

شناسایی مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی به عنوان عامل اصلی تنظیم بروز کرچی در بوقلمون

- فاطمه بانکی زاده
دانش آموخته دکترای گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
- هدایت اله روشنفکر
استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
- محمد حسین بناءبازی (نویسنده مسئول)
استادیار بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- محمود نظری
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۹

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۵۲۴۷۰۹۹۹

Email: hossein.banabazi@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2020.352593.2113

چکیده

کرچی یک رفتار مادری و غریزه طبیعی در پرندگان است که تولید تخم را مهار می‌کند. بوقلمون یکی از پرندگانی است که بروز کرچی ممکن است بخش عمده ای از طول عمر اقتصادی آن را شامل شده و سودآوری اقتصادی صنعت پرورش آن را به میزان قابل توجهی تاثیر قرار دهد. زمینه ژنتیکی و عوامل محیطی و مدیریتی موثر بر بروز کرچی در طیور بخوبی شناسایی و به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اما سازوکار تنظیم مولکولی آن بطور کامل مشخص نیست. در مطالعه حاضر ترانسکریپتوم هیپوفیز بوقلمون مادر تجاری از نژاد بیوتی طی مراحل تخمگذاری و کرچی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۳۴ ژن متفاوت بیان شده بین دو گروه تشخیص داده شد، که ۲۲۹ ژن دارای بیان زیاد و ۱۰۵ ژن دارای بیان کم در گروه تخمگذار در مقایسه با گروه کرچ مشاهده شد. در این مطالعه نتایج آنالیز عملکرد ژن‌ها با استفاده از پایگاه KEGG نشان داد که ژن‌های مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی نقش موثری در کنترل کرچی بوقلمون-ها داشتند ($P < 0.05$). آنالیز شبکه ژنی نشان داد که ژن‌های *CANX*، *HSPA8*، *HSPBP1*، *P4HB* و *ATF4* ممکن است به عنوان تعدیل‌کننده‌های مهم هورمونی و سازوکارهای رفتاری مرتبط با کرچی عمل کنند.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 131 pp: 217-228

Identify protein processing in endoplasmic reticulum pathway as an effective factor in regulating broodiness of turkey

By: Fatemeh Bankizadeh¹, Hedayatollah Roshanfekar², Mohammad Hossein Banabazi*³, Mahmood Nazari⁴

1. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

2. Professor, Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of IRAN (ASIR), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. m.banabaz@areeo.ac.ir

4- Assistant Professor, Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Received: November 2019

Accepted: September 2020

Broodiness, the maternal behavior and instinct for natural breeding in poultry, inhibits egg production. The turkey is a bird with a prolonged broody behavior that may cause a loss in its industrial productivity. The genetic background and the environmental factors influencing broodiness in poultry have been extensively studied, but the molecular regulation mechanism of broodiness is somewhat unclear. In this research, the whole transcriptome profile of the pituitary was studied in commercial turkey broiler from BUT breed during the laying and broodiness periods. A total of 334 differentially expressed genes were identified. There were 229 upregulated and 104 downregulated at the egg-laying period compared with brooding ones. In the present study, the analysis of genes using KEGG revealed that the genes in the protein processing in the endoplasmic reticulum pathway ($P < 0.05$) are critical for controlling broodiness in the turkeys. Gene network analysis revealed that CANX, HSPA8, P4HB, HSPBP1, and ATF4 genes may likely act as main modulators of the hormonal and behavioral mechanism associated with broodiness.

Key words: Turkey, Broodiness, Transcriptome, Pituitary.

مقدمه

دوره‌ی کرچی تغییر می‌کند. در مرغ و بوقلمون، با وقوع کرچی غلظت پرولاکتین پلازما افزایش پیدا می‌کند و سطح mRNA پرولاکتین نیز طی این مرحله دارای بیان بیشتری است (El Halawani و همکاران، ۱۹۸۰؛ Proudman و Opel، ۱۹۸۱)، و سطح بالای پرولاکتین فعالیت کرچی را حفظ می‌کند (El Halawani و همکاران، ۱۹۸۴). افزایش سطح هورمون پرولاکتین با تحریک نوری و بلوغ جنسی ارتباط دارد. همچنین افزایش دمای محیط به سرعت سطح پرولاکتین را افزایش می‌دهد و در نتیجه وقوع کرچی را در بوقلمون‌ها سرعت می‌بخشد (El Halawani و همکاران، ۱۹۸۴). تولید تخم با آزادسازی تخمک از فولیکول‌ها آغاز می‌شود، و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد سیستم تولید مثل و تخمک‌گذاری را تنظیم می‌کنند (Yu و

کرچی (جوجه در آوری) خصوصیت رفتاری است که در آن پرنده تخم‌گذار تمایل به خوابیدن روی تخم دارد. وقتی پرنده کرچ می‌شود بیشتر در آشیانه می‌ماند و تخمدان و مجاری آن تخریب می‌شود. همچنین تعداد زیادی از فولیکول‌ها تحلیل رفته و جذب می‌شوند و تولید تخم متوقف می‌گردد. این کاهش یا توقف تولید تخم باعث رکود اقتصادی قابل توجهی در صنعت طیور می‌شود (Ye و همکاران، ۲۰۱۹). انتقال از مرحله تخم-گذاری به کرچی فرآیند پیچیده‌ای است که به دلیل اثر متقابل هورمونی ایجاد می‌شود. هورمون‌های اندوکرینی تولیدمثلی شامل گنادوتروپین (GnRH)، پرولاکتین (PRL)، هورمون لوتئین کننده (LH)، هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) و استرادیول (E2) و ارتباط آنها با ژن‌ها به طور معنی‌داری در طول

مبارزه با سلول‌های سرطانی، تنظیم مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس)، کمک به تجزیه‌ی پروتئین‌های نادرست تاخورد و تجمع یافته نقش دارند (Schwarz و همکاران، ۲۰۱۶). در این مطالعه بررسی ترانسکریپتوم هیپوفیز بوقلمون‌ها در دو مرحله تخم-گذاری و کرچی و با تاکید بر تفاوت بیان ژن‌های دخیل در مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی^۱ که مربوط به خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی هستند در دو مرحله از چرخه تولید مثلی انجام شد. هدف از این مطالعه بررسی ژنتیکی انتقال بین مرحله تخمگذاری و کرچی در سطح RNA-Seq و به دست آوردن نشانه‌های جدید در رفتار تولیدمثلی طیور است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش و نمونه گیری

در این مطالعه به منظور آنالیز ترانسکریپتوم، از بوقلمون‌های مادر گوشتی نژاد بیوتی (But Premium) شرکت آویازن انگلستان استفاده شد. دوره‌ی پرورش این پرنده با جیره پیشنهادی و تحت شرایط مدیریتی کاملاً کنترل شده انجام شد. یکی از نکات مورد توجه در مزارع بوقلمون بررسی صفت کرچی است. به صورت عملی مدیریت کرچی از هفته دوم تولید آغاز می‌شود. برای این منظور روش‌های متفاوتی وجود دارد که ما در گله حاضر طبق توصیه شرکت آویازن از روش رنگ کردن و انتخاب پرنده^۲ استفاده نمودیم. در نهایت در سن ۵۶ هفتگی تعداد ۱۲ پرنده انتخاب شد که شش عدد کاملاً کرچ و شش عدد تخمگذار بودند و همه برای نمونه‌گیری به کشتارگاه انتقال داده شدند. کشتار پرنده‌ها به صورت انفرادی انجام شد، و هیپوفیز پرنده‌ها تحت شرایط کنترل شده و در کوتاه‌ترین زمان ممکن جدا شدند و به فریزر ۸۰- انتقال پیدا کردند.

استخراج RNA و توالی‌یابی

استخراج RNA توسط تریزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانو درآپ و الکتروفورز سنجیده شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده شش نمونه RNA مختلف با غلظت یکسان از هر گروه از بوقلمون‌های کرچ و تخمگذار با هم ادغام شدند و

همکاران، ۲۰۱۶). پروژسترون و استروژن از هورمون‌های درون‌ریز مهمی هستند که باعث افزایش ترشح پرولاکتین می‌شوند. در پرنده‌های کرچ میزان هورمون‌های پروژسترون، استروژن و پرولاکتین افزایش پیدا می‌کند. جالب است که در گونه‌های پرندگان، سلول‌های گرانولوزا فولیکول فقط پروژسترون و سلول‌های تکا تستوسترون یا استرادیول تولید می‌کنند (Porter و همکاران، ۱۹۸۹). پروژسترون (P4)، به آرامی همراه با توسعه فولیکول‌ها افزایش می‌یابد اما مقادیر زیادی از پروژسترون می‌تواند باعث کاهش عملکرد تخمک‌گذاری تخمدان، آتروفی فولیکول و تحریک رفتار کرچی شود (Kezele and Skinner, 2003). در پرنده‌های کرچ میزان آتروفی در سلول‌های گرانولوزا افزایش پیدا می‌کند (Yu و همکاران، ۲۰۱۶). بررسی‌ها نشان داده است که در فرآیند آتروفی فولیکول‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی نقش دارند و بیان تعدادی از آن‌ها در پرنده‌های کرچ افزایش پیدا می‌کند (Yu و همکاران، ۲۰۱۶؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۸). در این مرحله میزان آپیتوزیس میتوکندریایی، پروتئین‌ها و ژن‌های مرتبط با استرس شبکه آندوپلاسمی به بالاترین سطح در سلول‌های گرانولوزا می‌رسد (Lin و همکاران، ۲۰۱۸). همچنین تفاوت بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های شوک حرارتی در بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس نیز به وضوح نشان داده شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۸). پروتئین‌های شوک حرارتی خانواده بزرگی از چاپرون‌های پروتئینی هستند که در پاسخ به افزایش دما و تنش‌های محیطی، استرس‌های فیزیکی و شیمیایی، سرما، اشعه‌ها و کمک به بهبود زخم‌ها بیان سریعی پیدا می‌کنند و به ترمیم سلول کمک می‌کنند (Reddy Bonam و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین این پروتئین‌ها در مجموع نقش تاخوردگی صحیح پلی‌پپتیدهای نوساز، باز کردن پلی‌پپتیدهای غلط تاخورد و جلوگیری از تجمع پروتئین‌ها را ایفا می‌کنند و علاوه بر این چاپرون‌های مولکولی در زمینه‌های دیگری از جمله هدایت صحیح پروتئین‌های سلولی به اندامک‌های هدف، انتقال یون‌های فلزی به اندامک‌های مختلف سلولی، کمک به سنتز گیرنده‌های آنتی ژنی دستگاه ایمنی، جلوگیری از پیری سلول و

آنالیز تفاوت بیان ژن

پیش از آنالیز افتراقی بیان مبتنی بر شمارش، رونوشت‌های با بیان پایین (کمتر از ده) حذف شدند. سپس توسط edgeR نسخه ۳.۱۰.۰ از بسته نرم‌افزاری Bioconductor تعداد شمارش‌های هر خوانش تصحیح شد. در نهایت آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها توسط برنامه DESeq2 مبتنی بر مدل خطی تعمیم یافته انجام شد. در نهایت ژنهایی که از نظر آماری P تصحیح شده کمتر از ۰.۰۵ داشتند شناسایی شدند (Ritchie و همکاران، ۲۰۱۵).

شناسایی و تعیین عملکرد ژن‌ها

به منظور بررسی حاشیه نویسی و مصور سازی ژن‌های متفاوت بیان شده در دو گروه پرند کرچ و تخم‌گذار از پایگاه اطلاعاتی DAVID به آدرس <https://david.ncifcrf.gov> استفاده شد. این پایگاه با اتصال به پایگاه‌های دیگری مانند هستی شناسی ژن (GO)^۵ و دایره المعارف کیوتو در زمینه ژن‌ها و ژنوم‌ها (KEGG)^۶ به بررسی عملکرد و مسیرهای مولکولی^۷، سلولی^۸ و بیولوژیکی^۹ می‌پردازد. عبارات با مقدار $P\text{-value} < 0.05$ که با روش FDR تصحیح شده بودند معنی‌دار در نظر گرفته شدند. ژن‌های حاصل از مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی به منظور تعیین شبکه ارتباط بین پروتئین‌ها به پایگاه داده String وارد شدند (شکل ۲). سپس جهت دستیابی به آماره‌های شبکه و تعیین نقش ژن‌ها، از نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.8.1 استفاده شد (شکل ۳). از نوار ابزار APPS گزینه CYTONCA نصب و شبکه بر اساس درجه ارزش ژن و مرکزیت بینایی ویرایش شد. به این ترتیب گره‌های پررنگ‌تر درجه کنترل‌کنندگی بیشتری در شبکه دارند و از نظر مرکزیت بینایی گره‌های کوچک‌تر نشان-دهنده تاثیر کمتر آن‌ها بر سایر ژن‌ها است (شکل ۲).

نتایج و بحث

پس از حذف خوانش‌های کم کیفیت، عمل هم‌ردیفی با ژنوم مرجع انجام شد. اطلاعات مربوط به تعداد خوانش‌ها قبل و بعد از ویرایش و همچنین میزان هم‌ردیفی خوانش‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

در نهایت سه نمونه ادغام شده از هر گروه (در مجموع شش نمونه)، آماده شد. سپس توالی‌یابی دو طرفه برای حدود ۳۰ میلیون خوانش ۱۵۰ جفت بازی (به ازای هر نمونه) روی پلتفرم Illumina HiSeq 2500 انجام گرفت. کنترل کیفیت داده‌ها بر روی فرمت fastq و با نرم‌افزار FastQC نسخه 0.11.2 انجام شد (Andrews، 2010). سنجش کیفیت داده‌ها برای هر خوانش بطور جداگانه با ۱۰ آزمون مختلف انجام می‌شود. طول همه خوانش‌ها در همه نمونه‌ها ۱۵۰ جفت باز و میانگین تعداد نوکلئوتیدهای خوانده نشده (N) برای همه خوانش‌ها صفر بود. پس از ویرایش خوانش‌ها بار دیگر عملیات سنجش کیفیت برای اطمینان از بهبود کیفیت داده‌ها انجام شد. ویرایش داده‌های خام توالی‌یابی شده توسط Trimmomatic نسخه 35 انجام شد (Bolger و همکاران، ۲۰۱۴). و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی کیفیت حذف شدند.

نقشه‌یابی داده‌های خام

به منظور مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع و تشکیل ترانسکرپت، ژنوم مرجع بوقلمون و اطلاعات حاشیه‌نویسی آن از بانک اطلاعات ncbi https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000146605.3 دریافت شد. هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه، پس از سنجش کیفیت، بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 نسخه 2.0.3 انجام شد (Kim و همکاران، ۲۰۱۵). ساده‌ترین روش برای برآورد بیان ژن‌ها، شمارش خوانش‌ها به ازای هر ژن می‌باشد. برای این منظور از نرم‌افزار Htseq-count (Hamzic و همکاران، ۲۰۱۶) بخشی از نرم‌افزار Htseq برای خوانش‌های هم‌ردیف شده در فرم‌های BAM و SAM استفاده شد که حاشیه‌نگاری ژنوم را بصورت GTT و GTF دریافت می‌کند. در این نرم‌افزار آگزون‌هایی که خوانش‌ها با آنها هم‌پوشانی داشت تشخیص داده شد. سپس شمارش‌های سطح آگزونی بر مبنای اسم ژنی آگزون‌ها در فایل GTF گروه بندی شد. در نهایت فایل خروجی شامل یک جدول از شمارش برای هر ژن تشکیل شد (Anders و همکاران، ۲۰۱۴).

جدول ۱- اطلاعات آماری خوانش‌ها قبل و بعد از ویرایش توالی‌های حاصل از RNA-Seq

نمونه‌ی بوقلمون‌های تجاری						خوانش‌ها
تخمگذار		کرچ				
نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱	
۵۰۴۱۱۶۶۵	۴۴۸۹۹۵۶۶	۵۵۹۲۳۵۶۶	۴۲۸۸۰۴۵۸	۴۰۶۱۸۰۲۸	۴۵۱۴۲۶۹۰	تعداد کل خوانش‌ها
۵۰۴۱۱۱۹۱	۴۴۸۹۹۳۲۱	۵۵۹۲۳۰۴۴	۴۱۰۶۳۸۶۰	۴۰۶۱۷۵۳۸	۴۱۵۰۹۹۸۴	خوانش‌های ویرایش شده
۸۱/۵۴	۸۱/۵۱	۸۱/۵۹	۸۳/۴۱	۸۳/۲۳	۸۳/۵۷	نرخ نقشه‌یابی

در این تحقیق تعداد ۱۳ ژن مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی در مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی پرنده‌های تخمگذار نسبت به پرنده‌های کرچ مشخص شد که میزان fold change آن‌ها از $-۳/۲۲۸۸۵$ تا $۳/۷۶۹۷۶$ متغیر بودند (جدول ۳)

آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها

هستی‌شناسی ژن و غنی‌سازی^۱ مسیر KEGG برای ژن‌های متفاوت بیان شده در دو گروه پرنده منجر به شناسایی مسیرهای مختلفی شد که مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی دارای ژن‌های مهم و کلیدی بود (جدول ۲).

جدول ۲- تفاوت بیان ژن‌های مربوط به مسیر شبکه آندوپلاسمی

نام ژن	عدد تفاوت بیان
DNAJB11	-۳/۲۲۸۸۵
STT3A	-۲/۱۱۹۱۳
HSPBP1	-۲/۰۰۴۸۲
HSPA8	-۱/۱۹۸۷۲
ATF4	-۱/۸۳۹۲۹
DNAJB2	-۱/۷۱۲۳۹
P4HB	-۱/۶۷۹۸۷
XBP1	-۱/۵۶۴۳۹
AMFR	۱/۴۹۰۳۳
NPLOC4	۱/۵۷۰۹۹
CANX	۲/۲۱۱۵۵
SEC62	۲/۲۵۶۶۸
CRYAB	۳/۷۶۹۷۶

کرچ بودند و سایر ژن‌ها در گروه کرچ بیان بالاتری داشتند. CRYAB جز گروه پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک

ژن‌های NPLOC4، CANX، SEC62، CRYAB و AMFR دارای بیان بالاتری در بوقلمون‌های تخمگذار نسبت به

P4HB در پرنده‌های کرچ می‌تواند به دلیل تاثیر بر تغییر بیان ژن رسپتورها و انتقال هورمون تیروئید به بافت باشد که همین موارد در مورد هورمون استروژن نیز صادق خواهد بود.

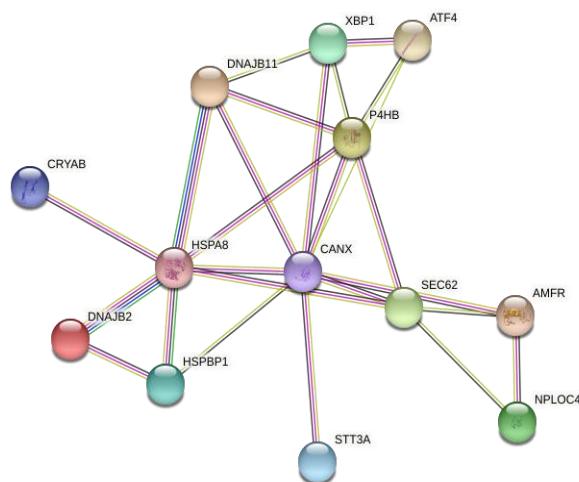
اتوفاژی فرآیند تخریب داخل سلولی است که تحت تاثیر لیزوزوم‌ها اتفاق می‌افتد و برای بقای سلول‌هایی که تحت محرومیت غذایی یا سایر استرس‌ها قرار گرفته‌اند مفید است (Liu و همکاران، ۲۰۱۸). تحقیقات نشان داده که اتوفاژی به طور مستقیم در تخریب و آتروفی فولیکول‌ها در پرندگان کرچ نقش دارد (Yu و همکاران، ۲۰۱۶).

پروتئین‌های شوک حرارتی دارای انواع مختلف و با نقش‌های متعددی هستند. در این مطالعه ژن‌های HSPA8، HSPBP1، ATF4، XBP1 و DNAJB11 در بوقلمون‌های کرچ بیان بالایی داشتند، تمام این ژن‌ها علاوه بر بیان در شرایط پاسخ به استرس در اتوفاژی نقش دارند. به عنوان نمونه مشخص شده که ژن ATF4 در تنظیم ژن‌های موثر در اتوفاژی فولیکول‌ها مثل ATGs دخالت دارد همچنین در شرایط سخت هاپوکسی بیان بالایی دارد (YU و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعات مختلف تعداد دیگری از این پروتئین‌ها از جمله HSPA8 در هیپوفیز و هیپوتالاموس پرنده‌های کرچ بررسی شد که برای این ژن‌ها تفاوت معنی داری در تخمدان و فولیکول‌ها نیز دیده شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۸). HSPBP1 همراه با HSPA8 در اتوفاژی نقش دارد. علاوه بر این تحقیقات نشان داده که این ژن در تنظیم رسپتورهای استروئیدی از جمله رسپتورهای گلوکوکورتیکوئید، مینرالوکورتیکوئید و آندروژن‌ها دخالت دارد (Regina و همکاران، ۲۰۱۴؛ Rual و همکاران، ۲۰۰۵).

ترسیم شبکه ژنی

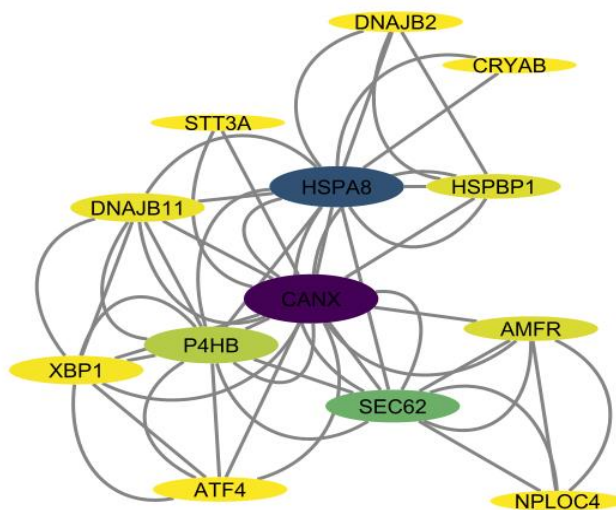
در نهایت ژن‌های ارائه شده برای مسیر پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی توسط نرم‌افزار KEGG به پایگاه String وارد شد و شبکه ژنی مربوطه ترسیم گردید (شکل ۱). بررسی ژن‌ها بیشترین ارتباط عملکردی بین پروتئین‌های شبکه را نشان داد. و ارتباط بین تمامی گره‌ها (ژن‌ها) نیز برقرار بود.

(sHSP) معروف به HSP20 است، که در شرایط بروز استرس با مهار پردازش پروتئین pro-apoptotic باعث ایجاد مقاومت در سلول‌ها می‌شود (Tang و همکاران، ۲۰۱۸) و به همین دلیل در این مطالعه در پرنده‌های تخم‌گذار بیان بالاتری داشت. بررسی‌ها نشان داده که CANX از چاپرون‌هایی است که علاوه بر دخالت در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و سیستم ایمنی در دوره‌ی تخم‌گذاری پرنده‌ها به دلیل خاصیت اتصال به کلسیم در تشکیل پوسته تخم دخالت دارد (Onchere و همکاران، ۲۰۱۰) و این می‌تواند دلیل بر بیان بالاتر این ژن در پرنده‌های تخم‌گذار نسبت به کرچ در این مطالعه باشد. ژن P4HB یکی از چاپرون‌هایی است که در این تحقیق به بررسی نقش آن در بوقلمون‌ها پرداخته شد. این ژن دارای بیان بالایی در پرنده‌های کرچ نسبت به تخم‌گذار بود و در پاسخ به استرس شبکه آندوپلاسمی یعنی هر فرآیند منجر به تغییر وضعیت یا فعالیت سلول (از نظر حرکت، ترشح، تولید آنزیم، بیان ژن و غیره) بیان می‌شود. همچنین این ژن در سیستم ایمنی، سیستم هورمونی و تولید مثلی نقش دارد. P4HB خاصیت اتصال بالا با هورمون T3 و استروژن دارد و با اتصال به رسپتورهای آن‌ها در تنظیم و بیان ژن‌های آن‌ها موثر است. علاوه بر این بیان بالای این پروتئین در سلول‌های GH3 هیپوفیز مانع بیان mRNA هورمون رشد (GH) و آزادسازی آن شده. بررسی‌ها نشان داده که P4HB با اتصال به هورمون T3 و استرادیول نقش ذخیره این دو هورمون را نیز انجام می‌دهد (Campose و همکاران، ۲۰۱۹). تحقیقات نشان داده که سطح هورمون رشد در پرنده‌های کرچ و تخم‌گذار متغیر است اما میزان آن در پرنده تخم‌گذار بیشتر است (Bedrak و همکاران، ۱۹۸۱) و به همین دلیل ممکن است پروتئین P4HB در پرنده‌های کرچ نسبت به تخم‌گذار بیشتر بیان شود. همچنین هورمون تیروئید برای فعالیت تولیدمثلی طبیعی در پرنده‌های ماده ضروری است طوری که کم کاری تیروئید منجر به کاهش تولید تخم، کاهش وزن تخم، کاهش ضخامت پوسته و کاهش وزن تخمدان شده و در موارد شدیدتر با قطع کامل تولید تخم همراه است (Anne McNabb، ۲۰۰۷)، بنابراین بیان بالاتر



سپس به منظور تعیین درجه اهمیت ژن‌ها اطلاعات موجود در خروجی استرینگ به نرم‌افزار Cytoscape انتقال یافت و شبکه ژنی با توجه به نوع ارتباطات بین ژنی آنالیز و رسم شد (شکل ۲). به این ترتیب بر اساس پارامتر درجه ژن‌های CANX، HSPA8 و P4HB به ترتیب بیشترین ارزش را داشتند.

شکل ۱- شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین ژن‌های شوک حرارتی شبکه آندوپلاسمی. تحلیل شبکه نشان می‌دهد که تعداد گره ۱۳، تعداد کمان ۲۵، میانگین درجه گره ۳/۲۸، ضریب کلاستری شدن ۰/۷۴۹، تعداد کمان مورد انتظار ۲ پرمایگی برهمکنش پروتئین- پروتئین و معنی داری بر اساس $P \text{ value} < 1.0E-16$ می‌باشد.



دهنده کاهش ارزش آن‌ها از نظر درجه و رنگ گره‌ها از روشن به تیره نشان دهنده افزایش گرایش ماندن در مرکز است.

شکل ۲- آنالیز شبکه ژنی در نرم‌افزار سیتواسکیپ بر اساس پارامترهای درجه (Degree) و مرکزیت بینابینی (Betweenness). اندازه گره‌ها از بزرگ به کوچک نشان

جدول ۳- نتایج مربوط به مسیرهای معنی دار KEGG

نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
Ribosome	9	3.98	4.51-E04	0.0254046	0.0254046	0.446491
protein processing in endoplasmic reticulum	13	6.32	1.77-E02	0.662848	0.662848	16.410070
Regulation of actin cytoskeleton	6	6.31	0.030839	0.8520429	0.615348	25.023533
Spliceosome	7	2.48	0.040465	0.905058	0.691873	33.597930

جدول ۴- نتایج مربوط به مسیرهای معنی دار در بخش فرآیند بیولوژیکی (BP)

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0031623	receptor internalization	3	3.15	0.0015929	0.9564642	0.9564642	12.696412
GO:0048168	regulation of neuronal synaptic plasticity	2	0.99	0.0375945	0.9999224	0.9911951	39.1562515
GO:0006412	translation	6	2.98	0.0018381	0.3652021	0.3652021	2.3573998
GO:0045124	regulation of bone resorption	6	2.10	0.0240711	0.9994756	0.9771011	90.7913646
GO:0014912	negative regulation of smooth muscle cell migration	2	2.105	0.0319677	0.9999577	0.9651702	35.3597469
GO:0042789	mRNA transcription from RNA polymerase II promoter	2	2.105	0.03980150	0.9999965	0.9570484	42.0422353

جدول ۵- نتایج مربوط به مسیرهای معنی دار در بخش عملکرد مولکولی (MF)

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0044822	poly(A) RNA binding	16	7.96	0.0010546	0.0702224	0.0702224	1.0829366
GO:0003735	structural constituent of ribosome	6	2.98	0.0028201	0.1770568	0.0928378	2.8721205
GO:0008270	translation zinc ion binding	12	5.97	0.0227970	0.7963193	0.4116308	21.1764012

جدول ۶- نتایج مربوط به مسیرهای معنی دار در بخش اجزای سلولی (CC)

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0005925	focal adhesion	12	12.63	1.08E-06	1.36E-04	1.36E-04	0.0012477
GO:0070062	extracellular exosome	28	29.47	2.28E-06	2.87E-04	1.4E-04	0.0026372
GO:0043209	myelin sheath	6	6.31	0.0012405	0.1447835	0.0507977	1.4271951
GO:0005615	extracellular space	9	9.47	0.0100556	0.7201281	0.2726560	11.0450640
GO:0005829	cytosol	9	9.47	0.0365514	0.9908294	0.6087275	35.0283385
GO:0005685	U1 snRNP	3	1.49	0.0022798	0.2022523	0.2022523	2.4968783
GO:0005687	U4 snRNP	2	0.99	0.0364924	0.9747851	0.8412082	33.7567804
GO:0034715	pICln-Sm protein complex	2	0.99	0.0454083	0.9899550	0.7842345	40.2396772

پاورقی

- ¹ Transcript
- ² Protein processing in endoplasmic reticulum
- ³ Paint and Take
- ⁴ Annotation
- ⁵ Generalized Linear Model
- ⁶ Gene Ontology Consortium
- ⁷ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- ⁸ Molecular function
- ⁹ Cellular component
- ¹⁰ Molecular function
- ¹¹ Enrichment
- ¹² Degree

منابع

- Anders, S., Pyl, PT., Huber, W. (2014). HTSeq - A Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31(2):166-9.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online: <http://bioinformatics.Babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Anne McNabb, FM. (2007). The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Birds and Its Role in Bird Development and Reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, 37:163-193. DOI: 10.1080/10408440601123552
- Bedrak, E., Harvey, S., Chadwick, A. (1991). Concentration of Pituitary, Gonadal and Adrenal Hormones in Serum of Laying and Broody White Rock Hens (*Gallus Domesticus*). *J. Endocrinology*. 89, 197-204.
- Bolger, A., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* *Bioinformatics*, 30(15):2114-20.
- Campos, JL., Doratioto, O., Tabata R., Bernardi Videira, N., Veras Ribeiro, H., Batista, F. and et al. (2019). Protein Disulfide Isomerase Modulates the Activation of Thyroid Hormone Receptors. *Frontiers in Endocrinology* | www.frontiersin.org. Volume 9 Article 784.

نتیجه گیری کلی

نتایج نشان می‌دهد که عملکرد تنظیمی رفتار کرجی در غده هیپوفیز بوقلمون‌های تجاری ممکن است به طور عمده با سازوکارهای هورمونی و ترشعی در سطح رونویسی مرتبط باشند. ژن‌های بررسی شده در این مطالعه از گروه پروتئین‌های شوک حرارتی هستند که در استرس، ایمنی و تاخوردگی پروتئین‌ها نقش اساسی دارند. فرآیند تخریب تخمدانی و اتوفازی فولیکول‌ها در پرندگان کرج به وفور اتفاق می‌افتد و همین امر میزان تولید تخم را کاهش می‌دهد.

در این بررسی با توجه به آنالیزهای انجام شده و مطالعات قبلی تعدادی ژن به غیر از ژن‌های معمول کنترل کننده تولید تخم (LH, FSH) و پرولاکتین) به عنوان عوامل کنترل کننده موثر بر کرجی شناسایی شدند. ژن‌های XBP1, HSPBP1, HSPA8 و ATF4 دارای نقش کلیدی در کنترل اتوفازی بودند. علاوه بر این ژن‌های P4HB و HSPA8 که دارای بیان بالایی در پرندگان کرج هستند در سیگنال‌های هورمونی موثر بر تولید مثل نقش داشتند. همچنین نتایج حاصل از آنالیز با نرم‌افزار Cytoscape نشان داد که ژن‌های CANX, HSPA8 و P4HB دارای درجه اهمیت بیشتری بودند. با توجه به اینکه توالی‌یابی RNA برای صفت کرجی در بوقلمون تا کنون انجام نشده است پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در راستای این مطالعه و بررسی سازوکارهای مولکولی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی موثر بر رفتار تولید مثل پرندگان در فازهای کرجی و تخمگذاری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

لازم است از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در اجرای طرح تشکر و قدردانی گردد. همچنین این مطالعه با کد طرح شماره ۹۷۰۱۶۰۶ و مشارکت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran National Science Foundation: INSF) انجام شد و در اینجا از حمایت‌های انجام شده این بخش نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

- El Halawani, M. E., Burke, W. H. Dennison, P. T. (1980). Effect of nest deprivation on serum prolactin level in nesting female turkeys. *Biol. Reprod.* 23:118–123.
- El Halawani, M. E., Silsby, J. L., Behnke, E. J Fehrer, S. C. (1984). Effect of ambient temperature on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the reproductive life cycle of the female turkey (*Meleagris gallopavo*). *Biol. Reprod.* 30:809–815.
- Hamzic, E. Kjaerup, R.B., Mach, N., Minozzi, G., Strozzi, F., Gualdi, V. and et al. (2016). RNA sequencing-based analysis of the spleen transcriptome following infectious bronchitis virus infection of chickens selected for different mannose binding lectin serum concentrations. *BMC Genomics* 17:82.
- Kezele, P., Skinner, M. K. 2003. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 144:3329–3337.
- Liu, H., Wang, J., Li, L., Han, C., He, H., Xu, H. (2018). Transcriptome analysis revealed the possible regulatory pathways initiating female geese broodiness within the hypothalamic-pituitarygonadal axis. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191213>.
- Liu, L., Xiao, Q. Gilbert, E R., Cui, Z., Zhao, X., Wang, Y. and et al. (2018). Whole transcriptome analysis of atrophic ovaries in broody chickens reveals regulatory pathways associated with proliferation and apoptosis. *Scientific Reports* 8:7231.
- Lin, X., Liu, X., Ma, Y., Mi, Y., Zeng, W., Li, J., Zhan, C. (2018). Coherent apoptotic and autophagic activities involved in regression of chicken postovulatory follicles. *AGING* Vol. 10, No. 4
- Kim, D., Langmead, B. Salzberg, S. L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12:357-360.
- Onchere, X., Godbert, SR., Antier, CH., Cabau, C., Sibut, V., Cogburn LA. and et al. (2010). Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *BMC Genomics.* 11:57
- Proudman, J. A., Opel, H. (1981). Turkey prolactin: validation of a radioimmunoassay and measurement of changes associated with broodiness. *Biol. Reprod.* 25:573–580.
- Porter, T. E., Hargis, B. M., Silsby, J. L., El Halawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 125:109–116.
- Reddy Bonam, S., Ru, M., Muller, S. (2019). HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *journal cells.* 8: 849.
- Regina, T. Knapp, RT., Wong, MJH., Kollmannsberger, LK., Gassen, NC., Kretzschmar, A., and et al (2014). Hsp70 Cochaperones HspBP1 and BAG-1M DifferentiallyRegulate Steroid Hormone Receptor Function. *PLOS ONE.* 9,1: 85415.
- Ritchie, ME., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, CW., Shi, W. and et al. (2015) Limma powersdifferential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47
- Rual, JF., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N. and et al. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature.* 437 (7062): 1173–8.
- Schwarz, DS., Blower, MD. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular to signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:79–94.
- Tang, E. Song, B. Yin, J. Xu, J., Bao, E. (2018). Rosemary Reduces Heat Stress by Inducing CRYAB and HSP70 Expression in Broiler Chickens. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2018, Article ID 7014126, 10 pages.

Ye, P., Ge, K., Li, M., Yang, L., Jin, S. Zhang, C., Chen, X., Geng, Z. (2019). Egg-laying and brooding stage-specific hormonal response and transcriptional regulation in pituitary of Muscovy duck (*Cairina moschata*). *Poultry Science* 98:5287–5296.

Yu, J., Lou, Y., He, K., Yang, S., Yu, W., Han, L., Zhao, A. (2016). Goose broodiness is

involved in granulosa cell autophagy and homeostatic imbalance of follicular hormones. *Poultry Science* 95:1156–1164

Yu, J., Lou, Y., Zhao, A. (2016). Transcriptome analysis of follicles reveals the importance of autophagy and hormones in regulating broodiness of Zhedong white goose. *Scientific Reports* 6:36877.

