

مطالعه شبکه ژنی آنژیوژنز در جوجه‌های مرغ آرین حساس به آسیت با استفاده از داده‌های RNA-Seq

وحید تقی زاده^۱ - محمدرضا نصیری^{۲*} - مجتبی طهمورث پور^۳ - محمدرضا بختیاری زاده^۴ - علی جوادمش^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۱۶

چکیده

سندروم آسیت یک عارضه متابولیکی است که در سنین بالا در پرندگان گوشتی بروز می‌کند و به سوبه تجاری آرین که تنها لاین اصلاح شده مرغ گوشتی ایران می‌باشد آسیب جدی وارد کرده است. مطالعات گذشته نقش عوامل ژنتیکی در بروز این سندروم را اثبات کرده است. از آنجا که ارگان‌های متعددی در بروز آسیت دخالت دارند و نقش قلب در آنها از همه بارزتر است، از مطالعات ژنومی استفاده شد تا ژن‌های مرتبط با مسیر آنژیوژنز در هایپرتروفی بطن راست قلب شناسایی شوند. در این تحقیق تعداد ۴۶۴ پرنده از خط پدري B لاین آرین تحت تنش سرمایي پرورش داده شد و در بررسی آنالیز داده های RNA-seq بین دو گروه سالم و مبتلا به آسیت، پروفایل بیان ژن‌ها در بطن راست قلب مرغان حساس و مقاوم به آسیت با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل آینده مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی ترنسکریپتومی ژنهای مسیر آنژیوژنز نشان داد که تعداد ۵۹ ژن بین دو تیمار سالم و آسیتی تفاوت بیان معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$) که از این تعداد ۲۹ ژن افزایش بیان و ۳۰ ژن کاهش بیان نشان دادند. بر اساس نتایج هستی‌شناسی ژنی، بیشترین معنی‌داری در پروسه‌های بیولوژیکی به مسیرهای برهم‌کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای (ECM-receptors)، تقسیم سلولی میتوز، پارتیشن بندی کروموزومی، چرخه سلولی و اینترلوکین‌ها تعلق داشتند. بر اساس نتایج آنالیز شبکه از ژن‌های افزایش بیان یافته در بیماری آسیت، سه خوشه ژنی تشکیل شد که ژن‌هایی از قبیل *CDK1*، *COL6A2* و *IL7R* به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با آنژیوژنز معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: آسیت، آنالیز مسیر، آنژیوژنز، شبکه ژنی، هستی‌شناسی ژن، RNA-Seq

مقدمه

هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (۲۸). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به‌ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد (۲۸). از طرفی ایران یکی از معدود کشورهای دارای لاین اصلاح‌شده مرغ گوشتی است که به نام آرین معروف است. این لاین در سال‌های اخیر به دلیل مشکلات متعدد نتوانست در جلب رضایت پرورش‌دهنده‌ها موفق باشد و در حال حاضر سهم بازار جوجه یک‌روزه گوشتی را تقریباً به‌طور کامل از دست داده است. علاوه بر عملکرد نسبتاً ضعیف تولیدی این سویه در مقایسه با سویه‌های رایج وارداتی عمده‌ترین مشکل آن میزان مرگ و میر بالا به علت بروز آسیت (به‌ویژه در نواحی مرتفع) است. میزان بروز آسیت در این سویه به ۱۰ درصد (۲) می‌رسد، در

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریباً قرن ۷ 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 طریق خشکی و

۱- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، پردیس واحد بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ابوریحان

۵- استادیار گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: nassiry@gmail.com)

می‌باشد (۷). در پاسخ به افزایش نیاز به اکسیژن، سیستم عصبی مرکزی قلب را تحریک به فعالیت بیشتر می‌کند (۲۰) و بطن راست خون بیشتری به سمت ریه‌ها پمپ می‌کند (۱۹). در واکنش به افزایش فعالیت بطن راست قلب، توده عضلانی بطن راست بزرگ شده (هایپرتروفی) و این تغییر موجب ضعف کارکرد درپچه بین دهلیز و بطن راست می‌شود (۳۵) لذا هنگام انقباض بطن راست جهت ارسال خون به سرخرگ‌های ریوی این درپچه‌ها به خوبی بسته نمی‌شوند و مقداری خون از طریق بطن و دهلیز راست به بزرگ سیاهرگ خلفی پس زده می‌شود و سبب بالا رفتن فشار خون در سیاهرگ‌های کبد می‌شود. همین عامل منجر به آسیب سلول‌های کبدی و سپس آب‌آوردگی کبد و تجمع مایعات در حفره شکمی می‌گردد (۱۵). همراه با اصلاح ژنتیکی، که به‌عنوان هدف بلندمدت پیشگیری از بروز سندروم آسیت مدنظر است (۱۳)، کنترل و مدیریت عوامل محیطی زمینه‌ساز سندرم آسیت از جمله دمای محیط، سطح انرژی خوراک، فرم فیزیکی‌دان، محدودیت غذایی، کنترل آمونیاک و سلامت دستگاه تنفس بسیار مؤثر خواهد بود.

اصلاح نژاد علیه این سندروم با روش‌های سنتی بسیار هزینه‌بر خواهد بود. خوشبختانه به دلیل پیشرفت‌های بسیار زیاد در حوزه ژنتیک مولکولی و توسعه تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل آینده در حال حاضر تحقیقات گسترده بر روی صفاتی نظیر سندروم آسیت، که یک صفت کاملاً اقتصادی است، در سطح نوکلئوتید نیز فراهم شده است (۱۷). مهم‌ترین مطالعات نقشه‌یابی کیوتی، ال^۲، ارتباط‌سنجی کل ژنوم^۳ و توالی‌یابی نواحی ژنومی کاندید مؤثر بر آسیت و معرفی ژن‌های بسیار مؤثر بر حساسیت به آن در عصر ژنتیک مولکولی انجام شده است (۸، ۲۳، ۳۸ و ۴۰). 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 کند. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به‌دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (۱). به‌علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (۳۱) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به‌طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (۱۸). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (۲۹). حفاظت باید بر اساس

حالی که مرگ‌ومیر به دلیل آسیت در سوبه‌های تجاری دیگر کمتر از ۸ درصد کل مرگ‌ومیر را شامل می‌شود (۱۲ و ۴۱). بروز آسیت در خط پدری (B) لاین آرین به دلیل سرعت رشد بیشتر، شایع‌تر است. 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.

سندرم فشار خون ریوی^۱ یا همان آسیت یک بیماری در طیور گوشتی است که ابتدا با بالا رفتن فشار خون عروق ریوی آغاز شده و در نهایت منجر به آسیت و مرگ و میر در پرندگان حساس می‌شود (۳). سالیان دراز آسیت به‌عنوان یک عامل بیماری و مرگ و میر جوجه‌های گوشتی در مناطق با ارتفاع بالا (بالای ۳۵۰۰ متر) شناخته می‌شد اما امروزه در نواحی کم ارتفاع هم مشاهده می‌شود (۲۵). ایجاد آسیت در جوجه‌های گوشتی عمدتاً مربوط به عدم تناسبی است که بین سیستم قلبی-عروقی و تنفسی با اندازه کل بدن آن‌ها، در نتیجه پیشرفت‌های اصلاح نژادی برای افزایش نرخ رشد و وزن بدن، به‌وجود آمده است (۲۱، ۴۲ و ۵۳). در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت، علائم بالینی شامل کسالت، ژولیدگی پرها، عدم تحرک، سیانوز پوست سر و بدن به‌ویژه قبل از مرگ، چروکیده شدن تاج و ریش، قرمز یا تیره شدن پوست و بافت‌ها و تجمع مایع سروزی زرد روشن در حفره شکمی می‌باشند و علائم کالبد گشایی شامل هایپرتروفی قلب، اتساع بطن راست، نقص درپچه دهلیزی بطنی، شل‌شدگی قلب و اتساع مدخل سیاهرگ به دهلیز، به‌خصوص بزرگ سیاهرگ خلفی و تحلیل دیواره بطن چپ که احتمالاً به دلیل عدم دسترسی کافی به اکسیژن در سلول‌های عضلانی بطن چپ است. مایع پریکاردیال به مقدار زیاد در اطراف قلب دیده می‌شود و ممکن است بی‌رنگ یا سروزی باشد. ریه‌های پرندگان آسیتی اغلب خاکستری رنگ یا زرد کم‌رنگ می‌باشند (۱۷).

امروزه عارضه آسیت یکی از مشکلات جدی صنعت طیور گوشتی محسوب می‌شود (۲۵) خسارات اقتصادی ناشی از آسیت در ایالات متحده آمریکا به‌تنهایی بالغ بر یکصد میلیون دلار در سال می‌باشد که شامل خسارات ناشی از تلفات در طی دوره رشد، انتقال به کشتارگاه و حذف لاشه در کشتارگاه می‌باشد (۳۳). این سندرم با علائم تجمع آب میان‌بافتی در پری‌کاردیوم، فیبروز شدن اپی‌کارد، ادم ریه‌ها، هایپرتروفی و شل‌شدگی عضله قلب به‌ویژه بطن راست، کاهش غلظت اکسیژن خون و افزایش هماتوکریت همراه است (۴، ۱۰، ۲۴، ۳۴، ۳۶ و ۴۸).

با اینکه در بروز آسیت عوامل متعددی دخالت دارند ولی آسیت عارضه‌ایی است که اساس آن بر پایه حجم محدود ژنتیکی ریه‌ها همراه با افزایش نیاز به اکسیژن مصرفی به‌دلیل متابولیسم پایه بالا

2- Quantitative Trait Loci (QTL)

3- GWAS

1- Pulmonary Hypertension Syndrome (PHS)

کل از طریق کیت A-bioZOL™ ساخت شرکت bioWorld¹ و رعایت پروتکل‌های آن البته با اندکی تغییرات جهت دستیابی به کیفیت بالای RNA انجام شد.

توالی‌یابی نمونه‌ها با استفاده از فن‌آوری ایلومینا توسط شرکت BGI هنگ کنگ انجام شد. نمونه‌های RNA ارسالی دارای معیار خردشدگی RNA (RIN) بالاتر از ۷ بودند. در مراحل بعدی که توسط شرکت انجام‌دهنده توالی‌یابی انجام شد با استفاده از Oligo dT beads همه RNA کوچکتر از قبیل RNAهای ریبوزومی، tRNA و غیره حذف شدند و سپس mRNAها توسط کیت‌های خاصی شکسته شده و به قطعات کوتاه‌تری تبدیل شدند. بعد با استفاده از پرایمرهای هگزامری، از روی قطعات شکسته شده cDNA تهیه شده و cDNAهای با طول مشخص ۲۰۰ باز انتخاب شدند و انتهای قطعات cDNA ترمیم و باز آدنین به آنها اضافه شد و بعد از آن آداپتور به آنها افزوده شد و در نهایت توسط دستگاه Illumina Hiseq 2000 مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

برای کنترل کیفی داده‌ها از نرم‌افزار FastQC (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) و Trimmomatic استفاده شد و برای نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم از نرم‌افزار Tophat (۴۹) (<http://tophat.cbcb.umd.edu>) استفاده شد. از مجموعه نرم‌افزارهای CumberBond که شامل نرم‌افزارهای Cufflinks (۵۰)، Cuffmerge و Cuffdiff (۵۱) برای سرهم‌سازی^۲ خوانش‌ها، تهیه ایندکس و آنالیز بیانی متمایز^۳ استفاده شد و خروجی داده‌های Cuffdiff جهت بررسی هستی‌شناسی ژنتیکی (GO) به نرم‌افزار DAVID 6.8 (<http://david-d.ncicrf.gov>) معرفی شد تا ژن‌هایی که به‌طور معنی‌دار در مسیر آنژیوزنز شبکه‌های ژنتیکی پایگاه داده KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) شناسایی شدند برای ترسیم شبکه ژنی استفاده شود. برای رسم شبکه ژنی از نرم‌افزار String Ver 10.5 (<http://string-db.org>) استفاده شد (۴۷).

برای تحلیل شبکه و تهیه خوشه‌های (Clusters) معنی‌دار و نمایش خصوصیات شبکه از Cytoscape (<http://Cytoscape.org>) نسخه 3.5.1 استفاده شد. شبکه‌های ژنی برهم‌کنش پروتئینی و خوشه‌ها و زیرخوشه‌ها همگی براساس ژن‌های دارای افزایش بیان (UP-Regulated) ترسیم شدند. در تصاویر شبکه‌ها و خوشه‌های ترسیم شده در Cytoscape میزان تفاوت بیان ژن بر حسب foldchange به‌صورت اندازه گره و میزان رنگ مشخص شده است به‌طوری که هر اندازه که بیان ژن بیشتر باشد اندازه گره بزرگتر و رنگ

دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۴۶ و ۵۵).

پیچیدگی سندرم آسیت و تعداد بالای ارگان‌های درگیر در بیماری که به‌تبع آن تعداد ژن‌های مداخله‌کننده در بروز این سندرم را نیز افزایش می‌دهد دلایلی است که مطالعه اخیر را به سمت Whole-Genome سوق داده است. از جهت دیگر در پیدایش آبشارگونه آسیت، هایپرتروفی عضله قلب نقش به‌سزایی در تشدید علائم ثانویه و پیشرفت روند بیماری دارد و از آنجایی که هایپرتروفی یک بافت مستلزم خون‌رسانی و فراهم کردن نیازهای سلولی است و برای تأمین این امکانات، بافت رشدکرده نیاز به توسعه‌ی عروق خونی (آنژیوزنز) دارد اگرچه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (۲۶، ۲۷، ۳۰ و ۵۶)، اما تاکنون شبکه ژنی آنژیوزنز در جوجه‌های مرغ آرین مورد مطالعه قرار نگرفته است لذا، به همین منظور مسیر بیولوژیکی آنژیوزنز از دیدگاه ژنتیکی در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت با این هدف که پس از شناسایی شبکه‌های ژنی معنی‌دار و تعیین زیرخوشه‌های معنی‌دار در شبکه ژنی به تعدادی ژن کلیدی کنترل‌کننده هایپرتروفی قلب دست یابیم تا از این طریق مسیر پژوهش‌های آینده برای برنامه‌های اصلاحی برای مقابله با این سندرم در جوجه‌های گوشتی هموارتر شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۶۴ قطعه جوجه یک‌روزه از خط B لاین آرین در یک سالن پرورشی تا ۲۱ روزگی در شرایط استاندارد (نور، دما، تغذیه و سایر عوامل یکسان) نگهداری شدند. سپس در ۲۱ روزگی جوجه‌ها به بخش سرد سالن که با پرده پلاستیکی جدا شده بود منتقل شدند. برای تشدید آسیت در جوجه‌های سالن سرد دمای این بخش در طول روز ۱۵ تا ۱۸ و در طول شب ۸ تا ۹ درجه نگه داشته شد.

بعد از اعمال تنش سرمایی، پرندگان که علائم آسیت را نشان دادند در دسته آسیتی و سایر پرنده‌ها در دسته سالم طبقه‌بندی شدند. در روزهای ۳۹ و ۴۲ نمونه‌های بافت بطن راست قلب ۲۴ پرنده به‌صورت جداگانه بر اساس روش استاندارد انجام شد (۱۲ پرنده آسیتی و ۱۲ پرنده سالم) جهت مطالعه ترنسکریپتوم برداشت و سریعاً به تانک ازت انتقال داده شد تا برای استخراج RNA کل از آنها استفاده شود.

در استخراج RNA کل از بافت قلب مقدار مساوی از RNA شش پرنده در یک نمونه ادغام شد. بدین ترتیب ۴ نمونه که دوتا از آنها سالم و دوتای دیگر آسیتی بودند ایجاد شد. استخراج RNA

1- Bioworld, is a division of GeneLinx International, Inc., USA

2- Assembly

3- Differential Expression Analysis

نتایج و بحث

به‌طور خلاصه داده‌های حاصل از توالی‌یابی در جدول ۱ نمایش داده شده است.

آن پر رنگ‌تر است. ارتباط بیانی دو ژن یا میزان هم بیانی به‌صورت ضخامت خطوط بین گره‌ها نمایش داده می‌شود و هر اندازه که بیانی دو ژن با هم ارتباط بیشتری داشته باشند ضخامت خط بین دو ژن ضخیم‌تر نشان داده شد.

جدول ۱- اطلاعات آماری داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل آینده

Table 1- Summary of reads from high throughput next generation sequencing

نمونه [§]	تعداد خوانش	تعداد باز	طول خوانش (باز)	درصد Q20 ^{&}	درصد GC
Sample [§]	Number of reads	Number of Bases	Length of read	Percent of Q20	Percent of GC
He-1-A	50,779,234	5,077,923,400	100	98.22	49.73
He-1-B	50,760,774	5,076,077,400	100	98.22	50.14
As-1-A	50,734,940	5,073,494,000	100	98.24	49.80
As-2-A	50,729,876	5,072,987,600	100	98.25	49.86

[§] نمونه‌های با پیشوند He مربوط به تیمار سالم و نمونه‌های با پیشوند As مربوط به تیمار آسیتی بودند.

[&] درصد Q20 بیانگر نسبتی از خوانش‌هایی است که میانگین کیفیت بازهای آن‌ها بالاتر از ۲۰ (بر مبنای فرد) می‌باشد.

[§] Samples with prefix of "He" assigned to Healthy and with "As" assigned to Ascites

[&] Percent of Q20 shows the quality of reads greater than 20 (based on Phred score)

جدول ۲- اطلاعات آماری خوانش‌های نقشه‌یابی شده بر روی ژنوم مرجع

Table 2- Summary of reads from high throughput next generation sequencing

نمونه [§]	As-1	As-2	He-1	He-2
Sample [§]				
تعداد کل خوانش‌ها (جفت)	24,992,539	25,061,262	25,085,727	25,070,763
Total reads (paired)				
تعداد خوانش‌های اول الاین شده (درصد)	22,465,894(89.9)	22,708,993(90.6)	22,677,628(90.4)	22,560,174(90)
First reads aligned (%)				
تعداد خوانش‌های دوم الاین شده (درصد)	22,426,986(89.7)	22,666,399(90.4)	22,636,232(90.2)	22,521,535(89.8)
Second reads aligned (%)				
تعداد جفت خوانش‌های الاین شده (درصد)	21,852,775(87.4)	22,083,944(88.1)	22,048,640(87.9)	21,937,325(87.6)
Paired reads aligned (%)				

[§] نمونه‌های با پیشوند As مربوط به تیمار آسیتی و نمونه‌های با پیشوند He مربوط به تیمار سالم می‌باشند.

[§] Samples with prefix of "He" assigned to Healthy and with "As" assigned to Ascites

حدود ۹۰ درصد از خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع نقشه‌یابی شده‌اند نکته قابل توجه این است که بسیاری از این خوانش‌ها به‌طور صحیح و در فاصله معقولی نسبت به جفت خود بر روی ژنوم الاین شده‌اند. بنابراین می‌توان استنتاج کرد که کیفیت خوانش‌ها بسیار مطلوب بوده و با حداقل خطا^۲ توالی‌یابی شده‌اند. در تیمار آسیتی از بین ۱۲۵ لوکوس با بیان متفاوت، سطح بیان تعداد ۷۹ ژن افزایش و سطح بیان تعداد ۴۶ لوکوس دیگر کاهش نشان داد. در مطالعات شای و همکاران (۲۰۱۴) نیز تعداد ژن‌های بیش‌بیان در پرندگان آسیتی نسبت به پرندگان سالم بیشتر از ژن‌های کم‌بیان گزارش شده است (۴۴).

از ۱۲۵ ژن که به‌طور معنی‌داری در آنالیز Cuffdiff تفاوت بیان

نشان دادند (DEGs) نشان دادند (FDR<20%) ۵۹ ژن در پایگاه داده KEGG در ارتباط با آنژیوژنز شناسایی شدند که ۲۹ ژن افزایش بیان و ۳۰ ژن کاهش بیان نشان داده شد. هستی‌شناسی (GO) ۵۹ ژن در نرم‌افزار DAVID 6.8 نشان می‌دهد که سه ژن^۳ LAMB1،^۴ IFIH1 و^۵ ACSL1 به‌ترتیب در فرآیندهای تقسیم سلولی و پارتیشن‌بندی کروموزوم، همانندسازی و نوترکیبی و بازسازی DNA و متابولیسم چربی نقش دارند و در این میان ژن LAMB1 بیشترین افزایش بیان را در گروه آسیتی در مقابل گروه سالم نشان داد.

3- Laminin subunit beta 1

4- Interferon induced with helicase C domain 1

5- Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1

1- Concordant pair alignment

2- Mismatch

جدول ۳- مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار در پایگاه داده KEGG (FDR<20%)

Table 3- Significant terms of biological process in KEGG pathway for angiogenesis (FDR<20%)

دسته	نام مسیر بیولوژیکی	تعداد	%	P-Value	FDR
Category	Term	Count			
KEGG_PATHWAY	gga04512:ECM-receptor interaction	9	15.25424	4.15E-06	0.004333
KEGG_PATHWAY	gga03320:PPAR signaling pathway	6	10.16949	0.001019	1.058334
KEGG_PATHWAY	gga04920:Adipocytokine signaling pathway	6	10.16949	0.001475	1.528821
KEGG_PATHWAY	gga04110:Cell cycle	7	11.86441	0.003158	3.247776
KEGG_PATHWAY	gga04510:Focal adhesion	8	13.55932	0.010421	10.35808

دیگر متصل بود و ضریب غیر یکنواختی شبکه (Network Heterogeneity) حدود ۰/۹ بود. در تصویر شبکه ژنی شکل ۶ میزان تفاوت بیان ژن به صورت اندازه رنگ نشان داده شده است به طوری که هرچه اندازه گره بزرگتر و رنگ آن پر رنگ تر باشد آن ژن تفاوت بیان بیشتری دارد. ارتباط بیانی دو ژن با میزان هم بیانی نیز به صورت ضخامت خطوط مابین گره‌ها نمایش داده می‌شود.

ژو و همکاران (۲۰۱۲) برای حاشیه نویسی مجدد ژنوم مرغ از داده‌های RNA-Seq بافت‌های شش و مجاری هوا استفاده کردند و تعداد ۲۷۳۷ ژن جدید پیدا کردند که در منابع پژوهشی گذشته گزارش نشده بودند (۵۸). کوبل و همکاران (۲۰۱۴) نیز داده‌های RNA-Seq ترنسکرپتوم کبد مرغان تحت تنش گرمایی و عادی را مورد مقایسه و آنالیز قرار دادند و تعداد ۴۰ ژن با بیان متفاوت (۲۷ ژن با بیان بیشتر و ۱۳ ژن با بیان کمتر را در پرندگان تحت تنش گرمایی نسبت به پرندگان تحت تیمار نرمال) مشاهده کردند (۹). ینگ و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از داده‌های RNA-Seq استخراج شده از بافت عروق ششی مرغان گوشتی مبتلا به آسیت و سالم ۸۹۵ ژن با تفاوت بیان معنی‌دار در ۴ مسیر بیولوژیکی در پایگاه داده KEGG^۷ مرتبط با آنژیوژنز را شناسایی کردند (۵۴). مطالعه مشابهی توسط شی و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد که در آن از داده‌های RNA-Seq استخراج شده از بافت کبد مرغان مبتلا به آسیت در مقایسه با پرندگان سالم استفاده شد و در آن نتایج متابولومیک با ترنسکرپتومیک با همدیگر مقایسه شدند (۴۵).

ژائو و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که در ناحیه یک QTL معنی‌دار بر روی کروموزوم ۸ گمان می‌رود ژنی تحت عنوان TNNI3K^۸ که فعالیت کیناز اختصاصاً در بافت قلب را به عهده دارد و نقش مهمی در سیستم عروق قلبی بیان بالاتری داشته است (۵۷). ولی مطالعه اخیر نشان داد که ژن TNNI3K بین دو گروه سالم و آسیتی تفاوت بیان معنی‌داری نداشتند. بیان ژن کدکننده عامل وادارکننده هیپوکسی (HIF1) که در رگزایی (Angiogenesis)، تغییر

همچنین بررسی مسیرهای بیولوژیکی در DAVID نشان داد که اغلب مسیرهای بیولوژیکی با فرآیندهای مربوط به کنترل گیرنده‌ها و فرآیندهای تقسیم سلولی و کنترل آن در ارتباط هستند (جدول ۳). از بین چندین مسیر بیولوژیکی معنی‌دار یک مسیر بیولوژیکی تحت عنوان gga04512:ECM-receptor interaction با ۹ ژن به نام‌های^۱ CD36،^۲ AGRN،^۳ COL2A1، COL5A1،^۴ SDC1 و^۵ VTN نقش مهمی در برهم کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای دارند که این عامل نقش بسیار کلیدی در فرآیند آنژیوژنز دارد. در میان این ۹ ژن LAMB4 بیشترین تفاوت بیان (foldchange= 1.54) و CD36 کمترین تفاوت بیان (fold change= -0.86) را در مقایسه پرنده‌های آسیتی با سالم نشان داد. در شکل ۱ مسیر بیولوژیکی مربوط به برهم کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای (ECM-receptor interaction) در پایگاه داده KEGG نشان داده شد که علامت ستاره (*) در شکل ۱ ژن‌هایی را نشان می‌دهد که در این پژوهش دارای تفاوت بیان معنی‌دار بوده و در مسیر بیولوژیکی پایگاه داده KEGG شناسایی شدند (شکل ۱).

جهت ترسیم شبکه برهم کنش پروتئینی ۵۹ ژن مسیر آنژیوژنز که در پایگاه داده KEGG شناسایی شدند از نرم‌افزار String (http://string-db.org) استفاده شد که ۴۹ گره از ۵۹ گره در یک شبکه ژنی به نمایش درآمد (شکل ۲). در این شبکه گره‌های کوچک پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که هنوز ساختار سه بعدی آنها به طور کامل مشخص نشده و گره‌های بزرگ پروتئین‌هایی هستند که ساختار سه بعدی آنها تعیین شده است.

سپس شبکه ژنی جهت تجزیه و تحلیل بیشتر شبکه در نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.5.1 فراخوان شد و پارامترهای شبکه به صورت جدول ۴ به نمایش درآمد. به طور میانگین هر گره به حدود ۴ گره

- 1- platelet glycoprotein 4
- 2- AGRIN
- 3- Collagen type II alpha 1 chain
- 4- Syndecan 1
- 5- Vitronectin

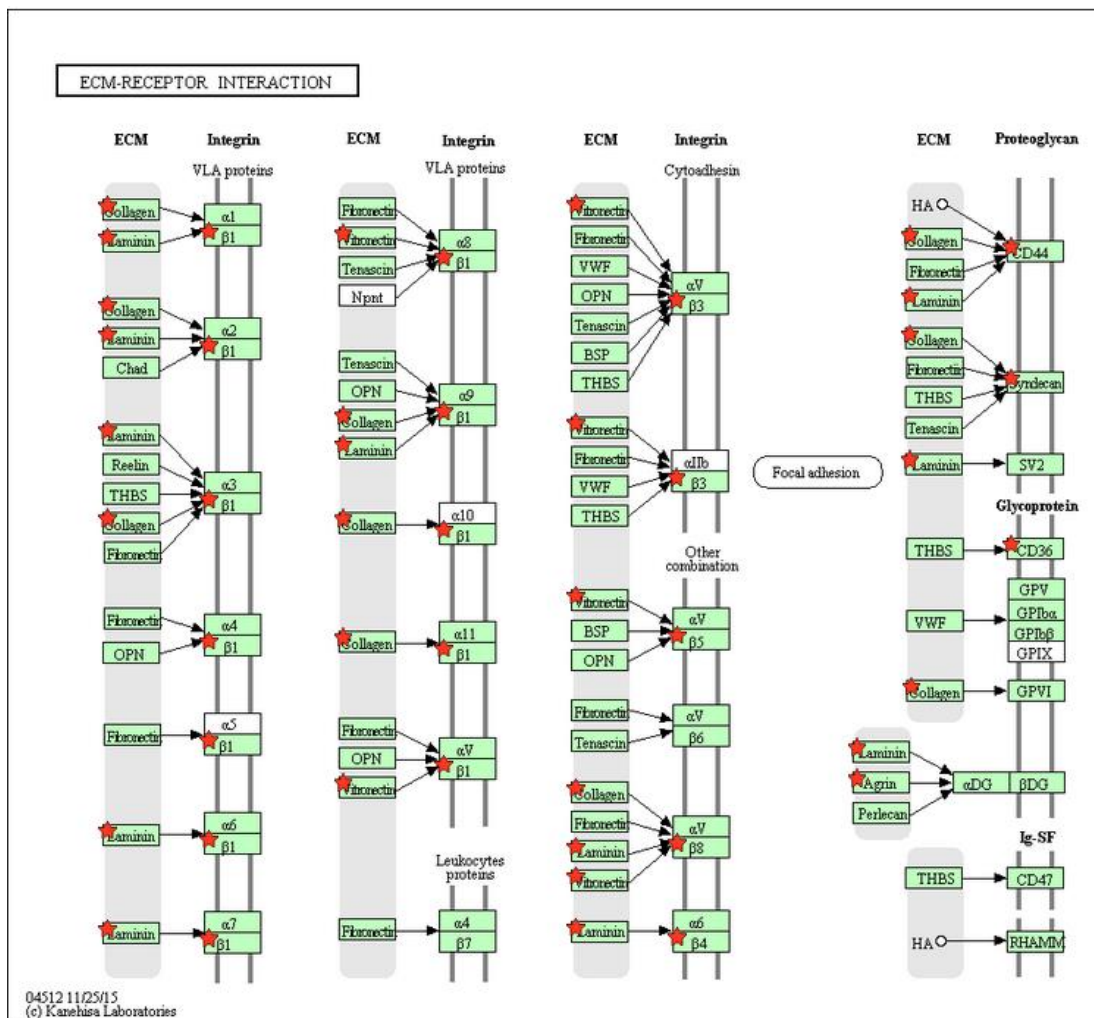
6- Reannotation

7- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

8- Serine/threonine-protein kinase

کلاژن و اینترلوکین ۷ تفاوت بیان معنی‌داری داشتند که هر سه گروه در پیدایش آنژیوژنز و توسعه آن دخالت دارند. بررسی خوشه‌بندی شبکه نشان داد که از بین ۵ خوشه ۳ تای آن معنی‌دار هستند ($P < 0.05$) که شکل خوشه‌بندی به‌همراه ژن‌های هر خوشه در شکل‌های زیر نمایش داده شد.

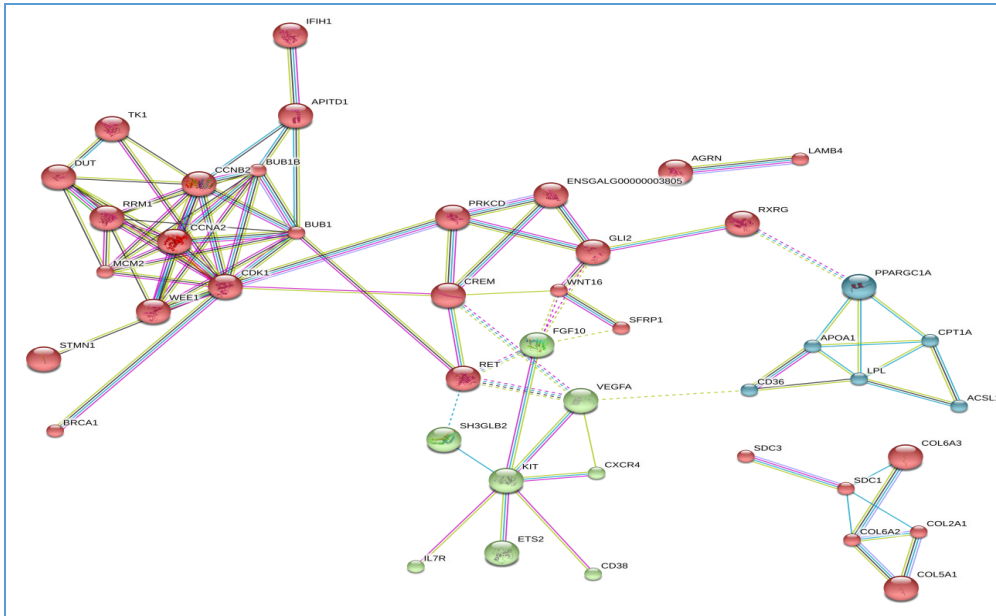
الگوی رگ‌زایی (Vasculature remodeling) و نرخ رشد رگ‌زایی (Vascular tone) در بافت‌های ریه و قلب پرندگان آسیتی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۵۷) در این مطالعه افزایش بیان قابل توجهی در بافت قلب نشان نداده است ($P > 0.05$). ولی ژن‌های مسیر بیولوژیکی گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای، تقسیم سلولی، تولید



شکل ۱- مسیر بیولوژیکی بر هم‌کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای (ECM-receptor interaction) در پایگاه داده KEGG علامت ستاره (★) در شکل ژن‌هایی را نشان می‌دهد که در این پژوهش دارای تفاوت بیان معنی‌دار بوده و در مسیر بیولوژیکی پایگاه داده KEGG شناسایی شدند. بیشتر ژن‌ها مربوط به لیگاند‌هایی از نوع کلاژن و لامینین بودند که با اینترگرین‌ها (Integrin) در ارتباط بودند.

Figure 1- ECM- receptor interaction in KEGG pathway. Star marks (★) show significant DEGs in this study involving ECM-receptor interaction. Most of DEGs related to types of collagen and laminin ligands involving to integrin

۱- اینترگرین‌ها، پروتئین‌های سطح سلولی هستند که در اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. اینترگرین‌ها همچنین به‌عنوان گیرنده‌هایی عمل می‌کنند که می‌توانند باعث فرستاده شدن پیام‌ها به درون سلول‌ها بشوند و موجب تنظیم ریخت سلول، مهاجرت سلول و همچنین چرخه سلول شوند.



شکل ۲- شبکه برهم‌کنش پروتئین- پروتئین ژن‌های مسیر آنژیوژنز Gallus Gallus به‌همراه نمایش خوشه‌های (Clustering) تحت شبکه در پرند‌های حساس به آسیت در خط B لاین آریین (p-value: 1.27e-14). گره‌های هم‌رنگ مرتبط به یک خوشه هستند و گره‌های بزرگ‌تر پروتئین‌هایی هستند که ساختار سه‌بعدی آنها شناسایی شد و گره‌های کوچک پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که ساختار سه‌بعدی آنها هنوز شناسایی نشده است.

Figure 2- Protein- Protein interaction Network in angiogenesis showing clusters in ascites susceptible of B-line pedigree Iranian meat type strain, Arian. Same node color shows the same cluster. large nodes: some 3D structure is known or predicted and small nodes: protein of unknown 3D structure

جدول ۴- آنالیز شبکه ژنی آنژیوژنز در پرند‌های حساس به آسیت خط B لاین آریین

Table 4- Network analysis in angiogenesis in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

6	قطر شبکه Network Diameter	59	تعداد گره Number of Nodes
0.236	مرکزیت شبکه Network Centralization	0.065	تراکم شبکه Network Dencity
3.763	متوسط تعداد مجاور Avg. number of neighbors	0.911	غیر یکنواختی شبکه Network Heterogeneity
0.357	ضریب خوشه‌بندی Clustering coefficient	6	تعداد گره‌های جدا شده Isolated Nodes
		0	تعداد خود حلقه Number of self-loops

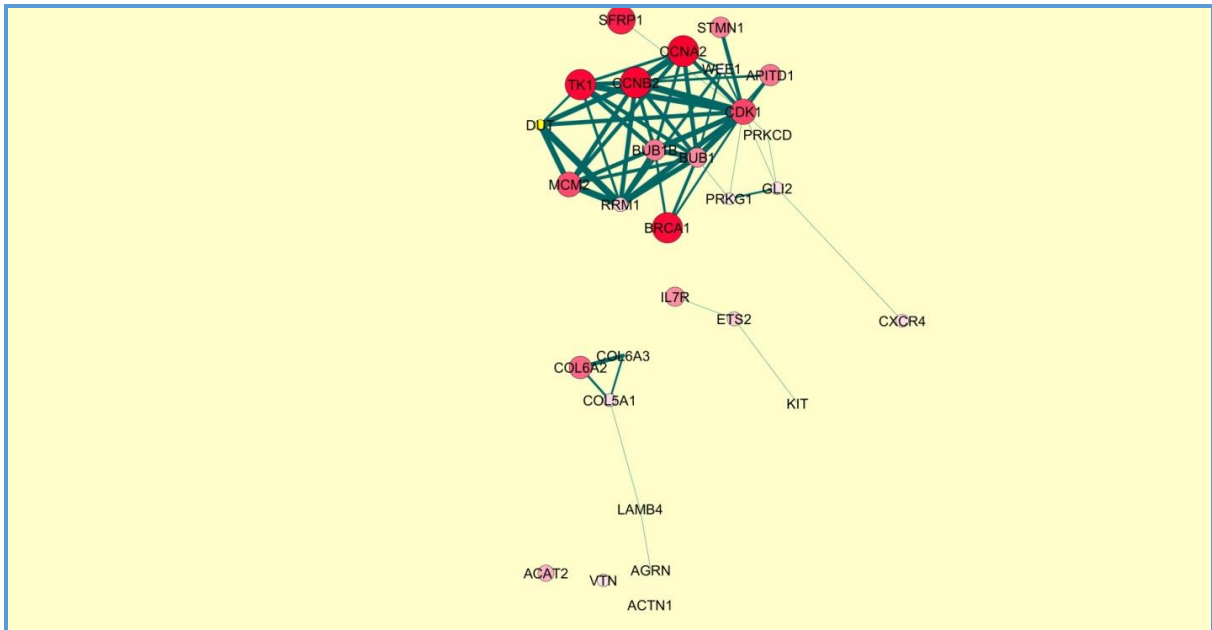
CDK1, DUT^۵, CCNA2, CCNB2, RRM1^۶, BUB1^۷, APITD1^۸, BUB1B^۹, BRCA1^{۱۰}, TK1^{۱۱}, WEE1^{۱۲}, BRCA1, TK1, CDK1 آنها ۱۳ PRKG1 است که از بین آنها

- 5- Deoxyuridine triphosphatase
- 6- Ribonucleotide reductase catalytic subunit M1
- 7- BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase
- 8- Centromere protein S
- 9- BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B
- 10- BRCA1, DNA repair associated
- 11- Thymidine kinase 1
- 12- WEE1 G2 checkpoint kinase
- 13- Protein kinase, cGMP-dependent, type I

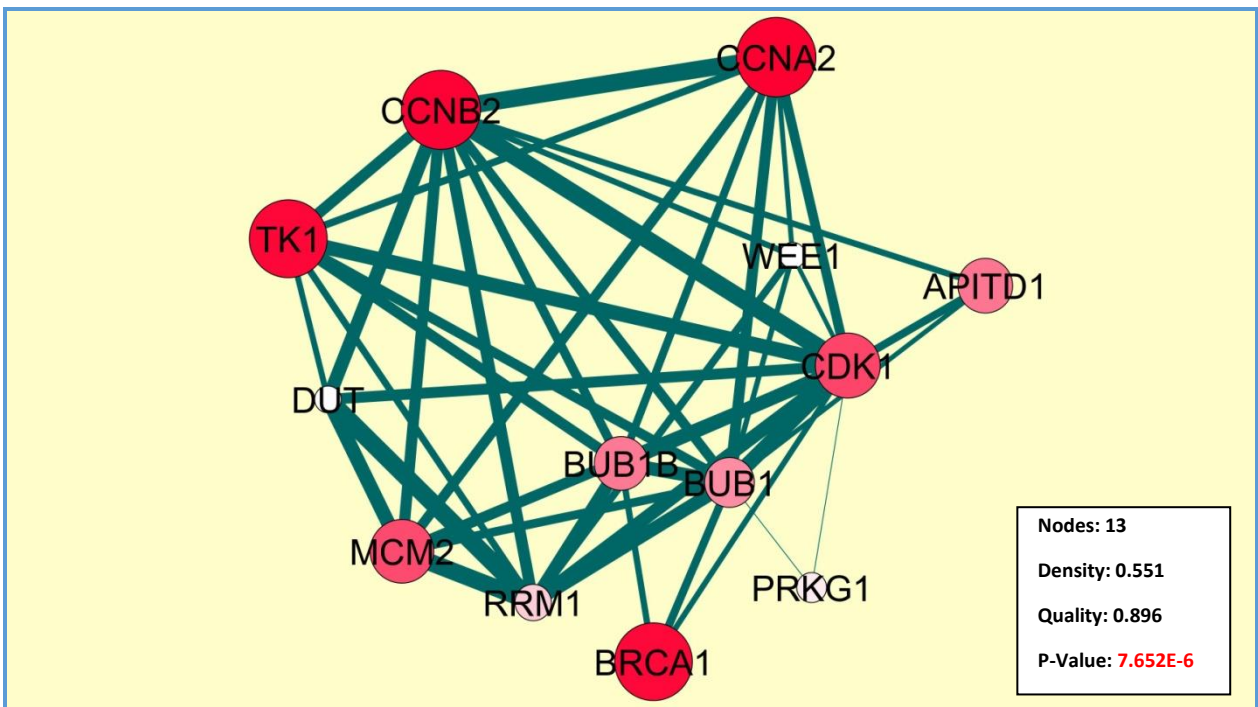
ژن CDK1 یکی از مهمترین عوامل تقسیم سلولی است (۱۱) و (۳۲) که به همراه ژن‌های CCNB1^۱ و CCNB2^۲ می‌تواند تبدیل به عامل فعال‌کننده MPF^۳ تبدیل شود که این عامل می‌تواند سلول را وادار به تقسیم میتوز کند (۱۴). تفاوت بیان معنی‌دار (P<۰/۰۵) این ژن‌ها در بافت قلب پرندگان حساس به آسیت می‌تواند دلیل هایپرتروفی عضله باشد. این خوشه ژنی شامل ۱۳ ژن، MCM2^۴

- 1- Cyclin B1
- 2- Cyclin B2
- 3- Maturation Promoting factor
- 4- Minichromosome maintenance complex component 2

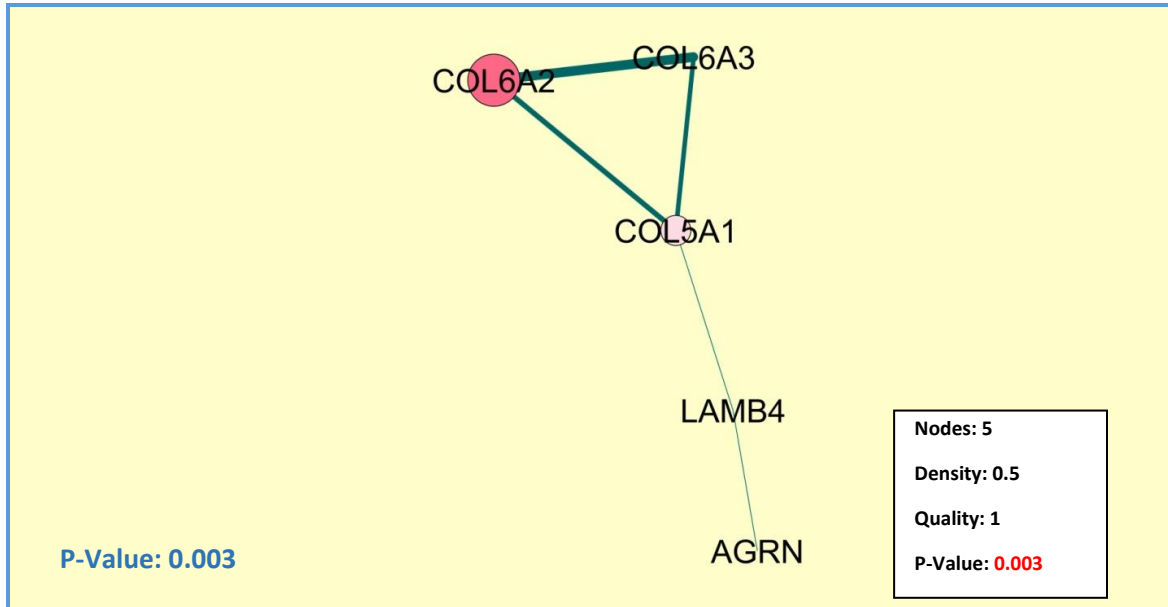
نشانی دهد. نشان دهد. می‌تواند احتمال فعال شدن سیستم MPF را در سلول‌های بافت قلب



شکل ۳ - شبکه اثر متقابلی پروتئین- پروتئین های افزایش بیان در پرندهای حساس به آسیت خط B لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 3- Protein- Protein interaction and co-expression network of up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian



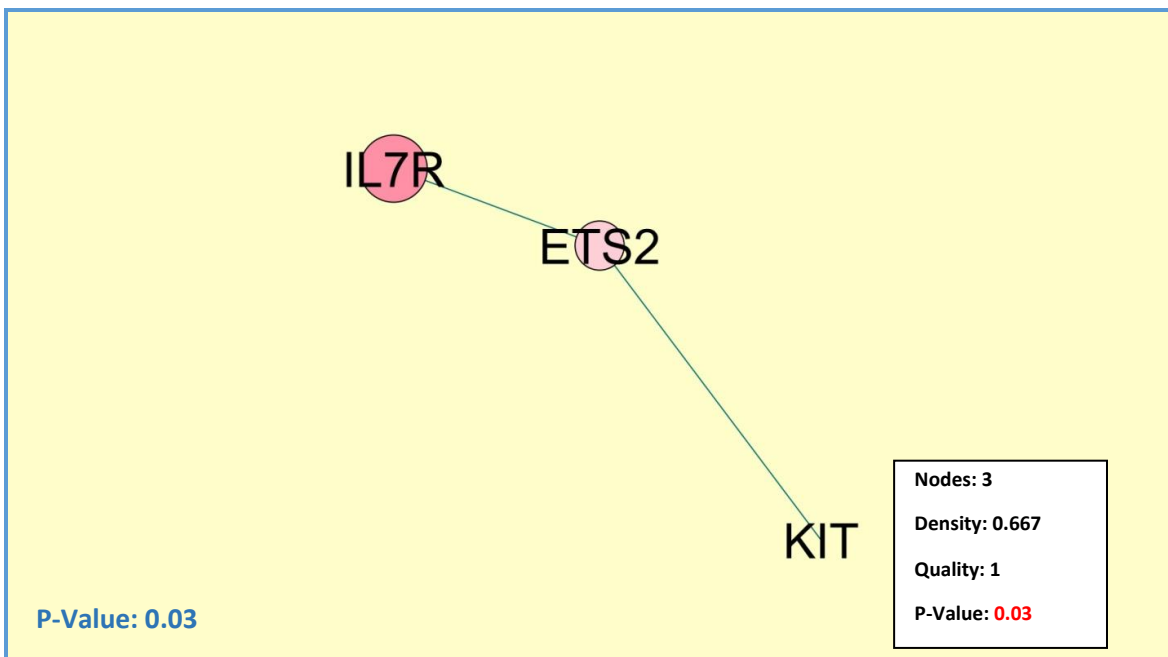
شکل ۴ - خوشه ژنی CDK1 به همراه ژن‌های هم گروه در شبکه در پرندهای حساس به آسیت خط B لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 4- Cluster of CDK1 and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian



شکل ۵ - خوشه ژنی COL6A2 به همراه ژن‌های هم‌گروه در شبکه در پرنده‌های حساس به آسیت لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 5- Cluster of COL6A2 and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

در پیدایش آنژیوژنز داشته باشد. مطالعات نشان داد که در پیدایش رگزایی تومورهای سرطانی، میزان بیان COL4 و COL6 افزایش می‌یابد (۵) ولی در این مطالعه تفاوت بیان COL4 در پرنده‌های حساس به آسیت معنی‌دار نبود ولی COL5 و COL6 در گروه آسیتی تفاوت بیان معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت ($P < 0.05$).

فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آنها برای آنژیوژنز مستلزم تغییر پروفایل پروتئین‌های مایه برون‌یاخته‌ای (ECM) است (۴۵). تغییر مقادیر پروتئین‌ها در خانواده بزرگ کلاژن‌ها بخشی از این تغییرات ECM می‌باشد که می‌توان به COL4، COL5، COL6 و اشاره کرد (۲۲) (شکل ۵). به نظر می‌رسد COL4 نقش بسیار مهمی



شکل ۶ - خوشه ژنی IL7R به همراه ژن‌های هم‌گروه در شبکه در پرنده‌های حساس به آسیت لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 6- Cluster of IL7R and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه شبکه ژنی از داده‌های RNA-Seq بافت قلب پرند‌های مبتلا به آسیت در مقایسه با سالم نشان داد که فرآیند آنژیوژنز در بافت قلب پرند‌های آسیتی در ژن‌های دارای افزایش بیان^۲ به‌طور معنی‌داری نسبت به پرند‌های سالم فعال‌تر بود به‌ویژه در مسیرهای برهم‌کنش گیرنده‌های ماتریکس برون‌یاخته‌ای^۳، تقسیم سلولی و اینترلوکین-۷ که هر سه مسیر بیولوژیکی اخیر در فرآیند آنژیوژنز و مدل‌سازی مجدد شبکه عروقی نقش فعال بازی می‌کنند. لذا پس از شناسایی این شبکه و خوشه‌های مرتبط با آن می‌توان مطالعات گسترده‌تری روی ژن‌های کم بیان^۴ و توام انجام داد و نتایج به‌دست آمده را برای مطالعات اصلاحی به‌کار برد.

تفاوت بیان ژن گیرنده اینترلوکین-۷ یا IL7R^۱ در پرند‌های حساس به آسیت در مقایسه با پرند‌های سالم معنی‌دار بوده (P < ۰/۰۵) (شکل ۶). در مطالعات پیکنز و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد که بیان ژن IL7R در سلول‌های فیبروبلاست در بیماران دارای التهاب مفاصل (روماتیسم آرتری) منجر به تمایز سلولی ماکروفاژها و سلول‌های شده و نقش بسیار مهمی در پیش‌رانه‌های آنژیوژنز (رگزایی در روماتیسم آرتری) دارد (۳۷). IL7R منجر به افزایش بیان ژن IL7 می‌شود که این خود سبب القاء تولید بیشتر IL8 و Ang-1 از ماکروفاژها و ترشح Ang-1 از سلول‌های اندوتلیال می‌گردد (۱۶).

منابع

- 1- Alinaghizadeh, H., M. R. Mohammad Abadi, and S. Zakizadeh. 2010 Exon 2 of BMP15 gene polymorphisms in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2 (1): 69-80. (In Persian).
- 2- Azizian, M., S. Rahimi, M. A. Kamali, Karimi M. A. Torshizi, and M. R. Zobdeh 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.
- 3- Bakar, S. 1996. How to control Ascites in Broilers. *Misset-World Poultry*. 12:55-57
- 4- Balog, J. M., B. D. Kidd, G. R. Huff, W. E. Huff, N. C. Rath, and N. B. Anthony. 2003. Effect of cold stress on broilers selected for resistance or susceptibility to ascites syndrome. *Poultry Science*, 82: 1383-1387.
- 5- Bellon G, T. Caulet, Y. Cam, M. Pluot, G. Poulin, M. Pytlinska, and M. H. Bernard. 1985. Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol*, 66(3):245-252. [PubMed: 3893018]
- 6- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- 7- Bozorgmehri M., B. Shoja doost, A. Akbari, G. Koleidari, and N. Sheikhi. 1996. Guides for poultry disease, Department of education and research of Kowsar economic organization. (In Persian).
- 8- Closter, A. M. 2014. Quantitative genetic analysis of ascites in broilers. PhD thesis. Wageningen University.
- 9- Coble D. J., D. Fleming, M. E. Persia, C. M. Ashwell, M. F. Rothschild, C. J. Schmidt, and S. J. Lamont. 2014. RNA Seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. *BMC Genomics*, 15: 1084.
- 10- Decuyper, E., J. Buyse, and N. Buys. 2000. Ascites in broiler chickens: exogenous and endogenous structural and functional causal factors. *World's Poultry Science Journal*, 56:367-377.
- 11- Diril, M. K., C. K. Ratnacaram, V. C. Padmakumar, T. Du, M. Wasser, and V. Coppola. 2012. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (10):3826-31.
- 12- Dominguez-Avila, N., G. Ruiz-Castañeda, J. González-Ramírez, N. Fernandez-Jaramillo, J. Escoto, F. Sánchez-Muñoz, R. Marquez-Velasco, R. Bojalil, R. Espinosa-Cervantes, and F. Sánchez. 2013. Over and under expression of endothelin 1 and TGF-beta family ligands and receptors in lung tissue of broilers with pulmonary hypertension. *BioMed Research International*, 1-7.
- 13- Druyan, S. 2012. Ascites syndrome in broiler chickens-A physiological syndrome affected by red blood cells. In: *Blood cell-an overview of studies in hematology*. (Edited by Terry E. Moschandreaou). INTECH. CC BY 3.0 license. Chapter, 13pp:243-270.
- 14- Ford H. L. and A. B. Pardee. 1999. Cancer and the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(S32):166-72.

- 1- Interleukin 7 receptor
- 2- UP-Regulated
- 3- ECM-receptor interaction
- 4- Down-Regulated

- 15- Hamal, K. R., F. Robert Wideman, B. Nicholas Anthony, and F. E. Gisela. 2010. Differential gene expression of proinflammatory chemokines and cytokines in lungs of ascites-resistant and -susceptible broiler chickens following intravenous cellulose microparticle injection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133: 250-255.
- 16- Hartgring, S. A., J. A. van Roon, M. Wenting-van Wijk, K. M. Jacobs, Z. N. Jahangier, and C. R. Willis. 2009. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 60(9):2595-605. [PubMed:19714586]
- 17- Hasanpoor K., M. R. Nassiri, G. A. Hoseini Salkandeh, R. Vaez torshizi, A. Pakdel, and H. Kermanshahi. 2016. Transcriptom analysis and gene expression profile of chicken susceptible to ascites. Thesis for PhD degree, Department of animal science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian)
- 18- Javanmard, A., M. R. Mohammadabadi, G. E. Zarrigabayi, A. A. Gharahedaghi, M. R. Nassiry, A. Javadmansh, and N. Asadzadeh. 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.
- 19- Julian, R. J. 1987. The Effect of Increased Sodium in the Drinking Water on Right Ventricular Hypertrophy, Right Ventricular Failure and Ascites in Broiler Chickens. *Avian Pathology*, 16:61-71
- 20- Julian, R. J., G. W. Friars, H. French, and M. Quinton .1987. The Relationship of Right Ventricular Hypertrophy, Right Ventricular Failure and Ascites to Weight Gain Broiler and Roster Chickens. *Avian Diseases*, 31:130-135
- 21- Julian, J. R. 1989. Lung volume of meat-type chickens. *Avian Disease*, 33: 174-176.
- 22- Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6):422-433. [PubMed: 12778132]
- 23- Krishnamoorthy, S., C. D. Smith, A. A. Al-Rubaye, G. F. Erf, R. F. Wideman, N. B. Anthony, and D. D. Rhoads. 2014. A quantitative trait locus for ascites on chromosome 9 in broiler chicken lines. *Poultry Science*, 93: 307-317.
- 24- Luger, D., D. Shinder, D. Wolfenson, and S. Yahav. 2003. Erythropoiesis regulation during the development of ascites syndrome in broiler chickens: a possible role of corticosterone on egg production. *Journal of Animal Science*, 81:784-790.
- 25- Maxwell, M. H., and G. W. Robeson. 1997. World Broiler Ascites Survey 1996. *Poultry Int.* April. 1 6-30
- 26- Moazeni, S., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Shahrababak, A. Koshkoieh, and F. Bordbar, 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.
- 27- Moazeni, S. M., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrababak, and A. K. Esmailzadeh. 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.
- 28- Mohammadabadi, M. R., M. Nikbakhti, H. R. Mirzaee, A. Shandi, D. A. Saghi, M. N. Romanov, and I. G. Moiseyeva. 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.
- 29- Mohammadi, A., M. R. Nassiry, J. Mosafer, M. R. Mohammadabadi, and G. E. Sulimova. 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.
- 30- Mohammadifar, A., and M. R. Mohammadabadi. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iranian Journal of Animal Science*, 42(4): 337-344.
- 31- Mousavizadeh, A., M. R. Mohammad Abadi, A. Torabi, M. R. Nassiry, H. Ghiasi, and A. K. Esmailzadeh. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Tali goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7 (1): 51-53.
- 32- Nigg, E. A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 17(6):471-80.
- 33- Odom, T. W. 1993. Ascites Syndrome: Overview and Up-To-Date. *Poultry Digest*, 52:14-22.
- 34- Olkowski, A. A., C. Wajnarowicz, B. M. Rathgeber, J. A. Abbott, and H. L. Classen. 2003. Lesions of pericardium and their significance in the aetiology of heart failure in broiler chick-ens. *Research in Veterinary Science*, 74:203-211.
- 35- Pakdel, A., J. A. Van Arendonk, A. L. Vereijken, and H. Bovenhuis. 2002. Direct and maternal genetic effects for ascites-related traits in broilers. *Poultry Science*, 81(9):1273-9.
- 36- Pavlidis, H. O., J. M. Balog, L. K. Stamps, J. D. Hughes, W. E. Huff, and N. B. Anthony. 2007. Divergent selection for ascites incidence in chickens. *Poultry Science*, 86:2517-2529.
- 37- Pickens, S. R., N. D. Chamberlain, M. V. Volin, R. M. Pope, N. E. Talarico, A. M. Mandelin II, and S. Shahrara. 2011. Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis *Arthritis Rheum.* 2011 October; 63(10): 2884-2893. doi:10.1002/art.30493.
- 38- Rabie, T., R. P. M. A. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, T. Veenendaal, J. J. van der Poel, J. A. M. Van Arendonk, A. Pakdel, and M. A. M. Groenen. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *International Society for Animal Genetics*,

- Animal Genetics, 36: 468-476.
- 39- Rabie, T., R. P. M. A. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, T. Veenendaal, J. J. van der Poel, J. A. M. van Arendonk, A. Pakdel, and M. A. M. Groenen. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *Animal Genetics*, 36: 468-476.
- 40- Rabie, T., R. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, A. Veenendaal, J. J. Van der Poel, J. A. M. Van Arendonk, and M. A. M. Groenen. 2007. Pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers: validation and fine-scale mapping of quantitative trait loci affecting PHS using advanced intercross line. In *utilisation of diversity in land use systems: Sustainable and organic approaches to meet human needs*. Tropentag, October 9-11, 2007, Witzzenhausen.
- 41- Rowland, K., A. Alban, N. B. Anthony, and B. W. Kong. 2013. Whole-genome sequencing of ascites resistant and susceptible lines of broilers. *Poultry Science*, 92(E-Suppl. 1): P. 53.
- 42- Schmidt, C. J., M. E. Persia, E. Feierstein, B. Kingham, and W.W. Saylor. 2009. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1950s. *Poultry Science*, 88: 2610-2619.
- 43- Shahdadnejad, N., M. R. Mohammadabadi, and M. Shamsadini, 2016. Typing of *Clostridium Perfringens* Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. *Genetics in the 3rd millennium*, 14 (4).
- 44- Shi, S., Y. Shen, Z. Zhao, Z. Hou, Y. Yang, and H. Zhou .2014. Integrative analysis of transcriptomic and metabolomic profiling of ascites syndrome in broiler chickens induced by low temperature. *Molecular BioSystems*, 10: 2984-2993. DOI: 10.1039/c4mb00360h PMID: 25178933.
- 45- Shi S., Y. Shen, S. Zhang, Z. Zhao, Z. Hou, H. Zhou, J. Zou, and Y. Guo. 2017. Combinatory Evaluation of Transcriptome and Metabolome Profiles of Low Temperatureinduced Resistant Ascites Syndrome in Broiler Chickens. *Scientific Reports*, 7: 2389. DOI: 10.1038/s41598-017-02492-8.
- 46- Shojaei, M., M. R. Mohammad Abadi, M. Asadi Fozi, O. Dayani, A. Khezri, and M. Akhondi. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2: 67-73
- 47- Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, and C. von Mering. 2015. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D447–D452. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1003>.
- 48- Tekeli, A. 2014. Effects of ascites on blood gas, blood oximetry parameters and heart sections of broilers growth at high altitude. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24:998-1002.
- 49- Trapnell, C., L. Pachter, and S. Salzberg. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25: 1105-1111.
- 50- Trapnell, C., B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold, and L. Pachter. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: 511-515.
- 51- Trapnell, C., D. G. Hendrickson, M. Sauvageau, L. Goff, J. L. Rinn, and L. Pachter. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnolgy*, 31: 46-53.
- 52- Wang, D., J. C. Anderson, C. L. Gladson. 2005. The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors. *Brain Pathol*, 15(4):318-326. [PubMed: 16389944]
- 53- Wideman, R. F. 1998. Causes and control of ascites in broilers. In: *National Mtg. Poultry Health and Processing*. Delmarva Poultry Industry Inc. Georgetown, DE. 33:56-85.
- 54- Yang, F., H. Cao, Q. Xiao, X. Guo, Y. Zhuang, and C. Zhang. 2016. Transcriptome Analysis and Gene Identification in the Pulmonary Artery of Broilers with Ascites Syndrome. *PLoS ONE* 11(6): e0156045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156045>
- 55- Zamani, P., M. Akhondi, M. R. Mohammadabadi, A. A. Saki, A. Ershadi, M. H. Banabazi, and A. R. Abdolmohammadi. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1812-1817.
- 56- Zandi, E., M. R. Mohammadabadi, M. Ezzatkah, and A. K. Esmailzadeh. 2014. Typing of Toxigenic Isolates of *Clostridium Perfringens* by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 509-514.
- 57- Zhao, Y., X. M. Meng, Y. J. Wei, X. W. Zhao, D. Q. Liu, H. Q. Cao, C. C. Liew, and J. F. Ding. 2003. Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I. *Journal of Molecular Medicine*, 81: 297-304.
- 58- Zhou, H. J., Y. Wang, S. J. Lamont, and P. Ross. 2012. Re-annotation of chicken genome using RNA-seq data. *Poultry Science*, 92(E-Suppl. 1).

Gene Expression Network Analysis on Angiogenesis Pathway in Low Temperature-Induced Ascites Susceptible Chickens in B-line Pedigree of Iranian Meat-Type Strain, Arian

V. Taghizadeh¹- M. R. Nassiri^{2*}- M. Tahmoorespur³- M. R. Bakhtiarizadeh⁴- A. Javadmanesh⁵

Received: 27-06-2017

Accepted: 07-08-2017

Introduction

Ascites syndrome is a metabolic disorder in late ages of meat-type chickens. The only commercial broiler strain of Iran, Arian, has been incurred by this syndrome during a couple of decades ago. Due to susceptibility to ascites and some poor performance issues this strain are wiping out from indigenous market. Prevalence of ascites syndrome in commercial broiler of Arian is nearly 10% in average and in paternal lines it gets more fatality. Role of genetic factors in arising ascites has been proven by former researchers. Fighting against this syndrome through old methods are expensive and time consuming. Since presence of hypertrophy in a tissue needs to make facilities such as blood vessels to providing oxygen and nutrients so studying on angiogenesis pathway and its key important genes was directed. Whereas numerous organs engage the disease and among them heart has key role for initiating and developing the disease, so genomic study dealing with next generation sequencing (NGS) technology has been conducted to identify genes relating to angiogenesis and hypertrophy in right ventricle of ascites susceptible birds.

Materials and methods:

464 one-day-old chicks from B-line pedigree of Arian strain have been reared up to 21 days at the same rearing and nutritional conditions. At the age of 21 the rearing house was divided to 3 sections. Normal and cold sections at the ends of the house and buffer section at the middle. 464 chickens were transferred from normal to the cold section and kept the ambient temperature lower than 16 degrees for inducing ascites. 120 birds from cold section were selected randomly and slaughtered at the age of 42. Those of birds having ascites symptoms classified to ascites susceptible (As) and the other assigned to healthy (He). Samples of right ventricle was picked up and stored with RNAase-Later in liquid N tank. Then 12 As samples and 12 He samples were chosen for extracting total RNA by Biozol kit. After that every 6 samples in each groups pooled together and finally 2 As and 2 He samples prepared to make cDNA libraries for high throughput sequencer machine, Illumina HiSeq 2000. RNA integrity score (RIN) were more than 7 for all samples. All small RNAs such as microRNAs, rRNAs and tRNAs were eliminated by oligo dt beads and finally all mRNAs was used for preparing library. cDNAs as long as 200 bp were selected for library. Sequencing has been done by BGI Company. For mapping, aligning, and DE analyzing several softwares were used such as: Tophat, cufflinks, cuffmerge and cuffdiff. Then significant DEGs imported to String for creating gene expression network and use DAVID 6.8 for investigation gene annotation and pathway analysis and finally Cytoscape v. 3.5.1 was used for network and cluster analysis.

Results and Discussion:

Nearly 90% of reads mapped on genome reference. In ascites group among 125 DEGs 79 genes was up-regulated and 46 loci was down-regulated. Among 125 significant differentially expressed genes (FDR<20%) between As and He birds 59 genes were identified in a pathway in KEGG database. Gene ontology has been shown that the most significant biological process term containing 9 genes in term of gga04512: ECM-receptors interaction. The gene expression network analysis shows that average node neighboring was 3.763, network heterogeneity was 0.9 and network centralization was 0.236. Cluster analysis depicted 3 significant clusters

1- PhD Student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

3- Professor, Department of Animal Science and, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, College of Aburairhan, Iran

5- Assistant Professor, Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*- Corresponding author email: nassiry@gmail.com)

involving key rule in angiogenesis including Cyclin-dependent Kinase1 (CDK1), ECM-receptors interaction and Interleukin 7 (IL7) (p -value <0.05). Up regulating of CDK1 with CCNB1 and CCNB2 may activated maturation promoting factor (MPF) that eventually induce cell division and proliferation in endothelial cells (ECs). Up regulating COL6A2 shows its roles in remodeling of ECM-receptors that in turn involving in proangiogenesis process in right ventricle hypertrophy in As birds. IL7 up regulated significantly (P -value <0.05) in As birds. This factor can induce IL8 and Ang-1 secretion from ECs. These factors have key important role for vascular remodeling and vascular tone in proangiogenesis and angiogenesis process. Studying on gene networks in susceptible bird's heart cells has been shown that over expression in angiogenesis related genes was seen significantly in susceptible birds especially in ECM-receptor interaction, Cell division and IL-7 pathways as well. All these recent pathways rule actively in angiogenesis process and vascular network remodeling. So after finding these networks and related clusters it can be possible to find more extended studies on down regulated genes in apart or together for using breeding improvement objectives.

Key words: Angiogenesis, Ascites, Gene Network, Gene Ontology, Pathway Analysis, RNA-Seq