



Comparative analysis of gene expression and allele-specific expression (ASE) in intramuscular and subcutaneous adipose tissues in beef cattle

Hamideh Noori Sadegh¹ , Gholam Reza Dashab² , Zahra Roudbari³ ,
Mohammad Hossein Banabazi⁴  and Tomas Sadkowski⁵ 

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: h.noorisadegh95@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: dashab@uoz.ac.ir
3. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir
4. Department of Animal Biosciences (HBIO), Center for Veterinary Medicine and Animal Science (VHC), Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), 75007 Uppsala, Sweden. E-mail: banabazi.hossein@gmail.com
5. Department of Physiological Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Poland. E-mail: tomasz_sadkowski@sggw.edu.pl

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	<p>This study was conducted to investigate allele-specific expression (ASE) in two types of bovine adipose tissues—intramuscular adipose tissue (IMF) and subcutaneous adipose tissue (SCAT) in order to identify regulatory differences between these depots. Intramuscular fat is a key determinant of beef quality, contributing to tenderness, flavor, and juiciness, and unlike subcutaneous fat, it develops at later stages of animal growth. To achieve this objective, RNA-Seq data from eight tissue samples collected from the 9th to 11th rib region of crossbred Angus cattle were retrieved from the NCBI database (accession number PRJNA1053327) and processed using HISAT2, GATK, and VEP pipelines. The average read-mapping rate was 95%, and more than 580,000 genetic variants were identified. In IMF, among 214,613 ASE-informative SNPs, 890 significant ASE sites were detected, corresponding to 32 genes exhibiting clear allele-specific expression. In contrast, in SCAT, 1,094 significant ASE positions were identified among 305,996 ASE-informative SNPs, associated with 21 genes. Only one gene, SUGCT, was shared between the two tissues; this gene is involved in fatty acid metabolism and cellular energy regulation. Pathway enrichment analysis revealed that immune-related pathways such as JAK–STAT and Necroptosis were predominant in SCAT, whereas IMF was enriched for energy-related pathways, including Hippo signaling and Ubiquinone biosynthesis. The key regulatory genes IFNAR1 in SCAT and RB1 in IMF played major roles in immune regulation and adipocyte differentiation, respectively. Overall, the findings highlight fundamental biological differences between the two bovine fat depots: subcutaneous adipose tissue is more actively engaged in protective and immune-related functions, whereas intramuscular adipose tissue is more closely associated with metabolic and energy-production pathways. Identifying these depot-specific regulatory features and key ASE-associated genes is crucial for deepening our understanding of the molecular mechanisms influencing beef quality and for identifying potential genetic markers to support selection and improvement of desirable meat traits in beef cattle.</p>
Article history: Received: 19 October 2025 Received in revised form: 12 December 2025 Accepted: 26 December 2025 Published online: Summer 2026	
Keywords: <i>Allele-specific expression (ASE), Marbling, Meat quality, Transcriptomics.</i>	

Cite this article: Noori Sadegh, H., Dashab, G. R., Roudbari, Z., Banabazi, M. H. & Sadkowski, T. (2026). Comparative analysis of gene expression and allele-specific expression (ASE) in intramuscular and subcutaneous adipose tissues in beef cattle. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 (2), 333-349. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.406502.654106>



Extended Abstract

Introduction

Lipids constitute a diverse class of biomolecules that play essential roles in maintaining cellular structure and regulating metabolic processes across all cell types. Over the past several decades, long-chain fatty acids (FAs) have been recognized as key participants in a variety of biological functions, ranging from transcriptional regulation to physiological activities. Adipose tissue can be categorized according to its anatomical location into subcutaneous adipose tissue, visceral adipose tissue, bone marrow adipose tissue, intermuscular adipose tissue, and intramuscular adipose tissue. In cattle, intramuscular fat (IMF) differs from other white adipose depots not only in its anatomical position but also in its biological function and, importantly, its economic significance. Since IMF represents fat deposited within muscle fibers, it directly affects the energy balance and growth of muscle tissue. Moreover, the IMF contributes to the flavor, tenderness, and juiciness of beef, making it a “valuable” form of fat in the meat industry. The development of IMF in cattle accelerates after puberty and is modulated by multiple factors, including genetics, nutritional status, sex, and management practices, indicating that IMF deposition can be effectively targeted through selective interventions. In contrast, subcutaneous and other white adipose depots are often regarded as “waste” fat in the beef industry, as their accumulation consumes considerable dietary energy and they are typically undesirable to consumers due to health concerns associated with excessive fat intake, such as an increased risk of cardiovascular disease. This study aims to research and compare intramuscular (marbling) and subcutaneous adipose tissues to elucidate the molecular mechanisms regulating fat accumulation in different depots. Understanding the molecular basis of IMF development across distinct fat types provides valuable insights for improving meat quality and optimizing the utilization of cattle genetic and nutritional resources.

Method

In this study, RNA-Seq data from four intramuscular adipose tissue (IMF) samples and four subcutaneous adipose tissue (SCAT) samples of beef cattle (*Bos taurus*) (accession number PRJNA1053327) were used. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent, and its quality was assessed with NanoDrop and Bioanalyzer instruments. RNA libraries were prepared with the Illumina TruSeq Stranded mRNA Kit and sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform using paired-end reads. Raw reads were processed and aligned using FastQC and HISAT2 on the Galaxy platform. Variant calling and allele-specific expression analysis were performed with GATK and Picard in a Linux environment, and gene annotation was carried out using VEP and the DAVID database.

Results

In this study, RNA-seq data from intramuscular adipose tissue (IMF) and subcutaneous adipose tissue (SCAT) of beef cattle were analyzed to investigate allele-specific expression (ASE) differences between the two fat depots. The sequencing data showed high quality, with over 95% of reads successfully mapped to the bovine reference genome. A total of 582999 variants were identified in IMF, of which 214613 exhibited ASE, and 890 SNPs showed statistically significant expression, corresponding to 32 genes. In SCAT, 1094 significant ASE SNPs were detected, associated with 21 genes. Only one gene, *SUGCT*, was shared between the two tissues, indicating its potential role in fatty acid metabolism and cellular energy regulation. Pathway enrichment analysis revealed distinct functional profiles between IMF and SCAT. Immune-related pathways such as JAK–STAT signaling and necroptosis predominated in SCAT, while IMF was enriched in pathways related to cellular growth and oxidative metabolism, including Hippo signaling and ubiquinone biosynthesis. The *RB1* gene in IMF was identified as a regulator of adipocyte differentiation and lipid storage, whereas *IFNAR1* in SCAT was linked to immune and metabolic responses. Enhanced activity of the ubiquinone pathway in IMF suggested higher mitochondrial energy metabolism, consistent with its role in maintaining muscle energy homeostasis. SCAT demonstrated a greater capacity for lipid accumulation than IMF. Overall, ASE patterns were found to be tissue-specific, reflecting distinct metabolic and regulatory mechanisms between fat depots. These findings provide valuable insights into cis-regulatory control of lipid metabolism and identify potential genomic markers for improving beef quality.

Conclusions

This study demonstrated that allele-specific expression (ASE) patterns differ markedly between intramuscular (IMF) and subcutaneous (SCAT) adipose tissues in beef cattle, reflecting distinct metabolic and regulatory functions. IMF showed enrichment in pathways related to mitochondrial activity and energy metabolism, whereas SCAT was primarily associated with immune and inflammatory signaling pathways. Key genes such as *RB1* and *IFNAR1* were identified as central regulators of adipocyte differentiation and immune modulation, respectively, while *SUGCT* emerged as the only shared gene, implicating its role in lipid and energy homeostasis. These findings highlight the tissue-specific nature of gene regulation in bovine adipose depots and suggest that cis-regulatory variation contributes to differences in fat deposition and meat quality.

Overall, this research provides a foundational framework for future genomic studies aimed at improving beef quality through molecular and genetic selection strategies.

Author Contributions

Methodology, H. N. S., G. R. D., M. H. B. and Z. R.; software, H. N. S., G. R. D. and Z. R.; formal analysis, H. N. S., G. R. D. and Z. R., writing—original draft preparation, H. N. S., G. R. D. and Z. R., writing—review and editing, H. N. S., G. R. D. and Z. R.; supervision, H. N. S., G. R. D., M. H. B., and Z. R., All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on NCBI by ID: PRJNA1053327.

Acknowledgements

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Zabol (Ethical cod: IR-UOZ-4398). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن و بیان آلل اختصاصی (ASE) در بافت های چربی داخل عضلانی و زیرجلدی در گاوهای گوشتی

حمیده نوری صادق^۱ | غلامرضا داشاب^۲ | زهرا رودباری^۳ | محمدحسین بناءبازی^۴ | توماس سادکوسکی^۵

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: h.noorisadegh95@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: dashab@uoz.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

۴. گروه علوم زیستی دامی، مرکز دامپزشکی و علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، ۷۵۰۰۷ اوسپالا، سوئد. رایانامه:

banabazi.hossein@gmail.com

۵. گروه فیزیولوژی حیوانات، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم زیستی ورشو، لهستان. رایانامه: tomasz_sadkowski@sggw.edu.pl

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	این پژوهش با هدف بررسی بیان آلل اختصاصی (Allele-Specific Expression; ASE) در دو نوع بافت چربی گاو شامل چربی داخل عضلانی (IMF) و چربی زیرجلدی (SCAT) انجام شد، تا تفاوت‌های تنظیمی ژن‌ها در این بافت‌ها شناسایی گردد. چربی داخل عضلانی از عوامل کلیدی تعیین کننده کیفیت گوشت گاو از نظر لطافت، طعم و آبداری است و برخلاف چربی زیرجلدی، در مراحل دیرتر رشد حیوان تشکیل می‌شود. برای این منظور، داده‌های RNA-Seq مربوط به هشت نمونه بافت از ناحیه دنده‌های ۹ تا ۱۱ گاوهای نژاد دورگه آنگوس از پایگاه داده NCBI (با شماره پروژه PRJNA1053327) استخراج شدند و مراحل تجزیه با استفاده از نرم‌افزارهای HISAT2، GATK و VEP پردازش گردید. میانگین نرخ نگاشت خوانش‌ها ۹۵٪ بود و در مجموع بیش از ۵۸۰ هزار واریانت ژنتیکی شناسایی شد. در بافت داخل عضلانی از میان ۲۱۴۶۱۳ SNP دارای قابلیت ASE، تعداد ۸۹۰ موقعیت معنی‌دار شناسایی و ۳۲ ژن حاوی الگوی بیان آللی اختصاصی مشخص گردید. در حالی که در بافت زیرجلدی، از ۳۰۵۹۹۶ SNP دارای ویژگی ASE تعداد ۱۰۹۴ موقعیت معنی‌دار شناخته شدند که با ۲۱ ژن مرتبط بودند. تنها ژن مشترک میان دو بافت، SUGCT بود که در متابولیسم اسیدهای چرب و تنظیم انرژی سلولی نقش دارد. تحلیل غنی‌سازی مسیرها نشان داد که در بافت SCAT مسیرهای ایمنی نظیر JAK-STAT و Necroptosis غالب بودند، در حالی که در بافت داخل عضلانی مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی از جمله Hippo signaling و Ubiquinone biosynthesis فعال تر بودند. ژن‌های کلیدی IFNAR1 در بافت چربی زیرجلدی و RB1 در بافت چربی داخل عضلانی به ترتیب در تنظیم پاسخ ایمنی و تمایز آدیپوسیتی نقش برجسته‌ای داشتند. در مجموع، نتایج این مطالعه بیانگر تفاوت‌های زیستی مهم میان دو نوع چربی گاو است. چربی زیرجلدی بیشتر در نقش محافظتی و ایمنی و چربی داخل عضلانی در مسیرهای متابولیکی و تولید انرژی فعال تر عمل می‌کند. شناسایی این تفاوت‌ها و ژن‌های کلیدی مرتبط، جهت درک دقیق‌تر مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن مؤثر بر کیفیت گوشت گاو و همچنین معرفی نشانگرهای ژنتیکی بالقوه برای اصلاح و بهبود صفات مطلوب گوشت در نژادهای گوشتی، حائز اهمیت است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۵ تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۵	کلیدواژه‌ها: بیان اختصاصی آلل (ASE) ترانسکریپتومیکس، کیفیت گوشت، ماربلینگ

استناد: نوری صادق، حمیده؛ داشاب، غلامرضا؛ رودباری، زهرا؛ بناءبازی، محمدحسین و سادکوسکی، توماس (۱۴۰۵). تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن و بیان آلل اختصاصی (ASE) در بافت های چربی داخل عضلانی و زیرجلدی در گاوهای گوشتی. نشریه علوم دامی ایران، ۵۷ (۲)، ۳۳۳-۳۴۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.406502.654106>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.406502.654106>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

بافت چربی سفید نقش مهمی در تنظیم تعادل انرژی و متابولیسم بدن دارد. در پستانداران، چربی‌ها از طریق مسیر لیپوژنز از مازاد انرژی سنتز و ذخیره شده و در هنگام کمبود انرژی از طریق مسیر لیپولیز تجزیه و مصرف می‌شوند (Rosen and Spiegelman, 2014). دو نوع اصلی چربی سفید شامل چربی داخل عضلانی (Intramuscular Adipose Tissue; IMF) و چربی زیرجلدی (Subcutaneous Adipose Tissue; SCAT) در گاو به ترتیب بین فیبرهای عضله اسکلتی و زیر پوست تجمع می‌یابند (Tan et al., 2025).

گوشت گاو علاوه بر پروتئین، حاوی مقدار قابل توجهی چربی است. رسوب بافت چربی داخل عضلانی (IMF) یکی از عوامل اصلی تعیین کننده درجه کیفیت گوشت گاو محسوب می‌شود (Green et al., 2025) و با ویژگی‌هایی چون لطافت، آبداری و طعم مطلوب گوشت ارتباط مستقیم دارد (Yu et al., 2023). این نوع چربی برخلاف چربی زیرجلدی دیرتر شکل گرفته و رشد کندتری دارد (Pethick et al., 2006). چربی داخل عضلانی (IMF) به عنوان چربی موجود بین فیبرهای عضله اسکلتی تعریف می‌شود. از نظر فیزیولوژیکی، اعتقاد بر این است که IMF عملکردهای مشابهی با سایر ذخایر چربی در بدن گاو دارد و به عنوان ذخیره انرژی عمل می‌کند و در مواقع افزایش تقاضای متابولیک یا تأمین ناکافی مواد مغذی، سوخت را تأمین می‌کند. از منظر تغذیه و بازار مصرف، چربی داخل عضلانی نه تنها ذخیره انرژی سلولی محسوب می‌شود، بلکه یکی از عوامل کلیدی رضایت مصرف کنندگان از گوشت است (Tan and Jiang, 2024).

با توجه به افزایش تقاضا برای محصولات دامی با چربی کمتر و نسبت بالاتر از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، شناخت سازوکارهای مولکولی و ژنتیکی مؤثر بر شکل‌گیری و تنظیم چربی اهمیت ویژه‌ای یافته است. در گاو، ترکیب و مقدار اسیدهای چرب موجود در عضلات تأثیر مستقیمی بر کیفیت و ارزش تغذیه‌ای گوشت دارد (da Costa et al., 2013). الگوی توزیع و مقدار چربی داخل عضله‌ای تحت تأثیر تعامل عوامل ژنتیکی، محیطی و تغذیه‌ای قرار دارد (Mannen, 2011). فرآیندهای آدیپوژنز، لیپوژنز و لیپولیز بر اثر هماهنگی میان مکانیسم‌های ژنتیکی درون‌زا (تنظیم شده توسط بیان ژن‌ها)، فاکتورهای غدد درون‌ریز و مؤلفه‌های تغذیه‌ای کنترل می‌شوند (Taniguchi et al., 2008). از آنجا که توسعه چربی داخل عضلانی فرآیندی پیچیده و چندعاملی است، تغییرات در بیان ژن‌های عضله اسکلتی می‌تواند به طور مستقیم بر رشد و تفاوت‌های تجمع چربی اثرگذار باشد (Roberts et al., 2015)، با وجود این، سازوکارهای تنظیمی دقیق کنترل کننده بیان ژن در این بافت هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. پیشرفت‌های اخیر در فناوری ترانسکریپتوم (RNA-Seq)، امکان بررسی دقیق‌تر زیست‌شناسی مولکولی بافت‌های چربی گاو را فراهم کرده است.

در این راستا، تجزیه و تحلیل بیان آلل اختصاصی (ASE) به عنوان یکی از رویکردهای مؤثر در بیوانفورماتیک مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش با تشخیص تفاوت میزان رونویسی آلل‌های مادری و پدری در یک فرد، قادر است اثرات تنظیم ژن در سطح cis regulatory را آشکار سازد و واریانت‌های عملکردی را بدون تأثیرپذیری از تنوع فردی شناسایی کند. این روش به طور فزاینده‌ای در گونه‌های دامی، مانند گاو، برای درک تنظیم ژن بدون اثرات مخدوش کننده تنوع بین فردی استفاده شده است (Guillocheau et al., 2019).

ASE معمولاً مختص بافت است و میزان عدم تعادل آللی می‌تواند حتی برای یک ژن در بافت‌های مختلف معکوس شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بخش قابل توجهی از ژن‌های گاو بیان آللی اختصاصی را دست‌کم در یکی از بافت‌ها نشان می‌دهند، به طوری که در پژوهش Chamberlain و همکاران، بیش از ۸۹٪ از ژن‌ها دارای ASE بوده‌اند (Chamberlain et al., 2015). بررسی الگوهای ASE در بافت چربی داخل عضلانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، چرا که این بافت مستقیماً با فرآیند تجمع چربی داخل عضله‌ای و مرمری شدن گوشت مرتبط است. بسیاری از SNP‌های دارای ASE در نواحی ژنومی مرتبط با صفات گوشت و لاشه قرار دارند و می‌توانند در تنظیم فرآیندهای متابولیکی مؤثر باشند (de Souza et al., 2020). این نوع تحلیل‌ها به محققان امکان می‌دهد تا تفاوت‌های تنظیمی بین آلل‌ها را مستقل از سطح کلی بیان ژن بررسی کرده و سازوکارهای علی مرتبط با صفات پیچیده و وراثت‌پذیری پایین را شناسایی نمایند (van Beek et al., 2023).

با توجه به اینکه مکانیسم‌های مولکولی مؤثر بر تفاوت‌های تجمع چربی زیرجلدی و داخل‌عضلانی در گاو هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند، هدف اصلی این مطالعه بررسی بیان آلل اختصاصی (ASE) در ژن‌های مرتبط با بافت‌های چربی داخل‌عضلانی و زیرجلدی گاوهای گوشتی با استفاده از داده‌های RNA-Seq و شناسایی مسیرهای زیستی و ژن‌های کلیدی درگیر در تنظیم متابولیسم لیپید و عملکرد سلول‌های چربی بود. این مطالعه تلاشی است در جهت درک دقیق‌تر سازوکارهای تنظیم بیان ژن و فراهم‌سازی زمینه‌ای علمی برای بهبود کیفیت گوشت گاو از منظر ژنتیکی و مولکولی.

مواد و روش‌ها

منشأ داده‌ها و آماده‌سازی نمونه‌های RNA-Seq

در این مطالعه، از داده‌های حاصل از چهار نمونه بافت چربی داخل‌عضلانی (IMF) و چهار نمونه بافت چربی زیرجلدی (SCAT) مربوط به گاوهای گوشتی دورگه آنگوس استفاده شد که از پایگاه داده ملی NCBI تحت شماره پروژه PRJNA1053327 بازبازی گردید (Tegeler *et al.*, 2025). این نمونه‌ها منشأ گرفته از بخش عضله *Longissimus dorsi* در ناحیه بین دنده‌های ۹ تا ۱۱ بودند. حیوانات شامل سه گاو نر اخته و یک گاو ماده بودند که بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد رفاه حیوانات و با استفاده از روش *captive bolt stunning* در آزمایشگاه گوشت دانشگاه فنی تگزاس (Texas Tech University Meat Laboratory) ذبح شدند. نمونه‌برداری در مطالعه اصلی بلافاصله پس از خروج خون و جداسازی پوست انجام گرفته بود تا از تخریب RNA جلوگیری شود. هر نمونه بافتی حدود ۱ گرم وزن داشت و پس از جمع‌آوری در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای -80°C نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت TRIZol Reagent طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. خلوص و کمیت RNA با دستگاه NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) اندازه‌گیری شدند و کیفیت RNA از طریق الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد و دستگاه Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) بررسی شده است. نمونه‌های با نسبت جذب A260/A280 بین ۱/۹ تا ۲/۱ و شاخص یکپارچگی RNA (RIN) بالاتر از ۷ برای توالی‌یابی انتخاب شدند. برای تهیه کتابخانه‌های RNA از کیت Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit استفاده شد و توالی‌یابی RNA بر روی پلتفرم Illumina HiSeq 2500 به روش *paired end* با طول خوانش ۱۵۰ جفت‌باز انجام گرفت. داده‌های حاصل با فرمت FASTQ در دسترس بوده و برای تحلیل‌های بیوانفورماتیکی حاضر مورد استفاده قرار گرفتند.

هم‌ترازی توالی‌ها

داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی RNA با فرمت FASTQ ابتدا مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند تا خوانش‌های معتبر و فاقد خطا برای مراحل بعدی شناسایی شوند. بررسی شاخص‌های کیفیت شامل میانگین امتیاز Phred، درصد بازهای مبهم و طول خوانش‌ها با نرم‌افزار FastQC انجام شد و نتایج نشان داد که نمونه‌ها دارای کیفیت بالا و حداقل خطا سیستماتیک هستند. در گام بعد، خوانش‌های پالایش‌شده با استفاده از هم‌ترازکننده‌ی HISAT2 نسبت به ژنوم مرجع گاوی (*Bos taurus ARS UCD2.0*) هم‌تراز شدند. داده‌های حاصل از هم‌ترازی با ابزار MultiQC به صورت جامع بررسی و تجسم شدند تا درصد خوانش‌های نگاشت‌شده، میزان هم‌ترازی چندگانه و شاخص‌های پوشش ژنومی ارزیابی گردد. این مرحله دقت هم‌ترازی بیش از ۹۵ درصدی را نشان داد و کیفیت مناسب داده‌ها برای ادامه‌ی تحلیل را تأیید کرد (جدول ۱).

پس از هم‌ترازی خوانش‌های RNA-Seq و تولید فایل‌های BAM، این فایل‌ها ابتدا مرتب و ایندکس شدند تا دسترسی به موقعیت‌های ژنومی تسهیل گردد. به منظور حذف اربیی ناشی از تکثیرهای غیرواقعی و جلوگیری از خطا در شناسایی واریانت‌ها، خوانش‌های تکراری با استفاده از ابزار Picard علامت‌گذاری و حذف شدند؛ زیرا وجود چندین نسخه‌ی تکراری از یک قطعه می‌تواند به‌طور مصنوعی فراوانی آلل‌های هموزیگوت را افزایش داده و دقت فراخوانی واریانت را کاهش دهد. در گام بعد، امتیازهای کیفیت بازها (Phred scores) با به‌کارگیری ابزار BaseRecalibrator از بسته‌ی GATK بازآموزی شده تا اصلاح خطاهای سیستماتیک و بهبود صحت و اختصاصیت داده‌های توالی‌یابی تضمین گردد. داده‌های پردازش‌شده‌ی نهایی حاصل از این مراحل، به‌عنوان ورودی مطمئن و استاندارد برای مرحله‌ی فراخوانی واریانت‌ها مورد استفاده قرار گرفتند و بستر مناسبی برای تجزیه و تحلیل دقیق بیان آلل اختصاصی (ASE) و سایر تحلیل‌های ژنومی فراهم کردند.

فراخوانی واریانت‌ها

فراخوانی واریانت‌های ژنتیکی با استفاده از ابزار (McKenna *et al.*, 2010) GATK HaplotypeCaller صورت گرفت. این نرم‌افزار با الگوریتم مبتنی بر مدل هاپلوتیپ، قادر به شناسایی دقیق واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) و انواع indelهای کوچک و پیچیده است و امکان تعیین حالت فازی واریانت‌ها را نیز فراهم می‌کند. مرحله فراخوانی واریانت منجر به تولید فایل VCF شد که اطلاعات جامع هر واریانت شامل موقعیت ژنی، نوع و شمار آلل‌ها، امتیاز کیفیت ژنوتیپ و عمق پوشش خوانش‌ها را در برداشت. پیاده‌سازی این فرآیند با بهره‌گیری از GATK نسخه ۵,۴,۰ (Genome Analysis Toolkit) و ابزار جانبی Picard انجام شد تا پردازش خوانش‌ها و حذف داده‌های تکراری با دقت بالا انجام گیرد.

شناسایی بیان آلل اختصاصی (ASE)

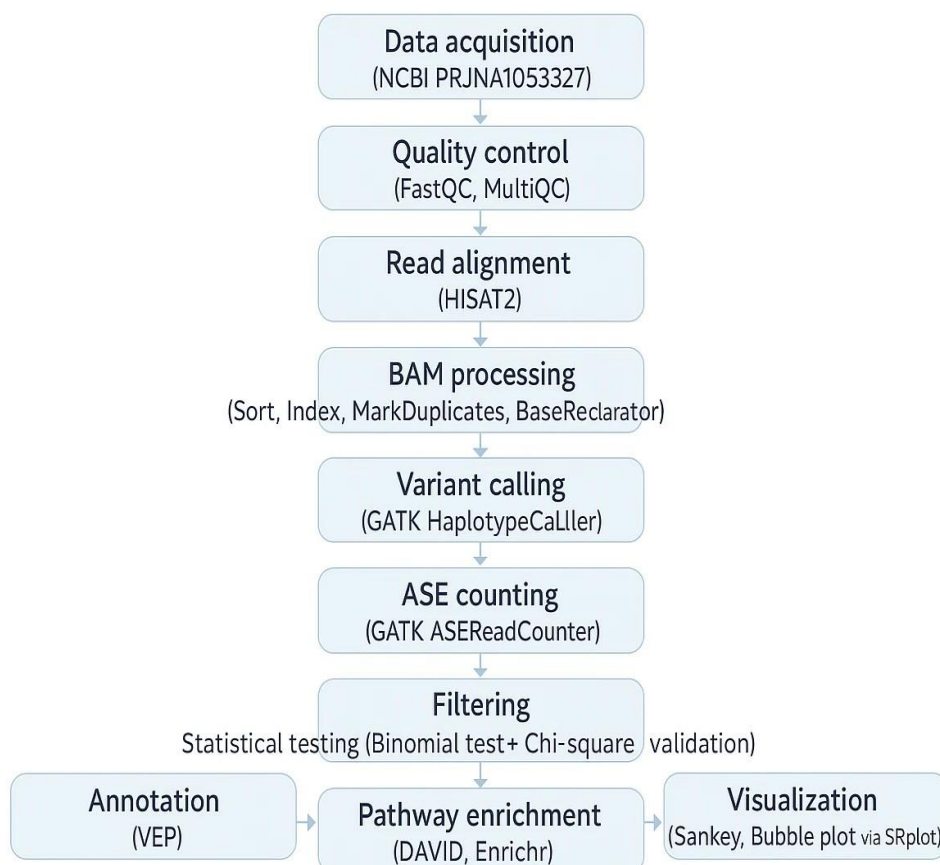
به‌منظور شناسایی بیان آلل اختصاصی، از ابزار ASEReadCounter موجود در بسته‌ی GATK نسخه ۵/۴/۰ استفاده شد. این ابزار تعداد خوانش‌های متناسب به هر آلل را در جایگاه‌های هتروزیگوت شمارش کرده و میزان عدم تعادل در بیان آلل‌ها را به‌صورت کمی گزارش می‌کند. در این مطالعه، تنها جایگاه‌هایی که دارای حداقل ۱۰ خوانش برای دست کم یکی از آلل‌ها بودند، برای تحلیل حفظ شدند. جهت ارزیابی معناداری عدم تعادل بیان، آزمون دوجمله‌ای (Binomial test) با فراوانی فرضی آللی ۰/۵ و سطح معنی‌داری ۵ درصد به کار گرفته شد که با استفاده از اسکریپت Python اجرا گردید. علاوه بر این، برای بررسی پایداری نتایج، آزمون کای‌اسکوئر نیز بر روی همان جایگاه‌ها اعمال شد و هماهنگی معنی‌دار نتایج میان دو آزمون تأیید گردید. پس از انتخاب SNPهای دارای بیان آلل اختصاصی معنی‌دار، داده‌ها برای هر دو بافت چربی داخل عضلانی (IMF) و چربی زیرجلدی (SCAT) استخراج و تحلیل شدند.

حاشیه‌نویسی ژن‌ها و واریانت‌های دارای بیان آلل اختصاصی (ASE)

فرآیند حاشیه‌نویسی واریانت‌های دارای بیان آلل اختصاصی با استفاده از ابزار Variant Effect Predictor (VEP) انجام شد. در این مرحله، فایل واریانت‌های حاصل از فراخوانی (VCF) به‌عنوان ورودی به نرم‌افزار داده شد تا موقعیت ژنومی، اثر احتمالی و نوع هر واریانت بر اساس ژنوم مرجع (Bos taurus ARS UCD2.0) تعیین شود. پایگاه داده‌ی ترانسکریپت Ensembl برای تطبیق ژن‌ها و ایزوفرم‌های معتبر استفاده شد و تنها واریانت‌های واقع در ناحیه‌های رونویسی شده وارد تحلیل شدند. در ادامه، ویژگی‌های عملکردی هر واریانت از جمله موقعیت در اگزون یا اینترون، نوع تغییر (missense، synonymous یا nonsense)، و اثرات احتمالی بر ساختار پروتئین استخراج گردید.

تحلیل عملکردی ژن‌های ASE

برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن‌های دارای بیان آلل اختصاصی، از دو رویکرد مکمل استفاده شد. ابتدا تحلیل هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology Analysis) با بهره‌گیری از بستر DAVID انجام شد تا دسته‌های عملکردی، مولکولی و سلولی مرتبط با ژن‌های حاصل از حاشیه‌نویسی VEP شناسایی شوند. در این مرحله، گونه‌ی مورد مطالعه *Bos taurus* انتخاب شد و داده‌های مربوط به طبقات عملکردی ژن (GO terms) استخراج گردید. سپس تحلیل غنی‌سازی مسیر (Pathway Enrichment Analysis) به‌منظور شناسایی مسیرهای زیستی و متابولیکی مرتبط با ژن‌های ASE توسط ابزار Enrichr اجرا شد. این تحلیل برای دو گروه بافت چربی زیرجلدی (SCAT) و داخل عضلانی (IMF) انجام گرفت تا تفاوت‌های اختصاصی مسیرهای بیولوژیکی بین آن‌ها بررسی گردد. معناداری آماری هر مسیر با استفاده از آزمون دقیق فیشر در آستانه‌ی $P\text{-value} < 0.05$ تعیین شد و فقط مسیرهای معنی‌دار برای تحلیل و تجسم بعدی در نظر گرفته شدند. نتایج از طریق نمودار ترکیبی Sankey و نمودار Bubble یا نقطه‌ای ایجاد شد و با استفاده از SRplot تجسم شدند. فلوجارت روند کلی مراحل پردازش داده‌های RNA-Seq، فراخوانی واریانت‌ها و تحلیل بیان آلل اختصاصی در این پژوهش در شکل ۱ به صورت خلاصه ارائه شده است.



شکل ۱. نمای شماتیک از پایلین بیوانفورماتیکی مورد استفاده برای پردازش داده‌های RNA-Seq و تحلیل ASE

Figure 1. Schematic view of the bioinformatics pipeline used for RNA-Seq data processing and ASE analysis.

نتایج

آمار توالی‌یابی و هم‌ترازی خوانش‌ها

در این مطالعه، حدود ۲۸۰ میلیارد خوانش جفت‌شده با پلتفرم Illumina HiSeq 2500 برای هشت نمونه بافت چربی زیرجلدی (SCAT) و چربی داخل عضلانی (IMF) تولید شدند. کیفیت خوانش‌ها پس از ارزیابی با FastQC و MultiQC در سطح مطلوب قرار داشت (میانگین $Phred > 30$). نرخ هم‌ترازی با استفاده از HISAT2 نسبت به ژنوم مرجع *Bos taurus ARS UCD2.0* به طور میانگین ۹۵/۹ درصد بود که نشان‌دهنده دقت بالا در نقشه‌برداری داده‌ها است (جدول ۱).

جدول ۱. درصد نقشه‌یابی ۴ نمونه چربی عضلانی و ۴ نمونه زیرجلدی بر روی ژنوم مرجع گاو

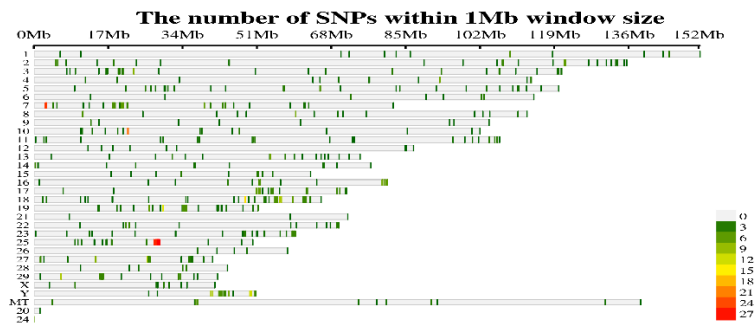
Table 1. Mapping percentage of 4 muscle fat samples and 4 subcutaneous fat samples on the bovine reference genome

نرخ هم‌ترازی (درصد)	نام نمونه	ردیف
96.3	SRR27227895 (زیرجلدی)	1
95.4	SRR27227899 (زیرجلدی)	2
96.6	SRR27227902 (زیرجلدی)	3
96.2	SRR27227905 (زیرجلدی)	4
94.4	SRR27227897 (داخل عضلانی)	5
96.4	SRR27227898 (داخل عضلانی)	6
95.9	SRR27227901 (داخل عضلانی)	7
96.5	SRR27227904 (داخل عضلانی)	8

فراخوانی واریانت‌ها و شناسایی SNP های دارای ASE

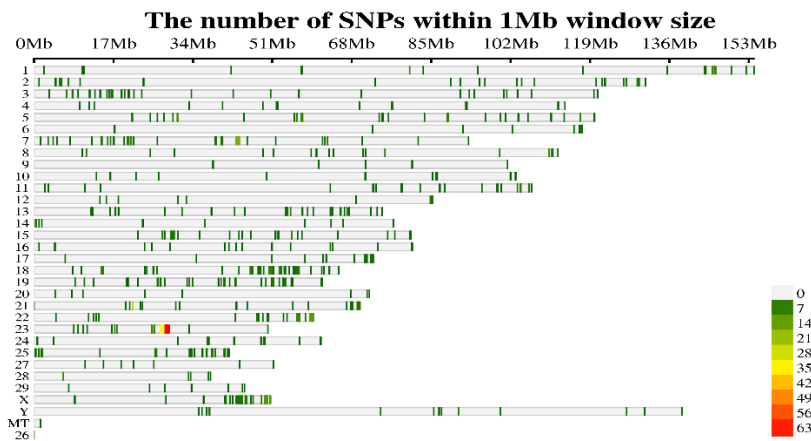
با استفاده از ابزار GATK HaplotypeCaller، در مجموع 582,999 جایگاه SNP در بافت داخل عضلانی شناسایی شدند. پس از فیلترهای کیفی و بررسی با ASEReadCounter، از این تعداد 214,613 SNP دارای ویژگی بیان آلل اختصاصی بودند.

آزمون دوجمله‌ای ($P < 0.05$; Binomial test، نسبت ۰/۵) منجر به انتخاب 890 SNP معنی‌دار در بافت چربی داخل عضلانی و 1094 SNP معنی‌دار در بافت چربی زیرجلدی شد. توزیع مکان‌یابی واریانت‌های هتروزیگوت با عملکرد ASE بر روی کروموزوم‌های گاو در شکل ۱ و ۲ نمایش داده شده است و الگوی پراکنده، اما متناظر را میان دو بافت نشان می‌دهد.



شکل ۱. توزیع SNP های هتروزیگوت معنی‌دار در سراسر کروموزوم‌ها برای بافت چربی داخل عضلانی

Figure 2. Distribution of significant heterozygous SNPs across chromosomes for intramuscular adipose tissue



شکل ۲. توزیع SNP های هتروزیگوت معنی‌دار در سراسر کروموزوم‌ها برای بافت چربی زیرجلدی

Figure 3. Distribution of significant heterozygous SNPs across chromosomes for subcutaneous adipose tissue

جدول ۲. واریانت‌ها و SNP های با بیان آلل اختصاصی (ASE) شناسایی شده در نمونه‌های بافت چربی داخل عضلانی (IMF) و زیرجلدی (SCAT)

Table 2. Variants and SNPs with allele-specific expression (ASE) identified in intramuscular (IMF) and subcutaneous adipose tissue (SCAT) samples

ردیف	نام نمونه	همه واریانت‌ها	کل SNP های شناسایی شده	تعداد SNP ها بعد از فیلتر	تعداد SNP های ASE
1	SRR27227897 (داخل عضلانی)	232380	157599	156794	56345
2	SRR27227898 (داخل عضلانی)	165942	107958	107404	36291
3	SRR27227901 (داخل عضلانی)	217384	154141	153363	58851
4	SRR27227904 (داخل عضلانی)	238840	163301	162406	63126
5	SRR27227895 (زیرجلدی)	260013	189585	188466	75061
6	SRR27227899 (زیرجلدی)	327582	241055	239816	94412
7	SRR27227902 (زیرجلدی)	254142	175185	174364	68682
8	SRR27227905 (زیرجلدی)	243812	169039	168225	67841

حاشیه‌نویسی و شناسایی ژن‌های دارای بیان آل اختصاصی

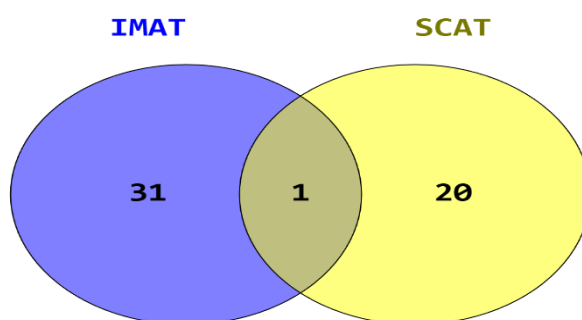
واریانتهای معنی‌دار بیان آل اختصاصی مورد حاشیه‌نویسی قرار گرفتند. در این مرحله تنها واریانتهایی بررسی شدند که در نواحی رونویسی شده قرار داشتند تا ارتباط مستقیم آن‌ها با بیان ژن‌ها مشخص گردد. نتایج حاشیه‌نویسی منجر به شناسایی ۳۲ ژن دارای بیان آل اختصاصی در بافت چربی داخل عضلانی (IMF) و ۲۱ ژن در بافت چربی زیرجلدی (SCAT) شد (جدول ۳).

جدول ۳. لیست ژن‌های شناسایی شده برای بافت چربی زیرجلدی و داخل عضلانی

Table 3. List of genes identified for subcutaneous and intramuscular adipose tissue

ردیف	گروه‌های مورد مقایسه	لیست ژن‌های دارای بیان اختصاصی شناسایی شده
1	بافت چربی داخل عضلانی	TLNRD1, FHIT, SUGCT, SYNE1, COL18A1, BBS4, RMDN2, LHFPL6, MLLT10, XKR4, COQ5, NTRK3, GSG1L, SORCS3, SCART1, GABPA, ATP5PF, NTN1, PPP2R5C, DLG2, GRIK3, FXR1, HRH2, RB1, CUL2, PMP2, CCDC102B, TVP23A, NOLC1, SGCZ, CTNNA3, GALNTL6.
2	بافت چربی زیر جلدی	IFNGR2, ZNF623, MAPK15, NR3C2, MAGI2, WWC1, CDC14B, IFNAR1, SV2C, SLC9A2, ANKFN1, ENC1, ULK4, BAZ1B, SUGCT, TNFSF10, ANKEF1, TG, SLA, UNC13A, HBS1L.

مقایسه‌ی دو گروه نشان داد که تنها ژن SUGCT میان هر دو نوع بافت مشترک است (شکل ۳). این ژن کدکننده‌ی آنزیمی میتوکندریایی است که در مسیر کاتابولیسم تریپتوفان و لیزین با تبدیل گلوکاتارات به گلوکاتاریل CoA نقش دارد و در عین حال در تنظیم هموستازی انرژی سلولی و تعادل لیپید نیز مشارکت دارد (Niska-Blakie *et al.*, 2020)؛ عاملی که می‌تواند بیانگر نقش سازگاری متابولیکی این ژن در عملکرد هر دو نوع بافت چربی باشد.



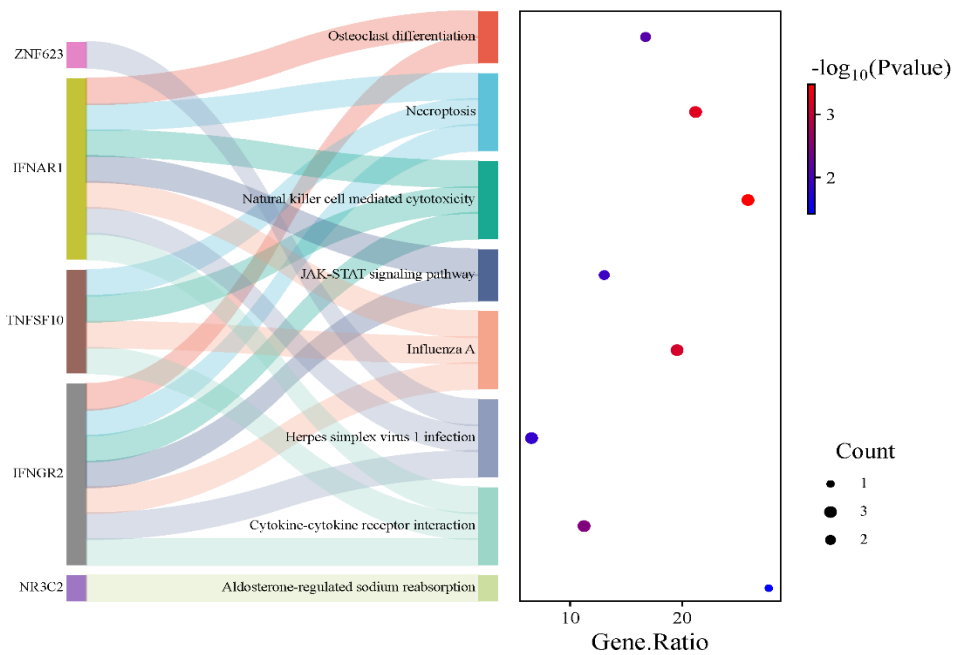
شکل ۳. نمودار ون مقایسه‌ی ژن‌های شناسایی شده در بافت‌های چربی داخل عضلانی و زیرجلدی

Figure 3. Venn diagram comparing genes identified in intramuscular and subcutaneous adipose tissues

تحلیل عملکردی و غنی‌سازی مسیرهای زیستی

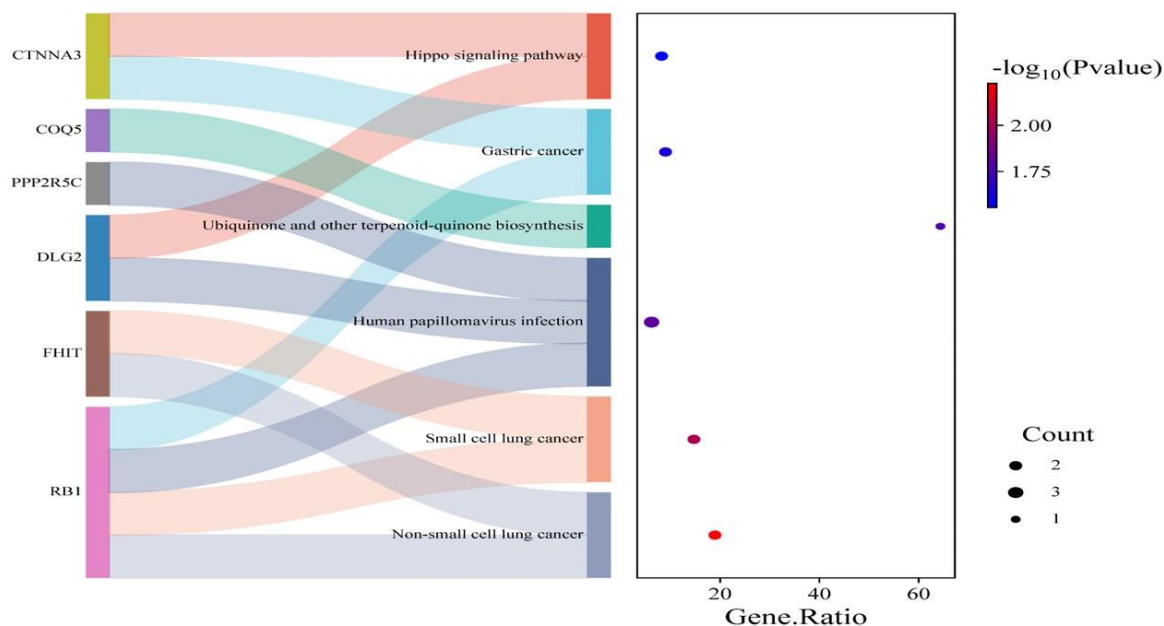
بر اساس نتایج حاصل از تحلیل عملکردی و غنی‌سازی مسیرهای زیستی (شکل ۴ و ۵)، الگوهای متفاوتی از مسیرهای مولکولی در دو نوع بافت چربی زیرجلدی (SCAT) و چربی داخل عضلانی (IMF) مشاهده شد که بیانگر تفاوت بنیادی در نقش فیزیولوژیک این بافت‌ها است. در بافت چربی زیرجلدی، مسیرهای غالب با فرآیندهای ایمنی و دفاع سلولی مرتبط بودند؛ از جمله مسیرهای JAK-STAT signaling و Necroptosis که در تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارند. حضور ژن IFNAR1 در بخش عمده‌ای از این مسیرها نشان‌دهنده‌ی فعال شدن محور اینترفرونی در سلول‌های چربی بوده و احتمالاً با کنترل ایمنی، وزن بدن و تنظیم تحمل گلوکز در ارتباط است. این یافته‌ها حاکی از آن است که چربی زیرجلدی در گاو بیشتر عملکردی محافظتی و

ایمونولوژیک دارد. در مقابل، در چربی داخل عضلانی مسیرهای غالب شامل Ubiquinone and other و pathway terpenoid-quinone biosynthesis بودند که به فرآیندهای متابولیسم انرژی و رشد سلولی مربوط هستند. حضور ژن RB1 در این مسیرها نقش کلیدی در تنظیم چرخه سلولی و تمایز آدیپوسیت‌ها دارد؛ به گونه‌ای که کاهش بیان آن می‌تواند ظرفیت تجمع چربی را محدود سازد. مسیر یوبی‌کینون بیانگر افزایش فعالیت میتوکندری و متابولیسم اکسیداتیو است که در چربی داخل عضلانی موجب مصرف بیشتر انرژی و کاهش ذخیره‌ی لیپید می‌شود. به طور کلی، نتایج تجزیه و تحلیل شکل‌های ۴ و ۵ نشان می‌دهد که بافت چربی زیرجلدی بیشتر درگیر مسیرهای ایمنی التهابی و حفاظت بافتی است، در حالی که چربی داخل عضلانی در مسیرهای متابولیکی و انرژی‌زا فعال‌تر است. این تمایز عملکردی می‌تواند یکی از عوامل کلیدی در تفاوت ترکیب اسیدهای چرب، حساسیت انسولینی و کیفیت گوشت بین مناطق مختلف چربی گاو باشد.



شکل ۴. ارتباط بین ژن‌ها و مسیرهای زیستی برای بافت چربی زیرجلدی

Figure 4. Relationship between genes and biological pathways for subcutaneous adipose tissue



شکل ۵. ارتباط بین ژن‌ها و مسیرهای زیستی برای بافت چربی داخل عضلانی

Figure 5. Relationship between genes and biological pathways for intramuscular adipose tissue

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان آل اختصاصی (ASE) به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم تنظیم ژنتیکی، در شکل‌گیری صفات پیچیده و ایجاد تنوع فنوتیپی میان موجودات نقش اساسی دارد. در سال‌های اخیر، گسترش داده‌های حاصل از RNA-Seq در افراد متعدد و انواع بافت‌ها، امکان بررسی دقیق‌تری از سهم تنوع ژنتیکی در ایجاد عدم تعادل آلی در بیان ژن فراهم کرده است (Cleary and Seoighe, 2021). یافته‌های مطالعه حاضر نیز بر وجود اختلافات ویژه بافت در ترانسکریپتوم و عملکرد سلول‌های چربی داخل عضلانی و زیرجلدی تأکید دارد. در این میان، غنی‌شدگی مسیر Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis در بافت چربی داخل عضلانی قابل توجه است. این مسیر که با تولید یوبی‌کینون (CoQ) مرتبط است، نقش محوری در عملکرد زنجیره انتقال الکترون و افزایش فعالیت میتوکندریایی و متابولیسم اکسیداتیو دارد. افزایش بیان ژن‌های مربوط به این مسیر در چربی داخل عضلانی می‌تواند بازتابی از مصرف انرژی بیشتر برای حفظ عملکرد عضلانی باشد؛ فرآیندی که اغلب با کاهش لیپوژنز و کاهش تمایل به ذخیره‌سازی لیپید همراه است. بنابراین، این مسیر احتمالاً یکی از عوامل محدودکننده در تشکیل ماربلینگ و رسوب چربی داخل عضلانی محسوب می‌شود (Agrawal et al., 2017). یوبی‌کینون (کوآنزیم Q) به‌عنوان یک مولکول کلیدی در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری عمل می‌کند و انتقال الکترون از کمپلکس‌های I و II به کمپلکس III را تسهیل می‌کند؛ فرآیندی که برای تولید ATP در مسیر فسفوریلاسیون اکسیداتیو ضروری است. افزایش سطح یوبی‌کینون می‌تواند کارایی انتقال الکترون را بهبود بخشد و در نتیجه موجب افزایش تولید ATP شود. کارآمدتر شدن متابولیسم انرژی، به‌طور بالقوه نیاز سلول به ذخیره انرژی در قالب چربی را کاهش می‌دهد (Gvozdzáková et al., 2020). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در بیوسنتز یوبی‌کینون می‌تواند بر بافت چربی سفید اثر بگذارد. به‌طور خاص، تیمار با بتا-رزورسیلیک اسید (β -RA) که موجب کاهش یک متابولیت میانی در مسیر کوآنزیم Q می‌شود، اندازه و مقدار بافت چربی سفید را در موش‌ها کاهش می‌دهد. این اثر با مهار آدیپوژنز و تغییرات متابولیکی میتوکندری مرتبط است. این شواهد بر اهمیت تنظیم مسیر یوبی‌کینون در متابولیسم چربی تأکید می‌کند (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2021). مسیر سیگنالینگ Hippo یک تنظیم‌کننده حیاتی هموستازی انرژی و تمایز آدیپوسیت‌ها است که بر تکثیر سلولی، آپوپتوز و حفظ کلی بافت تأثیر می‌گذارد (Wang et al., 2015). مسیر هیپو نقش مهمی در انعطاف‌پذیری آدیپوسیت‌ها و ایجاد فیروز بافت چربی دارد. مهار این مسیر در چاقی باعث تضعیف هویت آدیپوسیت و افزایش بازسازی ماتریکس خارج‌سلولی می‌شود. همچنین، آدیپوسیت‌های فاقد Lats1/2 می‌توانند تمایززدایی شده و پس از

تحریک TGFβ به میوفیبروبلاست تبدیل شوند. فاکتورهای YAP و TAZ نیز با پایدار کردن SMAD2، پاسخ‌های فیبروتیک را تقویت می‌کنند. در مجموع، مهار YAP/TAZ در مدل‌های چاقی می‌تواند فیروز چربی را کاهش داده و وضعیت متابولیک را بهبود بخشد (Shen et al., 2022). مسیر JAK-STAT یک مسیر سیگنالینگ حفاظت‌شده تکاملی است که توسط تحریک سیتوکین فعال می‌شود و سیگنال‌های خارج سلولی را قادر می‌سازد تا از طریق غشای سلولی به هسته منتقل شوند و باعث ایجاد تغییراتی در رونویسی DNA شوند. سیگنالینگ JAK-STAT عملکردهای سلولی متنوعی از جمله تکثیر، مهاجرت، تمایز و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. نکته مهم این است که سیگنالینگ JAK-STAT همچنین نقش تنظیمی مهمی در عملکرد سیستم ایمنی دارد (Xue et al., 2023). مسیر نکروز نوعی نکروز برنامه‌ریزی‌شده است که می‌تواند توسط فاکتور نکروز تومور (TNF) ایجاد شود و ارتباط نزدیکی با پاسخ‌های ایمنی و آپوپتوز دارد (Koehler et al., 2024). TNF-α مسیرهای مرگ سلولی را تحریک می‌کند. سیتوکین‌های التهابی، از جمله TNF-α، مسیرهای مرگ سلولی مرتبط با میتوکندری را در سلول‌های چربی، مانند آپوپتوز و نکروز، فعال می‌کنند (Hertzel et al., 2022).

همچنین شواهد پیشین نشان می‌دهند که چربی زیرجلدی در مقایسه با چربی داخل عضلانی دارای پتانسیل بالاتری برای تجمع لیپید است؛ موضوعی که در گاوهای گوشتی و شیری نیز تأیید شده است (Chakrabarty and Romans, 1972). این تفاوت‌های بافتی، اهمیت بررسی الگوهای ASE را در درک سازوکارهای مولکولی مؤثر بر رسوب چربی و کیفیت گوشت دوچندان می‌کند.

در بافت چربی زیرجلدی، ژن IFNAR1 در تعداد قابل توجهی از مسیرهای زیستی شناسایی شد (شکل ۴) که این موضوع بر نقش چند بعدی آن در تنظیم عملکرد سلولی تأکید دارد. پالمیتویلاسیون زیر واحد IFNAR1 برای فعال‌سازی صحیح مسیر JAK/STAT پس از تحریک با اینترفرون α ضروری است و اختلال در این فرایند می‌تواند پاسخ ژنی وابسته به اینترفرون را مختل کند (Claudinon et al., 2009). از سوی دیگر، شواهد جدید نشان می‌دهند که سیگنال‌دهی نوع I اینترفرون‌ها در آدیپوسیت‌ها و بافت چربی نقش فراتر از پاسخ ایمنی داشته و می‌تواند در تنظیم متابولیسم، کنترل وزن بدن و بهبود یا تضعیف تحمل گلوکز نقش آفرینی کند (Adolph et al., 2017). بر این اساس، تغییرات در بیان IFNAR1 یا اختلال در فرایند پالمیتویلاسیون آن ممکن است در بافت چربی زیرجلدی گاو تأثیرگذار باشد و به‌طور هم‌زمان مسیرهای ایمنی-التهابی و متابولیک را تحت تأثیر قرار دهد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که ژن RB1 (Retinoblastoma) در بافت چربی داخل عضلانی بیش از سایر ژن‌ها در مسیرهای مرتبط با تمایز و عملکرد آدیپوسیت‌ها درگیر است (شکل ۵). RB1 که به‌عنوان یک سرکوب‌گر تومور کلاسیک شناخته می‌شود، علاوه بر نقش شناخته شده‌اش در تنظیم چرخه سلولی، در فرآیند آدیپوژنز نیز عملکرد کلیدی دارد. در بافت چربی، RB1 با فعال‌سازی ترانس‌اکتیپتورهای C/EBP و PPARγ موجب تحریک بیان ژن‌های آدیپوژنیک و افزایش ظرفیت ذخیره‌سازی لیپید می‌شود. شواهد پیشین نشان داده‌اند که کاهش بیان RB1 می‌تواند منجر به اختلال در تمایز سلول‌های پیش‌چربی شده و در نهایت کاهش توانایی سلول‌ها برای انباشت چربی را به‌همراه داشته باشد (Moreno-Navarrete et al., 2013). از سوی دیگر، گزارش شده است که سلول‌های چربی داخل عضلانی در گاوهای بالغ اندازه کوچک‌تری نسبت به سلول‌های چربی زیرجلدی دارند که این موضوع نشان‌دهنده رشد کندتر یا بلوغ کمتر این سلول‌ها است (Tan et al., 2025). هم‌زمانی این الگو با نقش تنظیمی RB1 می‌تواند توضیح‌دهنده حساسیت بیشتر بافت چربی داخل عضلانی به تغییرات ژنتیکی در مسیرهای آدیپوژنز باشد و احتمالاً یکی از عوامل مؤثر بر تفاوت در ظرفیت ذخیره لیپید و تشکیل ماربلینگ بین این دو بافت محسوب می‌شود.

تحلیل مقایسه‌ای ژن‌های شناسایی‌شده نشان داد که تنها ژن مشترک میان دو بافت SUGCT است. این ژن که کدکننده آنزیم گلو تاریل CoA- ترانسفراز می‌باشد، در مسیرهای متابولیکی مربوط به تریپتوفان و لیزین نقش ایفا می‌کند و از طریق تنظیم سطح گلو تارات، در حفظ هموستازی انرژی سلولی و تنظیم متابولیسم لیپید مؤثر است. شواهد پژوهشی نشان داده‌اند که SUGCT در متابولیسم اسیدهای چرب و تعادل انرژی سلولی نقش کلیدی دارد. برای مثال، گزارش شده است که حذف SUGCT در مدل موش موجب بروز اختلال در متابولیسم لیپید و آسید کاربنتین در کلیه، تغییر ترکیب میکروبیوم روده و ظهور یک فنوتیپ مشابه چاقی می‌شود که با تجمع لیپید در کلیه و کبد مشخص می‌گردد. اگرچه فعالیت آنزیمی مستقیم SUGCT بر روی گلو تارات متمرکز

است، اما اثرات مشاهده شده بر متابولیسم لیپید و ترکیبات آسید کربنیتی، نشان‌دهنده نقش گسترده‌تر این ژن در مسیرهای تنظیم انرژی سلولی است (Niska-Blakie *et al.*, 2020).

در مطالعه حاضر، ژن‌های XKR4 و COL18A1 در بافت چربی داخل‌عضلانی و ژن MAPK15 در بافت چربی زیرجلدی به‌عنوان ژن‌های دارای بیان آلل اختصاصی شناسایی شدند که ارتباط مستقیم با تجمع چربی و فرایندهای مرتبط با متابولیسم لیپید داشتند. گزارش‌های GWAS در گاو، ارتباط‌های ژنتیکی نزدیک به XKR4 را با صفاتی مانند ضخامت چربی یا مصرف خوراک/رشد ذکر کرده‌اند؛ همچنین گزارش شده است که این ژن با ضخامت چربی گلوئال و چربی پشت مرتبط است (de Las Heras-Saldana *et al.*, 2019). ظهور ASE در این ژن در چربی داخل‌عضلانی می‌تواند نمایانگر یک مکانیزم تنظیمی باشد که بر توزیع لیپیدی در عضله اثر می‌گذارد، یعنی جهتی که از راه تنظیم بیان آللی موجب تفاوت‌های فنوتیپی ماربلینگ می‌شود. شواهد مولکولی نشان می‌دهد ایزوفرم‌های کلاژن XVIII می‌توانند بر تعداد آدیپوسیت و انباشت چربی تأثیر بگذارند. ASE در COL18A1 در چربی داخل‌عضلانی نویددهنده تغییرات در محیط ECM (extracellular matrix) محلی است که می‌تواند تمایز و بقا/مرگ سلولی آدیپوسیت‌های داخل‌عضله را تعدیل کند و در نتیجه بر الگوی توزیع چربی داخل‌عضلانی اثر بگذارد (Aikio *et al.*, 2014). ERK7 (MAPK15) یک کیناز غیرمعمول است و نقش بازدارنده در انباشت لیپید دارد. هنگامی که ERK7 حذف شود، میزان تری‌گلیسیرید در بافت چربی افزایش می‌یابد و قطرات چربی بیشتری تشکیل می‌شوند. این بدان معناست که MAPK15 می‌تواند به‌عنوان یک کنترل‌کننده منفی ذخیره چربی عمل کند، یعنی در شرایط عادی، فعالیت ERK7 جلوی تجمع بیش از حد لیپید در سلول‌های چربی را می‌گیرد، که برای هموستازی انرژی مهم است (Hasygar *et al.*, 2021). در بافت چربی زیرجلدی گاو تحلیل غنی‌سازی در رده‌ی Cellular Component نشان داد که بیشترین تجمع ژن‌ها در بخش‌های سیتوپلاسم (cytoplasm) و غشای وزیکول‌های سیناپسی (synaptic vesicle membrane) مشاهده می‌شود (Ashburner *et al.*, 2000).

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیان آلل اختصاصی نقش مهمی در تفاوت‌های مولکولی میان بافت‌های چربی داخل‌عضلانی و زیرجلدی گاو دارد و می‌تواند عامل تعیین‌کننده‌ای در الگوهای متابولیکی و کیفیت گوشت باشد. تحلیل‌های ژنومی و مسیرهای زیستی نشان دادند که چربی زیرجلدی عمدتاً تحت تأثیر مسیرهای ایمنی و التهابی قرار دارد، در حالی که چربی داخل‌عضلانی بیشتر با مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی و فعالیت میتوکندریایی درگیر است. شناسایی ژن‌های کلیدی مانند RB1، IFNAR1 و ژن مشترک SUGCT بیانگر وجود مکانیسم‌های تنظیمی متمایز در هر دو بافت است که بر ظرفیت ذخیره‌سازی لیپید و تمایز آدیپوسیت‌ها اثر می‌گذارند. تفاوت‌های مشاهده شده در الگوهای ASE می‌تواند منشأ بخشی از تنوع فنوتیپی مرتبط با ماربلینگ و کیفیت گوشت در گاوهای گوشتی باشد. به طور کلی، نتایج این مطالعه مسیرهای جدیدی را برای درک بهتر تنظیم ژنتیکی بافت‌های چربی و بهبود انتخاب ژنتیکی در صنعت گاو‌داری ارائه می‌کند.

REFERENCES

- Adolph, T., Wieser, V., Grander, C., Grabherr, F., Enrich, B., Moser, P., Moschen, A., Kaser, S., and Tilg, H.J.J.o.H. (2017). Adipose type I interferon signalling protects against metabolic dysfunction. *Journal of Hepatology* 1, S609.
- Agrawal, S., Jaswal, K., Shiver, A.L., Balecha, H., Patra, T., and Chaba, R. (2017). A genome-wide screen in *Escherichia coli* reveals that ubiquinone is a key antioxidant for metabolism of long-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 292, 20086-20099.
- Aikio, M., Elamaa, H., Vicente, D., Izzi, V., Kaur, I., Seppinen, L., Speedy, H.E., Kaminska, D., Kuusisto, S., Sormunen, R., et al. (2014). Specific collagen XVIII isoforms promote adipose tissue accrual via mechanisms determining adipocyte number and affect fat deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E3043-3052.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29.
- Chakrabarty, K., and Romans, J.R. (1972). Lipogenesis in the adipose cells of the bovine (*Bos taurus*) as related to their intramuscular fat content. *Comparative Biochemistry and Physiology* 41B, 603-615.
- Chamberlain, A.J., Vander Jagt, C.J., Hayes, B.J., Khansefid, M., Marett, L.C., Millen, C.A., Nguyen, T.T.T., and Goddard, M.E. (2015). Extensive variation between tissues in allele specific expression in an outbred mammal. *BMC Genomics* 16, 993.
- Claudinon, J., Gonnord, P., Beslard, E., Marchetti, M., Mitchell, K., Boularan, C., Johannes, L., Eid, P., and Lamaze, C. (2009). Palmitoylation of Interferon- β (IFN- β) Receptor Subunit IFNAR1 Is Required for the Activation of Stat1 and Stat2 by IFN- β . *Journal of Biological Chemistry* 284, 24328-24340.
- Cleary, S., and Seoighe, C. (2021). Perspectives on Allele-Specific Expression. *Annu Rev Biomed Data Sci* 4, 101-122.
- da Costa, A.S.H., Pires, V.M.R., Fontes, C.M.G.A., and Mestre Prates, J.A. (2013). Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef cattle breeds fed high or low silage diets. *BMC Veterinary Research* 9, 118.
- de Las Heras-Saldana, S., Clark, S.A., Duijvesteijn, N., Gondro, C., van der Werf, J.H.J., and Chen, Y. (2019). Combining information from genome-wide association and multi-tissue gene expression studies to elucidate factors underlying genetic variation for residual feed intake in Australian Angus cattle. *BMC Genomics* 20, 939.
- de Souza, M.M., Zerlotini, A., Rocha, M.I.P., Bruscadin, J.J., Diniz, W.J.d.S., Cardoso, T.F., Cesar, A.S.M., Afonso, J., Andrade, B.G.N., Mudadu, M.d.A., et al. (2020). Allele-specific expression is widespread in *Bos indicus* muscle and affects meat quality candidate genes. *Scientific Reports* 10, 10204.
- Green, M.M., Ford, H., Benitez, O.J., Woerner, D.R., Johnson, B.J., and Strieder-Barboza, C. (2025). PSV-5 Single-nucleus analysis of intramuscular fat reveals predominance of lipid associated macrophages in beef steers with high marbling. *Journal of Animal Science* 103, 397-398.
- Guillocheau, G.M., El Hou, A., Meersseman, C., Esquerré, D., Rebours, E., Letaief, R., Simao, M., Hypolite, N., Bourneuf, E., Bruneau, N., et al. (2019). Survey of allele specific expression in bovine muscle. *Scientific Reports* 9, 4297.
- Gvozdjáková, A., Kucharská, J., Kura, B., Vančová, O.g., Rausová, Z., Sumbalová, Z., Uličná, O.g., and Slezák, J. (2020). A new insight into the molecular hydrogen effect on coenzyme Q and mitochondrial function of rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 98, 29-34.
- Hasygar, K., Deniz, O., Liu, Y., Gullmets, J., Hynynen, R., Ruhanen, H., Kokki, K., Käkälä, R., and Hietakangas, V. (2021). Coordinated control of adiposity and growth by anti-anabolic kinase ERK7. *EMBO Reports* 22, e49602.

- Hertzel, A.V., Yong, J., Chen, X., and Bernlohr, D.A.J.E. (2022). Immune modulation of adipocyte mitochondrial metabolism. *Endocrinology* 163, bqac094.
- Hidalgo-Gutiérrez, A., Barriocanal-Casado, E., Díaz-Casado, M.E., González-García, P., Zenezini Chiozzi, R., Acuña-Castroviejo, D., and López, L.C. (2021). β -RA Targets Mitochondrial Metabolism and Adipogenesis, Leading to Therapeutic Benefits against CoQ Deficiency and Age-Related Overweight. *Biomedicines* 9, 112-125.
- Koehler, H., Titus, D., and Lawson, C. (2024). Cell-type dependence of necroptosis pathways triggered by viral infection. *The FEBS Journal* 291, 2388-2404.
- Mannen, H.J.A.S.J. (2011). Identification and utilization of genes associated with beef qualities. *Animal Science Journal* 82, 1-7.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., and Daly, M.J.G.r. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *20*, 1297-1303.
- Moreno-Navarrete, J.M., Petrov, P., Serrano, M., Ortega, F., García-Ruiz, E., Oliver, P., Ribot, J., Ricart, W., Palou, A., Bonet, M.L., *et al.* (2013). Decreased RB1 mRNA, Protein, and Activity Reflect Obesity-Induced Altered Adipogenic Capacity in Human Adipose Tissue. *Diabetes* 62, 1923-1931.
- Niska-Blakie, J., Gopinathan, L., Low, K.N., Kien, Y.L., Goh, C.M.F., Caldez, M.J., Pfeifferberger, E., Jones, O.S., Ong, C.B., Kurochkin, I.V., *et al.* (2020). Knockout of the non-essential gene SUGCT creates diet-linked, age-related microbiome disbalance with a diabetes-like metabolic syndrome phenotype. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77, 3423-3439.
- Pethick, D.W., Harper, G.S., Hocquette, J.-F., and Wang, Y.J.P.o.A.b.t.l. (2006). Marbling biology—what do we know about getting fat into muscle. *Proceedings of Australian beef—the leader*, 103-110.
- Roberts, S.L., Lancaster, P.A., DeSilva, U., Horn, G.W., and Krehbiel, C.R. (2015). Coordinated gene expression between skeletal muscle and intramuscular adipose tissue in growing beef cattle. *Journal of Animal Science* 93, 4302-4311.
- Rosen, Evan D., and Spiegelman, Bruce M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 156, 20-44.
- Shen, H., Huang, X., Zhao, Y., Wu, D., Xue, K., Yao, J., Wang, Y., Tang, N., and Qiu, Y. (2022). The Hippo pathway links adipocyte plasticity to adipose tissue fibrosis. *Nature Communications* 13, 6030.
- Tan, Z., and Jiang, H. (2024). Molecular and Cellular Mechanisms of Intramuscular Fat Development and Growth in Cattle. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 320-335.
- Tan, Z., Pokhrel, B., Zhou, Z., and Jiang, H. (2025). Transcriptome analysis unveils multiple reasons behind delayed and slower deposition of intramuscular fat compared to subcutaneous fat in cattle. *BMC Genomics* 26, 706.
- Taniguchi, M., Guan, L.L., Zhang, B., Dodson, M.V., Okine, E., and Moore, S.S. (2008). Gene expression patterns of bovine perimuscular preadipocytes during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 346-351.
- Tegeler, A.P., Ford, H.R., Fiallo-Diez, J.F., Michelotti, T.C., Johnson, B.J., Benitez, O.J., Woerner, D.R., and Strieder-Barboza, C. (2025). Transcriptome and Cellular Evidence of Depot-Specific Function in Beef Cattle Intramuscular, Subcutaneous, and Visceral Adipose Tissues. *Biology* 14.
- van Beek, D., Verdonschot, J., Derks, K., Brunner, H., de Kok, T.M., Arts, I.C., Heymans, S., Kutmon, M., and Adriaens, M.J.S.R. (2023). Allele-specific expression analysis for complex genetic phenotypes applied to a unique dilated cardiomyopathy cohort. *Scientific Reports* 13, 564.
- Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K.E., Gan, B., Johnson, R.L., and Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology* 17, 490-

499.

Xue, C., Yao, Q., Gu, X., Shi, Q., Yuan, X., Chu, Q., Bao, Z., Lu, J., and Li, L. (2023). Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8, 204.

Yu, H., Wang, J., Zhang, K., Cheng, G., Mei, C., and Zan, L. (2023). Integrated multi-omics analysis reveals variation in intramuscular fat among muscle locations of Qinchuan cattle. *BMC Genomics* 24, 367.