



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

# فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۳۹، تابستان ۱۴۰۰  
ص:ص: ۶۱-۶۶

## آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها در هسته سوپر ایتیک شتر بین فصل زمستان و تابستان تحت داده های RNA-Seq

• حسین نعیمی پور یونسی (نویسنده مسئول)

استادیار گروه علوم دامی دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۶۲۳۷۴۳

Email: hnaeimipour@birjand.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2021.124936

### چکیده:

شترها به دلیل نقش چندمنظوره مانند شیر، تولید گوشت و پشم، حمل و نقل، مسابقه، گردشگری و کارهای کشاورزی نقش مهمی در زندگی انسان‌ها به ویژه در مناطق خشک دارند. علیرغم اهمیت عظیم اقتصادی، فرهنگی و بیولوژیکی آن، ژنوم شتر مورد مطالعه گسترده قرار نگرفته است. اندازه ژنوم شتر تقریباً ۲/۳۸ گیگابایت است که حاوی بیش از ۲۰،۰۰۰ ژن و ۴،۷۲۷،۲۳۸ اس ان پی است. معماری ژنتیکی غیرمعمول شتر دلیل بقا و سازگاری آن با محیط سخت بیابان است. یکی از راه‌های دستیابی به این امر از طریق فعالیت هورمون‌ها و ازوپرسین است که در قسمت خاصی از مغز به نام سیستم هیپوتالامو-نورو هیپوفیزال ساخته می‌شود، اما اثر خود را در کلیه برای تحریک حفظ آب اعمال می‌کند. مطالعات نشان داده که زیرساخت سیستم هیپوتالامو-نورو هیپوفیزال شتر براساس فصل تغییر می‌کند و پیشنهاد شده است که در شرایط خشک تابستان سیستم هیپوتالامو-نورو هیپوفیزال در حالت فعال و آماده‌سازی برای احتمال محرومیت از آب است. در این تحقیق براساس توالی‌یابی ژنوم شتر تک‌کوهانه یک آنالیز RNA-Seq از سیستم هیپوتالامو-نورو هیپوفیز در شرایط مختلف (زمستان نسبت به تابستان) انجام شد. نتایج نشان داد ۴ رونوشت (از ۵۱۵۱۳ رونوشت) به‌طور قابل توجهی اختلاف معنی‌داری ( $FDR < 0.05$ ) دارای تفاوت بیان ژن داشتند به طوری که سه ژن بیان بالا و یک ژن بیان پائین داشتند.

واژه‌های کلیدی: ترانسکریپتوم، ژنوم شتر، سوپر ایتیک، سیستم هیپوتالامو-نورو هیپوفیزال، هورمون ضد ادرار

Applied Animal Science Research Journal No 39 pp: 61-66

**Investigation gene expression differential in the camel supraoptic nucleus between winter and summer under RNA-Seq data**

By: Hossein Naemipour Younesi\*

Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Birjand

Email: hnaemipour@birjand.ac.ir, Tel:+989153623743

**Received: March 2021****Accepted: May 2021**

Camels have an important role in the lives of human beings, especially in arid regions, due to their multipurpose role like milk, meat and wool production, transportation, racing, tourism and agricultural work. In spite of its enormous economic, cultural, and biological importance, the camel genome has not been widely studied. The size of camel genome is roughly 2.38 GB, containing over 20,000 genes and 4,727,238 SNPs. Because of unusual genetic architecture has a remarkable capacity to survive in conditions of extreme heat without needing to drink water. One of the ways that this is attained is through the actions of the antidiuretic hormone arginine vasopressin (AVP), which is made in the hypothalamo-neurohypophyseal system (HNS) of brain, but applies its effects at the level of the kidney to stimulate water preservation. The studies have shown that the ultrastructure of the dromedary HNS changes according to season, suggesting that in the arid conditions of summer the HNS is in an activated state, in preparation for the likely landscape of water privation. Based on dromedary camel genome sequence, carried out an RNA-Seq analysis of the dromedary HNS under the different conditions (winter vs. summer). Amongst the 4 transcripts (of 51513 transcripts) found to be significantly differentially regulated (FDR < 0.05), so that three genes had up-regulated and one gene had down-regulated.

**Key words:** Antidiuretic hormone, Camel genome, Hypothalamo-neurohypophyseal system, Transcriptome

**مقدمه**

نارسایی قلبی ناشی از اختلال در گردش خون، برای شان کشنده خواهد بود (اینکرم و مانت، ۲۰۱۲). معماری ژنتیکی غیرمعمول شتر، دلیل بقا و سازگاری آن با شرایط سخت محیط بیابان است. اندازه ژنوم شتر تقریباً ۲/۳۸ گیگابایت است که حاوی بیش از ۲۰،۰۰۰ ژن و ۴،۷۲۷،۲۳۸ اس ان پی است (خلخالی و همکاران، ۲۰۱۸؛ وو و همکاران، ۲۰۱۴). زندگی در شرایط نامساعد و پراسترس بیابان و قرار گرفتن در معرض عواملی مانند اشعه ماورای بنفش خورشید و میزان نمک بالا (در گیاهانی که شترها از آن تغذیه می کنند و نیز آب مورد استفاده آنها) می تواند باعث افزایش تخریب DNA شده و در نتیجه، نیاز به تولید و تعمیر این مواد حیاتی را بالا ببرد (بورگ و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج بدست آمده در یک تحقیق نشان داد که وقوع درج-ها و حذفها (ایندلها) بیشتر در ژنهایی که در عادت پذیری

شترها یکی از شگفت انگیزترین انواع پستانداران در جهان محسوب می شود علی رغم آن که شتر دارای ویژگی های منحصر به فردی است که منجر به تحمل و بقا شتر در شرایط سخت صحرا و دماهای گوناگون به ویژه گرمای شدید تابستان و کمبود آب و علوفه می گردد و می توان گفت که کشتی بیابان هاست و قوی ترین، کم خرج ترین، پرفایده ترین، آرام ترین و بردبارترین حیوان است. شترها به دلیل نقش چند منظوره مانند شیر، تولید گوشت و پشم، حمل و نقل، مسابقه، گردشگری و کارهای کشاورزی نقش مهمی در زندگی انسانها به ویژه در مناطق خشک دارند (علی و همکاران، ۲۰۱۹). از دست دادن آب در شتر به خوبی قابل تحمل است و می تواند تا ۳۴ درصد آب را از دست بدهد و زنده بماند (اشمیت نیلسن، ۱۹۵۹) اما پستاندارانی که در بیابان زندگی نمی کنند، از دست دادن ۱۲ درصد آب به دلیل

خوانش ها روی ژنوم مرجع و خلاصه سازی خوانش های توالی خام روی این داده ها صورت گرفته بود و به صورت ماتریس خوانش های نقشه یابی سطح ژن در سایت NCBI بارگذاری شده بودند. آنالیز داده ها با یک برنامه تحت وب یکپارچه (iDEP<sup>2</sup>) که به ۶۳ بسته نرم افزاری از نرم افزار R و Bioconductor، ۲ سرویس وب و پایگاه های جامع حاشیه نویسی و مسیر برای ۲۲۰ گونه گیاهی و حیوانی متصل است انجام شد (جی و همکاران، ۲۰۱۸).

### نتایج

بعد از بارگیری داده های شمارش خوانش ها، داده ها مورد با پیش فرض کمتر از ۰/۵ خوانش در میلیون، در حداقل یک نمونه، فیلتر شدند و ۱۳۴۷۶ ژن حذف گردید. از مجموع ۶۴۹۸۹ ژن در ۴ نمونه، ۵۱۵۱۳ ژن، برای آنالیز تفرق ژن مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۱ کل شمارش خوانش ها (میلیون) را در نمونه ها نشان می دهد که تنوع اندکی دیده می شود. شکل ۲ توزیع داده های تبدیل لگاریتمی شده توسط بسته نرم افزاری DESeq2 را نشان می دهد که واریانس وابسته به میانگین کاهش می یابد و همچنین تنوع بین تکرارها اندک است. ژن ها براساس انحراف معیار رتبه بندی شدند و ۱۰۰۰ ژن برتر در یک خوشه بندی سلسله مراتبی به صورت نمودار حرارتی (heatmap) در شکل ۳ نشان داده شده است. در این نمودار نمونه ها در ستون ها و ژن ها در ردیف ها قرار دارند و رنگ و شدت آن در جعبه ها نشان دهنده میزان بیان ژن می باشد. رنگ سبز نشان دهنده کاهش بیان، رنگ قرمز افزایش بیان و رنگ سیاه عدم تغییر در بیان ژن می باشد.

شترها به شرایط بیابان دخیل بوده اند، رخ داده است (خلخالی ایوریک، ۱۳۹۷). در شتر ژن های سیتوکروم P450 (CYP) که در متابولیسم اسید آراشیدونیک دخیل هستند، در مقایسه با سایر پستانداران توزیع متفاوت دارند. در آنالیز ژنوم شتر دو کوهانه، تعداد بیشتری از نسخه های ژن سیتوکروم P450 (CYP) مانند CYP2J (۱۱ نسخه) و CYP2E (۲ نسخه) در مقایسه با دیگر پستانداران و انسان یافت شد. اما نسخه های ژن های CYP4A (یک نسخه) و CYP4F (دو نسخه) از دیگر پستانداران کمتر بودند (۱۰). ژن های CYP2E و CYP2J، آراشیدونیک اسید را به ۱۹ اس هیدروکسی ایکوساتترانوئیک اسید تبدیل می کنند در حالی که ژن های CYP4F و CYPA آن را به ۲۰ هیدروکسی ایکوساتترانوئیک اسید، تبدیل می کنند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۲). ۱۹ اس هیدروکسی ایکوساتترانوئیک اسید، یک گشادکننده قوی عروق پری گلومرال کلیوی است، که محرک بازجذب آب است و برای بقاء حیوان به طور بالقوه در بیابان ها مفید است (کارول و همکاران، ۱۹۹۶). بعلاوه چندین نسخه از ژن های CYP2J به شتر این امکان را می دهد که مقدار زیادی نمک را بدون ایجاد فشارخون استفاده کنند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۲). فعالیت CYP2J2 با نمک بالای جیره تنظیم می شود و عدم فعالیت آن منجر به فشار خون بالا می شود (ژائو و همکاران، ۲۰۰۳).

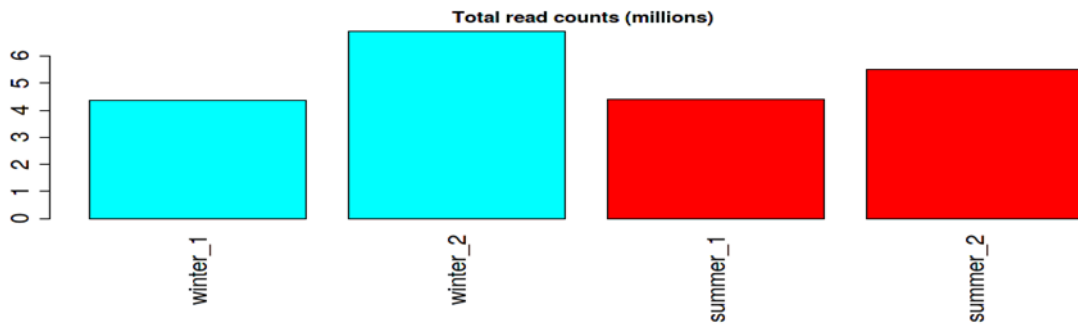
هورمون های ضد ادراری (ADH<sup>1</sup>) مانند وازوپرسین (Vasopressin) در هسته های ویژه ای در هیپوتالاموس، به نام سوپراپتیک ساخته شده و در نوروهیپوفیز ذخیره می شوند (الیم و همکاران، ۲۰۱۹). هدف از این تحقیق استفاده از داده های RNA-Seq برای بررسی بیان افتراقی ژن ها در هسته های سوپراپتیک شتر در شرایط مختلف محیطی (فصل زمستان نسبت به تابستان) بود.

### مواد و روش

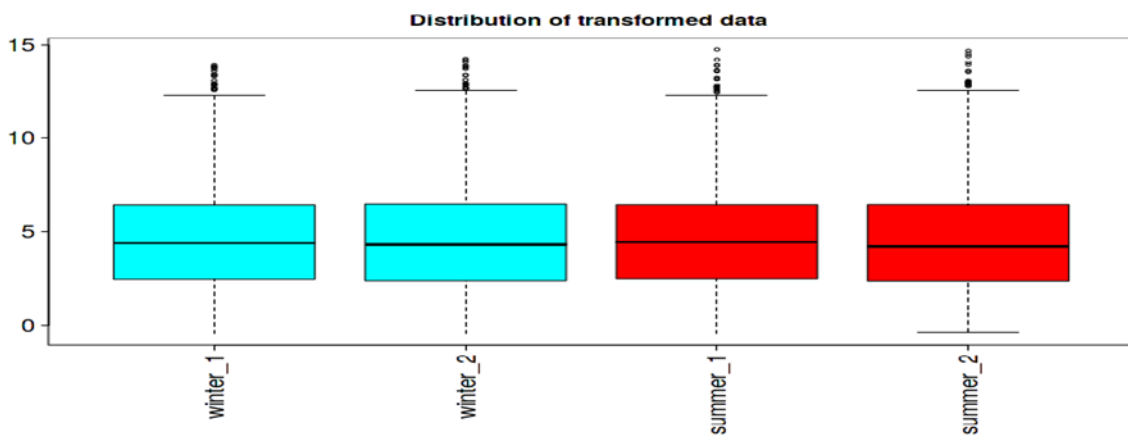
در این تحقیق به منظور شناسایی ژن های با بیان بالا، داده های شمارش خوانش ها مربوط به یک مطالعه RNA-Seq با شماره دسترسی GSE131361 از سایت NCBI استخراج گردید (الیم و همکاران، ۲۰۱۹). کیفیت و پیرایش خوانش ها، نقشه یابی

<sup>1</sup> Antidiuretic hormone (ADH)

<sup>2</sup> integrated Differential Expression and Pathway analysis (iDEP)



شکل ۱: توزیع خوانش‌های داده‌های تبدیل شده



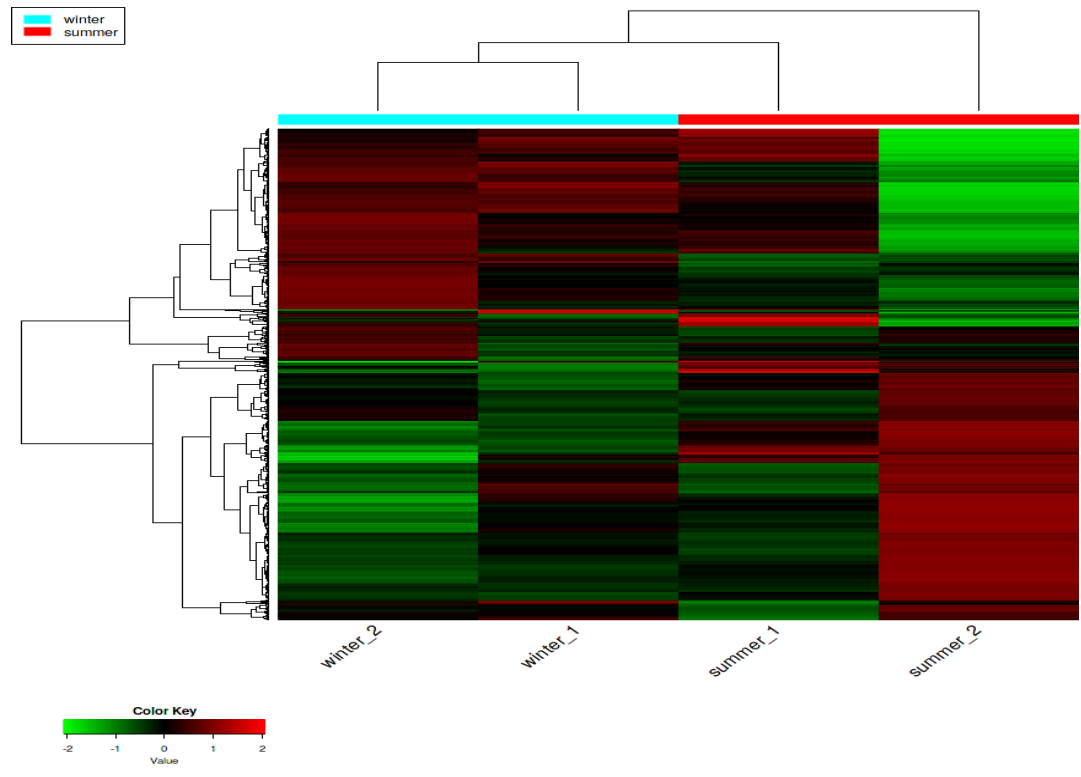
شکل ۲: توزیع داده‌های تبدیل لگاریتمی شده

( $FDR^4 < 0.1$ ) و تغییر بیش از دو برابر ( $fold-change > 2$ ) شناسایی شدند.

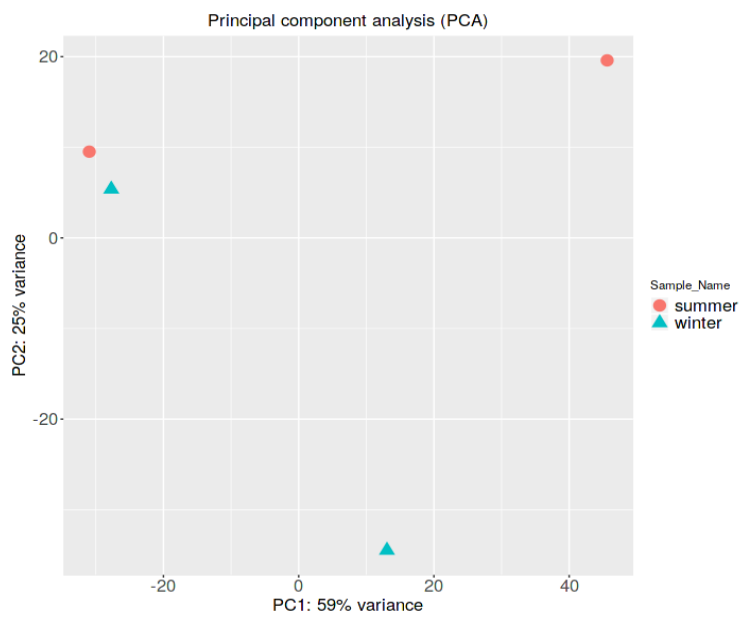
نمودار آنالیز مؤلفه اصلی ( $PCA^3$ ) با استفاده از اولین و دومین مؤلفه‌های اصلی در شکل ۴ نشان داده شده است. اختلاف مشخصی بین دو تکرار نمونه‌های تابستان و زمستان دیده می‌شود که در امتداد اولین مؤلفه اصلی ۵۹ درصد از واریانس را توضیح می‌دهد هرچند دو تکرار بسیار به هم نزدیک هستند و اختلافی با هم نداشتند. با استفاده از بسته نرم‌افزاری DEseq2 و در شرایط مختلف (زمستان نسبت به تابستان) ۳ ژن با بیان بالا ( $CDRV1\_G00004866$ ،  $CDRV1\_G00024277$ ) و ۱ ژن با بیان پائین ( $CDRV1\_G00036692$ ) و ۱ ژن با بیان پائین ( $CDRV1\_G00006613$ ) با آستانه میزان کشف اشتباه

<sup>3</sup> Principal components analysis (PCA)

<sup>4</sup> False discovery rate (FDR)



شکل ۳: نمودار حرارتی بیان ژن در نمونه‌ها



شکل ۴: نمودار آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA)

## بحث

- stresses. *Physiological reviews*, 87(4), 1441-1474.
5. Carroll, M. A., Balazy, M., Margiotta, P., Huang, D. D., Falck, J., and McGiff, J. C. (1996). Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(4), R863-R869.
  6. Ge, S. X., Son, E. W., and Yao, R. (2018). iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC bioinformatics*, 19(1), 534.
  7. Ingram, D. L., and Mount, L. E. (2012). *Man and animals in hot environments*: Springer Science and Business Media.
  8. Khalkhali, I. R., Hafezian, S. H., Hedayat, I. N., Farhadi, A., and Bakhtiarizadeh, M. R. (2018). Detection and analysis of deletions and insertions in genome of Iranian dromedary camels using whole genome sequencing data.
  9. Schmidt-Nielsen, K. (1959). The physiology of the camel. *Scientific American*, 201(6), 140-151.
  10. Sequencing, T. B. C. G., Wang, Z., Ding, G., Chen, G., Sun, Y., Sun, Z., . . . Zhang, Y. (2012). Genome sequences of wild and domestic bactrian camels. *Nature communications*, 3, 1202.
  11. Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., . . . Levine, B. (2012). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*, 338(6109), 956-959.
  12. Wu, H., Guang, X., Al-Fageeh, M. B., Cao, J., Pan, S., Zhou, H., . . . Xie, Z. (2014). Camelid genomes reveal evolution and adaptation to desert environments. *Nature communications*, 5, 5188.
  13. Zhao, X., Pollock, D. M., Inscho, E. W., Zeldin, D. C., and Imig, J. D. (2003). Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with angiotensin salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 41(3), 709-714.

برای این داده‌ها علیم و همکاران (۲۰۱۹)، ۱۷۱ ژن را دارای تفاوت معنی‌دار در تغییرات بیان ژن گزارش کردند ( $P < 0.05$ ) که از نتایج این تحقیق بیشتر بود و دلیل تفاوت می‌تواند استفاده آستانه معنی‌دار تصحیح نشده (P-value) در گزارش آنها باشد که سبب گردید تعداد ژن بیشتری معنی‌دار باشند.

## توصیه های ترویجی

در حالیکه ۱۲ درصد از دست دادن آب در سایر حیوانات به دلیل نارسایی قلبی ناشی از اختلال در گردش خون کشنده است اما شتر تا ۳۰ درصد ازدست دادن آب می‌تواند زنده بماند. شناسایی ژن‌های اصلی مرتبط در سازگاری با محیط بیابانی ممکن است در برنامه های اصلاح نژاد کاربرد داشته باشد و دیدگاه‌هایی برای تحقیق در مورد مقاومت به بیماری در گونه‌های مختلف حیوانی و انسان ارائه دهد. مطالعات آینده ژنوم شتر ممکن است به درک دقیق مکانیسم‌های مهم فیزیولوژیکی با توجه به شرایط پزشکی انسان (به عنوان مثال، ارتباط بین متابولیسم سدیم و فشار خون بالا، قند خون و دیابت، متابولیسم چربی و چاقی و گرد و غبار و بیماری‌های تنفسی) کمک کند.

## منابع

۱. خلخالی ایوریق، رضا، حافظیان، سیدحسین، هدایت ایوریق، نعمت، فرهادی، ایوب، بختیاری‌زاده، محمدرضا، (۱۳۹۷). شناسایی و آنالیز حذف و درج‌ها در ژنوم شترهای تک‌کوهانه ایران با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم. *تولیدات دامی*، ۲۰(۱)، ۱۰۹-۱۲۰.
2. Ali, A., Baby, B., and Vijayan, R. (2019). From Desert to Medicine: A Review of Camel Genomics and Therapeutic Products. *Frontiers in genetics*, 10.
3. Alim, F. Z. D., Romanova, E. V., Tay, Y.-L., bin Abdul Rahman, A. Y., Chan, K.-G., Hong, K.-W., . . . Mecawi, A. S. (2019). Seasonal adaptations of the hypothalamoneurohypophyseal system of the dromedary camel. *PLoS one*, 14(6), e0216679.
4. Burg, M. B., Ferraris, J. D., and Dmitrieva, N. I. (2007). Cellular response to hyperosmotic