



بررسی بیان ژن و شبکه های ژنی مرتبط با آپوتوزیس در مرغان حساس و مقاوم به آسیت والدین جوجه گوشتی آرین با استفاده از RNA-seq

سعید صحرایی^۱، محمدرضا نصیری^{۲*}، علی جوادمنش^۳، رضا توحیدی^۴، اسماعیل ابراهیمی^۵

- ۱- دانشجوی دوره دکتری تخصصی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش و تحقیقات تربت جام
- ۵- دانشیار، گروه بیومدیکال مولکولی، دانشگاه آدلاید استرالیا

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۲۴)

چکیده

برنامه‌های به‌گزینی روی لاین آرین، بدون توجه به توسعه اندام‌های حیاتی بدن، از جمله قلب سبب شده که این لاین به یکی از لاین‌های بسیار حساس نسبت به سندروم آسیت شناخته شود. از این‌رو، این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌ها و شبکه‌های ژنی درگیر با آپوتوزیس قلبی در سلول‌های بافت قلب مرغان حساس و مقاوم به آسیت لاین آرین انجام شد. بدین منظور، دو نمونه حساس و دو نمونه مقاوم استخراج RNA و اطلاعات ترانسکریپتومی آنها با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید RNA-Seq بدست آمد. تعیین کیفیت داده و حذف آلودگی آن با استفاده از نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic صورت گرفت. همچنین تفریق بیان ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Cuffdiff و Cufflink امکان‌پذیر شد. ۲۰۰۳۴ ژن در مجموع نمونه‌ها مشاهده شدند که بعد از جداسازی ژن‌های با میزان بیان معنی‌دار نمونه‌های مقاوم نسبت به حساس، در مجموع ۲۹۱ ژن با ۶۶ مسیر زیستی مرتبط دانسته شدند، که در این میان، ۵۳ ژن در مسیر زیستی آپوتوزیس ارتباط معنی‌دار داشتند. بررسی فرآیندهای زیستی هستی‌شناسی ژن‌های معنی‌دار در نمونه‌های مقاوم به آسیت برای مسیر زیستی آپوتوزیس نشان دادند که مسیرهای تنظیم فرآیند سلولی و تنظیم منفی آپوتوزیس به طور معنی‌داری تحت تاثیر آسیت قرار دارند ($FDR < 0.01$). شبکه ژنی ترسیم شده نشان داد که ژن‌های *MAD2L1* و *CDK1* دارای بیشترین ارتباط ژنی در شبکه ژنی هستند. بنابراین اصلاح نژاد مبتنی بر این ژن‌ها و طراحی دارو ممکن است در کنترل آپوتوزیس ناشی از سندروم آسیت موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوتوزیس، بیان ژن، سندروم آسیت، مرغ آرین، RNA-Seq

* نویسنده مسئول: nassiry@um.ac.ir

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از راه این کشور تاریخی بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن پنجم قبل از میلاد تا تقریباً قرن هفتم میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی، ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از راه خشکی و هم از راه دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را آسان کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi *et al.*, 2010). بر اساس تحقیقات انجام شده، استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد (Mohammadabadi *et al.*, 2010). از طرفی لاین‌های مرغ آرین ایران که از شرکت طيور هیبرو هلند خریداری شدند توانستند از سال ۸۷ تا سال ۹۲ نزدیک به یک میلیارد و یکصد میلیون جوجه یکروزه تولید نمایند. وجود مشکلاتی همچون ضریب تبدیل غذایی و وزن بازاری پایین، میزان مرگ‌ومیر بالاتر از حد استاندارد به علت بروز عارضه آسیت^۱ سبب شده که لاین آرین بازارپسندی مناسبی نداشته باشد. میزان بروز آسیت در این سویه بیش از ۱۰ درصد گزارش شده که با رعایت نکردن اصول مدیریتی، درصد مرگ و میر افزایش می‌یابد (Azizian *et al.*, 2013; Hassanpour *et al.*, 2014). بررسی‌ها در سویه‌های تجاری دیگر نشان می‌دهد که مرگ و میر به دلیل آسیت کمتر از ۸ درصد کل مرگ و میر است (Dominguez-Avila *et al.*, 2013).

در بروز سندروم آسیت عوامل متعددی از قبیل عوامل ژنتیکی، تغذیه‌ای و محیطی از عوامل مستعدکننده پرندگان به آسیت هستند. آناتومی و فیزیولوژی سیستم تنفسی

پرندگان در ابتلاء جوجه‌های گوشتی به سندرم افزایش فشار ریوی (PHS^۲) و آسیت مهم است. حجم ریه و قلب کوچک در مقایسه با وزن بدن و سینه بزرگ و سنگین، سبب ایجاد فشار محتویات شکم روی کیسه‌های هوایی شده و در نتیجه آسیت در پرندگان افزایش می‌یابد (Hassanpour *et al.*, 2011). هر عاملی که سبب افزایش فعالیت متابولیکی پرندگان شود نیاز به اکسیژن را بالا می‌برد که سبب افزایش فشار ریوی می‌شود که آسیب‌های فیزیولوژیکی از جمله نارسایی سمت راست قلب، بطن راست قلب، نارسایی دریچه بطن راست، احتقان سیاهرگ مرکزی، احتقان غیر فعال کبدی و سرانجام تجمع مایعات سرورزی در حفره صفاقی و پریکاردیوم را در پی دارد (Hassanpour *et al.*, 2011). بررسی‌های ترنسکریپتومی نشان داده که ژن‌های دخیل در مسیرهای مرتبط با اکسیداسیون و احیا، سوخت و ساز چربی و کربوهیدرات، پاسخ ایمنی، انتقال سیگنال، آپیتوز و تمایز سلول گلبول قرمز در پرندگان آسیتی، نسبت به پرندگان سالم، به شکل متفاوتی بیان می‌شود (Wang *et al.*, 2013). اگرچه مکانیسم دقیق بروز این سندروم در پرندگان هنوز شناخته شده نیست، اما به نظر می‌رسد که نقص ژنتیکی لاین آرین و عدم اصلاح ژنتیکی آن نسبت به صفات مرتبط با زنده‌مانی در گذشته، عامل اصلی بالا بودن سندروم آسیت در آن باشد. از طرفی با توجه به اینکه آسیت در انتهای دوره و در پرندگان درشت بیشتر شیوع پیدا می‌کند، لذا ضرر اقتصادی بسیار زیادی برای پرورش‌دهنده در پی دارد (Hassanpour *et al.*, 2014).

یکی از نشانه‌های آسیت، مرگ سلول‌های قلبی است که به آن آپیتوزیس^۳ می‌گویند. آپیتوزیس یا مرگ از پیش طراحی شده یک فرآیند ویژه است که نقش مهمی در حفظ تکثیر سلولی و هموستازی بدن ایفا می‌کند (Jacobson *et al.*, 1997). مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده برای افزایش تعداد و تکثیر سلول از راه حفظ حالت هموستاز ضروری است، ولی در حالتی ممکن است این توازن تغییر کند و نتیجه معکوس و اثر مخرب و مضر داشته باشد (Chester *et al.*, 1998; Laytragoon-Lewin, 1999). ژن‌های تنظیم‌کننده

2. Pulmonary Hypertension Syndrome (PHS)
3. Apoptosis

1. Ascites syndrome

تکنیک توالی‌یابی نسل جدید فراهم شده و اطلاعات دقیقی از رونوشت‌های سلولی، حتی آن دسته از رونوشت‌هایی که نیمه عمر کوتاهی دارند و یا سطح بیان آنها در سلول بسیار پایین است، را تهیه می‌کند (Wilhelm et al., 2008). این داده‌ها به طور گسترده در مطالعات مختلفی جهت شناسایی ژن‌ها و رونوشت‌های جدید، شناسایی جهش‌ها، بررسی تفاوت بیان در ژن‌ها و بررسی شبکه ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگر چه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (Zandi et al., 2014; Mohammadifar et al., 2011; Moazeni et al., 2016a; Moazeni et al., 2016b)، اما تاکنون بیان ژن‌ها و شبکه ژنی مرتبط با مرگ سلولی و آپتوزیس مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، در این مطالعه، با بررسی بیان ژن‌ها و شبکه ژنی مرتبط با مرگ سلولی و آپتوزیس در جوجه‌های گوشتی لاین آرین در دو تیمار درگیر با بیماری و سالم، ژن‌ها و چرخه‌های زیستی مرتبط با بیماری شناسایی و گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

پرورش طیور و نمونه‌گیری: تمام مراحل دوره پرورش در مرکز تحقیقات کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. تعداد ۱۴۵۸ قطعه جوجه از ۶۷ خانواده ناتنی پدری^۱ از خط B لاین آرین (که در آن آسیت شایع‌تر است) در روز اول انتخاب و شماره‌گذاری شدند. این جوجه‌ها نتاج ۶۷ خروس و تعداد ۵۰۱ مرغ بودند که در نسل‌های قبل نیز تعداد ۴۳۴۴ مرغ و خروس مولد موجود بود. به منظور القای آسیت، در روز ۲۱ دوره پرورش، تعداد حدود ۱۰ جوجه از هر خانواده ناتنی به سالن سرد (دمای سالن در طول روز بین ۱۵ تا ۱۸ درجه سانتیگراد و در طول شب تا ۱۰-۹ درجه سانتیگراد) منتقل شدند. روشنایی در ۴۸ ساعت اول به صورت ممتد و با شدت نور بالا و در بقیه روزها به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی بود. جیره غذایی به صورت آردی و بر پایه ذرت و سویا بود. جیره غذایی به صورت سه‌فازی پیش‌دان (۱۰ روز اول)، میان‌دان (روزهای ۱۱-۲۴) و پس دان (روز ۲۵ تا انتهای دوره پرورش یعنی

آپتوزیس به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱- ایجاد کننده آپتوزیس (به عنوان مثال تبدیل آنزیم ۱ بتا اینترلوکین به خانواده ICE) که در شروع آپتوزیس نقش دارد، ۲- متوقف‌کننده آپتوزیس (به عنوان مثال ژن BCL-2) که برای آپتوز بسیار مهم هستند و در پاتوژن بسیاری از بیماری‌ها مانند لنفوم و سرطان خون نقش دارد و ۳- تنظیم‌کننده‌های واسط آپتوزیس (به عنوان مثال لیگاند FAS/FAS، p53، C-MYC) که می‌تواند با جمعی از گیرنده‌های دیگر تنظیم‌کننده‌های آپتوزیس ارتباط داشته باشد و نقش تحریک‌کننده یا بازدارنده آپتوزیس را ایفا کند (Rezvani et al., 2010). بدین منظور، بررسی داده‌های ترانسکرپتومی آپتوزیس سلول‌های قلبی می‌تواند در درک بهتر ساز و کار این عارضه در لاین آرین راهگشا باشد و از طرفی اطلاعات لازم را برای اصلاح نژاد این لاین در اختیار محققان قرار دهد. همچنین در حوزه ژنتیک و اصلاح نژاد، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی به برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی نماید. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که ارائه می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری بدست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است آنها را رد کند (Alinaghizadeh et al., 2010). بعلاوه، استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار، تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاص است (Mousavizadeh et al., 2009). همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Javanmard et al., 2008). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Mohammadi et al., 2009). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei et al., 2013; Zamani et al., 2010). امروزه امکان دستیابی به داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترانسکرپتوم با استفاده از

بررسی کیفیت خوانش‌ها: بدین منظور نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار FastQC (Andrews, 2010) مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهایی از قبیل کیفیت بازها و خوانش‌ها، میزان آلودگی به آدپتور و غیره مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل و حداکثر درصد بازهای GC هر خوانش به ترتیب ۲۰ و ۸۰ درصد در نظر گرفته شد. به منظور حذف آلودگی‌های آدپتوری، ده باز اول همه خوانش‌ها، دم پلی آدنین به طول ده باز از سمت چپ و راست و داده‌های بی-کیفیت از نرم‌افزار Trimmomatic استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014). همچنین همه خوانش‌های دارای بازهای ناشناخته و خوانش‌های با میانگین کیفیت کمتر از ۲۸ و خوانش‌هایی که بعد از پیرایش، طول آن‌ها کوتاه می‌شد، حذف شدند.

نقشه‌یابی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع: در این مرحله، خوانش‌های توالی‌یابی شده ترانسکریپتوم که از کیفیت آنها اطمینان حاصل شده است روی ژنوم مرجع Gallus-ensembl gallus.Galgal4.79 که از سایت ftp.ensembl.org/pub/release-79/fasta/gallus_gallus/dna

دانلود شده بود، با استفاده از نرم‌افزار TopHat2 هم‌ردیف شدند (Trapnell *et al.*, 2009). این نرم‌افزار قابلیت شناسایی و در نظر گرفتن نواحی اسپلاسیسینگ را دارد و بنابراین برای تجزیه داده‌های RNA-Seq مناسب است. اما با توجه به اینکه نرم‌افزار TopHat2 ژنوم مرجع ایندکس شده را به عنوان ورودی می‌پذیرد، از نرم‌افزار Bowtie2 جهت ایندکس کردن ژنوم مرجع استفاده شد (Langmead *et al.*, 2009; Trapnell *et al.*, 2009).

بررسی صحت نقشه‌یابی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع: به منظور بررسی صحت هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع و دستیابی به عمق هم‌ردیفی و همچنین بررسی سایر ویژگی‌های کیفی خوانش‌های تطبیق داده شده، از نرم‌افزار RseQC-2.3.9 استفاده شد (Wang *et al.*, 2012).

گردآوری خوانش‌ها و تفاوت بیان ژن: برای گردآوری خوانش‌ها و بدست آوردن ترانسکریپتوم‌های آزمایش حاضر و همچنین دستیابی به تفاوت بیان ژن، از نرم‌افزار Cufflinks و Cuffdiff استفاده شد.

روز ۵۴) تنظیم شد. این جیره‌ها متناسب با جیره‌های پیشنهادی لاین آرین بودند، ولی به منظور القای آسیت در اکثر پرندگان حساس، جیره غذایی متراکم‌تری نسبت به پروتکل پیشنهادی لاین آرین تنظیم و تهیه شد. برای اینکه از تلف شدن حداکثر تعداد پرندگان حساس به آسیت اطمینان حاصل شود، طول دوره پرورش تا روز ۵۴ ادامه داده شد. بعد از اعمال تنش سرمایی، پرندگان تلف شده کالبدشکافی شده و علت مرگ آن‌ها بررسی شد. وقوع آسیت با تجمع آب در حفره شکمی و اطراف قلب و ایجاد بافت‌مردگی در کبد و هایپرتروفی بطن راست که با شل‌شدگی بافت کل قلب همراه است، قابل تشخیص بود. سپس از ۲۰ نمونه بافت قلب (۱۰ نمونه سالم و ۱۰ نمونه آسیت) در روز ۴۲ پرورش، نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به خوبی با RNA-Shield (شرکت دنازیست، ایران) تیمار شده و سپس به داخل فلاسک نمونه‌برداری حاوی نیترژن مایع منتقل شده و بلافاصله جهت استخراج RNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج RNA و توالی‌یابی: استخراج RNA با استفاده از محلول استخراج RNA شرکت Roche با نام تجاری TriPure Isolation Reagent صورت گرفت. به شکل مختصر، هر پنج نمونه با یکدیگر آمیخته شدند و سپس ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه با استفاده از نیترژن مایع بخوبی پودر شد و سپس ۱ میلی لیتر تریزول به آن اضافه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به محلول اضافه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محلول بالایی به میکروتیوپ دیگر منتقل شده و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. به منظور رسوب RNA، سانتریفیوژ انجام شده و پس از شستشو رسوب با اتانول ۷۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر آب عاری از DNase و RNase به آن اضافه شد. به منظور دستیابی به کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از نمونه استخراج شده با ۹۹ میکرولیتر آب مخلوط و در الکتروفورز و اسپکتوفوتومتر نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع دو نمونه سالم و دو نمونه بیمار به منظور توالی‌یابی به شرکت BGI چین جهت توالی‌یابی و تولید داده‌های NGS با دستگاه ایلومینا دو طرف خوانش ۱/۹ ارسال شد.

تفاوت بیان را بین مرغ‌های مقاوم و حساس به آسیت نشان دادند. به منظور مطالعه هستی‌شناسی ژن‌ها و مسیرهای زیستی از نرم‌افزار DAVID استفاده شد. در این پایگاه اطلاعاتی، داده‌های KEGG Pathway و Gene Ontology برای آن ۶۵۳ ژن به شکل کامل مطالعه و بررسی شد. در این میان، ۶۶ مسیر زیستی برای ۲۹۱ ژن مشاهده شدند. با توجه به هدف اصلی این پژوهش که تمرکز روی مسیر زیستی آپوتوزیس است، لیست ژن‌های مرتبط با آپوتوزیس پس از بررسی ۶۶ مسیر زیستی تهیه و سپس نسبت به بررسی مجدد در پایگاه اطلاعاتی DAVID و داده‌های KEGG Pathway و Gene Ontology مشخصا برای آپوتوزیس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. این لیست ژنی شامل ۵۳ ژن مرتبط با آپوتوزیس بودند و یا به عبارتی بیان ژنی معنی‌داری در جوجه‌های مقاوم به آسیت نسبت به حساس را داشتند. بررسی ژن‌ها و شبکه‌های درگیر در مسیرهای مرتبط با آپوتوزیس به منظور بررسی برهمکنش و ارتباط بین ژن‌های درگیر در آپوتوزیس با استفاده از نرم‌افزار STRING 10 به آدرس <http://string-db.org/> انجام شد (The STRING database, 2017).

نتایج و بحث

استخراج RNA: پس از استخراج RNA از نمونه‌های بافت قلب، به منظور سنجش کیفیت RNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر از نمونه روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نورسنجی با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ نشان داد که RNA استخراج شده دارای کیفیت و کمیت مناسبی است (شکل ۱). وجود دو باند شارپ 28s و 18s نشان از کیفیت بالای RNA استخراجی داشت. پروتئین‌ها متداول‌ترین آلوده‌کننده‌های اضافی در نمونه‌های DNA و RNA هستند و همانطور که در شکل ۱ مشخص است هیچ آلودگی پروتئینی مشاهده نشد.

تجزیه **RPKM** و **FPKM** از نرم‌افزار Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2009) برای اسمبلی ترنسکرپت‌ها و شمارش تعداد قطعه یا خوانش نقشه‌یابی شده به هر ژن و استانداردسازی تعداد خوانش‌ها با توجه به طول ژن و میزان بیان کلی در لاین‌های مختلف، تعداد قطعه یا خوانش نقشه‌یابی شده تصحیح شده برای هر ژن را، که با معیارهای ^۱RPKM (برای خوانش‌های تک انتهای) (Mortazavi *et al.*, 2008) و ^۲FPKM (برای خوانش‌های جفت انتهای) (Trapnell *et al.*, 2009) مشخص می‌شوند، بدست می‌دهد. بدین ترتیب امکان مقایسه بیان ژن‌های با طول مختلف و بیان ژن نمونه‌های توالی‌یابی شده با لاین‌های مختلف مهیا می‌شود.

هستی‌شناسی ژن: بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌های معنی‌دار در دو گروه بیمار و آسیتی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی DAVID^۵ به آدرس <https://david.ncifcrf.gov/> انجام شد (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b). این پایگاه با اتصال به پایگاه‌های دیگری مانند GO^۶ و KEGG^۷ به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن‌های معنی‌دار می‌پردازد. جایگاه‌هایی که فاقد نام ژن بودند از این تجزیه حذف شدند. به منظور برآورد ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها، لیست ژن‌های تبدیل شده به فرمت Official Gene بخش Gene Functional Classification وارد شد. پس از تجزیه و بررسی نتایج این مطالعه، مشخص شد که ۲۰۰۳۴ ژن در مجموع نمونه‌ها مشاهده شدند. ژن‌هایی که فاقد نام بودند حذف شدند و ژن‌های با فرمت ensemble با استفاده از نرم‌افزار DAVID به فرمت official تبدیل شدند. از بین این ژن‌ها، تعداد ۶۵۳ ژن به طور معنی‌داری ($P < 0.01$)

1. Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
2. Single End (SE) or Single Read (SR)
3. Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
4. Paired End (PE)
5. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
6. Gene Ontology Consortium
7. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

مسیرهای Oocyte meiosis و Cell cycle داشت. با این حال، هیچ یک از این مسیرها معنی دار نبودند. در این دو مسیر، ژن های $CDK1^3$ و $MAD2L1^4$ به عنوان ژن های اصلی و مشترک شناخته می شوند. بررسی مسیر هستی-شناسی ژن ها برای فرآیند زیستی در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که مشخص است مسیرهای مربوط به تنظیم فرآیند سلولی و تنظیم منفی آپوپتوزیس با FDR معنی دار در بالاترین سطح قرار گرفتند. نتایج نشان می دهد که ۳۵ درصد مسیرهای زیستی دارای $P < 0.01$ هستند و در مجموع ۱۳۰ مسیر زیستی با ژن های شناسایی شده مرتبط بودند. ژن های درگیر در تنظیم فرآیند سلولی ۲۶ ژن بودند که مهمترین آنها شامل خانواده $MEF2^5$ است. ژن های درگیر در تنظیم منفی آپوپتوزیس شامل ۸ ژن بودند که مهمترین آنها ژن $CRYAB$ است. مطابق گزارش های پژوهشگران، آپوتوزیس و نکروزیس نقش حیاتی در زیست-شناسی طبیعی از جمله رشد و هموستاز سلول دارند (Konstantinidis *et al.*, 2012). از این رو بسیاری از بیماری های انسان از جمله بیماری های قلبی و عروقی، سرطان و دیابت در نتیجه مرگ سلولی اتفاق می افتد (Freedman *et al.*, 1998). پژوهش ها ثابت کرده است که خانواده ژنی $MEF2$ که نقش عامل رونویسی را در توسعه و تمایز بافت های قلب بر عهده دارند، با آپوپتوزیس قلبی در ارتباط است (Olson, 1998; Potthoff *et al.*, 2007; McKinsey *et al.*, 2002). همچنین این ژن به عنوان یک عامل پیشروی موثر بر عوامل رونویسی هسته و توسعه و رشد بافت قلب شناخته می شود (Olson, 2006). نقش اصلی ژن $MEF2$ در تنظیم و عملکرد ژن های کاردیاک بافت قلب است (Desjardins *et al.*, 2016). با توجه به عملکرد تاثیرگذار $MEF2$ در بافت میوکارد، هرگونه تغییر بیان ژن در این خانواده می تواند مستقیماً سبب ایجاد آپوپتوزیس لولی شود. بررسی های دانشمندان نشان داده که چندین پروتئین کوچک مرتبط با شوک حرارتی^۶ نقش مهمی را در تنظیم سیگنال آپوپتوزیس در سلول های عضله قلب دارد که

3. Cyclin-dependent kinase 1

4. Mitotic spindle assembly checkpoint protein

5. Myocyte enhancer factor 2

6. Small heat-shock proteins

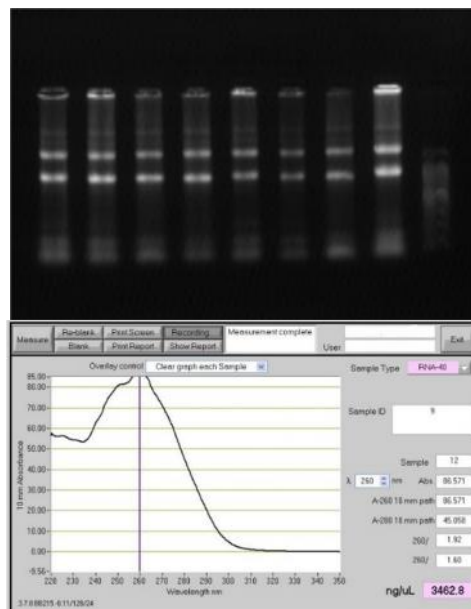


Fig. 1. Evaluation of the quality of RNA extraction on 1% agarose gel. The presence of the bands of 28s and 18s indicates the quality of RNA extraction شکل ۱- بررسی کیفیت استخراج RNA انجام شده روی ژل آگارز ۱ درصد. وجود باندهای 28s و 18s، نشان دهنده کیفیت RNA استخراجی است.

تجزیه نتایج $RNA-Seq$: به طور کلی، کیفیت خوانش های حاصل از توالی یابی مناسب و متوسط کیفیت بازهای خوانده شده بالای ۲۵ (احتمال وجود یک باز اشتباه در هر ۳ خوانش ۱۰۰ بازی) برآورد شد. خوانش های پیرو^۱ نسبت به خوانش های پیش رو^۲ کیفیت بهتری داشتند و با نزدیک تر شدن به انتهای خوانش افت کیفیت باز در آن ها مشاهده شد. در جدول ۱ داده های مربوط به کیفیت بازها در طول خوانش، پراکنش کیفیت خوانش ها و سایر معیارهای کیفی مربوط به نمونه سالم و آسیتی پیش و بعد از فرآیند پیش فرآوری گزارش شده است. طول خوانش پس از حذف آلودگی ها با استفاده از نرم افزار Trimmomatic، ۹۰ باز بود که نشان از کیفیت مناسب داده ها برای تجزیه تفریقی بیان ژن داشت. بعضی از ۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس در چند مسیر زیستی دخیل بودند. نتیجه تجزیه مسیرهای غنی شده KEGG PATHWAY دلالت بر نقش این ژن ها با

1. Backward reads

2. Forward reads

نرم‌افزار String استفاده شد. ۴۸ گره از ۵۳ گره تعریف شده در شبکه جنس و گونه *Gallus gallus* به نمایش درآمد ($P=0/000076$) (جدول ۵). ژن‌های MEF2A, FGF10, CDK1 به عنوان ژن‌های اصلی در دو شبکه برهمکنش پروتئینی ژن‌های درگیر در آپوپتوزیس شناخته شده‌اند (شکل ۲).

بیان پروتئین خانواده FGF به عنوان یکی از اصلی‌ترین مولکول‌ها در رشد قلب ضروری است (Vega-Hernández *et al.*, 2011). در پرندگان سیگنال‌دهی FGF به منظور تحت تاثیر قرار دادن سلول‌های اپیکاردیال و تمایز سلول‌های عضله‌ای عروق کرونر، فیروبلاست‌های قلبی بین سلول، سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر و کریومیوسیت‌ها ضروری است (Lepilina *et al.*, 2006). بنابراین با توجه با سرعت رشد بالا قلبی در لاین مرغ آرین، بیان این ژن نقش بسزایی در رشد بافت قلب و پرنده دارد. لذا با توجه به اینکه این ژن به همراه ژن CRYAB و MEF2A در یک شبکه قرار گرفته است، برهم‌کنش نهایی این ژن‌ها می‌تواند در آپوپتوزیس سلولی قلب جوجه‌های حساس به آسیت موثر باشد.

بیان ژن سیکلین وابسته به کیناز (CDK) نقش موثری در تنظیم چرخه سلولی کاردیومیست‌ها دارد (Ahuja *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان داده که سطح سیکلین A در پاسخ به تحریک کاهش اکسیژن افزایش یافته و بیان غیر التهابی سیکلین A منجر به آپوپتوزیس در سلول‌های کاردیومیست می‌شود (Adachi *et al.*, 2001). بنابراین در تابستان با افزایش دما و کاهش رطوبت سالن که هر دو از عوامل اصلی سندروم آسیت هستند، تنفس دچار مشکل شده و اکسیژن بدن حیوان کاهش می‌یابد. از این رو با افزایش سطح سیکلین A، آپوپتوزیس در سلول‌های کاردیومیست‌ها اتفاق می‌افتد.

مهمترین آنها شامل آلفا کریستالین (CRYAB) است (Morrison *et al.*, 2004). این پروتئین از راه حفظ انعطاف-پذیری سارکوئیک‌ها، یکپارچگی میتوکندری و همچنین حفظ هموستاز دارای عملکرد محافظتی در کاردیومیست‌ها است (Mitra *et al.*, 2013). بنابراین از آنجا که بیماری آسیت با شوک حرارتی کاملاً در ارتباط بوده و فراوانی آن در فصل‌های گرم سال بیشتر است، پروتئین CRYAB نقش تعیین‌کننده‌ای در آپوپتوزیس قلبی دارد.

بررسی مسیر هستی‌شناسی ژن برای فرآیند اندام‌های سلولی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که از بین ۵۳ ژن کاندید شده، ۵ ژن نقش بسیار موثر در هستی‌شناسی ژن میکروذرات خون دارند ($P < 0/01$ ، $FDR > 0/1$). میکرو ذرات خون از سلول‌های فعال و یا ذرات آپوپتیک تولید شده و به عنوان نشانگر برای شناسایی نارسایی‌های مزمن قلبی در انسان بکار می‌رود. در حال حاضر، میکروساختارهای سلولی، پلاکتی و مونوسیت/ماکروفاژ بدست آمده از میکروذرات‌ها را با بیماری‌های قلبی و عروقی و متابولیکی و وضعیت التهابی در ارتباط می‌دانند (Berezin *et al.*, 2015). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه مشخص می‌شود که با توجه به اینکه آسیت بیمار متابولیکی برای حیوان است، لذا تولید میکروذرات در بافت قلبی، حیوان را با بیماری نارسایی قلبی درگیر ساخته است. همچنین ژن‌های کاندید در اندام‌های زیستی دیگر مانند اسپیندال میوتوتیک، بخش‌هایی از کروموزوم، فیبرونوزن، فضای خارج سلولی و گرانول‌های آلفا پلاکت‌ها به شکل معنی‌داری حضور داشتند ($P < 0/01$). تمامی این اندام‌های سلولی در فعالیت طبیعی سلول‌های قلب نقش موثری دارند. همچنین بررسی هستی‌شناسی ژن برای فرآیند عملکرد مولکولی ۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس نشان می‌دهد که بیشتر این ژن‌ها با اتصال به پروتئین، کروماتین، ماکرومولکول‌ها، داروها، عوامل رونویسی و RNA پلی‌مرازها و ... ارتباط معنی‌دار دارند (جدول ۴).

۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس در مرغان مقاوم به آسیت نسبت به مرغان حساس به منظور مشخص شدن نحوه عملکرد به نرم‌افزار برخط String وارد شد. به منظور ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئینی ۵۳ ژن درگیر در آپوپتوزیس از

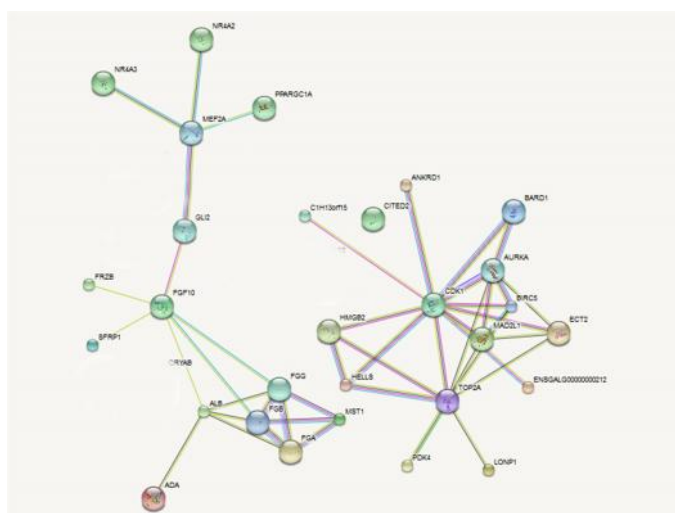


Fig. 2. The Protein-Protein Interaction network for apoptosis pathway genes of *Gallus gallus* showing gene clusters of ascites sensitive Aryan chickens ($P=0.000076$). The similar colored nodes are related to a cluster, and larger nodes are proteins whose three-dimensional structures are detected

شکل ۲- شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین ژنهای مسیر آپوپتوزیس *Gallus gallus* به همراه نمایش خوشه‌های تحت شبکه در نمونه‌های حساس به آسیب لاین آرین ($P=0.000076$). گره‌های هم‌رنگ مربوط به یک خوشه هستند و گره‌های بزرگ‌تر، پروتئین‌هایی هستند که ساختار سه بعدی آنها شناسایی شده است

جدول ۱- اطلاعات آماری خوانش‌ها در قبل و بعد از پیرایش توالی‌های RNA-Seq

Table 1. Statistical information of the readings RNA-Seq sequences before and after of trimming

§ Samples	Before trimming		After trimming	
	Number of reads (pairs)	Read length (Base)	Number of reads (pairs)	Read length (Base)
As-1	25389617	2*100	24992539	2*90
As-2	25380387	2*100	25061262	2*90
He-1	25367470	2*100	25085727	2*90
He-2	25364938	2*100	25070763	2*90
Total	101402412	2*100	100210291	2*90

§ Samples with As prefix are related to ascites treatment and samples with He prefix are related to healthy group.

جدول ۲- بررسی مسیر ژن آنتولوژی برای فرآیند زیستی مربوط به بررسی بیان ۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس در مرغان حساس به آسیت نژاد آراین

Table 2. The investigated gene ontology pathways for biological process including 53 genes involved in apoptosis in ascites sensitive Aryan chickens

Term	Count	P value	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0050794~regulation of cellular process	26	2.68E-07	2154	6441	2.355955	1.95E-04	1.95E-04	4.06E-04
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	8	6.02E-07	105	6441	14.871	4.37E-04	2.19E-04	9.13E-04
GO:0050789~regulation of biological process	26	6.72E-07	2247	6441	2.258446	4.88E-04	1.63E-04	0.001018
GO:0060548~negative regulation of cell death	8	6.85E-07	107	6441	14.59303	4.98E-04	1.24E-04	0.001039
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	8	6.85E-07	107	6441	14.59303	4.98E-04	1.24E-04	0.001039
GO:0065007~biological regulation	26	1.91E-06	2359	6441	2.15122	0.001386	2.77E-04	0.002895
GO:0048523~negative regulation of cellular process	12	3.54E-06	428	6441	5.472387	0.002563	4.28E-04	0.005357
GO:0042981~regulation of apoptosis	9	5.78E-06	209	6441	8.404959	0.004185	5.99E-04	0.008754
GO:0043067~regulation of programmed cell death	9	6.65E-06	213	6441	8.247119	0.004816	6.03E-04	0.010077
GO:0010941~regulation of cell death	9	6.88E-06	214	6441	8.208581	0.004986	5.55E-04	0.010433
GO:0048519~negative regulation of biological process	12	8.59E-06	469	6441	4.993991	0.006218	6.24E-04	0.013019
GO:0032501~multicellular organismal process	16	3.68E-05	1024	6441	3.049716	0.02635	0.002425	0.055724
GO:0006916~anti-apoptosis	5	5.41E-05	43	6441	22.69556	0.038495	0.003266	0.081906
GO:0048522~positive regulation of cellular process	11	1.18E-04	511	6441	4.201566	0.081984	0.006558	0.178394
GO:0048518~positive regulation of biological process	11	2.31E-04	554	6441	3.875451	0.15433	0.011902	0.349285
GO:0007275~multicellular organismal development	13	3.41E-04	823	6441	3.083066	0.219498	0.016385	0.51595

جدول ۳- بررسی مسیر ژن آنتولوژی برای اجزای سلولی مربوط به بررسی بیان ۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس در مرغان حساس به آسیت نژاد آراین

Table 3. The investigated gene ontology pathway for cellular components including 53 genes involved in apoptosis in ascites sensitive Aryan chickens

Term	Count	P value	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0072562~blood microparticle	5	7.60E-05	47	10057	21.39787	0.014346	0.014346	0.094477
GO:0072686~mitotic spindle	4	2.61E-04	26	10057	30.94462	0.048421	0.024511	0.324138
GO:0044427~chromosomal part	10	3.15E-04	458	10057	4.391703	0.05802	0.019727	0.390222
GO:0005577~fibrinogen complex	3	3.45E-04	6	10057	100.57	0.063373	0.016234	0.42735
GO:0005694~chromosome	10	5.64E-04	496	10057	4.055242	0.10165	0.021211	0.698756
GO:0005615~extracellular space	11	8.36E-04	637	10057	3.473375	0.146989	0.026149	1.034579
GO:0031091~platelet alpha granule	3	0.001753	13	10057	46.41692	0.283473	0.046504	2.156899
GO:0005634~nucleus	28	0.00219	3449	10057	1.632914	0.340668	0.050734	2.687887
GO:0000228~nuclear chromosome	7	0.002298	281	10057	5.010605	0.35415	0.047416	2.819314

جدول ۴- بررسی مسیر ژن آنتولوژی برای عملکرد مولکولی مربوط به بررسی بیان ۵۳ ژن مرتبط با آپوپتوزیس در مرغان حساس به آسیت نژاد آراین

Table 4. The investigated gene ontology pathway for molecular functions related to 53 genes involved in apoptosis in ascites sensitive Aryan chickens

Term	Count	P value	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0005515~protein binding	17	2.45E-04	1334	8532	2.588777	0.053172	0.053172	0.312081
GO:0003682~chromatin binding	8	2.45E-04	267	8532	6.086677	0.053235	0.026982	0.312459
GO:0044877~macromolecular complex binding	10	2.92E-04	466	8532	4.359289	0.063154	0.021511	0.372501
GO:0008144~drug binding	4	7.15E-04	37	8532	21.96139	0.14734	0.039065	0.907703
GO:0000982~transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	6	0.001377	174	8532	7.004926	0.264591	0.059615	1.742766
GO:0001104~RNA polymerase II transcription cofactor activity	4	0.002517	57	8532	14.25564	0.429993	0.08943	3.164481
GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	9	0.003726	542	8532	3.373221	0.56497	0.112109	4.649979
GO:0001071~nucleic acid binding transcription factor activity	9	0.003726	542	8532	3.373221	0.56497	0.112109	4.649979
GO:0001105~RNA polymerase II transcription coactivator activity	3	0.004897	22	8532	27.7013	0.665393	0.127899	6.070915
GO:0001076~transcription factor activity, RNA polymerase II transcription factor binding	4	0.008787	89	8532	9.130016	0.860302	0.196435	10.64909

جدول ۵- تجزیه شبکه ژنی ژن های مسیر آپوپتوزیس در پرند های حساس به آسیت در لاین آراین

Table 5. Analysis of gene network for genes involved in apoptosis in ascites sensitive Aryan chickens

Number of nodes	48
Number of edges	46
Average node degree	1.92
Average local clustering coefficient	0.46
Expected number of edges	25
PPI enrichment P value	7.6e-05

آپوپتوزیس در انفارکتوس قلبی تایید شده است (Olivetti *et al.*, 1996; Bernecker *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003). شواهد آپوپتوزیس کاردیومیوسیت در گونه های مختلف مانند موش، موش صحرای، خرگوش، سگ، گوسفند و خوک در آزمایشات مختلف گزارش شده است (Kang *et al.*, 2004). از این رو در این مطالعه به منظور دستیابی به اطلاعات ترانسکریپتومی بافت قلب مرغان حساس به آسیت لاین آراین، از روش RNA-Seq استفاده شد.

در این گزارش نیز اثر ژن های موثر در آپوپتوزیس سلول های قلبی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی فنوتیپی نشان داده که تحت تنش آسیت زاء، تند رشد بودن پرند ارتباط بسیار قابل ملاحظه ای با بروز آسیت ندارد (Hassanpour *et al.*, 2011). از این رو بررسی های ژنتیکی می تواند به شکل معنی داری نقش ژن های درگیر در این سندروم را تبیین سازد. آپوپتوزیس در هر دو حالت فیزیولوژیک و پاتولوژیک اتفاق می افتد، بنابراین شناسایی mRNA کاسپاز در قلب با توجه به فشار خون بالا قابل پیش بینی بود. مطالعات حیوانی و انسانی نشان داده است که آپوپتوزیس در ناحیه مرزی مایوکاردیوم قلب در فازهای اولیه وجود دارد و نقش

نتیجه گیری کلی

همچنین ترسیم شبکه ژنی نتایج قابل توجهی را نشان دادند. نتایج به خوبی نقش بیان ژن‌های MEFA2، CRYAB، CDK1 و FGF10 را در این مطالعه نشان دادند. به نظر می‌رسد این ژن‌ها نقش کلیدی در فرآیند آپوپتوزیس ناشی از بیماری آسیت ایفا می‌کنند. این ژن‌ها عمدتاً روی توسعه و رشد بافت قلب، تنظیم سیگنال آپوپتوزیس در سلول‌های عضله قلب و تنظیم چرخه سلولی کاردیوماست‌ها نقش دارند. بررسی برهمکنش ژن‌ها در شبکه ژنی ترسیم شده نیز جایگاه ویژه ژن‌های ذکر شده را به خوبی در فرآیند آپوپتوزیس ناشی از بیماری آسیت نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق شاید بتوان بیان کرد که با تمرکز روی ژن‌های MEFA2، CRYAB، CDK1 و FGF10، در چارچوب طراحی دارو در کنترل فرآیند آپوپتوزیس و نهایتاً کنترل بیماری آسیت جوجه‌ها نقش ایفا نمود. از طرف دیگر شاید تمرکز روی این ژن‌ها در اصلاح لاین مرغان حساس به آسیت نیز جایگاه خاص خود را داشته باشند.

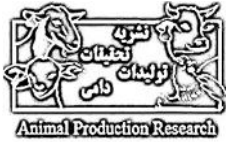
مرغان لاین آرین در ایران درگیر بیماری متابولیکی آسیت هستند و بررسی پروفایل‌های مولکولی و بیان ژن مرتبط با این بیماری به منظور اهداف مختلف دارویی و ژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی، بررسی مولکولی فرآیندهای زیستی شامل آپوپتوزیس، آنژیوژنز و غیره نیز در رسیدن به اهداف بالا کمک فراوانی خواهد نمود. در بیماری متابولیکی سندروم آسیت، فرآیند آپوپتوزیس و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شود و به عبارتی روند توسعه بیماری تشدید می‌شود. لذا شاید کنترل فرآیند آپوپتوزیس بتواند کنترل بیماری را سبب شود. در این بین، مطالعات مولکولی پروفایل بیان ژنی فرآیند آپوپتوزیس در مرغان لاین آرین مقاوم و حساس به آسیت در جهت اهداف آتی حائز اهمیت است. در این مطالعه ۵۳ ژن با بیان ژنی متفاوت معنی دار در مرغان مقاوم به بیماری آسیت شناسایی شدند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها در چارچوب فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی، اجزاء سلولی و مسیرهای سلولی KEGG

فهرست منابع

- Adachi S., Ito H. and Tamamori-Adachi M. 2001. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circulation Research*, 88(4): 408-414.
- Ahuja P., Sdek P. and MacLellan W. R. 2007. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, 87(2): 521-544.
- Alinaghizadeh H., Mohammad Abadi M. R. and Zakizadeh S. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(1): 69-80.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Azizian M., Rahimi S., Kamali M. A., Karimi Torshizi M. A. and Zobdeh M. R. 2013. Comparison of the susceptibility of six male broiler hybrids to ascites by using hematological and pathological parameters. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 517-525.
- Berezin A. E., Kremzer A. A., Martovitskaya Y. V., Samura T. A. and Berezina T. A. 2015. The predictive role of circulating microparticles in patients with chronic heart failure. *BBA Clinical*, 3: 18-24.
- Bernecker O. Y., Huq F., Heist E. K., Podesser B. K. and Hajjar R. J. 2003. Apoptosis in heart failure and the senescent heart. *Cardiovascular Toxicology*, 3: 183-190.
- Bolger A. M., Lohse M. and Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 21: 11-17.
- Chester N., Kuo F., Kozak C., O'Hara C. D. and Leder P. 1998. Stage-specific apoptosis, developmental delay, and embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption in the murine Bloom's syndrome gene. *Genes and Development*, 12(21): 3382-3393.
- Desjardins C. A. and Naya F. J. 2016. The Function of the MEF2 Family of Transcription Factors in Cardiac Development, Cardiogenomics, and Direct Reprogramming. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3(3): 26.
- Dominguez-Avila N., Ruiz-Castañeda G., González-Ramírez J., Fernandez-Jaramillo N., Escoto J., Sánchez-Muñoz F., Marquez-Velasco R., Bojalil R., Espinosa-Cervantes R. and Sánchez F. 2013. Over, and under expression

- of endothelin 1 and TGF-beta family ligands and receptors in lung tissue of broilers with pulmonary hypertension. *Biomedical Research International*, Article ID 190382: 1-7.
- Freedman J. E., Ting B., Hankin B., Loscalzo J., Keaney J. F., Vita J.A. 1998. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation*, 98: 1481-1486.
- Hassanpour H., Momtaz H., Shahgholian L., Bagheri R., Sarfaraz S. and Heydaripoor B. 2011. Gene expression of endothelin-1 and its receptors in the heart of broiler chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *Research in Veterinary Science*, 91: 370-375.
- Hassanpour H., Teshfam M., Momtaz H., Zarei H. and Bahadoran S. 2014. Caspase-1, -2, and -3 gene expression is enhanced in the heart and lung of chickens with pulmonary hypertension (ascites). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 1-5.
- Huang D. W., Sherman B. T. and Lempicki R. A. 2009. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1): 1-13.
- Huang D. W., Sherman B. T. and Lempicki R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*, 4(1): 44-57.
- Jacobson M. D., Weil M. and Raff M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354.
- Javanmard A., Mohammadabadi M. R., Zarrigabayi G. E., Gharahedaghi A. A., Nassiry M. R., Javadmash A. and Asadzadeh N. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (*Iranian Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44(4), 495-497.
- Kang P. M. and Izumo S. 2000. Apoptosis and heart failure: a critical review of the literature. *Circulation Research*, 86: 1107-1113.
- Konstantinidis K., Whelan R. S. and Kitsis R. N. 2012. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(7): 1552-1562.
- Kumar D., Sudha T. and Singal P. K. 2003. Can apoptosis explain heart failure? *Kuwait Medical Journal*, 35: 86-90.
- Langmead B., Trapnell C., Pop M. and Salzberg S. L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10: 25-38.
- Laytragoon-Lewin N. 1997. Programmed cell death: the influence of CD40, CD95 (Fas or Apo-I) and their ligands. *Medical Oncology*, 15 (1): 15-19.
- Lepilina A., Coon A. N., Kikuchi K., Holdway J. E., Roberts R. W., Burns C. G. and Poss K. D. 2006. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 127: 607-619.
- McKinsey T. A., Zhang C. L. and Olson E. N. 2002. MEF2: A calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 40-47.
- Mitra A., Basak T., Datta K., Naskar S., Sengupta S. and Sarkar S. 2013. Role of α -crystallin B as a regulatory switch in modulating cardiomyocyte apoptosis by mitochondria or endoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy and myocardial infarction. *Cell Death Disease*, 4: 582-590.
- Moazeni S., Mohammadabadi M. R., Sadeghi M., Shahrabak H., Koshkoieh A. and Bordbar F. 2016a. Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Open Journal of Animal Sciences*, 6(1): 1-8.
- Moazeni S. M., Mohammadabadi M. R., Sadeghi M., Moradi Shahrabak H. and Esmailizadeh A. K. 2016b. Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4(2): 51-56.
- Mohammadabadi M. R., Nikbakhti M., Mirzaee H. R., Shandi A, Saghi D. A., Romanov M. N. and Moiseyeva I. G. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46(4): 505-509.
- Mohammadi A., Nassiry M. R., Mosafer J., Mohammadabadi M. R. and Sulimova G. E. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian journal of genetics*, 45(2): 198-202.
- Mohammadifar A. and Mohammadabadi M. R. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermanshah sheep genome. *Iranian Journal of Animal Science*, 42(4): 337-344.
- Morrison L. E., Whittaker R. J., Klepper R. E., Wawrousek E. F. and Glembotski C. C. 2004. Roles for α B-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286: 847-855.
- Mortazavi A., Williams B., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5: 621-628.

- Mousavizadeh A., Mohammad Abadi M. R., Torabi A., Nassiry M. R., Ghiasi H. and Esmailzadeh A. K. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1): 51-53.
- Olivetti G., Quaini F. and Sala R. 1996. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28: 2005-2016.
- Olson E. N. 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14: 167-196.
- Olson E. N. 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*, 313: 1922-1927.
- Potthoff M. J. and Olson E. N. 2007. MEF2: A central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 134: 4131-4140.
- Rezvani M., Barrans J. D., Dai K. S. and Liew C. C. 2000. Apoptosis-related genes expressed in cardiovascular development and disease: an EST approach. *Cardiovascular Research*, 45(3): 621-9.
- Shahdadnejad N., Mohammadabadi M. R. and Shamsadini M. 2016. Typing of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens using Multiplex PCR. *Genetics in the 3rd Millennium*, 14(4): 4368-4374.
- Shojaei M., Mohammad Abadi M. R., Asadi Fozi M., Dayani O., Khezri A. and Akhondi M. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2: 67-73
- The STRING database. 2017. Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45: D362-68.
- Trapnell C., Pachter L. and Salzberg S. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25: 1105-1111.
- Trapnell C., Pachter L. and Salzberg S. L. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. *Bioinformatics*, 25: 1105-1111.
- Vega-Hernández M., Kovacs A., De Langhe S. and Ornitz D. M. 2011. FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development*, 138(15): 3331-3340.
- Wang Y., Guo Y., Ning D., Peng Y., Cai H., Tan J., Yang Y. and Liu D. 2012. Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1): 41.
- Wang Y., Guo Y., Ning D., Peng Y., Yang Y. and Liu D. 2013. Analysis of liver transcriptome in broilers with ascites and regulation by L-Carnitine. *Journal of Poultry Science*, 50: 126-137.
- Wilhelm B. T., Marguerat S., Watt S., Schubert F., Wood V., Goodhead I., Penkett C. J., Rogers J. and Bahler J. 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, 453: 1239-1243.
- Zamani P., Akhondi M., Mohammadabadi M. R., Saki A. A., Ershadi A., Banabazi M. H., Abdolmohammadi A. R. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1812-1817.
- Zandi E., Mohammadabadi M. R., Ezzatkah M., Esmailzadeh A. K. 2014. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(4): 509-514.



Investigation of gene expression and gene networks related to apoptosis in sensitive and resistant Aryan broiler breeders with RNA-Seq

S. Sahraei¹, M. R. Nassiri^{2*}, A. Javadmanesh³, R. Tohidi⁴, E. Ebrahimie⁵

1. Ph.D Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

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

4. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Torbat-e-Jam University, Torbat-e-Jam, Iran

5. Associate Professor, School of Molecular and Biomedical Science, The University of Adelaide, Australia

(Received: 14-06-2018 – Accepted: 15-08-2018)

Abstract

The designing of animal breeding program on Aryan broiler chicks without development of vital organs such as the heart, has made the chicken most susceptible for ascites syndrome. The cell apoptosis is common in ascites syndrome. Therefore, this study was done with the aim of identification of genes and genetic networks that involved in cardiac cell apoptosis among normal Aryan chickens and Aryan chickens resistant to ascites. For this purpose, two ascites and two normal samples of Aryan chicken were RNA extracted and transcriptome data were produced by the Next Generation Sequencing. The data quality and elimination of pollution were performed with FastQC and Trimmomatic softwares. In addition, the gene expression analyses were investigated using Cuffmerge, Cufflink and Cuffdiff. The results showed that there were 20034 genes in samples that 291 genes were associated with 66 biological pathways. Among this, 53 genes were associated with apoptosis pathways. Investigation of the biological process of gene ontology showed that regulation of cellular process and negative regulation of apoptosis pathways were significantly affected by chickens resistant to ascites syndrome (FDR <0.01). The gene network was extracted by 48 nodes in two clusters. The results of genes' networking showed that MEF2A, FGF10, CDK1 and MAD2L1 genes had maximum gene association. Therefore, the ascites syndrome in Aryan chickens can be controlled focusing on these genes for breeding programs and drug designing.

Keywords: Apoptosis, Gene Expression, Ascites Syndrome, Aryan chicken, RNA-Seq

*Corresponding author: nassiry@um.ac.ir