

## بررسی اثر ژن‌های مرتبط با میتوپروتئوم بر رشد ماهیچه سینه مرغ بومی اصفهان به وسیله داده RNA-seq

سید نادر آلبوشوکه<sup>۱</sup> - مجتبی طهمورث پور<sup>۲\*</sup> - محمدرضا بختیاری زاده<sup>۳</sup> - محمدرضا نصیری<sup>۲</sup> - سعید اسماعیل خانیان<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵

### چکیده

این آزمایش به منظور بررسی و شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی و مسیرهای متابولیکی مرتبط با میتوکندری بین توده مرغ بومی اصفهان و یک سویه جوجه تجاری راس ۷۰۸ با سرعت رشد‌های متفاوت، انجام شد. بدین منظور از روش توالی‌یابی RNA-seq با استفاده از چهار نمونه ماهیچه سینه ۲۸ روزگی استفاده شد. مقایسه آماری بیان ژن‌های توالی‌یابی شده در مرغ بومی و جوجه تجاری، ۶۰۶ ژن با تفاوت معنی‌دار را مشخص نمود و از این تعداد ۲۴۹ ژن در مرغ بومی و ۳۵۷ ژن در جوجه تجاری افزایش بیان داشتند. بر اساس نتایج بیان ژن‌ها در مرغ بومی، فاکتور رونویسی FoxO3 موجب فعال شدن مسیر آتروفی لیگازهای یوبیکویتینی E3 و افزایش شکست پروتئین و در نتیجه کاهش حجم ماهیچه اسکلتی در مقایسه با جوجه تجاری شده است. هیپوکسی و تنظیم فرآیند متابولیکی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی فعال در مرغ بومی بودند. بررسی و مقایسه ژن‌های مرتبط با پروتئوم میتوکندریایی نشان داد در این مرغ تغییرات معنی‌داری در بیان بسیاری از پروتئین‌های وابسته به رشد و تنظیم‌کننده رونویسی وجود دارد. این تغییرات نشان‌دهنده برنامه سازگاری پیچیده‌ای است که شکست پروتئین را تسهیل نموده و سوخت گلوکز در ماهیچه را کاهش می‌دهد. این مسیرهای متابولیسمی در جهت کاستن سطح نیازمندی‌های مرغ بومی به گونه‌ای تکامل یافته‌اند تا توان این مرغ را در غلبه بر شرایط و تنش‌های محیطی و تحمل کمبودهای غذایی تقویت نمایند.

واژه‌های کلیدی: ماهیچه سینه، مرغ بومی، میتوپروتئوم، RNA-Seq

### مقدمه

توده ماهیچه در نتیجه یک تعادل بسیار دقیق مابین فرآیندهای ساخت و شکست، کنترل و حفظ می‌گردد. تحلیل رفتن توده ماهیچه ای شامل آتروفی فیبرهای ماهیچه‌ای به دلیل فعال شدن مسیرهای سیگنالی شکست پروتئین می‌باشد. آتوفازی<sup>۲</sup> نیز در پاسخ به شرایط تنشی و جهت هموستاز بافتی و حفظ بقای سلول فعال می‌گردد (۲۵). در طی دوره وفور مواد غذایی، سیگنال‌دهی شبه انسولین در ماهیچه اسکلتی مسیرهای آنابولیکی را تحریک نموده تا ساخت پروتئین و هایپرتروفی ماهیچه‌ای بیشتر شود. چنانچه سطح گلوکز در گردش

پایین باشد، پروتئین ماهیچه اسکلتی شکسته و اسیدهای آمینه آزاد شده تا جهت گلوکونئوزنر و ساخت پروتئین‌های ضروری استفاده شوند. ماهیچه‌های اسکلتی قادرند در پاسخ به تغییر در قابلیت دسترسی مواد غذایی، به‌طور انتخابی سوبستراهایی را جهت تأمین انرژی مصرف نمایند. ماهیچه اسکلتی عمده مکان دریافت و اکسیداسیون گلوکز به‌واسطه تحریک انسولین است لیکن در طی روزه داری در ماهیچه اسکلتی اسیدهای چرب سوبسترای غالب جهت اکسیداسیون می‌شوند (۱۷). این انعطاف‌پذیری متابولیسم بدن که با وجود حجم بالای ماهیچه‌های اسکلتی و مصرف انرژی آنها، اولویت استفاده از کربوهیدرات‌ها را به مغز می‌دهد یک ویژگی مهم جهت حفظ بقا و هموستاز انرژی می‌باشد. متابولیسم ماهیچه‌های اسکلتی به شدت وابسته به عملکرد میتوکندری می‌باشد. میتوکندری در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله متابولیسم انرژی، مرگ برنامه ریزی شده سلولی<sup>۳</sup>، سیگنال‌دهی، مسیرهای متابولیسمی مرتبط به چربی‌ها، اسیدهای آمینه و آهن یک عامل حیاتی به‌شمار می‌آید. حدود ۸۰ درصد از ۶۱۵ پروتئین یافت شده در میتوکندری قلب انسان

۱- گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران  
۲- استاد، گروه آموزشی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
۳- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران  
۴- دانشیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران  
(\*) نویسنده مسئول  
(Email: tahmoors@um.ac.ir)

در فسفریلاسیون اکسیداتیو، RNA، DNA و ساخت پروتئین، انتقال یون و متابولیسم دخالت دارند (۴۰). با توجه به اینکه میتوکندری با استفاده از فسفریلاسیون اکسیداتیو حدود ۹۰ درصد انرژی سلولی را تولید می‌کند (۱) می‌توان فرض نمود بی‌کفایتی توام با میتوکندری ناکارآمد، اثر شگرفی بر عملکرد رشد و بیان فنوتیپی راندمان غذایی در حیوانات داشته باشد. تنوع در رشد جوجه‌های گوشتی و راندمان غذایی را می‌توان تا حدودی ناشی از تفاوت در عمل میتوکندری و بیوشیمی آن دانست. مقایسات ژنومی روشی مناسب در مطالعه چگونگی سازگاری گونه‌های جانوری به شرایط محیطی می‌باشد. در میان حیوانات مختلف، مرغ خانگی از بهترین مدل‌های حیوانی جهت بررسی فرآیندهای تکاملی-به‌گزینی ژنتیکی به‌شمار می‌آید (۱۲). مرغ بومی از نظر سازگاری به شرایط اقلیمی، تنش‌های غذایی و مدیریتی و نیز مقاومت به بیماری معروف شده است (۳۱). در حالی که جوجه های گوشتی تجارتي در مقایسه با مرغ بومی دارای ضریب تبدیل غذای بهتر و سرعت رشد بالاتر می‌باشند. با توجه به این موضوعات و جهت بررسی تفاوت بیان ژنی مرتبط با میتوکندری در دو گروه جوجه تجاری راس و جوجه بومی اصفهان این آزمایش انجام شد تا علت تفاوت‌های میزان رشد ماهیچه اسکلتی و راندمان غذایی این دو از نظر عملکرد ژنوم بررسی 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 توده مرغ بومی اصفهان استفاده شد. جوجه‌ها به سالن‌های مرغداری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول انتقال داده شده و تا پایان آزمایش با شرایط یکسان، نگهداری و مدیریت شدند. تمامی جوجه‌ها از یک جیره غذایی متعادل بر مبنای ذرت و سویا با ۳۰۰۰ کیلوکالری انرژی در کیلوگرم وزن خشک و ۲۰ درصد پروتئین خام تغذیه شدند. دسترسی به آب آشامیدنی و خوراک آزاد بود. در پایان ۲۸ روزگی از هر گروه ۶ قطعه جوجه خروس به‌طور تصادفی انتخاب، توزین و کشتار شد. در هر جوجه از یک مکان مشابه در ماهیچه سمت چپ سینه (Pectoralis major muscle) یک نمونه تقریباً دوگرمی گرفته شده و در کریوتیوب‌های استریل و فاقد RNase و DNase قرار داده شد. نمونه‌های گرفته شده بلافاصله به تانک ازت مایع منتقل و سپس در آزمایشگاه تا زمان استخراج RNA در فریزر دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**جدا و خالص سازی RNA:** با استفاده از تریزول (Invitrogen, USA) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از نمونه‌ها RNA استخراج گردید. خلوص RNA با استفاده از نانودراپ

شرکت BGI چین توالی‌یابی شد. جذب 260 به 280 نانومتر در نمونه‌های 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 به‌ازای هر یک از دو گروه آزمایشی، ۲ تکرار از نمونه‌های ادغام شده (Pooled) به‌دست 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) سنجش کیفیت توالی خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC نسخه 0.11.2 تحت سیستم عامل لینوکس انجام شد. برای حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و یا خوانش‌های خام حاوی توالی‌های مربوط به آداپتور و پرایمر و Poly-N از نرم‌افزار Trimmomatic (۲۶) استفاده شد. خوانش‌های پیرایش شده جهت تأیید کیفیت، مجدداً با نرم‌افزار Fastqc بررسی شدند. آنالیز بیان ژن: از تارنمای 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. خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار HISAT2 (نسخه 2.0.4) (۱۸) به ژنوم مرجع هم‌ردیف شده، با استفاده از نرم‌افزار Cufflinks (نسخه 2.2.1) (۴۱) و با استفاده از فایل رفرنس‌دهی ژنوم (حاوی ۱۷۹۵۴ ژن در بانک اطلاعاتی Ensembl) به رونوشت‌های بیان شده اسمبل شده تا بدین ترتیب رونوشت‌های شناخته شده و جدید تشخیص داده شوند. سپس با استفاده از ابزار Cuffdiff تفاوت معنی‌دار بیان ژن‌ها (Differential Expressed Genes) بررسی گردید. بدین منظور نرخ تشخیص خطای ۵ درصد (FDR < 0.05) به‌عنوان 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.

**آنالیز میتو پروتئوم:** جهت تخمین محتوای میتوکندریایی مابین دو گروه آزمایشی، میتو پروتئوم انسانی از وب سایت میتومینر (Mitominer) به آدرس <http://mitominer.mrc- mbu.cam.ac.uk/release-3.1/begin.do> دریافت شد. فهرست موجود دارای ۱۱۵۲ پروتئین میتوکندریایی کدشونده توسط DNA هسته و میتوکندریایی بود. نام پروتئین‌ها تبدیل به نام ژن‌های مربوطه شده و با فهرست ژن‌های توالی‌یابی شده مقایسه گردید.

**بررسی عملکرد ژن‌های با بیان متفاوت:** آنالیز عملکردی برای ژن‌های با بیان متفاوت و آنالیز مسیرهای بیولوژیکی ژن‌ها (KEGG) به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای برخط geneontology و DAVID نسخه 6.8 (۵) انجام شد. قبل از ثبت اسامی ژن‌ها در

توسط DNA هسته و میتوکندری منجر به شناسایی ۹۳۱ ژن مشابه در این دو گردید. از این تعداد ۳۵۱ ژن در مرغ تجاری و ۵۳۰ ژن در مرغ بومی بیان بالاتری داشتند. پلات MA چگونگی توزیع این ژن‌ها بین دو گروه مرغ بومی و جوجه تجاری را نشان می‌دهد (شکل ۱).

این توزیع و پراکندگی ژن‌ها از نظر آزمون آماری (بر اساس توزیع دو جمله‌ای) بسیار معنی‌دار بود ( $P \text{ value} < 5.918e-14$ ). نتیجه این آزمون نشان می‌دهد توزیع پراکندگی به نفع مرغ بومی انحراف پیدا کرده است و این بدان معنی است که مرغ بومی محتوای میتوکندریایی بیشتری نسبت به مرغ تجاری دارد. این نتیجه در توافق با نتایج مطالعات مشابهی بود که نشان می‌دهد در جوجه‌های گوستی مدرن در مقایسه با جوجه‌های بومی تعداد ژن کدکننده پروتئین‌های میتوکندریایی کمتر است (۴ و ۲۱). به‌رحال بر اساس FDR با سطح معنی‌دار ۵ درصد، فقط بیان ۳۱ ژن (۱۸ ژن در مرغ بومی و ۱۳ ژن در مرغ تجاری) از کل ۹۳۱ ژن، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۲). نام و برخی خصوصیات مربوط به این ژن‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج بررسی عملکردی ژن‌های مرتبط با عمل میتوکندریایی در فرایند بیولوژیکی نشان داد فرآیندهای مولکول‌های کوچک، اگزواسید، اسیدهای آلی، اسید کربوکسیلیک و اسید مونوکربوکسیلیک، انتقال میتوکندریایی، واکنش به ترکیبات اکسیژن‌دار و تنظیم فرآیند متابولیسمی گونه‌های اکسیژن فعال<sup>۴</sup> (ROS) از مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی معنادار در مرغ بومی بودند (شکل ۳). در جوجه تجاری، ۱۳ ژن مرتبط میتوکندریایی، در هیچ فرآیند بیولوژیکی معنی‌داری شرکت نداشتند.

### بررسی وضعیت ژن‌های موثر بر متابولیسم پروتئین

فعال شدن مسیرهای کاتابولیسم پروتئین‌های ماهیچه‌ای نیازمند افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آتروفی (آتروژن‌ها) است. بیان آتروژن‌ها توسط فاکتورهای نسخه‌برداری ویزه‌های نظیر FoxO3<sup>۵</sup> کنترل می‌گردد (۲۸). این ژن دو سیستم عمده شکست پروتئینی، یعنی مسیر یوبیکوتین-پروتئوزوم و مسیر اتوفاژی/لیزوزوم را در ماهیچه اسکلتی کنترل می‌نماید (۳۴). ژن پروتئین کیناز B (AKT) یک کیناز پروتئینی سرین/ترئونینی است و نقش کلیدی در مسیرهای سیگنالی انسولین و PI3K/Akt/mTOR<sup>۶</sup> ایفا می‌کند.

این پایگاه داده‌ها، اسامی رسمی<sup>۱</sup> و اسامی مختص پایگاه Ensembl ژن‌ها از پایگاه داده Ensembl دریافت شد. اسامی ژن‌های مشترک بین فهرست میتوزنوم انسانی با فهرست ژن‌های با بیان متفاوت به پایگاه داده DAVID ارائه شد. از بین این ژن‌ها تعداد ۳۱ ژن در پایگاه‌های مذکور شناخته شد و برای آن‌ها آنالیز عملکردی انجام گردید. نتایج آنتولوژی برای فرآیند بیولوژیکی<sup>۲</sup> با سطح معنی‌دار ۰/۰۵ تصحیح شده برای خطای چندتستی با روش FDR ( $q \leq 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت.

**نمودارهای آماری:** با استفاده از نرم‌افزار آماری R و پکیج ggplot2 (۱۱) پلات‌های MA و Volcano برای ژن‌های مشترک بین میتوپروتئوم و فهرست ژن‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه ترسیم گردید. انحراف از توزیع فرض برابری ۵۰:۵۰ توسط آماره بینومیلی تعیین شد. با چنین روشی می‌توان میزان گرایش ژن‌های میتوپروتئوم به سمت یکی از هر یک از دو گروه را تعیین نمود.

### نتایج و بحث

خلاصه مقادیر مربوط به خصوصیات اوزان بدن، افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک تا ۲۸ روزگی جوجه‌های هر دو گروه در جدول ۱ آورده شده است. در روز نخست پس از تفریح، وزن جوجه‌های تجاری سنگین‌تر از بومی بود. این روند تا پایان آزمایش یعنی ۲۸ روزگی همچنان ادامه داشت. برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار در میانگین‌های صفات تولیدی در دو گروه از آزمون آماری مقایسه میانگین دو جامعه مستقل (t استیودنت) استفاده شد. نتایج آزمون مطابق انتظار نشان داد جوجه تجاری وزن سنگین‌تر، سرعت رشد بالاتر و ضریب تبدیل خوراک پایین‌تری نسبت به جوجه بومی دارد.

با استفاده از نمونه‌ی بافت سینه مربوط به شش جوجه خروس از هر یک از دو گروه بومی و راس، چهار نمونه تشکیل (هر نمونه حاوی RNA سه جوجه خروس به صورت ادغام شده) به صورت خوانش‌های جفتی (2 x 150 bp) توالی‌یابی شد. به‌ازای هر نمونه حدود ۳۰-۲۵ میلیون خوانش خام به‌دست آمد و با ژنوم مرجع مرغ اهلی (galgal4) هم‌ردیف شد. پس از انجام آنالیز آماری ۶۰۶ ژن ( $\text{Log}_2\text{FC} > 0.8$  و  $P\text{-adjusted} \leq 0.05$ ) به‌عنوان ژن‌های با تفاوت معنی‌دار<sup>۳</sup> DEGs شناسایی شد. از این تعداد ۲۴۹ ژن در مرغ بومی و ۳۵۷ ژن در جوجه تجاری بیان بالاتر داشتند.

### شناسایی ژن‌های مرتبط با میتوکندری: مقایسه فهرست

ژن‌های توالی‌یابی شده با ۱۱۵۲ پروتئین میتوکندریایی کدشونده

4- Reactive Oxygen Species

5- Forkhead box

6- Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt (a serine/threonine kinase also known as protein kinase B [PKB]), and mammalian target of rapamycin (mTOR)

1- Official\_gene\_symbol

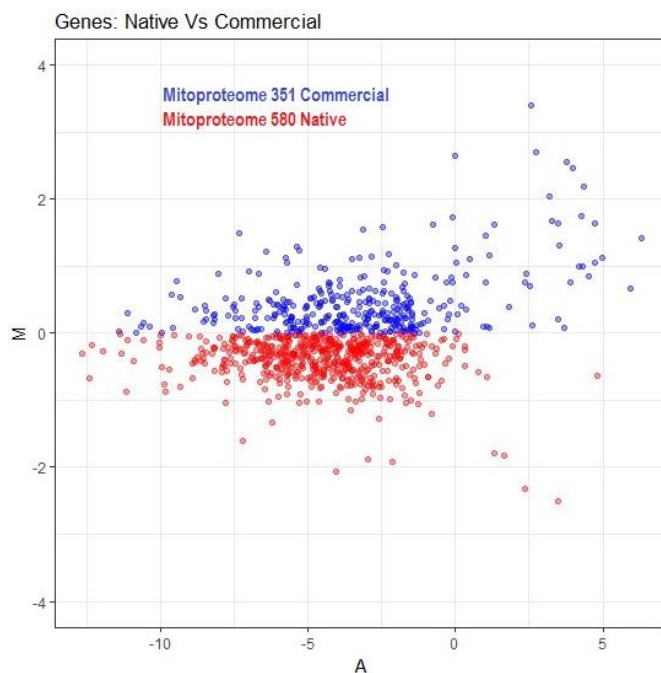
2- Biological Process

3- Differential Expression Genes

جدول ۱- داده‌های عملکردی رشد در جوجه تجاری و توده مرغ بومی

Table 1- Growth performance data in commercial and native chickens

صفت Trait	جوجه بومی Native	جوجه تجاری Commercial	P-Value
وزن روز نخست Body weight at first day	32.02 ± 0.23	40.49 ± 0.72	< 0.001
وزن روز ۱۴ Body weight at day 14	177.14 ± 1.33	382.29 ± 17.52	< 0.001
وزن روز ۲۸ Body weight at day 28	340 ± 2.42	1234.29 ± 18.31	< 0.001
افزایش وزن ۱۴-۲۸ Weight gain at 14-28	162.86 ± 2.23	852 ± 11.79	< 0.001
ضریب تبدیل خوراک Feed Conversion Ratio	3.47 ± 0.192	1.76 ± 0.146	< 0.001



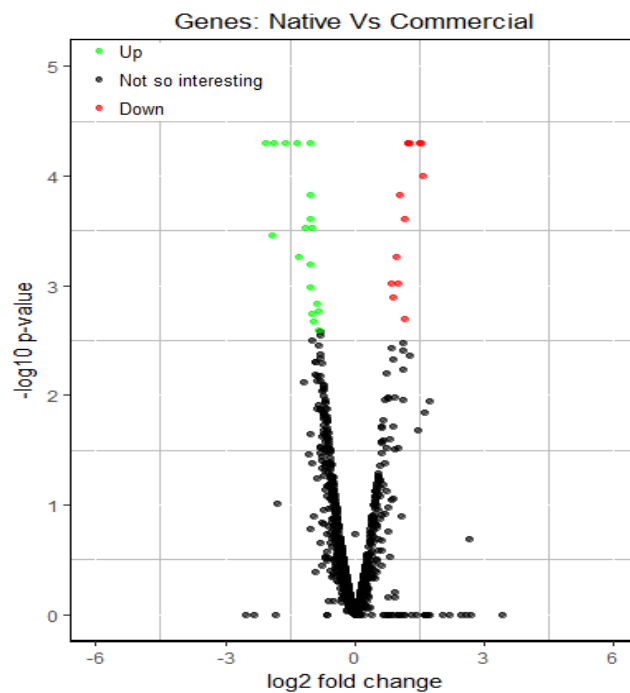
شکل ۱- پلات MA و تعداد ژن میتوپروتئوم با بیان بالا. محورهای Y و X به ترتیب بیانگر نسبت لگاریتمی تفاوت بیان به میانگین بیان برای هر ژن در دو گروه بومی و تجاری می‌باشند. ژن‌های میتوپروتئوم که بیان بالاتری در گروه بومی داشتند به رنگ قرمز و در گروه تجاری به رنگ آبی نمایش داده شده‌اند.

**Figure 1-** MA plots and number of mitoproteome genes with higher expression. Y and x axis represent the log ratio of differential expression and the average expression, respectively, for each gene in native and commercial breeds. Mitoproteome genes, which have a higher expression in the native breed, are red in color and blue for commercial breed.

بیان PIK3IP1 منجر به فعال شدن PI3K/AKT و در نتیجه افزایش سنتز پروتئین و اندازه سلول ماهیچه‌ای می‌شود (۳۹). همچنین افزایش بیان IGFBP3 نیز با مهار نمودن IGF-1 موجب کاهش فعالیت مسیر سیگنالی IGF1/PI3K/Akt و در نتیجه پیشرفت آتروفی می‌شود (۱۴).

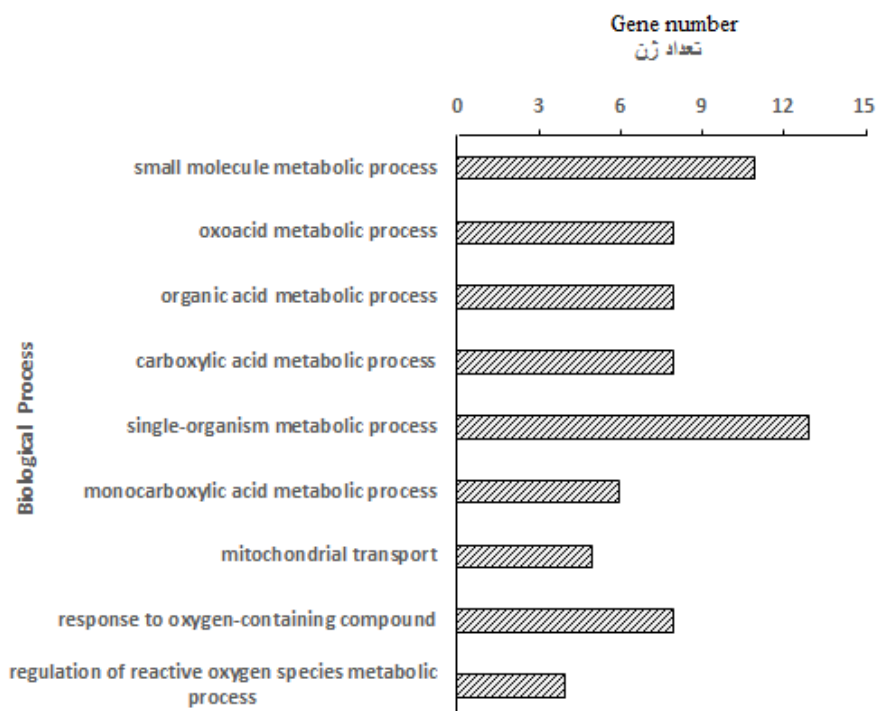
در حضور انسولین و فاکتورهای رشد (IGF)، AKT موجب فعال شدن mTOR شده و با غیرفعال سازی FoxO3 همزمان بیان ژن‌های پیشرفت‌دهنده آتوفاژی در ماهیچه را کاهش می‌دهد (۴۸). ژن<sup>۱</sup> PIK3IP1 پروتئینی را کدهی می‌نماید که می‌تواند تنظیم‌کننده منفی مسیر PI3K و میانجی مثبت فعال شدن FoxO3 باشد (۳۶). کمبود

1- Phosphoinositide-3-Kinase Interacting Protein 1



شکل ۲- نمودار ولکانو و پراکنندگی ژن‌های مرتبط با میتوکندری در دو گروه. ژن‌های نمایش‌یافته با رنگ سبز در مرغ بومی و ژن‌های با رنگ قرمز در جوجه راس بر اساس نرخ خطای تشخیص معنی‌دار اعلام شده‌اند ( $FDR \leq 0.05$ ). ژن‌های به رنگ مشکی در هر دو گروه بیان یکسانی داشته‌اند.

**Figure 2-** Volcano plot and dispersion of mitoproteome genes in two groups. Green genes in native chickens and red genes in Ross chickens are DEGs ( $FDR < 0.05$ ). The genes in black have no differential expression.



شکل ۳- فرآیندهای بیولوژیکی ژن‌های با بیان متفاوت در مرغ بومی. ستون‌ها به ترتیب سطح معنی‌دار مرتب شده‌اند به طوری که کمترین مقدار، در بالاترین جایگاه قرار دارد.

**Figure 3-** Biological process of DEGs in Native chickens. The columns are arranged in a significant level, respectively, so that the lowest value is at the highest position

جدول ۲- مهمترین ژن‌های با افزایش بیان معنی‌دار مرتبط با میتوکندری در مرغ بومی و جوجه راس

Table 2- The most important Differential expression mitoproteom genes in Native and Ross chickens

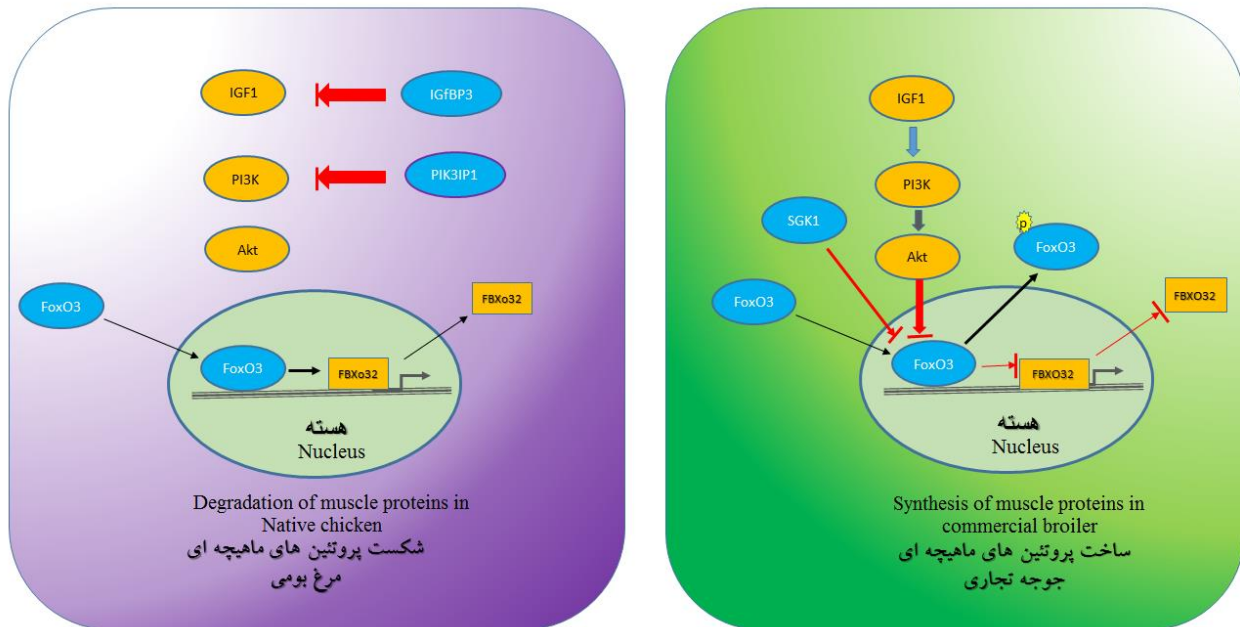
علامت ژن Gene symbol	نام کامل ژن Full name of gene	Log2FC	FDR
ژن‌های با افزایش بیان در مرغ بومی Mitoproteom Genes upregulated in Native chicks			
TAF3	TATA-box binding protein associated factor 3	-0.82329	0.049246
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	-0.84264	0.036874
MCCC2	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 beta	-0.88493	0.033184
PK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3	-0.93856	0.043623
PNPLA8	patatin like phospholipase domain containing 8	-0.97732	0.010601
TFB2M	transcription factor B2, mitochondrial	-0.98299	0.038682
CMC2	C-x9-C motif containing 2	-1.01105	0.02614
MPC1	mitochondrial pyruvate carrier 1	-1.01477	0.002453
GLUL	glutamate-ammonia ligase	-1.01969	0.009169
CRYAB	crystallin, alpha B	-1.04299	0.006119
ADCK3	aarF domain containing kinase 3	-1.04646	0.018387
PIIF	peptidylprolyl isomerase F	-1.14617	0.010601
SLC25A33	solute carrier family 25 pyrimidine nucleotide carrier, member 33	-1.28314	0.016523
GCAT	glycine C-acetyltransferase	-1.32246	0.002453
UCP3	uncoupling protein 3 mitochondrial, proton carrier	-1.60935	0.002453
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-1.87763	0.002453
UQCRCQ	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa	-1.90952	0.012039
PK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	-2.0654	0.002453
ژن‌های با افزایش بیان در سوبه تجاری Mitoproteom Genes upregulated in Commercial chicks			
PYCR2	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	1.57699	0.004404
FAM213A	family with sequence similarity 213 member A	1.55352	0.002453
ANXA2	annexin A2	1.49268	0.002453
FN1	fibronectin 1	1.28796	0.002453
ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	1.23011	0.002453
ANXA1	annexin A1	1.21498	0.002453
FAM69C	family with sequence similarity 69 member C	1.17417	0.009169
GM2A	GM2 ganglioside activator	1.1428	0.041521
GATM	glycine amidinotransferase	1.05586	0.006119
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 rho family, small GTP binding protein Rac2	0.988807	0.024328
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	0.957613	0.016523
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 glucose-regulated protein, 78kDa	0.897724	0.030595
FKBP10	FK506 binding protein 10, 65 kDa	0.846919	0.024328

بومی داشت. بنابراین در این دو مرغ دو ژن PIK3IP1 و SGK1 با دو اثر متضاد و تعیین کننده، سبب تاثیر بر میزان بیان و فعالیت ژن FoxO3 شده‌اند.

#### آتروفی از طریق مسیر یوبیکوتین پروتئوزوم E3

برای شروع آتروفی در ماهیچه اسکلتی، وجود FoxO3 شرط لازم و کافی به‌شمار می‌آید (شکل ۵). FoxO3 با افزایش رونویسی مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده لیگازهای E3 همانند FBXO32 موجب آتروفی ماهیچه اسکلتی می‌شود (۳۵). مطالعات متعدد نشان داده‌اند در ماهیچه در حال آتروفی mRNA چنین پروتئوزوم‌هایی افزایش بیان می‌یابند (۱۶). لیگازهای E3 با شکست پروتئین‌ها و به خصوص اجزا فیبرهای ماهیچه‌ای موجب تحلیل رفتن ماهیچه می‌شوند (۲۳).

در مرغ بومی افزایش بیان دو ژن PIK3IP1 و IGF1 نشان می‌دهد این دو پروتئین با کاهش سطوح IGF-1 و PI3K، موجب غیرفعال شدن مسیر IGF1-PI3K-AKT شده و بنابراین این دو ژن عمده عوامل فعال ساز FoxO3 بوده‌اند (شکل ۴). این موضوع از یک طرف موجب کاهش ساخت پروتئین‌های ماهیچه‌ای از طریق غیر فعال شدن سیستم mTOR و از طرف دیگر موجب افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای از طریق فعال سازی مسیر آتروفی لیگازهای وابسته به FoxO3 شد. ژن SGK1 یک کیناز وابسته به PI3K بوده و از نظر ساختمانی بسیار شبیه و همولوگ با Akt است (۲۰). SGK1 توسط ژن‌های IGF1 و PDK1 و PI3K (mTORC2) فعال شده و با فسفریلاسیون FoxO3، آتروفی ماهیچه‌ای را ممانعت می‌نماید (شکل ۴). این ژن در جوجه تجاری بیان بالاتری نسبت به مرغ



**شکل ۴-** ساخت و شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای. در غیاب انسولین یا فاکتورهای رشد، FoxO3 به هسته سلول رفته و موجب افزایش رونویسی آتروژن‌ها و ژن‌های مربوط به آتوفاژی شده و این منجر به افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای می‌شود. Akt با فسفریلاسیون FoxO3 موجب جابه‌جایی آن از هسته به سیتوپلاسم و ممانعت از توان رونویسی آن می‌شود.

**Figure 4-** Synthesis and degradation of muscle proteins. In the absence of insulin or growth factors, FoxO3 localized in the nucleus, where it promotes transcription of the atrogenes and autophagy-associated genes that induced catabolism of skeletal muscle proteins. AKT with phosphorylation of FoxO3, inducing its translocation from the nucleus to the cytoplasm and prevents its transcriptional capability.

mTOR در نهایت موجب کاهش اندازه فیبرهای ماهیچه‌ای می‌شود (۳۷). در واقع بیان این ژن توام با FOXO، نوعی اثر افزایش بر افزایش بیان لیگازهای یوبیکوئیتین E3 دارد (شکل ۵). بالا بودن بیان این ژن در مرغ بومی نشان می‌دهد که این ژن در آتروفی ناشی از فعال‌سازی لیگازها دخالت نموده است. همچنین بالا بودن سطح بیان ژن FKPB5<sup>۳</sup> به‌عنوان نگهبان (Chaperon) آن در سیتوزول در مرغ بومی نشان می‌دهد بیان بالای ژن KLF15 می‌تواند به‌صورت محافظت شده در سیتوزول باقی بماند. ژن CUL3<sup>۴</sup> پروتئینی به نام Cullin-3 را کدهی می‌کند که در قسمت مرکزی سیستم پروتئوزوم یوبیکوئیتین E3 قرار می‌گیرد. لانگ و همکاران نشان دادند Cullin-3 در ناحیه Z دیسک سارکومر میوفیبریل‌های ماهیچه اسکلتی قرار دارد و در شکست پروتئین‌های ماهیچه شرکت می‌نماید (۲۲). ژن Sen1<sup>۵</sup> مرتبط با آتروفی نیز بیان بالاتری در مرغ بومی نسبت به مرغ تجاری داشت.

افزایش بیان ۲۸ روزگی دو ژن FBXO32<sup>۱</sup> و FBXO30<sup>۱</sup> در مرغ بومی نشان می‌دهد دخالت ژن‌های F-box در آتروفی ماهیچه اسکلتی از سنین پایین عمر این جوجه شروع شده است. وانگ و همکاران گزارش نمود در آتروفی ناشی از FBXO32 افزایش بیان ژن RUNX1 می‌تواند از آتوفاژی ماهیچه اسکلتی جلوگیری نماید (۴۶). مطابق با این مطالعه، در این آزمایش نیز بیان ژن RUNX1 در مرغ بومی تقریباً یک سوم مقدار آن در جوجه تجاری مشاهده شد.

#### بیان برخی ژن‌های تقویت‌کننده اثر لیگازهای یوبیکوئیتینی

ژن KLF15<sup>۲</sup> نقش تنظیمی منفی بر توده ماهیچه داشته و سرکوب آن موجب هایپرتروفی ماهیچه می‌گردد (۸). شیمیزو و همکاران ثابت نمودند این ژن سبب افزایش بیان ژن‌های لیگازهای یوبیکوئیتین E3 می‌شود (۳۷). همچنین بیان این ژن از طریق فعال نمودن آنزیم‌های موثر در شکست اسیدهای آمینه منشعب و سرکوب

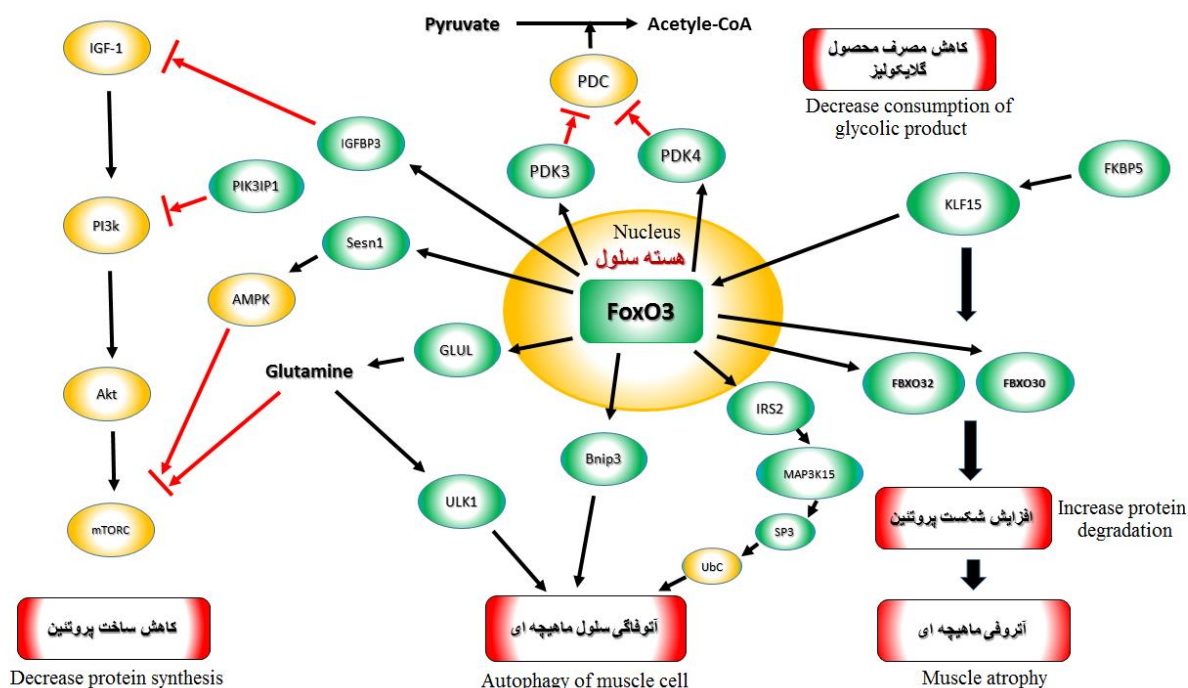
3- FK506 Binding Protein 5

4- Cullin 3

5- Sestrin 1 (Sesn1)

1- F-Box Protein 30

2- Kruppel Like Factor 15



شکل ۵- نقش FoxO3 در هموستاز ماهیچه اسکلتی. FOXO3 با افزایش رونویسی پاپروویت دهیدروژناز کیناز ۴ (PDK4) موجب ممانعت‌کنندگی از کمپلکس پاپروویت دهیدروژناز شده و بدین ترتیب اکسیداسیون هوازی گلیکولیز را تنظیم منفی می‌نماید. ژن‌های رنگ سبز در مرغ بومی بیان بالا داشتند.

**Figure 5-** The role of FoxO3 in skeletal muscle homeostasis. By increasing the expression of pdk4 transcript, FOXO3 inhibits PDC and thus disrupts oxidative glycolysis. DEGs expressed in native chicken are shown in green.

### آتروفی از طریق آپوپتوز و اتوفاجی

فنگ و همکاران نشان دادند بین ژن‌های FoxO3، IGF1، IGFBP3، BNIP3 و HIF-1 $\alpha$  با بروز اتوفاجی رابطه‌ی مثبت وجود دارد (۷). Bnip3 در غشای خارجی میتوکندری مستقر شده و با تشکیل کمپلکس‌های هومو-دایمری سبب افزایش نفوذپذیری غشا، تورم میتوکندری، آزادسازی سیتوکروم c و در نهایت آپوپتوز آن شده (۳۳) و IGFBP3 نیز با مهار نمودن IGF-1 موجب سرکوب شدن مسیر سیگنالی IGF1/PI3K/Akt و در نتیجه پیشرفت مرگ سلولی، نقص در میوزن و افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای می‌شود (۱۴). با این حال علی‌رغم افزایش بیان هر دو این ژن‌ها در مرغ بومی، بیان HIF-1 $\alpha$  تفاوت معنی‌داری بین دو گروه آزمایشی نداشت. فنگ و همکاران نشان دادند بیان فاکتور رونویسی HIF-1 $\alpha$  به تدریج و در ۲۴ ساعت شروع هیپوکسی، افزایش یافته ولی پس از آن فروکش می‌نماید (۷). آنها علت این کاهش را در سازگاری به شرایط هیپوکسی شدید و تبدیل شدن HIF-1 $\alpha$  به سایر فاکتورهای رونویسی بیان شونده به‌وسیله هیپوکسی دانستند. همچنین نشان دادند منکوب نمودن ژن HIF-1 $\alpha$  یا FoxO3 موجب برگشت تغییرات ایجاد شده در هیپوکسی می‌گردد (۷). در تأیید این موضوع، افزایش بیان ژن‌های

این ژن در تنش‌های محیطی و متابولیکی نظیر تنش اکسیداتیو، هیپوکسی، تخلیه انرژی، کمبود اسیدهای آمینه و یا در حضور فاکتورهای رونویسی نظیر FOXO افزایش بیان می‌یابد (۲۴). برجسته‌ترین اثر سسترینها ممانعت از رشد سلولی از طریق فعال سازی AMPK و منکوب کردن محور mTORC1 و در نتیجه کاهش رشد ماهیچه از طریق جلوگیری از مسیر ساخت پروتئین می‌باشد (شکل ۵). گزارش دیگری نشان می‌دهد FoxO3 باعث افزایش IRS2 در ماهیچه اسکلتی شده و این موجب افزایش سیگنال MEK/ERK، فعال‌سازی و فسفریلاسیون SP1<sup>۱</sup> و افزایش بیان یوبیکوتین C شده و این موضوع در نهایت به انجام اتروفی کمک می‌نماید (۴۹). در مرغ بومی بیان ژن‌های IRS2، SP3 و MAP3K15 در مقایسه با مرغ تجاری افزایش معنی‌داری داشت. همچنین بیان SP3 از خانواده SP1 بوده و همان نقش را ایفا می‌کند (۴۵). SP3 بیان MAP3K15 که جز خانواده MAP3K است می‌تواند نشانه فعال شدن سیگنال MEK/ERK باشد. بنابراین در مرغ بومی، ژن FoxO3 سبب افزایش بیان IRS2 و فعال‌سازی سیگنال MEK/ERK جهت انجام اتروفی شده است.

1- Specificity Protein 1



متابولیسم تک کربنی شود (۳۸). هر سه آنزیم در مرغ بومی بیان بالاتری نسبت به جوجه تجاری داشتند. این موضوع نشان‌دهنده حجم بالای اسید آمینه آزاد و شکسته شده در ماهیچه مرغ بومی است و اینکه بدن به‌جای استفاده از گلوکز با منشاء کربوهیدراتی، از چنین منابعی استفاده نموده است.

### ژن‌های موثر بر متابولیسم گلوکز و چربی

متابولیسم تبدیل پیروویت به استیل کوانزیم A توسط کمپلکس پیروویت دهیدروژناز (PDC) واقع در میتوکندری انجام می‌شود. پروتئین‌های PDK3 و PDK4 در ماتریکس میتوکندری واقع شده و موجب ممانعت از فعالیت آنزیمی PDC می‌شوند و بدین ترتیب تبدیل پیروویت به استیل کوانزیم A را کاهش می‌دهند. FOXO می‌تواند به ناحیه پروموتری این دو ژن متصل شده و موجب افزایش رونویسی آنها گردد (۹). افزایش بیان PDK3 و PDK4 در مرغ بومی، باعث افزایش گلوکونئوژنز (از طریق حفظ گلوکز و سایر سوبستراهای گلوکونئوژنز نظیر آلانین) و نیز همزمان موجب کاهش گلایکولیز (از طریق غیرفعال نمودن PDC) شده است. پیروویت اگرچه عمده سوبسترای گلوکونئوژنز است ولی برای تبدیل به گلوکز باید ابتدا وارد میتوکندری شود. برای این منظور پیروویت از طریق MPC1 و MPC2 واقع در غشای داخلی میتوکندری به ماتریکس انتقال می‌یابد (۱۳). بنابراین افزایش بیان MPC1 در مرغ بومی نشانه افزایش فعالیت گلوکونئوژنز از طریق انتقال پیروویت به درون میتوکندری بوده است. یکی از مهمترین ژن‌های موثر در متابولیسم چربی UCP3 است که ورود اسیدهای چرب را به میتوکندری تسهیل می‌نماید (۲۷). پروتئین‌های UCP در پستانداران و پرندگان می‌توانند عمل ترموژنز (تولید حرارت به طریق غیر لرزشی) را در ماهیچه‌های اسکلتی انجام دهند (۳). منتهی این عمل به‌واسطه نشست پروتون<sup>۲</sup> یا جفت ناشدگی میتوکندریایی<sup>۳</sup> موجب ناکارآمدی میتوکندریایی شده و میزان هدررفت انرژی از این طریق را حدود ۳۰ درصد میزان متابولیسم پایه تخمین می‌زنند (۳۰). بنابراین افزایش بیان این میتو پروتئوم در مرغ بومی می‌تواند تا حدی علت نامناسب بودن ضریب تبدیل غذا در این مرغ را توجیه نماید.

### ژن‌های موثر بر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی در مرغ بومی

در ماهیچه‌های اسکلتی افزایش تقاضای انرژی سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. در مرغ بومی احتمالاً افزایش بیان ژن‌های UQRQCQ، CMC2، ADCK3 و

RORA<sup>۱</sup> و BMP7 مرتبط با هیپوکسی (۱۵) و نیز بالا بودن چند برابری بیان کربنیک آنهیدراز ۹ (CA9) که از آن به‌عنوان بیومارکر هیپوکسی یاد می‌شود (۳۲) بیانگر بروز این وضعیت در مرغ بومی در مطالعه حاضر می‌باشد. وجود ژن ULK1 برای شروع اتوفازی ضروری می‌باشد (۴۷). در شرایط وفور غذایی AMPK توام با Uik1 بوده و تحت شرایط گرسنگی و روزه‌داری از آن جدا شده و آن را فسفریله می‌نماید. این عمل موجب فعال شدن این پروتئین شده و آن نیز ژن‌های پایین دست را فعال می‌نماید تا اتوفازی به‌صورت جریانی از فعال شدن آشاری ژن‌های مختلف شروع گردد (۲۹). افزایش بیان FoxO3 منجر به افزایش چند برابری بیان ژن GLUL (گلوتامین سینتتاز) و متعاقب آن افزایش سطح گلوتامین می‌شود (۴۴). گلوتامین سینتتاز با بلوکه کردن مسیر mTORC1 مانع ساخت پروتئین شده و در نتیجه فعال شدن همزمان Uik1 می‌تواند اتوفازی را آغاز نماید (۴۴). در گرسنگی‌های مزمن و روزه‌داری بدن در تلاش جهت بالا بردن سطح گلوکز، با افزایش شکست اسیدهای آمینه منشعب نظیر والین، لئوسین و ایزولئوسین در ماهیچه اسکلتی از یک‌طرف موجب افزایش ساخت گلوتامین توسط گلوتامین سینتتاز شده (۱۹) و از طرف دیگر اسکلت کربنی آنها را تبدیل به آلانین یعنی عمده منبع سوبسترای گلوکونئوژنز می‌نماید. آلانین عمده اسید آمینه آزاد شده از ماهیچه‌های اسکلتی و جذب شده توسط کبد است (۶). در مرغ بومی سطح بیان ژن‌های GLUL، Uik1 معنی‌دار و تقریباً دو برابر میزان آن در مرغ تجاری بود. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با اتوفازی و آپوپتوز میتوکندری سلول ماهیچه‌ای می‌تواند سبب از بین رفتن توان فسفریلاسیون اکسیداتیو، کاهش عملکرد مسیر تولید انرژی و نامناسب شدن راندمان غذایی در مرغ بومی شود.

### ژن‌های موثر بر متابولیسم اسیدهای آمینه حاصل از شکست پروتئین

در طی شکست اسیدهای آمینه منشعب، ژن MCCC2 آنزیم کربوکسیلاز میتوکندریایی وابسته به بیوتین را کددهی می‌نماید. این آنزیم یک مرحله از فرآیند شکست اسید آمینه لئوسین و تبدیل آن به استواستات و استیل کوانزیم A را انجام می‌دهد (۴۳). در طی روزه داری و یا شرایط مشابه، در ماهیچه اسکلتی لئوسین با ممانعت کردن از اکسیداسیون گلوکز و پیروویت می‌تواند گلوکونئوژنز را افزایش دهد (۱۰). ترنژین نیز توسط آنزیم‌های TDH و GCAT (همچنین KBL نیز خوانده می‌شود) به گلایسین و استیل کوانزیم A شکسته می‌شود (۴۲). استیل کوانزیم A می‌تواند وارد سیکل کربس و یا ساخت اگزالواستات گردد. گلایسین نیز می‌تواند با شکسته شدن وارد

2- Proton leak  
3- Mitochondrial uncoupling

1- RAR Related Orphan Receptor A

موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با اکسیداسیون اسیدهای آمینه (نظیر MCCC2 و TDH) و افزایش بیان پیروویک دئیدروژناز کیناز (PDK3 و PDK4) و در نتیجه کاهش اکسیداسیون هوازی پیروویک شد. بدین ترتیب مسیر سیستم تولید انرژی از اکسیداسیون کامل کربوهیدرات‌ها به سمت اکسیداسیون اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب و نیز افزایش گلوکونئوزنز تغییر نموده تا بدین وسیله نیازهای مواد مغذی بدن تأمین گردد. در مرغ بومی افزایش بیان ژن UCP3 می‌تواند تا حدی موجب کاهش کارآمدی میتوکندری و نامناسب شدن ضریب تبدیل غذا در مقایسه با جوجه تجاری گردد. این تغییرات در مسیرهای تولید انرژی، در نتیجه غالب و تثبیت شدن ژن‌هایی است که در سیر تکاملی این مرغ موجب سازگاری آن با شرایط و کمبودهای غذایی شده است. بنابراین در برنامه‌های اصلاح نژادی مرغ بومی اصفهان، احتمالاً به‌گزینی بر علیه ژن PIK3IP1 و بر له ژن SGK1 می‌تواند از فعال شدن FoxO3 و در نتیجه افزایش بیان لیگازهای E3 و میتوپروتئوم‌های مرتبط با مسیرهای شکست پروتئین ماهیچه‌ای جلوگیری نموده و موجب بهبود و افزایش سرعت رشد در این مرغ گردد.

TFB2M در ارتباط با فعالیت ژنوم هسته‌ای در تلاش جهت افزایش بیان سیتوکروم b و سیتوکروم C و کوآنزیم Q و فرآیندهای رونویسی در ژنوم میتوکندری بوده است تا بدین ترتیب و با افزایش فعالیت میتوکندری، تقاضای انرژی ماهیچه‌های اسکلتی در این مرغ تأمین گردد. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده وجود ارتباط بیشتر ژنوم هسته‌ای با ژنوم میتوکندریایی در مرغ بومی باشد. به‌رحال در این مطالعه امکان بررسی میزان بیان ژن‌های کد شونده توسط میتوکندری وجود نداشت.

### نتیجه‌گیری کلی

در مرغ بومی افزایش بیان ژن PI3KP1 و در نتیجه فعال شدن فاکتور رونویسی FoxO3، از یک طرف موجب کاهش ساخت (در نتیجه از کار افتادن مسیر IGF1-PI3K-AKT) و از طرفی دیگر باعث افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای (در نتیجه افزایش بیان لیگازهای یوبیکویتینی FBXO32 و FBXO30) شد. برآیند این دو موضوع موجب کاهش رشد هایپرتروفی ماهیچه اسکلتی این مرغ در مقایسه با جوجه تجاری گردید. همچنین افزایش بیان ژن FoxO3 و آزاد شدن اسیدهای آمینه ناشی از شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای

### منابع

1. Bottje, W. G., and G. E. Carstens. 2012. Variation in Metabolism: Biological Efficiency of Energy Production and Utilization That Affects Feed Efficiency. Pages 251-273 in Feed Efficiency in the Beef Industry. Wiley-Blackwell.
2. Brunet, A., J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings, and M. E. Greenberg. 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology* 21(3):952-965.
3. Criscuolo, F., M. del Mar Gonzalez-Barroso, Y. Le Maho, D. Ricquier, and F. Bouillaud. 2005. Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1565):803-810.
4. Davis, R. V., S. J. Lamont, M. F. Rothschild, M. E. Persia, C. M. Ashwell, and C. J. Schmidt. 2015. Transcriptome analysis of post-hatch breast muscle in legacy and modern broiler chickens reveals enrichment of several regulators of myogenic growth. *PLoS One* 10(3):e0122525.
5. Dennis, G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, and R. A. Lempicki. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology* 4(9):1.
6. Felig, P., T. Pozefsk, E. Marlis, and G. F. Cahill. 1970. Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science*, 167(3920):1003-1004.
7. Feng, C.-C., C.-C. Lin, Y.-P. Lai, T.-S. Chen, S. Marthandam Asokan, J.-Y. Lin, K.-H. Lin, V. P. Viswanadha, W.-W. Kuo, and C.-Y. Huang. 2016. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 $\alpha$ -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression. *Growth Factors*, 34(3-4):73-86.
8. Fisch, S., S. Gray, S. Heymans, S. M. Haldar, B. Wang, O. Pfister, L. Cui, A. Kumar, Z. Lin, and S. Sen-Banerjee. 2007. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17):7074-7079.
9. Furuyama, T., K. Kitayama, H. Yamashita, and M. Nozomu. 2003. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochemical Journal*, 375(2):365-371.
10. Chang, T. W., and A. Goldberg. 1978. Leucine inhibits oxidation of glucose and pyruvate in skeletal muscles during fasting. *Journal of Biological Chemistry*, 253(10): 3696-3701.
11. Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li,

- and M. Lieber. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8):1494-1512.
12. He, Q., S. Wang, L. Leng, W. Na, Q. Wang, and H. Li. 2014. Differentially expressed genes in the liver of lean and fat chickens. *Genetics and Molecular Research* 13(4):10823-10828.
  13. Herzig, S., E. Raemy, S. Montessuit, J.-L. Veuthey, N. Zamboni, B. Westermann, E. R. Kunji, and J.-C. Martinou. 2012. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*, 337(6090):93-96.
  14. Huang, X.-Y., Z.-L. Huang, J.-H. Yang, Y.-H. Xu, J.-S. Sun, Q. Zheng, C. Wei, W. Song, and Z. Yuan. 2016. Pancreatic cancer cell-derived IGFBP-3 contributes to muscle wasting. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1):46.
  15. Hyun, S. W., and Y. S. Jung. 2014. Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood-brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(4):1638-1642.
  16. Jagoe, R. T., S. H. Lecker, M. Gomes, and A. L. Goldberg. 2002. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *The FASEB Journal*, 16(13):1697-1712.
  17. Kelley, D. E. 2005. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7):1699-1702.
  18. Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4):357-360.
  19. King, P. A., L. Goldstein, and E. A. Newsholme. 1983. Glutamine synthetase activity of muscle in acidosis. *Biochemical Journal*, 216(2):523-525.
  20. Kobayashi, T., D. Maria, N. Morrice, and P. Cohen. 1999. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum-and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochemical Journal*, 344(1):189-197.
  21. Kong, B.-W., N. Hudson, D. Seo, S. Lee, B. Khatri, K. Lassiter, D. Cook, A. Piekarski, S. Dridi, and N. Anthony. 2017. RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line. *BMC Genomics*, 18(1):82.
  22. Lange, S., S. Perera, P. Teh, and J. Chen. 2012. Obscurin and KCTD6 regulate cullin-dependent small ankyrin-1 (sAnk1. 5) protein turnover. *Molecular Biology of the Cell*, 23(13):2490-2504.
  23. Lecker, S. H., A. L. Goldberg, and W. E. Mitch. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(7):1807-1819.
  24. Lee, J. H., A. V. Budanov, and M. Karin. 2013. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metabolism* 18(6):792-801.
  25. Liu, C.-C., Y.-C. Lin, Y.-H. Chen, C.-M. Chen, L.-Y. Pang, H.-A. Chen, P.-R. Wu, M.-Y. Lin, S.-T. Jiang, and T.-F. Tsai. 2016. Cul3-KLHL20 ubiquitin ligase governs the turnover of ULK1 and VPS34 complexes to control autophagy termination. *Molecular Cell*, 61(1):84-97.
  26. Lohse, M., A. Bolger, A. Nagel, A. R. Fernie, J. E. Lunn, M. Stitt, and B. Usadel. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Research*, 41(W1):W622-W627
  27. MacLellan, J. D., M. F. Gerrits, A. Gowing, P. J. Smith, M. B. Wheeler, and M.-E. Harper. 2005. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*, 54(8):2343-2350.
  28. Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, and J. Zhao. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, 6(6):458-471.
  29. Matsunaga, K., E. Morita, T. Saitoh, S. Akira, N. T. Ktistakis, T. Izumi, T. Noda, and T. Yoshimori. 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology*, 190(4):511-521.
  30. Mookerjee, S. A., A. S. Divakaruni, M. Jastroch, and M. D. Brand. 2010. Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7):463-472.
  31. Motsepe, R., M. Mabelebele, D. Norris, D. Brown, J. Ngambi, and M. Ginindza. 2016. Carcass and meat quality characteristics of South African indigenous chickens. *Indian Journal of Animal Research*, 50(4) 580-587.
  32. Olive, P. L., C. Aquino-Parsons, S. H. MacPhail, S. Y. Liao, J. A. Raleigh, M. I. Lerman, and E. J. Stanbridge. 2001. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Research*, 61(24):8924-8929.
  33. Quinsay, M. N., Y. Lee, S. Rikka, M. R. Sayen, J. D. Molkenin, R. A. Gottlieb, and Å. B. Gustafsson. 2010. Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6):1146-1156.
  34. Sandri, M. 2008. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology*, 23(3):160-170.
  35. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3):399-412.
  36. Schmidt-Strassburger, U., T. G. Schips, H. J. Maier, K. Kloiber, F. Mannella, K. E. Braunstein, K. Holzmann, A. Ushmorov, S. Liebau, and T. M. Boeckers. 2012. Expression of constitutively active FoxO3 in murine forebrain

- leads to a loss of neural progenitors. *The FASEB Journal*, 26(12):4990-5001.
37. Shimizu, N., N. Yoshikawa, N. Ito, T. Maruyama, Y. Suzuki, S.-i. Takeda, J. Nakae, Y. Tagata, S. Nishitani, and K. Takehana. 2011. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metabolism* 13(2):170-182.
  38. Shyh-Chang, N., J. W. Locasale, C. A. Lyssiotis, Y. Zheng, R. Y. Teo, S. Ratanasirintrao, J. Zhang, T. Onder, J. J. Unternaehrer, and H. Zhu. 2013. Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science*, 339(6116):222-226.
  39. Song, H. K., J. Kim, J. S. Lee, K. J. Nho, H. C. Jeong, J. Kim, Y. Ahn, and W. J. Park. 2015. Pik3ip1 modulates cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K pathway. *PLoS One* 10(3):e0122251.
  40. Taylor, S. W., E. Fahy, B. Zhang, G. M. Glenn, D. E. Warnock, S. Wiley, A. N. Murphy, S. P. Gaucher, R. A. Capaldi, and B. W. Gibson. 2003. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature Biotechnology*, 21(3):281-286.
  41. Trapnell, C., B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. Van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold, and L. Pachter. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5):511-515.
  42. Tressel, T., R. Thompson, L. Zieske, M. Menendez, and L. Davis. 1986. Interaction between L-threonine dehydrogenase and aminoacetone synthetase and mechanism of aminoacetone production. *Journal of Biological Chemistry*, 261(35):16428-16437.
  43. Tymoczko, J. L., J. M. Berg, and L. Stryer. 2011. *Biochemistry: a short course*. Macmillan.
  44. Van Der Vos, K. E., P. Eliasson, T. Proikas-Cezanne, S. J. Vervoort, R. Van Boxtel, M. Putker, I. J. Van Zutphen, M. Mauthe, S. Zellmer, and C. Pals. 2012. Modulation of glutamine metabolism by the PI (3) K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nature Cell Biology*, 14(8):829-837.
  45. Wang, J., P. Alexander, L. Wu, R. Hammer, O. Cleaver, and S. L. McKnight. 2009. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science*, 325(5939):435-439.
  46. Wang, X., C. Blagden, J. Fan, S. J. Nowak, I. Taniuchi, D. R. Littman, and S. J. Burden. 2005. Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. *Genes & Development*, 19(14):1715-1722.
  47. Wirth, M., J. Joachim, and S. A. Tooze. 2013. Autophagosome formation-the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. Pages 301-309 in *Proc. Seminars in Cancer Biology*. Elsevier.
  48. Zhao, J., J. J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, 6(6):472-83.
  49. Zheng, B., S. Ohkawa, H. Li, T. K. Roberts-Wilson, and S. R. Price. 2010. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogen-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The FASEB Journal*, 24(8):2660-2669.

## The Effect of Mitoproteum Genes on Breast Muscle Growth of Isfahan Native Chickens by RNA-seq Data

S. N. Albooshoke<sup>1</sup>- M. Tahmoorespur<sup>2\*</sup>- M. R. Bakhtiarizadeh<sup>3</sup>- M. R. Nasiry<sup>2</sup>- S. Esmailkhanian<sup>4</sup>

Received: 15-07-2017

Accepted: 16-09-2017

**Introduction** 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. On the other hand modern broilers grow faster and offer a higher nutritional efficiency than the indigenous chicken breeds. This advantage is the result of the severe genetic selection programs, which were designed to increase production. In this study, a systematic identification of mitoProteome genes and new pathways related to growth rate of pectoralis muscle in chicken has been made using gene expression profiles of two distinct breeds: Isfahan native, a slow-growing Iranian breed possessing low growth rate and Ross 708, a commercial fast-growing broiler line.

**Materials and Methods** All the birds were reared under the same management, environmental and nutritional conditions. The diet was the same throughout the whole experiment and formulated to contain 20% CP and 3000 kcal ME/kg. The birds received feed and water freely (ad libitum). On day 28 post-hatch, six birds were randomly selected from each breed, weighed and sacrificed. From each bird, 1 to 2 g of tissue was excised from the posterior region of the left pectoralis major muscle. Total RNA was isolated from breast muscle samples. Using Truseq Stranded RNA Prep kit (Illumina), each sample was converted to a uniquely indexed cDNA library, and the resulting cDNA libraries were pooled and sequenced on an Illumina HiSeq 2000 sequencer. An average of 70 million paired end reads (150 bp) were produced from all sample, 70% of which were properly mapped to the reference genome (EnsemblGalgal4). We analyzed the sequence data using bioinformatics tools Hisat2 and Cufflinks. Using Hisat2 aligner, more than 72% of clean reads (in average) were mapped back to the Galgal4 reference genome. In addition, about 90% of reads were aligned concordantly.

**Results and Discussion** On the first day after hatching, the weight of commercial chicks were heavier than native. This process continued until the end of the test, 28 days. The commercial chickens have a heavier weight, higher growth rate, and lower feed conversion rates than native chickens. The RNA-Seq of four muscle samples yielded around 131,590,636 million of raw 150 bp paired end reads, of which 94,483,431 and 37,107,205 reads were for native and commercial breeds, respectively. We identified 606 differentially expressed genes (DEGs) between two breeds with at least 2-fold differences ( $P$ -adjusted (Benjamini)  $\leq 0.05$ ,  $\log_2FC \geq 2$ ). Of these, 249 and 357 genes were up-regulated in native and commercial broilers, respectively. In the native chickens, FoxO3 transcription factor activated the atrophy pathway related to E3 ubiquitin ligases and led to increased proteolysis and reduced the skeletal muscle size as compared to the commercial broilers. Hypoxia and regulation of the metabolic process of the reactive oxygen species (ROS) were among the most important significant biological processes in native chickens. The analysis of the genes associated with the mitoProteome revealed significant changes in the expression of many genes involved in transcription regulation and growth. Also the increased expression of FoxO3 gene and the releasing of amino acids caused by the degradation of proteins, increased the expression of amino acid catabolism enzyme's (such as MCCC2 and TDH), as well increased expression of pyruvate dehydrogenase kinases (PDK4 and PDK3). This led to reducing of the aerobic oxidation of pyruvate and increasing gluconeogenesis. Increasing the UCP3 gene expression in native chickens can partly reduce mitochondrial efficiency and inappropriate feed conversion ratio compared to commercial chickens. These changes were also reflective of a complicated adaptation program that facilitates proteolysis and reduces oxidative metabolism of glucose and pyruvate in the muscles. These metabolic pathways have evolved to reduce the requirements of indigenous chickens and increase the ability of these strains to overcome the circumstances and environmental stress and resist nutritional deficits.

**Conclusion** Our results suggested that different expression patterns of some genes including SGK1,

1- Animal science department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahwaz, Iran

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

3- Assistant professor, Department of Animal Science, Aburairhan Campus, University of Tehran, Iran

4- Associate Professor, Animal Science Research Institute, Karaj, Iran

(\* Corresponding author email: Tahmoores@um.ac.ir)

FBXO32, FBX030, IRS2, SP3, CUL, PIK3IP1 and FoxO3 in native breed might represent a cause for the poor growth performance for this breed than commercial breed. Hence, evaluation of native chicken based on these candidate genes would accelerate the efficient native chicken breed in near future. These results expand our knowledge of the genes transcribed in the breast muscle of two breeds and provide a basis for future research of the molecular mechanisms underlying the chicken breed differences.

**Keywords:** Breast muscle, Native chicken, Mitoproteome, RNA-seq

