

## شناسایی ژن‌های مؤثر بر میزان چربی محوطه بطنی جوجه‌های گوشتی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و توالی‌یابی RNA

فرزاد غفوری<sup>۱</sup>، مصطفی صادقی<sup>۲\*</sup>، ابوالفضل بهرامی<sup>۳</sup> و سیدرضا میرائی آشتیانی<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳، ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشجوی سابق دکتری و استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، پردیس

کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۴)

### چکیده

امروزه انتخاب ژنتیکی برای افزایش رشد و تولید پروتئین حیوانی با کیفیت بالا در جوجه‌های گوشتی (*Gallus gallus domesticus*)، معمولاً منجر به افزایش وزن بیش از حد خواهد شد که نتیجه آن تأثیر منفی بر راندمان مصرف خوراک و کیفیت لاشه مانند افزایش چربی محوطه بطنی می‌شود. هدف این مطالعه استفاده از پروفایل ترانسکریپتوم بافت چربی دو دسته جوجه‌های گوشتی با چربی زیاد و کم در محوطه بطنی، به منظور شناسایی ژن‌های مؤثر در متابولیسم و ذخیره چربی می‌باشد. در تجزیه داده‌های ریزآرایه و RNA-seq برای بیان تفاوت ژنی به ترتیب ۲۹۱۴ و ۱۸۶۷ ژن استخراج شد که در مجموع با مقایسه ژن‌های شناسایی شده که تفاوت بیانی معنی‌داری داشتند ( $P < 0.000001$ )، ۱۸۳۵ ژن شناسایی شد. سپس با مقایسه تعداد ژن مربوطه در میان پروفایل‌های ترانسکریپتوم، ژن‌های مشترک مرتبط شامل THBS1، COLEC12، ANXA7، RGS19، TMEM258 و HTR7L بودند که در فرآیند اصلی مسیرهای کنترل سنتز، متابولیسم و ذخیره چربی و مسیر سیگنالینگ غدد درون‌ریز فعال شده توسط آدیپوکین‌ها دارای نقش می‌باشند. تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مرتبط با ذخیره چربی محوطه بطنی می‌تواند بیان‌کننده نقش آن به عنوان یک اندام متابولیک و درون‌ریز در جوجه‌های گوشتی باشد.

واژه‌های کلیدی: پروفایل ترانسکریپتوم، داده کاوی، مسیر سیگنالینگ، متابولیسم چربی.

## Identification of genes affecting the amount of abdominal fat in broiler chickens using microarray and RNA sequencing data

Farzad Ghafouri<sup>1</sup>, Mostafa Sadeghi<sup>2\*</sup>, Abolfazl Bahrami<sup>3</sup> and Seyed Reza Miraei-Ashtiani<sup>4</sup>

1, 2, 3, 4. M.Sc. Student, Associate Professor, Former Ph.D. Student and Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: May 21, 2019 - Accepted: Sep. 15, 2019)

### ABSTRACT

Abdominal fat deposition and several other unique features in the metabolism of birds such as interaction between genetic and endocrine factors, fasting hyperglycemia and insulin resistance are signs of obesity and metabolic disorders in poultry, similar to humans. The main purpose of this study was to use transcript profile of fat tissue in two groups of broiler chickens with high and low abdominal fat deposition, to identify the genes involved in storage and metabolism of fat, as well as the signaling pathways associated with the endocrine glands. Based on the analysis of microarray and RNA-seq data, 2914 and 1867 genes were detected as differentially expressed genes, respectively. In total, 1835 genes were identified by comparing the genes with a significant difference in expression ( $P < 0.000001$ ). Then, by comparing the number of relevant genes among the transcript profiles, the most important related genes were THBS1, COLEC12, ANXA7, RGS19, TMEM258 and HTR7L, which in the main process of pathways controlling synthesis, fat metabolism and storage and the endocrine signaling pathways activated by adipokines, are involved. The analysis of the relevant tissue may indicate the role of ventricular fat as a metabolic and endocrine organ in broiler chickens.

**Keywords:** Data mining, fat metabolism, signaling pathway, transcriptomic profile.

\* Corresponding author E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir

### مقدمه

افزایش چربی محوطه بطنی و چند ویژگی منحصر به فرد دیگر در متابولیسم پرندگان مانند آثار متقابل بین عوامل ژنتیکی و غدد درون‌ریز، هیپرگلیسمی ناشتا و مقاومت به انسولین، از نشانه‌های مرتبط با چاقی و اختلالات متابولیکی در طیور است که با انسان مشابهت دارد. از مرغ اهلی (*Gallus gallus domesticus*) به‌عنوان یک منبع استراتژیک برای تأمین پروتئین حیوانی با کیفیت بالا در تغذیه انسان و همچنین مدل حیوانی مناسب برای مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی نام برده می‌شود (Burt, 2007; Cogburn, 2007; Stern, 2005; Dodgson, 2007; et al., 2007). به‌گونه‌ای که به‌صورت گسترده به‌عنوان یک مدل زیست پزشکی برای درک مکانیسم‌های پایه‌ای جهت کنترل رشد جنین، عملکرد سیستم ایمنی، مصرف مواد غذایی، حساسیت هورمونی و چاقی استفاده شده است (Resnyk et al., 2015). افزایش انرژی جیره در تغذیه جوجه‌های گوشتی باعث افزایش سرعت رشد و بهبود عملکرد می‌شود و دارای آثار منفی مانند تنش و افزایش چربی محوطه بطنی و لاشه می‌شود (Julian, 2005; Hassanzadeh et al., 1997). وجود چربی در لاشه ماکیان بویژه جوجه‌های گوشتی، به‌دلیل بازارپسندی کمتر و نیز هزینه بیشتر تولید به‌عنوان یکی از مشکلات و چالش‌های اصلی در صنعت طیور به‌شمار می‌آید، زیرا انرژی مورد نیاز برای ساخت و ذخیره یک گرم چربی، دو برابر انرژی مورد نیاز برای ساخت و ذخیره همان مقدار پروتئین است (Moody et al., 2000). این در حالی است که حدود ۷۰ درصد از هزینه‌های یک واحد مرغداری را هزینه خوراک تشکیل می‌دهد (Abdollahi et al., 2013). از طرفی دیگر مصرف گوشت با چربی بالا، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و به‌دنبال آن احتمال سکت قلبی را در انسان افزایش می‌دهد (Leheska et al., 2009). تجمع چربی در لاشه مرغ‌های گوشتی باعث کاهش بازده خوراک، کاهش کیفیت لاشه و کاهش تمایل به خرید لاشه‌های سنگین‌تر نسبت به میانگین وزن گله می‌شود. کل چربی موجود در لاشه جوجه‌های گوشتی متغیر بوده، ولی به‌طور میانگین

حدود ۱۲ درصد می‌باشد (Sakomura et al., 2005). بخش عمده چربی لاشه مرغ در حفره شکمی بوده و حدود ۱۸ تا ۲۲ درصد کل چربی لاشه گزارش شده است (Crespo & Esteve-Garcia, 2001). تفاوت در میزان و حجم توده چربی در نواحی ذخیره‌ای مختلف لاشه مرغ بستگی به جنس، سن پرده، وزن زنده، تغذیه و عوامل ژنتیکی دارد (Tumova & Teimouri, 2010).

مرغ دارای چند ویژگی متابولیکی منحصر به فرد می‌باشد که آن را به یک مدل ایده‌آل و برتر برای مطالعات در زمینه چربی تبدیل کرده است (Resnyk et al., 2015). از ویژگی‌های منحصر به فرد متابولیسم بدن پرندگان می‌توان به درک تعاملات و اثر متقابل بین عوامل ژنتیکی و غدد درون‌ریز اشاره کرد که این روابط به توسعه چاقی و اختلالات متابولیکی مرتبط کمک می‌کند (Resnyk et al., 2013). عدم حساسیت نسبی جوجه‌های گوشتی به انسولین باعث اختلاف بیان بیش از یک هزار ژن در عضله کبد و عضلات اسکلتی شد (Simon et al., 2012). در مقابل تنها ۶۹ ژن پس از ایمنی‌سازی نسبت به انسولین در رونویسی بافت چربی محوطه بطنی جوجه‌های گوشتی بیان شد. هر چند که تولید سریع چربی در اثر تغذیه سریع در مدت زمان کوتاه موجب تغییر بسیار شدید (بیان متفاوت ۱۷۸۰ ژن) در رونویسی ژن‌های چربی محوطه بطنی می‌شود (Ji et al., 2012).

بیشتر مدل‌های چاقی در پستانداران از جهش‌های تک‌ژنی و نیز استفاده از رژیم‌های غذایی با چربی و انرژی بالا ناشی می‌شود (Nilsson et al., 2012). عدم وجود اختلال در جایگاه ژنومی ۵ آدیپوکین مرغ بویژه لپتین (LEP)، برخلاف پستانداران نشان می‌دهد که مکانیسم‌های جایگزین برای تنظیم مصرف خوراک و تعادل بین مصرف انرژی و ذخیره‌سازی باید وجود داشته باشد (Friedman-Einat et al., 2014). تولید چربی در مرغ‌ها، یک صفت پلی‌ژنیک با توارث‌پذیری بالا است که توسط عوامل مختلف رفتاری، محیطی و هورمونی تنظیم می‌شود (Rankinen et al., 2006; Ikeobi et al., 2002; Le Mignon et al., 2009).

در مطالعه‌ای با استفاده از ریزآرایه‌های با تراکم بالا در دو گروه پرندگان چاق (دارای چربی بالا) و پرندگان

ژن‌های شناسایی شده در چربی محوطه بطنی جوجه‌های گوشتی با سرعت رشد پایین، بیشتر با هموستاز، کاتابولیسم انرژی و مسیر سیگنالینگ غدد درون‌ریز مرتبط می‌باشد (Resnyk *et al.*, 2017). مطالعاتی روی عضلات اسکلتی (Zheng *et al.*, 2009) و هیپوتالاموس (Ka *et al.*, 2011) جهت شناسایی ژن‌های مسئول نرخ رشد انجام شده است تا اطلاعات جامعی از ژن‌های رونویسی اصلی در مدل‌های مختلف رشد جوجه‌های گوشتی به دست آورند. تجزیه و تحلیل ریزآرایه‌ها نشان‌دهنده این است که بیان چندین ژن با افزایش یا کاهش رشد عضله سینه و چربی داخل عضلانی ارتباط دارد و در نتیجه آن می‌توان عنوان کرد که بافت چربی در تنظیم میزان رشد عضله دارای نقش است (Resnyk *et al.*, 2017).

با این وجود شناسایی ژن‌های بالا و پایین دست دخیل در متابولیسم و ذخیره چربی بویژه چربی ناحیه شکمی با استفاده از داده‌های پربونداد در جوجه‌های گوشتی تاکنون صورت نگرفته است. افزون بر این هنوز هم تعداد بسیار زیادی از ژن‌های مرتبط با هموستازی، کاتابولیسم انرژی و مسیر سیگنالینگ غدد درون‌ریز که مرتبط با متابولیسم و ذخیره چربی هستند، شناسایی نشده‌اند. بر پایه بررسی‌های پیشین مربوط به متابولیسم چربی در بدن و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ذخیره چربی و انتقال آن در گونه‌های آزمایشگاهی و نیز جوجه‌های گوشتی فرض شد که در دو دسته از جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی بالا و چربی محوطه بطنی پایین، تفاوت بیانی مختلفی در ژن‌های مرتبط با متابولیسم و ذخیره چربی از خود نشان می‌دهند.

بنابراین هدف اصلی در این مطالعه استفاده از داده‌های RNA-seq و ریزآرایه برای شناسایی ژن‌هایی که در متابولیسم و ذخیره چربی محوطه بطنی در جوجه‌های گوشتی دخیل هستند، می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

برای فهم بهتر فرآیندهای زیستی مرتبط با ذخیره چربی به‌خصوص در محوطه بطنی از مجموعه داده‌های مختلفی استفاده شد که نحوه نمونه‌گیری

لاغر (دارای چربی پایین) نشان دادند که ژن‌های مرتبط با مسیرهای زیستی لیپوژنیک در بافت چربی مرغ رونویسی می‌شوند (Ji *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای دیگر میزان بیان ژن و پروفایل متابولیکی در چربی محوطه بطنی نژادهای نسبتاً لاغر مرغ (لگهورن و فایومی) با جوجه‌های گوشتی سنگین‌تر در همان سن مقایسه شد. نتایج این تحقیق بیان‌کننده این است که کاهش چربی محوطه بطنی در نژادهای لگهورن و فایومی با افزایش کاتابولیسم لیپید و کاهش سنتز لیپیدها به دست می‌آید، در حالی که افزایش چربی در جوجه‌های گوشتی باعث کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب و آزاد شدن اسیدهای چرب غیراستریفه توسط چربی ناحیه شکمی می‌شود (Leclercq *et al.*, 1980).

در مطالعه‌ای دیگر با مقایسه ژن‌های بیان‌شده، تعداد بسیار زیادی ژن در غدد درون‌ریز، هموستاتیک، لیپولیتیک و ژن‌های انتقالی لیپید در چربی ناحیه شکمی جوجه‌های با چربی محوطه بطنی پایین شناسایی شده است (Resnyk *et al.*, 2013). از سوی دیگر چربی احشایی جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی بالا نشان‌دهنده بیان بالای عوامل متعدد رونویسی، آنزیم‌ها و انتقال‌دهنده‌های درگیر در آدیپوژنز و لیپوژنز بود (Resnyk *et al.*, 2013). مطالعه رونویسی بافت چربی جوجه‌های گوشتی تجاری، در مدت زمان کوتاه ناشتا (۵ ساعت)، منجر به اختلاف بیان ۱۷۸۰ ژن شد، این در حالی است که پس از خنثی‌سازی اثر انسولین در آن‌ها تنها ۹۲ ژن دخیل در متابولیسم چربی تحت تأثیر قرار گرفت (Ji *et al.*, 2012). با این وجود در درک مکانیزم آدیپوژنز در جوجه‌های گوشتی بویژه اهمیت سنتز مجدد لیپیدها در بافت چربی محوطه بطنی و عملکرد تعدادی از فاکتورها یا گیرنده‌های بیان‌شده غدد درون‌ریز هنوز هم ناشناخته‌هایی وجود دارد. هیپرگلیسمی جوجه‌های گوشتی با چربی بالا نشان‌دهنده نرخ بالاتر لیپوژنز کبدی از متابولیسم کربوهیدرات است که به احتمال زیاد به علت افزایش حساسیت به انسولین در جوجه‌های گوشتی با چربی بالا می‌باشد (Leclercq *et al.*, 1984; Simon & Leclercq, 1982).

برای پردازش داده‌های مربوط به کدهای دسترسی GSE42980 و GSE49121 (Resnyk *et al.*, 2015) و RNA-seq مرتبط با آنها نرم‌افزارهای مختلفی استفاده شد که در زیر به آنها اشاره می‌شود.

در آغاز برای کنترل کیفیت داده‌های موجود از نرم‌افزار کنترل کیفیت FastQC (Andrews, 2010) و FastQ Groomer (Blankenberg *et al.*, 2010) برای تبدیل فرمت فایل‌ها به فرمت ایلومینا و سنگر استفاده شد. پس از تبدیل فرمت فایل‌ها، داده‌ها نیاز به پیرایش آداپتورها داشتند که برای انجام این کار از نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) استفاده شد. در مرحله بعد از نرم‌افزار TopHat2 (Kim *et al.*, 2013) برای نقشه‌یابی قطعه‌های خوانده‌شده روی ژنوم مرجع گونه مرغ (*Gallus gallus domesticus*) استفاده گردید. در پایان با استفاده از نرم‌افزار CuffDiff (Trapnell *et al.*, 2010) میزان تفاوت در بیان ژن‌ها ارزیابی شد.

#### حاشیه‌نویسی ژن‌ها

برای حاشیه‌نویسی ژن‌ها از پایگاه‌های مختلفی از جمله DAVID (Huang *et al.*, 2009)، g:profiler<sup>۳</sup> و GeneCards<sup>۴</sup> استفاده شد.

#### استخراج فهرست ژنی

با تجزیه جداگانه کدهای دسترسی مربوط به داده‌های ریزآرایه و RNA-seq (مجموعه‌ای از داده‌هایی که تاکنون در پایگاه داده‌های مختلف ثبت شده‌اند) تعداد ژن‌هایی که تفاوت معنی‌داری داشتند، شناسایی شد.

آن‌ها بسته به نوع مجموعه داده‌ای و همچنین شرایط مطالعه متفاوت بود. مهمترین استراتژی به کار گرفته‌شده در این تحقیق شناسایی ژن‌هایی بود که در شرایط محیطی مختلف از خود تفاوت بیان نشان دادند. در جهت انجام تجزیه و تحلیل داده‌های مرتبط با چربی محوطه بطنی و یافتن ژن‌های کلیدی مؤثر در ذخیره چربی در دو دسته از جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی بالا و جوجه‌های با چربی محوطه بطنی پایین، گردش کار که در ادامه توضیح داده می‌شود، استفاده شد.

#### جمع‌آوری داده

با جستجو در پایگاه GEO<sup>۱</sup> و Array Express<sup>۲</sup> برای بافت چربی محوطه بطنی در گونه اهلی گالوس گالوس (*Gallus gallus domesticus*) شمار زیادی داده گردآوری شد. کدهای دسترسی GEO برای مجموعه داده‌های RNA-seq و ریزآرایه مطابق با جدول ۱ می‌باشند.

#### تجزیه مربوط به داده‌های ریزآرایه و RNA-seq

داده‌های ریزآرایه شامل کدهای دسترسی GSE37585 (Resnyk *et al.*, 2013)، GSE8812 (Cogburn, 2007)، GSE45825 (Resnyk *et al.*, 2013)، GSE10052 (Byerly *et al.*, 2010) و GSE3867 (Bourneuf *et al.*, 2006) بودند که با استفاده از بسته نرم‌افزاری Lumi (Du *et al.*, 2008) در نرم‌افزار R پیش پردازش شدند. در ادامه داده‌های پردازش‌شده با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری Limma (Ritchie *et al.*, 2015)، GEOquary (Davis & Meltzer, 2007) و Biobase (Huber *et al.*, 2015) آنالیز شدند.

جدول ۱. کدهای دسترسی GEO برای مجموعه داده‌های RNA-seq و ریزآرایه

Table 1. GEO access codes for RNA-seq and microarray data sets

NO.	Data Type	GSE	Platforms	No. Sample(s)	Contributor(s)
1	RNA-seq	GSE49121	GPL16133 (Illumina HiSeq 2000)	16	Resnyk <i>et al.</i> , 2015
2	RNA-seq	GSE42980	GPL16133 (Illumina HiSeq 2000)	24	Resnyk <i>et al.</i> , 2015
3	Microarray	GSE37585	GPL1731 (DEL-MAR 14K Integrated Systems)	24	Resnyk <i>et al.</i> , 2013
4	Microarray	GSE8812	GPL1731 (DEL-MAR 14K Integrated Systems)	24	Cogburn, 2007
5	Microarray	GSE45825	GPL1731 (DEL-MAR 14K Integrated Systems)	24	Resnyk <i>et al.</i> , 2013
6	Microarray	GSE10052	GPL1731 (DEL-MAR 14K Integrated Systems)	8	Byerly <i>et al.</i> , 2010
7	Microarray	GSE3867	GPL3265 (Chicken cDNA DDMET 1700 array version 1.0)	28	Bourneuf <i>et al.</i> , 2006

3. <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>

4. <https://www.genecards.org/>

1. [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)

2. [www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)

تغییر بیان در کدهای دسترسی GSE49121 (Resnyk *et al.*, 2015) و GSE42980 (Resnyk *et al.*, 2015) به ترتیب تعداد ۳۱۴ و ۷۰ ژن شناسایی شد. در کل تعداد ۳۸۴ ژن تفاوت معنی‌داری داشتند. با مقایسه این فهرست، ژن‌هایی را که در میان کدهای دسترسی مشترک بودند، مشخص و این فهرست ژنی به‌عنوان مجموعه شماره ۲ که حاصل داده‌های RNA-seq هستند، در نظر گرفته شد.

برتری استفاده از بافت چربی محوطه بطنی جوجه‌های گوشتی جهت شناسایی ژن‌های درگیر در متابولیسم و ذخیره چربی این است که می‌تواند به دلیل ویژگی‌های متابولیکی خاص آن به‌عنوان یک مدل برتر در دیگر گونه‌ها و افراد یک گونه باشد (Resnyk *et al.*, 2015). با استفاده از فرضیه ما برای شناسایی ژن‌هایی که بیان ژنی متفاوت دارند، به تایید آماری نرخ بیان ژن‌هایی که تفاوت بسیار معنی‌داری ( $P < 0.00001$ ) داشتند، در داده‌های مربوط به RNA-seq تعداد ۳۸۴ ژن و در داده‌های مربوط به ریزآرایه تعداد ۱۴۵۱ ژن دارای تفاوت بیان بودند. در این بررسی داده‌های ما برای جوجه‌های گوشتی که دارای چربی محوطه بطنی بالا و چربی محوطه بطنی پایین هستند، جمع‌آوری شده بودند.

جوجه‌های با چربی محوطه بطنی بالا و چربی محوطه بطنی پایین دارای نرخ رشد مشابه بوده اما در گروه با چربی محوطه بطنی بالاتر تفاوت ۲/۵ برابری در چربی ناحیه شکمی و وزن عضله سینه بالاتر نسبت به گروه با چربی محوطه بطنی پایین بود (Resnyk *et al.*, 2015). مرغ‌های با چربی محوطه بطنی بالا دارای هایپرپلازیا و هایپرتروفی سلول‌های چربی در سنین پایین‌تر نسبت به مرغ‌های با چربی محوطه بطنی پایین‌تر می‌باشند (Simon & Leclercq, 1982; Hermier *et al.*, 1989). در این باره تجزیه و تحلیل اولیه رونویسی بافت کبد در مرغ‌های با چربی محوطه بطنی بالا و چربی محوطه بطنی پایین در طول دوره رشد جوجه‌ها نشان‌دهنده اختلاف بیان ۱۸۰۵ ژن بود (Cogburn *et al.*, 2007). این در حالی است که در تجزیه و تحلیل رونویسی چربی عروقی، ۳۷ ژن لیپوزنیک قابل بیان شناسایی شده است که بیشتر در

ابتدا تجزیه داده‌ها در داخل هر یک از مجموعه داده‌ها انجام و ژن‌هایی که تفاوت معنی‌دار در بیان نشان دادند ( $P < 0.00001$ ) و همچنین میزان بیان آن‌ها در مجموعه داده‌های مختلف مشابه یا به‌عبارت دیگر در همه مجموعه‌های داده‌ای از خود افزایش یا کاهش بیان نشان داده بودند استخراج شدند. در مرحله بعد ژن‌های دارای تفاوت معنی‌دار مربوط به کدهای دسترسی داده‌های ریزآرایه به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته و ژن‌های دارای تفاوت معنی‌دار در بیان تحت عنوان مجموعه ژنی شماره ۱ فهرست شدند. این مقایسه برای ژن‌های دارای تفاوت بیان متفاوت در داده‌های RNA-seq هم انجام شد و تحت عنوان مجموعه ژنی شماره ۲ فهرست شدند. در نهایت تعداد ژن مشخص که در دو مجموعه ژنی شماره ۱ و ۲ با هم مشترک بودند، شناسایی شد.

## نتایج و بحث

### تجزیه داده‌های ریزآرایه

پس از تجزیه داده‌های ریزآرایه برای بیان تفاوت ژنی، ۲۹۱۴ ژن استخراج و پس از در نظر گرفتن حد آستانه تغییر بیان در هر کدام از کدهای دسترسی GSE37585 (Resnyk *et al.*, 2013)، GSE8812 (Cogburn, 2007) GSE45825 (Resnyk *et al.*, 2013) GSE10052 (Byerly *et al.*, 2010) و GSE3867 (Bourneuf *et al.*, 2006) به ترتیب تعداد ۶۱۲، ۱۰۷، ۵۸۲، ۱۰۴ و ۴۶ ژن شناسایی شد. در کل تعداد ۱۴۵۱ ژن تفاوت معنی‌داری داشتند. در میان تعداد ژن ذکر شده، ژن‌هایی را که در میان پنج کد دسترسی داده‌های ریزآرایه با هم مشترک بوده‌اند، مشخص و این فهرست ژنی به‌عنوان مجموعه ژنی شماره ۱ که حاصل داده‌های ریزآرایه هستند، در نظر گرفته شد.

### تجزیه داده‌های RNA-seq

در بخش تجزیه داده‌های RNA-seq، پس از کنترل کیفیت، تبدیل فرمت فایل‌ها، پیرایش آداپتورها، نقشه‌یابی و در پایان ارزیابی تفاوت در بیان ژن‌ها، ۱۸۶۷ ژن استخراج و پس از در نظر گرفتن حد آستانه

بافت چربی محوطه بطنی هیپرتروفی انسان و موش دارای بیان بالایی می‌باشد (Inoue *et al.*, 2013)، همچنین در جوجه‌های گوشتی که مصرف جیره غذایی با چربی بالا دارند، باعث افزایش شدید بیان THBS1 در مراحل اولیه تغذیه می‌شود (Inoue *et al.*, 2013). این ژن عمدتاً در بافت‌های چربی محوطه بطنی بیان می‌شود و بیان آن در افراد مقاوم به انسولین و چاق افزایش می‌یابد (Varma *et al.*, 2008). THBS1 در پاسخ به مصرف جیره‌های حاوی چربی بالا تغییر می‌کند، که ممکن است سبب ایجاد مقاومت به انسولین، آسیب بافت فیبروتیک در ماهیچه‌های اسکلتی و همچنین تغییر رنگ بافت چربی به قهوه‌ای مایل به زرد در مراحل اولیه مصرف جیره غذایی با چربی بالا شود (Inoue *et al.*, 2013). بافت چربی سفید توسط شبکه پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی احاطه شده است (Chun, 2012; Huang & Greenspan, 2012). تعادل پویا بین سنتز و تخریب پروتئین ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی در تنظیم میزان عملکرد بافت چربی در طول توسعه چربی دارد (Khan *et al.*, 2009). همچنین میزان بیان ژن COLEC12 در جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی زیاد نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی کم کاهش پیدا کرده بود (جدول ۲). ژن COLEC12 عضوی از خانواده لکتین C است و کدکننده پروتئین‌هایی است که دارای توالی‌های کلاژن مانند و دامنه‌های تشخیص کربوهیدرات هستند. پروتئین کدشده توسط ژن COLEC12 به آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی روی میکروارگانیزم‌ها متصل شده و باعث تسهیل شناسایی و مرگ آن‌ها می‌شود.

جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی بالا صادق است. از جمله ژن‌هایی که در میان ۳۷ ژن شناسایی شده مهم تلقی می‌شوند می‌توان به SREBF2، SREBF2، SCD، FASN و THRSPA اشاره کرد که نقش زیادی در متابولیسم و ذخیره چربی دارند (Resnyk *et al.*, 2013).

در این مطالعه با مقایسه دو مجموعه ژنی شماره ۱ و شماره ۲ مربوط به داده‌های RNA-seq و ریزآرایه، ۶ ژن به صورت مشترک شناسایی شد. مشخصات ژن‌های مورد مطالعه مشترک بین دو مجموعه ژنی شماره ۱ و ۲ در جدول ۲ آمده است.

نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن THBS1 در جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی زیاد نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی کم کاهش پیدا کرده است (جدول ۲). پروتئین کدگذاری شده توسط ژن THBS1 یک زیرواحد از پروتئین هوموتریمریک<sup>۱</sup> مرتبط با دی‌سولفید به نام Thrombosponding است. این پروتئین یک گلیکوپروتئین چسبنده است که به‌عنوان واسطه سلول به سلول و ناقل سلول به ماتریکس عمل می‌کند. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان متابولیسم پروتئین و گلیکوزیله شدن O-Linked را نام برد. این پروتئین همچنین می‌تواند به فیبرینوژن، فیبرونکتین، لامینین، کلاژن نوع ۷ و انتگرین آلفا ۷ و بتا یک متصل شود. این امر نشان‌دهنده این است که این ژن نقش مهمی در تجمع پلاکت‌ها، آنژیوژنز و تومورزایی دارد. حاشیه‌نویسی این ژن شامل اتصال یون کلسیم و اتصال هیپارین است (<https://www.genecards.org/>). Thrombosponding 1 گلیکوپروتئینی است که در

جدول ۲. مشخصات ژن‌های مورد مطالعه مشترک بین مجموعه ژنی شماره ۱ و ۲، در چربی محوطه بطنی بالا در مقایسه با چربی

محوطه بطنی پایین

Table 2. Details of common genes between gene data set 1 and 2, in high abdominal fat, compared to low abdominal fat

NO.	Gene. Sym	Gene. Title	LogFC	Adj.P.val
1	THBS1	Thrombospondin 1	-1.6	6.71E-05
2	COLEC12	Colectin sub-family member 12	-4.2	7.36E-05
3	ANXA7	Annexin A7	-5.4	4.02E-05
4	RGS19	Regulator of G-protein signaling 19	-4.6	2.45E-06
5	TMEM258	Transmembrane protein 258	2.1	2E-04
6	HTR7L	5-hydroxytryptamine receptor 7 like	2.2	1E-04

1. Homotrimeric

(<https://www.genecards.org/>) گزارش شده است که فسفریلاسیون ANXA7 توسط PKC به شکل قابل توجهی توانایی پروتئین برای تجمع ویزیکول‌های فسفولیپیدی در سلول‌های کرومافین (Chromaffin) را تقویت می‌کند (Caohuy & Pollard, 2001). هنگامی که غلظت یون‌های کلسیم سلولی افزایش می‌یابد، محل ساخت داخل سلولی ANXA7 تغییر می‌کند. این یون‌ها پلی‌مری را تشکیل می‌دهند تا ترکیبی از فسفولیپیدهای اسیدی را تقویت کنند، که در نهایت به بخش‌های خاصی از مولکول متصل شده و از طریق غشای دو لایه با میانجی‌گری آزاد شدن انتقال‌دهندهٔ عصبی و انتقال ویزیکولی حرکت می‌کنند (Hoque *et al.*, 2014).

با توجه به نتایج میزان بیان ژن RGS19 در جوجه‌های گوشتی با چربی زیاد در محوطه بطنی نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی کم در محوطه بطنی نشان داد (جدول ۲). پروتئین کدگذاری‌شده توسط ژن RGS19 مربوط به خانواده RGS (تنظیم‌کننده مسیر سیگنالینگ پروتئین G) است و به شکل ویژه با پروتئین G، GAI3 تعامل دارد. همچنین فعال‌کننده گوانوزین تری فسفاتاز است که فعالیت آن تنظیم مسیر سیگنالینگ Galpha q-Linked و یا Galpha i است. پروتئین G به‌عنوان عامل واسطه چندین فرآیند سلولی عمل می‌کند. از مسیرهای مرتبط با آن مسیر سیگنالینگ ADP از طریق Purineceptor P2Y و مسیر MAPK-Erk می‌باشند (<https://www.genecards.org/>). حاشیه نویسی این ژن فعال‌سازی فعال‌کننده GTPase و اتصال زیرواحد آلفا پروتئین G است. مهارکننده‌های انتقال سیگنال با افزایش فعالیت GTPase زیرواحدهای پروتئین G باعث می‌شوند که حرکت از محدودهٔ GDP غیرفعال شود (<https://www.genecards.org/>).

ژن TMEM258 یک ژن کدکننده پروتئین است که میزان بیان آن در جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی زیاد نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی کم، افزایش پیدا کرده است (جدول ۲) و به‌عنوان جزئی از کمپلکس OST (N-Oligosaccharyl Transferase) وظیفه انتقال یک لیگوساکارید مانوز را از دهنده لیگوساکاریدی وابسته

همچنین شناسایی و تخریب لیپوپروتئین‌های کم چگال اکسیداتیو را توسط سلول‌های اندوتلیال عروقی متوقف می‌کند. از مسیرهای مرتبط با ژن COLEC12 می‌توان اتصال و جذب لیگاندها توسط گیرنده‌ها و انتقال‌دهنده‌های ویزیکول‌های متوسط را نام برد. حاشیه‌نویسی این ژن شامل فعالیت گیرندهٔ شناسایی الگوی سیگنال است (<https://www.genecards.org/>). گزارش شده است که بیان بیش از حد ژن APOA5 انسان در موش‌ها با کاهش میزان تری‌گلیسرید پلاسما ارتباط دارد (Merkel *et al.*, 2005). بنابراین با توجه به وجود رابطه بین دو ژن APOA5 و COLEC12 می‌توان گفت که هر دو ژن نقش کلیدی در متابولیسم لیپیدها ایفا می‌کنند (Ohtani *et al.*, 2001; Degenhardt *et al.*, 2016).

در جوجه‌های گوشتی با چربی زیاد در محوطه بطنی نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی کم در محوطه بطنی میزان بیان ژن ANXA7 کاهش نشان داد (جدول ۲). ژن ANXA7 (آنکسین ۷) یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های متصل به فسفولیپید وابسته به کلسیم است که شامل ۱۴ اگزون و DNA ۳۴ کیلوبازی است. پیش‌بینی می‌شود که دو ایزوفرم پروتئین کدشده توسط آن در ناحیه انتهایی N (N-Terminal) با هم متفاوت باشند. ژن ANXA7 در هر کدام از بافت‌ها به‌صورت تخصصی عمل می‌کند و mRNA رونویسی شده از روی اگزون آن در مغز، قلب و ماهیچه اسکلتی به شکل گسترده دیده می‌شود. همچنین رونوشت‌های آن‌ها با استفاده از دو ناحیهٔ پلی A موجود در ناحیه غیرکدشونده از یک‌دیگر تفکیک می‌شوند (<https://www.genecards.org/>). تجزیه و تحلیل ساختاری پروتئین نشان می‌دهد که آنکسین ۷ یک پروتئین متصل به غشاء با کارکرد متنوع می‌باشد؛ از جمله فعالیت‌های آن می‌توان به فعالیت کانال کلسیم حساس به ولتاژ، انتخاب یون و انتشار غشایی اشاره کرد. مسیرهای کلسیم، cAMP و مسیر سیگنالینگ لیپید از مسیرهای مرتبط با این ژن می‌باشند. پروتئین کدگذاری‌شده توسط ژن ANXA7 اتصال دهنده فسفولیپید کلسیم است که باعث تخریب غشاء شده و در اگزوسیتوز دخالت دارد

جمله چربی ناحیه شکمی است. هورمون‌های مرتبط با متابولیسم و ذخیره چربی مانند انسولین و گلوکاگون روی گیرنده‌های مربوط به آن‌ها در بافت‌های چربی، کبد و عضلات اسکلتی باند شده و در نتیجه آن می‌توانند بر روی مسیرهای سیگنالینگ کنترل شده توسط ژن‌های ذکر شده و همچنین متابولیسم چربی در بافت‌های هدف نقش به‌سزایی داشته باشند. ژن‌های درگیر در فرآیندهای مشابه می‌توانند از جمله ژن‌های هدف در این تحقیق باشند.

#### نتیجه‌گیری کلی

اطلاعات حاصل از ترکیب داده‌های RNA-seq و ریزآرایه در به‌دست‌آوردن و شناسایی ژن‌هایی که تفاوت بیانی ژنی دارند، به‌طور موفقیت‌آمیزی ۱۸۳۵ ژن را در بافت چربی محوطه بطنی دو گروه جوجه‌های گوشتی با ذخیره چربی محوطه بطنی زیاد و کم شناسایی کرد، که ژن‌های مشترک شناسایی شده در فرآیند مسیرهای سیگنالینگ غدد درون‌ریز مرتبط با متابولیسم چربی و کاتابولیسم انرژی دخالت دارند. می‌توان آن‌ها را از جمله ژن‌هایی دسته‌بندی کرد که در بین گونه‌های مختلف یکسان و مشترک هستند. در این تحقیق ژن‌های مشترک مهم مرتبط با متابولیسم چربی و مسیرهای سیگنالینگ غدد درون‌ریز شناسایی شدند، که در ادامه آن سازوکارهای مرتبط با نقل و انتقال چربی‌ها توسط غشاهای سلولی و بافت‌های مختلف با بیان توضیحاتی پیرامون ژن‌های مربوطه مشخص شد. نتیجه کلی این تحقیق شامل شناسایی ۶ ژن در فرآیند اصلی متابولیسم و ذخیره چربی و مسیر سیگنالینگ غدد درون‌ریز و غشای سلولی است.

به چربی عهده‌دار است. این در حالی است که فقط آسپارژین موجود در ترادف Asn-X-Ser/Thr پروتئین می‌تواند به زنجیره پلی‌پپتیدی در حال رشد منتقل شود. همچنین به هموستازی آندوپلاسمی رتیکولوم (ER= Endoplasmic Reticulum) در اپیتلیوم کولون وابسته است (<https://www.genecards.org/>) و برای گلیکوزیلاسیون پروتئین وابسته به N ضروری است (Graham et al., 2016).

در جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی زیاد نسبت به جوجه‌های گوشتی با چربی محوطه بطنی کم ژن HTR7L کدکننده پروتئین گیرنده ۵-هیدروکسی تریپتامین (HT-5) است که میزان بیان آن افزایش پیدا کرده است (جدول ۲). موقعیت این ژن روی کروموزوم ۴ بوده و دارای ۲ اگزون می‌باشد (<https://www.genecards.org/>). در آخرین طبقه‌بندی صورت گرفته برای گیرنده‌های ۵-هیدروکسی تریپتامین (HT-5)، گیرنده‌های 5-ht<sub>7</sub> در طبقه‌بندی ساختاری و دارویی نقش ایفا می‌کنند. همچنین به‌عنوان یک عامل انتقالی با گیرنده‌های 5-HT<sub>4</sub> و 5-HT<sub>6</sub> در شکل‌گیری چرخه AMP همکاری دارد (Hoyer et al., 1994). سطح بالای بیان mRNA گیرنده 5-ht<sub>7</sub> در مغز انسان و ماهیچه‌های صاف یافت می‌شود. پیشنهاد شده است که گیرنده‌های 5-ht<sub>7</sub> ممکن است باعث آرامش در برخی از عضلات صاف شوند (Martin, 1995). اخیراً نشان داده شده است که mRNA گیرنده 5-ht<sub>7</sub> در انواع مختلف رگ‌ها و سلول‌های عضلانی بیان می‌شود (Ullmer et al., 1995).

به‌طور کلی استفاده از ترکیب اطلاعات پایگاه‌های داده‌های مختلف، راهی سریع و قابل اتکا برای ارزیابی تفاوت بیان ژن‌های متنوع در بافت‌های مختلف از

#### REFERENCES

1. Abdollahi, M. R., Ravindran, V. & Svihus, B. (2013). Pelleting of broiler diets: an overview with emphasis on pellet quality and nutritional value. *Animal Feed Science and Technology*, 179(1), 1-23.
2. Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
3. Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J. & Nekrutenko, A. (2010). Galaxy team. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-5.
4. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-2120.
5. Bourneuf, E., Héroult, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., ... & Diot, C. (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene*, 372, 162-170.



6. Burt, D. W. (2007). Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry Science*, 86(7), 1460-1471.
7. Byerly, M. S., Simon, J., Cogburn, L. A., Le Bihan-Duval, E., Duclos, M. J., Aggrey, S. E. & Porter, T. E. (2010). Transcriptional profiling of hypothalamus during development of adiposity in genetically selected fat and lean chickens. *Physiological Genomics*, 42(2), 157-167.
8. Caohuy, H. & Pollard, H. B. (2001). Activation of annexin 7 by protein kinase c *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12813-12821.
9. Chun, T. H. (2012). Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. *Adipocyte*, 1(2), 89-95.
10. Cogburn, L. A. (2007). Hepatic transcriptional profiling of juvenile broiler chickens divergently selected for abdominal fatness or leanness, geo, V1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE8812>
11. Cogburn, L. A., Porter, T. E., Duclos, M. J., Simon, J., Burgess, S. C., Zhu, J. J. & Burnside, J. (2007). Functional genomics of the chicken—a model organism. *Poultry Science*, 86(10), 2059-2094.
12. Crespo, N. & Esteve- Garcia, E. (2001). Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science*, 80, 71-78.
13. Davis S, Meltzer P (2007). "GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor." *Bioinformatics*, 14, 1846–1847.
14. Degenhardt, F., Niklowitz, P., Szymczak, S., Jacobs, G., Lieb, W., Menke, T. & Döring, F. (2016). Genome-wide association study of serum coenzyme Q10 levels identifies susceptibility loci linked to neuronal diseases. *Human Molecular Genetics*, 25(13), 2881-2891.
15. Dodgson, J. B. (2007). The chicken genome: some good news and some bad news. *Poultry Science*, 86(7), 1453-1459.
16. Du, P., Kibbe, W. A. & Lin, S. M. (2008). Lumi: a pipeline for processing Illumina microarray'. *Bioinformatics*, 24, 1547-1548.
17. Friedman-Einat, M., Cogburn, L. A., Yosefi, S., Hen, G., Shinder, D., Shirak, A. & Seroussi, E. (2014). Discovery and characterization of the first genuine avian leptin gene in the rock dove (*Columba livia*). *Endocrinology*, 155(9), 3376-3384.
18. Graham, D. B., Lefkovich, A., Deelen, P., de Klein, N., Varma, M., Boroughs, A. & Petersen, C. P. (2016). TMEM258 is a component of the oligosaccharyltransferase complex controlling ER stress and intestinal inflammation. *Cell Reports*, 17(11), 2955-2965.
19. Hassanzadeh, M., Gilanpour, H., Charkhkar, S., Buyse, J. & Decuypere, E. (2005). Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome. *Avian Pathology*, 34(3), 188-193.
20. Hermier, D. Q. B. A., Quignard-Boulangé, A., Dugail, I., Guy, G., Salichon, M. R., Brigant, L., ... & Leclercq, B. (1989). Evidence of enhanced storage capacity in adipose tissue of genetically fat chickens. *The Journal of Nutrition*, 119(10), 1369-1375.
21. Hoque, M., Rentero, C., Cairns, R., Tebar, F., Enrich, C. & Grewal, T. (2014). Annexins-Scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cellular Signalling*, 26(6), 1213-1225.
22. Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., ... & Humphrey, P. P. (1994). International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157-203.
23. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocol*, 4(1), 44-57.
24. Huang, G. & Greenspan, D. S. (2012). ECM roles in the function of metabolic tissues. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(1), 16-22.
25. Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T. & Gottardo, R. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature methods*, 12(2), 115. <http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n2/full/nmeth.3252.html>.
26. Ikeobi, C. O. N., Woolliams, J. A., Morrice, D. R., Law, A., Windsor, D., Burt, D. W. & Hocking, P. M. (2002). Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. *Animal Genetics*, 33(6), 428-435.
27. Inoue, M., Jiang, Y., Barnes, R. H., Tokunaga, M., Martinez-Santibañez, G., Geletka, L. & Chun, T. H. (2013). Thrombospondin 1 mediates high-fat diet-induced muscle fibrosis and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*, 154(12), 4548-4559.
28. Ji, B., Ernest, B., Gooding, J. R., Das, S., Saxton, A. M., Simon, J. & Voy, B. H. (2012). Transcriptomic and metabolomic profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC Genomics*, 13(1), 441.
29. Ji, B., Middleton, J. L., Ernest, B., Saxton, A. M., Lamont, S. J., Campagna, S. R. & Voy, B. H. (2014). Molecular and metabolic profiles suggest that increased lipid catabolism in adipose tissue contributes to leanness in domestic chickens. *Physiological Genomics*, 46(9), 315-327.
30. Julian, R. J. (1997). Causes and prevention of ascites in broilers. *Zootec International*, 452-53.

31. Ka, S., Albert, F. W., Denbow, D. M., Pääbo, S., Siegel, P. B., Andersson, L. & Hallböök, F. (2011). Differentially expressed genes in hypothalamus in relation to genomic regions under selection in two chicken lines resulting from divergent selection for high or low body weight. *Neurogenetics*, 12(3), 211.
32. Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N. & Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), 1575-1591.
33. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), pp. R36.
34. Le Mignon, G., Pitel, F., Gilbert, H., Le Bihan-Duval, E., Vignoles, F., Demeure, O., ... & Douaire, M. (2009). A comprehensive analysis of QTL for abdominal fat and breast muscle weights on chicken chromosome 5 using a multivariate approach. *Animal Genetics*, 40(2), 157-164.
35. Leclercq, B., Blum, J. C. & Boyer, J. P. (1980). Selecting broilers for low or high abdominal fat: initial observations. *British Poultry Science*, 21(2), 107-113.
36. Leclercq, B., Hermier, D. & Salichon, M. R. (1984). Effects of age and diet on plasma lipid and glucose concentrations in genetically lean or fat chickens. *Reproduction Nutrition Développement*, 24(1), 53-61.
37. Leheska, J. M., Montgomery, J. L., Krehbiel, C. R., Yates, D. A., Hutcheson, J. P., Nichols, W. T., ... & Miller, M. F. (2009). Dietary zilpaterol hydrochloride. II. Carcass composition and meat palatability of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 87(4), 1384-1393.
38. Martin, G. R. (1995). Operational characteristics of a 5-HT receptor mediating direct vascular relaxation: identity with 5-HT<sub>7</sub> receptors?. *British Journal of Pharmacology*, 114, 383.
39. Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L. A. & Heeren, J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21553-21560.
40. Moody, D.E., Hancock, D.L., Anderson, D.B. & Mello, J. P. D. (2000). Phenethanolamine Repartitioning Agents In: Farm Animal Metabolism and Nutrition, CAB pub., New York. *Endocrinology and Metabolism*, 281:449-454. . PP: 65-96.
41. Nilsson, C., Raun, K., Yan, F. F., Larsen, M. O. & Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(2), 173.
42. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H. & Suzutani, T. (2001). The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44222-44228.
43. Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B. & Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, 14(4), 529-644.
44. Resnyk, C. W., Carré, W., Wang, X., Porter, T. E., Simon, J., Le Bihan-Duval, E. & Cogburn, L. A. (2013). Transcriptional analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens reveals adipokines, lipogenic genes and a link between hemostasis and leanness. *BMC Genomics*, 14(1), 557.
45. Resnyk, C. W., Carré, W., Wang, X., Porter, T. E., Simon, J., Le Bihan-Duval, E. & Cogburn, L. A. (2017). Transcriptional analysis of abdominal fat in chickens divergently selected on bodyweight at two ages reveals novel mechanisms controlling adiposity: validating visceral adipose tissue as a dynamic endocrine and metabolic organ. *BMC Genomics*, 18(1), 626.
46. Resnyk, C. W., Chen, C., Huang, H., Wu, C. H., Simon, J., Le Bihan-Duval, E. & Cogburn, L. A. (2015). RNA-Seq analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens highlights a divergence in expression of genes controlling adiposity, hemostasis, and lipid metabolism. *PLoS One*, 10(10), e0139549.
47. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.
48. Sakomura, N. K., Longo, F. A., Oviedo-Rondon, E. O., Boa-Viagem, C. & Ferraudo, A. (2005). Modeling energy utilization and growth parameter description for broiler chickens. *Poultry Science*, 84, 1363-1369.
49. Simon, J. (1989). Chicken as a useful species for the comprehension of insulin action. *CRC Critical Review in Poultry Biology*, 2, 121-148.
50. Simon, J. & Leclercq, B. (1982). Longitudinal study of adiposity in chickens selected for high or low abdominal fat content: further evidence of a glucose-insulin imbalance in the fat line. *The Journal of Nutrition*, 112(10), 1961-1973.
51. Simon, J., Milenkovic, D., Godet, E., Cabau, C., Collin, A., Métayer-Coustard, S., ... & Cailleau-Audouin, E. (2012). Insulin immuno-neutralization in fed chickens: effects on liver and muscle transcriptome. *Physiological Genomics*, 44(5), 283-292.
52. Stern, C. D. (2005). The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental*

- Cell*, 8(1), 9-17.
53. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J. & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511-515.
  54. Tumova, E. & Teimouri, A. (2010). Fat deposition in the broiler chicken: A review. *Scientia Agricultura and Bohemica*, 41, 121-128.
  55. Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H. O. & Lübbert, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters*, 370(3), 215-221.
  56. Varma, V., Yao-Borengasser, A., Bodles, A. M., Rasouli, N., Phanavanh, B., Nolen, G. T. & Fried, S. K. (2008). Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes*, 57(2), 432-439.
  57. Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X. J. & Zhu, D. (2009). Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC Genomics*, 10(1), 87.