

Bioinformatics investigation of expression changes of abomasal gene transcripts to *Haemonchus contortus* infection in resistant and sensitive sheep

R. Seighalani^{1*}, H. Samizadeh Lahiji², F. Rafeie³, M. Mottaghtalab⁴, M. Galin Sharifdini⁵

1. Ph.D. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
5. Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Guilan University of Medical Science, Rasht, Iran

(Received: 01-05-2022 – Accepted: 27-07-2022)

Introduction: Gastrointestinal nematodes (GIN) represent a major health issue for livestock production systems worldwide. *Haemonchus contortus* is one of the most pathogenic GIN in small ruminants and causes serious losses to farmers, both in impaired production and in control with anthelmintics. It has long been recognized that differences in host resistance and susceptibility to parasitic infection exist in various sheep breeds and that genetics may play an important role in regulating host resistance, which has spurred efforts to control parasitic infection through selective breeding for naturally resistant sheep. A detailed understanding of the genes and mechanisms involved in expressing a resistant phenotype and the factors that regulate this response would facilitate the identification of candidate genes for selection. Recent advances in high-throughput technology, such as microarrays and RNA sequencing, have made a large number of transcriptome data accessible. As a result, researchers are now able to obtain more reliable results by integrating information from multiple sources. Accordingly, meta-analysis can be used as a useful and powerful tool to identify differential gene expression. It can also find out genes that their products are key molecules in response to the infection and use in animal breeding programs. The purpose of this study was to conduct a systematic review and meta-analysis on data collected from infected sheep with *H. contortus* and general analysis of changes in abomasal gene transcripts in response to infection using RNA-seq technology and bioinformatics tools.

Materials and methods: In this study, to identify infection-related genes, pathways, and molecular mechanisms underlying host resistance to this parasite, a meta-analysis was performed by combining two different datasets, including 70 samples of sheep *H. contortus* infection with Rankprod package of R software. After pre-processing, to remove heterogeneity across studies, batch effect correction was performed on gene expression data. The result of the principal component analysis showed that batch correction reduced the batch variation among the datasets. Meta-analysis was carried out and DEGs selected by meta-analysis were further analyzed and characterized. Enrichment analysis, as an efficient method for functional analysis of massive genetic data, was used to determine the biological process, molecular function, and cellular component of DEGs. Moreover, we searched upstream regions of DEGs for over-represented DNA motifs and functional analysis of discovered motifs. To explore the potential interaction network of the DEGs, the protein-protein interaction network among the DEGs was analyzed using the STRING database, which included direct and indirect associations of proteins. After analyzing the result derived from STRING analysis and expression change information for each DEG, the network figure was drawn

* Corresponding author: rseighalani@yahoo.com



for the selected DEGs (connected with one or more DEGs) by using the Cytoscape software and hub genes identified with the CytoHubba plugin of Cytoscape.

Results and discussion: Results derived from the meta-analysis showed a total of 1388 differentially expressed genes between resistant and susceptible sheep. Among them, 1137 were significantly upregulated, whereas 251 were downregulated across the datasets. In the identified DEGs, DEGs corresponding to ribosomal protein S3A, lysozyme C-1-like (LOC443320), and heterogeneous *nuclear ribonucleoprotein K* were the most strongly upregulated ones, while tenascin C and fibromodulin were the most strongly downregulated. Results from enrichment analysis showed these differentially expressed genes (DEGs) were involved in different biological processes such as one-carbon metabolism, translation, cell surface receptor signaling pathway, immune response, metabolic pathways, PPAR signaling pathway, etc. Moreover, searching in upstream regions of DEGs to find DNA motifs, were able to identify eight conserved sequence motifs. The functional analysis of these motifs revealed that they were involved in the positive regulation of gene expression, defense response, positive regulation of immune response, cellular calcium ion homeostasis, etc. Using the protein-protein interaction analysis also identified multiple hub genes such as albumin and CD4 which may show that improved immune response, induced by up-regulation different genes affects the creation of resistance.

Conclusions: The mechanisms of sheep resistance to GIN infections involve complex immune responses. Our results offered overall insight into changes in the transcriptomes of resistant and susceptible sheep and molecular mechanisms of host resistance induced by *H. contortus* infection. We propose these DEGs as a useful resource of molecular biomarkers and potential candidate genes for breeding programs which can provide a basis for further research on this topic.

Keywords: Differential expression, RNA-seq analysis, Meta-analysis, Gene ontology

How to cite this article:

Seighalani R., Samizadeh Lahiji H., Rafeie F., Mottaghtalab M. and Galin Sharifdini M. 2022. Bioinformatics investigation of expression changes of abomasal gene transcripts to *Heamonchus contortus* infection in resistant and sensitive sheep. *Animal Production Research*, 11(4): 61-75. doi: 10.22124/AR.2023.22217.1700



بررسی بیوانفورماتیکی تغییرات بیان رونوشت ژن‌های شیردان به آلودگی انگل *Heamonchus contortus* در گوسفندان مقاوم و حساس

رامین صیقلانی^{۱*}، حبیب الله سمیع زاده لاهیجی^۲، فرجاد رفیعی^۳، مجید متقی طلب^۴، میثم گلین

شریف‌دینی^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۵- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵)

چکیده

هدف از این مطالعه، انجام یک بررسی سیستماتیک و متاآنالیز داده‌های جمع آوری شده از گوسفندان آلوده شده با *Heamonchus contortus* به عنوان یکی از مهمترین و بیماری‌زاترین انگل‌های دستگاه گوارش گوسفند و تجزیه و تحلیل کلی تغییر در رونوشت ژن‌های شیردان در پاسخ به این عفونت با استفاده از فناوری RNA-seq و ابزارهای بیوانفورماتیک بود. به منظور شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با عفونت، متاآنالیز با ترکیب مجموعه داده‌های مختلف عفونت *Heamonchus contortus* گوسفند با استفاده از بسته رنگ پراد نرم افزار R انجام شد و نتایج به‌دست آمده برای استحصال اطلاعات بیشتر مورد تجزیه و تحلیل‌های پائین‌دستی قرار گرفتند. نتایج حاصل از متاآنالیز نشان داد که در مجموع، ۱۳۸۸ ژن بین نژادهای مقاوم و حساس دارای بیان افتراقی (DEG) بودند. مطابق با نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن و دانشنامه کیوتوی ژن‌ها و ژنوم‌ها (KEGG)، این ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG) در فرآیندهای زیستی متعددی مانند سوخت و ساز واحدهای یک کربنی، ترجمه، مسیر سیگنالینگ رسپتور سطح سلولی، پاسخ ایمنی، مسیرهای متابولیکی و ... درگیر بودند. با استفاده از تجزیه و تحلیل برهمکنش پروتئین-پروتئین، ژن‌های هاب متعددی مانند آلبومین و CD4 شناسایی شدند که ممکن است نشان دهد بهبود پاسخ ایمنی ناشی از افزایش بیان ژن‌های مختلف در ایجاد مقاومت تأثیر می‌گذارد. نتایج این مطالعه، بینشی کلی از تغییرات در ترانسکریپتوم نژادهای مقاوم و حساس گوسفند و ساز و کارهای مولکولی مقاومت میزبان در نتیجه عفونت *Heamonchus contortus* ارائه می‌دهد که می‌تواند مبنایی برای تحقیقات بیشتر در مورد این موضوع فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: بیان افتراقی، تجزیه RNA-seq، متاآنالیز، هستی‌شناسی ژن‌ها

* نویسنده مسئول: rseighalani@yahoo.com

مقدمه

GIN فراهم کرده است (Andersson, 2012). تجزیه ترانسکریپتوم روشی قدرتمند برای شناسایی و تعیین کمیت ژن‌های بیان شده طی یک اختلال فیزیولوژیک است. مطالعات متعددی برای مشخص کردن تغییر در میزان رونوشت ژن‌های موجود در دوازدهه (Diez-Tascon *et al.*, Rowe *et al.*, 2005; Keane *et al.*, 2007)، مخاط شیردان (Rowe *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2009)، گره لنفاوی و مایع لنفاوی (Andronicos *et al.*, 2010; Gossner *et al.*, 2013) انجام شده است که منجر به شناسایی ژن‌ها و فرآیندهای زیستی مرتبط با پاسخ میزبان به GIN شده است. در نهایت، این مطالعات منجر به شناسایی تعدادی از مسیرها شده است که در ایجاد فنوتیپ مقاوم نقش دارند. هدف از این مطالعه، انجام بررسی سیستماتیک و متآنالیز داده‌های جمع‌آوری شده از گوسفندان آلوده شده با *H. contortus* و تجزیه و تحلیل کلی تغییر در رونوشت ژن‌های شیردان در پاسخ به این عفونت با استفاده از فناوری RNA-seq و ابزارهای بیوانفورماتیک است، که منجر به شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در میزبان در پاسخ به چالش ایجاد شده می‌شود و به شناخت بیشتر ساز و کارهای مولکولی مقاومت در برابر عفونت کمک می‌نماید. نتایج حاصل از این مطالعه منجر به شناسایی ژن‌های کاندید و یافته‌های ارزشمندی می‌شود که فرضیه‌های کاری برای تحقیقات آینده را فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده، پیش پردازش و متآنالیز: فرا داده (Metadata) و فایل‌های خام توالی‌یابی شده مرتبط با آلودگی شیردان گوسفند با انگل خون‌خوار *Haemonchus contortus* با شماره پروژه‌های SRA access number PRJNA445172 و SRA access number PRJNA268183 از سایت EMBL-EBI دانلود شدند. تجزیه RNA-seq برای به دست آوردن ژن‌هایی با بیان افتراقی (DEG) با استفاده از نرم افزار CLC genomics workbench نسخه ۱۲ انجام شد. در مرحله اول، خوانش-های توالی‌یابی شده خام با استفاده از FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) بررسی شدند. تجزیه کنترل کیفیت شامل محتوای GC، محتوای بازهای مبهم، Phred score، base coverage، و nucleotide contributions و over-represented

عفونت‌های ایجاد شده به وسیله نماتدهای دستگاه گوارش (GIN: Gastrointestinal nematode) به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت و تولید حیوان و یکی از مهمترین محدودیت‌های اقتصادی در تولید نشخوارکنندگان کوچک شناخته می‌شوند (Vijayasarithi *et al.*, 2016)، که عمدتاً دام‌های چرا کننده در سراسر جهان و به ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. نماتد خون‌خوار *Haemonchus contortus* (نماتد اصلی شایع در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب که به عنوان انگل هماتوفاژ نیز شناخته می‌شود) یکی از مهمترین و بیماری‌زاترین انگل-های دستگاه گوارش گوسفند است (Benavides *et al.*, 2015). این انگل خون‌خوار در شیردان میزبان ساکن است و مسئول کاهش وزن، کم خونی و کاهش عملکرد است (Miller *et al.*, 1998). از نظر اقتصادی نیز *Haemonchus contortus* مهم‌ترین نماتد دستگاه گوارش است که صدها میلیون نشخوارکننده کوچک را در سراسر جهان آلوده می‌کند (Gasser *et al.*, 2016). در ۵۰ سال گذشته، راهبردهای کنترل عمدتاً مبتنی بر استفاده از داروهای ضد انگل بوده است، اما متأسفانه، فشار انتخاب ایجاد شده در اثر استفاده مکرر از آن‌ها منجر به توسعه سریع مقاومت ضد انگل در جمعیت‌های GIN در سراسر جهان شده است (Dolinská *et al.*, 2014; Geurden *et al.*, 2014). به عبارت دیگر، وجود مقاومت ضد انگل، استفاده از داروهای ضد انگل برای کنترل GIN را ناپایدار کرده است (McManus *et al.*, 2014). عواملی که به ناپایداری بیشتر استفاده از داروهای ضد انگل کمک می‌کنند، هزینه بالای داروها (Mpetile *et al.*, 2015)، نگرانی مصرف کننده در مورد آثار احتمالی باقی‌مانده (Vijayasarithi *et al.*, 2016) و گران بودن ساخت داروهای ضد انگل جدید و مؤثر (Chagas *et al.*, 2016) است. بنابراین نیاز به راهبردهای مدیریت واقع‌بینانه، پایدارتر و مقرون به صرفه‌تر این نماتدها وجود دارد (Bath, 2014).

مشخص شده است تغییرات فنوتیپی القا شده به وسیله عامل بیماری‌زا، همواره با تغییرات قابل توجه بیان ژن در میزبان همراه بوده است. پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات ژنومی، ابزارهایی برای کشف عوامل ژنتیکی کنترل کننده تنوع فنوتیپی در صفات پیچیده از جمله مقاومت در برابر

موتیف‌ها را با هم مقایسه می‌کند و جدولی را که بر اساس مقدار q مرتب شده است تولید می‌کند که به معنای وجود کمترین تعداد تطابق کاذب در بین موتیف‌ها است. ابزار GOMo (<http://meme-suite.org/tools/gomo>) برای شناسایی نقش‌های ممکن برای موتیف‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Buske *et al.*, 2010).

ساخت شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI)، تجزیه کلاستر و شناسایی ژن‌های کلیدی: برای شناسایی ارتباط میان DEG‌های کد کننده پروتئین‌ها، یک شبکه PPI با استفاده از پایگاه داده برخط STRING نسخه 11.5 (<https://string-db.org>) ساخته شد (Szkarczyk *et al.*, 2019). به منظور دستیابی به یک شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین قوی، confident interaction score روی عدد بزرگ‌تر و مساوی 0.4 تنظیم شد و گره‌های بدون ارتباط نیز پنهان شدند. برای مصورسازی شبکه‌های PPI و تجزیه ژن‌های هاب، نرم افزار Cytoscape نسخه 3.9.0 (<https://www.cytoscape.org>) مورد استفاده قرار گرفت (Shannon *et al.*, 2014). دو روش محاسبه closness و stress از پلاگین CytoHubba (Chin *et al.*, 2014) به منظور دستیابی به ۱۰۰ ژن هاب موجود در شبکه PPI ساخته شده، مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این، یک ون دیاگرام برای شناسایی ژن‌های هاب مهم که بین دو روش محاسبه مشابه بودند، مورد استفاده قرار گرفت. بر مبنای gene score، ژن‌های دارای رتبه بالا مورد تجزیه قرار گرفتند. همچنین از پلاگین MCL cluster (Cytoscape) (plugin-MCL cluster) برای یافتن کلاسترهای دارای ارتباط بالا و معنی‌دار در درون شبکه PPI استفاده شد. به صورت پیش فرض حفظ شد. علاوه بر این، وب سرور Array source روی Combined score و Edge cut off به صورت پیش فرض حفظ شد. برای پیش‌بینی نقش ژن‌های هاب و هستی-شناسی ژن کلاسترهای ایجاد شده مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه توزیع DEG‌ها در موقعیت‌های کروموزومی: موقعیت ژنومی DEG‌ها روی تمامی کروموزوم‌ها با استفاده از Circos plot، به وسیله یک وب سرویس برخط که به صورت رایگان در <http://clicofs.codoncloud.com> در دسترس است، ساخته شد.

sequences parameters روی فایل‌های FastQC انجام شد (Cánovas *et al.*, 2014). بعد از انجام کنترل کیفیت، خوانش‌های توالی‌یابی شده در برابر رفرنس ژنوم annotated Oar_v3.1.84 ovine (fragment per kilo base) FPKM (per million mapped reads) های هر ژن به مقادیر نرمال‌سازی شدند. تجزیه بیان افتراقی با استفاده از بسته رنک پرواد در نرم افزار R انجام شد. برای تعیین معنی‌دار بودن بیان افتراقی از لحاظ آماری، $P\text{-value} < 0.05$ و $\text{false discovery rate} \leq 0.05$ (FDR) به عنوان حد آستانه برای DEG‌های معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تجزیه هستی‌شناسی ژن (GO) و غنی‌سازی مسیر (KEGG): تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن به عنوان یک سیستم استاندارد بین‌المللی طبقه‌بندی کارکردی ژن در این مطالعه به منظور توصیف ویژگی ژن‌ها و فرآورده آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. DEG‌ها از نظر عملکردی در سه حوزه هستی‌شناسی گروه‌بندی شدند: (فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و فرآیندهای مولکولی). هستی‌شناسی ژن (GO) با استفاده از وب سرور برخط DAVID نسخه 6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) انجام شد. تمامی اصطلاحات هستی‌شناسی ژن غنی شده‌ای که $P < 0.05$ داشتند نمایش داده شدند. تجزیه غنی‌سازی مسیر KEGG نیز با استفاده از وب سرور DAVID انجام شد (Huang *et al.*, 2009) و مسیرهای با $P < 0.05$ به عنوان مسیرهای معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

تجزیه پروموتور: ۱۵۰۰ جفت باز از نواحی بالادست DEG‌ها از پایگاه داده Ensembl Genome Browser استخراج شد (<https://asia.ensembl.org/index.html>). جستجو به منظور یافتن موتیف‌های حفاظت شده در توالی پروموتور DEG‌ها با استفاده از MEME (meme.nbcn.net/meme/intro.html) نسخه 5.4.1 انجام شد. بیشترین تعداد موتیف‌ها روی ۲۰ و بقیه فراسنجه‌ها بر روی حالت پیش‌فرض تنظیم شدند (Bailey *et al.*, 2009). ابزار TOMTOM (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>) نسخه 5.4.1 نیز به منظور مقایسه موتیف‌های معنی‌دار حاصل از خروجی MEME با موتیف‌های شناخته شده موجود در پایگاه داده JASPAR CORE 2018 Vertebrate با حد آستانه $E\text{-value} < 10^{-5}$ مورد استفاده قرار گرفت (Khan *et al.*, 2018). این ابزار

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq و بیان افتراقی: با توجه به محدودیت تعداد تکرارهای زیستی، مطالعات انفرادی نمی‌توانند نگرش جامعی از پاسخ به بیماری‌ها ایجاد نمایند. بنابراین یکی کردن آزمایشات مستقل با استفاده از متاآنالیز این فرصت را فراهم می‌آورد که قدرت آماری شناسایی ژن-هایی که تفاوت بیانی نشان می‌دهند را بهبود بخشیم (Salehinasab *et al.*, 2018). در این مطالعه، دو مجموعه داده با شماره پروژه‌های PRJNA445172 و SRA access number PRJNA268183 شامل ۷۰ نمونه وارد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج حاصل از متاآنالیز ۱۳۸۸ ژن با بیان افتراقی (DEGs)، از جمله ۲۵۱ ژن down-regulate و ۱۱۳۷ ژن up-regulate بود. این مشاهدات بیانگر آن هستند که در زمان عفونت، تعداد زیادی از ژن-های درگیر در فرآیندهای زیستی دچار تغییرات بیان می‌شوند تا به حیوان در پشت سر نهادن شرایط دشوار کمک نمایند. در نهایت، ژن‌های با بیان افتراقی شناسایی شده، مورد تجزیه و تحلیل‌های پائین دستی قرار گرفتند.

هستی‌شناسی ژن (GO) و غنی‌سازی مسیر (KEGG): برای دستیابی به بینش بیشتر در مورد روند کلی عملکرد DEGs، تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) مبتنی بر آزمون‌های غنی‌سازی با طبقه‌بندی عملکرد DEGs به سه دسته عملکردی اصلی (فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی) با جستجوی DEGs در پایگاه داده DAVID نسخه‌ی 6.8 با E-value threshold کوچک-تر یا مساوی ۰/۰۵ انجام شد. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن نشان داد که DEGs در ۱۳ دسته فرآیند زیستی غنی شدند که بالاترین اصطلاحات GO غنی شده شامل سوخت و ساز واحدهای یک کربنی، ترجمه، مسیر سیگنالینگ رسپتور سطح سلولی، پاسخ ایمنی، تنظیم مثبت تکثیر سلولی و ... بودند (شکل ۱). یکی از مسیرهای زیست‌شناسی مولکولی که ژن‌های دارای بیان افتراقی در این مطالعه در آن فعال بودند، مسیر سیگنالینگ رسپتور سطح سلولی بود. این مسیر شامل مجموعه‌ای از سیگنال-های مولکولی ایجاد شده به وسیله فعال‌سازی رسپتور یا گیرنده بر سطح یک سلول است که با اتصال یک لیگاند خارج سلولی به یک رسپتور در سطح سلول شروع می‌شود و در نهایت با تنظیم فرآیندهای سلولی پایین دست مانند

رونویسی خاتمه می‌یابد. تغییرات ساختاری ایجاد شده در دومین‌های سیتوپلاسمی رسپتورها در پی اتصال لیگاندها به آن‌ها سبب اعطای فعالیت آنزیمی به آن‌ها می‌شود (معمولاً یک فعالیت کینازی که می‌تواند از ATP برای فسفریله نمودن پروتئین‌ها شامل خود مولکول رسپتور استفاده نماید)، سپس رسپتور فعال شده می‌تواند واکنش-هایی که دیگر پروتئین‌ها را فسفریله می‌نمایند کاتالیز نماید و این فسفریلاسیون به نوبه خود، فعالیت‌های نهفته آن‌ها را فعال می‌کند. در نهایت، آبخار فسفریلاسیون یک عامل رونویسی خاموش را که مجموعه‌ای از ژن‌ها را فعال (یا سرکوب) می‌نماید، فعال می‌کند (Hilger *et al.*, 2018). با توجه به آن که رسپتورهای غشا و ترانسان سیگنال‌های مرتبط با آن‌ها ممکن است در برخی از بیماری‌ها به عنوان نتیجه‌ای از ساز و کارهای سازگاری یا maladaptive شامل جهش در ژن‌های کد کننده آن‌ها تغییر یابند (Ulloa *et al.*, 2017). فعال بودن تعداد زیادی از ژن‌های دارای بیان افتراقی شناسایی شده به وسیله متاآنالیز، در مسیر سیگنالینگ رسپتور سطح سلولی که در نتیجه تحریک یک عامل خارجی (حمله انگل در مطالعه مورد نظر) رخ داد، ممکن است سبب فعال‌سازی یا ماندگار شدن یک پاسخ ایمنی شود. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن در حوزه عملکرد مولکولی نشان داد بیشتر GOهای غنی شده در دسته عملکرد مولکولی شامل اتصال به ATP، یون کلسیم، ریبوزوم و ... بودند، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بیشتر رونوشت‌های دارای بیان افتراقی شناسایی شده در دسته مولکولی در این مطالعه، عملکرد خود را با اتصال به مولکول‌های هدف اعمال می‌کنند (شکل ۱). در حوزه اجزای سلولی مشخص شد که DEGs عمدتاً در فضای خارج سلولی، دستگاه گلژی، سیتوزول و ... قرار دارند. علاوه بر این، با هدف شناسایی مسیرهای مهم، تجزیه غنی‌سازی مسیر KEGG روی DEGs انجام شد. در تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG، ۱۷ مسیر که به‌طور معنی‌داری غنی شدند، شناسایی شدند. برترین این مسیرها شامل فرآیندهای متابولیسمی و PPAR signaling pathway بودند (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی انجام شده روی ۷۱ DEGs افزایش تنظیم‌یافته فعال شده به وسیله GIN در گوسفند مقاوم که روی نمونه‌های غدد لنفاوی شیردان انجام شد، نیز غنی‌سازی معنی‌دار مسیر PPAR signaling را نشان داد (Bionaz *et al.*, 2013). گیرنده‌های

تجزیه پروموتور: ۱۵۰۰ جفت باز از نواحی بالادست DEGsها برای یافتن موتیف‌های حفاظت شده و عناصر تنظیمی سیس (CRE) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. خروجی MEME مجموعه‌ای از هشت موتیف معنی‌دار با طولی مابین ۲۲ تا ۲۵۴۹ جفت باز در پروموتور DEGsها بود. موتیف ۱ و ۲ به ترتیب در ۳۳۱ و ۳۲۰ تا از DEGsهای به‌دست آمده از متآنالیز یافت شدند. بعد از مقایسه هر یک از موتیف‌های معنی‌دار یافت شده در پروموتور DEGsها با جایگاه‌های شناخته شده اتصال عوامل رونویسی با استفاده از ابزار TOMTOM، ۱۳ خانواده از عوامل رونویسی از مجموع ۱۳۱ (مجموع تطابق‌های تام تام) موتیف دارای تطابق شناسایی شد که بیشتر موتیف‌های یافت شده که به عنوان CRE شناخته شدند، به وسیله دومین‌های C_2H_2 zinc finger factor شناسایی می‌شوند و به عبارت دیگر، دارای همبستگی بالایی با خانواده عوامل رونویسی C_2H_2 zinc finger factor بودند (شکل ۳).

هسته‌ای (NR)، از جمله PPARها، یک خانواده عامل رونویسی شامل ۴۷ تا ۴۹ عضو را تشکیل می‌دهند (Zhang *et al.*, 2004). فعالیت NR امکان کنترل طولانی‌مدت (ساعت‌ها تا روزها) سوخت و ساز را فراهم می‌کند زیرا آن‌ها می‌توانند بر بیان mRNA ژن‌های هدف، از جمله آنزیم‌های متابولیکی، تأثیر بگذارند. بنابراین، NR یک سیستم تنظیمی مهم در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها است که نقش کلیدی در هماهنگی سوخت و ساز کل موجود زنده ایفا می‌نماید. PPARها به وسیله اسیدهای چرب طبیعی یا مشتقات اسیدهای چرب (مانند ایکوزانوئیدها) فعال می‌شوند و نقش فیزیولوژیکی حیاتی در تنظیم فرآیندهای زیستی متعدد از جمله سوخت و ساز لیپید، گلوکز و هموستازی کلی انرژی دارند (Bionaz *et al.*, 2013). مسیر سیگنالینگ PPAR، تمایز سلولی، تعادل انرژی و سوخت و ساز لیپید را تنظیم می‌کند (Gross *et al.*, 2017).

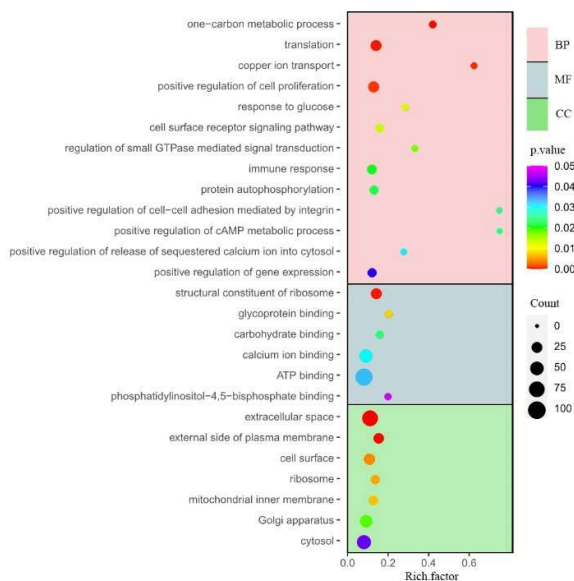


Fig. 1. Scatter plot of enriched GO terms. The vertical axis represents the enriched GO terms in biological process (BP), molecular function (MF), cellular component (CC), and horizontal axis represents the rich factor of each GO terms. Rich factor refers to the ratio of the number of DEGs enriched in certain GO terms to the number of annotated genes. The greater the value is, the higher the DEGs enrichment degree. The size of dots indicates the number of DEGs enriched in certain term, and the color of the dots corresponds to the range of the P-value.

شکل ۱- اسکرین‌شات مسیریابی GO غنی شده. محور عمودی بیانگر مسیرهای GO غنی شده در فرآیند زیستی (BP)، عملکرد مولکولی (MF)، جزء سلولی (CC) و محور افقی نشان‌دهنده Rich factor هر مسیر GO است. Rich factor به نسبت تعداد DEGs غنی شده در مسیرهای GO خاص به تعداد کل ژن‌های annotate شده در آن مسیر است. هر چه مقدار عددی آن بیشتر باشد، درجه غنی‌سازی DEG بالاتر است. اندازه نقاط، تعداد DEGs غنی شده در مسیرهای خاص را نشان می‌دهد و رنگ نقطه‌ها با محدوده P-value مطابقت دارد.

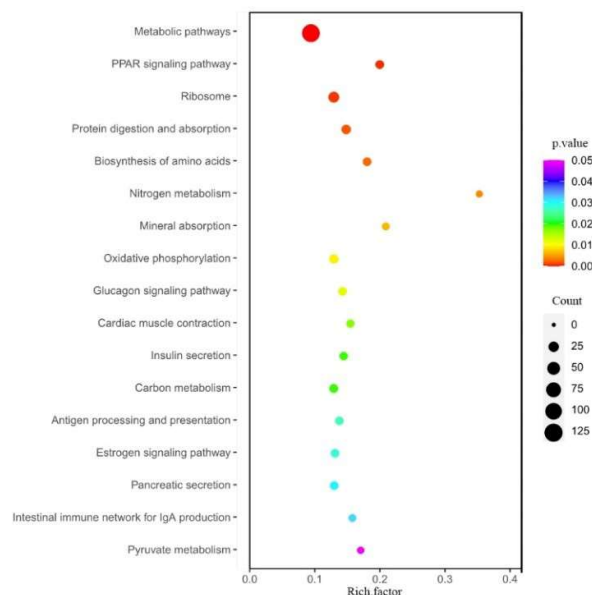


Fig. 2. Scatter plot of enriched KEGG pathways. The vertical axis represents the enriched KEGG pathways and horizontal axis represents the rich factor of each KEGG pathway. Rich factor refers to the ratio of the number of DEGs enriched in certain KEGG pathway to the number of annotated genes. The greater the value is, the higher the DEGs enrichment degree. The size of dots indicates the number of DEGs enriched in certain pathway, and the color of the dots corresponds to the range of the *P*-value.

شکل ۲- اسکتربلات مسیرهای KEGG غنی شده. محور عمودی بیانگر مسیرهای KEGG غنی شده و محور افقی نشان‌دهنده Rich factor هر مسیر KEGG است. Rich factor به نسبت تعداد DEGs غنی شده در مسیرهای KEGG خاص به تعداد کل ژن‌های annotate شده در آن مسیر است. هر چه مقدار عددی آن بیشتر باشد، درجه غنی‌سازی DEG بالاتر است. اندازه نقاط، تعداد DEGs غنی شده در مسیرهای خاص را نشان می‌دهد و رنگ نقطه‌ها با محدوده *P*-value مطابقت دارد.

تحت کنترل تنظیمی مشترک هستند یا خیر، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتری DEGs انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد عوامل رونویسی اصلی تنظیم‌کننده مسیرهای پاسخ به انگل در این مطالعه، C_2H_2 zinc finger factor بودند (شکل ۳). خانواده انگشت روی C_2H_2 ، دسته بزرگی از عوامل رونویسی در ژنوم پستانداران و تنظیم‌کننده‌های کلیدی رونویسی در سلول‌های ایمنی هستند (Brayer and Segal, 2008). گزارش شده است بسیاری از عوامل رونویسی انگشت روی در تعدیل و تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی نقش دارند (Fu and Blackshear, 2017). انگشت روی‌ها نقش‌های متعددی در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ سلولی نیز ایفا می‌کنند، به طوری که تمامی ایزوفرم‌های پروتئین کیناز C حاوی حداقل یک توالی انگشت روی هستند و در بسیاری از موارد، این دومین‌ها مسئول اتصال به دی اسیل گلیسرول هستند (Zhao et al., 2010). دسته خاصی از انگشت روی‌ها نیز در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلول‌های ایمنی نقش دارند

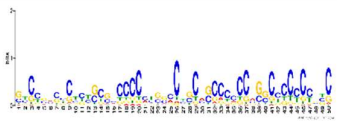
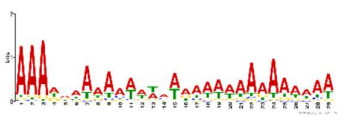
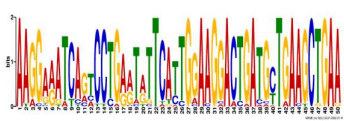
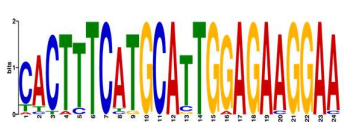
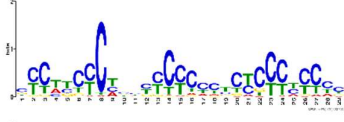

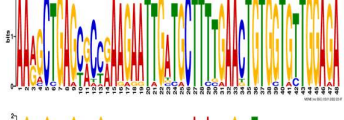
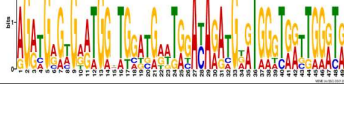
تجزیه GOMo برای موتیف‌های شناسایی شده به وسیله MEME بیانگر وجود نقش‌های زیستی جذاب متعددی برای DEGs بود (جدول ۱). هستی‌شناسی ژن بیانگر آن بود که این موتیف‌ها در تنظیم بیان ژن، تنظیم مثبت پاسخ ایمنی، پاسخ دفاعی، هموستازی یون کلیسم و ... مشارکت می‌نمایند. علاوه بر این، این موتیف‌ها در نقش‌های مولکولی مانند فعالیت عوامل رونویسی، فعالیت گیرنده غشایی، فعالیت سیتوکین و ... درگیر بودند (جدول ۱). همچنین تحلیل اجزای سلولی این موتیف‌ها نشان داد که فعالیت این موتیف‌ها در اندامک، محدود به فضای بین سلولی، میتوکندری، سیتوزول و ... است. شناسایی نواحی پروموتری، اولین گام در درک ساز و کارهای تنظیم بیان ژن است (Rani et al., 2007). پروموترها نواحی عملکردی حاوی عناصر تنظیمی پیچیده برای تعیین شروع رونویسی ژن‌ها هستند (Abeel et al., 2008). به منظور یافتن عناصر تنظیمی سیس واقع شده در نواحی پروموتری DEGs و یافتن آن که آیا ژن‌های دارای بیان افتراقی در این مطالعه

هیستون در سرکوب و فعال‌سازی رونویسی نقش دارد (Berger, 2002; Wang and Zhu, 2008 and Black *et al.*, 2012)، به عبارت دیگر، متیلاسیون DNA شروع رونویسی را به وسیله مداخله مستقیم با اتصال فعال‌کننده‌های رونویسی یا به‌طور غیرمستقیم با اتصال پروتئین‌ها سرکوب می‌نماید (Meyer *et al.*, 1994).

و سبب تنظیم تولید سیتوکین و فعال شدن سلول‌های ایمنی می‌شوند (Fu and Blackshear, 2017). همچنین اتصال پروتئین‌های انگشت روی C_2H_2 به DNA اغلب به جذب پروتئین‌های دیگر کمک نموده و سبب تنظیم تغییرات اپی ژنیک شامل تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها می‌شود. بسته به مکان‌های متیله شده، متیلاسیون

جدول ۱- موتیف‌های حفاظت شده شناسایی شده در نواحی پروموتری DEGها به وسیله تجزیه MEME

Table 1. Conserved motif discovered in promoter region of DEGs with MEME analysis

Motif LOGO	E-value	Width	Significant GO term identified by GOMO
	4/4e-334	50	Biological process: positive regulation of transcription Molecular function: transcription factor activity Molecular function: ATP binding Molecular function: calmodulin binding Cellular component: cytosol
	2/7e-077	29	Biological process: regulation of gene expression Molecular function: olfactory receptor activity Cellular component: mitochondrion
	2/9e-028	50	Biological process: defense response Biological process: positive regulation of immune response Cellular component: extracellular space
	9/0e-018	21	Biological process: cellular calcium ion homeostasis Cellular component: integral to plasma membrane
	4/2e-010	29	Biological process: wound healing, spreading of epidermal cells Molecular function: tyrosine kinase signaling pathway
	8/7e-007	29	Biological process: positive regulation of production of molecular mediator of immune response Molecular function: cytokine activity
	1/7e-004	48	Biological process: response to stimulus Biological process: regulation of T cell activation
	7/8e-005	50	Biological process: regulation of T-helper 1 type immune response Cellular component: external side of plasma membrane

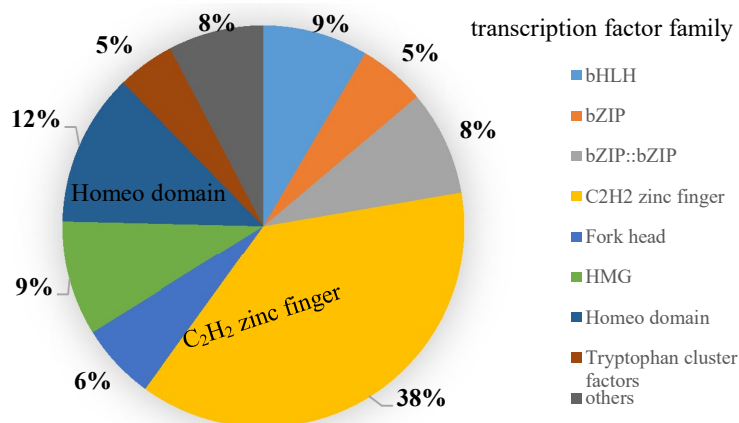


Fig. 3. Transcription factor families available in significant and high correlated motifs with available motifs in DEGs

شکل ۳- خانواده عوامل رونویسی موجود در موتیف‌های دارای همبستگی بالا و معنی‌دار با موتیف‌های موجود در ژن‌های دارای بیان افتراقی

حساس، افزایش بیان یافته است. در حیوانات، آلبومین ۳۵ تا ۵۰ درصد کل پروتئین سرم را تشکیل می‌دهد. آلبومین نقش مهمی در حفظ هموستازی و حمل و نقل مواد ایفا می‌کند و به عنوان حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند (Hankins, 2006). ثابت شده است که عفونت گوارشی می‌تواند منجر به هیپوپروتئینمی شود. بنابراین، سطح پروتئین کل پلاسما (g/dL) ممکن است فراسنجه مهمی در ارزیابی وضعیت مقاومت و انتخاب نژادهای مقاوم باشد (Saddiqi, 2010). نشان داده شده است که گوسفند حساس Corriedale دارای بار انگل بیشتر، هیپوپروتئینمی و هیپوآلبومینمی است، در حالی که، حیوانات Crioula (مقاوم) تنها کاهش جزئی در غلظت کل پروتئین سرم و آلبومین داشتند (Bricarello et al., 2004). کاهش غلظت پروتئین کل معمولاً نتیجه کاهش آلبومین و یا گاهی اوقات، کاهش گاما گلوبولین‌ها است. این گزارشات مهر تأییدی بر یافته به‌دست آمده از این مطالعه در ارتباط با افزایش بیان ژن کدکننده آلبومین در نژاد مقاوم است. همچنین از لحاظ اصطلاحات فرآیندهای زیستی هستی-شناسی ژن مشخص شد این ژن در تنظیم منفی آپوپتوسیس نقش ایفا می‌کند. آپوپتوسیس به وسیله انواع مختلفی از محرک‌ها از جمله عفونت، تشعشع و غیره آغاز می‌شود. افزایش آپوپتوسیس ممکن است به انتشار پاتوژن-های داخل سلولی کمک کند و یا باعث سرکوب سیستم ایمنی شود. در نتیجه ورود عوامل بیماری‌زا به سلول‌های

ساخت شبکه PPI و تجزیه کلاستر: تجزیه STRING برای کشف و به‌دست آوردن اطلاعات و شبکه تعاملی بین DEGs در پاسخ به انگل *heamonchus contortus* استفاده قرار گرفت. در شبکه نهایی، ۱۲۸۳ گره و ۱۰۳۱۶ لبه شامل ۱۱۳۷ ژن upregulate و ۲۵۱ ژن downregulate وجود داشت. ژن‌های هاب به دلیل موقعیت مرکزی خود در شبکه، نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کنند. ژن‌های هاب دارای امتیاز بالای به‌دست آمده از الگوریتم closness و stress پلاگین CytoHubba در این مطالعه شامل آلبومین (ALB)، CD4، Cbl proto-oncogene (CBL)، فیبرونکتین ۱ (FN1)، Myb like، پروتئین SWIRM and MPN domains 1 (MYSM1)، شوک حرارتی خانواده A (hsp70) عضو ۵ (HSPA5)، phospholipase C، cyclin-dependent kinase (CDK1)، gamma 2 (PLCG2) و ... بودند. هستی‌شناسی ژن‌های هاب به‌دست آمده نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای فرآیندهای زیستی مانند تنظیم منفی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تنظیم مثبت بیان ژن، مسیر سیگنالینگ رسپتور سلول B، پاسخ ایمنی ذاتی، ترجمه، اتوفسفوریلاسون پروتئینی، پاسخ‌های التهابی، مسیر سیگنالینگ G-پروتئین متصل به رسپتور و ... غنی شدند. در این مطالعه، ژن آلبومین (ALB) به عنوان ژن هاب با رتبه یک شناسایی شد. بررسی لگاریتم Fold change این ژن نشان داد که این ژن هاب در نژاد مقاوم نسبت به نژاد

اینترلوکین-۴ عمل می‌کنند (Van Panhuys et al., 2011). همچنین، با استفاده از پلاگین MCL cluster، ۱۰ کلاستر کلیدی با حداقل ۱۵ گره از کل شبکه، اسکرین گرفته شد. ژن‌ها در کلاستر ۱ عمدتاً در مسیر ترجمه، غنی شدند. BP ژن‌ها در کلاستر ۲ به‌طور ویژه در مسیر تنظیم مثبت سیتوکینز و در کلاستر ۳ در مسیر پاسخ ایمنی، غنی شدند (شکل ۴).

تجسم *circos* موقعیت *DEG*: با توجه به ژنوم گوسفند و وجود ۲۷ جفت کروموزوم، بررسی جهت یافتن رابطه معنی‌دار بین *DEG*ها و موقعیت ژنومی آن‌ها صورت گرفت. ابتدا با توجه به اسمبلی خوانش‌ها با ژنوم مرجع، موقعیت این رونوشت‌ها روی کروموزوم‌ها مشخص شد و از *Circos* plot برای نمایش موقعیت ژنومی *DEG*های شناسایی شده روی کروموزوم‌ها استفاده شد (شکل ۵). همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، بیشترین تعداد *DEG*های شناخته شده در این مطالعه روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ قرار داشتند که با توجه به طول کروموزوم، این تفاوت معنی‌دار نبود. در مجموع، این تجزیه نشان می‌دهد که کل کروموزوم‌ها در پاسخ به انگل *H. contortus* نقش دارند و ژنوم، ساز و کار پیچیده‌ای در مقابله با این چالش دارد.

نتیجه‌گیری کلی

متاآنالیز روشی قدرتمند برای تشخیص ژن‌هایی است که تأثیر کوچک اما ثابت بر صفت مورد نظر دارند. جمع‌آوری اطلاعات مطالعات متعدد، همان‌طور که در متاآنالیز انجام می‌شود، به کشف دقیق‌تر این نوع ژن‌های کوچک اثر مؤثر کمک می‌نماید. داده‌های رونویسی به‌دست آمده از متاآنالیز در این مطالعه منجر به آشکارسازی فرآیند رونویسی و ژن‌های کاندید جالبی شد که می‌توانند به‌طور مؤثر برای افزایش مقاومت مورد هدف قرار گیرند. همچنین نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل‌های پایین‌دستی از جمله هستی‌شناسی ژن (GO)، غنی‌سازی و تجزیه و تحلیل شبکه تعامل پروتئین-پروتئین در راستای انجام مطالعه جامع روی ژن‌های دارای بیان افتراقی تحت عفونت *H. contortus* بیانگر غنی شدن *DEG*ها در فرآیندهای زیستی متعددی مانند سوخت و ساز واحدهای یک کربنی، ترجمه، مسیر سیگنالینگ رسپتور سطح سلولی، پاسخ ایمنی و ژن‌های کلیدی پاسخ به عفونت ایجاد شده بود.

پستانداران، واکنش‌ها یا پاسخ‌های مختلفی از جمله آزادسازی سیتوکین‌ها، ترشح دفسین‌ها، تولید رادیکال-های آزاد و به راه افتادن آپوپتوسیس برانگیخته می‌شود. عوامل بیماری‌زا می‌توانند از راه فرآیندهای مختلفی که شامل ترشح مهارکننده‌های تولید پروتئین و پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منافذ است، آپوپتوسیس را تحریک کنند. آن‌ها همچنین می‌توانند پروتئین‌های آپوپتوسیس مانند کاسپازها را فعال کنند و پروتئین‌های ضد آپوپتوسیس را غیرفعال کنند (Ntuli, 2015). بنابراین افزایش بیان این ژن در نژاد مقاوم در مقایسه با نژاد حساس در پاسخ به انگل *Haemonchus contortus* با توجه به مطالب ذکر شده در بخش بالا، احتمالاً در راستای مقابله با انتشار انگل در درون سلول‌های میزبان بوده و اطلاعات ارزنده‌ای را در ارتباط با شناسایی پروتئین‌هایی که ممکن است نقش مهمی در ایجاد ایمنی ایفا کنند و/یا به عنوان نشانگرهای زیستی مقاومت به عفونت عمل کنند، فراهم می‌آورد.

یکی از ژن‌های دیگر شناسایی شده در پژوهش حاضر که ارتباط گسترده‌ای با سایر ژن‌ها نشان داد، ژن CD4 بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشخص شد بیان این ژن در نژاد مقاوم نسبت به نژاد حساس افزایش یافت. در زیست‌شناسی مولکولی، CD4 یک گلیکوپروتئین است که به عنوان کو-رپرسور برای رسپتور سلول T (TCR) عمل می‌کند. CD4 روی سطح سلول‌های ایمنی مانند سلول‌های T-helper، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک یافت می‌شود (Bernard and Boumsell, 1984). این گلیکوپروتئین غشایی دارای نقش اساسی در پاسخ ایمنی است و نقش‌های متعددی را در پاسخ به حملات خارجی و داخلی انجام می‌دهد. مطالعات متعددی اهمیت لنفوسیت‌های CD4⁺ T را در ایمنی به عفونت نامتد دستگاه گوارش گزارش کرده‌اند (Urban et al., 1991; Gill et al., 1993; Koyama et al., 1995; Karanu et al., 1997). در همین راستا مشخص شده است لنفوسیت‌های CD4⁺ T نقش مهمی در ایجاد مقاومت در برابر نامتد *Haemonchus contortus* در گوسفند دارند (Peña et al., 2006) و پاسخ‌های لنفوسیتی بسیار بالاتر و معنی‌دارتری نسبت به آنتی ژن انگل در حیواناتی با مقاومت ژنتیکی به همونکوزیس گزارش شده است (Gill, 1994). در طول عفونت، سلول‌های CD4⁺ T به عنوان منبع غالب تولید

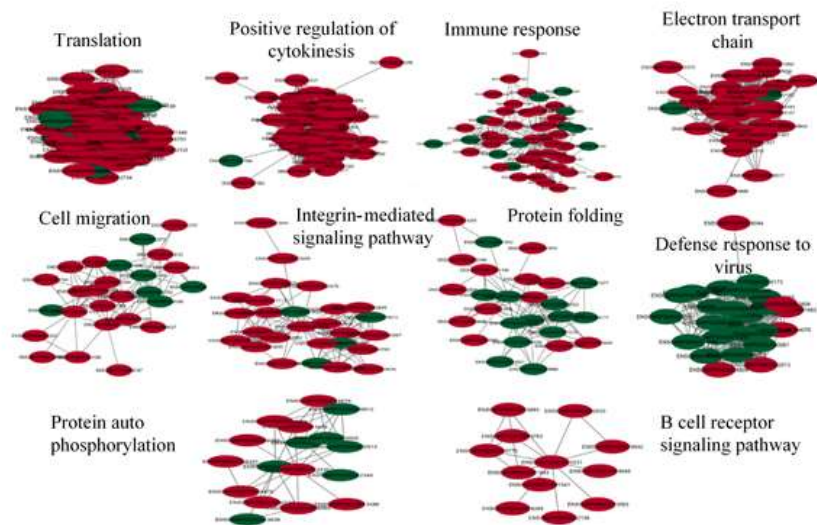


Fig. 4. Top 10 key cluster screened from network with MCL cluster plugin
 شکل ۴- نمایش ۱۰ کلاستر کلیدی برتر از کل شبکه با استفاده از پلاگین MCL cluster

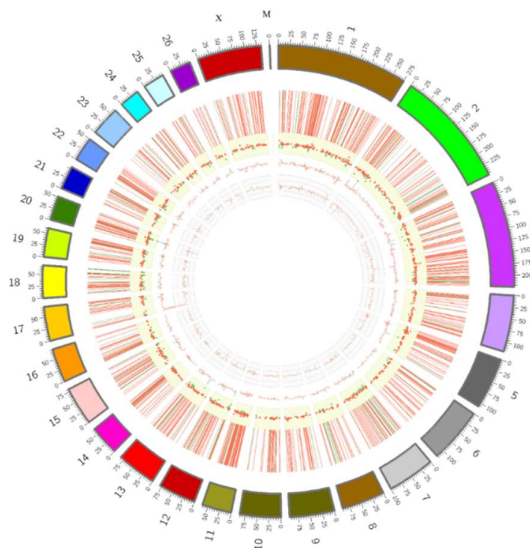


Fig. 5. Schematic representation of the genomic position of DEGs on all chromosomes of sheep by the Circos plot. The genome is displayed as a circle, chromosome 1 to X. Circles from outer to inner represent chromosome number, differential expresses genes through heat map, scatter plot, histogram and line plot. Red and green colors indicate up- and down regulate genes, respectively.

شکل ۵- نمایش شماتیک موقعیت ژنومی DEGها روی کروموزوم‌های گوسفند با استفاده از Circos plot. ژنوم به صورت دایره‌ای، کروموزوم‌های ۱ تا X را نشان می‌دهد. هر دایره از بیرون به داخل به ترتیب نشان‌دهنده تعداد کروموزوم، ژن‌های بیان شده به صورت افتراقی از راه نقشه حرارتی، نمودار پراکندگی، هیستوگرام و پلات خطی هستند. رنگ قرمز بیانگر ژن‌های با افزایش بیان و رنگ سبز بیانگر ژن‌های با کاهش بیان است.

فهرست منابع

- Abeel T., Saeys Y., Rouze P. and Vande Peer Y. 2008. Pro SOM: Core promoter prediction based on unsupervised clustering of DNA physical profiles. *Bioinformatics*, 24: 24-31.
- Andersson L. 2012. How selective sweeps in domestic animals provide new insight into biological mechanisms. *Journal of Internal Medicine*, 271(1): 1-14.
- Andronicos N. M., Hunt P. and Windon R. 2010. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 40: 417-429.
- Bailey T. L., Boden M., Buske F. A., Frith M., Grant C. E., Clementi L., Ren J., Li W. W. and Nobel W. S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37: 202-208.
- Bath G. F. 2014. The “BIG FIVE”-A South African perspective on sustainable holistic internal parasite management in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 118: 48-55.
- Benavides M. V., Sonstegard T. S., Kemp S., Mugambi J. M., Gibson J. P., Baker R. L., Hanotte O., Marshall K. and Tassell C. V. 2015. Identification of novel loci associated with gastrointestinal parasite resistance in a Red Maasai x Dorper backcross population. *PLoS One*, 1: e122797.
- Berger S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12: 142-148.
- Bernard A., Boumsell L. and Hill C. 1984. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard A., Boumsell L. and Dausset J. (Eds) *Leucocyte typing: human leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies: specification, classification, nomenclature*. Berlin, Springer. Pp. 45-48.
- Bionaz M., Chen S., Khan M. J. and Looor J. J. 2013. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Research*, 1: e684159.
- Black J. C., Van Rechem C. and Whetstone J. R. 2012. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular Cell*, 48: 491-507.
- Brayer K. J. and Segal D. J. 2008. Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C₂H₂ zinc finger domains. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 50: 111-131.
- Bricarello P. A., Gennari S. M., Oliveira-Sequeira T. C., Vaz C. M., de Goncalves I. G. and Eschevarria F.A. 2004. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, 51: 75-83.
- Buske F. A., Boden M., Bauer D. C. and Bailey T. L. 2010. Assigning roles to DNA regulatory motifs using comparative genomics. *Bioinformatics*, 26: 860-866.
- Cánovas A., Reverter A., DeAtley K. L., Ashley R. L., Colgrave M. L., Fortes M. R. S., Islas-Trejo A., Lehnert S., Porto-Neto L., Rincon G., Silver G. A., Snelling W. M., Medrano J. F. and Thomas M. G. 2014. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. *PLoS One*, 9: e102551.
- Chagas A., Domingues L. F., Gaínza Y. A., Barioni-Junior W., Esteves S. N. and Niciura S. C. 2016. Target selected treatment with levamisole to control the development of AR in a sheep flock. *Parasitology Research*, 115: 1131-1139.
- Chin C., Chen S. H., Wu H. H., Ho C., Ko M. T. and Lin C. 2014. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC System Biology*, 8: e11.
- Diez-Tascon C., Keane O. M., Wilson T., Zadissa A., Hyndman D., Baird D. B., McEwan J. C. and Crawford A. M. 2005. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiological Genomics*, 21: 59-69.
- Dolinská M., Ivanisinoval O., Konigova A. and Várady M. 2014. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Veterinary Research*, 10: e233.
- Fu M. and Blackshear P. J. 2017. RNA-binding proteins in immune regulation: A focus on CCCH zinc finger proteins. *Nature Reviews Immunology*, 17: 130-143.
- Gasser R., Schwarz E., Korhonen P. and Young N. 2016. Understanding *Haemonchus contortus* better through genomics and transcriptomics. *Advances in Parasitology*, 93: 519-567.
- Geurden T., Hoste H., Jacquiet P., Traversa D., Sotiraki S., Regalbono A. F., Tzanidakis N., Kostopoulou D., Gaillac C., Privat S., Giangaspero A., Zanardello C., Noe L., Vanimisetti B. and Bartram D. 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, 201: 59-66.
- Gill H. S. 1994. Cell-mediated immunity in Merino lambs with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 24: 749-756.
- Gill H. S., Watson D. L. and Brandon M. R. 1993. Monoclonal antibody to CD⁴⁺ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *The Journal of Immunology*, 78: 43-49.

- Gossner A. G., Wilkie H., Joshi A. and Hopkins J. 2013. Exploring the abomasal lymph node transcriptome for genes associated with resistance to the sheep nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Journal of Veterinary Parasitology*, 44: 1-13.
- Gross B., Pawlak M., Lefebvre P. and Staels B. 2017. PPARs in obesity-induced T₂DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nature Reviews Endocrinology*, 13: 36-49.
- Hankins J. 2006. The role of albumin in fluid and electrolyte balance. *Journal of Infusion Nursing*, 29: 260-265.
- Hilger D., Masureel M. and Kobilka B. K. 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25: 4-12.
- Huang D. W., Sherman B. T. and Lempicki R. A. 2009. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37: 1-13.
- Karanu F. N., McGuire T. C., Davis W. C., Besser T. E. and Jasmer D. P. 1997. CD⁴⁺ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunology*, 19: 435-445.
- Keane O. M., Dodds K. G., Crawford A. M. and McEwan J. C. 2007. Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies Ovar-DQA₁ allele frequency differences between nematode-resistant and susceptible selection lines. *Physiological Genomics*, 30: 253-261.
- Khan A., Fornes O., Stigliani A., Gheorghe M., Castro-Mondragon J. A., Lee R. V., Bessy A., Cheneby J., Kulkarni S. R., Tan G., Baranasic D., Arenillas D. J., Sandelin A., Vandepoele K., Lenhard B., Ballester B., Wasserman W., Parcy F. and Mathelier A. 2017. JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Research*, 46: 260-266.
- Knight P. A., Griffith S. E., Pemberton A. D., Pate J. M., Guarneri L., Anderson K., Talbot R. T., Smith S., Waddington D., Fell M., Archibald A. L., Burgess S. T., Smith D. W., Miller H. R. and Morrison I. W. 2011. Novel gene expression responses in the ovine abomasal mucosa to infection with the gastric nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Research*, 42: 78-100.
- Koyama K., Tamauchi H. and Ito Y. 1995. The role of CD⁴⁺ and CD⁸⁺ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunology*, 17: 161-165.
- Meyer P., Niedenh I. and Ten Lohuis M. 1994. Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic petunia hybrida. *The Embo Journal*, 13: 2084-2088.
- Miller J. E., Bahirathan M., Lemarie S., Hembry F. G., Kearney M. T. and Barras S. R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 74: 55-74.
- Mpetile Z., Cloete S., Kruger A. and Dzama K. 2015. Environmental and genetic factors affecting faecal worm egg counts in Merinos divergently selected for reproduction. *Journal of Animal Science*, 45: 510-520.
- Ntuli T. M. 2015. Cell death- autophagy, apoptosis and necrosis (Ed.): Apoptosis and infections. South Africa: IntechOpen. P. 446.
- Peña M. T., Miller J. E. and Horohov D. W. 2006. Effect of CD⁴⁺ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 138: 240-246.
- Rani T. S., Bhavani S. D. and Bapi R. S. 2007. Analysis of *E. coli* promoter recognition problem in di-nucleotide feature space. *Bioinformatics*, 23: 582-588.
- Rowe A., Gondro C., Emery D. and Sangster N. 2009. Sequential microarray to identify timing of molecular responses to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 161: 76-87.
- Saddiqi H. A. 2010. Evaluation of some indigenous breeds of sheep for natural resistance *Haemonchus contortus* infection. Ph.D. Dissertation, Faisalabad University, Pakistan.
- Salehinasab M., Rahimi Mianji Gh., Ebrahimie E. and Ghafouri S. A. 2018. Identification of differentially expressed genes in H5N1 infected chickens using meta-analysis of DNA microarray datasets. *Animal Production Research*, 7(3): 13-23. (In Persian).
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B. and Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13: 2498-2504.
- Szklarczyk D., Gable A. L., Lyon D. and Junge A. 2018. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47: 607-613.
- Ulloa A., Zarinan T., Castillo J. A. and Maravillas J. L. 2017. Reference module in neuroscience and biobehavioral psychology. Elsevier SciTech Connect. Pp. 1-10.
- Urban J. F., Katona I. M. and Finkelman F. D. 1991. *Heligmosomoides polygyrus*: CD⁴⁺ but not CD⁸⁺ T cells regulate the IgE response and protective immunity to mice. *Experimental Parasitology*, 73: 500-511.
- Van Panhuys N., Prout M., Forbes E., Min B., Paul W. E. and Gros G. L. 2011. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *The Journal of Immunology*, 186: 2719-2728.

- Vijayarathi M., Sreekumar C., Venkataramanan R. and Raman M. 2016. Influence of sustained deworming pressure on the AR status in strongyles of sheep under field conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 48: 55-62.
- Wang X. and Zhu W. G. 2008. Advances in histone methyltransferases and histone demethylases. *Journal of Cancer*, 27: 1018-1025.
- Zhang Z., Burch P. E., Cooney A. J., Lanz R. B., Pereira F. A., Wu J., Gibbs R. A., Weinstock G. and Wheeler D. A. 2004. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Research*, 14: 580-590.
- Zhao F., Ilbert M., Varadan R., Cremers C. M., Hoyos B., Acin-Perez R., Vinogradov V., Cowburn D., Jakob U. and Hammerling U. 2010. Are zinc-finger domains of protein kinase C dynamic structures that unfold by lipid or redox activation? *Antioxidants & Redox Signaling*, 14: 757-766.