944	0.144137
MTUS1	1.127114	6.009025	3.852893	0.000696	0.027571	-0.48104
PTPN14	1.085529	7.391925	3.59518	0.001348	0.040657	-1.09786
SYBU	1.081182	5.567166	3.733414	0.000947	0.033723	-0.76841
AKAP7	1.076681	5.927487	5.367946	1.32E-05	0.002351	3.25048
MFN2	1.026356	7.883619	3.803323	0.000791	0.030185	-0.60054
PRKAB2	1.004612	6.775296	3.674774	0.0011	0.036073	-0.90859

جدول ۴ - ژن‌های با کاهش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

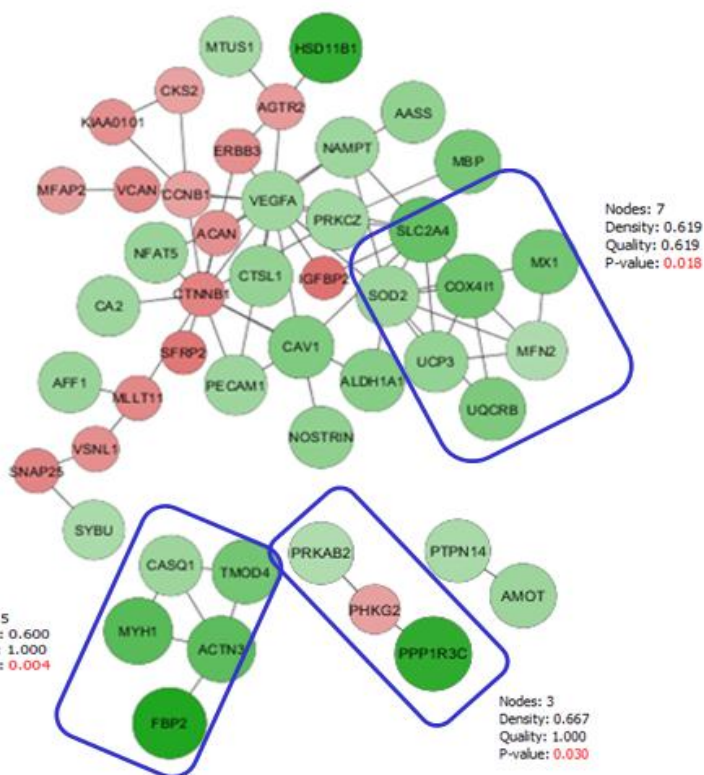
Table 4- Genes with decreased expression between Adult and 70 days of embryonic age.

Gene Symbol	logFC	AveExpr	T-test	P.Value	adj.P.Val	Bonferroni
NNAT	-2.41962	8.500148	-4.04752	0.00042	0.019467	-0.00862
ACOT7	-1.7284	5.420076	-6.51776	6.95E-07	0.000286	6.02412
IGFBP2	-1.55898	7.795998	-7.05712	1.83E-07	0.00015	7.273291
SFRP2	-1.49095	7.345442	-4.78297	6.13E-05	0.006295	1.804346
ISYNA1	-1.41615	5.849885	-8.49402	6.21E-09	1.36E-05	10.39651
ABI3BP	-1.38777	8.139394	-4.24061	0.000254	0.015223	0.464209
CTNNA1	-1.34473	9.220989	-4.2457	0.000251	0.015223	0.476728
SNAP25	-1.34138	5.926042	-6.8015	3.43E-07	0.000161	6.686106
MLLT11	-1.28446	5.608408	-6.27621	1.28E-06	0.00042	5.452683
VCAN	-1.26264	6.098742	-4.56524	0.000109	0.008921	1.265119
HN1	-1.23088	7.958271	-4.54582	0.000114	0.009159	1.21707
ERBB3	-1.2049	7.262624	-3.71656	0.000989	0.034048	-0.80877
VSNL1	-1.20476	4.388637	-4.5276	0.00012	0.009379	1.17199
KIAA0101	-1.19771	7.019201	-5.18265	2.15E-05	0.003055	2.793629
ACAN	-1.19551	4.322863	-3.59735	0.001341	0.040657	-1.09271
CDK2AP1	-1.1836	8.28275	-3.97701	0.000505	0.021557	-0.18032
AGTR2	-1.08291	5.009504	-6.82985	3.19E-07	0.000161	6.751666
PIGU	-1.07011	8.185229	-5.12811	2.48E-05	0.003055	2.658887
MFAP2	-1.05935	8.882939	-4.06435	0.000402	0.019385	0.032461
EMILIN2	-1.03678	6.224918	-4.38136	0.000176	0.012298	0.810768
INTS10	-1.0179	5.922382	-3.53011	0.001591	0.044407	-1.25166



CKS2	-1.01125	7.343007	-4.49475	0.000131	0.009758	1.090771
TLL1	-1.01047	4.55422	-6.36673	1.02E-06	0.000371	5.667644
PHKG2	-1.00799	6.056636	-4.4255	0.000157	0.011313	0.919692
CCNB1	-1.00222	6.348495	-4.64391	8.83E-05	0.007505	1.459842

بعد از رسم شبکه‌ی تعاملی بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده با نرم‌افزار Cytoscape و برنامه STRING، خوشه‌های ژنی معنی‌دار با افزونه CytoCluster و عبارات هستی‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار آن‌ها با افزونه‌های ClueGO و CluePedia شناسایی شدند. از میان ۶۲ ژن افتراقی شناسایی شده بین دو مقطع ۷۰ روزگی جنینی و بلوغ، در نهایت شبکه تعامل ژنی میان ۴۷ ژن رسم شد (شکل ۴). در ادامه سه خوشه‌ی ژنی معنی‌دار ( $P\text{-Value} < 0.05$ ) نیز شناسایی شد که هر خوشه به همراه مقدار P-Value آن روی هر شبکه مشخص شده است.



شکل ۴- خوشه‌های معنی‌دار شبکه تعاملی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی. در این شبکه، ژن‌های با گره‌های بزرگ و سبز تیره بالاترین بیان و گره‌های کوچکتر و قرمز کمترین بیان را دارند.

**Figure 4-** Significant clusters of the interaction network of identified DEGs between Adult and 70 days of embryonic age. In this network, genes with large and dark green nodes have the highest expression and smaller and red nodes have the lowest expression.

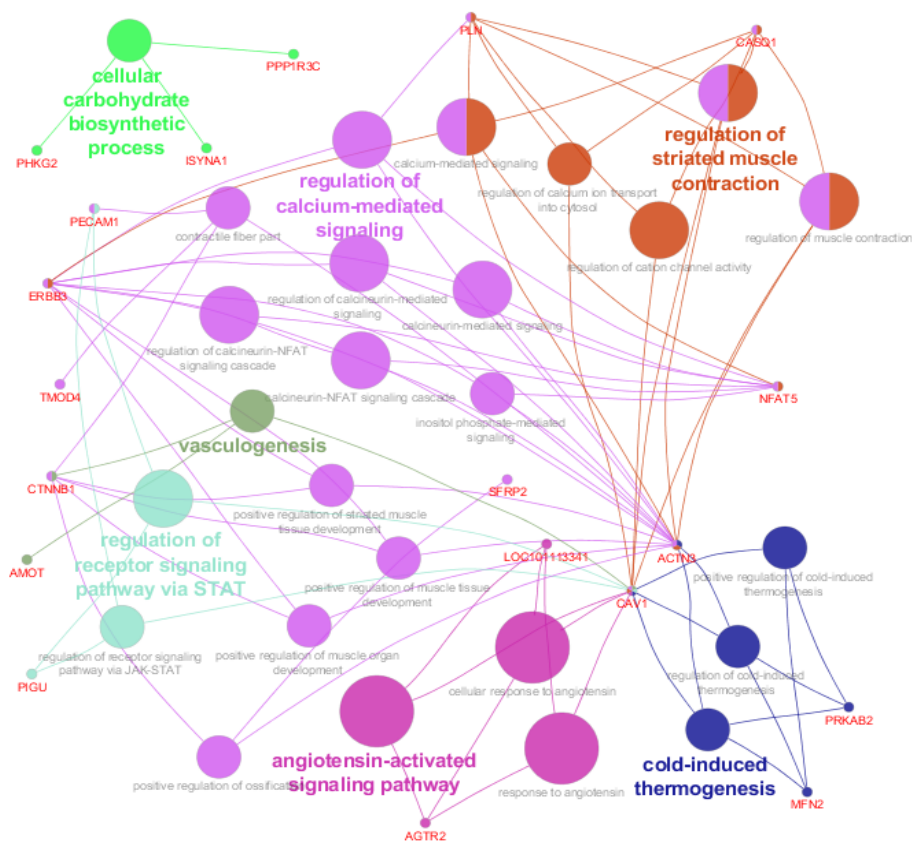
اولین خوشه معنی‌دار با  $P\text{-Value} = 0.004$  بر روی شبکه‌ی ژنی نشان داده شده است. این خوشه با ۵ گره شامل ژن‌های CASQ1، TMOD4، ACTN3، MYH1 و FBP2 است که همگی دارای بیان بالا (UP) بوده‌اند. ژن‌های این خوشه به نحوی در انقباض و هایپرتروفی عضلات نقش دارند و افزایش بیان این ژن‌ها در عضله در زمان بلوغ نسب به دوران جنینی امری طبیعی است. ژن MYH1 که بیشتر در فیبرهای عضله نوع تند (سریع) بیان می‌شود و در عضله‌ی مخطط وجود دارد، یک پروتئین انقباضی عمده است که از طریق هیدرولیز ATP انرژی شیمیایی را به انرژی مکانیکی تبدیل می‌کند. (Weiss)

1999). *et al.* کالسوکوئسترین که توسط ژن CASQ1 کدگذاری می‌شود یک پروتئین متصل به کلسیم است که به عنوان یک بافر کلسیم در شبکه سارکوپلاسمی عمل می‌کند. (Terentyev *et al.*, 2003). آلفا اکتینین پروتئینی است که توسط ژن ACTN3 رمزگذاری می‌شود و در صفحات Z و اجسام متراکم قرار دارد و به لنگر انداختن رشته های اکتین میوفیبریلار کمک می‌کند (Beggs *et al.*, 1992). میوزین-1 پروتئینی است که توسط ژن MYOZ1 کدگذاری می‌شود و به عنوان پروتئین های اتصال دهنده داخل سلولی در ارتباط با پروتئین های صفحات Z خدمت می‌کنند. همچنین این پروتئین ممکن است در میوفیبریلاژ نقش داشته باشد (Takada *et al.*, 2001). ژن TMOD4 پروتئین تروپومودولین 4 (عضله) را رمزگذاری می‌کند و انتهای نوک رشته های اکتین را می‌پوشاند و یک چارچوب ساختاری برای سفت و سخت نگه داشتن رشته های اکتین فراهم می‌کند. (Almenar-Queralt *et al.*, 1999). ژن FBP2 هم که پروتئین فروکتوز بیس فسفاتاز 2 را کدگذاری می‌کند، یک آنزیم تنظیم کننده گلوکونئوژنز است که هیدرولیز فروکتوز 1,6-بیس فسفات را به فروکتوز 6-فسفات و فسفات معدنی کاتالیز می‌کند (Rakus *et al.*, 2005).

دومین خوشه معنی دار با  $P\text{-Value} = 0.018$  بر روی شبکه ی ژنی مشخص شده است. این خوشه با 7 گره شامل ژن های SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB و UCP3 است که همگی دارای بیان بالا (UP) بوده اند. ژن SLC2A4 از این خوشه بعنوان ژن های افتراقی در مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله بین دو نژاد مریخی گوستی چین خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده است (Sun *et al.*, 2016). این ژن پروتئین ناقل گلوکز نوع 4 (GLUT-4) را که جزو خانواده ی حامل های تسهیل شده ی گلوکز هم شناخته می‌شود رمز گذاری می‌کند. GLUT4 یک حمل کننده گلوکز وابسته به انسولین است که در بافت چربی و عضلات مخطط (ماهیچه اسکلتی و ماهیچه قلب) وجود دارد. این پروتئین، انتشار حامل گلوکز را از خلال غشاء سلول پستانداران تسهیل می‌کند و اجازه انتشار آسان گلوکز در گردش را در شیب غلظت آن در سلول های ماهیچه و چربی می‌دهد (Huang and Czech, 2007). پروتئین های Mx، GTPase، های نشانگر القای اینترفرون هستند که در طیف وسیعی از سلول ها مانند ماکروفاژ و سلول های کبدی بیان شده و در تنظیم سامانه ایمنی در سلول نقش دارند. (Horisberger, 1992). ایزوفرم زیر واحد 4 سیتوکروم c اکسیداز میتوکندریایی، آنزیمی است که توسط ژن COX4I1 رمزگذاری می‌شود. سیتوکروم c اکسیداز (کمپلکس IV) یک مجموعه آنزیمی چند زیرواحدی است که انتقال الکترون از سیتوکروم c به اکسیژن مولکولی را جفت می‌کند و به شیب الکتروشیمیایی پروتون کمک می‌کند (Huttemann *et al.*, 2001). سوپراکسید دیسموتاز 2 میتوکندریایی (SOD2) که به عنوان سوپراکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (MnSOD) شناخته می‌شود، آنزیمی است که توسط ژن SOD2 کدگذاری می‌شود. این پروتئین به محصولات جانبی سوپراکسید فسفوریلایسون اکسیداتیو متصل شده و آنها را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن دیاتومیک تبدیل می‌کند. این عملکرد به SOD2 اجازه می‌دهد تا محافظت در برابر مرگ سلولی را به همراه داشته باشد (Zelko *et al.*, 2002). میتوفوزین 2- پروتئینی است که توسط ژن MFN2 کدگذاری می‌شود. میتوفوزین ها GTPase هایی هستند که در غشای خارجی میتوکندری جاسازی شده اند. در پستانداران MFN1 و MFN2 برای همجوشی میتوکندری ضروری است (Filadi *et al.*, 2018). پروتئین متصل به Ubiquinol-cytochrome c ردوکتاز که به عنوان UQCRB هم شناخته می‌شود جزئی از زنجیره تنفسی میتوکندری است و به عنوان مجموعه ای از ubiquinone و QP-C نقش مهمی در انتقال الکترون دارد (Jung *et al.*, 2011). پروتئین جفت نشده شماره 3 میتوکندریایی پروتئینی است که توسط ژن UCP3 کدگذاری می‌شود. خانواده پروتئین های جفت نشده نقش مهمی در هموستاز انرژی ایفا می‌کنند و بنابراین در بروز چاقی می‌تواند مؤثر باشد (Boss *et al.*, 1998).

سومین خوشه معنی دار با  $P\text{-Value} = 0.030$  بر روی شبکه‌ی ژنی مشخص شده‌است. این خوشه با ۳ گره شامل ژن‌های PRKAB2، PHKG2 و PPP1R3C است که ژن PPP1R3C و PRKAB2 دارای بیان بالا و ژن PHKG2 دارای بیان کم بودند. ژن PPP1R3C از این خوشه بعنوان ژن‌های افتراقی در مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله بین دو نژاد مریخی گوشتی چین‌خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده‌است (Sun et al., 2016). این ژن‌ها در تأمین و تنظیم انرژی سلول‌ها و احتمالاً فسفریله و غیرفعال کردن آنزیم‌های مسئول بیوسنتز اسیدهای چرب و کلاسترول دخیل هستند. زنجیره کاتالیتیکی فسفوریلاز b کیناز گاما آنزیمی است که توسط ژن PHKG2 رمزگذاری می‌شود. بیشترین فراوانی بیان این ژن در کبد و عضلات گزارش شده‌است. این ژن نقش مهمی در تأمین انرژی سلول‌ها دارد و گلوکزی که به شکل گلیکوژن در سلول‌های عضلانی و کبدی ذخیره می‌شود را در صورت نیاز به گلوکز به سرعت تجزیه می‌کند (Huang et al., 1994). ژن PPP1R3C آنزیم زیر واحد تنظیمی C<sub>3</sub> پروتئین فسفاتاز ۱ که به عنوان PTG هم شناخته می‌شود را رمزگذاری می‌کند. پروتئین فسفاتاز ۱- (PP1) در تنظیم طیف گسترده‌ای از عملکردهای سلولی توسط فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر پروتئین شرکت می‌کند. (Doherty et al., 1997). زیر واحد بتا-۲ پروتئین کیناز فعال 5'-AMP آنزیمی است که توسط ژن PRKAB2 رمزگذاری می‌شود. پروتئین رمزگذاری شده توسط این ژن، زیر واحد تنظیم‌کننده پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) است. AMPK یک آنزیم مهم انرژی‌سنج است که می‌تواند افزایش نسبت AMP/ATP و ADP/ATP در سلول‌های استرس‌دیده را کشف نموده و تعادل انرژی را تنظیم نماید و در واقع وضعیت انرژی سلولی را کنترل نماید. این زیر واحد ممکن است تنظیم‌کننده‌ای مثبت بر فعالیت AMPK باشد و چون در ماهیچه‌های اسکلتی بسیار بیان می‌شود، بنابراین ممکن است نقش‌های خاص بافتی داشته باشد (Cheung et al., 2000). کاهش دادن AMPK فعال، موجب افزایش mTORC1 فعال در ماهیچه اسکلتی و افزایش حجم ماهیچه می‌شود. این نشان می‌دهد AMPK ساخت پروتئین در ماهیچه اسکلتی را تنظیم می‌نماید.

در ادامه برای مرتبط کردن DEG‌های این مقطع سنی به دسته‌بندی‌های احتمالی خود، آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی ژنی در سه گروه فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی صورت گرفت. آنالیز غنی‌سازی برای DEG‌های میان مقطع سنی بلوغ و جنینی نشان داد ۲۵ فرآیند زیستی به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده‌اند ( $P\text{-adj Bonf} > 0.05$ ) که عمدتاً فرآیندهای زیستی مربوط به فرآیند استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام و بافت‌های عضلانی، مسیر و پاسخ‌های آنزیم‌تسین، تنظیم انقباض عضله مخطط، سیگنالینگ واسطه کلسینورین، مسیر علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و تنظیم آن، تنظیم مسیر علامت‌دهی گیرنده از طریق JAK-STAT، علامت‌دهی با واسطه کلسیم، فرآیند ساخت کربوهیدرات سلولی بودند. همچنین یک عملکرد مولکولی به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده‌است ( $P\text{-adj Bonf} > 0.05$ ) که مربوط به تنظیم فعالیت کانال کاتیونی است. یک اجزای سلولی نیز به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده‌است ( $P\text{-adj Bonf} > 0.05$ ) که مربوط به فیبر انقباضی است. نتایج هستی‌شناسی این ژن‌ها در این مقطع سنی در شکل‌های ۵ و جدول ۵ نشان داده شده‌اند.



شکل ۵- ارتباط بین هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی. نودهای کوچک ژن‌ها و نودهای بزرگ عبارات هستی‌شناسی هستند

**Figure 5-** Relationship between the ontology of identified DEGs between Adult and 70 days embryonic age. Small nodes are genes and large nodes are ontology terms.

جدول ۵- عبارات هستی‌شناسی شناسایی شده ژن‌های افتراقی بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی.

**Table 5-** The identified ontology terms of DEGs between Adult and 70 days of embryonic age.

GO-ID	GO-Term	Class	PValue	Bonferroni	Associated Genes
GO:0001570	Vasculogenesis	BP	7.8E-4	5.5E-3	[AMOT, CAV1, CTNNB1]
GO:0034637	cellular carbohydrate biosynthetic process	BP	2.1E-3	6.5E-3	[ISYNA1, PHKG2, PPP1R3C]
GO:0046425	regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, FIGU]
GO:1904892	regulation of receptor signaling pathway via STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, FIGU]
GO:0106106	cold-induced thermogenesis	BP	1.5E-3	7.9E-3	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0120161	regulation of cold-induced thermogenesis	BP	2.2E-5	4.5E-4	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0038166	angiotensin-activated signaling pathway	BP	2.8E-4	3.9E-3	[AGTR2, CAV1, LOC10113341]
GO:0045778	positive regulation of ossification	BP	5.4E-5	1.0E-3	[ACTN3, CTNNB1, SFRP2]
GO:1901863	positive regulation of muscle tissue development	BP	1.6E-3	6.6E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]

GO:0044449	contractile fiber part	CC	2.8E-3	2.8E-3	[ACTN3, CTNNB1, PECAM1, TMOD4]
GO:0006937	regulation of muscle contraction	BP	1.4E-3	8.6E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0048636	positive regulation of muscle organ development	BP	5.3E-4	5.8E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]
GO:0019722	calcium-mediated signaling	BP	5.3E-4	5.3E-3	[ACTN3, CASQ1, ERBB3, NFAT5, PLN]
GO:0048016	inositol phosphate-mediated signaling	BP	2.8E-4	3.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0006942	regulation of striated muscle contraction	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0045844	positive regulation of striated muscle tissue development	BP	1.0E-4	1.7E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]
GO:0033173	calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0106056	regulation of calcineurin-mediated signaling	BP	7.2E-5	1.2E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:2001257	regulation of cation channel activity	BP, MF	2.56E-4	3.8E-3	[CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0070884	regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	1.2E-4	2.0E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]

### نتیجه گیری کلی

پایگاه‌های داده مخزن بزرگی از داده‌های خام هستند که می‌توان با روش‌های جدید متاآنالیز، آنها را ادغام و نتایج را تفسیر کرد. از آنجایی که در بیشتر مطالعات *in silico* تعداد نمونه به کار رفته کم است، اما در روش‌های ادغامی داده‌ها مانند مطالعه‌ی حاضر، مطالعات مختلف تجمیع و تعداد نمونه‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه نتایج گسترده‌تری بدست می‌آید. این مطالعه با ادغام داده‌های دو روش متفاوت، داده‌های بیان برای مقاطع سنی مهم را کنار هم فراهم آورد تا دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکریپتوم‌ها در بافت عضله‌ی گوسفند نژاد تکسل در دو مقطع مهم سنی را نشان دهد. در مجموع در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش بیان و ۲۵ ژن کاهش بیان) در عضله به شکلی معنادار اختلاف داشت. با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی این دو مقطع در مجموع ۱۵ ژن منتخب MYH1، ACTN3، PRKAB2، UCP3، UQCRB، MFN2، SOD2، COX4I1، MX1، SLC2A4، FBP2، TMOD4، CASQ1، PPP1R3C، PHKG2 شناسایی شد. عملکرد این ژن‌ها به نحوی در تکثیر سلولی، سنتز پروتئین‌ها، تشکیل و سازماندهی میوفیبریل‌ها (در مقطع سنی جنینی) و متابولیسم‌های چربی زایی (در مقطع سنی بلوغ) ثابت شده است. آنالیز غنی‌سازی ژن‌های افتراقی شناسایی شده برخی از فرآیندهای زیستی مثل عروق‌زایی، تنظیم مثبت استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام عضلانی، تنظیم اقباض عضلات مخطط، بخش فیبر انقباضی، علامت‌دهی بواسطه کلسیم، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و JAK-STAT، عملکرد مولکولی تنظیم فعالیت کانال کاتیونی و در نهایت اجزای سلولی فیبر انقباضی را آشکار کرد. این یافته‌ها می‌تواند منبعی مفید برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد عضله در گوسفند باشد و سرنخ‌هایی را برای درک مکانیسم‌های ژنتیکی مولکولی در دیگر نژادهای گوسفند در اختیارمان قرار دهد. در نهایت با توجه به اینکه نتایج بدست آمده از روش ادغامی در این مطالعه در راستای مطالعات انفرادی هر یک از مجموعه داده‌ی ریزآرایه و RNA-Seq و همچنین بررسی منابع صورت گرفته است، می‌توان گفت روش ادغام داده‌ها می‌تواند بسیاری از مطالعات ناقص را تکمیل و نتایج مفیدی ارائه دهد.

## References

1. Almenar-Queralt, A., A. Lee, C. A. Conley, L. R. de Pouplana and V. M. Fowler. 1999. Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28466-28475. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28466.
2. Badday Betti, S., M. Tahmoorespur and A. Javadmanesh. 2022. Identification of lncRNAs expression and their regulatory networks associated with development and growth of skeletal muscle in sheep using RNA-Seq. *Agriculture and Natural Resources*, 56(2), 373-386. DOI: 10.34044/j.anres.2022.56.2.15
3. Bakhshalizadeh, S., S. Zerehdaran and A. Javadmanesh. 2021. Meta-analysis of genome-wide association studies for somatic cells score trait in dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 9(3), 39-58. DOI: 10.22069/ejrr.2021.19036.1787
4. Beggs, A. H., T. J. Byers, J. H. Knoll, F. M. Boyce, G. A. Bruns and L. M. Kunkel. 1992. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (13), 9281–8.
5. Betti, S., M. Tahmoorespur and A. Javadmanesh. 2022. Alternative Splicing Novel lncRNAs and Their Target Genes in Ovine Skeletal Muscles. *Journal of Cell and Molecular Research*, 13(2), 129-136. DOI: 10.22067/jcmr.2022.74635.1027
6. Boss, O., J. P. Giacobino, P. Muzzin . 1998. Genomic structure of uncoupling protein-3 (UCP3) and its assignment to chromosome 11q13. *Genomics*, 47 (3), 425–6. DOI: 10.1006/geno.1997.5135.
7. Cheung, P. C., I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie and D. Carling. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*, 346(3), 659-669. DOI.org/10.1042/bj3460659.
8. Doherty, M. J., P. R. Young and P. T. Cohen. 1997. Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS letters*, 399(3), 339-343. DOI: 10.1016/s0014-5793(96)01357-9.
9. Filadi, R., D. Pendin and P. Pizzo. 2018. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death & Disease*, 9 (3), 330. DOI: 10.1038/s41419-017-0023-6.
10. Horisberger, M. A. 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *Journal of virology*, 66(8), 4705-4709. DOI: 10.1128/JVI.66.8.4705-4709.1992 .
11. Huang, C. Y., C. J. Yuan, N. B. Livanova and D. J. Graves. 1994. Expression, purification, characterization, and deletion mutations of phosphorylase kinase gamma subunit: identification of an inhibitory domain in the gamma subunit. Reversible Protein Phosphorylation in Cell Regulation, 7–18. DOI: 10.1007/978-1-4615-2600-1\_1.
12. Huang, S. and M. P. Czech. 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5 (4), 237–52. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.

13. Hüttemann, M., B. Kadenbach and L. I. Grossman. 2001. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, 267 (1), 111–23. DOI: 10.1016/s0378-1119(01)00385-7 .
14. Jung, H. J., K. H. Kim, N. D. Kim, G. Han and H. J. Kwon. 2011. Identification of a novel small molecule targeting UQCRB of mitochondrial complex III and its anti-angiogenic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(3), 1052-1056. DOI.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.002.
15. Jung, J., C. Mok, W. Lee and W. Jang. 2017. Meta-analysis of microarray and RNA-Seq gene expression datasets for carcinogenic risk: An assessment of Bisphenol A. *Molecular & Cellular Toxicology*, 13(2), 239-249. DOI:10.1007/s13273-017-0026-5.
16. Kamali S, A. Javadmanesh, L, L, Stelinski, T. Kyndt, A. Seifi, M. Cheniany, M. Zaki-Aghl, M. Hosseini, M. Heydarpour, J. Asili and J. Karimi. 2022. Beneficial worm allies warn plants of parasite attack below-ground and reduce above-ground herbivore preference and performance. *Molecular Ecology*, 31(2), 691-712. DOI.org/10.1111/mec.16254.
17. Liu, N., J. N. He, W. M. Yu, K. D. Liu, M. Cheng, J. F. Liu, Y. H. He, J. S. Zhao and X. X. Qu. 2015. Transcriptome analysis of skeletal muscle at prenatal stages in Polled Dorset versus Small-tailed Han sheep. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1085-1095. DOI: 10.4238/2015.February.6.12.
18. Ma, T., F. Liang, S. Oesterreich and G. C. Tseng. 2017. A joint bayesian model for integrating microarray and RNA sequencing transcriptomic data. *Journal of Computational Biology*, 24(7), 647-662. DOI: 10.1089/cmb.2017.0056.
19. Mohammadi, F., M. Tahmoorespur and A. Javadmanesh. 2019. Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin- and fat-tailed breeds, *Animal Science Journal*, 32(123), 301-312. DOI: 10.22092/asj.2018.122913.1749 (In Persian)
20. Rakus, D., E. Maciaszczyk, D. Wawrzycka, S. Ułaszewski, K. Eschrich and A. Dzugaj. 2005. The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS letters*, 579(25), 5577-5581. DOI:10.1016/j.febslet.2005.09.021.
21. Rashidian, Z., N, Dehdilani, H, Dehghani and A. Javadmanesh. 2020. Isolation and culturing myogenic satellite cells from ovine skeletal muscle. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 12(2), 36-43. DOI: 10.22067/veterinary.v12i2.82979 (In Persian)
22. Sadkowski, T., M. Jank, J. Oprzadek and T. Motyl. 2006. Agedependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 57, 95-110.
23. Saedi, N., M. Aminafshara, M. Chamania, M. Honarvar and A. Javadmanesh. 2022. Expression pattern and network visualization of genes involved in milk persistency in bovine mammary tissue. *Agriculture and Natural Resources*, 56(1), 23-34. DOI:10.34044/j.anres.2021.56.1.03
24. Sahraei, S., M. R. Nassiri, A. Javadmanesh, R. Tohidi and E. Ebrahimie. 2019. Investigation of gene expression and gene networks related to apoptosis in sensitive and resistant Aryan broiler breeders with RNA-Seq. *Animal Production Research*, 8(1), 53-66.

25. Sun, L., M. Bai, L. Xiang, G. Zhang, W. Ma and H. Jiang. 2016. Comparative transcriptome profiling of longissimus muscle tissues from Qianhua Mutton Merino and Small Tail Han sheep. *Scientific Reports*, 6, 33586.
26. Takada, F., D. L. Vander Woude, H. Q. Tong, T. G. Thompson, S. C. Watkins, L. M. Kunkel and A. H. Beggs. 2001. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1595-1600. DOI: 10.1073/pnas.041609698.
27. Terentyev, D., S. Viatchenko-Karpinski, I. Györke, P. Volpe, S. C. Williams and S. Györke. 2003. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11759-11764. DOI: 10.1073/pnas.1932318100.
28. Weiss, A., S. Schiaffino and L. A. Leinwand. 1999. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology*, 290 (1), 61–75. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2865.
29. Yan, X., M. J. Zhu, M. V. Dodson and M. Du. 2013. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Genomics*, 1: 29–38. DOI: 10.7150/jgen.3930.
30. Zelko, I. N., T. J. Mariani R. J. Folz. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
31. Zerehdaran, S., F. Ghobakhloo, M. Jabbari Nooghabi and M. Shariati. 2020. Meta-Analysis of studies on genetic parameters of economic traits in Iranian Holstein dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 8(2), 1-22. DOI: 10.22069/ejrr.2020.16994.1703 (In Persian)
32. Zhang, Ch., G. Wang, J. Wang, Zh. Ji, Zh. Liu, Xi. Pi and C. Chen. 2013. Characterization and Comparative Analyses of Muscle Transcriptomes in Dorper and Small-Tailed Han Sheep Using RNA-Seq Technique. *PLOS ONE Journal*, 8 (8), 72686.