

# تجزیه و تحلیل تلفیقی و مقایسه‌ای پروفایل رونویسی و شبکه‌های تنظیمی RNA درون‌زای رقابتی به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی

## چکیده

در حال حاضر، جوجه‌های گوشتی امروزی نسبت به گرما حساس هستند، به گونه‌ای که مواجهه با دمای بالا می‌تواند آثار زیان‌باری روی رفاه و عملکرد تولیدی آن‌ها داشته باشد. در این راستا، هدف از پژوهش حاضر، ادغام تجزیه و تحلیل پروفایل‌های رونویسی و استفاده مرور منابع پیشین به‌همراه با تجزیه شبکه تنظیمی RNA درون‌زای رقابتی برای شناسایی RNAهای پیام‌رسان کلیدی و RNAهای غیرکدکننده دخیل در تنظیم مولکولی سلول‌های بافت غده هیپوفیز و بافت قشری مغز برای تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی بود. بدین منظور، در مجموع، ۲ lncRNA، ۱۱ miRNA و ۴۲۶ mRNA ژن مشترک دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو بافت شناسایی شدند. در این راستا خروجی تجزیه و تحلیل‌ها، ۱۲ ژن هاب (*HSPA4*, *HSP90B1*, *HSPA5*, *HSP90AA1*)، *HSPH1*، *HSPA4L*، *DNAJB4*، *DNAJA4*، *DNAJA1*، *ALB*، *AHSA2*، *HYOU1*، *HUSY1*، *ALB*، *DNAJA1*، *DNAJA4*، *HSPA4L*، *HSPH1*) شناسایی و معرفی شدند که از نظر بیانی این ژن‌ها در جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی در مقایسه با جوجه‌های گوشتی گروه کنترل، افزایش بیان از خود نشان داده بودند. علاوه بر این، پس از بازسازی شبکه تنظیمی RNA درون‌زای رقابتی و ماژول کاندیدای مرتبط، مسیرهای متابولیکی معنی‌دار شناسایی شده شامل تاشدن پروتئین به وسیله چپرون، سازماندهی اجزاء سلولی، اتصال پروتئین شوک حرارتی، کمپلکس چپرون شبکه آندوپلاسمی و مسیر سیگنالینگ پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی بودند. در نهایت با توجه به RNAهای شناسایی شده دخیل در شبکه تنظیمی ceRNA که زمینه‌ساز تفاوت‌های فنوتیپی در شدت بروز تنش حرارتی هستند، این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز ارائه بینش جدیدی در مورد سازوکارهای تنظیم ژنی مرتبط با میزان شدت و مقاومت نسبت به تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی باشد.

**کلمات کلیدی:** تنش حرارتی، ترانسکریپتوم، جوجه‌های گوشتی، ژن‌های هاب، شبکه تنظیمی درون‌زای رقابتی

## Integrative and comparative analysis of transcriptional profiles and competitive endogenous RNA regulatory networks to identify key genes associated with heat stress in broiler chickens

### Abstract

Broilers are particularly sensitive to high ambient temperatures, which may have a negative impact on their welfare and production efficiency. The aim of the study was to combine a literature review analysis of transcriptional profiling and a competitive analysis of endogenous regulatory network (CERNA) to identify the key messenger and non-coding RNAs involved in the molecular regulation of the cells of the pituitary gland and the brain in heat stress broiler chickens. Overall, two long non-coding RNA, 11 microRNAs and 426 common mRNAs and genes were identified that showed significant differences in expression between the two tissues. From the analysis, 12 major genes (*HSP90A1*, *HSPA5*, *HSP90B1*, *HSPA4*, *HUSY1*, *AHSA2*, *ALB*, *DNAJA1*, *DNAJA4*, *HSPA4L*, and *HSPH1*) were found to be more extensively expressed in broiler chickens under heat stress than in control chickens. In addition, after reconstructing the competitive endogenous RNA regulatory network and the associated candidate modules, the main important metabolic signalling pathways identified were protein-folding chaperones, cellular component organisation, protein-binding to heat shock proteins, the endoplasmic reticulum chaperone complex, and protein-processing signalling pathways in the endoplasmic reticulum. Overall, considering the identified RNAs involved in the ceRNA regulatory network that underlie phenotypic differences in the severity of heat stress, this study may provide new insights into the molecular mechanisms underlying the control of heat stress severity and resistance in broiler chickens.

**Keyword(s):** Broiler chickens, Competitive endogenous regulatory network, Heat stress, Hub genes, Transcriptome

امروزه، صنعت پرورش طیور نقش حیاتی در تأمین تقاضای رو به رشد، جهت تأمین پروتئین حیوانی منطبق با جمعیت رو به رشد جهان ایفا می‌کند. در مقایسه با دهه‌های گذشته در نتیجه اعمال روش‌های اصلاح‌نژادی جهت‌دار، جوجه‌های گوشتی علاوه بر تولید گوشت دارای پروتئین‌های با قابلیت هضم بالا و محتوای چربی پایین، از سرعت رشد بیشتری برخوردار شده‌اند (Marangoni *et al.*, 2015). در دو دهه گذشته تولید جهانی گوشت مرغ و بوقلمون دو برابر شده است، به گونه‌ای که در سال ۲۰۲۰ به ۱۲۵/۵ میلیون تن رسیده است (FAO, 2022). این میزان، تقریباً ۳۷ درصد از تولید گوشت جهانی را تشکیل می‌دهد، در حالی که، سهم گوشت مرغ در اوایل دهه ۲۰۰۰ تنها ۲۹ درصد بود. با پیش‌بینی افزایش جمعیت جهانی از ۷/۸ میلیارد به ۹/۹ میلیارد نفر تا سال ۲۰۵۰ و دسترسی بهتر به محصولات دامی در مناطق در حال توسعه، پیش‌بینی می‌شود که تقاضا برای غذاهای مبتنی بر پروتئین حیوانی در همین بازه زمانی تقریباً، ۷۰ درصد افزایش یابد (Searchinger *et al.*, 2019). گزارش شده است که در ایالات متحده آمریکا، تنش گرمایی در صنعت پرورش جوجه‌های گوشتی، به تنهایی منجر به زیان اقتصادی سالانه ۱۲۸ تا ۱۶۵ میلیون دلار می‌شود (Madkour *et al.*, 2022).

سرعت رشد عمدتاً، به معنای فعالیت متابولیکی بیشتر و در نتیجه تولید گرمای بالاتر در بدن است و این امر، اهمیت تدوین راهبردهای اصلاح‌نژادی دقیق و مدیریت مناسب فارم‌های پرورشی را دوچندان می‌سازد (Tona, 2018). جوجه‌های گوشتی، به دلیل سیستم تنظیم‌کننده حرارت (پره‌های پوشیده و فقدان غده عرق) نسبت به دمای بالای ناخواسته محیط، حساس‌تر هستند و افزایش کنونی دمای کره زمین، آن‌ها را به ویژه در برابر تنش گرمایی آسیب‌پذیر می‌کند (He *et al.*, 2018). این تنش، پیامدهای منفی بر مصرف خوراک، بازده خوراک، شاخص توده بدنی، کیفیت و کمیت گوشت و همچنین، میزان مرگ و میر دارد (Livingston *et al.*, 2022). تنش حرارتی (HS<sup>1</sup>)، شرایطی است که در آن جوجه‌های گوشتی نمی‌توانند گرمای اضافی بدن خود را به محیط اطراف منتقل کنند و این امر، منجر به افزایش دمای بدن آن‌ها می‌شود. دمای بهینه (ناحیه حرارتی خنثی) برای بهبود عملکرد و سلامت جوجه‌ها در هفته‌های مختلف شامل C° ۳۲-۳۳ برای هفته اول، C° ۲۸-۳۲ برای هفته دوم، C° ۲۶-۲۸ برای هفته سوم، C° ۲۴-۲۶ برای هفته چهارم، و C° ۲۴-۱۸ برای هفته‌های پنجم و ششم می‌باشد (Cassuce *et al.*, 2013). از آنجائی که، جوجه‌های گوشتی غده‌های عرق ندارند، علاوه بر کاهش فعالیت‌های فیزیکی و رفتاری (کاهش راه رفتن، استراحت، ماندن در مناطق سایه‌دار و حمام گرد و خاک)، چندین فرآیند فیزیولوژیکی مانند سیستم گردش خون، متابولیسم، مسیرهای مرتبط با واکنش به استرس و عملکرد ایمنی در شرایط تنش حرارتی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Renaudeau *et al.*, 2012). به جز عوامل تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی، در سطح سلولی، استرس گرمایی بر چرخه سلولی، سازوکارهای ترمیم DNA، رونویسی، ترجمه، ویرایش پس از ترجمه<sup>۲</sup>، متابولیسم اکسیداتیو<sup>۳</sup>، ساختار و عملکرد غشاء و ناپایداری یا نادرست شدن پروتئین‌ها<sup>۴</sup> نیز تأثیر می‌گذارد (Etches *et al.*, 2008; Ekhtiyari *et al.*, 2023).

در سال‌های اخیر، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تنش گرمایی می‌تواند باعث آپوپتوز سلولی و اختلال در عملکرد و یا آسیب به اعضای بدن شود. علاوه بر این، اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی همچون متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم هیستون، میکروRNAهای (miRNAs) کروماتین و RNAهای غیر کدکننده بلند (LncRNAs) است که با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، و آب و هوا برای تأثیر بر مشخصات بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh *et al.*, 2016). با این وجود، تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد (Amiri Roudbar *et al.*, 2020).

<sup>1</sup> Heat Stress

<sup>2</sup> Post-translational modifications

<sup>3</sup> Oxidative metabolism

<sup>4</sup> unfolding or improper folding of proteins

همچنین، شواهد متعدد حاکی از تأثیر تنوع اپی ژنوم بر سلامت و تولید است. بیان ژن‌های یوکاریوتی به طور موقت و چند بُعدی کنترل می‌شود؛ به گونه‌ای که تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود (Heidarpour *et al.*, 2011; Khabiri *et al.*, 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت خاص است (Safaei *et al.*, 2023). همچنین میزان فرآورده‌های ژنی که در همان بافت و همچنین سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن ژن را تنظیم می‌کند. یکی از فعالیت‌های اساسی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات و بررسی آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Bordbar *et al.*, 2022; Mohammadabadi *et al.*, 2024).

استفاده از RNAهای کدکننده (cRNA) و RNAهای غیر کدکننده (lncRNA) بعنوان یک رویکرد کنترلی جدید و امیدوارکننده برای تنش حرارتی مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است (Liu *et al.*, 2024). اخیراً، گزارش شده است که چندین RNA غیر کدکننده کوتاه و بلند برای مقاومت جوجه‌های گوشتی در برابر تنش گرمایی اهمیت زیادی دارند، زیرا، که با تغییر یا تنظیم سطوح بیان ژن‌های کدکننده پروتئین ارتباط دارند (Safdar & Özslan, 2023). lncRNAها دسته‌ای از ncRNAهای با بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که تقریباً، ۸۰ درصد از RNAهای غیر کدکننده را تشکیل می‌دهند و بطور عمده از رشته آنتی سنس و مناطق بین ژن‌های کدکننده پروتئین رونویسی می‌شوند (Liu *et al.*, 2024). lncRNAها بعنوان بیومارکرهای مولکولی بالقوه برای تشخیص و درمان بیماری و همچنین، بهبود صفات مختلف در طیور، به ویژه در پاسخ به کنترل تنش حرارتی دارای نقش بوده و مورد بررسی قرار می‌گیرند (Liu *et al.*, 2024; Hosseinzadeh and Hasanpur, 2024; Wu *et al.*, 2024). miRNAهای برعکس lncRNAها، کوچک و تک‌رشته‌ای هستند که طول آن‌ها بین ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید است و بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مانند آپوپتوز<sup>۵</sup>، تمایز و تکثیر<sup>۶</sup> را تنظیم می‌کنند (McKenna *et al.*, 2010). miRNAها همچنین، نقش‌های مهمی در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA و یا سرکوب ترجمه ایفا می‌کنند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که miRNAها همچنین برای تنظیم lncRNAها و mRNAها بسیار مهم هستند (Hill & Tran, 2021). بطور کلی، تنش حرارتی می‌تواند تغییراتی در میزان بیان ژن ایجاد کند که بر بیان lncRNAها و miRNAها تأثیر می‌گذارد. lncRNAها و miRNAها می‌توانند به عنوان RNAهای درون‌زا رقابتی (ceRNA) عمل کنند تا با تعدیل شرایط پاتوفیزیولوژیک در ارگانیسم‌های مختلف، بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهند (Ghafouri *et al.*, 2024b). تجزیه و تحلیل شبکه‌های ceRNA یکپارچه lncRNA-miRNA-mRNA بینش‌هایی را در مورد مکانیسم‌های مولکولی پیچیده با در نظر گرفتن تداخل بین RNAهای تنظیمی مختلف در سایر گونه‌ها برای صفات گوناگون ارائه کرده است (Reyhan *et al.*, 2022; Naserkheil *et al.*, 2022; Dehghanian Reyhan *et al.*, 2023; Ghafouri *et al.*, 2023; Ghafouri *et al.*, 2024a).

این مطالعه، اطلاعات را در مورد طیف متنوعی از RNAها و نقش آن‌ها بعنوان ceRNA، با استفاده از پروفایل‌های رونویسی و مرور مطالعات انجام شده برای رسیدگی به سؤالات پژوهشی در مورد آثار عملکردی بیولوژیکی و تنظیمی ژن‌ها، ncRNAها و مسیرهای مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی، ادغام کرده است. رویکردهای مبتنی بر شبکه چند بخشی برهمکنشی که اجزای مختلف رونوشت را ادغام می‌کنند، دیدگاه‌های جدیدی را در مورد تنظیم صفات پیچیده چند ژنی ارائه کرده‌اند (Ghafouri *et al.*, 2024a; Dehghanian Reyhan *et al.*, 2023; Ghafouri *et al.*, 2024a). با این حال، مطالعات کمی بر روی RNAهای غیر کدکننده مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی متمرکز شده‌اند. در این راستا، انجام یک مطالعه جامع با رویکرد یکپارچه‌سازی پروفایل‌های رونویسی، ادبیات کاوی (برای در بر گرفتن یافته‌های مطالعات قبلی)، شبکه‌های نظارتی ceRNA و ماژول‌های آن‌ها

<sup>5</sup> Apoptosis

<sup>6</sup> Proliferation

برای اولین بار مرتبط با دو بافت غده هیپوفیز و قشری مغز ضروری به نظر می‌رسد. در نتیجه، اهداف اصلی در این طرح شناسایی ژن‌ها یا mRNAهای عملکردی دخیل در تنش گرمایی در بافت‌های هیپوفیز و قشر مغز بین دو گروه از جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی و کنترل (تحت شرایط دمایی استاندارد)، شناسایی miRNAها و lncRNAهای کنترل‌کننده و همچنین شناسایی ژن‌های مورد هدف آن‌ها، بازسازی شبکه چند بخشی برهمکنشی مرتبط و شناسایی ماژول‌های عملکردی مرتبط با آن و در نهایت شناسایی مسیرهای متابولیکی و سیگنالینگ درگیر در تنش حرارتی جوجه‌های گوشتی است.

## پیشینه پژوهش

در مطالعات ترانسکریپتومی، نتایج به دست آمده ژن‌ها یا mRNAهایی را شناسایی می‌کنند که به تنش گرمایی پاسخ می‌دهند؛ به گونه‌ای که برخی از آن‌ها مسئول آثار ژنتیکی شناسایی شده در آنالیزهای مطالعات پویس ژنوم (GWAS<sup>7</sup>) هستند و ژن‌های هدف را برای اصلاحات ژنتیکی کلاسیک یا مدرن برای حفظ صفات در مواجهه با تغییرات آب و هوایی معرفی می‌کنند (Pritchett *et al.*, 2023). از آنجائیکه، هیپوتالاموس و هیپوفیز بعنوان اندام‌های مرتبط با سیستم عصبی، تنظیم سیستمیک پاسخ تنش گرمایی را فراهم می‌کنند، Pritchett و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه‌ای به بررسی و تجزیه و تحلیل پاسخ هیپوفیز به تنش گرمایی حاد در سطح ترانسکریپتوم پرداختند؛ به گونه‌ای که، جوجه‌های گوشتی به مدت دو ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تحت تنش حرارتی قرار گرفتند. آن‌ها گزارش کرده‌اند که هیپوفیز جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی از طریق تغییر بیان ژن‌های کدکننده چپرون<sup>8</sup>، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی<sup>9</sup>، سنتز کلاسترول، فاکتورهای رونویسی، همراه با هورمون‌های پپتیدی ترشح شده، به تنش گرمایی واکنش نشان می‌دهد. همچنین، گزارش کردند که تنش حرارتی به طور قابل توجهی رونویسی ژن *SC5D* را افزایش می‌دهد به گونه‌ای که آنزیم کاتالیزکننده مرحله ما قبل آخر در سنتز کلاسترول را کد می‌کند (Pritchett *et al.*, 2023). با حمایت بیشتر از این ایده که تنش گرمایی سطح کلاسترول را افزایش می‌دهد، *DNAJA4* باعث افزایش پایداری و فعالیت پروتئین ردوکتاز HMG-CoA، آنزیم محدودکننده سرعت در سنتز کلاسترول می‌شود (Robichon *et al.*, 2006).

در مطالعه Guerreiro و همکاران (۲۰۰۴) اثر سازگاری حرارتی بر سطوح پروتئین Hsp70<sup>10</sup> مغز و کبد و دمای بدن جوجه‌های گوشتی در پاسخ به تنش گرمایی تدریجی بررسی شد. دو گروه از جوجه‌های گوشتی تا سن ۴۷ روزگی تحت شرایط دمایی مشخص پرورش داده شدند: تعادل حرارتی<sup>11</sup> (دمای استاندارد محیط با توجه به سن پرند) و محیط با دمای بالا (۳۱-۳۳ درجه سانتی‌گراد). در سن ۴۶ روزگی، پرندگانی که در دمای بالای محیط پرورش داده شده بودند، به شرایط دمایی خنثی منتقل شدند. پس از ۱۸ ساعت، هر دو گروه تحت تنش گرمایی تدریجی در یک محفظه قرار گرفتند، به گونه‌ای که دمای محیط از ۲۸ درجه به ۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد در ساعت در حال افزایش بود. دمای کولون با استفاده از یک پروب دماسنج در هر دو ساعت اندازه‌گیری می‌شد. بافت‌های کبد و مغز بلافاصله پس از کشتار جمع‌آوری شدند تا سطح پروتئین Hsp70 توسط آنالیز وسترن بلات<sup>12</sup> ارزیابی شود. دمای کولون پرندگانی که در دمای بالا پرورش یافته بودند در طی ۲ ساعت اول تنش گرمایی (۱/۰۶ درجه سانتی‌گراد در ساعت) و پس از آن به کندی (۰/۵۹ درجه سانتی‌گراد در ساعت) افزایش یافته بود. جوجه‌های گوشتی پرورش داده شده در دمای خنثی افزایش اندکی در ۴ ساعت اول تنش گرمایی (۰/۱۸ درجه سانتی‌گراد در ساعت) نشان دادند و سپس، دمای کولون با سرعت بالاتری افزایش

<sup>7</sup> Genome wide association study

<sup>8</sup> Chaperones

<sup>9</sup> Cell cycle regulators

<sup>10</sup> 70 kDa heat shock protein

<sup>11</sup> Thermonutral

<sup>12</sup> Western blotting analysis

یافت (۰/۷۲) درجه سانتی‌گراد در ساعت). با این وجود، هر دو گروه تا پایان دوره تنش گرمایی، دمای نهایی کولون مشابهی را ارائه کردند. سطوح Hsp70 در اندام کبد یا اندام مغز جوجه‌های گوشتی که در دمای بالا پرورش داده شده بودند، تغییری نکرد. از سوی دیگر، هر دو سطح Hsp70 کبد و مغز بطور قابل توجهی در طول استرس گرمایی در حیواناتی که در شرایط حرارتی خنثی پرورش یافته بودند، با بیان بالاتر این پپتید در بافت مغز افزایش یافت (Guerreiro *et al.*, 2004).

در مطالعه دیگر، Ekhtiyari و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه‌ای با استفاده از پروفایل ترانسکریپتوم سه بافت مغز، کبد و ماهیچه ران دو دسته از جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی و گروه کنترل، در مجموع ۹۴ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار مرتبط با تنش گرمایی را شناسایی و معرفی کردند. سپس، با بررسی حاشیه‌نویسی<sup>۱۳</sup> ژن‌های مربوطه حاصل از آنالیز داده‌ها و مرور منابع ژن‌های هاب کاندیدا شامل<sup>۱۴</sup> NSDHL،<sup>۱۵</sup> DHCR24،<sup>۱۶</sup> LSS،<sup>۱۷</sup> FDPS،<sup>۱۸</sup> PCK1،<sup>۱۹</sup> ACTA1،<sup>۲۰</sup> HSP90AA1،<sup>۲۱</sup> HSPA2،<sup>۲۲</sup> HSPB1،<sup>۲۳</sup> HSF1،<sup>۲۴</sup> CRYAB،<sup>۲۵</sup> APOB و<sup>۲۶</sup> IL6 را معرفی کردند. همچنین، گزارش کردند که ژن‌های معرفی شده در فرآیند اصلی مسیرهای متابولیک و سیگنالینگ مرتبط با سیستم حمل و نقل یونی، بیوسنتز استروئیدها، آنتی‌بادی‌ها و کلاسترول، متابولیسم لیپیدها، عملکرد سیستم ایمنی بدن و همچنین مسیرهای سیگنالی مختلف مانند کیناز MAP، RET و ERK نقش دارند (Ekhtiyari *et al.*, 2023).

## روش‌شناسی پژوهش

در ابتدا، با توجه به هدف از پیش تعیین شده در رابطه با این مطالعه و همچنین انتخاب بافت‌های مورد نظر (قشر مغز و هیپوفیز)، با جستجو در دو پایگاه داده GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) و Array Express ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) برای پیدا کردن کدهای دسترسی مرتبط با تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی، در نهایت دو کد دسترسی شناسایی گردید که اطلاعات کلی این کدهای دسترسی مطابق جدول (۱) است.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به کد دسترسی GEO برای مجموعه داده‌های RNA-Seq و ریزآرایه

ردیف	کد دسترسی	نوع داده	نژاد	تعداد نمونه (کنترل/تنش گرمایی)	جنس	بافت	Contributor(s)
۱	GSE23592	Microarray	تجاری گوشتی	۶ (۳/۳)	نر	قشر مغز	Song <i>et al.</i> , 2012
۲	GSE89297	RNA-Seq	راس ۷۰۸	۱۰۰ (۴۸/۵۲)	نر	هیپوفیز	Pritchett <i>et al.</i> , 2023

## تجزیه و تحلیل مربوط به داده‌های RNA-Seq

آنالیز پروفایل ترانسکریپتوم داده‌ها و شناسایی الگوهای بیان افتراقی ژن در بافت‌های مرتبط می‌تواند در کشف سازوکارهای مولکولی مقاوم به تنش حرارتی نقش داشته باشد. در مورد داده‌های RNA-Seq، کیفیت داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC (v0.11.9) مورد ارزیابی قرار گرفتند (Andrews, 2010). سپس، بر اساس نتایج کنترل کیفیت داده‌های خام، توالی‌ها برای حذف آداپتورها،

<sup>13</sup> Ontology

<sup>14</sup> NAD(P) Dependent Steroid Dehydrogenase-like

<sup>15</sup> Dehydrocholesterol Reductase

<sup>16</sup> Lanosterol Synthase

<sup>17</sup> Farnesyl Diphosphate Synthase

<sup>18</sup> Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1

<sup>19</sup> Actin Alpha 1, Skeletal Muscle

<sup>20</sup> Heat Shock Transcription Factor

<sup>21</sup> Crystallin Alpha B

<sup>22</sup> Apolipoprotein B

<sup>23</sup> Interleukin 6

پرایمرهای PCR<sup>۲۴</sup> و خوانش‌های با کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (v0.38.0) ویرایش شدند (Bolger *et al.*, 2014). هم‌ردیف کردن توالی‌ها و نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 (v2.1.0) انجام شد (Kim *et al.*, 2015). برای کمی‌سازی رونوشت‌ها، از نرم‌افزار featureCounts (v2.0.1) جهت اندازه‌گیری تعداد کل خام خوانش‌های نقشه‌یابی شده استفاده شد (Liao *et al.*, 2014). سپس از نرم‌افزار DESeq2 (v2.11.40.6) برای اندازه‌گیری میزان تغییرات نهایی معنی‌دار در بیان ژن‌ها استفاده گردید (Love *et al.*, 2014).

### تجزیه و تحلیل مربوط به داده‌های خام ریز آرایه

در ابتدا مجموعه داده ریز آرایه با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری Lumi (Du *et al.*, 2008) و Affy (Gautier *et al.*, 2004) در نرم‌افزار R پیش پردازش شدند. بدین منظور، برای تصحیح پس زمینه، نرمال‌سازی و خلاصه‌سازی داده‌ها از روش Quantile استفاده شد (Zhao *et al.*, 2020). در ادامه داده‌های پردازش شده با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری Limma (Ritchie *et al.*, 2015) و GEOquery (Davis & Meltzer, 2007)، Biobase (Huber *et al.*, 2015) و umap (McInnes *et al.*, 2018) ارزیابی شدند.

### مرور منابع برای شناسایی miRNAها و lncRNAهای کاندیدا مربوط به تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی

برای شناسایی miRNAها و lncRNAهای مرتبط با استرس گرمایی در جوجه‌های گوشتی، از دو پایگاه داده آنلاین (برخط) شامل Google Scholar و PubMed استفاده گردید. در مجموع، پس از بررسی مقالات علمی- پژوهشی بین‌المللی مرتبط، ۱۱ miRNA و ۲ lncRNA جهت شناسایی آثار متقابل و تنظیمی آن‌ها روی ژن‌ها/mRNAهای شناسایی شده و همچنین، بازسازی شبکه چند بخشی برهمکنشی و ماژول‌های مرتبط استخراج شدند (جدول ۲).

جدول ۲. miRNAها و lncRNAهای کاندیدا مربوط به تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی حاصل از گزارش‌های منتشر شده

Non-Coding RNAs	Name	Reference
miRNA	gga-miR-22	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-30a-5p	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-146a	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-155	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-let-7f	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-181a	Safdar & Özaslan, 2023
	gga-miR-6607-5p	Hosseinzadeh & Hasanpur, 2024
	gga-miR-2127	Hosseinzadeh & Hasanpur, 2024
	gga-miR-1754-3p	Hosseinzadeh & Hasanpur, 2024
	gga-miR-6593-5p	Hosseinzadeh & Hasanpur, 2024
	gga-miR-1770	Hosseinzadeh & Hasanpur, 2024
LncRNA	ENSGALG00000037064	Pritchett <i>et al.</i> , 2023
	ENSGALG00000050713	Pritchett <i>et al.</i> , 2023

### هستی‌شناسی ژن (GO<sup>۲۵</sup>) و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌ها

برای هستی‌شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی آن‌ها از وبسایت‌های آنلاین همچون DAVID (https://david.ncifcrf.gov/)، GeneCards (www.genecards.org) و پایگاه داده STRING<sup>۲۶</sup> (https://string-db.org) استفاده شد. این وبسایت‌ها ابزارها و نرم‌افزارهای جامعی هستند که به کشف فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی، اجزای

<sup>24</sup> Polymerase Chain Reaction

<sup>25</sup> Gene ontology

<sup>26</sup> Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins



سلولی و همچنین مسیرهای سیگنالی در دایره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (KEGG<sup>27</sup>) مجموعه ژن استخراج شده کمک می‌کنند. همچنین، برای شناسایی ارتباط ژن‌های هدف شناسایی شده و انواع RNAهای غیرکدکننده مانند miRNAها و lncRNAها از وبسایت‌های آنلاین STRING (https://string-db.org)، miRBase (https://www.mirbase.org)، miRWalk (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de) و LNCipedia (https://lncipedia.org) استفاده شد.

### ترسیم و بازسازی شبکه‌های مختلف ژنی

پس از شناسایی تعاملات بین پروتئینی و داده‌های هم بیان ژنی<sup>28</sup> و تجزیه و تحلیل شبکه تنظیم‌کننده ژن (GRN) برای ترسیم شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین (PPI) از پایگاه داده آنلاین STRING (Szkarczyk *et al.*, 2019) برای یافتن تعاملات بین ژنی در گونه مرغ اهلی *Gallus gallus* استفاده شد. سپس، شبکه تنظیمی lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA مستند از مقالات مرتبط و پایگاه‌های اطلاعاتی برهمکنش‌های lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA و miRNA-mRNA مستند از مقالات مرتبط و پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین بازسازی شد. در ادامه، با استفاده از پلاگین MCODE که زیر مجموعه نرم‌افزار Cytoscape است، برای شناسایی ماژول‌های عملکردی و گره‌های هاب در شبکه تنظیمی lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA استفاده شد. پلاگین MCODE می‌تواند ماژول‌ها را در شبکه‌های جهت‌دار یا غیر جهت‌دار شناسایی کند (Nepusz *et al.*, 2012). علاوه بر این، غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی و سیگنالی در شبکه و زیرشبکه‌های تنظیمی ceRNA با استفاده از وبسایت‌های آنلاین STRING، DAVID و PANTHER انجام شد.

### یافته‌های پژوهش و بحث

#### تجزیه داده‌های RNA-Seq و ریزآرایه

با استفاده از پردازش پروفایل بیانی بافت‌های هیپوفیز و قشر مغز برای دو گروه از جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی و کنترل، در مجموع 30108 ژن معنی‌دار برای داده‌های RNA-Seq و 884 ژن معنی‌دار برای داده‌های ریزآرایه شناسایی شد و در نهایت پس از در نظر گرفتن حد آستانه تغییر بیان ( $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$  and  $\text{FDR} \leq 0.05$ ) به ترتیب تعداد 613 و 13940 رونوشت دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو گروه جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی و کنترل برای کدهای دسترسی GSE23592 (داده‌های ریزآرایه) و GSE89297 (داده‌های RNA-Seq) شناسایی و استخراج شد. در نهایت، برای شناسایی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو بافت هیپوفیز و قشر مغز، نمودار ون برای رونوشت‌های شناسایی شده مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی رسم گردید که نشان‌دهنده وجود 426 رونوشت مشترک بین دو بافت است (شکل ۱).

شکل ۱. نمودار ون رونوشت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شده مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی

#### ترسیم شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های هاب

شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده آنلاین STRING ترسیم شد. این شبکه برهمکنش بین پروتئین‌ها (mRNAها) را بر اساس عملکردهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد. شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین ترسیم شده شامل 286 گره (mRNA) و 559 یال بود که نشان‌دهنده تعامل بین گره‌ها بود. علاوه بر این، mRNAها/ژن‌های هاب بر اساس تعاملات بیشتر در

<sup>27</sup> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

<sup>28</sup> Co-Expression

این شبکه شامل *DNAJB4*, *DNAJA4*, *DNAJA1*, *ALB*, *AHSA2*, *HYOU1*, *HSPA4*, *HSP90B1*, *HSPA5*, *HSP90AA1*, *HSPH1* و *HSPA4L* بودند که میزان بیان آن‌ها در زمان بروز تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی نسبت به شرایط دمایی استاندارد به صورت افزایشی تغییر می‌کند و نقش قابل توجهی در بروز این صفت برعهده دارند. اطلاعات جامع مرتبط با ژن‌های هاب شناسایی شده بین دو بافت هیپوفیز و قشر مغز در شرایط تنش گرمایی در جدول ۳ ذکر شده است.

جدول ۳. مشخصات ژن‌های هاب مشترک بین دو فهرست ژنی بافت هیپوفیز و قشر مغز در شرایط استرس گرمایی

Gene	Annotation	Chromosome	Tissue	Log2(FC)	Down/Up Regulation (logFC)	P_value	q_value
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	3	Pituitary gland	1.8207	UP	2.40E-31	1.55E-28
			Cerebral cortex	0.9703	UP	7.34E-05	0.0288
ALB	Albumin	4	Pituitary gland	-0.9969	Down	0.0021	0.0057
			Cerebral cortex	5.2071	UP	3.10E-04	0.0389
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	Z	Pituitary gland	0.7414	UP	4.72E-10	3.74E-08
			Cerebral cortex	0.8364	UP	1.14E-03	0.0498
DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	10	Pituitary gland	1.1848	UP	6.04E-10	4.57E-08
			Cerebral cortex	1.8751	UP	2.05E-07	0.0025
DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	8	Pituitary gland	0.5254	UP	8.94E-08	7.82E-07
			Cerebral cortex	1.3225	UP	6.20E-06	0.0141
HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	5	Pituitary gland	1.1348	UP	1.39E-14	2.68E-12
			Cerebral cortex	1.1781	UP	3.31E-05	0.0245
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1	Pituitary gland	1.0212	UP	3.67E-09	2.23E-07
			Cerebral cortex	1.4743	UP	1.02E-05	0.0171
HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	13	Pituitary gland	0.8781	UP	2.39E-16	9.84E-15
			Cerebral cortex	0.9961	UP	2.43E-05	0.0228
HSPA4L	Heat shock 70kDa protein 4-like	4	Pituitary gland	0.6539	UP	4.35E-09	2.55E-07
			Cerebral cortex	1.5242	UP	1.31E-06	0.0051
HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	17	Pituitary gland	1.5838	UP	8.09E-14	1.39E-11
			Cerebral cortex	1.0836	UP	1.79E-05	0.0209
HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	1	Pituitary gland	1.0231	UP	3.27E-09	2.04E-07
			Cerebral cortex	1.4334	UP	1.74E-05	0.0209
HYOU1	Hypoxia up-regulated 1	24	Pituitary gland	0.5109	UP	8.68E-06	0.0002
			Cerebral cortex	0.6265	UP	2.00E-04	0.0367

تجزیه و تحلیل حاشیه‌نویسی mRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار



تجزیه و تحلیل عملکردهای متابولیکی بر اساس فرآیند بیولوژیکی (BP<sup>29</sup>)، عملکرد مولکولی (MF<sup>30</sup>) و اجزاء سلولی (CC<sup>31</sup>) بر روی فهرست ژنی مشترک دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو بافت هیپوفیز و قشر مغز انجام شد. در مجموع، ۸ مسیر برای فرآیند بیولوژیکی شناسایی شد که شامل تاشدن پروتئین<sup>32</sup>، فرآیند سلولی<sup>33</sup>، پردازش mRNA<sup>34</sup>، سازماندهی اجزاء سلولی<sup>35</sup>، فرآیند متابولیکی ماکرومولکول<sup>36</sup>، فرآیند متابولیک mRNA، تاشدن پروتئین بوسیلهٔ چپرون<sup>37</sup> و سازماندهی یا بیورژن اجزاء سلولی<sup>38</sup> می‌باشند. علاوه بر این، mRNAهای شناسایی شده در ۷ مسیر عملکردی مولکولی مهم دسته‌بندی شدند که شامل اتصال<sup>39</sup>، چپرون تاشدن پروتئین<sup>40</sup>، اتصال پروتئین غیرتا شده<sup>41</sup>، اتصال چپرون<sup>42</sup>، چپرون تاشدن پروتئین وابسته به ATP<sup>43</sup>، اتصال پروتئین<sup>44</sup> و اتصال پروتئین شوک حرارتی<sup>45</sup> بودند. همچنین در رابطه با اجزاء سلولی، ۲۷ مسیر معنی‌دار شناسایی شد که مهم‌ترین آن‌ها براساس کد شدن توسط ژن‌های معرفی شده شامل ساختار آناتومیکی درون سلولی<sup>46</sup>، سیتوپلاسم، اندامک درون سلولی<sup>47</sup>، موجودیت آناتومیکی سلولی<sup>48</sup>، پروژکشن نورونی<sup>49</sup>، کمپلکس حاوی پروتئین<sup>50</sup>، لومن شبکه آندوپلاسمی<sup>51</sup>، ملانوزوم<sup>52</sup>، اندامک درون سلولی محصور در غشاء<sup>53</sup>، اندامک محصور در غشاء، کمپلکس چپرون شبکه آندوپلاسمی<sup>54</sup>، پروژکشن سلولی محصور در غشای پلاسمایی<sup>55</sup>، وزیکول<sup>56</sup>، پروژکشن سلول<sup>57</sup>، آکسون<sup>58</sup>، لومن اندامک درون سلولی<sup>59</sup> و وزیکول سیتوپلاسمی<sup>60</sup> هستند (شکل ۲). براساس تجزیه و تحلیل مسیرهای مرتبط با KEGG با استفاده از فهرست mRNA مشترک استخراج شده بین دو بافت، ۲ مسیر سیگنالی معنی‌دار شناسایی شد که شامل مسیرهای پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و مولکول‌های چسبندگی سلولی بودند.

در این مطالعه، مسیرهای متابولیکی که در گروه‌های مختلف شامل فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزاء سلولی دسته‌بندی شده بودند، می‌توان گفت که بیشتر ژن‌های هاب شناسایی شده مانند *HSPA5*، *AHSA2*، *HYOU1*، *HSP90AA1* و *DNAJA1* در

<sup>29</sup> Biological Process

<sup>30</sup> Molecular Function

<sup>31</sup> Cellular Component

<sup>32</sup> Protein folding

<sup>33</sup> Cellular process

<sup>34</sup> mRNA processing

<sup>35</sup> Cellular component organization

<sup>36</sup> Macromolecule metabolic process

<sup>37</sup> Chaperone-mediated protein folding

<sup>38</sup> Cellular component organization or biogenesis

<sup>39</sup> Binding

<sup>40</sup> Protein folding chaperone

<sup>41</sup> Unfolded protein binding

<sup>42</sup> Chaperone binding

<sup>43</sup> ATP-dependent protein folding chaperone

<sup>44</sup> Protein binding

<sup>45</sup> Heat shock protein binding

<sup>46</sup> Intracellular anatomical structure

<sup>47</sup> Intracellular organelle

<sup>48</sup> Cellular anatomical entity

<sup>49</sup> Neuron projection

<sup>50</sup> Protein-containing complex

<sup>51</sup> Endoplasmic reticulum lumen

<sup>52</sup> Melanosome

<sup>53</sup> Intracellular membrane-bounded organelle

<sup>54</sup> Endoplasmic reticulum chaperone complex

<sup>55</sup> Plasma membrane bounded cell projection

<sup>56</sup> Vesicle

<sup>57</sup> Cell projection

<sup>58</sup> Axon

<sup>59</sup> Intracellular organelle lumen

<sup>60</sup> Cytoplasmic vesicle

ناشدن پروتئین نقش دارند و ژن‌های *HSPA5*، *DNAJB4* و *HSPH1* در مسیرهای مرتبط با فعالیت چپرون نقش دارند. از طرفی، تمام ژن‌های هاب شناسایی شده در مسیرهای مرتبط با فرآیند سلولی کد شده بودند. Lin و همکاران در سال ۲۰۲۴ سه ژن *HSPH1*، *DNAJ1* و *HSP90AA1* را به عنوان ژن‌های مؤثر در تنش گرمایی جوجه‌های گوشتی معرفی کرده‌اند. در این راستا، ژن *DNAJ1* متعلق به خانواده DNAJ/HSP40 است و یکی از فراوان‌ترین کو-چاپرون‌های<sup>۶۱</sup> *HSPA8* می‌باشد (Baaklini et al., 2012). Li و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند که میزان بیان ژن *DNAJ1* در سطوح مختلف تحت تنش حرارتی حاد و مزمن تغییر می‌کند و نقش بالقوه‌ای در مقاومت به تنش حرارتی نشان داده است. ژن *AHSA2* بعنوان یک فعال‌کننده ATPase و تحریک‌کننده رایج پروتئین HSP90 شناخته شده است (Sun et al., 2012) و ممکن است نقش تنظیمی در واکنش‌های تنش مرتبط با گرما داشته باشد و با نام *AHA1* نیز شناخته می‌شود. *AHSA1* و *AHSA2* پروتئین‌های تنظیم‌کننده تنش هستند که به خانواده AHA (یعنی عامل فعال‌کننده Hsp90 ATPase) تعلق دارند؛ این پروتئین‌ها به طور مستقیم به Hsp90 متصل می‌شوند و برای فعال‌سازی پروتئین‌های وابسته به Hsp90 ضروری هستند (Holmes et al., 2008). Hsp90 یک پروتئین چپرون است که به تاخوردگی صحیح سایر پروتئین‌ها کمک کرده و پروتئین‌ها را در طی تنش گرمایی پایدار می‌سازد؛ بنابراین، این پروتئین نقش مهمی در کاهش آسیب‌های ناشی از حرارت و افزایش مقاومت به گرما ایفا می‌کند. از این رو، می‌توان ژن *AHSA2* را بعنوان ژن‌های کاندیدایی که نقش مهمی در مقاومت به تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی دارند، معرفی کرد (Cheng et al., 2020).

در بخش عملکرد مولکولی نیز ژن‌های *AHSA2*، *DNAJB4*، *DNAJA4*، *HSP90AA1* و *DNAJ1* در مسیر اتصال چاپرون درگیر هستند. از طرفی، ژن‌های *HSPA5*، *AHSA2*، *DNAJA4*، *HSP90AA1* و *DNAJ1* نیز در اتصال پروتئین شوک حرارتی نقش دارند و در تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی مؤثر هستند. Barreto Sánchez و همکاران (۲۰۲۲)، *HSP90B1* و *HSPA5* را به عنوان ژن‌های کاندید مرتبط با تنش حرارتی شناسایی و معرفی کردند. ژن *HSP90B1* یک پروتئین *HSP90* است که در شبکه آندوپلاسمی یافت می‌شود (Chen et al., 2005). پروتئین‌های *HSP90* خانواده‌ای از چاپرون‌های مولکولی بسیار محافظت‌شده هستند که نقش‌های حیاتی در انتقال سیگنال، تاشدن پروتئین‌ها، تخریب<sup>۶۲</sup> و تکامل مورفولوژیکی<sup>۶۳</sup> ایفا می‌کنند. پروتئین‌های *HSP90* معمولاً همراه با سایر پروتئین‌های تازه تولید شده هستند و پایداری و تاشدن مجدد پروتئین‌های دناتوره شده پس از استرس را تسهیل می‌کنند. *HSP90B1*، *HSPA5* و *HYOU1* پروتئین‌های چپرونی هستند که در تنظیم تاشدن پروتئین‌ها نقش دارند. *HSP90B1* در *HSPA5* در فعالیت‌های شبکه آندوپلاسمی مرتبط در زمان استرس نقش دارند. *HSP90B1* کلسیم را متصل کرده و متابولیسم ATP را انجام می‌دهد، در حالی که *HSPA5* تحت تأثیر سطح گلوکز قرار دارد. علاوه بر این، *HSPA5* در نظارت بر انتقال پروتئین‌ها درون سلول نقش داشته و از طرفی دیگر، ژن *HYOU1* نیز تحت تأثیر گلوکز قرار گرفته و افزایش بیان آن در کاهش آپوپتوز نقش دارد. همچنین، ژن *HSP90B1* در تنظیم فعالیت‌های مرتبط با توسعه هیپوتالاموس نقش دارد که روی فعالیت‌های عضلانی اسکلتی مؤثر است و فعالیت آن با فعالیت چپرون ایمنی که تنظیم‌کننده ایمنی ذاتی و اکتسابی است، مرتبط می‌باشد (Dou et al., 2017).

از میان مسیرهای مرتبط با اجزاء سلولی، در کمپلکس چپرون شبکه آندوپلاسمی، ژن‌های *HSPA5*، *HSP90B1* و *HYOU1* درگیر هستند. این در حالی است که در بخش‌های مرتبط با ساختار آناتومیکی درون سلولی و سیتوپلاسم تمام ژن‌های هاب معرفی شده مؤثر هستند. پروتئین *HSPA5* یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (*Hsp70*) است که در لومن شبکه آندوپلاسمی قرار دارد و بعنوان یک چپرون معمولی *HSP70* عمل کرده و به تاشدن و مونتاژ پروتئین‌ها در داخل شبکه آندوپلاسمی کمک کرده و بعنوان

<sup>61</sup> Co-chaperones

<sup>62</sup> Degradation

<sup>63</sup> Morphological evolution

یک تنظیم‌کننده اصلی هموستاز شبکه آندوپلاسمی است. *HSPA5* با پروتئین‌های حسگر تنش غشایی تعامل دارد. این پروتئین که با نام پروتئین تنظیم‌شده توسط گلوکز ۷۸ (*GRP78*<sup>64</sup>) نیز شناخته می‌شود، یکی از اجزای کلیدی مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی است که در انتهای فرآیند ماکروآتوفاژی تحت شرایط استرس عمل می‌کند (Barreto Sánchez *et al.*, 2022).

در مسیر سیگنالی کد شده برای مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، ۱۳ ژن درگیر بودند که در میان آن‌ها ژن‌های *HSPA5*، *HSPA4L*، *HSPA4*، *HSPH1*، *HSP90B1*، *HYOU1*، *HSP90AA1* و *DNAJA1* کد شده‌اند و در تمامی مراحل مسیر همچون انتقال پروتئین، تا شدن، اصلاح و تخریب پروتئین نقش دارند. در مسیر مولکول‌های چسبندگی سلولی نیز ۹ ژن درگیر بودند که ژن *HSPA4* به عنوان یکی از ژن‌های هاب معرفی می‌شود. این ژن نیز عضوی از خانواده HSP110 است و بعنوان یک عامل تبادل نوکلئوتید برای چپرون‌های HSP70 عمل می‌کند (Mohamed *et al.*, 2012). در مطالعه Kubota و همکاران نیز در سال ۲۰۲۳، سطح بیان ژن‌های *HSPA4*، *HSPA4L*، *HSPA5*، *HSP90AA1*، *HSP90B1* و *HSPH1* در بافت‌های ناحیه اتصالی رحم به واژن (UVJ)<sup>65</sup> مرغ‌های تخم‌گذار تحت استرس حرارتی افزایش یافته بود.

شکل ۲. مسیرهای متابولیکی و سیگنالی شامل فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و جزاء سلولی شناسایی شده با استفاده از فهرست mRNA/ژن‌های مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی. اعداد نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با هر مسیر است.

#### بازسازی شبکه تنظیمی درون‌زای رقابتی lncRNA-miRNA-mRNA

شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده آنالین STRING ترسیم شد که تعاملات بین پروتئین‌ها (mRNA) را براساس عملکردهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد. همچنین، ۱۲ mRNA/ژن هاب بر اساس میزان آثار متقابل گرہ‌ها در این شبکه شناسایی و معرفی شدند. برای درک چگونگی تنظیم بیان ژن توسط lncRNAها (مانند lncRNAها) از طریق هدف‌گیری miRNAها و mRNAهای پیام‌رسان، با استفاده از اطلاعات استخراج شده از پایگاه داده آنالین STRING و سایر مقالات مرتبط از طریق مرور منابع، شبکه تنظیمی ceRNA lncRNA-miRNA-mRNA بازسازی شد که تعاملات تنظیمی بین مولکول‌های RNA را ادغام می‌کند. این شبکه تنظیمی شامل ۲۹۷ گرہ و ۷۶۰ یال بود. ۲۹۷ گرہ شامل ۲ lncRNA، ۱۱ miRNA و ۲۸۴ mRNA بود. با توجه آثار متقابل بین RNAهای درگیر در شبکه، miRNAهای *gga-miR-2127*، *gga-miR-6593-5p*، *miR-181a*، *miR-22* و *miR-let-7f* به عنوان miRNAهای هاب شناسایی و معرفی شدند (شکل ۳).

شکل ۳. شبکه تنظیمی ceRNA شامل ۲ lncRNA، ۱۱ miRNA و ۲۸۴ mRNA است. گرہ‌های هشت ضلعی نمایانگر lncRNAها، گرہ‌های مثلثی نشان‌دهنده miRNAها و گرہ‌های مستطیلی نشان‌دهنده mRNAها/ژن‌ها هستند. لبه‌های سیاه نشان‌دهنده آثار متقابل بین گرہ‌ها می‌باشد.

#### تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی ماژول‌های تنظیمی درون‌زای رقابتی lncRNA-miRNA-mRNA

پس از بازسازی شبکه تنظیمی ceRNA، از افزونه MCODE در نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳،۱۰،۳) برای تجزیه و تحلیل ماژول‌بندی آن استفاده شد. در مجموع، ۴ ماژول بازسازی گردید. ماژول‌های ۱ تا ۴ به ترتیب دارای ۹۶، ۸۷، ۵۸ و ۴۸ گرہ و ۳۰۳، ۱۵۵، ۲۰۴ و ۸۳ لبه بودند.

<sup>64</sup> Glucose-regulated protein 78

<sup>65</sup> Uterovaginal junction

در میان ماژول‌ها، ماژول ۱ شامل تمام ژن‌های هاب شناسایی شده بود؛ بنابراین این ماژول بعنوان مهم‌ترین ماژول در نظر گرفته شد. در این ماژول، ۴ miRNA شامل gga-miR-1770 و gga-miR-1754-3p، gga-miR-2127 و amiR-6607-5p درگیر بودند که در میان آن‌ها miR-2127 هاب بود و با ژن‌های *COMMD3*، *BCAR1*، *GNG13* و *NRXN1* در ارتباط بود. ژن *COMMD3* در سیتوپلاسم و اندامک درون سلولی محصور در غشاء حضور دارد. از طرفی ژن *BCAR1* نیز در فرآیند سلولی، سازماندهی یا بیوژنر اجزاء سلولی، اتصال پروتئین و اسکلت سلولی نقش دارد. ژن *GNG13* نیز در فرآیند سلولی و اتصال پروتئین دخالت دارد و در نهایت در این دسته، ژن *NRXN1* نیز در سازماندهی یا بیوژنر اجزاء سلولی، اتصال پروتئین، لومن اندامک درون سلولی و وزیکول حضور دارد. در ماژول‌های ۱ و ۳، هر دو lncRNA ENSGALG00000037064 و ENSGALG00000050713 درگیر بودند که lncRNA ENSGALG00000037064 با چهار ژن *HSP90AA1*، *DNAJA4*، *BAG3* و *CHORDC1* درگیر بود. ژن *BAG3* بعنوان یک کوچپرون برای پروتئین‌های چپرون *HSP70* و *HSC70* عمل می‌کند. این ژن همچنین بعنوان یک عامل تبادل نوکلئوتید (NEF<sup>66</sup>) عمل کرده و آزادسازی ADP از پروتئین‌های *HSP70* و *HSC70* را تحریک می‌کند و به این ترتیب آغازگر آزادسازی پروتئین‌های سوستر می‌شود (Rauch et al., 2016). ژن *CHORDC* نیز در تا شدن پروتئین به وسیله چپرون، بیوژنر سلولی و اتصال پروتئین شوک حرارتی مؤثر است. ENSGALG00000050713 lncRNA نیز با هر ژن‌های هاب *HSPA5*، *HSPA4L* و *DNAJA1* در ارتباط بود. ژن *HSP90AA1* ایزوفورم القایی استرس پروتئین *HSP90* است که نقش حیاتی در پاسخ به تنش سلولی ایفا می‌کند و بعنوان نشانگر کلاسیک تنش حرارتی شناخته می‌شود (Hu et al., 2024). گزارش شده است که ژن *HSP90AA1* نقش حفاظتی قابل توجهی در کاردیومیوسیت‌های اولیه جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی دارد (Yao et al., 2023). علاوه بر این، Chen و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که افزایش مقاومت سلولی به آسیب‌های ناشی از استرس حرارتی ممکن است با انتقال هسته‌ای<sup>67</sup> *HSP90AA1* مرتبط باشد. در مطالعه‌ای دیگر، تحلیل LFQP<sup>68</sup> افزایش قابل توجهی در بیان *HSP90AA1* در گروه تحت تنش حرارتی را نشان داد که با نتایج وسترن بلات مطابقت داشت. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی<sup>69</sup> و امتیازدهی، سیگنال‌های مثبت تقویت شده *HSP90AA1* در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های قشر آدرنال و همچنین، سلول‌های کرومافین در گروه تحت تنش حرارتی نشان داد که میزان بیان آن با پیشرفت استرس حرارتی سیگنال هسته‌ای در گروه تحت تنش حرارتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد (Lin et al., 2024).

ژن *HSPA5* (که بعنوان GRP78<sup>70</sup> نیز شناخته می‌شود) در سیستم ایمنی نقش دارد و همچنین، نشان داده است که *GRP78* التهاب و پاسخ‌های ایمنی را از طریق چندین مکانیزم تنظیم می‌کند (Li & Li, 2012) و بعنوان یک مولکول چپرون اصلی در شبکه آندوپلاسمی، *GRP78* فرآوری و ترشح شیمیوکاین‌ها<sup>71</sup> و سیتوکین‌ها<sup>72</sup> را در سلول‌های پستانداران تسهیل می‌کند (Hori et al., 1996). *GRP78* همچنین، بعنوان یک شریک ضروری برای MHC-I<sup>73</sup> سطح سلولی عمل می‌کند (Triantafilou et al., 2001). با استفاده از تجزیه و تحلیل RNA-Seq بر روی جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی، گزارش شده است که ژن *HSPA5* نقش مهمی در فعال‌سازی سلول‌های ایمنی ایفا می‌کند. با این حال، یک مطالعه دیگر که واکنش *GRP78* به تنش حرارتی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) را بررسی کرده است، نشان داد که میزان بیان *GRP78* در قلب، کبد، مغز و عضلات پاهای مرغ ابتدا افزایش یافته (در ۳ ساعت

<sup>66</sup> Nucleotide exchange factor

<sup>67</sup> Nuclear translocation

<sup>68</sup> Label-Free Quantitative Proteomics

<sup>69</sup> Immunohistochemical staining

<sup>70</sup> Glucose-regulated protein 78

<sup>71</sup> chemokine

<sup>72</sup> cytokine

<sup>73</sup> Major histocompatibility complex class I

اوج می‌گیرد) و سپس کاهش می‌یابد. همچنین گزارش شده است که این پروتئین در پاسخ ایمنی پرندگان نیز نقش دارد (Kong *et al.*, 2015). این مطالعه نشان داد که افزایش بیان داخل سلولی ژن *HSPA5* تأثیری مستقیم بر بیان افتراقی ژن‌های ارائه‌دهنده آنتی ژن ندارد، اما، شناسایی  $LPS^{۷۴}$  توسط  $HD11^{۷۵}$  را تسریع و تقویت کرده است. در نتیجه *HSPA5* می‌تواند شناسایی  $LPS$  توسط  $HD11$  را مهار کند (بیان MHC-II را مهار کند). Lu و همکاران در سال ۲۰۲۳ ژن‌های *HSPA5*، *HSPA4L*، *HSPH1* و *HSP90AA1* و *HSP90B1* را بعنوان ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار مرتبط با تنش حرارتی در جوجه‌های گوشتی شناسایی و معرفی کردند که در مسیر شبکه اندوپلاسمی دخیل هستند (شکل ۴).

شکل ۴. ماژول ۱: در بازسازی این ماژول ۲ *dncRNA*، ۴ *miRNA* و ۹۰ *mRNA* دخالت دارند. گره‌های هشت ضلعی نشان‌دهنده *lncRNA*ها، گره‌های مثلثی نشان‌دهنده *miRNA*ها و گره‌های چهارضلعی نشان‌دهنده *mRNA*ها/ژن‌ها هستند. لبه‌ها آثار متقابل را نشان می‌دهند؛ لبه‌های سیاه نشان‌دهنده آثار متقابل *mRNA-mRNA* لبه‌های سبز نشان‌دهنده آثار متقابل *lncRNA-mRNA* و لبه‌های قرمز نشان‌دهنده آثار متقابل *miRNA-mRNA* هستند.

در ماژول ۲ نیز *miRNA*های *amiR-146a*، *amiR-6607-5p*، *gga-miR-1770* و *gga-miR-1754-3p* درگیر بودند که در میان آن‌ها دو *miRNA* *gga-miR-6593-5p* و *gga-miR-2127* به عنوان رونوشت‌های هاب معرفی می‌شوند. این دو *miRNA* به طور مشترک با ژن‌های *MMP15*، *DOCK3*، *BCAR1*، *GNAQ*، *STXBP5* و *MAP1B* در ارتباط هستند. ژن *MMP15* در فرآیند متابولیسمی ماکرومولکول و سازماندهی یا بیورژنر اجزاء سلولی مؤثر است. ژن *DOCK3* نیز در اتصال پروتئین، ساختار آناتومیکی درون سلولی نقش دارد. از طرفی، ژن *GNAQ* نیز در اتصال پروتئین مؤثر است و ژن *MAP1B* در اسکلت سلولی نقش ایفا می‌کند. این ژن‌ها به طور مشترک در آناتومی سلولی، فرآیند سلولی و اتصالات کد می‌شوند. در این ماژول، ژن *LUC7L3* با *miRNA* ۲ و ۶ ژن بیشترین یال را دارد که در پردازش متابولیسمی *mRNA*، کمپلکس حاوی پروتئین و اندامک درون سلولی محصور در غشاء نقش دارد (شکل ۵).

شکل ۵. ماژول ۲: در بازسازی این ماژول ۶ *miRNA* و ۸۱ *mRNA* دخالت دارند. گره‌های مثلثی نشان‌دهنده *miRNA*ها و گره‌های چهارضلعی نشان‌دهنده *mRNA*ها/ژن‌ها هستند. لبه‌ها آثار متقابل را نشان می‌دهند؛ لبه‌های سیاه نشان‌دهنده آثار متقابل *mRNA-mRNA* و لبه‌های قرمز نشان‌دهنده آثار متقابل *miRNA-mRNA* هستند.

در ماژول ۳، تمام ژن‌های هاب معرفی شده در این مطالعه درگیر هستند. ژن *DNAJA4* پایداری و فعالیت پروتئین HMG-CoA ردوکتاز، آنزیم محدودکننده سرعت در سنتز کلسترول را افزایش می‌دهد و متابولیسم کلسترول و سنتز اکسیژن واکنشی<sup>۷۶</sup> را تنظیم می‌کند و با افزایش سطح پروتئین HMGCR<sup>۷۷</sup> بر متابولیسم کلسترول تأثیر می‌گذارد (Robichon *et al.*, 2006). پیامد تنش حرارتی در غده هیپوفیز، افزایش تولید کلسترول است که احتمالاً، بر عملکرد رفته‌های لیپیدی<sup>۷۸</sup> تأثیر می‌گذارد. در سلول‌های عصبی، اعضای خانواده‌های *HSPA* و *HSP90* به همراه *DNAJA4* در عملکرد رفته‌های لیپیدی مؤثر هستند و کاهش سطح کلسترول منجر به از دست رفتن این پروتئین‌ها از رفته‌ها می‌شود (Gerges *et al.*, 2004). چپرون‌ها مسئول حفظ مسیرهای انتقال سیگنال در رفته‌های لیپیدی هستند (Bernardo *et al.*, 2007)؛ بنابراین، تغییرات در سطح کلسترول در طول تنش حرارتی احتمالاً، بر سیگنال‌دهی

<sup>74</sup> lipopolysaccharides

<sup>75</sup> chicken macrophage-like cell line

<sup>76</sup> Reactive oxygen

<sup>77</sup> 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase

<sup>78</sup> Lipid rafts



بین سلولی تأثیر می‌گذارد. ژن *HSPH1* به خانواده *HSP70* تعلق دارد و یکی از اعضای مهم پروتئین‌های شوک حرارتی است که در بافت‌ها و سلول‌های مختلف حیوانات بطور گسترده توزیع شده است (Subjeck *et al.*, 1982; Lee-Yoon *et al.*, 1995). در شبکه آندوپلاسمی، *HSPH1* بطور عمده در فرآیند تخریب وابسته به شبکه آندوپلاسمی ( $ERAD^{79}$ ) شرکت می‌کند و بعنوان یک عامل تبادل نوکلئوتید برای *HSPA8* عمل می‌کند. این پروتئین از طریق همکاری با کوچپرون‌های *DNAJ/HSP40* در چرخه تغییریابی *HSPA8* شرکت کرده و به تخریب پروتئین‌های تانخورده کمک می‌کند (Smith *et al.*, 2011; Rosenzweig *et al.*, 2019). همچنین نقش ضروری در مکانیسم مقابله با تنش حرارتی ( $HSR^{80}$ ) حیوانات ایفا می‌کند. تحقیقات Hightower و Guidon در سال ۱۹۸۹ نشان داد که تحت شرایط تنش حرارتی، سطح بیان ژن *HSPH1* در سلول‌های جنینی موش به سرعت افزایش می‌یابد. علاوه بر این مطالعات Luo و همکاران (۲۰۱۴) در زمینه ژنومیک جمعیتی مقایسه‌ای در جوجه‌های گوشتی با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه و همچنین Asadollahpour و همکاران (۲۰۲۲) بر روی مرغ‌های بومی ایرانی، نشان می‌دهند که *HSPH1* نیز یک مولکول پروتئینی مهم در مکانیسم مقابله با تنش حرارتی است (شکل ۶).

شکل ۶. ماژول ۳: در بازسازی این ماژول *lncRNA2* و *mRNA 56* دخالت دارند. گره‌های هشت ضلعی نشان‌دهنده *lncRNA*ها و گره‌های چهارضلعی نشان‌دهنده *mRNA*ها/ژن‌ها هستند. لبه‌ها آثار متقابل را نشان می‌دهند؛ لبه‌های سیاه نشان‌دهنده آثار متقابل *mRNA-mRNA* و لبه‌های سبز نشان‌دهنده آثار متقابل *lncRNA-mRNA* هستند.

در ماژول ۴، دو *miRNA* هاب *gga-miR-6593-5p* و *gga-miR-2127* می‌باشند که مانند ماژول ۲، با ژن‌های *MMP15*، *DOCK3*، *GNAQ*، *STXBP5* و *MAP1B* در ارتباط هستند، با این تفاوت که ژن *BCAR1* در این زیرشبکه حضور ندارد. ژن *STXBP5* در اتصال پروتئین، ساختار آناتومیکی درون سلولی و وزیکول سیتوپلاسمی نقش معنی‌دار و مؤثری دارد (شکل ۷).

شکل ۷. ماژول ۴: در بازسازی این ماژول *miRNA 4* و *mRNA 44* دخالت دارند. گره‌های مثلثی نشان‌دهنده *miRNA*ها و گره‌های چهارضلعی نشان‌دهنده *mRNA*ها/ژن‌ها هستند. لبه‌ها آثار متقابل را نشان می‌دهند؛ لبه‌های سیاه نشان‌دهنده آثار متقابل *mRNA-mRNA* و لبه‌های قرمز نشان‌دهنده آثار متقابل *miRNA-mRNA* هستند.

## نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، با ادغام تجزیه و تحلیل پروفایل‌های ترانسکریپتومی RNA-Seq و ریزآرایه مربوط به بافت‌های هیپوفیز و قشر مغزی دو دسته از جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی و کنترل (تحت شرایط دمایی استاندارد) و استفاده گزارش‌های منتشر شده قبلی، در مجموع ۲ *lncRNA*، ۱۱ *miRNA* و ۴۲۶ *mRNA* /ژن مشترک دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو بافت شناسایی شد. در این راستا، با توجه شبکه‌های بازسازی شده، ۱۲ ژن هاب (*AHSA2*، *HYOU1*، *HSPA4*، *HSP90B1*، *HSPA5*، *HSP90AA1*، *ALB*، *DNAJAI*، *DNAJA4*، *DNAJB4*، *HSPA4L* و *HSPH1*) شناسایی و معرفی شدند که از نظر بیانی این ژن‌ها در مقایسه جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی نسبت به جوجه‌های گوشتی کنترل افزایش بیان از خود نشان دادند. بر اساس شبکه تنظیمی درون‌زای رقابتی *lncRNA-miRNA-mRNA*، ۴ ماژول کلیدی مهم بازسازی شدند که در مکانیسم‌های اصلی متابولیسمی شامل تاشدن پروتئین به وسیله چپرون، سازماندهی اجزاء سلولی، فرآیند سلولی، سازماندهی یا بیوژنز اجزاء سلولی، اتصال پروتئین شوک حرارتی، کمپلکس چپرون شبکه آندوپلاسمی و مسیر سیگنالینگ پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی دخیل بودند. بنابراین، نتایج

<sup>79</sup> ER-associated degradation

<sup>80</sup> Heat stress resistance



این مطالعه نشان داد که ادغام پروفایل‌های ترانسکریپتومی و استفاده از مرور منابع در کنار تجزیه و تحلیل شبکه تنظیمی ceRNA با استفاده از نمونه بافت‌های مرتبط با مغز همچون بافت هیپوفیز و بافت قشری مغز در شرایط تحت تنش گرمایی برای شناسایی RNAهای هاب کدکننده و غیرکدکننده، مسیرها و عملکردهای مربوطه می‌تواند بینش‌های جدیدی را برای بهبود درک ژنتیک و مکانیسم‌های تنظیم‌کننده تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی ایجاد کند و در کاهش مشکلات تنش گرمایی و بهبود صفات عملکردی در آن‌ها نقش داشته باشد.

## منابع

- Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. M. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, 124(5), 658–674.
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Sadollahpour Nanaei, H., Kharrati-Koopae, H., & Esmailzadeh, A. (2022). Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC Genomics*, 23(1), 224.
- Baaklini, I., Wong, M. J., Hantouche, C., Patel, Y., Shrier, A., & Young, J. C. (2012). The DNAJA2 substrate release mechanism is essential for chaperone-mediated folding. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41939-41954.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11), 487–495.
- Barreto Sánchez, A. L., Wang, Q., Thiam, M., Wang, Z., Zhang, J., Zhang, Q., Zhang, N., Li, Q., Wen, J. & Zhao, G. (2022). Liver transcriptome response to heat stress in Beijing You chickens and Guang Ming broilers. *Genes*, 13(3), 416.
- Bernardo, M. V., Yelo, E., Gimeno, L., Campillo, J. A., & Parrado, A. (2007). Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(2), 317-322.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in Simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals (Basel)*, 12(9), 1103.
- Cassuce, D. C., Tinôco, I. D. F., Baêta, F. C., Zolnier, S., Cecon, P. R., & Vieira, M. D. F. (2013). Thermal comfort temperature update for broiler chickens up to 21 days of age. *Engenharia Agrícola*, 33, 28-36.
- Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E., & Monteiro, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*, 86(6), 627-637.
- Chen, B., Yang, B., Zhu, J., Wu, J., Sha, J., Sun, J., Bao, E. & Zhang, X. (2020). Hsp90 relieves heat stress-induced damage in mouse kidneys: Involvement of antiapoptotic PKM2-AKT and autophagic HIF-1 $\alpha$  signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1646.
- Cheng, S. Z., Guang-Xin, E., Liu, C. L., Basang, W. D., Zhu, Y. B., Na, R. S., Han, Y.G., Zeng, Y., Wang, X., Ni, W.W., Yang, B.G. & Huang, Y. F. (2020). SNP of AHSA2 gene in three cattle breeds using snapshot technology. *Journal of Genetics*, 99, 1-6.

- Davis, S. & Meltzer, P.S. (2007). GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*, 23(14), 1846-1847.
- Dehghanian Reyhan, V., Ghafouri, F., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S.R., Kastelic, J.P., Barkema, H.W. & Shirali, M. (2023). Integrated comparative transcriptome and circRNA-lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network analyses identify molecular mechanisms associated with intramuscular fat content in beef cattle. *Animals*, 13(16), 2598.
- Dou, T., Zhao, S., Rong, H., Gu, D., Li, Q., Huang, Y., Xu, Z., Chu, X., Tao, L., Liu, L. and Ge, C. & Jia, J. (2017). Biological mechanisms discriminating growth rate and adult body weight phenotypes in two Chinese indigenous chicken breeds. *BMC Genomics*, 18, 1-12.
- Du, P., Kibbe, W.A. & Lin, S.M. (2008). Lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*, 24(13), 1547-1548.
- Ekhtiyari, M.S., Javanmard, A., Ghafouri, F., Sadr, A.S., Miraei-Ashtiani, S.R. & Shirali, M. (2023). Bioinformatics analysis of differentially gene expression profiles related to heat stress in brain, liver, and leg muscle of broiler chickens based on microarray technique. *Iranian Journal of Animal Science*, 54(3), 203-223. (in Persian).
- Etches, R. J., John, T. M., & Gibbins, A. V. (2008). Behavioural, physiological, neuroendocrine and molecular responses to heat stress. *Poultry Production in Hot Climates* (pp. 48-79). Wallingford UK: CABI.
- FAO (2022). Data from: Crops and livestock products dataset. License: CC BY-NC-SA 3.0 igo. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed April 01, 2022).
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M. & Irizarry, R.A. (2004). Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20(3), 307-315.
- Gerges, N. Z., Tran, I. C., Backos, D. S., Harrell, J. M., Chinkers, M., Pratt, W. B., & Esteban, J. A. (2004). Independent functions of hsp90 in neurotransmitter release and in the continuous synaptic cycling of AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4758-4766.
- Ghafouri, F., Bahrami, A., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S.R., Bakherad, M., Barkema, H.W. & Larose, S. (2021). Omics multi-layers networks provide novel mechanistic and functional insights into fat storage and lipid metabolism in poultry. *Frontiers in Genetics*, 12, 646297.
- Ghafouri, F., Dehghanian Reyhan, V., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S.R., Kastelic, J.P., Barkema, H.W. & Shirali, M. (2024a). Integrated analysis of transcriptome profiles and lncRNA-miRNA-mRNA competing endogenous RNA regulatory network to identify biological functional effects of genes and pathways associated with Johne's disease in dairy cattle. *Non-coding RNA*, 10(4), 38.
- Ghafouri, F., Dehghanian Reyhan, V., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S.R., Kastelic, J.P., Barkema, H.W. & Shirali, M., (2024b). Competing endogenous RNAs (ceRNAs) and application of their regulatory networks in complex traits and diseases of ruminants. *Ruminants*, 4(2), 165-181.
- Ghafouri, F., Sadeghi, M., Bahrami, A., Naserkheil, M., Dehghanian Reyhan, V., Javanmard, A., Miraei-Ashtiani, S.R., Ghahremani, S., Barkema, H.W., Abdollahi-Arpanahi, R. & Kastelic, J.P. (2023). Construction of a circRNA-lincRNA-lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network identifies genes and pathways linked to goat fertility. *Frontiers in Genetics*, 14, 1195480.
- Guerreiro, E. N., Giachetto, P. F., Givisiez, P. E. N., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Gabriel, J. E., Furlan, R.L. & Macari, M. (2004). Brain and hepatic Hsp70 protein levels in heat-acclimated broiler chickens during heat stress. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6, 201-206.
- He, X., Lu, Z., Ma, B., Zhang, L., Li, J., Jiang, Y., Zhou, G. & Gao, F. (2018). Effects of chronic heat exposure on growth performance, intestinal epithelial histology, appetite and related hormones and genes expression in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4471-4478.
- Heidarpour, F., Mohammadabadi, M. R., Zaidul, I. S. M., Maherani, B., Saari, N., Hamid, A. A., Abas, F., Manap, M. Y. A, Mozafari, M. R, (2011). Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. *Pharmazie*. 66(5), 319-324.

- Hightower, L. E., & Guidon Jr, P. T. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 138(2), 257-266.
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 14(4), dmm047662.
- Holmes, J. L., Sharp, S. Y., Hobbs, S., & Workman, P. (2008). Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Research*, 68(4), 1188-1197.
- Hori, O., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Maeda, Y., Ueda, H., Ohtsuki, T., Kinoshita, T., Ogawa, S., Stern, D.M. & Kamada, T. (1996). Exposure of astrocytes to hypoxia/reoxygenation enhances expression of glucose-regulated protein 78 facilitating astrocyte release of the neuroprotective cytokine interleukin 6. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), 973-979.
- Hosseinzadeh, S. & Hasanpur, K. (2024). Whole genome discovery of regulatory genes responsible for the response of chicken to heat stress. *Scientific Reports*, 14(1), 6544.
- Hu, L., Fang, H., Abbas, Z., Luo, H., Brito, L. F., Wang, Y., & Xu, Q. (2024). The HSP90AA1 Gene Is Involved in heat stress responses and its functional genetic polymorphism are associated with heat tolerance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*.
- 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), 115-121.
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII.1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4), e221.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357-360.
- Kong, L. N., Zhang, D. X., Ji, C. L., Zhang, X. Q., & Luo, Q. B. (2015). Association analysis between SNPs in the 5'-flanking region of the chicken GRP78 gene, thermotolerance parameters, and tissue mRNA expression. *Genet. Mol. Res*, 14, 6110-6123.
- Kubota, S., Pasri, P., Okrathok, S., Jantasaeng, O., Rakngam, S., Mermillod, P., & Khempaka, S. (2023). Transcriptome analysis of the uterovaginal junction containing sperm storage tubules in heat-stressed breeder hens. *Poultry Science*, 102(8), 102797.
- Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., & Subject, J. R. (1995). Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), 15725-15733.
- Li, G., Zhao, H., Guo, H., Wang, Y., Cui, X., Li, H., Xu, B. & Guo, X. (2020). Analyses of the function of DnaJ family proteins reveal an underlying regulatory mechanism of heat tolerance in honeybee. *Science of the Total Environment*, 716, 137036.
- Li, Z., & Li, Z. (2012). Glucose regulated protein 78: a critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(1), 13-22.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lin, Y., Ji, Z., Li, C., Liang, Q., Shi, J., Su, Z., Yao, X. & Zhang, X. (2024). Proteomics analysis for key molecules in adrenal glands of Wenchang chickens for their resistance to heat stress. *Poultry Science*, 103(11), 104161.
- Liu, Z., Liu, Y., Xing, T., Li, J., Zhang, L., Zhao, L., Jiang, Y. & Gao, F. (2024). Unraveling the role of long non-coding RNAs in chronic heat stress-induced muscle injury in broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), 135.

- Livingston, M. L., Pokoo-Aikins, A., Frost, T., Laprade, L., Hoang, V., Nogal, B., Phillips, C. & Cowieson, A. J. (2022). Effect of heat stress, dietary electrolytes, and vitamins E and C on growth performance and blood biochemistry of the broiler chicken. *Frontiers in Animal Science*, 3, 807267.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1-21.
- Lu, T., Li, L., Li, Y., & Li, X. (2023). RNA-sequencing reveals differentially expressed genes of laying hens fed Baihu Decoction under heat shock. *The Journal of Poultry Science*, 60(2), 2023012.
- Luo, Q. B., Song, X. Y., Ji, C. L., Zhang, X. Q., & Zhang, D. X. (2014). Exploring the molecular mechanism of acute heat stress exposure in broiler chickens using gene expression profiling. *Gene*, 546(2), 200-205.
- Madkour, M., Salman, F.M., El-Wardany, I., Abdel-Fattah, S.A., Alagawany, M., Hashem, N.M., Abdelnour, S.A., El-Kholy, M.S. & Dhama, K. (2022). Mitigating the detrimental effects of heat stress in poultry through thermal conditioning and nutritional manipulation. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103169.
- Marangoni, F., Corsello, G., Cricelli, C., Ferrara, N., Ghiselli, A., Lucchin, L. & Poli, A. (2015). Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document. *Food & Nutrition Research*, 59(1), 27606.
- McInnes, L., Healy, J. & Melville, J. (2018). Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. *ArXiv Preprint ArXiv:1802.03426*.
- McKenna, L. B., Schug, J., Vourekas, A., McKenna, J. B., Bramswig, N. C., Friedman, J. R., & Kaestner, K. H. (2010). MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology*, 139(5), 1654-1664.
- Mohamed, B. A., Barakat, A. Z., Zimmermann, W. H., Bittner, R. E., Mühlfeld, C., Hünlich, M., Engel, W., Maier, L.S. & Adham, I. M. (2012). Targeted disruption of Hspa4 gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 53(4), 459-468.
- Mohammadabadi, M., Babenko, I. O., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafiieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 317-332.
- Naserkheil, M., Ghafouri, F., Zakizadeh, S., Pirany, N., Manzari, Z., Ghorbani, S., Banabazi, M.H., Bakhtiarizadeh, M.R., Huq, M.A., Park, M.N. & Barkema, H.W. (2022). Multi-omics integration and network analysis reveal potential hub genes and genetic mechanisms regulating bovine mastitis. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(1), 309-328.
- Nepusz, T., Yu, H. & Paccanaro, A. (2012). Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks. *Nature Methods*, 9(5), 471-472.
- Pritchett, E. M., Van Goor, A., Schneider, B. K., Young, M., Lamont, S. J., & Schmidt, C. J. (2023). Chicken pituitary transcriptomic responses to acute heat stress. *Molecular Biology Reports*, 50(6), 5233-5246.
- Rauch, J. N., Zuiderweg, E. R., & Gestwicki, J. E. (2016). Non-canonical interactions between heat shock cognate protein 70 (Hsc70) and Bcl2-associated anthanogene (BAG) co-chaperones are important for client release. *Journal of Biological Chemistry*, 291(38), 19848-19857.
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., De Basilio, V., Gourdiene, J. L., & Collier, R. J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707-728.
- Reyhan, V. D., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S. R., Ghafouri, F., Kastelic, J. P., & Barkema, H. W. (2022). Integrated transcriptome and regulatory network analyses identify candidate genes and pathways modulating ewe fertility. *Gene Reports*, 28, 101659.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D.I., 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-e47.



- Robichon, C., Varret, M., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Hajduch, E., Ferré, P. & Dugail, I. (2006). DnaJA4 is a SREBP-regulated chaperone involved in the cholesterol biosynthesis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(9), 1107-1113.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665-680.
- Safaei, S. M. H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska, R., Klopenko, N., & Kalashnyk, O. (2022). An Origanum majorana leaf diet influences Myogenin gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals (Basel)*, 13(1), 14.
- Safdar, M., & Özaslan, M. (2023). MicroRNAs as potential biomarkers for heat stress in livestock. *Zeugma Biological Science*, 4(2), 6-12.
- Searchinger, T., Waite, R., Hanson, C., Ranganathan, J., Dumas, P., Matthews, E., & Klirs, C. (2019). Creating a sustainable food future: A menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050. Final Report.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., & Weissman, J. S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334(6059), 1086-1090.
- Song, X.Y., Luo, Q.B. & Zhang, X.Q. (2012). Gene expression profiling of three tissues in chicken with heat stress by Affymetrix microarray. Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE23592>
- Subject, J. R., Sciandra, J. J., Chao, C. F., & Johnson, R. J. (1982). Heat shock proteins and biological response to hyperthermia. *The British Journal of Cancer. Supplement*, 5, 127.
- Sun, L., Prince, T., Manjarrez, J. R., Scroggins, B. T., & Matts, R. L. (2012). Characterization of the interaction of Aha1 with components of the Hsp90 chaperone machine and client proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(6), 1092-1101.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P. & Jensen, L.J. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), 607-613.
- Tona, G. O. (2018). Current and future improvements in livestock nutrition and feed resources. *Animal Husbandry and Nutrition*, 18, 73088.
- Triantafilou, M., Fradelizi, D., & Triantafilou, K. (2001). Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (GRP) 78 on the cell surface. *Human Immunology*, 62(8), 764-770.
- Wu, X., Du, X., Pian, H. & Yu, D. (2024). Effect of curcumin on hepatic mRNA and lncRNA Co-expression in heat-stressed laying hens. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5393.
- Yao, X., Zhu, J., Li, L., Yang, B., Chen, B., Bao, E., & Zhang, X. (2023). Hsp90 protected chicken primary myocardial cells from heat-stress injury by inhibiting oxidative stress and calcium overload in mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 209, 115434.
- Zhao, Y., Wong, L. & Goh, W.W.B. (2020). How to do quantile normalization correctly for gene expression data analyses. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.

## Extended Abstract

### Introduction

Broilers are an important breed of livestock and play an important role in food security. In poultry farming, the higher production rate is largely dependent on nutrient intake, climate conditions and ambient humidity. In recent years, climate conditions have changed, leading to an increase in average global temperature, which is contributing to global warming. Broiler meat is an important and essential source of food for humans and accounts for about 34.3 per cent of global meat production. However, chickens are particularly sensitive to heat stress. Despite various efforts to mitigate the adverse effects of heat stress on broiler chickens, the molecular mechanisms and regulatory functions involved in their biological response are still not fully understood. The aim of this study was to combine the analysis of the transcriptional profiling with literature review and analysis of the competitive regulatory network of endogenous RNA (ceRNA). The aim of this approach was to identify the key messenger RNA (mRNA) and non-coding RNA (RNA) involved in the molecular regulation of the cells of the pituitary gland and the brain under heat stress in broiler chickens.

### Materials and Methods

The study analysed transcription profiles from two types of brain tissue: pituitary gland and brain stem cells. We performed a comparative transcriptome analysis of the RNA-Seq and microarray data sets to detect the differences in gene expression between two groups of broiler chickens: the heat-treated group and the control group. Following this, we explored the ontology of the relevant genes as identified by data analysis and literature review. In addition, we reconstructed a competitive endogenous RNA regulatory network highlighting four candidate modules related to heat stress in broiler chickens.

### Results and Discussion

Results from this study identified two long non-coding (ncRNA) RNAs, 11 microRNAs and 426 common mRNAs and genes that showed significant differences in expression between the two tissues. After analysing the interactions between the differentially expressed genes and building a network of protein interactions, we identified 12 major interaction genes (mRNAs): *HSP90A1*, *HSPA5*, *HSP90B1*, *HSPA4*, *HSPA2*, *HSPA3*, *HSPA4L*, *HSPA2*, *ALB*, *DNAJ1*, *DNAJ4*, and *DNAJ4*. These genes showed increased expression in broiler chickens under heat stress compared with control chickens. In addition, we reconstructed a competitive endogenous RNA regulatory network and identified four related candidate modules by means of clustering. An annotation analysis of the identified RNA has shown their association with 8, 7 and 27 relevant pathways for heat stress, respectively, in the categories of biological processes, molecular functions and cellular constituents. Notably, the major metabolic signalling pathways identified were those related to protein-folding chaperones, cellular component organisation, cellular processes, cellular biogenesis, thermal protein binding, endoplasmic reticulum chaperone complexes, and endoplasmic reticulum protein processing signalling.

### Conclusion

The results suggest that combining transcriptomic profiles with literature reviews and analysis of the CERN in brain tissue samples, especially the pituitary and the cerebral cortex, under heat stress conditions, may help to identify key coding and non-coding RNA. This integrated approach provides valuable insights into the genetic and regulatory mechanisms involved in broiler chicken heat stress. In addition, it can help to address the problems of heat stress and improve their performance characteristics.