



بررسی مقایسه ای ترنسکریپتوم مرغان حساس و مقاوم به سندروم آسیت

کریم حسن پور^۱، محمدرضا نصیری^۲، قاسم حسینی سالکده^۳، رسول واعظ ترشیزی^۴، عباس پاکدل^۵، وحید تقی زاده^۶، سعید صحرايي^۶

۱. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

۲. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۴. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تربیت مدرس

۵. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان

۶. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل نویسنده مسئول: karimhasanpur@yahoo.com

چکیده

سندروم آسیت یک بیماری متابولیکی است که در پرندگان تیپ گوشتی در سنین انتهایی بروز پیدا میکند و تاکنون منشاء اصلی آن ناشناخته مانده‌اند. در پژوهش حاضر ترنسکریپتوم بطن راست جوجه های گوشتی حساس و مقاوم به آسیت از خط B لاین آرین با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل آینده مورد مقایسه قرار گرفت تا دلایل احتمالی بروز آسیت در سطح ترنسکریپتوم شناسایی گردند. نتایج نشان داد که تعداد ۱۲۵ ژن، ۴۰ ایزوفرم، ۸۵ گروه TSS و ۶۲ CDS بین دو گروه سالم و آسیتی تفاوت بیان داشتند. بررسی ژن آنتولوژی این ژن‌ها نشان داد که ژن‌های بیش‌بیاں به پروسه‌های بیولوژیکی انتقال گازهای تنفسی و ژن‌های کم‌بیاں به پروسه‌های بیولوژیکی پاسخ دفاعی در برابر باکتری‌ها، الحاق بیولوژیکی، الحاق سلولی، کشتن سلول‌های موجودات بیگانه و تقسیم سلولی متعلق بوده‌اند. همچنین ژن‌های با تفاوت بیان با بیماری‌های ژنتیکی قلبی-عروقی و مرتبط با انسولین در انسان ارتباط داشته‌اند. می‌توان استنتاج کرد که بافت قلب پرندگان آسیتی از فشار پایین گاز اکسیژن بافتی رنج می‌برد که این مسئله احتمالاً باعث افزایش غلظت گونه‌های اکسیژن فعال شده که آنها نیز به نوبه خود با تأثیر مخرب بر میتوکندری باعث افت تولید انرژی در آنجا می‌شوند. عدم تأمین انرژی کافی برای قلب پرکار پرندگان آسیتی، که به دلیل غلیظ شدن خون و بروز هایپرنتشن ریوی نیاز به انرژی بسیار بیشتری برای پمپ خون دارند، باعث افت عملکرد آن شده و بدین ترتیب نقص قلب و سپس سندروم آسیت حادث می‌شود.

واژه های کلیدی: بیان ژن- آسیت- لاین آرین- RNA-Seq

مقدمه

شناخت دلیل وقوع آسیت در ابتدای شیوع آن، که در ارتفاعات آمریکای جنوبی بوده است، کار سختی نبود و به‌راحتی با آگاهی از اینکه در ارتفاعات هوا رقیق‌تر از نواحی پست‌تر است، شناخته شد (۱). بنابراین وقوع آسیت در ارتفاعات در همان ابتدا به هایپوکسیا (فشار جزئی پایین اکسیژن در اتمسفر) ارتباط داده شد. با این حال در سال‌های بعد، که آسیت در همه جای جهان و حتی در نواحی پست هم‌سطح دریا نیز شایع شد، پیدا کردن دلیل اصلی و محرک بروز آسیت کار آسانی نبود و علیرغم مطالعات متعدد تاکنون دلایل محرکه بروز آسیت در نواحی پست شناخته نشده‌اند (۴ و ۲). تاکنون مطالعات انجام شده این بیماری را در سطح پاتولوژیکی، فیزیولوژیکی، تغذیه ای و اصلاح نژادی بررسی کرده‌اند و مطالعات جامعی که پروفایل بیان ژنی در دو گروه حساس و مقاوم به آسیت را با یکدیگر بررسی



کنند انگشت شمارند (۳ و ۴). در این تحقیق ترنسکریپتوم این دو گروه مورد مقایسه قرار گرفت تا چشم اندازی در مورد ژنهای کنترل کننده این بیماری شناسایی شوند.

مواد و روش ها

در این آزمایش جوجه ها از خط B لاین آرین، که به سندروم آسیت بسیار حساس است، استفاده شده است. تا روز ۲۱ دوره پرورش، همه جوجه ها تحت شرایط استاندارد دما و تغذیه پرورش داده شدند. در روز ۲۱ از تنش سرمایی برای القاء آسیت استفاده شد. از آنجایی که این آزمایش در اواخر زمستان شروع شد، کاهش دمای سالن با مسدود کردن کانال های گرمایشی و باز کردن پنجره ها امکان پذیر بود. دمای سالن در طول روز بین ۱۵ تا ۱۸ درجه در تغییر بود ولی در طول شب تا ۸-۹ درجه نیز کاهش می یافت. علاوه بر سرما از کولرهایی که در سالن یک جریان خفیف هوا ایجاد می کردند، نیز استفاده شد. قلب یکی از بافتهای بسیار مهم درگیر در این سندروم است و به عقیده برخی از محققین نخستین بافت شروع علائم مشخص بیماری میباشد، بنابراین این بافت برای بررسی در این آزمایش استفاده شد. برای نمونه برداری از بافت قلب، در روز ۳۹ دوره پرورش تعداد حدود ۶۵ پرنده کشتار شد و بعد از تعیین آسیتی یا سالم بودن پرنده ها، نمونه های بافتی از آنها جمع آوری و سریعاً به تانک ازت منتقل شدند. نمونه ها برای استخراج RNA کل به آزمایشگاه ژنومیک پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران منتقل شدند. برای مطالعه ژن های با بیان متفاوت در جوجه های آسیتی و سالم تعداد ۱۲ پرنده از هر کدام از گروه های سالم و آسیتی انتخاب شد. مقدار مساوی از RNA استخراج شده از بطن راست قلب هر ۶ پرنده با یکدیگر ادغام شد و ۴ نمونه ادغام شده (۲ تکرار برای گروه سالم و ۲ تکرار برای گروه آسیتی) ایجاد شد. توالی یابی نمونه ها با استفاده از فناوری ایلومینا و توسط شرکت BGI و با استفاده از دستگاه های توالی یابی ایلومینا هایسک ۲۰۰۰ انجام شد. تعداد بالغ بر ۵۰ میلیون خوانش جفت انتهایی ۱۰۰ بازی به ازای هر نمونه تولید شد. برای کنترل کیفی خوانش ها از نرم افزار fastQC و از نرم افزارهای Trimmomatic و PRINSEQ برای پیرایش و فیلتر خوانش های نامطلوب استفاده شد. برای مکانیابی خوانش ها بر روی ژنوم و ترنسکریپتوم مرجع مرغ اهلی (-Gallus gallus) از نرم افزار TopHat استفاده شد. این نرم افزار قابلیت شناسایی و در نظر گرفتن نواحی اسپلایسینگ را دارد و بنابراین برای آنالیز داده های RNA-Seq مناسب است. برای کنترل کیفی بعد از مکان یابی خوانش ها از نرم افزار RseQC-2.3.9 استفاده شد. برای اسمبلی خوانش ها و نائل شدن به ترنسکریپتوم آزمایش حاضر، از نرم افزار Cufflinks استفاده شد. آنالیز تفاوت بیان ژن با استفاده از نرم افزار Cuffdiff انجام شد. از بانک های اطلاعاتی geneontology و DAVID برای آنولوژی ژن استفاده شد.

نتایج و بحث

برای آنالیز تفاوت بیان ژن در کل ترنسکریپتوم از فناوری توالی یابی نسل آینده^۱ (NGS) برای توالی یابی نمونه های RNA، که به اختصار RNA-Seq نامیده می شود، استفاده شد. در این روش، آنالیز بیان همه ژن های بیان شده در بطن راست مرغان سالم و بیمار به طور همزمان انجام گرفت. برای آنالیز تفاوت بیان، تعداد ۲۱۳۷۶ ژن، ۴۸۷۹۹ ایزوفرم، ۳۱۸۰۶ TSS و ۱۶۲۲۳ CDS در مجموع نمونه ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز تفاوت بیان نشان داد که از مجموع تعداد ژن ها و بقیه ویژگی های ژنی مذکور، تعداد ۱۲۵ ژن، ۶۲ ایزوفرم، ۸۵ TSS و ۴۰ CDS در دو تیمار مورد بررسی تفاوت بیان داشتند. از بین ۱۲۵ لوکوس با بیان متفاوت، سطح بیان تعداد ۷۹ لوکوس در گروه آسیتی افزایش و تعداد ۴۶ لوکوس دیگر کاهش نشان داد. از بین ۶۲ ایزوفرم با بیان متفاوت سطح بیان تعداد ۴۱ ایزوفرم افزایش و ۲۱ ایزوفرم دیگر کاهش داشت. از بین ۸۵ TSS با بیان متفاوت، سطح بیان تعداد ۵۵ TSS افزایش و ۳۰ TSS دیگر کاهش داشت.

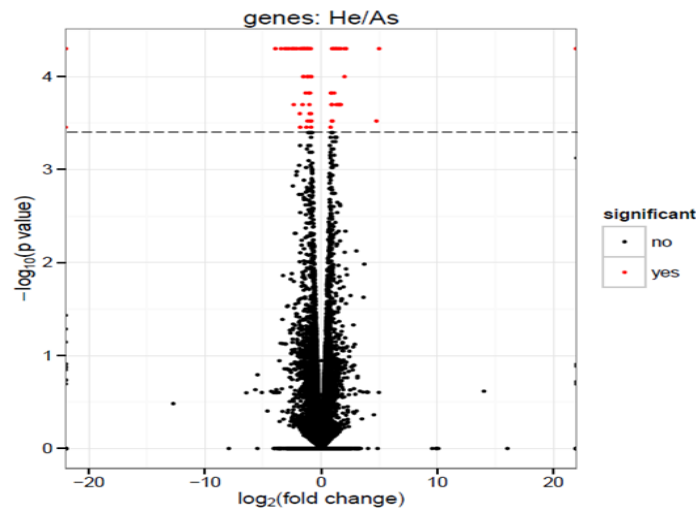
¹ Next Generation Sequencing (NGS)



هفتمین کنفرانس علوم دار ایران

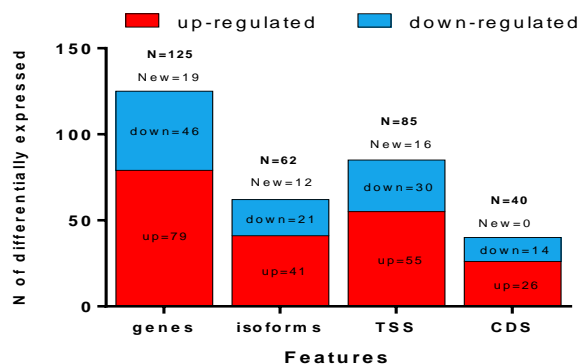


همچنین از بین ۴۰ CDS با بیان متفاوت، سطح بیان ۲۶ مورد افزایش و سطح بیان ۱۴ تای دیگر کاهش یافته بود. در شکل ۱ نمودار آتش فشانی بیان کل ژن‌ها و در شکل ۲ نمودار فراوانی ژن‌ها، ایزوفرم‌ها، TSSها و CDSهای معنی‌دار در دو دسته بیش بیان و کم بیان نشان داده شده‌اند. در شکل ۲ مشهود است که افزایش بیان نسبت به کاهش بیان، سهم بیشتری از ژن‌ها را شامل شده است. در مطالعات ونگ و همکاران (۲۰۱۲) و شای و همکاران (۲۰۱۴) نیز تعداد ژن‌های بیش بیان در پرندگان آسیتی نسبت به پرندگان سالم بیشتر از ژن‌های کم بیان گزارش شده است. هر دو مطالعه مذکور بر روی بافت کبد انجام شده بودند که در مطالعه ونگ و همکاران (۲۰۱۲) تعداد ۱۲۸ ژن بیش بیان و ۵۰ ژن کم بیان و در مطالعه شای و همکاران (۲۰۱۴) تعداد ۲۱۲ ژن بیش بیان و ۱۷۸ ژن کم بیان در تیمار آسیتی گزارش شده بود. به نظر می‌رسد که سلول‌های بافت‌های مختلف پرندگان آسیتی برای مقاومت در برابر بیماری، اقدام به افزایش بیان برخی از ژن‌های خود می‌کنند تا بدین ترتیب از محصول آن‌ها برای تأمین هموستازی خود استفاده کنند. از بین ۱۲۵ لوکوس با بیان متفاوت، تعداد ۱۰۶ لوکوس از قبل شناخته شده بود و ژن یا پروتئین مربوطه در بانک‌های اطلاعاتی گزارش شده بود اما برای تعداد ۱۹ لوکوس باقیمانده هیچ‌گونه انوتیشنی در بانک‌های اطلاعاتی موجود نبود و بنابراین به نظر می‌رسد که مربوط به ژن‌های کاملاً جدید باشند. میزان بیان در تعداد زیادی از لوکوس‌های جدید تا حد قابل قبولی بالا است و می‌تواند بیانگر نقش عملکردی این ژن‌ها باشد.



شکل ۱: نمودار توزیع آتشفشانی تفاوت بیان ژن بین تیمار سالم (He) و آسیتی (As)

نکته: نقاط قرمز بالای خط آستانه مقطع بیانگر ژن‌های با بیان متفاوت و نقاط سیاه زیر آن بیانگر ژن‌های با بیان مشابه می‌باشند.

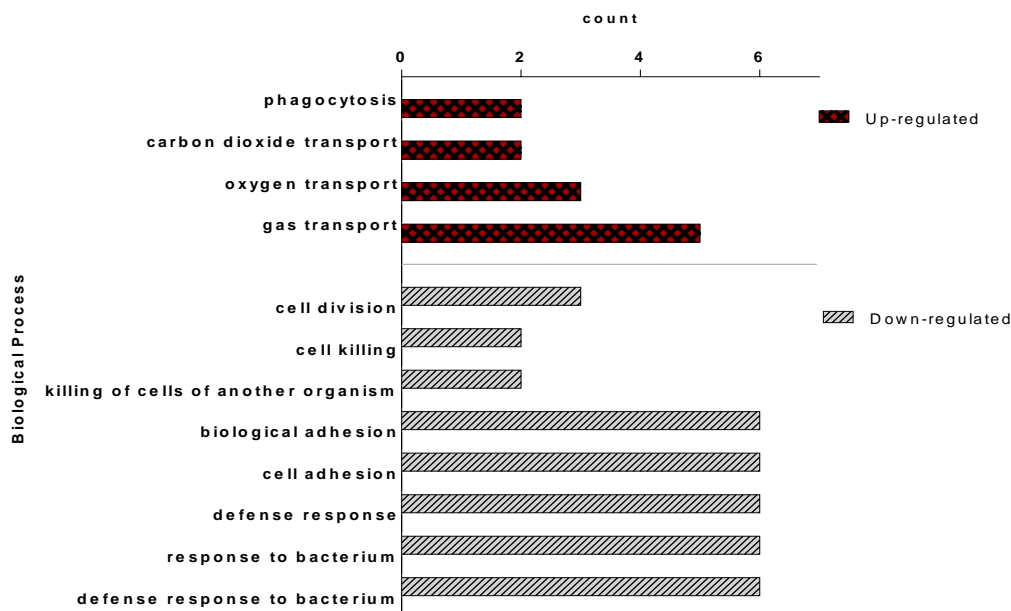


شکل ۲: نمودار ستونی ویژگی‌های مختلف ژنی با بیان متفاوت بین تیمار سالم و آسیتی



نکته: N: تعداد کل ویژگی‌های ژنی با بیان متفاوت، New تعداد ویژگی‌های ژنی انوتیت نشده، Down-regulated تعداد ویژگی‌های ژنی کم بیان و Up-regulated تعداد ویژگی‌های ژنی بیش بیان را نشان می‌دهد.

نتایج آنالیز ژن‌های بیش بیان در گروه آسیتی نشان داد که ژن‌های موجود در پروسه بیولوژیکی انتقال گازهای تنفسی از جمله انتقال گازهای اکسیژن و دی اکسیدکربن و فاگوسیتوزیس به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش بیان روبرو بودند. آنالیز ژن‌های کم بیان نیز نشان داد که این ژن‌ها به مسیرهای بیولوژیکی دفاع در برابر باکتری‌ها، الحاق بیولوژیکی، الحاق سلولی، کشتن سلول‌های موجودات بیگانه و تقسیم سلولی متعلق بوده‌اند. پروسه‌های بیولوژیکی ژن‌های بیش بیان و کم بیان در شکل ۳ نشان داده شده است. مؤلفه‌های سلولی کمپلکس هموگلوبین و بخش‌های سیتوزولی نیز به‌طور معنی‌داری در ژن‌های با بیان بالا غنی بوده‌اند. ژن‌های با کاهش بیان نیز با مؤلفه‌های سلولی نواحی و فضای خارج سلولی مرتبط بوده‌اند. بررسی عملکرد مولکولی نیز نشان داد که محصولات ژن‌های بیش بیان دارای فعالیت حمل‌ونقل و اتصال به اکسیژن، تبادل بین غشایی آمونیوم و کاتیون‌های آلی و اتصال به هم بودند. این در حالی بود که محصولات ژن‌های کم بیان به عنوان مولکول‌های ساختاری و اجزایی ساختاری ماتریکس خارج سلولی نقش ایفا می‌کنند.



شکل ۳: پروسه‌های بیولوژیکی ژن‌های بیش و کم بیان بین دو تیمار سالم و آسیتی

نکته: پروسه‌های بیولوژیکی در هر کدام از گروه‌های بیش و کم بیان به ترتیب نزولی مقدار عددی P-value مرتب شده‌اند.

علاوه بر بررسی ژن آنتولوژی، ارتباط بین ژن‌های با بیان متفاوت با بیماری‌های ژنتیکی شناخته شده در انسان نیز انجام شد. نتایج نشان داد این ژن‌ها با بیماری‌های مربوط به دسته بیماری‌های قلبی-عروقی^۲ در مطالعات قبلی در ارتباط بوده‌اند. بررسی دقیق‌تر بیماری‌ها نشان داد که این ژن‌ها با بیماری‌های مرتبط با انسولین و تراکم استخوان در ارتباط بوده‌اند. هدف اصلی از بررسی ترنسکریپتوم مرغان حساس به آسیت و بررسی مقایسه آن با ترنسکریپتوم مرغان سالم این بود که دیدگاه نسبتاً عمیق‌تری در مورد ژن‌ها و پروسه‌های بیولوژیکی و متابولیسمی مرتبط با این سندروم به دست آید. انتظار می‌رود که نتایج این تحقیق مبنا و پایه بررسی‌های مولکولی آتی بر روی این سندروم

² Cardiovascular



باشد. با جمع‌بندی نتایج می‌توان عامل اصلی شروع آسیت را به نقص سیستم تنفسی در تامین اکسیژن مورد نیاز برای سوخت و ساز ربط داد که کمبود اکسیژن با ایجاد تنش اکسیداتیو، بر میتوکندری سلول تاثیر مخرب گذاشته و موجب بروز اختلال در تولید انرژی سلولی در آن می‌شود.

منابع

1. Cueva S., Sillau H., Valenzue A. and Ploog H. 1974. High-altitude induced pulmonary-hypertension and right heart-failure in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 16: 370-374.
2. Huchzermeyer F.W. 2012. Broiler ascites a review of the ascites work done at the poultry section of the Onderstepoort Veterinary Institute 1981-1990. *World's Poultry Science Journal*, 68: 41-50.
3. Shi S., Shen Y., Zhao Z., Hou Z., Yang Y., Zhou H., Zou J. and Guo Y. 2014. Integrative analysis of transcriptomic and metabolomic profiling of ascites syndrome in broiler chickens induced by low temperature. *Molecular BioSystems*, 10:2984.
4. Wang Y. Guo Y. Ning D. Peng Y. Cai H. Tan J. Yang Y. Liu D. 2012. Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1): 41.

Comparative Transcriptome Analysis of Susceptible and Resistant Chickens to Ascites Syndrome

Abstract

Ascites syndrome (AS), a metabolic disorder in meat-type chickens, occurs mainly at later ages of the birds. Despite many research, there is no consensus about the original cause of this syndrome. In the current research, the whole transcriptome of AS-susceptible chickens was studied in comparison with that of AS-resistant chickens in line B of Arian strain using next generation sequencing technology in order to gain insight into the metabolic mechanisms and to reveal the most probable reason of the syndrome. The results revealed 125, 40, 85, and 62 differential expressed genes, isoforms, transcription start sites (TSS) and coding sequences (CDS), respectively, between the ascitic and healthy groups. Gene ontology analysis showed that the up-regulated genes were enriched in gas transport biological processes, while down-regulated genes were involved in biological processes such as defense response to bacteria, biologic adhesion, cell adhesion, killing of cells of another organism and cell division. The DE genes were genetically associated with human cardiovascular diseases, suggesting the excessive heart problems of the ascitic chicks. It can be concluded that the heart is, probably, the first tissue suffering from the incompetence of small respiratory system of AS-susceptible chickens in delivering sufficient amount of O₂ for metabolism. This tissue hypoxia causes free radicals to concentrate in the heart cells that, in turn, might damage the mitochondria and make the electron respiratory chain uncoupled. In such condition, the energy production machine of the damaged cells would not produce sufficient energy for increasing workload of the ascitic birds' heart in pushing the gravid blood into arterioles that resist against blood flow. In the case of persistent pulmonary hypertension, the congestive heart failure would eventually occur and the bird would die from the AS.

Keywords: Gene Expression Profile- ascites- Arian strain- RNA-Seq