

## آنالیز بیان ژن‌ها و رسم شبکه ژنی آپوتوزیس در نژادهای مرغ بومی اصفهان و تجاری راس تحت داده‌های RNA-seq

ژیلا حسانی<sup>۱</sup> - محمدرضا نصیری<sup>۲\*</sup> - محمدرضا بختیاری زاده<sup>۳</sup> - مجتبی طهمورث پور<sup>۲</sup> - علی جواد منش<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴

### چکیده

در این مطالعه با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA-seq، به دست آمده از ۱۲ قطعه مرغ ماده، بومی اصفهان و تجاری راس به بررسی ژن‌های با بیان متفاوت، به شناسایی مهمترین ژن‌های مؤثر در سیستم آپوتوزیس و تقویت آن پرداخته شد. در این بررسی کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC سنجیده شد. پس از حذف خوانش‌های بی کیفیت، با استفاده از نرم افزار Trimmomatic، نقشه یابی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار TOP HAT2 انجام گرفت. شبکه ژنی آپوتوزیس توسط پایگاه استرینگ رسم و آنالیز شد. تحلیل شبکه نشان‌دهنده معنی‌داری شبکه بوده و میزان و چگونگی ارتباط ژن‌ها مشخص شد. نتایج حاصل از بررسی ترنسکریپتوم‌های سیستم ایمنی با استفاده از Cuffdiff نشان داد که از بین ۱۳۲۸ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار در سیستم ایمنی، ۱۱ ژن مربوط به آپوتوزیس بود. همچنین ژن PIK3CD دارای بیشترین مقدار بیان در دو نژاد بومی و تجاری و PIK3CB دارای کمترین مقدار بیان در نژاد بومی بودند. بیشترین معنی‌داری در فرایندهای بیولوژیکی بر اساس آماره Bonferroni، مربوط به مسیر علامت‌دهی وابسته به اینوزیتول و بر اساس آماره P-value مربوط به مسیر تنظیم موضعی کردن پروتئین به سمت هسته می‌باشد. آنالیز شبکه ژنی آپوتوزیس، منجر به شناسایی دو زیر شبکه (کلاستر) گردید که ژن شاخص آنها به ترتیب PIK3R1 و IL1R1 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوتوزیس، نژاد مرغ بومی و راس، هستی‌شناسی ژن‌ها، RNA-seq.

### مقدمه

نفع خود تولید می‌کنند و سیستم ایمنی نیز برای مقابله با بسیاری از پاتوژن‌ها از جمله ویروس‌ها از این مسیر استفاده می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند هر عاملی که از رشد و تکامل سلول‌ها جلوگیری کند، مانند قرارگیری در معرض عوامل توکسیک یا انجماد، ممکن است زمینه را برای بروز آپوتوزیس در آن‌ها فراهم کند. سیستم ایمنی در انتهای پاسخ ایمنی به حالت عادی برمی‌گردد که عمدتاً ناشی از مرگ نوادگان لنفوسیت‌های تحریک شده با آنتی‌ژن در اثر آپوتوزیس است (۲). بیشتر لنفوسیت‌های تحریک شده با آنتی‌ژن متحمل آپوتوزیس ۱ می‌شوند، شاید به این دلیل که بقاء لنفوسیت‌ها، وابسته به آنتی‌ژن و فاکتورهای رشد تولید شده توسط آنتی‌ژن است و با حذف آنتی‌ژن توسط پاسخ‌های ایمنی، لنفوسیت‌ها از محرک‌های ضروری برای ادامه حیات محروم می‌گردند. جهش‌های سوماتیک گاهی سبب از بین رفتن توانایی اتصال به یک آنتی‌ژن در یک سلول B شده که در این صورت سلول با مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوتوزیس از بین خواهد رفت (۱۴، ۱۷ و ۲۱). در واقع بسیاری از گیاهان، جانوران و بسیاری از یوکاریوت‌های تک سلولی از مرگ برنامه‌ریزی شده

در سال ۱۹۷۲ هنگامی که کر (Kerr) و همکاران برای نخستین بار تفاوت میان نکروز و آپوتوزیس ۶۵ را مشاهده کردند، گمان نمی‌بردند که پدیده اکتشافی آنها روزی سرلوحه مطالعات ضد سرطان قرار گیرد. مکانیسم آپوتوزیس یکی از اصلی‌ترین راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته است که در بدن موجودات پرسلولی و حتی تک سلولی انجام می‌شود (۱۵ و ۱۷). بسیاری از ویروس‌ها محصول‌های خاصی را جهت کنترل این فرایند زیستی به

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

۲- استاد، گروه آموزشی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

۳- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران،

۴- استادیار، گروه آموزشی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

\*- نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v1397i1.66151

شده و به واسطه مهار مستقیم آپوپتوزیز به پایداری سلول‌های سرطانی کمک می‌نماید. به طور معکوس در برخی سرطانها کاهش بیان پروتئین پروآپوپتوتیک BAX وجود دارد و جهش در ژن‌های bax سبب تحریک تشکیل تومور می‌شود (۱۵ و ۳۱).

پروش 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 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 (۲۵). 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) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (۲۵). بنابراین، با توجه به اهمیت این پدیده در گونه‌های مختلف از جمله پرندگان و مخصوصاً مرغان و اهمیت اقتصادی آنها، فهم کامل از رشد و عملکرد سیستم ایمنی و آپوپتوزیز در پرندگان لازم و ضروری به نظر می‌رسد. این اطلاعات کاربرد مستقیم در برنامه‌های اصلاحی خواهد داشت و آگاهی از شبکه سیستم ایمنی که همراه با فرایند آپوپتوزیز عملکرد خود را تقویت و کامل می‌کند و مقاومت به بیماری می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مرتبط با تولید، کمک فراوانی کند. بنابر این یک روش سازگار با محیط زیست برای حفظ سلامت طیور لازم و ضروری است (۲۶). با توجه به پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای که در روش‌های توالی‌یابی از جمله روش توالی‌یابی RNA-seq انجام شده است، لذا در این پژوهش به بررسی ژن‌های درگیر در آپوپتوزیز در دو نژاد بومی اصفهان و تجاری راس به منظور ارزیابی تفاوت بیان ژن‌ها پرداخته شد. از آن جهت که امروز علاقه فراوانی به گونه‌های بومی، میان تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان ایجاد شده است و همچنین این نژادها در شرایط اقلیمی نامناسب دارای مقاومت منحصر به فردی بوده و قابلیت فراوان برای تولید محصولاتی با طعم و بوی مطلوب دارند و تقاضای قابل توجهی برای تولیدات مرغ‌های بومی مشاهده می‌شود، همچنین این گونه‌ها به دلیل جایگزینی با پرندگان غیربومی و بهبود یافته تا حدودی در خطر انقراض نیز قرار گرفته بودند (۱۳، ۳۴). هم چنین اگرچه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (۲۳، ۲۴، ۲۵، ۳۵ و ۳۸)، اما تاکنون ژن‌های درگیر در آپوپتوزیز در دو نژاد بومی اصفهان و تجاری راس

سلولی در جهت مکانیسم‌های رشدی - نموی و دفاعی استفاده می‌کنند (۱۰، ۲۶ و ۳۷). آپوپتوزیز در مراحل متفاوت تکامل زیستی یک موجود زنده ایفای نقش کرده و اگر از تنظیم خارج شود، بیماری‌های گوناگونی را موجب می‌شود (۱۰). برای نمونه، فعالیت بیش از حد طبیعی آپوپتوزیز سبب بیماری‌های دژنره کننده مانند آلزایمر و پارکینسون می‌گردد (۲۸ و ۲۹). اخیراً درمان سلول‌های سرطانی با وارد کردن ریز RNAهایی که در ایجاد آپوپتوزیز نقش دارند، در سطح پژوهشی مطرح می‌باشد (۲۸). فرایند آپوپتوزیز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، به عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن‌هاست که با هدف حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به کار می‌رود و در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی یا بیماری‌ها مداخله می‌کند. اصلی‌ترین تفاوت این مسیر با نکروز سلولی، در عدم ایجاد التهاب و اثر محدود به سلول‌های هدف است.

چان یان ون<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۷) به دنبال اجرای فن‌آوری با توانش بالا (RNA-seq) به بررسی تفاوت بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها پرداختند طی این بررسی به منظور تبیین مسیرها و ژن‌های درگیر در آپوپتوزیز سلول‌های ماهیچه‌ای قلب در مرغ، سلول‌های مذکور در معرض DTT (dithiothreitol) که ایجادکننده آپوپتوزیز به شکل کاذب می‌باشد، قرار گرفتند. سپس به دنبال اجرای فن‌آوری با توان بالا (RNA-seq) به بررسی تفاوت بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها پرداختند و با استفاده از تفاوت بیان رونوشت‌های مربوط، شبکه برهم کنشی پروتئین-پروتئین برای آپوپتوزیز، در مرغ رسم شد. نتایج این مطالعه نشان داد، آغاز آپوپتوزیز بیشتر وابسته به کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ بود. از سوی دیگر مرحله اساسی آپوپتوزیز به کاسپاز ۳ وابسته بود. مهار آپوپتوزیز نیز به طور اساسی وابسته به Bcl-2، IAP و S/VA بود. همچنین مسیرهای علامت‌دهی تغییر یافته شامل WNT و MAPK می‌باشد که در زمان مهار آپوپتوزیز توسط Bcl-2 و IAP و S/VA رخ داد (۶). فعال شدن کاسپاز به میزان زیادی، مختص آپوپتوزیز است و تعیین فعالیت کاسپازها برای تمایز بین نکروز و آپوپتوزیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در واقع ارزیابی فعالیت کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوزیز مطرح است (۳۱). در طول سال‌های اخیر مشخص شده که تشکیل تومور متحصراً ناشی از تکثیر بیش از حد سلولی به دلیل فعال شدن آنکوژن‌ها نیست بلکه تا میزان مشابهی به دلیل اختلال در مسیرهای کنترل آپوپتوزیز می‌باشد. اکثر سلول‌های توموری به دلیل بیان نامناسب پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک یا غیرفعال شدن فاکتورهای پروآپوپتوتیک نسبت به آپوپتوزیز مقاوم هستند. bcl-2 اولین ژن شناخته شده مرتبط با آپوپتوزیز بود که در تشکیل تومور نقش داشت. افزایش بیان bcl-2 در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده

استفاده از نرم افزار<sup>۴</sup> TOPHAT2 ورژن ۰.۱.۱ انجام شد (۱۸).

### هم گذاری رونوشتها با استفاده از Cufflinks

به منظور تشکیل رونوشت<sup>۵</sup> مربوط به مطالعه حاضر، از بسته نرم افزاری Cufflinks نسخه<sup>۶</sup> ۲.۲.۱ استفاده شد (۳۶). همچنین با کمک این نرم افزار فرایند یک پارچه کردن<sup>۷</sup> تعداد قطعات مکان یابی شده نسبت به یک لوکوس خاص انجام شد.

### ادغام رونوشت‌های مربوط به هر نمونه و تشکیل

#### رونوشت جدید

نرم افزار cuffmerge دارای بسته<sup>۸</sup> نرم افزاری به نام Cuffmerge می باشد که می تواند رونوشت های حاصل از Cufflinks را ادغام کرده و یک فایل رونوشت جدید مرجع ادغام شده، ایجاد کند. همچنین این بسته با راه اندازی Cuffcompare منجر به پاک سازی قطعات رونویسی<sup>۹</sup> که به احتمال زیاد خطای آزمایش محسوب می شوند، خواهد شد.

### آنالیز تفاوت بیان ژن

به این منظور از نرم افزار Cuffdiff استفاده شد که علاوه بر بیان ژن، قابلیت اندازه گیری بیان ایزوفرم های مختلف یک ژن را نیز دارد. کند بنابراین با استفاده از این نرم افزار ژن های با بیان متفاوت بین دو نژاد شناسایی شد. ژن های با مقدار  $P < 0.05$  که با روش FDR برای خطای چند تستی تصحیح شده بودند به عنوان ژن های با بیان متفاوت در نظر گرفته شدند (۴).

### هستی شناسی ژن

به منظور بررسی ویژگی های ساختاری و عملکردی ژن های معنی دار در دو نژاد از پایگاه اطلاعاتی David استفاده شد. این پایگاه با اتصال به پایگاه های دیگری مانند GO<sup>۸</sup> و KEGG<sup>۹</sup> به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن های معنی دار می پردازد. عبارات با مقدار  $p < 0.05$  که با روش FDR برای خطای چند تستی تصحیح شده بودند، به عنوان عبارات معنادار در نظر گرفته شد (۷). در این رابطه ژن های آپوتوزیز حاصل از نتایج توالی یابی RNA-seq به پایگاه داده استرینگ ورژن ۱۰/۵ ارائه شد و با هدف دست یابی به آماره های شبکه و مجسم سازی شبکه از نظر تبیین نقش ژن ها، از

مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا بر آن شدیم تا با مقایسه ژن های سیستم ایمنی ذاتی که شامل ژن های آپوتوزیز نیز می باشد بین دو نژاد بومی اصفهان و تجاری راس به بررسی تفاوت های ژنتیکی آنها بپردازیم از سوی دیگر، با توجه به پیشرفت های قابل ملاحظه در روش های توالی یابی از جمله روش توالی یابی RNA-seq، لذا در این پژوهش با استفاده از این روش بررسی ژن های در گیر در آپوتوزیز در دو نژاد بومی اصفهان و تجاری راس با هدف ارزیابی تفاوت بیان ژن ها انجام شد.

### مواد و روش ها

در این مطالعه به تعداد ۱۲ قطعه نژاد گوشتی جوجه های ماده بومی سویه اصفهان و سویه تجاری راس در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد که در کشور ایران، استان خوزستان و شهر دزفول قرار دارد، پرورش داده شدند و در سن ۴۷ روزگی خون گیری از ورید بالی به میزان ۲ تا ۳ سی سی در لوله های خلاء دار حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) انجام گرفت.

پس از آن نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت استخراج RNA به آزمایشگاه منتقل شدند. RNA تام توسط کیت تجاری Trizol<sup>۱</sup> مطابق با پروتکل کارخانه استخراج شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، سه نمونه RNA مختلف با غلظت یکسان از هر نژاد با هم ادغام شده<sup>۲</sup> و در نهایت ۲ نمونه ادغام شده از هر نژاد آماده شد. ۴ نمونه آماده شده جهت توالی یابی paired-end به شرکت BGI چین ارسال شدند. فرایند توالی یابی توسط سیستم با توانش بالای Illumina<sup>۳</sup> انجام شد. سنجش کیفیت داده ها بر روی فرمت fastq و با استفاده از نرم افزار FastQC نسخه 0.11.2 تحت سیستم عامل لینوکس انجام شد. همچنین ویرایش داده های خام به صورت حذف آداپتورها و یا حذف و کوتاه نمودن خوانش های بی کیفیت، با استفاده از نرم افزار Trimmomatic نسخه 0.35 انجام گردید (۴).

### نقشه یابی داده های خام RNA-seq (خوانش ها)

در این مطالعه، از ژنوم مرجع مربوط به مرغ ویرایش چهارم و فایل های حاشیه نویسی شده با فرمت GFT دانلود شده از Ensembl به آدرس <http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html> استفاده شد. هم ردیفی خوانش های کوتاه، پس از سنجش کیفیت، با

5- Transcriptom  
6- Normalize  
7- Tansfrag  
8- Gene Ontology Consortium  
9- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

1- Invitrogen, USA  
2- Pool  
3- Illumina Hiseq 2000 sequencing platform  
4- Hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts

بومی داشت، با این حال بیان آن از ژن متناظر خود در مرغ تجاری کمتر بود. با توجه به اینکه شرایط محیط رشد مرغان بومی و تجاری یکسان بوده اما اثرات متفاوت روی ژن‌های دو نژاد داشته است، زیرا در نژادهای بومی نسبت به شرایط محیطی مقاومت بیشتری وجود دارد و ژن‌های آپوپتوزیز نیز بخشی از سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند، می‌توان بیان کمتر ژن‌های مرغان بومی را به تغییرات اپی ژنتیک نسبت داد، زیرا تغییراتی مانند هیپرمتیلاسیون در نواحی پروموتور ژن-های مهم به منظور مراقبت و پیشگیری انجام می‌گیرد (۲۷). همچنین جسینگ و همکاران در بررسی خود روی موش‌های GHRKO<sup>3</sup> و نرمال نشان دادند که سطح بیان ژن‌های آپوپتوزیز معین مانند caspase-9, caspase-3, Smac/DIABLO, bax و پروتئین‌های مهم آپوپتوزیز در ماهیچه‌های اسکلتی موش‌های CHRKO در مقایسه با موش‌های نرمال کاهش یافته است که احتمالاً این فرایند می‌تواند به عنوان اثر محافظتی ذاتی برای طول عمر این حیوانات در نظر گرفته شود (۹). موش‌های GHRKO به دلیل اختلال هدفمند ژن گیرنده هورمون رشد به این هورمون مقاوم هستند.

همچنین در پژوهش‌های اخیر مشخص شده است، استرس گرمایی که از عوامل بارز محیطی می‌باشد، نیز روی بیان ژن‌ها در نژادهای مختلف تاثیرگذار است (۳۲). ریمولدی، سمیونا و همکاران اثر استرس گرمایی مزمن را روی بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند Catalase و همچنین روی پروتئین‌های شوک حرارتی مانند CASP6 را در کبد دو نژاد مختلف شامل Red JA و Ross بررسی کردند و براساس یافته‌های این مطالعه بیان ژن‌ها، تحت تاثیر شوک حرارتی قرار گرفتند، به طوری که در نژاد راس سطوح بیان ژن CASP6 کاهش و در نژاد Red JA سطوح بیان ژن Catalase افزایش نشان داد. در حالی که سطوح بیان ژن‌های گیرنده گلوکوکورتیکوئید (NR3C1) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در هر دو نژاد تغییری نشان نداد.

### آنالیز مسیرهای ژن‌های دارای تفاوت بیان

نتایج KEGG از ژن‌های دارای بیان بالاتر، منجر به شناسایی یک مسیر تحت عنوان Regulation of actin cytoskeleton شد. با این حال ۱۷ مسیر از جمله مسیر آپوپتوزیز که موضوع بحث در این مقاله می‌باشد، بر اساس P-value معنی‌دار شده‌اند ( $P \leq 0.05$ ). همچنین نتایج KEGG در مورد ژن‌های آپوپتوزیز ۱۲ ژن را ارائه داد که ۱۱ ژن معنی‌دار شده و یک ژن نیز بدون بیان بود. تفاوت بیان ژن‌ها در نژاد تجاری در مقایسه با نژاد بومی بر اساس Fold

نرم‌افزار سایتواسکیپ ورژن ۱.۵.۳ استفاده شد. به منظور رسم شبکه و تبیین نقش ژن‌ها در شبکه ژنی، خروجی استرینگ به نرم‌افزار سایتواسکیپ ارائه شد و پس از آنالیز شبکه و مشخص شدن آماره‌های شبکه، از نوار ابزار APPS گزینه CYTONCA شبکه بر اساس درجه ارزش ژن<sup>۱</sup> و مرکزیت بینابینی<sup>۲</sup> ویرایش شد. به این ترتیب از نظر ارزش، گره‌های بزرگ نشان‌دهنده ژن‌هایی یا پروتئین‌هایی هستند که درجه کنترل‌کنندگی بیشتری در شبکه دارند، و از نظر مرکزیت بینابینی گره‌های با رنگ روشن‌تر نشان‌دهنده تاثیر کمتر آنها بر سایر ژن‌ها می‌باشد (شکل ۲). به منظور شناسایی و بررسی کلاسترهای مربوط به شبکه ژنی آپوپتوزیز، از منوی APPS گزینه ClusterONE استفاده شد و خروجی کلاسترهای مربوط به شبکه ژنی آپوپتوزیز در نرم‌افزار Cytoscape، شناسایی و ارائه شد (شکل ۴ و ۵).

## نتایج و بحث

### آنالیز کیفیت و داده‌های RNA-seq

به منظور تشریح و مقایسه ترنسکریپتوم مرغان پرورشی نمونه‌های خون از مرغ‌های تجاری راس و بومی اصفهان جمع‌آوری شد و مخزن RNA فراهم شد. پس از توالی‌یابی، میانگین تعداد خوانش‌ها از چهار نمونه (دو نمونه از هر نوع) در حدود ۱۷ میلیون‌بار آورد شد. در نهایت حدود ۱۸۰۰۰۰۰۰ خوانش با ۱۵۰ جفت باز توالی‌یابی شدند.

پس از حذف خوانش‌های کم کیفیت، عمل هم‌ردیفی با ژنوم مرجع (Galgal4) با استفاده از Tophat2 انجام شد که این فرایند به طور تقریبی در مورد ۸۵٪ از قطعات توالی‌یابی شده، با موفقیت همراه بود (جدول ۱).

### آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها

پس از مکان‌یابی خوانش‌ها نسبت به ژنوم مرجع توسط Tophat2، همگذاری رونوشت‌ها انجام شد و سطح بیان نسبی آنها توسط Cufflink محاسبه شد. شدت بیان ژن با استفاده از روش FPKM تخمین زده شد. در مورد ژن‌های آپوپتوزیز ۱۱ ژن دارای بیان بالا و معنی‌داری بودند.

در بین ۱۱ ژن مربوط به آپوپتوزیز که بیان بالاتر داشتند، ژن PIK3CD دارای بیشترین بیان در بین ژن‌های آپوپتوزیز، در نژاد بومی و تجاری بود و ژن PIK3CB کمترین بیان را در نژاد بومی داشت. اما، همه ۱۱ ژن دارای بیان بالاتر در نژاد تجاری نسبت به نژاد بومی بودند. PIK3CD بالاترین بیان را در بین ژن‌های آپوپتوزیز مرغ

3- The long-lived growth hormone (GH) receptor knockout mice

1- Dgree

2- Betweenness Centrality

Changes در دامنه تغییراتی از ۳/۵۰۸۹۴- تا ۳/۷۵۵۵۹ قرار داشت.

جدول ۱- نتایج حاصل از همترازی با ژنوم مرجع  
Table 1-Number of aligned reads with reference genome

همترازی Aligned reads	نژاد Race			
	بومی Native		تجاری Commercial	
	نمونه ۱ Sample1	نمونه ۲ Sample2	نمونه ۱ Sample1	نمونه ۲ Sample2
کل خوانش ها Total Reads	18768307	17995632	15923838	15621164
خوانش ها پس از حذف Trimming	18509420	17650558	15677357	15313649
خوانش های همتراز شده با ژنوم مرجع Aligned Reads with the reference genome	86.6%	84.89%	84.36%	84.17%

سایتواسکیپ شبکه ژنی با توجه به نوع ارتباطات بین ژنی آنالیز و رسم شد.

پیشرفت های حاصل در علوم زیستی و تولید حجم انبوه اطلاعات مستخرج از فرآیندهای زیستی، دانش ما را در مورد واحدهای تشکیل دهنده حیات از جمله ژن ها و پروتئین ها افزایش داده است، اما داشتن همه اطلاعات مربوط به ژن ها یا همه پروتئین ها به تنهایی کافی نیست، بلکه می بایست با نگاهی سیستمی به موضوع نگریست (۱۹،۱۸). در این مقاله سعی بر آنالیز تفاوت بیان و همچنین آنالیز مسیر آپوپتوزیز توسط پایگاه داده String و David و نرم افزار Cytoscape می باشد.

در این مطالعه مسیر آپوپتوزیز شامل ژن های<sup>۳</sup> AKT1،<sup>۴</sup> CSF2RB2،<sup>۵</sup> IL1R13،<sup>۶</sup> MYD884،<sup>۷</sup> PIK3CB5،<sup>۸</sup> PIK3CD6،<sup>۹</sup> PIK3CG7،<sup>۱۰</sup> PIK3R18،<sup>۱۱</sup> PRKACB9

- 3- RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
- 4- Colony stimulating factor 2 receptor beta common subunit
- 5-Interleukin 1 receptor, type I precursor
- 6-Myeloid differentiation primary response protei(Adapter protein involved in the Toll-like receptor and IL-1 receptor signaling pathway in the innate immune response
- 7-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate catalytic subunit beta isoform 3-kinase
- 8-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate catalytic subunit delta isoform 3-kinase
- 9- Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate catalytic subunit gamma isoform 3-kinase
- 10- phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1

به این ترتیب در این مطالعه با توجه به اهمیت آپوپتوزیز در سیستم ایمنی و کنترل و رفع بیماری ها در گونه های مختلف از جمله مرغان به بحث و بررسی این مقوله پرداخته شد. از جمله می توان از نقش MYD88 در مسیرهای پاسخ ایمنی ذاتی نام برد مانند مسیرهای علامت دهی<sup>۱</sup> TLRS که در شناسایی الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن های معین ایفاء وظیفه می کند (۳ و ۱۰) و یا نقش در مسیر<sup>۲</sup> IL-1 که بیشتر در مقابله با چالش های انگلی، باکتریایی و یا ویروسی افزایش می یابد (۱۰ و ۲۱). بر این اساس ژن های ارائه شده برای آپوپتوزیز توسط نتایج KEGG به پایگاه استرینگ ورژن ۱۰/۵ ارائه شد و شبکه ژنی مربوط به آپوپتوزیز رسم شد (شکل ۲). بررسی ژن های آپوپتوزیز به دست آمده در این پژوهش در شبکه String نشان دهنده بیشترین ارتباط عملکردی مورد انتظار، بین پروتئین های شبکه آپوپتوزیز بوده و ارتباط بیولوژیکی بین پروتئین های این شبکه، مشخص می باشد (شکل ۲). در آنالیز توسط پایگاه داده String پروتئینی با نام PPP3CA شناسایی نشد این پروتئین (ژن) یکی از ۱۱ پروتئین آپوپتوزی است که در نتایج KEGG ارائه شد، به این ترتیب شبکه ژنی ارائه شده توسط این پایگاه با ۱۰ پروتئین مصور شد و همچنین بین گره مربوط به TRADD نیز با سایر گره های شبکه ارتباطی مشاهده نشد. به عبارتی این گره اثری بر سایر گره های شبکه ندارد. هر گره مبین یک پروتئین (ژن) می باشد. سپس با استفاده از اطلاعات موجود در خروجی استرینگ تحت عنوان simple tabular text output as در نرم افزار

- 1- Toll-like receptor signaling pathway
- 2- IL-۱ receptor signaling pathway

باشد و همچنین همراه با آرایش ویژه ای از فرایندهای مولکولی و به وسیله محصولات ژنی ویژه انجام می‌گیرد. در واقع فرایندهای بیولوژیکی در بین سه دیدگاه هستی‌شناسی فراگیرترین جنبه می‌باشد (۵ و ۳۰)

با توجه به جدول (۴) بیشترین معنی داری در مسیر regulation of protein localization to nucleus بر اساس FDR و P-value مشاهده می‌شود که دلالت بر فعال بودن فرایند انتقال و یا نگهداری پروتئین‌های هسته ای مربوط به آپوتوز در درون هسته سلول می‌باشد و یا به عبارت دیگر محتوای پروتئینی هسته سلول توسط فرایندهای خاصی افزایش یافته است. پروتئین‌ها در این مسیر شامل PIK3R1، MYD88، AKT1 و PPP3CA می‌باشند.

همچنین با توجه به نتایج حاصل از آنالیز فرایندهای بیولوژیکی ۳ مسیر معنی دار بر اساس P-value دارای بیشترین fold enrichment یعنی به ترتیب، ۱۶۳/۵۲ و ۱۶۳/۵۲ و ۱۹۹/۸۶ بوده و شامل مسیرهای insulin-like growth factor و growth hormone receptor signaling pathway و regulation of nitric-oxide synthase activity می‌باشد. این آماره در واقع نشان دهنده میزان درگیری ژن‌ها با فعالیت کینازی می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل فرایندهای بیولوژیکی ژن‌های AKT1 و IL1R1 در مسیر فعالیت سنتزی نیتریک اکساید و PIK3R1، AKT1 در دو مسیر علامت دهی گیرنده فاکتور رشد و پاسخ به هورمون رشد نقش دارند. بنابراین، می‌توان این مطلب را درک کرد که ژن‌های شرکت کننده با ترکیب‌های مختلف می‌توانند نقش‌های متفاوتی را ایفا نمایند. از طرف دیگر با یک نوع ترکیب نیز چند عمل متفاوت انجام دهند. به عنوان مثال ژن‌های AKT1، MYD88، PPP3CA و PIK3R1 در مسیرهایی مانند protein targeting to nucleus) به سمت هسته (nucleus import protein)، اجازه ورود پروتئین به داخل هسته (into nucleus) و چندین مسیر دیگر فعالیت دارند.

سپس آنالیز شبکه ژنی آپوتوز توسط سایتواسکیپ انجام شد و شکل شبکه بر اساس پارامترهای آماری حاصل از نرم‌افزار مذکور مشخص شد (شکل ۳).

به این ترتیب بر اساس درجه (Degree)، بیشترین ارزش را ژن PIK3R1 داشته و بر اساس مرکزیت بینایی (Beetwinness Centrality) بیشترین ارزش را AKT1 و CSF2RB دارند.

PPP3CA<sup>10</sup> و TRADD11<sup>۳</sup> بوده که ژن CSF2RB فاقد بیان می‌باشد. مقایسه میزان تفاوت بیان در ژن‌های آپوتوز بین دو نمونه تجاری و بومی نشان می‌دهد که میزان بیان در تمام ژن‌های بدست آمده در این پژوهش در گونه تجاری نسبت به بومی بیشتر بوده و همچنین از دوازده ژن گزارش شده، ۱۱ ژن بیان شده در رده ژن‌های Up regulated قرار دارند.

همانطور که مشخص است تعداد ژن‌های آپوتوز بیان شده در این پژوهش n=11 می‌باشد، و با توجه به مطالعه نوری دلویی و همکاران تعداد ژن‌ها در این مطالعه کمتر است (۲۶ و ۳۳)، دلیل این امر می‌تواند فاکتورهای مختلفی، از جمله کاربرد آستانه در سطح معنی داری و حداقل اختلاف بیان (Fold Change) باشد. کاهش تعداد ژن‌های دارای تفاوت بیان را به تعداد نمونه

ای آزمایشی نمی‌توان نسبت داد، زیرا تعداد نمونه‌ها بر اساس پروتکل آزمایشات RNA-seq انتخاب شده است (۸). بررسی KEGG PATHWAY مربوط به آپوتوز دلالت بر معنی داری 7 مسیر بر اساس FDR ≤ 0.05 و 14 مسیر بر اساس Pvalue ≤ 0.05 داشت و همچنین ۱۳ مسیر بر اساس Benjamini معنی دار بود. لازم به ذکر است که برخی مسیرها بر اساس دو یا چند آنالیز آماری معنی دار بودند. همچنین ژن‌های PIK3CB، PIK3CG، PIK3R1، AKT1، PIK3CD در بیشتر مسیرها نقش داشتند.

بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این ۵ ژن دارای ارتباطات بیشتری بوده و اثر تنظیمی بالاتری نسبت به ۶ ژن دیگر دارند هر چه ارتباطات ژنی بیشتر باشد، دارای کمان‌های بیشتری با سایر گره‌ها هستند (۲).

در هستی‌شناسی ژن در بخش فرایند‌های بیولوژیکی (Biological Processes) حدود ۸۱/۳ درصد از مسیرها بر اساس P-value، و بر اساس FDR فقط مسیر positive regulation of protein localization to nucleus معنی دار بودند (جدول ۴). نتایج حاصل از بخش ترکیبات سلولی (Cellular Components) نشان می‌دهد که یک مسیر شامل ۳phosphatidylinositol kinase complex، بر اساس FDR معنی دار شده است و کل مسیرها در این بخش بر اساس Pvalue معنی دار بودند (جدول ۲). در بخش عملکرد مولکولی (Molecular Functions) سه مسیر بر اساس FDR و تمام مسیرها از نظر Pvalue معنی دار شده‌اند. ۱۰ مسیر نیز بر اساس آنالیز آماری Benjamini معنی دار بودند (جدول ۳). هر فرایند بیولوژیکی اغلب توسط پیامد و یا حالت نهایی خود تبیین می‌شود، مانند فرایند تقسیم سلولی که نتیجه آن تولید دو سلول دختر می‌

- 1- protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta
- 2- protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha
- 3- TNFRSF1A associated via death domain

جدول ۲- جدول مربوط به مسیرهای معنی دار در بخش CC (اجزای سلولی) درهستی شناسی ژن های شبکه آپوپتوز مرغان تجاری وبومی اصفهان

Table 2- Significant pathways of cellular components from gene ontology enrichment in apoptosis gene networks of commercial and native Esfahan chickens.

هستی شناسی Ontology	کد شناسایی GO	نام مسیر Term	تعداد ژن Number	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM-CC-ALL	GO:0005942	Phosphatidylinositol3-kinase complex	4	4.78 E-07 *	3.97 E-05 **	5.12 E-04 .	5.12 E-04 ..
GOTERM-CC-ALL	GO:0061695	transferring phosphorus -containing groups	4	3.20 E-04 *	0.026254 **	0.013214 .	0.342664
GOTERM-CC-ALL	GO:0019898	extrinsic component of membrane	4	4.61 E-04 *	0.037575 **	0.012685 .	0.492917
GOTERM-CC-ALL	GO:1902494	Catalytic complex	5	0.002948 *	0.217345	0.059427 .	3.112349
GOTERM-CC-ALL	GO:1990234	Trasferase complex	4	0.009683 *	0.554081	0.149154	9.895403
GOTERM-CC-ALL	GO:0043234	Protein complex	7	0.014817 *	0.710338	0.186579	14.77378
GOTERM-CC-ALL	GO:0098796	Membrane protein complex	4	0.017838 *	0.775506	0.192179	17.53069
GOTERM-CC-ALL	GO:0032991	Macromolecular complex	7	0.034595 *	0.946188	0.305999	31.41038
GOTERM-CC-ALL	GO:0005886	Plasma membrane	6	0.040767 *	0.9684	0.318763	35.96322
GOTERM-CC-ALL	GO:00116020	membrane	9	0.044729 *	0.977587	0.316008	38.73922
GOTERM-CC-ALL	GO:0071944	Cell periphery	6	0.045921 *	0.9797993	0.298617	39.5527
GOTERM-CC-ALL	GO:0005829	cytosol*	4	0.046439	0.980684	0.280286	39.90347

\*\*FDR ≤ 0.05 و \*Benjamini ≤ 0.05 ، \*\*Bonferoni ≤ 0.05 ، \*Pvalue ≤ 0.05

جدول ۳- جدول مربوط به مسیرهای معنی دار در بخش MF (عملکرد مولکولی) درهستی شناسی ژن های شبکه آپوپتوز مرغان تجاری و بومی اصفهان

Table 3- Significant pathways of molecular functions from gene ontology enrichment in apoptosis gene networks of commercial and native Esfahan chickens.

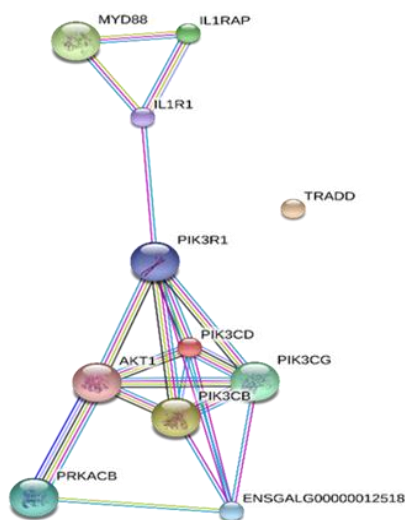
هستی شناسی Ontology	کد شناسایی GO	نام مسیر Term	تعداد ژن number	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM-MF-ALL	GO:0035005	1-Phosphatidylinositol-4-phosphate3- kinase activity	3	2.07 E-05 *	0.001532 **	0.001532 .	0.021681 ..
GOTERM-MF-ALL	GO:0016303	1Phosphatidylinositol3-kinase activity	3	4.43 E-05 *	0.003274 **	0.001639 .	0.046378 ..
GOTERM-MF-ALL	GO:0035004	Phosphatidylinositol3-kinase activity	3	5.41 E-05 *	0.003998 **	0.001335 .	0.05665 ..
GOTERM-MF-ALL	GO:0016307	Phosphatidylinositol phosphate kinase activity	3	6.49 E-05 *	0.004793 **	0.001201 .	0.06794
GOTERM-MF-ALL	GO:0052742	Phosphatidylinositol kinase activity	3	7.67 E-05	0.00566 **	0.001134 .	0.080244
GOTERM-MF-ALL	GO:0016773	Phosphotransferase activity,alcohol group as reseptor	5	0.001058 *	0.075312	0.012965 .	1.101359
GOTERM-MF-ALL	GO:0016301	Kinase activity	5	0.00158 *	0.110434	0.016578 .	1.64155
GOTERM-MF-ALL	GO:0016772	Transferase activity,transferring phosphorus-containing groups	5	0.002732 *	0.183242	0.024984 .	2.822358
GOTERM-MF-ALL	GO:0046934	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity	2	0.004213 *	0.268352	0.034122 .	4.323199
GOTERM-MF-ALL	GO:0052813	phosphatidylinositol bisphosphate kinase activity	2	0.004213 *	0.268352	0.034122 .	4.323199
GOTERM-MF-ALL	GO:0016740	Transferase activity	5	0.049259 *	0.976198	0.311886	41.0635

\*\*FDR ≤ 0.05 و \*Benjamini ≤ 0.05 ، \*\*Bonferoni ≤ 0.05 ، \*Pvalue ≤ 0.05

**جدول ۴-** جدول مربوط به مسیرهای معنی‌دار در بخش BP (فرایندهای بیولوژیکی) درهستی‌شناسی ژن‌های شبکه آپوپتوزیز مرغان تجاری وبومی اصفهان  
**Table 4-** Significant pathways of biological processes from gene ontology enrichment in apoptosis gene networks of commercial and native Esfahan chickens.

هستی‌شناسی Ontology	کد شناسایی GO	نام مسیر Term	تعداد ژن	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM-BP-ALL	GO:190018	Positive regulation of protein localization to nucleus	4	3.21 E-05 *	0.03434 **	0.03434 •	0.05132 ••
GOTERM-BP-ALL	GO:0035556	intracellular signal transduction	8	3.92 E-05 *	0.04175 **	0.0211 •	0.06263
GOTERM-BP-ALL	GO:0048015	Phosphatidylinositol mediated signaling	4	5.27 E-05 *	0.05573 **	0.01893 •	0.0842
GOTERM-BP-ALL	GO:0048017	Inositol lipid-mediated signaling	4	5.69 E-05 *	0.05993 **	0.01533 •	0.09075
GOTERM-BP-ALL	GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	8	7.83 E-05 *	0.08155	0.01687 •	0.12489
GOTERM-BP-ALL	GO:1900180	Regulation of protein localization to nucleus	4	1.79 E-04 *	0.17684	0.03191 •	0.28546
GOTERM-BP-ALL	GO:0042993	positive regulation of transcription factor import into nucleus	3	1.85 E-04 *	0.18227	0.02834 •	0.29515
GOTERM-BP-ALL	GO:0007165	Signal transduction	9	2.82 E-04 *	0.26373	0.03755 •	0.44873
GOTERM-BP-ALL	GO:0048518	Positive regulation of biological process	9	3.02 E-04 *	0.27961	0.03579 •	0.48062
GOTERM-BP-ALL	GO:0044744	Protein targeting to nucleus	2	3.69 E-04 *	0.33042	0.03932 •	0.58748
GOTERM-BP-ALL	GO:0006606	Protein import into nucleus	4	3.69 E-04 *	0.33042	0.03932 •	0.58748
GOTERM-BP-ALL	GO:1902593	Single-organism nuclear import	4	3.69 E-04 *	0.33042	0.03932 •	0.58748
GOTERM-BP-ALL	GO:0051170	Nuclear import	4	3.76 E-04 *	0.33563	0.03649 •	0.59889
GOTERM-BP-ALL	GO:1903829	Positive regulation of cellular protein localization	4	4.86 E-04 *	0.41076	0.04312 •	0.77396
GOTERM-BP-ALL	Go:0019222	Regulation of metabolic process	9	5.24 E-04 *	0.43454	0.04291 •	0.83399

••FDR ≤ 0.05 ، •Benjamini ≤ 0.05 ، \*\*Bonferoni ≤ 0.05 ، \*Pvalue ≤ 0.05



**شکل ۱- الف-** شبکه ژنی آپوپتوز با استفاده از پایگاه شبکه‌های پروتئین-پروتئین و خروجی KEGG Ontology مربوط به سیستم ایمنی ب- تحلیل شبکه نشان می‌دهد که تعداد گره ۱۱، تعداد کمان ۲۰، میانگین درجه گره ۳/۶۴، ضریب کلاستری شدن، ۰/۶۲۱، تعداد کمان مورد انتظار ۷، پرمایگی برهمکنش پروتئین-پروتئین و معنی‌داری بر اساس  $P\text{-value} \leq 4.04e-05$  می‌باشد.

**Figure 1-** A- apoptosis gene network by using of protein-protein networks base and output KEGG Ontology relation to immunu system. B- result of analysis of network :the number of node: 11, the number of bow: 20, average of node degree: 3.64, clusterination coefficient: 0.621, the number of expected bow: 7, enrichment of protein-proteinn



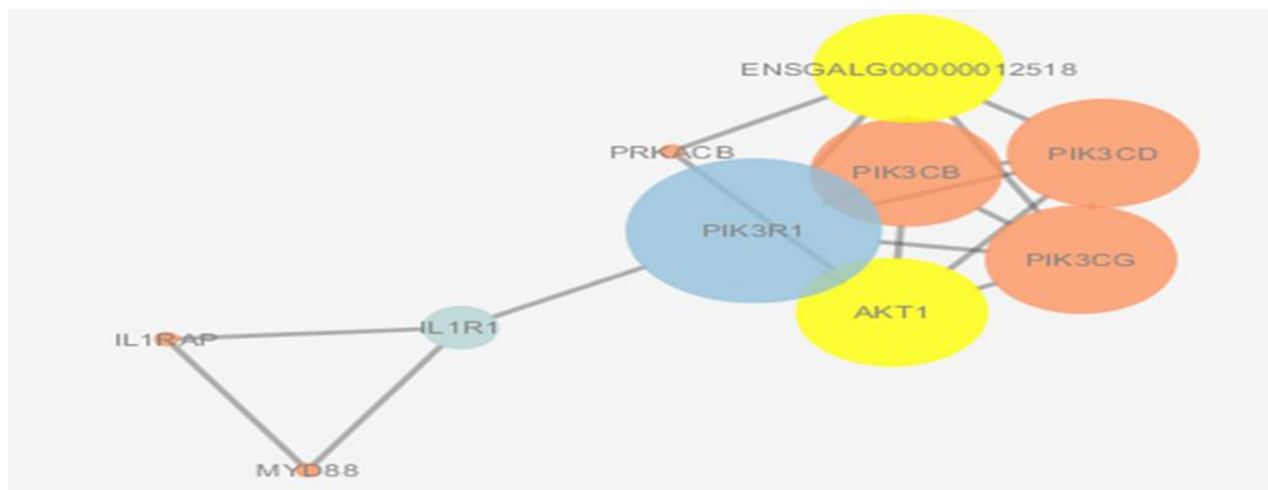
interaction and significant is based on P-value  $\leq 4.04e-05$

جدول ۵- جدول مربوط به مسیرهای KEGG در شبکه آپوپتوز مرغان تجاری و بومی اصفهان

Table 5-KEGG pathways in apoptosis gene networks of commercial and native Esfahan chickens.

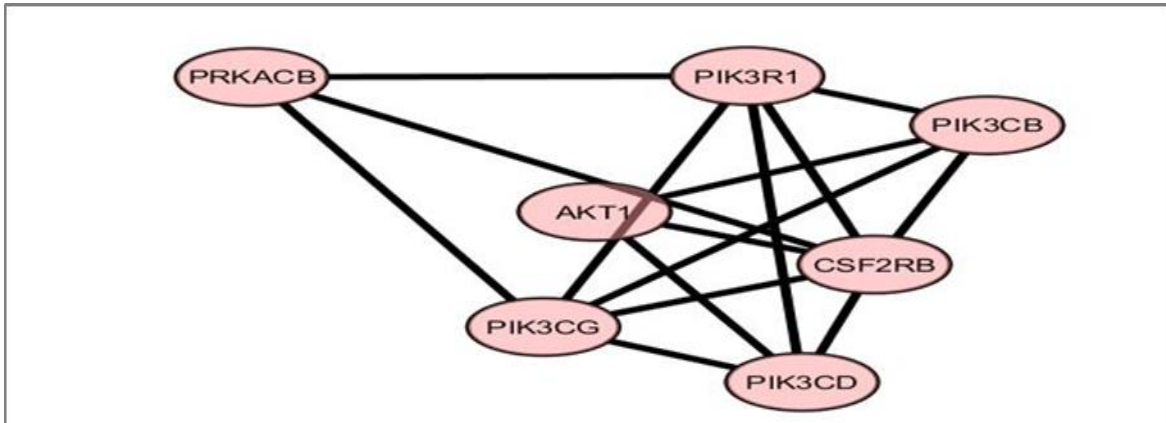
ردیف Category	نام مسیر Term	تعداد ژن Count	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR
KEGG_PATHWAY	gga04210:Apoptosis	11	1.20 E-17	3.123 E-16	3.1234 E-16	9.852 E-15
KEGG_PATHWAY	gga04370:VEGF signaling pathway	4	3.968 E-07 *	1.032 E-05 **	5.1586 E-06 .	0.0003254 ..
KEGG_PATHWAY	gga04914:ptogestron-mediated oocyte maturation	6	9.03 E-07 *	2.348 E-05 **	7.8256 E-06 .	0.0007405 ..
KEGG_PATHWAY	gga04620:Toll-like receptor signaling pathway	6	1.393 E-06 *	3.622 E-05 **	9.0542 E-06 .	0.0011423 ..
KEGG_PATHWAY	gga04150:Mtor signaling pathway	5	5.058 E-06 *	0.0001315 **	2.6301 E-05 .	0.0041478 ..
KEGG_PATHWAY	gga04910:insulin signaling pathway	6	8.573 E-06 *	0.0002229 **	3.7148 E-05 .	0.0070301 ..
KEGG_PATHWAY	gga04650:Natural Killer cell mediated cytotoxicity	5	2.875 E-05 *	0.0007473 **	0.00010679 .	0.0235756 ..
KEGG_PATHWAY	gga04012:Erb B signaling pathway	5	5.172 E-05 *	0.0013439 **	0.00016809 .	0.0424088 ..
KEGG_PATHWAY	gga04630:JaK-STAT signaling pathway	5	0.0002411 *	0.0062494 **	0.00069631 .	0.1975384 ..
KEGG_PATHWAY	gga04070:Phosphatidylinositol signaling system	4	0.0007332 *	0.0188905 **	0.00190531 .	0.5997287 ..
KEGG_PATHWAY	gga04510:Focal adhesion	5	0.0011689 *	0.0299516 **	0.00276066 .	0.9545672 ..
KEGG_PATHWAY	gga00562:inositol phosphate metabolism	3	0.0081117 *	0.1908449	0.01749226 .	6.461182 ..
KEGG_PATHWAY	Gga04810:Regulation of actin cytoskeleton	4	0.0123097 *	0.2753288	0.02446779 .	9.6586793 ..
KEGG_PATHWAY	Gga04010:MAPK signaling pathway	4	0.0221439 *	0.441339	0.04073374 .	16.776319 ..

••FDR $\leq 0.05$  , •Benjamini $\leq 0.05$  , \*\*Bonferoni $\leq 0.05$  , \*Pvalue $\leq 0.05$



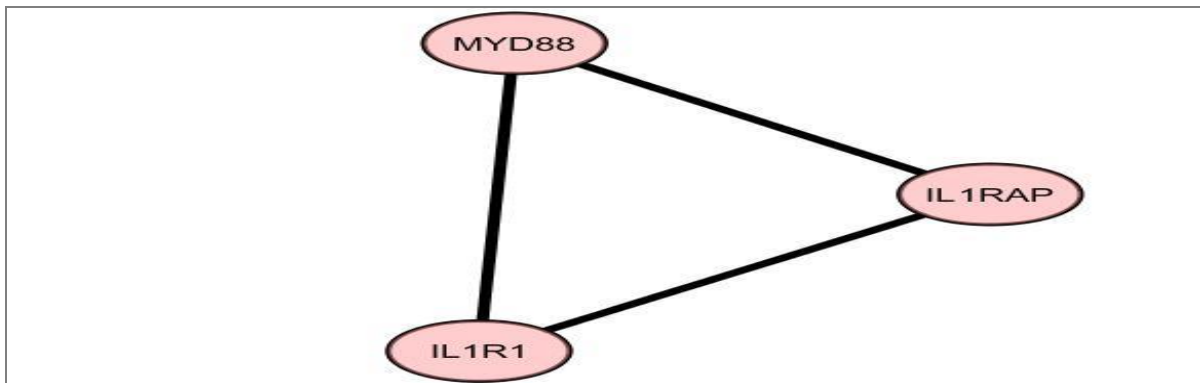
شکل ۲- آنالیز شبکه ژنی آپوپتوز در نرم افزار Cytoscape، بر اساس Centralities شامل درجه (Degree) و مرکزیت بینابینی ((Beetwinness که اندازه گره ها از کوچک به بزرگ نشان دهنده افزایش ارزش آنها از نظر درجه و میزان رنگ گره ها از تیره به روشن نشان دهنده کاهش گرایش به ماندن در مرکز می باشد.

Figure 2- Analysis of apoptosis gene network at Cytoscape, based on Centralities included Degree, Beetwinness ..... , and nodes size from small to great indicate increase of degree value and nodes color from dark to bright indicate decrease of tendency to center



شکل ۳- الف- کلاستر PIK3R1 حاصل از شبکه ژنی به دست آمده از استرینگ و آنالیز آن توسط نرم افزار سایتواسکیپ به منظور تبیین و رسم کلاسترهای مربوط به شبکه ژنی آپوپتوز ب- مشخصات کلاستر ۱ شامل تعداد گره: ۷ تراکم: ۰/۷۶۲؛ کیفیت: ۰/۹۴۱ و P-value: 4.284E-4 می باشد.

**Figure 3A** - PIK3R1 cluster from gene network outcome from string and analysis by cytoscape in order to drawing apoptosis gene network clusters, B- properties of cluster1: node number: 7, density: 0.762, quality: 0.941 and Pvalue: 4.284E-4



شکل ۴- الف- کلاستر IL1R1 حاصل از شبکه ژنی به دست آمده از استرینگ و آنالیز آن توسط نرم افزار سایتواسکیپ به منظور تبیین و رسم کلاسترهای مربوط به شبکه ژنی آپوپتوز ب- مشخصات کلاستر ۲ تعداد گره: ۳ تراکم: ۱/۰۰۰؛ کیفیت: ۰/۷۵۰ و P-value: 0.030 می باشد.

**Figure 4-** A- IL1R1 cluster from gene network outcome from string and analysis by cytoscape cytoscape in order to drawing apoptosis gene network clusters, B- properties of cluster2 : node number: 3, density: 1/000, quality: 0.750 and Pvalue: 0.030

مختلفی باعث مهار مرگ سلولی می‌شود و از این رو، این مسیر را به عنوان مسیر بقای سلولی نیز نامگذاری کرده اند (۲۷) از طرف دیگر IAP نیز مانند AKT1 یکی از مولکول‌های مهم و درگیر در مهار مرگ سلولی است که در این مطالعه بیان نشده است (۱۳ و ۲۶). باتوجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان داشت که سه ژن شامل AKT1، CSF2RB و PIK3R1 با اثر عمده وجود دارند که بر سایر ژن‌ها تاثیر گذار می‌باشند).

پس از رسم شبکه ژنی به بررسی کلاسترهای مربوط به شبکه پرداختیم. به منظور مشخص کردن کلاسترهای مذکور از نرم افزار سایتواسکیپ استفاده شد ( شکل ۴ و ۵).

همانطور که مشاهده می‌شود، تراکم یک شبکه نسبت عکس با تعداد گره‌ها دارد. با افزایش گره‌ها تراکم کاهش می‌یابد. همچنین

نتایج آماری حاصل از آنالیز شبکه ژنی مورد مطالعه توسط نرم افزار cytoscape نیز نشان دهنده این مطلب می‌باشد که عامل اصلی ارتباطات داخل شبکه ژن AKT1 می‌باشد و کمتر تحت تاثیر سایر ژن‌ها قرار می‌گیرد، زیرا بالاترین برون رفت<sup>۱</sup> و پایین‌ترین درون رفت<sup>۲</sup> را دارد و پس از آن ژن CSF2RB<sup>۳</sup> هم نقش مهمی در ارتباطات شبکه داراست. گره‌هایی که درجه برون رفت بالا دارند، ارتباط همسایگان<sup>۴</sup> آنها نیز بیشتر می‌باشد (۲).

AKT1 دارای سوبستراهای متعددی می‌باشد و از مسیرهای

- 1- out degree
- 2- in degree
- 3- ENSGALG00000012518
- 4- Neighborhood Connectivity

مسیرهای پاسخ ایمنی ذاتی نقش دارند، مانند مقابله با باکتری‌ها و ویروس‌ها و یا فرایند مهار و عدم مهار آپوپتوز توسط پروتئین‌های خاص که می‌تواند منجر به بیماری و یا جلوگیری از بیماری شود، پس می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی از این ژن‌های خاص درگیر استفاده کرده و در جهت خاص مورد نظر میزان بیان آنها را با روش‌های مناسب سلولی و مولکولی و یا با استفاده از روش‌های اپی‌ژنتیک تنظیم نمود. از سوی دیگر میزان بیان بالا در ژن‌های سوپره‌تجاری نسبت به سوپه بومی در این مطالعه نیز مانند مطالعات گذشته مورد تاکید قرار گرفت.

اگر شبکه ای کمان نداشته باشد، و گره‌های جداگانه و ایزوله داشته باشد، تراکم صفر است (۲).

## نتیجه گیری کلی

با توجه به اهمیت بیان و عملکرد ژن‌های آپوپتوزیز که در بسیاری از مطالعات مشخص شده است و همچنین میزان عملکرد و بیان ژن‌ها در مطالعه حاضر، خصوصاً ژن‌های AKT1 و CSF2RB و PIK3R1 که طی آنالیزهای بیوانفورماتیکی به اهمیت تنظیمی و میزان ارتباطات آنها در شبکه ژنی به دست آمده در این پژوهش، پی برده شد، می‌توان نتیجه گرفت از آنجا که برخی ژن‌های آپوپتوز

## منابع

1. Baoman, W. 2015. Identifying Novel Candidate Genes Related to Apoptosis from a Protein-Protein Interaction Network. Computational and Mathematical Methods in Medicine, Olume, Article ID 715639, 11 pages.
2. Behdani, E. 2017. Bayesian network constructing using bovine leukocytes RNA-seq data. Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan College of Animal and food Science, Department of Animal Science, (In Persian).
3. Blasius A. L., and B. Beutler. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3):305–15.
4. Bolger A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014 Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* Bioinformatics, 30(15):2114-20.
5. Christophe D., and N. Škunca. 2017. The Gene Ontology Handbook, Methods in Molecular Biology. International Standard Book Number (ISBN), 978-1-4939-3741-7.
6. Chunyun. W., X. Jinmei, R. Guo, S. Yang, Y. Li, and D. Guo. 2017. An RNA-Seq screen of the dithiothreitol-induced apoptosis response in chicken cardiomyocytes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(2):1019-1029.
7. Dennis G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane. 2003. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology*, 4(9):1
8. Derrick J. Coble, Damarius Fleming, Michael E. Persia, Chris M. Ashwell, Max F. Rothschild, Carl J Schmidt, and Susan J. Lamont. 2014. RNA-seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. *BMC Genomics*, 15:1084.
9. Gesing Adam, Michal M. Masternak, Feiya Wang, Andrzej Lewinski, Malgorzata Karbownik-Lewinska, and Andrzej Bartke. 2011. Decreased Expression Level of Apoptosis-Related Genes and/or Proteins in Skeletal Muscles, but not in Hearts, of Growth Hormone Receptor Knockout Mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, February, 236(2): 156–168.
10. Gloria, K., L. Anandaroop Mukhopadhyay, C. Cowing-Zitron, and B. D. Yu. 2011. The Post-Apoptotic Fate of RNAs Identified Through High-Throughput Sequencing of Human Hair. *6 (11) 27603: 1-10*.
11. Gordon, S. 2004. Pathogen recognition or homeostasis? APC receptor functions in innate immunity. *Comptes Rendus Biologies*, 327(6): 603-607.
12. Hashemi M., and S. Ghavami. 2008. Methods of Studying the Apoptosis. *JRUMS*, 7 (1):71-78(In Persian).
13. Haunshi S., M. Niranjani, M. Shanmugam, M. K. Padhi, M. R. Reddy, R. Sunitha, U. Rajkumar, and A. K. Panda. 2010. Characterization of two Indian native chicken breeds for production, egg and semen quality and welfare traits. *Poultry Science*, 90: 314-320.
14. Hoffman, S., and R. Ettinger. 2002. Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation, and homeostasis. *Current opinion in Allergy and Clinical Immunol*, 495-506.
15. Honardoost, Maryam, H Soleimanjahi, F. Rajaei. 2013. Apoptosis: programmed cell death, *Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, 17(3) 48-57 (In Persian).
16. Hang Yin, ShaoPeng Wang, Yu-Hang Zhang, Yu-Dong Cai, and Hailin Liu. 2016. Analysis of important gene ontology terms and biological pathways related to pancreatic cancer. *BioMed Research International*. Article ID 7861274, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7861274>.
17. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 2013. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972 Aug; 26 (4): 239-57.

18. Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, and S. L. Salzberg. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14:R36, <http://genomebiology.com>.
19. Kitano. H. 2000. Perspectives on systems biology. *New Generation Computing*, 18(3): 199–216.
20. Lamont, S. J. 2006. Integrated, whole-genome approaches to enhance disease resistance in poultry. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, Instituto Prociência, 07-01.
21. Lanier, L. 2005. N K-Cell Recognition. *Annual Review of Immunology*, 23: 225-274.
22. Mark, S. G., P. Kaiser, and M. Fife. 2014. The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics*, 66 (7-8): 427–438.
23. 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.
24. Moazeni S. M., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrababak, A. K. Esmailizadeh. 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.
25. 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.
26. Nishawar, J., M. Hussain, K. I. Andrabi. 2008. Programmed cell death or apoptosis: Do animals and plants share anything in commo. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3 (5): 111-126.
27. Noori Dalooi M. R., and E. Ebrahimzadeh Vesal. 2009. Molecular genetic, diagnosis, prevention and gene therapy in prostatic cancer, *Tehran University Medicine Journal*, 67 (1): 1-1(in Persian).
28. Noori-Dalooi M. R., and F. Vand Rajabpour. 2011. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. *Medical Sciences*, 21 (3):151-161(In Persian).
29. Offen D., Elkon H., Melamed E., 2000. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *Journal of neural transmission*. Supplement, 21: 153-166.
30. Paul, D. T. 2017 The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function, volum1446 [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-3743-1\\_2](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-3743-1_2).
31. Rezayi, M., L. Zaidooni. 2012. The rule of estatines in apoptosis, *Razi Journal of Medical science*, 4: 11-19 (In Persian).
32. Rimoldi, S., E. Lasagna, F. Maria Sarti, S. Paolo Marelli, M. Cristina Cozzi, G. Bernardini, G. Terova. 2015. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heatstress conditions. *Science Direct, Meta Gene*, 6: 17–25.S. A. Biosciences, a QIAGEN company. All rights reserved, Copyright © 2000-2010, Chicken Apoptosis PCR Array. [http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PAGG-012Z.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAGG-012Z.html).
33. Salehinasab M., S. Zerehdaran, M. A. Abbasi, S. Alijani, and S. Hassani. 2016. The analysis of genetic and phenotypic properties of egg quality traits in Isfahan native fowl. *Iranian Journal of Animal Science Research*, Article 10, 16 (5): 1055-1062. (In Persian).
34. 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).
35. Trapnell C., Williams B. A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M. J, Salzberg S. L, Wold and B. J, Pachter. 2010. Transcriptassembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotatedtranscripts and isoform switchingduring cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5):511-5.
36. Yaron F., and H. Steller. 2011. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell journal*, Cell 147, November, Elsevier Inc.
37. Zandi, E., M. R. Mohammadabadi, M. Ezzatkah, and A. K. Esmailizadeh. 2014. Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 509-514.

## Gene Expression Analysis on Apoptosis network and design it in Esfahani and Ross Breeds

Zh. Hesani<sup>1</sup>- M. R. Nasiry<sup>2\*</sup>- M. R. Bakhtiarzadeh<sup>3</sup>- M. Tahmorespur<sup>2</sup>- A. Javadmanesh<sup>4</sup>

Received: 15-07-2017

Accepted: 16-10-2017

**Introduction** Economic pressure on the modern poultry industry has directed the selection process towards fast-growing broilers that have a reduced feed conversion ratio. Selection based heavily on growth characteristics could adversely affect immune competence leaving chickens more susceptible to disease. Native breeds of chickens are playing an important role in rural economies in most of the developing and underdeveloped countries. The immune system is an adaptive defended at evolved in phylogenesis to control an organism's integrity and apoptosis system is involved in many immune system mechanisms and diseases therefore this study has emphasized on apoptosis system. Recently, next generation sequencing technology (RNA-Seq) has become available as a powerful tool to investigate transcriptional profiles for gene expression analysis of many organisms. So, we performed comparative gene expression analysis of native and commercial chickens by RNA-sequencing technology, in order to, detect differentially expressed genes involved in apoptosis in native and commercial breed poultry.

**Materials and methods** The chicken in this study was female from Esfahani and Ross breeds (47 days of age). The blood samples were collected from Brachial/ulnar wing vein; 5 ml was taken. The total RNA was extracted by using Trizol (Invitrogen, USA) according to the manufacture's protocol. The RNA pool was prepared by mixing together equal quantities of three RNA samples per group/ Total RNA was sent to BGI Company (China) for paired-end sequencing by an Illumina Hiseq 2000 platform and the raw reads were generated. Approximately 18 million fragments were sequenced with length of 150 bp. The quality of the row data was checked with Fast QC vol 0.11.2 and Trimmomatic (v 0.35) were used to remove Illumina adaptors, trimming of reads as well as quality or filtering reads by removing low-quality reads. The reads passed the quality control were mapped to the reference genome using Tophat2 (v2.1.1). For aligning and DE analyzing were used 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** Among 1328 significant differentially expressed genes in immune system, 11 genes were identified in a pathway in KEGG database, which named apoptosis genes. Gene ontology has been shown that the most significant biological process term containing 4 genes in term of GO: 1900182 positive regulation of protein localization to nucleus. The apoptosis genes Network analysis showed that number of nodes was 11, number of edges was 20, average of degree was 3.64, average local clustering coefficient was 0.621. Furthermore, analysis of apoptosis gene networks by Cytoscape showed that PIK3R1 had the highest value by degree. Beside of this result, AKT1 and CSF2RB had the highest value by Betweenness Centrality. The highest out degree and the lowest in degree were related to AKT1.

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

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

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

4-Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(\*-Corresponding Author Email: nassiry@um.ac.ir)

**Conclusion** Overall, 3 apoptic genes including PIK3R1, AKT1 and CSF2RB were recognized as very important in breeding poultry. According to involving apoptic genes in disease and Innate immune system, we may use these genes in breeding plans. We can regulate them with appropriate cell and molecular methods or using epigenetic procedures.

**Keywords:** Apoptosis, Esfehan and Commercial Breeds of Chickens, Gene Ontology, RNA-seq.