Iranian Journal of Animal Science
Vol 51, No 3, Autumn 2020 (243-251)
DOI: 10.22059/ijas.2020.307066.653793

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۱، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۹ (ص ۲۵۱-۲۴۳)

شناسایی ژن‌ها، مسیرهای زیستی و سیگنالینگ مؤثر در تنش گرمایی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در طیور

میلاد رضائی سینکی[۱]، مصطفی صادقی[۲*]، ابوالفضل بهرامی[۳] و محمد مرادی شهربابک[٤]
۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانش‌آموخته دکتری و استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۳۰)

چکیده

تنش گرمایی در طیور تأثیر به‌سزایی در کاهش عملکرد، سیستم ایمنی و افزایش تلفات دارد. با توجه به تعاملات میان مسیرهای زیستی دخیل در تنش گرمایی و اهمیت تنظیم‌کنندگی آن‌ها، استفاده از یک رویکرد جامع برای مطالعه تنش گرمایی ضروری می‌باشد. در این مطالعه اثرات تنش گرمایی بر بیان ژن در دو گروه از جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر تنش گرمایی و بدون تنش گرمایی (شاهد)، بررسی شد. در تجزیه، داده‌های ریزآرایه تعداد ۱۰۰۰ ژن استخراج و پس از حذف ژن‌های تکراری و خارج از سطح معنی‌داری در بیان (P<۰/۰۱)، تعداد ۷۰۹ ژن شناسایی شد. با بهره‌گیری از سایت String و آنالیز ژن‌ها در نرم‌افزار Cytoscape، تعداد ۱۱۵ ژن در چهار ماژول عملکردی شناسایی شد که در مسیرهای زیستی اسپلایسوزوم، یوبیکویتین واسطه‌گر پروتئولیز، بیوژنز ریبوزوم، پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، اتوفاژی-حیوانی و مسیرهای سیگنالینگ سیستم ایمنی ذاتی، MAPK Pathway و پیری سلولی دخیل بودند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنش گرمایی در طیور نقش مهمی در عملکرد رشد، سیستم ایمنی و سایر مکانیسم‌های بیولوژیکی دارد. شناسایی ژن‌های مؤثر در تنش گرمایی همچون PTEN و HSPها در پرندگان و بررسی داده‌های ریزآرایه، می‌تواند افق جدیدی را در درک بهتر فرآیندهای زیستی مرتبط با تنش گرمایی پیش روی ما قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش گرمایی، ریزآرایه، مسیر زیستی، مسیر سیگنالینگ.

Identification of genes, biological pathways and signaling affecting heat stress with microarray data sets in poultry

Milad Rezaei Sinaki[1], Mostafa Sadeghi[2*], Abolfazl Bahrami[3] and Mohammad Moradi Shahrbabak[4]
1, 2, 3, 4. M.Sc. Student, Associate Professor, Former Ph.D. Srtudent and Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 3, 2020 - Accepted: Dec. 20, 2020)

ABSTRACT

Heat stress in poultry decreases performance, weakens immune system and increases mortality, significantly. Given the interactions between biological pathways involved in heat stress, it is necessary to use a comprehensive approach to study heat stress. In this study, the effects of heat stress on gene expression in two groups of broilers under heat stress and without heat stress (control) were investigated. In the analysis, microarray data were extracted from 1000 genes and after removing duplicate genes and out of the level of significance in expression (P <0.01), 709 genes were identified. Using the String site and gene analysis in Cytoscape software, 115 genes were identified in four functional modules. The identified modules were involved in biological pathways of Spliceosome, Ubiquitin-mediated proteolysis, Ribosome biogenesis, Protein Processing in Endoplasmic Reticulum, Autophagy-Animal and Important Signaling pathways including Innate Immune System, MAPK pathway and Cellular Senescence. The results of this study showed that heat stress in poultry plays an important role in growth function, immune system and other biological mechanisms. Identifying the genes involved in heat stress such as PTEN and HSPs in birds, and reviewing microarray data could open new horizons for a better understanding heat stress-related biological process.

Keywords: Biological pathways, gene expression, heat stress, microarray, signaling pathways.

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

مقدمه

سهم عمده پرورش طیور در دنیا، به مناطق خشک و گرمسیری (دارای طول روز بلند و با دمای بیش از ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) اختصاص دارد (Aalaei *et al.*, 2014). یکی از مشکلات مهم در صنعت طیور در این مناطق، تنش گرمایی است که موجب کاهش عملکرد رشد و سیستم ایمنی و افزایش تلفات می‌شود؛ زمانی که دمای محیط به بالاتر از حد آسایش حرارتی افزایش می‌یابد، پرنده دچار تنش گرمایی شده و در این حالت تغییرات فیزیولوژیکی در اسیدیته و متابولیت‌های خون صورت می‌گیرد. کاهش مصرف غذا و بازدهی نامناسب خوراک، کاهش وزن، کیفیت لاشه، قدرت دفاعی و سیستم ایمنی بدن از مهمترین موارد در زمان تنش گرمایی است. تنش گرمایی، در جوجه‌های گوشتی باعث افزایش تولید رادیکال سوپراکسید و اکسیژن واکنشگر در ماهیچه سینه می‌شود که انباشته شدن آن می‌تواند به بسیاری از مولکول‌های بزرگ بیولوژیک مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA آسیب برساند (Smaili *et al.*, 2016).

مهمترین هدف در صنعت پرورش طیورگوشتی، افزایش وزن بدن، کاهش ضریب تبدیل خوراک، افزایش کیفیت گوشت لاشه و به طور کلی افزایش عملکرد و کسب حداکثر تولید با صرف کمترین هزینه است. تنش گرمایی باعث کاهش چشمگیر عملکرد جوجه‌های گوشتی و بازدهی لاشه می‌گردد (Ain Baziz *et al.*, 1996). همچنین بر اساس گزارش‌های الصفر[1] (۲۰۰۹) افزایش دما باعث کاهش افزایش وزن روزانه در جوجه‌های گوشتی نر می‌شود.

در مطالعه‌ای مشخص شد که تنش گرمایی باعث تغییرات ساختاری و عملکردی در سلول می‌شود (Sangster *et al.*, 2004). شوک حرارتی باعث می‌شود که تغییراتی در پروتئین‌های سلول ایجاد شود که در نتیجه باعث تجمع اجزای سلول شده و در نهایت عملکرد سلول را مختل می‌کند (Marcos-Carcavilla *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای دیگر در شرایط تنش گرمایی به این نتیجه رسیدند که پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPها) به‌علت ارتباط با صفات مهم اقتصادی در دام‌ها از قبیل مقاومت به تنش گرمایی دارای اهمیت هستند (Rezvannejad *et al.*, 2016). علاوه بر کنترل تنش گرمایی از طریق روش‌های تغذیه‌ای و مدیریتی، با اطلاع از ژن‌های کنترل کننده و مؤثر در تنش گرمایی و نیز مطالعه و شناخت مکانیسم کنترل ژنتیکی تنش گرمایی، می‌توان قدم‌های بیشتر و پایدارتری را برای رفع مشکل برداشت. در این راستا با پیدا کردن ژن‌های دخیل در تنش گرمایی در ژنوم توالی‌یابی شده هر گونه و نیز مسیرهای زیستی مربوطه، ممکن است بتوان در کنترل بهتر تنش گرمایی مؤثر بود. بنابراین هدف اصلی در این مطالعه استفاده از داده‌های ریزآرایه[2] برای شناسایی ژن های درگیر و همچنین شناسایی مسیرهای زیستی و سیگنالینگ مرتبط با تنش گرمایی جوجه‌های گوشتی می‌باشد.

سیستم بیولوژی، به زبان ساده مدل‌سازی محاسباتی پدیده‌ها و سیستم‌های پیچیده زیستی است. در سیستم بیولوژی با کمک داده‌های ژنومیک، پروتئومیک، ترانسکریپتومیکس و متابولومیکس سعی می‌شود سیستم سلولی شناسایی شده و رفتارهای سلول فرمولیزه شده و نیز مدل سلول طراحی شود (Cole *et al.*, 2013; Kadarmideen *et al.*, 2011). مطالعه شبکه‌های زیستی، درک مدل آن‌ها، تحلیل و تجسم آن‌ها در علم امروز نقش بسیار مهمی دارد. درک این شبکه‌ها برای دید زیستی بهتر از داده‌های پیچیده و بسیار زیادی که در حال تولید شدن هستند، بسیار ضروری است. تعداد بسیاری از شبکه‌های زیستی مهم مربوط به مولکول‌هایی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها و ترکیبات مورد نیاز برای سوخت و ساز سلول و فعل و انفعالات بین آن‌ها می‌باشد (Barbasi *et al.*, 2011). از مهم‌ترین نمونه‌های شبکه‌های زیستی در سطح مولکولی، می‌توان به شبکه تنظیم بیان ژن، شبکه برهمکنش پروتئین‌ها و شبکه متابولیکی اشاره کرد (Babaabasi, 2017).

1. Al-Saffar

2. Microarray

مواد و روش‌ها

برای درک هر چه بهتر مسیرهای زیستی مرتبط با تنش گرمایی در طیور از داده‌های مختلفی استفاده می‌شود و مهم‌ترین راهبرد به‌کار گرفته‌شده در این تحقیق شناسایی بیان ژن‌های درگیر در تنش گرمایی می‌باشد. برای انجام تجزیه و تحلیل‌های لازم و یافتن ژن‌های عملکردی مناسب و مورد نظر در این تحقیق، یعنی دو گروه جوجه‌های گوشتی نر و ماده (گروه تحت تنش گرمایی و گروه کنترل یا بدون تنش گرمایی) از روش‌ها و نرم‌افزارهایی که در ادامه توضیح داده می‌شود، استفاده شد.

جمع‌آوری و تجزیه داده‌های ریزآرایه

با جستجو در پایگاه (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) GEO و Array Express (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) برای تنش گرمایی در گونه اهلی گالوس گالوس دامستیکوس (*Gallus Gallus domesticus*) شمار زیادی داده گردآوری شد که مربوط به کشور چین بود. کد دسترسی GEO برای مجموعه داده‌های ریزآرایه GSE23592 (Song *et al.*, 2010) می‌باشد، که اثر تنش گرمایی بر بیان ژن در سه بافت مغز، کبد و عضله پا در جوجه‌های نژاد گوشتی را بررسی نمودند. داده‌های ریزآرایه بدست آمده با استفاده از بسته نرم افزاری Affy (Gautier *et al.*, 2004) در نرم‌افزار R پیش پردازش (شامل استانداردسازی و نرمال‌سازی و حذف داده‌های پرت) شدند. در ادامه داده‌های پیش پردازش شده با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری Limma (Ritchie *et al.*, 2015) و Biobase (Huber *et al.*, 2015) پردازش و ارزیابی شدند. با تجزیه کد دسترسی مربوط به داده‌های ریزآرایه، تعداد ژن‌های مورد نظر، شناسایی شدند. تجزیه و بررسی داده‌ها انجام و ژن‌ها با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری در بیان (P<0.01)، به صورت فهرست ژنی استخراج شدند. برای شناسایی اثرهای متقابل ژنی از پایگاه‌های داده‌ای String (Szklarczyk *et al.*, 2018) و Gene MANIA (Warde-Farley *et al.*, 2010) استفاده شد. پس از شناسایی اثرهای متقابل ژنی، همه آثار متقابل از جمله تعاملات پروتئین-پروتئین[1]، داده‌های هم‌بیان[2] ژنی، آثار متقابل حاصل از یافته‌های آزمایشگاهی[3] و داده‌های مربوط به مسیرهای زیستی مورد مطالعه قرار گرفتند و در نهایت ماژول‌های عملکردی مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) بدست آمدند. برای یافتن مسیرهای زیستی و سیگنالینگ دخیل در تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی با استفاده از ماژول‌های بدست آمده در این مطالعه، از سایت g:profiler (Raudvere *et al.*, 2019) استفاده شد. در این سایت در بخش KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) مسیرهای زیستی و سیگنالینگ قابل دسترس و شناسایی می‌باشند.

حاشیه نویسی ژن‌ها

برای حاشیه‌نویسی ژن‌ها از دو پایگاه g:profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) (Raudvere *et al.*, 2019) و GeneCards (https://www.genecards.org/) بهره گرفته شد.

نتایج و بحث

تجزیه داده‌های ریزآرایه

پس از تجزیه داده‌های ریزآرایه برای شناسایی ژن‌های بیان‌شده مؤثر در تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی، تعداد ۱۰۰۰ ژن استخراج و پس از حذف ژن‌های تکراری و خارج از سطح معنی‌داری در بیان (P<۰/۰۱) در کد دسترسی GSE23592 (Song *et al.*, 2010) تعداد ۷۰۹ ژن شناسایی شد و فهرست ژنی اصلی تهیه گردید.

ماژول‌های عملکردی مهم

برای آنالیز و پیداکردن ماژول‌ها و مهم‌ترین بخش‌های شبکه بیولوژیکی که بیشترین آثار متقابل را داشتند، از نرم‌افزار MCODE (Lotia *et al.*, 2013; Bader & Hogue, 2003) از ابزارهای نرم‌افزار Cytoscape بهره گرفته شد. خروجی‌های نرم افزار MCODE تعداد چهار ماژول عملکردی مهم شامل ۱۱۵ ژن بود که در جدول ۱ آورده شده‌اند.

1. Protein-Protein
2. Co-Expression
3. Experiment

جدول ۱. ماژول‌ها و ژن‌های عملکردی مهم شناسایی‌شده

Table 1. Important funectional modules and genes identified

No.	Module 1	Module 2	Module 3	Module 4
1	FBXW5	FTSJ3	CTDP1	FKBP4
2	RNF123	NOL10	DCAF5	SLTM
3	RLIM	IMP4	DDA1	WAPAL
4	CTNNBL1	DDX54	DDB1	SMC3
5	NPB	TRMT2A	ZNF143	ULK3
6	SNRPE	ESF1	DDB2	RB1CC1
7	SNRPB	RRP9	GTF2A1	DSN1
8	KLHL25	WDR18	CTR9	RAB5B
9	KBTBD8	DDX10	INTS6	WIPI2
10	EFTUD2	BMS1	DCAF7	VPS39
11	SNRNP40	PES1	DCAF6	XPO1
12	VPRBP	WDR12	DTL	VPS41
13	SKP1	GPATCH4	GTF2H5	LUC7L3
14	FIP1L1	DDX59	SSRP1	PNN
15	CUL1	WDR74	DCAF17	LOC776720
16	FBXL18	NOC4L	SNAPC5	RAB9A
17	HNRNPD	TFB2M	DCAF10	AHCTF1
18	POLR2E	NSUN3	HSPA2	PTEN
19	PA2G4	DDX55	HSPA4	ZFYVE20
20	RNF114	BRIX1		WDR59
21	CCAR1	NHP2		RFC5
22	TRIP12	RRP7A		NFYB
23	ENSGALG00000006043	DCAF13		HDAC8
24	UBR2	POLR3B		MON1A
25	UNKL			ATG7
26	RBBP6			POLK
27	NHP2L1			ATG5
28	POLR2C			ATG2B
29	POLR2I			HSPA2
30	CRNKL1			HSPA4
31	FUS			HSPH1
32	CWC22			
33	CDC5L			
34	RNF217			
35	NEDD4			
36	CPSF7			
37	HERC4			
38	UBE3C			
39	CLP1			
40	PAPOLA			
41	CPSF2			
42	UFL1			
43	CSTF3			
44	HSPA2			
45	HSPA4			
46	HSPH1			

هر چهار ماژول عملکردی به واسطه‌ی ژن‌های کلیدی شناسایی شده در مسیرهای مختلف زیستی مرتبط با تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی اثرگذار می‌باشند و همچنین مسیرهای سیگنالینگ ویژه‌ای را کد می‌کنند.

ژن IMP4 (IMP U3 Ruconucleoprotein Nucleolar Small Nucleolar 4) یک ژن کدکننده پروتئین است و در ماژول شماره دو جدول ۱ قرار دارد که پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن بخشی از اجزای ریبونوکلئوپروتئین کوچک هسته ای (U3 snoRNP)، می‌باشد. از جمله مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با این ژن می‌توان به MAPK Pathway اشاره کرد. به طور کلی استرس‌ها و به‌خصوص استرس گرمایی مسیرهای سیگنالینگ ویژه‌ای مانند MAPK را فعال می‌سازد که این مسیرهای فعال‌شده باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدان‌ها و آزادسازی سیتوکین‌های پیش التهابی مانند نوتروفیل می‌شود (Arabiyan *et al.*, 2019). مسیر سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن[1] عمومی (MAPK) عملکردهای سلولی مانند تکثیر سلولی، تمایز، نقل و انتقالات سلولی، بقای

1. Mitogen

سلول و آپوپتوز را تنظیم می‌کند (Sun *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای مشخص شد که تعامل پیچیده‌ای بین شوک گرمایی، پاسخ ایمنی و سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن و ژن‌های واکنش به استرس وجود دارد (Slawinska *et al.*, 2016). حاشیه نویسی مربوط به این ژن شامل اتصال snoRNA و رونوشت اولیه rRNA است (https://www.genecards.org). ژن IMP4 به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر زیستی بیوژنز ریبوزوم در یوکاریوت‌ها[1]، در بخش پردازش اطلاعات ژنتیکی (ترجمه) قرار می‌گیرد. در یوکاریوت‌ها، بیوژنز ریبوزومی شامل تولید و مونتاژ صحیح چهار rRNA و حدود ۸۰ پروتئین ریبوزومی است. در صورت عدم وجود این پروتئین‌ها، بیوژنز ریبوزوم متوقف شده و رشد سلول حتی در شرایط رشد بهینه خاتمه می‌یابد.

ژن NEDD4 (NEDD4 E3 Ubiquitin Protein Ligase) یک ژن کدکننده پروتئین است و در ماژول شماره یک جدول ۱ قرار دارد. این ژن در سیستم پروتئازوم یوبیکویتین در خصوص تخریب پروتئین عمل می‌کند. نقش مهمی در تنظیم تعدادی از گیرنده‌های غشایی، اجزای دستگاه اندوسایتیک[2] و مهارکننده تومور توسط ژن PTEN دارد. این ژن در سایت‌های متعدد، با چسبیدن به گیرنده‌ها و تغییر آن‌ها منجر به تخریب در لیزوزوم‌ها می‌شود. از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به سیگنالینگ اینترفرون گاما[3] (مربوط به سیستم ایمنی) اشاره کرد. Interferon-γ (IFN-γ) یک واسطه مهم ایمنی و التهاب است (Hu & Ivashkiv, 2009). تعامل پیچیده‌ای نیز بین شوک گرمایی، پاسخ ایمنی (اینترفرون گاما) و ژن‌های واکنش به استرس وجود دارد (Slawinska *et al.*, 2016). مکانیسم‌های سیگنالینگ IFN-γ در فعال‌سازی ماکروفاژها، التهاب، ترمیم بافت و کمک‌کننده و تنظیم‌کننده تمایز سلول‌های T و نحوه پاسخ‌های سلولی نیز در بیماری‌های خود ایمنی نقش خود را ایفا می‌کنند (Hu & Ivashkiv, 2009) و همچنین افزایش‌دهنده‌ی تخریب پاتوژن‌های متصل به سلول‌ها می‌باشند (Sadrzadeh, 2012) ولی تنش گرمایی با تضعیف عملکرد این مسیر، تمامی عملیات‌های تنظیمی را دچار اختلال نموده و در نهایت پرنده را با مشکلات و بیماری‌های جدی مواجه خواهد کرد. ماشلی[4] و همکاران در سال ۲۰۰۴ هم به این نتیجه رسیدند که استرس گرمایی نه تنها بر عملکرد تولیدی در طیور تأثیر می‌گذارد، بلکه مانع عملکرد سیستم ایمنی نیز می‌گردد. حاشیه نویسی مربوط به این ژن شامل فعالیت لیگاز و اتصال دامنه‌های خاص پروتئین است (https://www.genecards.org). ژن NEDD4 به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر زیستی یوبیکویتین واسطه‌گر پروتئولیز[5] در بخش پردازش اطلاعات ژنتیکی؛ (تاشوندگی، مرتب سازی و تخریب)[6] قرار می‌گیرد. یوبیکیونه شدن پروتئین نقش مهمی در فرآیندهای سلولی یوکاریوتی دارد. به‌طورکلی، به‌عنوان یک سیگنال تخریب پروتئین وابسته به پروتئازوم 26S عمل می‌کند. تخریب پروتئین‌ها به‌واسطه یوبیوکیتین با کمک سه آنزیم به نام E1 (آنزیم فعال‌کننده یوبیکویتین)، E2 (آنزیم متصل‌کننده یوبیکویتین) و E3 (لیگاز یوبیکویتین) انجام می‌شود.

ژن PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) یک ژن کدکننده پروتئین است و در ماژول شماره چهار جدول ۱ قرار دارد. این ژن به عنوان سرکوبگر تومور شناخته شده است که در تعداد زیادی از سرطان‌ها در فرکانس بالا جهش یافته است. پروتئین رمزگذاری‌شده توسط این ژن یک فسفاتیدیل اینوزیتول-۳، ۴ و ۵-تری‌فسفاتاز ۳-فسفاتاز است. PTEN در انسان در سرطان پروستات، گلیوبلاستوما[7]، آندومتر، ریه و سرطان پستان با درجات مختلف مشاهده شده است (https://www.genecards.org). از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به فعال‌سازی PI3K/ AKT اشاره کرد. مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول (PI3K)/ پروتئین کینازB (Akt) در تنظیم

1. Ribosome Biogenesis in Eukaryotes
2. endocytic machinery components
3. Interferon gamma signaling
4. Mashaly
5. Ubiquitin mediated Proteolysis
6 . Genetic Information Processing; (Folding, sorting and degradation)
7. Glioblastoma

بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی سلولی با دفسفریله کردن فوسفواینوزیتیدها و فعال‌کردن مولکول‌های مؤثر متقابل پایین‌دست، نقش مهمی در چرخه سلولی، رشد و تکثیر دارند، درگیر می‌باشند (Shi *et al.*, 2019). بنابراین ژن کد کننده پروتئین PTEN با تنظیم منفی مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT/ PKB، مانع رشد و تکثیر سلول‌های توموری می‌شود. در نتیجه قرارگرفتن در شرایطی مانند تنش گرمایی می‌تواند از بیان ژن PTEN جلوگیری کرده و در نهایت مهار مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT/ PKB انجام نمی‌شود و سلول‌های توموری رشد و تکثیر پیدا می‌کنند. حاشیه نویسی مربوط به این ژن شامل پروتئین کیناز و اتصال یون منیزیم است (https://www.genecards.org). ژن PTEN به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر زیستی اتوفاژی- حیوانی[1]، در بخش فرآیندهای سلولی (حمل و نقل و کاتابولیسم) قرار می‌گیرد. اتوفاژی یک مسیر کاتابولیک سلولی است که شامل تخریب پروتئین، انتقالات سلولی و تجزیه غیر انتخابی اجزای سیتوپلاسمی است. اتوفاژی در پاسخ به استرس خارج یا داخل سلولی و سیگنال‌هایی مانند گرسنگی، محرومیت از فاکتور رشد و استرس تنظیم می‌شود و نقش مهمی در هموستاز سلولی ایفا می‌کند.

ژن (ATG7 Autophagy Related 7) یک ژن کدکننده پروتئین است و در ماژول شماره چهار جدول ۱ قرار دارد. پروتئین کد شونده‌ی این ژن مسیرهای چرخه سلولی و بقای سلول را در طول استرس متابولیک در طولانی مدت تعدیل می‌کند. بیماری‌های مرتبط با ATG7 شامل میوپاتی نمالین۱[2] است. از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به پیری سلولی و سیستم ایمنی ذاتی اشاره کرد (https://www.genecards.org). برای پاتوژن‌هایی که به بدن وارد شده‌اند، اولین خط دفاعی، به وسیله‌ی مکانیسم‌های ایمنی ذاتی مثل سلول‌های فاگوسیت‌کننده که شامل هتروفیل‌ها (نوتروفیل‌ها) و ماکروفاژها، هستند و یا سیستم مکمل و سلول‌های کشنده طبیعی ترتیب داده شده است (Sadrzadeh, 2012). استرس گرمایی و قرارگرفتن در دمای محیطی بالا علاوه بر تضعیف سیستم ایمنی در طیور گوشتی (Feizi *et al.*, 2012) مانع عملکرد سیستم ایمنی در طیور نیز می‌شود (Mashaly *et al.*, 2004) بنابراین قرارگرفتن در شرایط تنش گرمایی می‌تواند آسیب جدی به عملکرد سیستم ایمنی از این طریق وارد نماید.

پیری سلولی یک مکانیسم ضد سرطان مهم است که تکثیر سلول‌های آسیب‌دیده یا زیان‌آور را محدود می‌کند و همچنین نقش مهمی در بازسازی بافت‌ها در طول توسعه سلولی دارد (Zhao *et al.*, 2018). عوامل متعددی در بروز پیری نقش دارند که شامل زمینه ژنتیکی، محدودیت غذایی، استرس، جهش‌های میتوکندریایی، تخریب و ترمیم DNA و غیره است. در پاسخ به طیفی از شوک‌های محیطی (تنش حرارتی)، سیستم‌های سلولی شروع به ساخت تدریجی پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPها) می‌نمایند و حتی شرایط غیر استرس نظیر چرخه سلولی، عوامل رشد و تمایز نیز باعث القای بیان این پروتئین‌ها می‌شوند. در حیوانات، افزایش بیان HSPها سبب افزایش تحمل سلول به مواد شیمیایی و شوک‌های محیطی می‌شود (Yari, 2011). ژن ATG7 به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر زیستی اتوفاژی[3]، در بخش فرآیندهای سلولی (حمل و نقل و کاتابولیسم) قرار می‌گیرد.

ژن HSP73 که یک نمونه مهم از این ژن، HSPA2 است به نام‌های LAP1، HSC54، HSC70، HSC71، HSP71، LAP-1، NIP71، HEL-33، HSPA10 و HEL-S-72p نیز شناخته می‌شود. ژن کدکننده پروتئین آن، HSPA8 (Heat Shock Protein Family A Member 8 (Hsp70)) می‌باشد. از جمله مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن، تنظیم تخریب deltaF508 CFTR در فیبروز کیستیک[4] است. مسیر سیگنالینگ مرتبط با ژن HSPA4 نیز تنظیم تخریب deltaF508 CFTR در فیبروز کیستیک می‌باشد. فیبروز کیستیک (CF) ناشی از یکی از جهش‌های بسیاری که در ژن رمزگذار تنظیم‌کننده هدایت انتقال فیبروز کیستیک[5] یا CFTR است و تنش گرمایی و قرارگیری در شرایط

1. Autophagy-Animal
2. Nemaline Myopathy 1
3. Autophagy
4. Cystic Fibrosis
5. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

استرس می‌تواند یکی از مهم‌ترین علل ایجاد این جهش‌ها باشد. شایع‌ترین آلل مربوط به آن، F508del می‌باشد. داده‌های اولیه نشان می‌دهد که F508del CFTR برای تخریب به واسطه‌ی شبکه آندوپلاسمی[1] (ERAD) انتخاب شده است (Estabrooks & Brodsky, 2020). همچنین انتقالات داخل سلولی را مختل کرده که منجر به فیبروز کیستیک (CF) می‌شود (Gomes-Alves *et al.*, 2010). ژن HSP73 به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر زیستی اسپلایسوزوم[2]، در بخش پردازش اطلاعات ژنتیکی (رونویسی) قرار می‌گیرد. در طی عمل پیرایش، اینترون‌ها حذف می‌شوند و اگزون‌ها توسط یک مجموعه ماکرومولکولی، یعنی اسپلایسوزوم پیوسته و به یکدیگر متصل می‌شوند. اسپلایسوزوم‌ها یک مجموعه پایدار ساده نیستند، بلکه یک خانواده پویا از ذره‌هایی هستند که در پیش‌ساز mRNA جمع می‌شوند و به چینش آن در یک ترکیب که اجازه می‌دهد transesterification انجام شود کمک می‌کنند.

ژن HSPH1 (Heat Shock Protein Family H (Hsp110) Member 1) یک ژن کدکننده پروتئین است. بیماری مرتبط با HSPH1 شامل فیبروز کیستیک است. از جمله مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن می‌توان به نقل و انتقالات وزیکولی[3] اشاره کرد (https://www.genecards.org). انتقال پروتئین‌ها و سایر محموله‌ها از طریق سلول نیاز به یک فرآیند حمل و نقل سلولی دارد که در آن مواد منتقل شده در وزیکول‌های محدود به غشای منتقل می‌شوند. مسیرهای انتقال وزیکولار بسته به عملکرد مسیر توصیف‌شده می‌توانند شامل تشکیل وزیکول[4]، ایجاد پوشش[5] ، جوانه زدن[6] ، بدون پوشش‌شدن[7] و همجوشی غشای هدف[8] باشند. حمل و نقل با وزیکول از درون سلول از طریق شبکه آندوپلاسمی و حمل و نقل گلژی انجام می‌شود، و همچنین در آندوسیتوز[9] مواد از طریق گیرنده‌های اسکونجر[10] به سلول منتقل می‌شوند (Lodish *et al.*, 2000).

ژن‌های HSPA2, HSPA4 در ماژول‌های شماره یک، سه و چهار جدول ۱ و ژن HSPH1 و در ماژول‌های شماره یک و چهار جدول ۱ قرار دارند که به‌عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر زیستی پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی[11]، در بخش پردازش اطلاعات ژنتیکی (رونویسی) قرار می‌گیرند. شبکه آندوپلاسمی (ER)[12] یک اندامک درون سلولی است که پروتئین‌ها با کمک چاپرون‌های لومن[13] در آن جمع می‌شوند. تجمع و انباشت پروتئین‌های بد و تا نخورده[14] در شبکه آندوپلاسمی باعث استرس شبکه آندوپلاسمی می‌شود (Mokaram *et al.*, 2018) و در صورت ادامه‌دار بودن این شرایط، مکانیسم‌های محافظتی فعال شده برای بازگرداندن عملکرد طبیعی شبکه آندوپلاسمی کافی نبوده و سلول‌ها در اثر آپوپتوز می‌میرند.

در سال‌های اخیر مولکول‌های تنظیم کننده پاسخ استرس شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان گزینه‌های بسیار قوی و مؤثر برای اهداف دارویی و درمانی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، آلزایمر، پارکینسون، دیابت، بیماری‌های قلبی و کبدی و آلرژی مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (Mokaram *et al.*, 2018). RNA-Seq یک تکنیک ابتکاری است که مطالعات ترانسکریپتوم را بر اساس تکنولوژی‌های نسل جدید توالی‌یابی انجام می‌دهد. این تکنیک علاوه بر غلبه بر بسیاری از مشکلات ریزآرایه، امکان بررسی همزمان بسیاری از فرآیندهای زیستی را فراهم می‌کند و در دو زمینه ژنومیکس و پروتئومیکس کاربردهای وسیعی دارد و همچنین امکان غربال هم‌زمان و سریع هزاران ژن را فراهم می‌سازد (Babaabasi, 2017)، غلبه می‌کند. به طور کلی استفاده از اطلاعات پایگاه‌های داده‌های مختلف و بکار بردن روش‌های نوین آنالیز همچون ریزآرایه و RNA-Seq، راهکاری سریع و

1. Endoplasmic reticulum associated protein degradation
2. Spliceosome
3. Vesicle-mediated transport
4. Vesicle formation
5. Coating
6. Budding
7. Uncoating
8. Target membrane fusion
9. Endocytosis
10. Scavenger
11. Protein processing in endoplasmic reticulum- Gallus gallus (chicken)
12. Endoplasmic reticulum
13. Lumenal chaperones
14. Misfolded Proteins

مطمئن برای ارزیابی بیان ژن‌های مختلف در شرایط خاص از جمله تنش گرمایی است.

نتیجه‌گیری کلی

تنش حرارتی بر روی نرخ رشد، عملکرد سیستم ایمنی و همچنین نرخ مرگ و میر طیور، تأثیر منفی دارد. اطلاعات حاصل از داده‌های ریزآرایه در به‌دست آوردن و شناسایی ژن‌ها و مسیرهای زیستی و سیگنالینگ، به‌طور موفقیت‌آمیزی ۱۱۵ ژن در دو گروه جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی و جوجه‌های گوشتی در شرایط بدون تنش گرمایی شناسایی کرد که در فرآیند مسیرهای زیستی و سیگنالینگ مرتبط با عملکرد ژن‌ها در شرایط تنش گرمایی دخالت دارند. آن‌ها را می‌توان از جمله ژن‌هایی طبقه‌بندی نمود که در بین گونه‌های مختلف یکسان می‌باشند. در این تحقیق، تشخیص ژن‌های مؤثر و ماژول‌های عملکردی، کمک قابل توجهی در شناسایی مسیرهای مختلف زیستی باتوجه به اینکه، این ژن‌ها و گروه‌های عملکردی ممکن است عامل مهمی برای جوجه‌هایی که تحت استرس گرمایی قرار می‌گیرند باشند، کرد. ماژول‌های شناسایی شده ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب دارای ۴۶، ۲۴، ۱۹ و ۳۱ ژن بودند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژن‌های PTEN، IMP4، NEDD4، ATG7، HSPH1، HSPA2 و HSPA4 اشاره نمود که مسیرهای زیستی اسپلایسوزوم، یوبیکویتین واسطه‌گر پروتئولیز، بیوژنز ریبوزوم در یوکاریوت‌ها، پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و اتوفاژی-حیوانی را کد کردند و همچنین مسیرهای سیگنالینگ شناسایی شده مرتبط با مسیرهای زیستی مؤثر در تنش گرمایی، شامل سیستم ایمنی ذاتی، اینترفرون گاما، MAPK Pathway، پیری سلولی، فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT، نقل و انتقالات وزیکولی و فیبروز کیستیک (تنظیم تخریب deltaF508 CFTR در فیبروز کیستیک) است.

REFERENCES

1. Aalaei, M., Shahir, M. H., Mamouei, M. & Sallary, S. (2014). Effects of early age feed restriction and thermal conditioning on growth and carcass characteristics in broiler chickens subjected to heat stress. *Iranian Veterinary Journal*, 10(1), 5-12**.**
2. Ain Baziz, H., Geraert, P.A., Padilha J.C.F. & Guillaumin, S. (1996). Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partitionin broiler carcasses. *Poultry Science Journal*, 75, 505-513.
3. Al-Saffar, A. (2009). The Interaction of dietary lysine and temperature on the reproductive performance of broiler breeders. *2nd Mediterranean Summit of Word Poultry Science Association*, Antalya, Turkey, 4-7 October 2009, 143-147.
4. Arabiyan, E., Hashemi, R., Yamchi, A., Davoodi, H. & Rostami, Sh. (2019). Evaluation of NF-*k*B gene expression in liver tissue of broiler chickens fed with silver nanoparticles as an indicator of inflammation induction in heat stress conditions. *Research on Animal Production Journal*, 10(24), 103-111.
5. Babaabasi, B. (2017). *Cellular and molecular bioinformatics*. 2th edition, Dr. Khalili publications, Tehran, Iran, 333p.
6. Bader, G.D. & Hogue, C.W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 2.
7. Barbasi, A. L., Gulbahce, N. & Loscalzo, J. (2011). Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 56-68.
8. Cole, J. B., Lewis, R. M., Maltecca, C., Newman, S., Olson, K. M. & Tait, R. G. (2013). Systems biology in animal breeding: identifying relationships among markers, genes, and phenotypes, *Breeding and Genetics Symposium*, 91, 521-522.
9. Estabrooks, S. & Brodsky, J. L. (2020). Regulation of CFTR biogenesis by the proteostatic network and pharmacological modulators. *Molecular Sciences Journal*, 21(2). doi: 10.3390/ijms21020452.
10. Feizi, A., Dadian, F. & Asadzadehmajdi, S. (2012). The effect of heat stress on some blood parameters, biochemical values and humoral immunity in broiler chickens. *Veterinary Clinical Pathology Journal*, 6(3), 1621-1627.
11. Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. (2004). Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20, 307-315. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg405.
12. Gomes-Alves, P., Couto, F., Pesquita, C., Coelho, A. & Penque, D. (2010). Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 856-65.
13. Hu, X. & Ivashkiv, L.B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-γ: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity Journal*, 31(4), 539-550.

14. 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 Journal*, 12(2), 115-121.
15. Kadarmideen, H. N., Watson-Haigh, N. S. & Andronicos, N. M. (2011). Systems biology of ovine intestinal parasite resistance: disease gene modules and biomarkers. *Molecular Biosystems*, 7(1), 235-246.
16. Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research Journal*, 28(1), 27-30.
17. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman, 4th Edition, 1184p.
18. Lotia, S., Montojo, J., Dong, Y., Bader, G. D. & Pico, A. R. (2013). Cytoscape app store. *Bioinformatics*, 29(10), 1350-1351.
19. Marcos-Carcavilla A., Mutikainen, M., Gonzalez, C., Calvo, J. H., Kantanen, J., Sanz, A., Marzanov, N.S., Perez-Guzman, M.D. & Serrano, M. (2010). A SNP in the HSP90AA1 gene 5' flanking region is associated with the adaptation to differential thermal conditions in the ovine species. *Cell Stress Chaperones*, 15, 67-81.
20. Mashaly, M. M., Hendricks, G. L., Kalama, M. A., Gehad, A. E., Abbas, A. O. & Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune response of laying hens. *Poultry Science Journal*, 83(6), 889-894.
21. Mokaram, P., Dastghaib, S., Siri, M. & Rezayi, S. (2018). Evaluation of endoplasmic reticulum stress mechanism and unfold protein response signaling in cancer. *Sadra Medical Sciences Journal*, 6(4), 317-330.
22. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. & Vilo, J. (2019). g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research Journal*, 47, 191-198.
23. Rezvannejad, E., Mortazavi, M. & Riahi Medvar, A. (2016). Software modeling of heat-shock protein 70 (HSP70) of poultry. *Novin Genetics*, 11(2), 173-183. (in Farsi)
24. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research Journal*, 43(7), e47-e47.
25. Sadrzadeh, A. (2012). *Principles of Diseases Prevention in Poultry Broilers*. (1st ed.). M. Sc. Thesis, Islamic Azad University Garmsar Branch, Garmsar, 1126p. (in Farsi)
26. Sangster, T.A., Lindquist, S. & Queitsch, C. (2004). Under cover: causes, effects and implications of HSP90- mediated genetic capacitance. *Bioessays*, 26, 348-362.
27. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research Journal*, 13(11), 2498-2504.
28. Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D. & Zhou, X. (2019). Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer. *Molecular Medicine Reports Journal*, 19(6), 4529-4535.
29. Slawinska, A., Hsieh, J.C., Schmidt, C.J. & Lamont, S.J. (2016). Heat stress and lipopolysaccharide stimulation of chicken macrophage-like cell line activates expression of distinct sets of genes. *Plos One Journal*, 11(10), 1-17.
30. Smaili, M., Deldar, H. & Ansari Pirsaraei, Z. (2016). Effect of Mentha piperita powder and Citrus aurantium extract on heat shock protein (HSP70) gene expression and some blood parameters of broilers chickens in heat stress condition. *Animal Sciense Research Journal*, 26(3), 115-124.
31. Song, XY., Luo, QB. & Zhang, XQ. (2010). *Gene Expression Profiling of Three Tissues in Chicken with Heat Stress by Affymetrix Microarray*. NCBI, GEO: GSE23592.
32. Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N. & Zhou, H. F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Receptors and Signal Transduction Journal*, 35(6), 600-604.
33. 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., (2018). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research Journal*, 47(D1), D607-D613.
34. Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C.T. & Maitland, A. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research Journal*, 38(suppl_2), W214-W220.
35. Yari, R. (2011). Cell ageing and biotechnology. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 1(4), 7-26.
36. Zhao, Y., Tyshkovskiy, A., Muñoz-Espín, D., Tian, X., Serrano, M., De Magalhaes, J. P., Nevoi, E., Gladyshevc, V. N., Andrei Seluanova, A. & Gorbunova, V. (2018). Naked male rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. In: Proceedings of the *National Academy of Sciences* of the United States of America, 115(8), 1801-1806.