

## آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین بر اساس ژن‌های تغییر بیان یافته در بافت ریه برای بیماری آنفولانزای مرعی

• آزاده ترابی (نویسنده مسئول)

استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج، ایران

• زهرا رودباری

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۱۲-۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۲-۲۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲-۰۲-۰۹ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۱۰-۰۱

Emali: azadehtorabi@gmail.com



### چکیده

شیوع بیماری آنفولانزای پرندگان با مرگ‌ومیر بالا، کاهش تولید تخم و کشتن اجباری گله‌های آلوده، تأثیر مخربی بر صنعت طیور دارد. براساس پروتئین مرکزی ویروس به سه زیر گروه A, B, C تقسیم می‌شود. ویروس آنفولانزای نوع A بسیار شایع می‌باشد این ویروس می‌تواند باعث ابتلای گونه‌های مختلف پستانداران و پرندگان شود و بیماری‌زایی بیشتری نسبت به آنفولانزای B, C دارد و تقریباً همه ساله باعث اپیدمی با شدت‌های مختلف می‌شود. اهداف اصلاح نژادی برای حفظ سلامت حیوانات منجر به رفاه حیوانات و جلوگیری از ضررهای اقتصادی می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، استفاده از روش آنالیز شبکه زیستی به منظور شناسایی نشانگرهای کلیدی جدید درگیر در بیماری آنفولانزای مرعی می‌باشد. در این مطالعه به منظور دستیابی سریع به مهم‌ترین ژن‌های درگیر در این بیماری داده‌های ریزآرایه بیان ژن مربوط به بافت ریه جوجه‌های آلوده به ویروس از سایت GEO با شماره دسترسی GSE۵۳۹۳۱ تهیه گردید. رسم شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. آنالیز کمپلکس‌های پروتئینی به کمک MCODE انجام گردید. سه کمپلکس پروتئینی استخراج شد. پروتئین‌های seed در کمپلکس‌ها عبارتند از MSH۴, RPL۱۰A, NOB۱ که بعنوان نشانگر کلیدی معرفی شدند، همچنین ژن‌های RPL۱۸A, RNF۱۴۶, CSRNP۱, NEB, RPF۱ با کم‌ترین درجه بیان و ژن‌های SLC۱۷A۸, SLC۶A۲۰, PLN, TMEM۱۷۹, NOXO۱ با بیشترین درجه بیان در مطالعه حاضر می‌باشند. بیشتر ژن‌ها در رونویسی، تکثیر، ترجمه ژن در ویروس آنفولانزا نقش دارند. آنالیزهای بر پایه شبکه می‌تواند به تشخیص ژن‌های درگیر در بیماری و ماژول عملکردی پردازد، که این امر می‌تواند کمک قابل توجهی در شناسایی عوامل تنظیم کننده و فرآیندهای زیستی دخیل در پاسخ به بیماری آنفولانزای مرعی داشته باشد.

کلمات کلیدی: آنفولانزای طیور، آنالیز شبکه، ریز آرایه، کمپلکس پروتئینی، ژن‌های متفاوت بیان شده

- Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 68-76

### Analysis of protein-protein interaction network based on altered genes expressed in lung tissue for avian influenza disease

By: Torabi, A., (Corresponding Author) Assistant professor, Animal science research institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Iran.. and Roudbari, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

Received: 2023-03-11 Accepted: 2023-05-17

Revised: 2023-04-29 Published: 2023-12-22

Email: azadehtorabi@gmail.com

The spread of bird flu disease with high mortality, reduced egg production and forced killing of infected flocks has a devastating effect on the poultry industry. Based on the central protein, the virus is divided into three subgroups A, B, and C. Influenza type A virus is very common. This virus can infect different species of mammals and birds, and it is more pathogenic than influenza B and C, and it causes epidemics of different severities almost every year. Breeding goals to maintain the health of animals lead to the well-being of animals and prevent economic losses. The purpose of this research was to use biological network analysis method to identify new key markers involved in bird flu disease. In this study, in order to quickly obtain the most important genes involved in this disease, gene expression microarray data related to the lung tissue of chickens infected with the virus was prepared from the GEO site with the accession number GSE53931. The protein-protein interaction network was drawn by Cytoscape software. Protein complexes were analyzed using MCODE. Three protein complexes were extracted. The seed proteins in the complexes include RPL10A, NOB1, and MSH4, which were introduced as key markers, as well as NEB, RPF1, CSRNP1, RNF146, and RPL18A genes with the lowest level of expression and SLC6A20, PLN, SLC17A8, NOXO1 and TMEM179 gene with the highest level of expression in the present study. Most of the genes are involved in the transcription, replication, translation of the gene in the influenza virus. Network-based analyzes can detect effective genes and functional modules, which can significantly help in identifying regulatory factors and biological processes involved in the response to avian influenza, and subsequently, better control of the disease.

**Keywords:** avian influenza, network analysis, microarray, protein complex, differentially expressed genes

### مقدمه

می‌کند، سبب نگرشی جامع در پیشگیری و درمان این آلودگی حتی در میزبان‌ها می‌شود و بررسی سازوکارهای بیماری‌زایی و اثرات متقابل ویروس میزبان در سطح بیان ژن می‌تواند منجر به توسعه واکسن‌ها و داروهای مؤثر برای این عفونت شود (۲۲). ویروس آنفولانزا از گلیکان‌های استفاده می‌کند که حاوی بخش‌های اسید سیالیک به عنوان گیرنده‌های سطح سلولی هستند که از نظر ساختار از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است. ویروس‌های آنفولانزای سازگار با انسان دارای HA با اولویت اتصال برای گیرنده‌های سلولی هستند که حاوی بخش‌های اسید سیالیک مرتبط با  $\alpha 2-6$  (Gal-NeuAc $\alpha 2$ ) هستند که عمدتاً در سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفسی فوقانی انسان یافت می‌شوند، در حالی که ویروس‌های پرندگان گیرنده‌هایی را ترجیح می‌دهند که با قسمت‌های اسید سیالیک متصل به  $\alpha 2-3$  (Gal-NeuAc $\alpha 2$ ) می‌باشد که بر روی سلول‌های اپیتلیال در روده‌ها و دستگاه تنفسی پرند یافت می‌شوند. این تفاوت کوچک در ساختار گلیکان یک مانع از آلوده کردن ویروس‌های آنفولانزای مرغی به انسان است یک مانع دیگر آن موسین‌های تولید شده توسط سلول‌های اپیتلیوم دستگاه تنفسی فوقانی است این پروتئین سرشار از سیالوزیدهای مرتبط با  $\alpha 2-3$  هستند و برای

بیماری آنفولانزای مرغی به دلیل وارد کردن خسارات زیاد به صنعت تولید طیور و دیگر صنعت‌های وابسته، دارای اهمیت زیادی است. علی‌رغم تلاش‌های بسیار برای کنترل آن، شیوع آن هر ساله اتفاق می‌افتد. تنوع و توزیع جغرافیایی ویروس‌های آنفولانزا که در بین پرندگان اهلی و وحشی در گردش است، بی‌سابقه می‌باشد حتی اگر احتمال آلودگی انسان‌ها، با این ویروس بسیار کم باشد، تهدید آن برای اقتصاد مبتنی بر صنعت مرغداری، بسیار قابل توجه است (۳۳). علم ژنتیک نقش مهمی در شناسایی و پاسخ به عفونت ویروسی دارد. آماده‌سازی در برابر شیوع بیماری آنفولانزا که تولید واکسن‌های کارآمد بخش مهمی از آن می‌باشد، موضوع پیچیده‌ای است که با پژوهش‌های ژنتیکی به عنوان یک بخش اساسی نیاز به همکاری دارد، ردیابی بیان ژن‌ها در کل سطح ژنوم، روشی مؤثر جهت پیدا کردن تغییرات ژنتیکی غیر معمول در جوجه‌های آلوده به ویروس آنفولانزا با استفاده از فناوری ریزآرایه DNA است. در پژوهش‌های اخیر برای افزایش آگاهی تغییرات سلولی و ملکولی در آلودگی آنفولانزا از این تکنیک استفاده می‌شود. میزان پاسخ میزبان به عفونت آنفولانزا و اثراتی که ویروس در پرند ایجاد

بیان ژن در سلولها را برای دهها هزار ژن به طور همزمان فراهم می‌کند. توانایی اندازه‌گیری تغییرات در فعالیت رونویسی یک سلول در پاسخ به یک محرک خارجی، یک رویکرد سیستمی را امکان‌پذیر می‌کند (۱۰). در دسترس بودن داده‌های قابل اعتماد مولکولی یکی از پیش‌زمینه‌های اساسی در بازسازی فرایندهای مولکولی به سطح شبکه‌ها برای شناسایی عملکرد و تنظیم شبکه‌های پیچیده زیستی ضروری است. به همین دلیل روش‌های محاسباتی مختلف در حوزه بیوانفورماتیک از جمله تئوری گراف برای تجزیه و تحلیل داده‌های زیستی در سطح سامانه‌ها به کار گرفته می‌شود. یکی از کاربردهای بیوانفورماتیک تحلیل داده‌های مختلف ژنومی برای یافتن منشأ ژنتیکی بیماری‌هاست (۱۰). تا به امروز، مکانیسم‌های زمینه‌ای برای حساسیت طیور به آنفلوانزا و پاسخ ایمنی مؤثر به طور کامل کشف نشده است هدف از پژوهش حاضر تجزیه و تحلیل پروفایل ریزآرایه‌های ترانسکریپتومی مربوط به طیور درگیر به ویروس آنفلوانزا و ترسیم شبکه پروتئین-پروتئین جهت شناسایی ژن‌ها با بیشترین اثر در کنترل بیماری پرداخته می‌شود.

### مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر جهت استخراج داده‌های ریزآرایه از بخش GEO بانک اطلاعاتی NCBI استفاده شد. این پایگاه اطلاعاتی داده‌های مرتبط با بیان ژن با روش‌های مختلف را ذخیره کرده و دارای ابزاری جهت تجزیه و تحلیل آن‌ها به منظور تشخیص ژن‌ها با بیان متفاوت است (۲۰). پروفایل بیان ژن مربوط به بافت ریه با شناسه GSE۵۳۹۳۱ از پایگاه GEO دانلود شد. داده‌ها توسط HU و همکارانش در سال ۲۰۱۵ منتشر شده است که در تحقیق شان جوجه‌ها با CK۱۰ تلقیح شده بودند و ۲۴ ساعت پس از آلودگی، ریه‌ها جوجه برای استخراج RNA و هیبریداسیون روی ریزآرایه‌های Affymetrix جدا شدند (۸). ویروس CK۱۰ مشتق شده از سویه H۵N۱ می‌باشد H۵N۱ سویه فوق حاد می‌باشد دلیل این‌که H۵N۱ خطرات زیادی دارد، توانایی آن برای عبور از پرنددهای وحشی به مرغ و سپس به انسان است. در حالی که پرنددهای وحشی عمدتاً به اثرات مخرب و احتمالاً کشنده H۵N۱ ایمن هستند، این ویروس بیش از نیمی از انسان‌ها و همه مرغ‌هایی که به آن مبتلا شده‌اند کشته است. ویروس CK۱۰ در مرغ و اردک‌ها با کاهش سطح بیان PA-X (پروتئینی که به تازگی کشف شده است) افزایش می‌یابد و با کاهش ایمنی بدن سبب مرگ طیور می‌شود. پروتئین PA-X بیماری‌زایی ویروس H۵N۱ را کاهش می‌دهد به طوری که از دست دادن بیان PA-X باعث افزایش تکثیر ویروس در سلول‌های ریه جوجه‌ها و اردک‌ها می‌شود، که بیشتر نشان می‌دهد اثر PA-X بر تکثیر ویروس‌ها موجب تغییر در واگرداری می‌شود (۹). بعد از پیش‌پردازش داده‌ها آنالیز بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار Geo۲R انجام شد Geo۲R یک ابزار تعاملی است که به کاربران اجازه می‌دهد دو یا چند گروه را باهم مقایسه کنند و ژن‌هایی با بیان‌های متفاوت در شرایط آزمایشگاهی را شناسایی کنند. همچنین Geo۲R رابط کاربری ساده‌ای را فراهم می‌کند که کاربران را قادر می‌سازد تجزیه و تحلیل آماری بدون تخصص و تسلط بر مسیرهای انجام تجزیه و تحلیل برنامه‌نویسی انجام دهند و فایل ماتریسی داده‌های اصلی به طور مستقیم بررسی کنند (۲۹). در این مطالعه نرم‌ال سازی چارکی و خلاصه

به دام انداختن ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان و جلوگیری از اتصال آن‌ها به سلول‌های اپیتلیال عمل می‌کند (۲۷) این ویروس از خانواده ارتومیکسوویروس‌ها می‌باشد و براساس پروتئین مرکزی ویروس به سه زیر گروه A, B, C تقسیم می‌شود. ویروس آنفلوانزای نوع A بسیار شایع می‌باشد و به میزبانی مرغ عادت کرده است. این ویروس می‌تواند باعث ابتلای گونه‌های مختلف پستانداران و پرندگان شود و بیماری‌زایی بیشتری نسبت به آنفلوانزای B, C دارد و تقریباً همه ساله باعث اپیدمی با شدت‌های مختلف می‌شود (۱). نوع A تحت آنتی‌ژن‌های H و N تقسیم‌بندی می‌گردد. امروزه تمامی ویروس‌هایی که در آزمایش‌ها جداسازی می‌شوند از گونه‌ی A این ویروس و از زیررده‌های H۵ و H۷ هستند (۱۴). بر اساس بیماری‌زایی در مرغ، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان (AIVs) را می‌توان به ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی زیاد و کم (به ترتیب HPAIVs و LPAIVs) طبقه‌بندی کرد. برخی از سویه‌ها نظیر H۹N۲ آسیایی حدت بیماری‌زایی نسبتاً بالایی برای ماکیان داشته و ممکن است علائم شدیدتر و مرگ و میر بیشتری داشته باشند و موجب بروز ناگهانی علائم شدید و مرگ و میر صد در صدی طی دو روز شوند (۱۳) در حالی که مرغ معمولاً می‌تواند عفونت LPAI را تحمل کند و در عرض چند روز تسلیم عفونت با HPAI می‌شود (۱۴). تغییرات اسید آمینه ژن‌های پلیمرز PA (T۵۱۵A) و PB۱ (Y۴۳۶H) فاکتورهای حدت هستند. جایگزینی دو اسید آمینه S۲۲۴P و N۳۸۳D در PA نیز به فنوتیپ بسیار خطرناک کمک می‌کند. علاوه بر این، تغییر ژن HA و PA باعث تکثیر بالای ویروس و یک پاسخ ایمنی ذاتی شدید در مرغ می‌شود. اگرچه چندین فاکتور حدت شناسایی شده است، عوامل میزبان نیز مسئول پاتوژنز عفونت‌ها هستند. افزایش تولید سیتوکین التهابی و کموکاین، هموستاز سیستم تنفسی، ایمنی را در طول عفونت ویروس آنفلوانزا از بین می‌برد، این در حالی است که ماکروفازهایی که به ریه‌های آلوده به آنفلوانزا مهاجرت می‌کنند، نقش بیماری‌زایی در التهاب ریوی دارند (۳۵). مطالعات نشان می‌دهد ویروس‌هایی که پاسخ ایمنی ذاتی قوی‌تری را القا می‌کنند کمتر از آنهایی هستند که پاسخ ایمنی ذاتی ضعیف‌تری را القا می‌کنند، تکثیر می‌شوند. پوشش ویروس آنفلوانزا دارای دو نوع گلیکوپروتئین به نام‌های هم‌آگلوتینین (HA) (Hemagglutinin) و نورآمینیداز (Neuraminidase) (NA) است و درون پوشش، پروتئین‌های ماتریکس (M۱) و پروتئین‌های غشایی (M۲) قرار دارند (۱۱). هم‌آگلوتینین دارای ۱۶ زیرمجموعه (H۱۶-H۱) است و نورآمینیداز دارای ۹ زیرمجموعه است. همه ۱۶ زیرمجموعه در اردک‌ها و پرنددهای آبی (که به صورت مخازن طبیعی میزبان گونه‌های ویروس‌ها هستند) یافت می‌شود. برای مثال H۴, H۳ و H۶ بیشتر در اردک‌های شمال آمریکا رایج است. H۱ و H۳ در خوک، H۳ در اسب، H۵ و H۷ در مرغ‌ها وجود دارند (۲۵). پاسخ میزبان به آنفلوانزای پرندگان بین گونه‌های مختلف متفاوت است، این تفاوت به دلیل بیان ژن‌های مختلف می‌باشد. ژن‌های زیادی در مسیرهای پاتوژنز عفونت ویروسی آنفلوانزا که شبکه‌های پیچیده را تشکیل می‌دهند، دخیل هستند (۱۲). روش‌های تجزیه و تحلیل شبکه پروتئین-پروتئین در معرفی ارتباط میان ژن‌ها و صفت‌های پیچیده کاربرد دارد (۱۶). تکنیک‌هایی مانند آنالیز ریزآرایه امکان اندازه‌گیری

و آنالیز شد. نمایی از شبکه برهمکنش پروتئین‌های دخیل در آنفولانزای طیور ترسیم و تغییر رنگ بر اساس میزان بیان ژن‌ها نمایش داده شده است (شکل ۱). رنگ آبی نشان‌دهنده ژن‌های با بیان پایین و رنگ قرمز ژن‌های با بیان بالا می‌باشند و ژن‌هایی که تغییر رنگ زیادی ندارند میزان تغییرات بیان کمتری دارند.

طبق اطلاعات david ژن NEB در مجموعه رشته نازک عضله قلب دخیل است. پروتئین RPF۱ با  $5,0830$  fold change به عنوان پروتئین هم‌تعالف با NS۱ می‌باشد که پروتئینی با چند عملکرد حیاتی است و این پروتئین در سلول‌های آلوده به میزان زیادی بیان می‌شود. این پروتئین در کنترل بلوغ mRNA ویروس/میزبان، پیرایش و بیان ژن به نفع تکثیر ویروس نقش دارند (۱۸). ژن CSRN۱ در تنظیم رونویسی از پروموتور RNA پلیمرز II، مسیر سیگنالینگ گیرنده فاکتور رشد مشتق از پلاکت، مورفوژن سیستم اسکلتی، رشد کام، مورفوژن صورت نقش دارد. ژن RNF۱۴۶ در تنظیم مثبت مسیر سیگنالدهی WNT نقش دارد یکپارچگی اپیتلیوم ریه برای عملکرد طبیعی ریه ضروری است و سیگنال دهی WNT- نقش مهمی در رشد و ترمیم ریه پس از آسیب ایفا می‌کند. از دست دادن سیگنال WNT در ریه منجر به افزایش پاتوژن ویروسی می‌شود برخی مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سیگنال دهی WNT تکثیر IAV را مهار می‌کند و پاسخ‌های التهابی ناشی از IAV را کنترل می‌کند (۵). ژن RPL۱۸A این پروتئین ریبوزومی در ترجمه و همچنین در برخی عملکردهای خارج ریبوزومی مانند تعامل با IRES (محل ورود ریبوزومی داخلی) یا لنگر انداختن ریبوزوم‌ها به غشای نقش دارند و به دلیل تعامل با بسیاری از پروتئین‌های ویروسی، یک عامل حیاتی شناخته شده است (۲۳) براساس اطلاعات david ژن SLC۶A۲۰ در انتقال گلیسین، انتقال یون سدیم نقش دارد. ژن PLN در مسیر

سازی به وسیله الگوریتم RMA به عنوان روش استاندارد نرمال‌سازی داده‌ها انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار Geo۲R داده‌ها به نرم‌افزار اکسل انتقال داده شدند. ژن‌های افتراقی بیان شده با  $p\text{-value} < 0/05$  و  $(2 < \text{LogFC} < 2)$  مشخص گردید.

در ادامه برای ترسیم شبکه‌ی پروتئین- پروتئین از نرم‌افزار Cytoscape که بر پایه پلتفرم جاوا طراحی شده برای به تصویر درآوردن شبکه‌های پروتئینی استفاده شد (۲۴). بعد از ترسیم شبکه محل‌های متراکم شبکه که به کمپلکس موسوم‌اند، بررسی شدند. این مناطق در واقع بخش‌هایی می‌باشند که در آنجا ارتباط پروتئین‌ها با هم‌دیگر زیاد است و شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که از نظر خصوصیات زیستی می‌توانند بسیار مشابه باشند. این کمپلکس‌ها می‌توانند بخشی از یک مسیر زیستی را تشکیل دهند (۲۳). کمپلکس‌های پروتئینی توسط افزونه Mcode موجود در نرم‌افزار Cytoscape تعیین و بررسی گردید، این نرم‌افزار قابلیت مشخص کردن محل‌های پرتراکم را دارد (۲). در این کمپلکس‌ها، پروتئین‌هایی که بالاترین امتیاز ارتباطی را داشتند به عنوان پروتئین seed معرفی شدند. جهت شناسایی مسیرهای متابولیکی مرتبط با آنفولانزای طیور ژن‌هایی با بالاترین و پایین درجه بیان از نرم‌افزار david استفاده شد.

### نتایج

در مطالعه حاضر ۳۷۸۵۰ ژن شناسایی شد، نتایج آنالیز بیان ژن‌ها براساس  $p\text{-value} < 0/05$  و  $(2 < \text{LogFC} < 2)$  نشان داد ۱۳۳ ژن افزایش بیان و ۳۵۵ ژن کاهش بیان داشتند. ژن‌های با بالاترین و پایین‌ترین درجه بیان در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از شناسایی ژن‌های متفاوت بیان در این مطالعه شبکه برهمکنش پروتئینی بیماری آنفولانزای طیور ترسیم

جدول ۱ - ژن‌های با بالاترین و پایین‌ترین بیان.

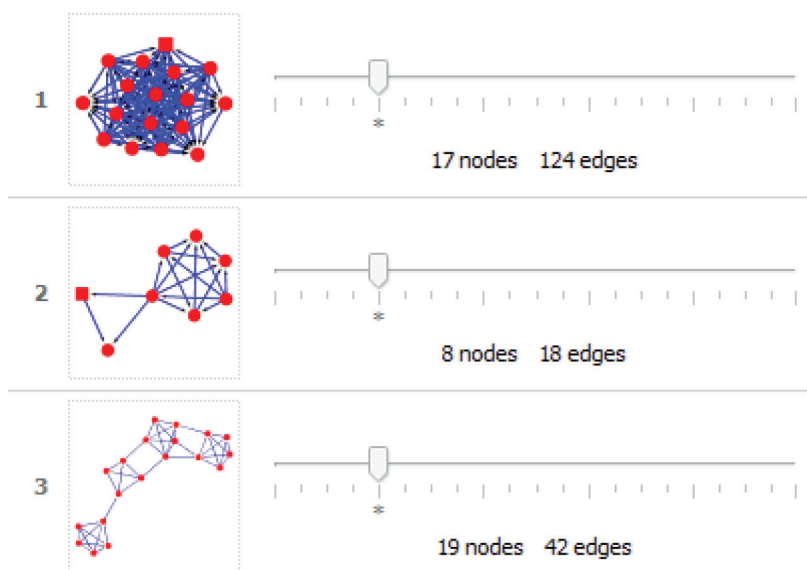
| gene    | FC        | P-Value  |
|---------|-----------|----------|
| NEB     | - ۶,۳۲۴۸۳ | ۰,۰۰۰۳۳۲ |
| RPF۱    | - ۵,۰۸۳۰۹ | ۰,۰۰۰۳۹۵ |
| CSRN۱   | - ۴,۴۷۶۷۷ | ۰,۰۰۰۰۲۱ |
| RNF۱۴۶  | - ۴,۳۱۷۸۱ | ۰,۰۱۳۹۱  |
| RPL۱۸A  | - ۴,۳۰۴۴۳ | ۰,۰۴۳۸۷  |
| SLC۶A۲۰ | ۳,۲۱      | ۰,۰۴۹۷۶۴ |
| PLN     | ۳,۲۳      | ۰,۰۱۷۳۷  |
| SLC۱۷A۸ | ۳,۴۲      | ۰,۰۰۳۸۱۸ |
| NOXO۱   | ۳,۶۹      | ۰,۰۰۱۸۰۲ |
| TMEM۱۷۹ | ۳,۷۷      | ۰,۰۰۴۲۰۹ |





ترجمه ویروس نقش دارد و ممکن است با مهار ترجمه mRNA سلولی میزبان و یا تحریک ترجمه mRNA ویروسی، ترجمه اختصاصی ویروس را ترویج کند (۱۷). ژن XRN1 به تکثیر ویروس آنفولانزای A و سرکوب آن کمک می‌کند. XRN1 بر القای IFN-b از طریق فسفوریلاسیون IRF3 تأثیر می‌گذارد. XRN1 می‌تواند تولید IFN-b را از طریق تأثیر بر مسیره‌های سیگنال دهی IFN با واسطه RIG-I و MDA5 مهار کند. IAV از XRN1 برای مهار فعالیت IRF3، سرکوب رونویسی سلولی IFN-b و سپس مسدود کردن سنتز پروتئین IFN از طریق سیستم ایمنی با واسطه RIG-I استفاده می‌کند (۱۵). ژن Sec61A1 که در کمپلکس یک می‌باشد یک عامل میزبان مورد نیاز برای تکثیر ویروس آنفولانزا است (۷). ژن GRB2 از جمله ژن‌های مرتبط با کمپلکس شماره سه می‌باشد. این ژن مرتبط با سیگنال‌دهی MAPK است که با سلول‌های B, T در ریه‌های موش مرتبط است (۳). یکی دیگر از ژن‌های مرتبط با کمپلکس سه PLCG1 می‌باشد که نشان دهنده اختلال در سیگنال‌دهی CD28 در سلول‌های کمکی T است و برای گسترش مؤثر سلول T اولیه مورد نیاز است (۶). زیرواحد پروتئازوم آلفا نوع ۲ (PSMA2) در کمپلکس سه می‌باشد و یک پروتئین اسید آمینه ۲۳۴ با وزن مولکولی ۲۵,۹ کیلو دالتون است که توسط ژن HC3 کدگذاری شده است و بر روی کروموزوم ۲ در طیور قرار دارد. همچنین یکی از ۱۴ زیر واحد ساختاری اساسی است که در پروتئازوم ۲۰S شناسایی شده است. به طور دقیق تر، PSMA2 ساختار حلقه را به همراه شش زیر واحد آلفای دیگر ایجاد می‌کند که ورود سوبسترا به داخل پروتئازوم را تسهیل می‌کند. ویروس آنفولانزای A، بیان بسیاری از پروتئین‌های سلولی میزبان را در سلول‌های آلوده تغییر

است که با نوکلئوپروتئین ویروسی (NP)، پیچیده شده است. NP یکی از پروتئین‌های ساختار اصلی در ویروس آنفولانزا، است که عملکردهای متعددی را که برای تکثیر و رونویسی vRNA در طول چرخه زندگی ویروس لازم است انجام می‌دهد. NHP2 یکی از پروتئین‌های سلولی میزبان همزمان با NP است (۲۶) و از مجموعه پروتئین‌های کمپلکس یک می‌باشد. MTOR از فرایندهای اصلی اتوفاژی، تنظیم کننده مرکزی پاسخ‌های سلولی به رشد ارگانسیم‌ها و هموستازی است. فعال‌سازی MTOR با سیگنال RPS6 مرتبط است. ژن RPS6 در سلول‌های اپیتلیال برونشیت انسانی به تدریج افزایش می‌یابد. این سیگنال با آلودگی H5N1 در ماکروفاژهای انسانی فعال می‌شود (۹). و در کمپلکس یک مطالعه حاضر وجود دارد. ژن دیگری که در کمپلکس یک می‌باشد و در مطالعات دیگر به نقش آن در آنفولانزا اشاره گردیده است ژن RPL24 می‌باشد که پروتئین ریپوزمی است و در رونویسی RNA ویروس آنفولانزا نقش دارد (۴) همچنین ژن RPL15 پروتئینی است که در تکثیر و ترجمه ویروس آنفولانزا نقش دارد (۲۹). ژن RPL32 یکی دیگر از پروتئین‌های کمپلکس پروتئینی شماره یک می‌باشد در روز اول پس از عفونت آنفولانزا کاهش می‌یابد. این ژن در متابولیسم نقش دارد و با پاسخ میزبان به پاتوژن تنفس مانند آنفولانزا مرتبط هستند، این ژن مربوط به چرخه سلولی است و رشد و تکثیر سلولی را مهار می‌کنند (۳۶). ABCE1 یکی دیگر از پروتئین‌های کمپلکس یک می‌باشد و به عنوان یک مهارکننده RNase شناسایی شده است و فعالیت RNase را در طول عفونت‌های ویروسی تنظیم می‌کند (۱۹). ژن RPS3A که از ژن‌های مورد مطالعه در کمپلکس یک می‌باشد با ویروس آنفولانزا به شکل کمپلکس در تعامل هستند و در



شکل ۲- کمپلکس‌های پروتئینی بیماری آنفولانزای طیور اتصالات پروتئینی به رنگ آبی و پروتئین‌ها به شکل دایره‌هایی با رنگ قرمز، پروتئین‌های seed به شکل مربع در هر کمپلکس نشان داده شده است.

PLN, SLC17A8, RPL18A, SLC6A20, RNF146, CSRN1, RPF1, TMEM179, NOXO1 به عنوان ژن‌های با بیشترین و کمترین درجه بیان شناسایی شدند همچنین پروتئین‌های seed در کمپلکس‌های پروتئینی عبارتند از MSH4, RPL10A, NOB1 که بعنوان نشانگر کلیدی معرفی شدند بیشتر ژن‌ها از طریق رونویسی، تکثیر، ترجمه ژن در بیماری ویروس آنفولانزا مرگی نقش دارند. بیماری آنفولانزا با قدرت بیماری‌زایی بالا تهدیدات زیادی را برای بهداشت انسان و طیور بوجود می‌آورد که این امر موجب شده است که توجه بیشتری به این بیماری معطوف گردد. بهره‌گیری از ترنسکریپتومیکس جهت بررسی دقیق بیان ژن‌های تحت تأثیر ویروس آنفولانزا و دستیابی به اطلاعات صحیح‌تر و کامل‌تر ژنومی می‌تواند برای پیشگیری و درمان بیماری مورد استفاده قرار گیرد. همچنین تشخیص ژن‌های مؤثر و ماژول عملکردی، می‌تواند کمک قابل توجهی در شناسایی عوامل تنظیم‌کننده و فرایندهای زیستی دخیل در پاسخ به آنفولانزای مرگی باشد که در پی آن کنترل بهتری برای بیماری آنفولانزای مرگی را امکان‌پذیر می‌کند.

### منابع مورد استفاده

1. Arnold, U. 2018. Investigations into the cellular interactome of the PB2 protein expressed by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. Ph.D thesis. University of Hamburg, Berlin, Germany.
2. Bader, G. D. and Hogue, C. W. 2003. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, 4(1): 1-27.
3. Cameron, C. M., Cameron, M. J., Bermejo-Martin, J. F., Ran, L., Xu, L., Turner, P. V. and Kelvin, D. J. 2008. *Gene expression*

می‌دهد. بسیاری از این پروتئین‌ها با فیرونکتین تعامل دارند. پروتئین PSMAY یکی از سه پروتئین مهم در برهمکنش فیرونکتین است که در سلول‌های آلوده به ویروس آنفولانزا به شدت بیان می‌شود و این پروتئین میزبان حیاتی برای ویروس آنفولانزا است و احتمالاً در مراحل پایانی تکثیر ویروس نقش داشته باشد. این ژن همچنین باعث اختلال در چندین مسیر سیگنال‌دهی درگیر در پاسخ ایمنی، سیگنال‌دهی سیتوکین، رشد و تکامل ارگاناسم، استرس و آسیب سلولی (از جمله اتوفاژی و پاسخ پروتئین باز شده)، و پاسخ‌های سرطانی می‌شود. (۲۱). افزایش تولید سیتوکین هموستاز سیستم تنفسی و ایمنی را در طول عفونت ویروس آنفولانزا می‌شکند، در حالی که ماکروفاژهایی که به ریه‌های آلوده به آنفولانزا مهاجرت می‌کنند، نقش بیماری‌زایی در التهاب ریوی دارند. PSMAY که از جمله ژن‌های مورد مطالعه ما می‌باشد و در کمپلکس سوم است، مکان اولیه تکثیر ویروس آنفولانزا می‌باشد و گزارش شده است که در ریه روده اردک القا می‌شود (۳۰). ژن ROS1 که در کمپلکس شماره سه نقش دارد یکی دیگر از نشانگرهای زیستی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است که می‌تواند به طور اختصاصی بیماری‌های ریوی نقش داشته باشد (۲۸). RPL10A پروتئین seed در کمپلکس شماره یک مطالعه حاضر می‌باشد و از پروتئین‌های دخیل در گلیکولیز هوازی و بی‌هوازی است و از جمله پپتیدهایی است که در متابولیسم سلولی نقش دارد. عفونت آنفولانزا با سویه‌های مختلف باعث ارائه چندین پپتید کدگذاری شده توسط پروتئین‌های دخیل در متابولیسم سلولی می‌شود از جمله این پروتئین‌ها RPL10A می‌باشد (۳۱).

### نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر ۳۷۸۵۰ ژن شناسایی شد بررسی تغییرات بیان ژن نشان داد ۱۳۳ ژن بیان بالا و ۳۵۵ ژن بیان پایین دارد از این تعداد ژن‌های NEB,

جدول ۲- پروتئین‌های شرکت کننده در کمپلکس‌های پروتئینی مرتبط با آنفولانزای مرگی.

| شماره کمپلکس | نام ژن  | پروتئین seed | Fold Change | P.value    |
|--------------|---|--------------|-------------|------------|
| ۱            | NHP2, RPL19, RPL37, RPS6, RPL27A, RPL24, RPL15, RPL23, MRPL13, ABCE1, LOC81046, RPS2A, RPL25A, SEC61B, XRN1, SEC61A1, RPL10A      | RPL10A       | - ۲,۴۸۶۷    | - ۱,۶۳E-۰۶ |
| ۲            | DHX15, RIOK1, DDX66, SNRPC, NOB1, SF3A2, RNPC2, MIB1  | NOB1         | - ۲,۳۰۰۷۱   | ۰,۰۰۰۱۳۴   |
| ۳            | GRB2, CSNK1D, RPA2, PLCG1, PSMB5, RMI1 SEC13, SEC24C, PSMAY, GEN1, PSMA6, ROS1, COBL1, MST1R, ATAD2B, SEC22A, UBLCP1, RTEL1, MSH4 | MSH4         | - ۲,۰۷۷۶۱   | ۰,۰۲۷۱۹۹   |

- analysis of host innate immune responses during lethal H5N1 infection in ferrets. *Journal of virology*, 82(22): 11308-11317.
4. Cui, Morgan, D., Cheng, D. H., Foo, S. L., Yap, G. L., Ampomah, P. B., and Lim, L. H. 2020. RNA-Sequencing-Based transcriptomic analysis reveals a role for annexin-A1 in classical and influenza A virus-induced autophagy. *Cell*, 9(6):1399.
  5. Forero, A., Tisoncik, J., Watanabe, T., Zhong, G., Hatta, M., Tchitchek, N. and Katze, M. 2016. The 1918 influenza virus PB2 protein enhances virulence through the disruption of inflammatory and WNT mediated signaling in mice. *Journal of virology*, 90(5): 2240-2253.
  6. Green, R., Wilkins, C., Thomas, S., Sekine, A., Hendrick, D. M., Voss, K, and Gale, J. 2017. Oas1b-dependent immune transcriptional profiles of west nile virus infection in the collaborative cross. G3: Genes, Genomes, *Genetics*, 7(6): 1665-1682.
  7. Heaton, N. S., Moshkina, N., Fenouil, R., Gardner, T. J., Aguirre, S., Shah, p. s. and Marazzi, I. 2016. Targeting viral proteostasis limits influenza virus, HIV, and dengue virus infection. *Immunity*, 44(1): 46-58.
  8. Hu, J., Mo, Y., Wang, X., Gu, M., Hu, Z., Zhong, L. and Liu, X. 2015. PA-X decreases the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in avian species by inhibiting virus replication and host response. *Journal of virology*, 89(8): 4126-4142.
  9. Hu, Y., Lou, J., Mao, Y. Y., Lai, T. W., Liu, L. Y., Zhu, C. and Shen, H. H. 2016. Activation of MTOR in pulmonary epithelium promotes LPS-induced lung injury. *Autophagy*, 12(12): 2286-2299.
  10. Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocol*, 4(1): 44-57.
  11. James, S., Ola, B., Terrence, M.T., Jeffery, K.T., James, C.P. and Ian, A.W. 2006. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science*: 404-410.
  12. Kann, M. G. 2007 Protein interactions and disease: computational approaches to uncover the etiology of diseases. *Brief Bioinformatics*, 8: 333-346.
  13. Khadimian, S., Bayat, M., Azizi, A., Qadri, S., Zia, M.A. and Beheshti, Sh. 2011. Serological investigation of influenza disease in native chickens in the areas near the sea of Golestan province. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 6: 15-23.
  14. Klees, S., Schluter, J. S., Schellhom, J., Bertram, H., Kurzweg, A. C., Ramzan, F. and Gultas, M. 2022. Comparative investigation of Gene regulatory processes underlying avian influenza viruses in chicken and duck. *Biology*, 11(2): 219.
  15. Liu, Y. C., Mok, B. W. Y., Wang, P., Kuo, R. L., Chen, H., and Shih, S. R. 2021. Cellular 5'-3' mRNA exoribonuclease XRN1 inhibits interferon beta activation and facilitates influenza A virus replication. *Microbiological Research*, 12(4): 945-21.
  16. Mason, O. and Verwoerd, M. 2006. Graph Theory and Networks in Biology. *The Journal of Engineering and Technology* 2: 89-119.
  17. Ouyang, H., Wang, Z., Chen, X., Yu, J., Li, Z., and Nie, Q. 2017. Proteomic analysis of chicken skeletal muscle during embryonic development. *Frontiers in physiology*, 8 (281).
  18. Rahim, M., Klewes, L., Zahedi, A., Mai, S. and Coombs, K. M. 2018. Global interactomics connect unclear mitotic apparatus protein NUMA1 to influenza virus maturation. *Viruses*, 10(12): 731.
  19. Ramnani, B., Manivannan, P., Jaggernauth, S., and Malathi, K. 2021. ABCE1 regulates RNase L-induced autophagy during viral infections. *Viruses*, 13(2): 315.
  20. Ranaware, P. B., Mishra, A., Vijayakumar, P., Gandhale, P. N., Kumar, H., Kulkarni, D. D., and Raut, A. A. 2016. Genome wide host gene expression analysis in chicken lungs infected with avian influenza viruses. *PLoS One*, 11(4): e0153671.
  21. Rashid, M. 2022. Role of fibronectin-interacting cellular proteins in Influenza a virus infection in human lung epithelial. *Cells*, 13(2): 315
  22. Riel, D., Munster, V. J., Wit, E., Rimmelzwaan, G. F. and Kuiken, T. 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Immunopathology and Infectious Disease*, 171: 1215-1223.
  23. Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N. and Vidal, M. 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437(7062): 1173-1178.
  24. Shahsundi, sh. 2014. Dynamic evaluation of influenza virus multiplication and virus-host interactions. *Scientific Research Journal of Arak University of Medical Sciences*. 5: 1-20.
  25. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D. and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11): 2498-2504.
  26. Spackman, E. 2002. Influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3256-3260.
  27. Stevens, J., Blixt, O., Paulson, J. C. and Wilson, I. A. 2006. Glycan microarray technologies tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11): 857-864.
  28. Sun, W., Li, S., Yang, J., Yang, L., Quan, G. and Liu, N. 2015. Proteomics analysis of cellular proteins co-immunoprecipitated



with nucleoprotein of influenza a virus (H7N9). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11): 25982-25998.

29. Tatebe, K., Zeytun, A., Ribeiro, R. M., Hoffman, R., Harrod, K. S. and Forst, C. V. 2010. Response network analysis of differential gene expression in human epithelial lung cells during avian influenza infections. *BMC bioinformatics*, 11: 1-15.

30. Ulyanova, V., Shah Mahmud, R., Laikov, A., Dudkina, E., Markelova, M., Moštafa, A. and Ilinskaya, O. 2020. Anti-influenza activity of the ribonuclease Binase: cellular targets detected by quantitative proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21): 8294.

31. Vandervan, H. A., Petkau, K., Ryan-Jean, K. E., Aldridge Jr, J. R., Webster, R. G., and Magor, K. E. 2012. Avian influenza rapidly induces antiviral genes in duck lung and intestine. *Molecular immunology*, 51(3-4): 316-324.

32. Wahl, A., Schafer, F., Bardet, W. and Hildebrand, W. H. 2010. Hla class I molecules reflect an altered host proteome after influ-

enza virus infection. *Human immunology*, 71(1):14-22.

33. Wang, Y., Brahmakshatriya, V., Lupiani, B., Reddy, S. 2012. Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. *BMC Genomics*, 13(278).

34. Yang, J., Huang, X., Liu, Y., Zhao, D., Han, K., Zhang, L. and Liu, Q. 2020. Analysis of the microRNA expression profiles of chicken dendritic cells in response to H9N2 avian influenza virus infection. *Veterinary Research*, 51: 1-9.

35. Ye, Y., Fan, H., Li, Q., Zhang, Z., Miao, P., Zhu, J., Liu, J., Zhang, J., Liao, M. 2022. Differential proteome response to H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses infection in duck. *Frontiers in Immunology*, 19 (13): 965454.

36. Yildirim, M. A., Goh, K. I., Cusick, M. E., and Barabasi, A. L. 2007. Vidal Marc. Drug-target network. *Nat Biotechnol*, 25(10): 1119-1126.

