Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 16, Issue 4, 2025 p: 29-42

OPEN ACCESS

Research Paper

Biomarkers Related to Immune Response to the Influenza Virus based on the Systems Biology Approach in Chickens

Mehre Mohammadnezhad[1], Mohsen Gholizadeh[2], Hasan Hafezian[3]

1- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, (Corresponding author: m.gholizadeh@sanru.ac.ir)
3- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 04 April, 2025 Revised: 01 July, 2025 Accepted: 10 August, 2025

Extended Abstract

Background: In recent years, the influenza virus has caused severe economic losses in the poultry industry, particularly in meat production, and remains one of the most important pathogens in the poultry industry worldwide despite vaccination programs. Avian influenza, especially H5N1, has become a major global health problem due to its potential as a zoonotic disease and its devastating impact on poultry populations. Identifying the molecular mechanisms of response to infections is crucial for the control, treatment, and prevention of epidemic diseases. A central goal of biological research is the coherent identification of all molecules in a living cell and their interactions. Co-expression of genes provides valuable information for understanding living systems because co-expressed genes often act in the same biological pathways or are linked through protein-protein interactions (PPI). The need for effective therapeutic strategies prompted the authors to investigate protein-protein interaction networks using systems biology approaches as a suitable method to discover candidate proteins and key biological pathways related to this disease. Since centrality indices measure the influence of nodes in an interaction network, betweenness, closeness, and degree centrality indices were used to analyze protein networks. This study aims to identify important biomarkers for the diagnosis, treatment, or control of the losses caused by avian influenza using biological network and signaling pathway analysis methods.

Methods: In the present study, the COXPRESdb gene co-expression database was searched using the keyword "response to the virus." As a result, 21 genes were identified as involved in the biological processes of virus response in chickens. Of these 21 genes, seven were presented in two separate gene co-expression networks. Two gene co-expression networks were developed, and a total of 148 genes were extracted from the COXPRESdb database in 12 distinct gene clusters to identify other gene co-expression components. To annotate the studied network, gene expression data from the GSE53932 series were extracted from the GEO database of NCBI. After statistical analysis, gene expression analysis was performed using GEO2R software to identify differentially expressed genes ($P < 0.05$ and $-2 < \text{Log FC} < 2$). Subnetworks were detected using the MCODE, jActiveModules 3.1, and CytoCluster 2.1.0 plugins in Cytoscape software. MCODE parameters included degree cut: 2, nodal cut: 0.5, K-score: 5, and maximum depth: 100. Using the jActiveModules plugin, active expression subnetworks were identified based on the expression data (adj.$P < 0.01$). The CytoCluster plugin was used to group the network based on P-values to identify significant clusters ($P < 0.05$). The CentiScaPe 2.1 plugin was used to calculate centrality parameters, including betweenness, closeness, and degree, for each node and to identify hubs. Gene Ontology (GO) terms for the identified subnetworks and clusters were retrieved using the DAVID functional annotation tool. Finally, the ontology network of genes was visualized using the ClueGO 2.5.10 and CluePedia 1.5.10 plugins.

Results: From the 21 virus-responsive genes in chickens, seven genes were present in two separate co-expression networks. These two networks included three genes (*TTR*, *ALB*, and *RBP4A*) and four genes (*SAMHD1*, *MX1*, *IRF7*, and *MYD88*). In addition to the genes annotated during the virus response in chickens, a gene list of 148 possible virus-responsive genes with a co-expression score deviation ($Z > 3$) was identified, as the co-expression exceeded the normal

Copyright ©2025. Mohammadnezhad et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

distribution of random co-expression. Expression data were extracted from the COXPRESdb gene co-expression database. After statistical analysis of the expression data, the initial interaction network for genes with significant differential expression was created with 61 nodes (proteins) and 306 edges using Cytoscape software. Two PPI networks were connected by three proteins: *PLAC8L1*, *LBFABP*, and *IFI6*. *SERPINA10* and *AHSG* proteins, with node scores of 22, and *PLG*, with a node score of 21, were identified as hub proteins with the highest interaction rates in the entire network of differentially expressed proteins. Two high-density clusters were identified using the MCODE plugin. These high-density regions may contain proteins that function as complexes within the cell. *AMBP* and *DDX60* were identified as seed proteins in clusters 1 and 2, respectively. After adding expression data to network nodes in Cytoscape software, clustering and calculations with the jActiveModules plugin identified five active expression subnetworks. Two significant gene clusters ($P < 0.05$) were identified using the CytoCluster 2.1.0 plugin (ClusterOne algorithm, $P < 0.05$). The first significant cluster, with 25 nodes, includes proteins involved in the phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis pathway. The second significant cluster, with 20 nodes, includes proteins related to the influenza A signaling pathway, herpes simplex virus infection, and the RIG-I receptor signaling pathway, which are involved in the immune response to the virus. Centrality indices were calculated for active expression subnetworks obtained using the jActiveModules algorithm after adding expression data and for clusters obtained with the MCODE algorithm before adding expression data. Finally, the *IFIT5*, *IFIH1*, and *RSAD2* proteins in the clusters obtained by the MCODE algorithm (the highest cluster score) and the *IFIH1* protein in the active expression subnetwork obtained by jActiveModules had the highest betweenness, closeness, and degree values. In KEGG gene enrichment analysis, these three proteins, along with *STAT1*, *EIF2AK2*, *TRIM25*, and *PLG*, were significantly ($P < 0.05$) associated with the influenza A signaling pathway, herpes simplex virus 1 infection, and other related pathways.

Conclusion: This study identified the proteins *IFIH1*, *IFIT5*, and *RSAD2* as having the highest centrality index values for active expression clusters and subnetworks, and *STAT1*, *PLG*, *EIF2AK2*, *DHX58*, and *TRIM25* as key biomarkers for influenza A response. These proteins, along with the associated signaling pathways, including the *RIG-I* receptor signaling pathway, offer potential targets for the diagnosis, treatment, and control of avian influenza in poultry.

Keywords: Centrality index, Gene co-expression, Influenza, KEGG, Protein-protein interaction network

How to Cite This Article: Mohammadnezhad, M., Gholizadeh, M., & Hafezian, H. (2025). Biomarkers Related to Immune Response to the Influenza Virus based on the Systems Biology Approach in Chickens. *Res Anim Prod,* 16(4), 29-42. DOI: 10.61882/rap.2025.1498

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

نشانگرهای زیستی مرتبط با پاسخ ایمنی به ویروس آنفولانزا مبتنی بر رویکرد زیست‌شناسی سامانه‌ای در مرغ

مهره محمدنژاد[۱]، محسن قلی‌زاده[۲] و حسن حافظیان[۳]

۱- گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: m.gholizadeh@sanru.ac.ir).
۳- گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹
صفحه ۲۹ تا ۴۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در سال‌های اخیر، ویروس آنفولانزا منجربه خسارات اقتصادی سنگینی در صنعت طیور به‌ویژه گله‌های گوشتی شده است که علی‌رغم انجام برنامه واکسیناسیون، همچنان از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در صنعت طیور در سراسر جهان است. آنفولانزای پرندگان، به‌ویژه سویه H5N1، به‌دلیل پتانسیل آن به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام و تأثیر مخرب آن بر جمعیت طیور، به‌عنوان نگرانی‌عمده بهداشت جهانی مطرح شده است. با این انگیزه تحقیقاتی، شناسایی مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به عفونت برای کنترل، درمان و پیشگیری از بیماری همه‌گیر، امری حیاتی است. از جمله اهداف کلیدی در تحقیقات زیستی، شناسایی منسجم تمام مولکول‌های درون‌سلولی زنده و نحوه تعامل بین آن‌ها است. بیان هم‌زمان ژن، اطلاعات کلیدی را برای درک سیستم‌های زنده فراهم می‌کند، زیرا ژن‌های هم‌بیان اغلب در مسیرهای زیستی یکسان یا مرتبط با برهمکنش پروتئین_پروتئین (PPI) هستند. نیاز به استراتژی‌های موفق درمانی نگارندگان را به مطالعه شبکه‌های تعامل پروتئین–پروتئین از طریق رویکردهای مبتنی‌بر زیست‌شناسی سیستمی به‌عنوان روشی مناسب برای کشف پروتئین‌های کاندید و مسیرهای بیولوژیکی کلیدی در این بیماری واداشته است. از آن‌جایی‌که اندازه‌گیری شاخص‌های مرکزیت معیاری برای تعیین تأثیر عضوها در شبکه تعاملی است، از شاخص‌های مرکزیت بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال عضو برای تجزیه و تحلیل شبکه‌های پروتئینی استفاده می‌شود. این مطالعه، با هدف شناسایی نشانگرهای زیستی کلیدی در تشخیص، درمان یا کنترل تلفات و خسارات ناشی از بیماری آنفولانزای مرغی با استفاده از روش‌های آنالیز شبکه‌های زیستی و تحلیل مسیرهای سیگنال‌دهی–عملکردی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، پایگاه داده هم‌بیانی ژن (COXPRESdb) با استفاده از کلیدواژه Response to virus جستجو شد. در نتیجه جستجو، مجموع ۲۱ ژن که در فرآیندهای بیولوژیکی پاسخ به ویروس در مرغ نقش دارند، معرفی شدند. از میان ۲۱ ژن معرفی شده، ۷ ژن در دو شبکه هم‌بیانی ژن مجزا حضور داشتند. با توسعه دو شبکه هم‌بیانی ژن، در نهایت ۱۴۸ ژن، در ۱۲ خوشه ژنی مجزا با هدف شناسایی سایر مؤلفه‌های هم‌بیانی ژنی، از پایگاه‌داده COXPRESdb شناسایی و استخراج شدند. جهت حاشیه‌نویسی شبکه مورد مطالعه، داده بیانی سری GSE53932 از بخش GEO بانک اطلاعات NCBI استخراج شد. تحلیل آماری و آنالیز بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار GEO2R انجام شد و ژن‌های با بیان افتراقی با ($P < 0.05$) و ($-2 < \text{Log FC} < 2$) مشخص گردیدند. شبکه‌های فرعی توسط افزونه‌های MCODE، jActiveModules 3.1 وCytoCluster 2.1.0 با نرم‌افزار Cytoscape شناسایی شدند. پارامترهای MCODE شامل برش تعداد اتصال عضو: ۲، برش امتیاز عضو: ۰/۵، K-score: ۵ و حداکثر عمق: ۱۰۰ در نظر گرفته شدند. با استفاده از افزونه jActiveModules براساس داده‌های بیان واردشده به شبکه، زیرشبکه‌های بیانی فعال با درنظر گرفتن (adj.$P < 0.01$) شناسایی شدند. از افزونه CytoCluster جهت خوشه‌بندی شبکه براساس P-value برای شناسایی خوشه‌های معنی‌دار ($P < 0.05$) استفاده شد. به‌منظور محاسبه پارامترهای مرکزیت شامل پارامترهای بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال برای هر عضو و شناسایی ژن‌های اصلی (هاب‌ها)، از افزونه CentiScaPe 2.1 در شبکه استفاده شد. عبارات هستی‌شناسی ژن (GO) زیرشبکه‌ها و خوشه‌های شناسایی‌شده با استفاده از ابزار حاشیه‌نویسی عملکردی DAVID بازیابی شدند. در نهایت، شبکه هستی‌شناسی ژن‌ها به‌وسیله افزونه‌های ClueGO 2.5.10 و CluePedia 1.5.10 ترسیم شد.

یافته‌ها: از میان فهرست ۲۱ ژن پاسخ به ویروس‌ها در مرغ، هفت ژن در دو شبکه هم‌بیانی مجزا حضور داشتند. این دو شبکه هم‌بیانی شامل سه ژن TTR، ALB و RBP4A و چهار ژن SAMHD1، MX1، IRF7 و MYD88 بودند. علاوه‌بر ژن‌های حاشیه‌نویسی‌شده در جریان پاسخ به ویروس در مرغ، فهرست ژنی حاوی ۱۴۸ ژن محتمل پاسخگو به ویروس با انحراف امتیاز هم‌بیانی در اطراف $Z > 3$، به‌عنوان هم‌بیانی بالاتر نسبت به توزیع نرمال هم‌بیانی تصادفی، از پایگاه‌داده هم‌بیانی ژن COXPRESdb استخراج شدند. بعد از تحلیل آماری داده‌های بیانی، شبکه تعاملی اولیه برای ژن‌ها با بیان افتراقی معنی‌دار به‌صورت ۶۱ عضو (پروتئین) و ۳۰۶ اتصال با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ایجاد شد. دو شبکه PPI توسط سه پروتئین PLAC8L1، LBFABP و IFI6 به‌هم مرتبط شدند. پروتئین‌های SERPINA10 و AHSG با امتیاز عضو ۲۲ و PLG با امتیاز عضو ۲۱ به‌عنوان پروتئین‌های هاب (Hub)، دارای بیشترین میزان تعامل در کل شبکه پروتئین‌ها با بیان افتراقی بودند. محاسبه با افزونه MCODE منجربه شناسایی دو خوشه با چگالی بالا شد. این مناطق با چگالی بالا در شبکه ممکن است شامل پروتئین‌هایی باشند که به‌عنوان مجموعه‌ای در سلول عمل کنند. AMBP و DDX60 به‌عنوان پروتئین‌های Seed به‌ترتیب در خوشه شماره ۱ و ۲ حضور داشتند. پس از افزودن داده‌های بیان به عضوهای شبکه در نرم‌افزار Cytoscape، محاسبه و خوشه‌بندی با استفاده از افزونه jActiveModules، پنج زیرشبکه بیانی فعال شناسایی شدند. دو خوشه ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) با استفاده از افزونه CytoCluster 2.1.0 (الگوریتم ClusterOne) با درنظر گرفتن مقدار ($P < 0.05$) شناسایی شدند. اولین خوشه معنی‌دار با ۲۵ عضو در سمت راست شبکه شامل پروتئین‌هایی بود که مسیر سیگنال‌دهی بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان را نشان دادند. دومین خوشه معنی‌دار با ۲۰ عضو در سمت چپ شبکه شامل پروتئین‌هایی بود که مسیر سیگنال‌دهی آنفولانزای A، عفونت ویروس هرپس سیمپلکس ۱ و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I را به‌عنوان مسیر درگیر در پاسخ ایمنی به ویروس نشان دادند. محاسبات شاخص‌های مرکزیت برای زیرشبکه‌های بیانی فعال حاصل از الگوریتم jActiveModules پس از افزودن داده‌های بیان و برای خوشه‌های حاصل از الگوریتم‌های MCODE قبل از افزودن داده‌های بیان نیز انجام شدند. در نهایت، پروتئین‌های IFIT5، IFIH1 و RSAD2 در خوشه‌های به‌دست‌آمده از الگوریتم MCODE (خوشه با بالاترین امتیاز) و CytoCluster و پروتئین IFIH1 در زیرشبکه فعال بیانی به‌دست‌آمده از jActiveModules، دارای بالاترین امتیاز بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال عضو بودند. در بررسی غنی‌سازی ژنی KEGG، این سه پروتئین به‌همراه چهار پروتئین STAT1، EIF2AK2، TRIM25 و PLGs به‌صورت معنی‌دار ($P < 0.05$) با مسیر سیگنال‌دهی آنفولانزای A، عفونت ویروس هرپس‌سیمپلکس ۱، بیوسنتز فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان، متابولیسم فنیل‌آلانین و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I در پاسخ ایمنی به ویروس آنفولانزا در ارتباط بودند.

نتیجه‌گیری: در نتیجه مطالعه حاضر، پروتئین‌های IFIH1، IFIT5، و RSAD2 با بالاترین امتیاز شاخص‌های مرکزیت برای خوشه‌ها و زیرشبکه‌های بیانی فعال و STAT1، PLG، EIF2AK2، DHX58 و TRIM25 با بالاترین سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در مسیرهای سیگنال‌دهی انفولانزای A و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I در طیور به‌عنوان نشانگرهای زیستی پاسخگو به آنفولانزا معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: آنفولانزا، شاخص مرکزیت، شبکه‌تعاملی پروتئین–پروتئین، هم‌بیانی ژن، KEGG

مقدمه

بیماری‌های ویروسی شایع‌ترین علت تلفات در گله‌های بزرگ تجاری طیور هستند. در سال‌های اخیر، ویروس آنفولانزا منجر به خسارات اقتصادی سنگینی در صنعت طیور به‌ویژه گله‌های گوشتی شده است که علی‌رغم انجام برنامه واکسیناسیون همچنان از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در صنعت طیور در سراسر جهان است (Golpasand *et al.,* 2024). آنفولانزای پرندگان، به‌ویژه H5N1، به‌دلیل پتانسیل آن به‌عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام و تأثیر مخرب آن بر جمعیت طیور، به‌عنوان نگرانی عمده بهداشت جهانی مطرح شده است. سویه‌های جدیدی از آن که باعث بیماری‌های همه‌گیر می‌شوند، با دسته‌بندی مجدد ژنتیکی با دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، اساس انواع ویروس‌های متمایز سرولوژیکی را تشکیل می‌دهند. (Edinger *et al.,* 2014; Michael *et al.,* 2013). شناسایی مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به عفونت برای کنترل، درمان و پیشگیری از بیماری همه‌گیر، امری حیاتی است (Golpasand *et al.,* 2024). از جمله اهداف کلیدی در تحقیقات زیستی، شناسایی منسجم تمام مولکول‌های درون‌سلولی زنده و نحوه تعامل بین آن‌ها است (Van Dam *et al.,* 2018). با این حال، عملکرد بسیاری از ژن‌ها هنوز به‌طور کامل درک نشده است، وضعیتی که با شناسایی بسیاری از ژن‌های غیر کدکننده جدید پیچیده‌تر نیز شده است (Zhao *et al.,* 2015). با توسعه فناوری‌های با توان بالا از جمله ریزآرایه‌ها و توالی‌یابی RNR و روش‌های آنالیز داده مربوطه، وضعیت عملکردی یک ژن را می‌توان از دیدگاه سیستماتیک مورد بررسی قرارداد (Dam *et al.,* 2014). یکی از روش‌های استنباط عملکرد ژن و ارتباط ژن با بیماری از راه داده‌های بیان ژن در کل ژنوم، واکاوی شبکه هم‌بیانی است؛ رویکردی که شبکه‌هایی از ژن‌ها را با تمایل به فعال شدن مشترک در میان گروهی از نمونه‌ها تشکیل می‌دهد و متعاقباً آن‌ها را تحلیل می‌نماید (Van Dam *et al.,* 2018).

استفاده از ریزآرایه‌های تجزیه و تحلیل بیان ژن در پاسخ به عفونت ویروسی آنفولانزا، امکان مطالعه برهمکنش‌های میزبان و پاتوژن و همچنین شناسایی اثربخشی داروها و واکسن‌ها را فراهم می‌سازد (Golpasand *et al.,* 2024). همچنین، شناسایی ژن‌های مرتبط با عفونت H5N1 می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام و توسعه داروی‌های جدید مورد استفاده، اثربخش باشد. از این‌رو، از روش‌های تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک به‌طور مکرر برای غربال نشانگرهای زیستی خاص بیماری از زمان ظهور فناوری‌های ریزآرایه استفاده شده است (Ibrahim *et al.*, 2018). ابزارهای بیوانفورماتیک یکپارچه‌ای که اطلاعات جامع و ارزشمندی را ارائه می‌دهند، برای بررسی پاتوفیزیولوژی مولکولی عفونت آنفلوانزا و ارزیابی نشانگرهای زیستی جدید به‌کار گرفته شده‌اند. این نشانگرهای زیستی مرتبط با ایمنی، برای روشن شدن علل، پیشگیری و درمان آنفولانزا مورد نیاز هستند (Chen *et al.,* 2022). در این میان، شبکه‌های زیستی، پلتفرم‌های ارزشمندی برای درک ویژگی‌های سیستم‌های زنده هستند که شامل شبکه‌های هم‌بیان ژنی، شبکه‌های برهمکنش پروتئین–پروتئین[1]، شبکه‌های سیگنال‌دهی، شبکه‌های متابولیک، و شبکه‌های تنظیم‌کننده ژن هستند (Jiang *et al.,* 2014). شبکه‌های هم‌بیان ژن (Gene co-expression networks) شبکه‌های ارتباط رونوشت– رونوشت هستند که عموماً به‌عنوان نمودارهای غیر جهت‌دار گزارش می‌شوند، جایی که ژن‌ها زمانی به‌هم متصل می‌شوند که ارتباط هم‌بیانی معنی‌داری بین آن‌ها وجود داشته باشد (Tieri *et al.,* 2019). مطالعه شبکه‌های هم‌بیان ژن امکان شناسایی ژن‌هایی را فراهم می‌سازد که توسط یک برنامه تنظیم‌کننده رونویسی کنترل می‌شوند، از نظر عملکردی مرتبط هستند، یا محصولات ژنی آن‌ها در یک فرآیند زیستی مشترک دخیل هستند (Tieri *et al.,* 2019). در مقایسه با انواع دیگر شبکه‌های زیستی، استفاده از شبکه‌های هم‌بیان ژن دارای چندین مزیت از جمله پوشش تقریباً، کامل ژن‌ها، اریبی اندک به‌دلیل مطالعات منتشرشده و توانایی ساخت شبکه‌های خاص است (Yang *et al.,* 2014). هم‌بیانی ژنی، همگامی بیان ژن در بسیاری از شرایط سلولی و محیطی است و به‌طور گسترده برای استنباط عملکرد بیولوژیکی ژن‌ها استفاده می‌شود (Van Dam *et al.,* 2018). یکی از راه‌های درک بهتر هم‌بیانی ژن‌ها، بررسی فهرست ژن‌های هم‌بیان شده در شبکه‌های ژنی، براساس قدرت و شدت هم‌بیانی آن‌ها است. فهرست ژن‌های هم‌بیان‌شده، رویکردی مستقیم برای بررسی اطلاعات بیان هم‌زمان ژن‌ها است (Langfelder & Horvath, 2008).

بیان هم‌زمان ژن اطلاعات کلیدی را برای درک سیستم‌های زنده فراهم می‌کند، زیرا ژن‌های هم‌بیان اغلب در مسیرهای زیستی مشابه یا مرتبط با برهمکنش پروتئین–پروتئین (PPI) هستند (Van Dam *et al.,* 2018). تاکنون داده‌های PPI به‌طور گسترده برای پیش‌بینی عملکرد ژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای اولین بار، نبیوا و همکاران (Nabieva *et al.,* 2005) نشان دادند که پروتئین‌های در حال تعامل، عملکردهای یکسان یا مشابهی دارند که ممکن است در یک مسیر درگیر باشند. با توجه به این فرض، می‌توان از شبکه‌های تعاملی پروتئین–پروتئین موجود جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری استفاده کرد. علاوه‌بر این، نیاز به استراتژی‌های موفق درمانی، نگارندگان را به مطالعه شبکه‌های تعامل پروتئین–پروتئین از طریق رویکردهای مبتنی بر زیست‌شناسی سیستمی به‌عنوان روشی مناسب برای کشف پروتئین‌های کاندید و مسیرهای بیولوژیکی کلیدی در این بیماری واداشته است. روش‌های میانگین کوتاه‌ترین مسیر[2] و بینابینی[3] نیز به‌طور گسترده برای شناسایی و تجزیه و تحلیل نشانگرهای زیستی در شبکه‌های تعامل ویروس–میزبان استفاده می‌شوند (Huang *et al.,* 2012). اگر پروتئینی در کوتاه‌ترین مسیرهای بین ژن‌های هدف

[1] Protein-protein interaction
[2] Average Shortest Path
[3] betweennes

ویروس باشد، بینابینی آن‌ها بسیار زیاد است و می‌تواند انتقال سیگنال در شبکه را مختل کند (Huang *et al.*, 2010). مشخص شد که پروتئین‌های با بینابینی بالا معمولاً عملکردهای مشابه با ژن‌های seed دارند (Jiang *et al.*, 2013).

راناوار و همکاران (Ranaware *et al.*, 2016) گزارش دادند که چگونه عفونت ویروس H5N1 بیان بیش از حد IFNهای نوع I (IFNA و IFNG)، سیتوکین‌ها (IL1B، IL18، IL22، IL13، و IL12B)، کموکاین‌ها (CCL4، CCL19، CCL10، و CX3CL1) و ژن‌های تحریک‌شده توسط IFN (RSAD2،IFITM5، IFIT5، GBP 1 و EIF2AK) در بافت ریه جوجه‌ها را القا کرد. این اختلال در ژن‌های ایمنی ذاتی میزبان ممکن است عامل تعیین‌کننده‌ای برای شدت و پیامد عفونت آنفولانزا در جوجه‌ها باشد. در مطالعه گلپسند و همکاران (Golpasand *et al.*, 2024)، نتایج تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک و تجزیه شبکه تعامل پروتئین–پروتئین، ژن‌های BUB1، NDC80، CDC20 و PLK1 را به‌عنوان ژن‌های مرکزی در مرغ و همچنین ژن‌های کلیدی A6COL3، A3COL1 و PLOD2 را در اردک شناسایی نمودند ($P < 0.05$).مقایسه هستی‌شناسی ژن‌های با تفاوت افتراقی در جوجه و اردک نشان داد که بیشتر آن‌ها در جوجه‌ها در پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت‌های التهابی میزبان نقش داشتند، ولی در اردک بیشتر در سوخت و ساز چربی و تولید انرژی برای تامین نیازمندی مقاومت میزبان در برابر بیماری نقش ایفا کردند.

این مطالعه، با هدف شناسایی نشانگرهای کلیدی در تشخیص، درمان یا کنترل تلفات و خسارات ناشی از بیماری آنفولانزای مرغی با استفاده از روش‌های آنالیز شبکه‌های زیستی و تحلیل مسیرهای سیگنال‌دهی–عملکردی انجام شد. به این منظور، علاوه‌بر ژن‌های شناخته‌شده با حاشیه‌نویسی GO یکسان در مسیر پاسخ ایمنی به ویروس، طیفی از ژن‌ها به‌صورت خوشه‌ها و شبکه‌های فرعی فعال از نقطه نظر مشارکت احتمالی آن‌ها در مسیرهای مهم زیستی، عملکردهای مولکولی، اجزاء سلولی و مسیرهای غنی‌سازی مربوطه، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که اندازه‌گیری شاخص‌های مرکزیت، معیاری برای تعیین تأثیر عضوها در شبکه تعاملی است، از شاخص‌های مرکزیت بینابینی، نزدیکی[1] و تعداد اتصال عضو[2] برای تجزیه و تحلیل شبکه‌های پروتئینی استفاده شد. یافته‌های این مطالعه ضمن افزایش آگاهی نسبت به چگونگی پاسخ میزبان به عفونت آنفلوانزای H5N1، ممکن است دستاوردهایی برای توسعه درمان هدفمند و راهبردهای نظارتی برای مبارزه موثر با شیوع H5N1 باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری ژن‌های محتمل پاسخگوی به آنفولانزا در مرغ

در مطالعه حاضر، پایگاه داده هم‌بیانی ژن COXPRESdb (https://coxpresdb.jp) با استفاده از کلمه کلیدی Response to virus جستجو شد. در نتیجه جستجو، ۲۱ ژن که در فرآیندهای بیولوژیکی پاسخ به انواع ویروس در مرغ نقش دارند، معرفی شده‌اند. در پایگاه داده COXPRESdb، ژن‌های هم‌بیان معرفی‌شده براساس داده‌های هم‌بیانی مرغ union-type (gga-u.3) مرتب شده‌اند. از میان ۲۱ ژن معرفی‌شده، هفت ژن در دو شبکه هم‌بیانی ژن مجزا حضور دارند. این دو شبکه هم‌بیانی شامل سه ژن TTR، ALB و RBP4A و چهار ژن SAMHD1، MX1، IRF7 و MYD88 بودند. با توسعه دو شبکه هم‌بیانی ژن، در نهایت ۱۴۸ ژن در ۱۲ خوشه‌ژنی مجزا با هدف شناسایی سایر مؤلفه‌های هم‌بیانی ژنی محتمل در فرآیندهای بیولوژیکی پاسخگو به ویروس آنفولانزا، از پایگاه داده COXPRESdb شناسایی و استخراج شدند. تشابه بیان[3]، درجه تشابه الگوی بیان ژن را نشان می‌دهد و به‌صورت ضریب همبستگی پیرسون بین دو ژن محاسبه می‌شود. جهت ترسیم شبکه هم‌بیانی ژنی در COXPRESdb، از فرمول رتبه متقارن[4] استفاده شد. ضریب همبستگی با وجود نرمال‌سازی تراکم ژن‌ها در فضای همبستگی، نامتقارن بود، در نتیجه از رتبه میانگین هندسی یا همان رتبه متقابل بین دو رتبه–جهت استفاده شد که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$MR_{(AB)} = \sqrt{(Rank(A \to B)\ X\ Rank(B \to A))} \quad (۱)$$

که در آن $Rank(A \to B)$ برابر رتبه همبستگی بیان ژن A از ژن B و $Rank(B \to A)$ برابر رتبه همبستگی بیان ژن B از ژن A است.

جفت‌های ژنی دارای نمرات هم‌بیانی تصادفی دارای توزیع نرمال هستند. در نتیجه، یک z-score هم‌بیانی اتخاذ شد که در آن صفر یک سطح تصادفی و ۳ یک نرخ مثبت کاذب ۰/۱ درصدی برای هم‌بیانی جفت‌ژنی در نظر گرفته شد. انحراف در اطراف $Z > ۳$، به‌عنوان هم‌بیانی بالاتر نسبت به توزیع نرمال هم‌بیانی تصادفی جفت‌های ژنی در نظر گرفته شد. با توجه به رویکرد حضور ژن‌های هم‌بیان در مسیرهای بیولوژیکی یکسان یا مرتبط با تعامل پروتئین–پروتئین (PPIs)، از ابزار STRING (https://string-db.org/) جهت رسم شبکه تعاملی پروتئین–پروتئین و محاسبه تعداد عضو شرکت‌کننده در شبکه تعاملی، تعداد اتصال‌ها، میانگین تعداد اتصال عضو، میانگین ضریب خوشه‌بندی محلی، تعداد اتصال‌های موردانتظار و P-value غنی‌سازی PPI استفاده شد (Doncheva *et al*., 2019).

[1] Closeness
[2] Degree
[3] Expression similarity
[4] Mutual Rank

حاشیه‌نویسی شبکه با داده‌های ریزآرایه

جهت حاشیه‌نویسی شبکه مورد مطالعه، داده بیان سری GSE53932 (Hu *et al.,* 2015) از بخش GEO بانک اطلاعات NCBI استخراج شد. بعد از تحلیل آماری، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/)، انجام شد و ژن‌های با بیان افتراقی با ($P < 0.05$) و ($2 < \text{Log FC} < -2$) مشخص گردیدند. به‌طور خلاصه، جوجه‌ها با سویه جهش‌یافته CK-PAX3 ویروس H5N1 تلقیح شدند و ۲۴ ساعت پس از آلودگی، ریه‌های جوجه‌ها برای استخراج RNA و هیربیداسیون روی ریزآرایه‌های Affymetrix جدا شدند (Hu *et al.,* 2015). حدت بیماری‌زایی این ویروس به‌دلیل وجود سه جهش T573C، C574A و T576A و ناکارامدشدن نقش پروتئین PA-X بالا است. پروتئین PA-X به‌عنوان تنظیم‌کننده حدت منفی، با مهار تکثیر ویروس و پاسخ ایمنی ذاتی میزبان حدت را کاهش می‌دهد (Hu *et al.,* 2015; Li *et al.,* 2016).

ترسیم شبکه‌های فرعی

شبکه‌های فرعی توسط افزونه‌های MCODE (Bader *et al.,* 2020) jActiveModules 3.1 (Saito *et al.,* 2012) و CytoCluster 2.1.0 (Li *et al.,* 2017) با نرم‌افزار Cytoscape (Shannon *et al.,* 2003) شناسایی شدند. به‌منظور شناسایی مناطق بسیار متراکم از نظر توپولوژیکی در شبکه، خوشه‌ها با استفاده از الگوریتم افزونه MCODE تعیین شدند. الگوریتم خوشه‌بندی افزونه MCODE، تشخیص پیچیدگی مولکولی بر اساس وزن‌دهی عضو با توجه به تراکم همسایگی محلی است. این الگوریتم در سه مرحله شامل وزن‌دهی عضو، پیش‌بینی کمپلکس مولکولی و پس‌پردازش برای فیلترکردن یا افزودن پروتئین‌ها به کمپلکس پیش‌بینی شده انجام می‌شود. پارامترهای MCODE شامل برش تعداد اتصال عضو: ۲، برش امتیاز عضو: ۰/۵، K-score: ۵ و حداکثر عمق: ۱۰۰ در نظر گرفته شدند (Saberi Anvar *et al.,* 2018). با استفاده از افزونه jActiveModules براساس داده‌های بیان واردشده به شبکه، زیرشبکه‌های بیانی فعال با در نظر گرفتن adj.P-value < 0.1 شناسایی شدند (Saito *et al.,* 2012). از افزونه CytoCluster جهت خوشه‌بندی شبکه براساس P-value برای شناسایی خوشه‌های معنی‌دار ($P < 0.05$) استفاده شد.

محاسبه پارامترهای مرکزیت

به‌منظور محاسبه پارامترهای مرکزیت شامل پارامترهای بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال برای هر عضو و شناسایی هاب‌ها، از افزونه CentiScaPe 2.1 نرم‌افزار Cytoscape در شبکه استفاده شد. شاخص مرکزیت تعداد اتصال عضو i تعداد اتصال‌های مستقیم به هر عضو را نشان می‌دهد که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (Hwang & Han, 2022):

$$C_D(i) = \sum_{j=1}^{N} A_{ij} \qquad (۲)$$

که در آن، N تعداد عضوهای شبکه و ماتریس مجاورتی A_{ij} یک اتصال بین عضوهای i و j برابر با یک هستند. شاخص بینابینی در قالب نقش یک عضو در پیوند با بقیه عضوهای شبکه ارزیابی می‌شود. شاخص بینابینی عضو i به‌صورت زیر تعریف می‌شود (Hwang and Han, 2022):

$$C_B(i) = \sum_{s,t\epsilon N} \frac{\sigma(s,t|i)}{\sigma(s,t)} \qquad (۳)$$

که در آن، N مجموعه عضوها است، $\sigma(s,t)$ تعداد کل کوتاه‌ترین مسیرها بین s و t و $\sigma(s,t|i)$ تعداد کوتاه‌ترین مسیرهای بین مسیرهای s و t است که از عضو i عبور می‌کند، اگر $s = t, \sigma(s,t)=1$ و $i \in s, t\sigma(s,t|i)=0$ باشد. بینابینی یک پروتئین به‌طور موثر نشان‌دهنده توانایی یک پروتئین در ممکن‌ساختن مخابره سیگنال‌ها به پروتئین‌های دوردست است. در مسیرهای سیگنال‌دهی، پروتئین‌هایی با امتیاز بینابینی بالا به احتمال زیاد، برای حفظ عملکرد و انسجام مکانیسم‌های سیگنال‌دهی بسیار مهم هستند (Hwang & Han, 2022; Scardoni & Lau, 2012). شاخص نزدیکی یک عضو در یک شبکه بیولوژیکی، به‌صورت احتمال یک عضو برای ارتباط عملکردی آن با چندین عضو دیگر تفسیر می‌شود، در حالی‌که برای چند عضو دیگر نامرتبط است. شاخص نزدیکی یک عضو نشان‌دهنده نزدیکی هر عضو به سایر عضوهای درون‌شبکه است و می‌تواند اطلاعاتی را درباره دسترسی و ارتباطات عضوها فراهم کند. شاخص نزدیکی عضو i به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (Scardoni & Lau, 2012).

$$C_{clo}(i) = \frac{1}{\sum_{t\epsilon N} dist(s,t)} \qquad (۴)$$

$dist\,(s,t)$ کوتاه‌ترین مسیر بین عضو i با تمام عضوهای دیگر در شبکه است. بنا بر این، یک پروتئین با نزدیکی بالا، در مقایسه با میانگین نزدیکی شبکه، به‌راحتی در تنظیم پروتئین‌های دیگر در مرکزیت خواهد بود، اما برخی پروتئین‌ها تحت تأثیر فعالیت آن قرار نگرفته‌اند. یک شبکه سیگنال‌دهی با میانگین نزدیکی بسیار بالا به احتمال زیاد واحدها یا ماژول‌های عملکردی را سازماندهی می‌کند، در حالی‌که یک شبکه سیگنال‌دهی با میانگین نزدیکی بسیار پایین به احتمال زیاد به‌عنوان خوشه‌ای باز از پروتئین‌ها که ماژول‌های تنظیمی مختلف را به‌هم متصل می‌کند، رفتار می‌کند (Scardoni & Lau, 2012).

تجزیه و تحلیل مجموعه ژن

اصطلاحات هستی‌شناسی ژن (GO) و مسیرهای زیرشبکه‌ها و خوشه‌های شناسایی شده با استفاده از ابزار حاشیه‌نویسی عملکردی DAVID بازیابی شدند و ارزیابی کیفیت داده‌های هم‌بیانی از طریق سازگاری بین هم‌بیانی ژن و حاشیه‌نویسی‌های عملکردی مسیر KEGG صورت‌گرفت. پایگاه DAVID (https://david.ncifcrf.gov/) پایگاه داده‌ای برای حاشیه‌نویسی، تجسم و کشف یکپارچگی، یکی از کارآمدترین ابزارهای آنلاین برای سازماندهی و حاشیه‌نویسی داده‌های ناهمگن حاصل از تکنیک‌های پرتوان مانند ریزآرایه است. این برنامه شامل ۶۸ ابزار غنی‌سازی ژن است که مجموعه‌های ژن را در چهار ماژول مختلف شامل ابزارهای حاشیه‌نویسی، GOchart، KEGGchart و Domainchart نشان می‌دهد (Huang *et al.,* 2009). جهت بررسی و درک

بهتر ماهیت و عملکرد ژن‌های افتراقی بیان‌شده، شبکه هستی‌شناسی ژن‌ها به‌وسیله افزونه‌های ClueGO 2.5.10 (Bindea *et al.,* 2009) و CluePedia 1.5.10 (Bindea *et al.,* 2013) نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شد. به این‌منظور، ژن‌های افتراقی بیان شده به افزونه ClueGO معرفی شدند و بعد از دریافت نتایج هستی‌شناسی، عبارات هستی‌شناسی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد.

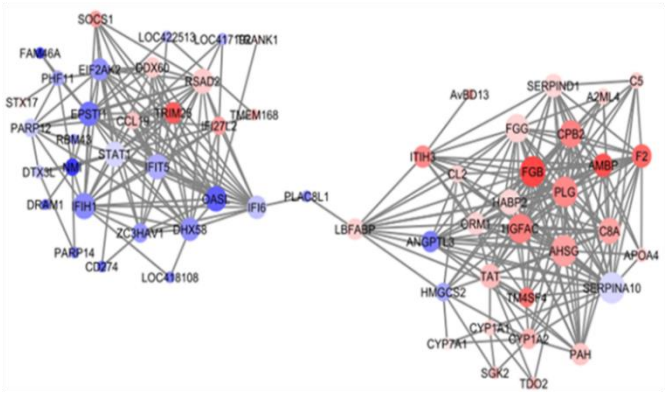
نتایج و بحث

ترسیم شبکه تعاملی در ابزار STRING

شبکه تعاملی پروتئین–پروتئین در ابزار STRING ترسیم شد. تعداد عضوها، تعداد اتصال‌ها، میانگین تعداد اتصال عضو، میانگین ضریب خوشه‌بندی محلی، تعداد اتصال‌های مورد انتظار و P-value غنی‌سازی شبکه PPI به‌ترتیب ۱۴۸، ۱۱۷۱، ۱۵/۸، ۰/۵۵۲، ۶۱ و P<1.0e−16 محاسبه شدند. براساس تعاملات مشاهده‌شده در شبکه ترسیم‌شده، مشخص شد که ۴۲ ژن هیچ‌گونه تعاملی با سایر ژن‌های مورد مطالعه نداشتند و خارج از شبکه حضور داشتند.

بارگذاری داده‌های ریزآرایه در شبکه و شناسایی شبکه‌های فرعی

بعد از تحلیل آماری داده‌های بیانی سری GSE53932، آنالیز و مقایسه بیان ژن‌ها میان گروه آلوده به ویروس آنفلوانزا CK-PAX3 مشتق‌شده از سویه H5N1 و گروه کنترل توسط نرم‌افزار GEO2R تعبیه‌شده در GEO انجام شد. شبکه تعاملی اولیه برای ژن‌ها با بیان افتراقی معنی‌دار به‌صورت ۶۱ عضو (پروتئین)، ۳۰۶ اتصال با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ایجاد شد. شبکه تعاملی پروتئین‌های هم‌بیان در پاسخ به ویروس آنفولانزا در مرغ ترسیم و تغییر رنگ بر اساس میزان بیان ژن‌ها در شکل ۱ نمایش داده شده است. رنگ‌های آبی و قرمز ژن‌های با بیان پایین و با بیان بالا را نشان می‌دهند و ژن‌هایی که تغییر رنگ زیادی ندارند میزان تغییرات بیان کمتری دارند. همچنین، تغییر اندازه عضوها نشان‌دهنده تغییر تعداد اتصال عضوها از کم به زیاد است. دو شبکه PPI توسط سه پروتئین PLAC8L1، LBFABP و IFI6 به‌هم مرتبط شدند. پروتئین‌های SERPINA10 و AHSG با امتیاز عضو ۲۲ و PLG با امتیاز عضو ۲۱ به‌عنوان پروتئین‌های هاب (Hub)، دارای بیشترین میزان تعامل در کل شبکه پروتئین‌ها با بیان افتراقی بودند که می‌تواند نشان‌دهنده نقش مهم بیولوژیکی و عملکردی متعدد آن‌ها باشد (شکل ۱).



شکل ۱– شبکه تعاملی پروتئین‌های پاسخگو به ویروس آنفولانزا در مرغ بعد از آنالیز با Cytoscape. تغییر طیف رنگ از آبی به قرمز نشان‌دهنده تغییر بیان از کم به زیاد و تغییر اندازه عضوها نشان‌دهنده تغییر تعداد اتصال عضوها از کم به زیاد است.

Figure 1. The interaction network of influenza virus-responsive proteins in chickens after analysis with Cytoscape. The color change from blue to red indicates the change of expression from low to high, and the change of the size of the nodes indicates the change of the degree of the nodes from low to high.

پروتئین عضو ۱۰ خانواده سرپین (SERPINA10) A یا مهارکننده‌های پروتئاز سرین (سرپین‌ها) خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که در تنظیم چندین فرآیند بیولوژیکی مهم نظیر التهاب، انعقاد، رگ‌زایی، و بقاء سلولی نقش دارند. این تنظیم عمدتاً شامل مهار پروتئازهای سرین است، اگرچه برخی سرپین‌ها دسته متفاوتی از پروتئازها را مهار می‌کنند یا حتی بدون فعالیت بازدارنده عمل می‌کنند (Bots & Medema, 2008). برخلاف سایر خانواده‌های بازدارنده پروتئاز، سرپین‌ها پروتئازهای هدف خود را با مکانیسم خاصی مهار می‌کنند که به تغییر ساختار بستگی دارد. علاوه‌بر بیان در اکثر بافت‌های طبیعی، سرپین‌ها را می‌توان در چندین سلول مختلف سیستم ایمنی یافت. از آن جا که بیان سرپین‌ها در این سلول‌ها به‌شدت تنظیم می‌شود، نشان‌دهنده نقش آن‌ها در تنظیم پاسخ‌های ایمنی است (Bots & Medema, 2008).

آلفا ۲–HS گلیکوپروتئین (AHSG) با اندوسیتوز و پاکسازی پاتوژن در ماکروفاژها مرتبط است و می‌تواند اریتروفاگوسیتوز ماکروفاژی و پاکسازی هماتوم را افزایش دهد (Zhang *et al.,* 2024). در بررسی حاشیه‌نویسی غنی‌سازی ژنی، پروتئین AHSG در مراحل بیولوژیکی مهم نظیر تنظیم مثبت فاگوسیتوز، پاسخ فاز حاد، پینوسیتوز و عملکرهای مولکولی نظیر فعالیت مهارکننده کیناز و فعالیت بازدارنده اندوپپتیداز نقش دارد (Jersmann *et al.,* 2003; Kalabay *et al.,* 2002; Lord, 2003). پلاسمینوژن (PLG)، زیموژن سرین پروتئاز پلاسمین، به سطوح سلولی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی متصل شده، فیبرینولیز، بهبود زخم،

جذب سلول‌های التهابی و فاکتور رشد و پردازش هورمون را تسهیل می‌کند (Plow & Hoover-Plow, 2004). در سطوح سلولی، PLG با گیرنده‌های متعددی که توسط لیزین‌های C ترمینال خود با مناطق کرینگل PLG تعامل دارند، مرتبط می‌شود (Miles *et al.*, 2005). اتصال PLG به ماکروفاژها تشکیل پلاسمین را افزایش داده، سیگنال‌های درون‌سلولی را تولید می‌کند که بیان ژن و پاسخ‌های عملکردی مانند تشکیل سلول‌های فوم را تعدیل می‌کنند (Das *et al.*, 2013). عملکرد فاگوسیتی ماکروفاژها نقشی اساسی در از بین بردن سلول‌های آپوپتوز و مهاجمان بیماری‌زا ایفا می‌کند. مشخص شده است که پلاسمین به‌جای ماکروفاژها روی سلول‌های طعمه عمل می‌کند (Berri *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای، با رویکردهای ترکیبی فارماکولوژیک و حذف ژن، نشان داده شد که چگونه پلاسمینوژن التهاب ریه و پاتوژنز عفونت‌های آنفولانزای A/PR/8/34، H5N1 بسیار بیماری‌زا و ویروس‌های همه‌گیر=2009 H1N1 را کنترل کرد. این اثر مشاهده شده ناشی از کاهش تکثیر ویروس نبود و در واقع، پلاسمینوژن با تشکیل لخته فیبرین موضعی در دفاع میزبان در برابر عفونت‌های ویروس آنفولانزا، به التهاب مضر ریه‌ها کمک کرد (Berri *et al.*, 2013).

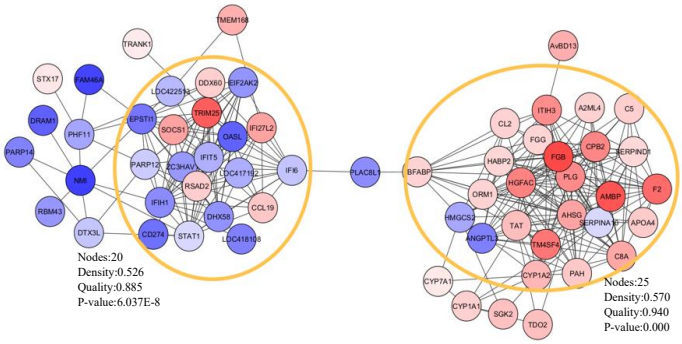
محاسبه با افزونه MCODE در نرم‌افزار Cytoscape منجربه شناسایی دوخوشه با چگالی بالا شد. این مناطق با چگالی بالا در شبکه ممکن است شامل پروتئین‌هایی باشند که به‌عنوان یک مجموعه در سلول عمل کنند. AMBP و DDX60 به‌عنوان پروتئین‌های Seed به‌ترتیب در خوشه شماره ۱ و ۲ حضور داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- شبکه‌های فرعی ایجاد شده توسط MCODE

Table 1. Subnetwork created by MCODE

Seed	تعداد اتصال Number of Edges	تعداد عضو Number of nodes	امتیاز Score	نام خوشه Cluster Name
AMBP	164	24	14.261	1
DDX60	91	16	12.133	2

پس از افزودن داده‌های بیان به عضوهای شبکه در نرم‌افزار Cytoscape، دو خوشه‌ژنی معنی‌دار (adj.$P < 0.05$) با استفاده از افزونه CytoCluster 2.1.0 (الگوریتم ClusterOne) با در نظر گرفتن مقدار ($P < 0.05$) شناسایی شدند (شکل ۲). اولین خوشه معنی‌دار با ۲۵ عضو در سمت راست شبکه شامل پروتئین‌های است که مسیر سیگنال‌دهی بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان را نشان دادند. دومین خوشه معنی‌دار با ۲۰ عضو در سمت چپ شبکه شامل پروتئین‌های است که مسیر سیگنال‌دهی آنفولانزای A، عفونت ویروس هرپس سیمپلکس ۱ و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I را به‌عنوان مسیر درگیر در پاسخ ایمنی به ویروس نشان دادند (جدول ۲).

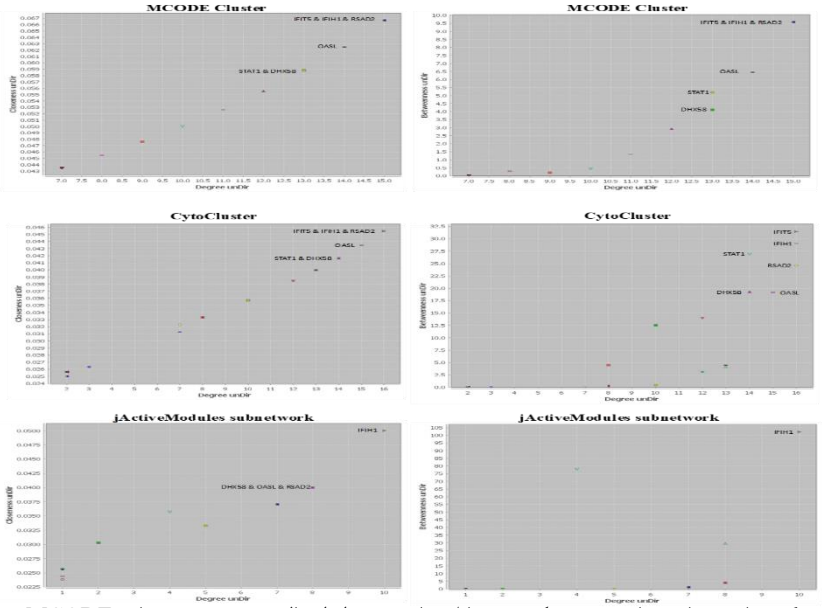


شکل ۲- خوشه‌های معنی‌دار شبکه تعاملی ژن‌های افتراقی شناسایی‌شده پاسخگو به ویروس آنفولانزا در مرغ. در این شبکه، ژن‌های با عضوهای قرمز تیره، بالاترین بیان و عضوهای آبی، کمترین بیان را دارند.

Figure 2. Significant clusters of the interaction network of identified DEGs responsive to influenza virus in chickens. In this network, genes with dark red and blue nodes have the highest and the lowest expressions, respectively.

شاخص‌های ارزیابی شبکه

پس از بارگذاری اطلاعات بیانی عضوها و محاسبه و طبقه‌بندی آن‌ها با استفاده از افزونه jActiveModules، پنج زیرشبکه بیانی فعال شناسایی شدند. محاسبات شاخص‌های مرکزیت برای زیرشبکه‌های بیانی فعال حاصل از الگوریتم jActiveModules پس از افزودن داده‌های بیان و برای خوشه‌های حاصل از الگوریتم‌های MCODE قبل از افزودن داده‌های بیان نیز انجام شدند. همان طور که در نمودار پراکندگی شکل ۳ نشان داده شده است، IFIT5، IFIH1 و RSAD2در خوشه‌های به‌دست‌آمده از الگوریتم MCODE و CytoCluster و IFIH1 در زیرشبکه فعال بیانی به‌دست‌آمده از jActiveModules دارای بالاترین امتیاز بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال عضو هستند. با توجه به خوشه‌ها و زیرشبکه‌های شناسایی‌شده، پروتئین‌های IFIH1، IFIT5 و RSAD2در خوشه‌های به‌دست‌آمده از الگوریتم MCODE (خوشه با بالاترین امتیاز) و CytoCluster و پروتئین IFIH1 در زیرشبکه فعال بیانی به‌دست‌آمده از jActiveModules دارای بالاترین امتیاز بینابینی، نزدیکی و تعداد اتصال عضو بودند.



شکل ۳–نمودار پراکندگی شاخص‌های بینابینی و نزدیکی در مقابل شاخص تعداد اتصال عضو در خوشه‌های MCODE و Cyto و زیرشبکه بیانی jAtiveModules.

Figure 3. The scatterplot of betweenness and closeness indices versus degree in MCODE and Cyto clusters and the jAtiveModules expression subnetwork

در بررسی غنی‌سازی ژنی KEGG، این سه پروتئین به‌همراه چهار پروتئین STAT1، EIF2AK2، TRIM25 و PLG به‌صورت معنی‌دار ($P < 0.05$) با مسیرهای غنی‌سازی آنفولانزای A در ارتباط بودند. در مسیرهای سیگنال‌دهی، پروتئین‌هایی با بینابینی بالا دارای بیشترین جریان اطلاعاتی بین پروتئین‌ها هستند. این پروتئین‌ها لزوما ممکن است هیچ‌گونه ارتباط فیزیکی با یکدیگر نداشته باشند اما با مهار یا تحریک پروتئین‌هایی با بینابینی بالا می‌توانند مسیر سیگنال‌دهی را نیز مهار یا تحریک کنند. در نتیجه، پروتئین‌هایی با امتیاز بینابینی بالا برای حفظ عملکرد و انسجام مکانیسم‌های سیگنال‌دهی بسیار مهم هستند. همچنین پروتئین‌هایی با نزدیکی بالا در مرکزیت یک مجموعه پروتئینی قراردارند که به‌صورت یک ماشین واحد عمل می‌کنند و در ارتباط تنگاتنگ فیزیکی با یکدیگر قرار دارند که با مهار یا تحریک پروتئین‌هایی با نزدیکی بالا می‌توان این مجموعه پروتئینی را نیز مهار یا تحریک کرد. شواهد نشان می‌دهند که پروتئین‌های القا شده با IFN با تکرارهای تتراتریکو پپتید (IFIT5) می‌توانند فعالیت‌های ضد ویروسی خود را به دو روش توقف ترجمه RNA ویروسی و شروع پاسخ‌های ایمنی ذاتی انجام دهند (Zhang *et al.,* 2013). هر دوی این فعالیت‌ها پتانسیل ضدویروسی IFIT5 را در برابر ویروس‌های RNAدار مانند ارتومیکسوویروس‌ها[1] مانند ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان و پارامیکسو ویروس‌ها[2] مانند ویروس بیماری نیوکاسل افزایش می‌دهند. بیان بیش از حد IFIT5 نه‌تنها تظاهرات علائم بالینی بیماری را در جوجه‌های آلوده به ویروس آنفولانزای H5N1 کاهش می‌دهد، بلکه ضایعات پاتولوژیک ناشی از ویروس و ریزش ویروس را نیز کاهش می‌دهد (Rohaim *et al.,* 2018). تعامل IFIT5 با RNA ویروسی به‌طور بالقوه، با رونویسی و ترجمه بعدی پروتئین‌های ویروسی تداخل ایجاد کرده، منجربه تأثیر منفی آن بر تکثیر RNA ویروس‌ها می‌شود (Rohaim *et al.,* 2018). پروتئین IFIH1 علاوه بر مسیر آنفولانزای A، در عفونت ویروس هرپس‌سیمپلکس ۱ و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I نیز نقش دارد (Kang *et al.,* 2002). در بافت‌های آلوده به ویروس آنفولانزای H5N1، ژن‌های IFIH1 و IRF7 تنظیم مثبت شدند که نشان‌دهنده فعال‌سازی پاسخ نوع ۱ IFN (IFNA) در ریه‌ها بود. همچنین، در فقدان ژن RIG-I در مرغ، ژن IFIH1 عملکردهای ایمنی RIG-I را جبران می‌کند (Karpala *et al.,* 2011). ژن RIG-I یک گیرنده تشخیص الگوی سیتوزولی است که القای پاسخ اینترفرون نوع ۱ (IFN1) را واسطه کرده، با شناسایی RNA/DNAهای ویروسی اگزوژن، ایمنی ذاتی ضدویروسی را آغاز می‌کند (Wang *et al.,* 2022). پروتئین ویپرین (پروتئین مهارکننده ویروس، مرتبط با شبکه آندوپلاسمی، القایی با اینترفرون) یا RSAD2، با ایجاد اختلال در قایق‌های لیپیدی روی غشای پلاسما و مهار انتشار نتاج ویروسی، عفونت ویروس آنفولانزا را مهار می‌کند (Zhang *et al.,* 2020). در جوجه‌ها، STAT1 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی NLRC5، نقش مهمی در فعالیت پروموتر NLRC5 ایفا می‌کند که ممکن است از طریق مسیر اینترفرون فعال شود (Qiu *et al.,* 2017). NLRC5 پروتئینی متعلق به خانواده پروتئین گیرنده‌های شبه NOD (NLRs)، در بافت‌ها و سلول‌های ایمنی به‌شدت بیان می‌شود. NLRC5 نقش مهمی در پاسخ ایمنی ایفا می‌کند

[1] Orthomyxoviruses
[2] Paramyxoviruses

(Qiu *et al.,* 2017). همچنین، مشخص شد که محور IFN-STAT1 نوع I باعث بیان گیرنده فاکتور تحریک کننده کلنی ماکروفاژ می‌شود و اثرات ضد ویروسی ایجاد می‌کند (Sue-Jane *et al.,* 2023). TRIM25، به‌عنوان یک عضو مهم از خانواده TRIM، اغلب در تنظیم پاسخ ضدویروسی میزبان با فعال‌کردن ایمنی ذاتی نشان داده شده است که پروتئین آن در جوجه‌ها به‌طور گسترده در اندام‌های ایمنی بیان می‌شود. گزارش شده است که TRIM25 با تسهیل حس میزبانی با واسطه RIG-I به روشی وابسته به لیگاز یوبیکوئیتین، عفونت ویروس آنفولانزا را مهار می‌کند (Liu *et al.,* 2022). TRIM25 مرغ می‌تواند از تکثیر ویروس جلوگیری‌کرده، پاسخ اینترفرون نوع I با واسطه گیرنده MDA5 را در جوجه‌ها تنظیم کند. این پروتئین می‌تواند واسطه القای پاسخ ضد ویروسی با یوبی‌کوئیتین کردن (Ubiquitinating) عوامل داخل سلولی باشد (Liu *et al.,* 2022). پروتئین کیناز R (EIF2AK2) در سلول‌های مرغ یک پروتئین چندشکل با عملکرد ضدویروسی است که برای القای IFNα/β در پاسخ به ویروس آنفولانزا مورد نیاز است (Schulz *et al.,* 2010). پروتئین EIF2AK2 علاوه بر مسیر آنفولانزای A درمسیر سیگنال‌دهی عفونت ویروس هرپس‌سیمپلکس ۱ نیز نقش دارد. در مطالعه چوداری و همکاران (Chaudhary *et al.,* 2023)، در مجموع ۳۹ ژن مرتبط با عفونت H5N1 در انسان به‌طور قابل‌توجهی با یکدیگر تعامل داشتند و یک شبکه PPI با ۳۸ عضو و ۱۴۹ اتصال تشکیل دادند که ۷۴ مسیر KEGG، ۷۶ فرآیند بیولوژیکی، ۱۳ جزء سلولی و ۲۲ عملکرد مولکولی را تعدیل می‌کرد. به‌علاوه، تجزیه و تحلیل شبکه PPI نشان داد که ۳۳ عضو با هم تعامل دارند و ۱۰۵۶ کوتاه‌ترین مسیر را با تراکم شبکه ۰/۲۸۲، همراه با طول مسیر مشخصه ۱/۹۴۷ تشکیل می‌دهند. تجزیه و تحلیل توپولوژیک محلی، ژن‌های هاب IFNA1، IRF3، CXCL8، CXCL10، IFNB1 و CHUK را در عفونت H5N1 انسانی پیش‌بینی کرد. در مطالعه یانگ و همکاران (Yang *et al.,* 2020)، MCEMP1 و SPARC به‌عنوان ژن هاب با تأثیر آشکار بر ایمنی ناشی از واکسن آنفولانزا تأیید شدند. نشان داده شد که بیان MCEMP1 با واکنش‌زایی مرتبط با واکسن در عرض ۷ روز پس از واکسیناسیون همبستگی منفی داشت، که می‌تواند توسط CXCL 8/IL-8 سرکوب و توسط واسطه سیتوتوکسیک Granzyme-B تشدید شود. در همین حال، بیان SPARC به افزایش پاسخ‌های ایمنی و تداوم تیترهای آنتی بادی هومورال کمک کرد.

بررسی روابط عملکردی و تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی

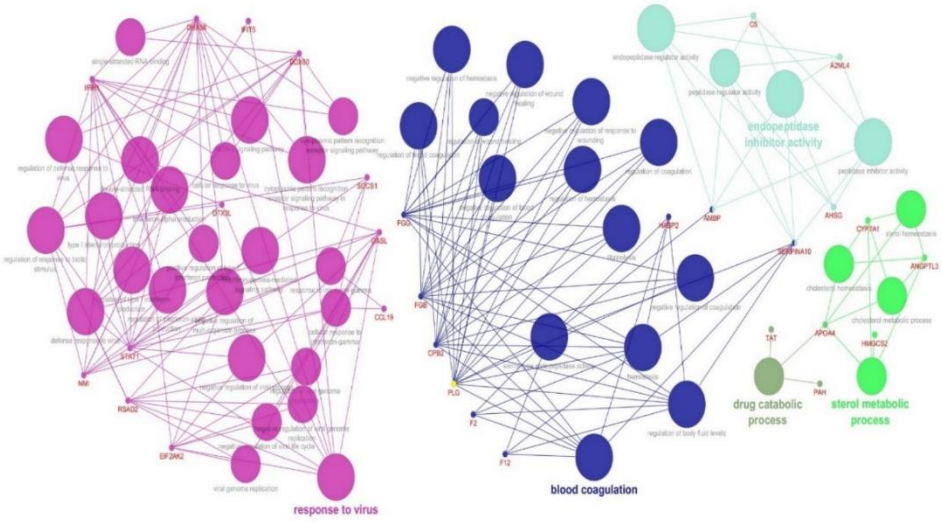
ابزار حاشیه‌نویسی عملکردی DAVID به‌منظور شناسایی مسیرها و عملکردهای بیولوژیکی مرتبط در هر یک از شبکه‌های فرعی مورد استفاده قرار گرفت. غنی‌سازی در شبکه اصلی، خوشه‌ها و زیرشبکه‌های فرعی با استفاده از مسیرهای KEGG نشان داد که برخی از ژن‌های آن‌ها در مسیر سیگنال‌دهی آنفولانزای A، عفونت ویروس هرپس‌سیمپلکس ۱، بیوسنتز اسید آمینه‌های فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان، متابولیسم فنیل‌آلانین و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I نقش دارند. گیرنده‌های شبه Retinoic acid-inducible gene I) (RLRs) RIG-I receptors (RIG-I)-like))، به‌عنوان حسگرهای کلیدی عفونت ویروسی، منجربه القای رونویسی اینترفرون‌های نوع I در جریان پاسخ ضد ویروسی شده، در نتیجه برای شناسایی RNA ویروسی و شروع پاسخ ایمنی ذاتی ضروری هستند (Rehwinkel & Gack, 2020). در نهایت، افزایش بیان ژن‌های این خوشه در زمان پاسخ به ویروس امری طبیعی است (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج غنی‌سازی عضوهای شناسایی شده در مطالعه حاضر

Table 2. Results of the enrichment of nodes detected in the present study

کد KEGG KEGG Code	عبارات هستی‌شناسی ژن (GO-term)	ژن‌های مرتبط (Associated genes)	مقادیر- P (P-value)
شبکه اصلی (Main Network)			
gga05164	Influenza A (آنفولانزای A)	IFIH1, RSAD2, STAT1, EIF2AK2, TRIM25, PLG	9.1E-5
gga05168	Herpes simplex virus 1 infection عفونت ویروس هرپس سیمپلکس ۱	IFIH1, C5, STAT1, EIF2AK2	1.7E-2
gga04622	RIG-I-like receptor signaling pathway مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I	IFIH1, DHX58, TRIM25	1.8E-2
gga00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis بیوسنتز فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان	TAT, PAH	1.8E-2
gga00360	Phenylalanine metabolism متابولیسم فنیل‌آلانین	TAT, PAH	4.6E-2
خوشه MCODE (MCODE Cluster)			
gga05164	Influenza A (آنفولانزای A)	IFIH1, RSAD2, STAT1, EIF2AK2, TRIM25	1.1E-5
gga04622	RIG-I-like receptor signaling pathway مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I	IFIH1, DHX58, TRIM25	2.2E-3
gga05168	Herpes simplex virus 1 infection عفونت ویروس هرپس سیمپلکس ۱	IFIH1, STAT1, EIF2AK2	1.5E-2
خوشه Cyto (CytoCluster)			
gga05164	Influenza A (آنفولانزای A)	IFIH1, RSAD2, STAT1, EIF2AK2, TRIM25	2.2E-5
gga04622	RIG-I-like receptor signaling pathway مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I	IFIH1, DHX58, TRIM25	2.9E-3
gga05168	Herpes simplex virus 1 infection عفونت ویروس هرپس سیمپلکس ۱	IFIH1, STAT1, EIF2AK2	1.9E-2
زیرشبکه ActiveModules (ActiveModules Subnetwork)			
gga05164	Influenza A (آنفولانزای A)	IFIH1, RSAD2, STAT1, EIF2AK2	1.4E-4
gga04622	RIG-I-like receptor signaling pathway مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I	IFIH1, DHX58, TRIM25	1.1E-3

همچنین، نتایج هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی بیان‌شده در قالب شبکه جهت نمایش عملکردهای مولکولی و فرآیندهای زیستی نظیر پاسخ به ویروس، تولید اینترفرون آلفا، تنظیم تولید اینترفرون نوع I، تنظیم منفی فرآیند ویروسی، تنظیم پاسخ دفاعی به ویروس، پاسخ سلولی به ویروس، تکثیر ژنوم ویروسی، فرآیند کاتابولیک دارو، فعالیت بازدارنده آندوپپتیداز، و فرآیند متابولیک استرول با معنی‌داری ($P < 0.05$) در شکل ۴ نشان داده شده‌اند.



شکل ۴- ارتباطات بین هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی شناسایی شده پاسخگو به ویروس انفولانزا در مرغ. عضوهای کوچک ژن‌ها و عضوهای بزرگ عبارات هستی‌شناسی هستند.

Figure 4. Relationships between the ontology of identified DEGs responsive to the influenza virus in chickens. Small and large nodes are genes and ontology terms, respectively.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، درنظر گرفتن احتمال ارتباط میان ژن‌های هم‌بیان در مسیرهای سیگنال‌دهی پاسخگو به ویروس و آنالیز اطلاعات بیانی حاصل از پایگاه داده GEO برای محاسبه شاخص‌های مرکزیت پروتئین‌های با بیان افتراقی معنی‌دار ($P < 0.05$) منجر به شناسایی نشانگرهای زیستی مرتبط با فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با پاسخ به ویروس آنفولانزا در مرغ شد. پروتئین‌های IFIH1، IFIT5، و RSAD2 با بالاترین امتیاز شاخص‌های مرکزیت در خوشه‌ها و زیرشبکه‌های بیانی فعال و STAT1، PLG، EIF2AK2، DHX58 و TRIM25 به‌عنوان پروتئین‌های با فعالیت معنی‌دار ($P < 0.05$) در مسیرهای سیگنال‌دهی آنفولانزای A و مسیر سیگنال‌دهی گیرنده RIG-I در طیور به‌عنوان نشانگرهای زیستی مهم شناسایی شدند. در نتیجه، تلاش در جهت شناسایی نشانگرهای زیستی تشخیصی و درمانی در جهت کمک به ساخت واکسن‌ها، گامی مهم برای کنترل این ویروس خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۴-۱۴۰۳-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

References

Bader, G., Pavlovic, V., & Lopes, C. (2020). *MCODE Documentation*.

Berri, F., Rimmelzwaan, G. F., Hanss, M., Albina, E., Foucault-Grunenwald, M.-L., Lê, V. B., Vogelzang-van Trierum, S. E., Gil, P., Camerer, E., Martinez, D., Lina, B., Lijnen, R., Carmeliet, P., & Riteau, B. (2013). Plasminogen Controls Inflammation and Pathogenesis of Influenza Virus Infections via Fibrinolysis. *PLOS Pathogens*, *9*(3), e1003229.

Bindea, G., Galon, J., & Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics,* 29(5), 661-663. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt019

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., & Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091–1093. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101

Bots, M., & Medema, J. P. (2008). Serpins in T cell immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(5), 1238–1247. https://doi.org/10.1189/jlb.0208140

Chaudhary, R. K., L, A., Patil, P., Mateti, U. V., Sah, S., Mohanty, A., Rath, R. S., Padhi, B. K., Malik,

S., Jassim, K. H., Al-Shammari, M. A., Waheed, Y., Satapathy, P., Barboza, J. J., Rodriguez-Morales, A. J., & Sah, R. (2023). System Biology Approach to Identify the Hub Genes and Pathways Associated with Human H5N1 Infection. *Vaccines*, 11(7), 1–16. https://doi.org/10.3390/vaccines11071269

Chen, L., Hua, J., & He, X. (2022). Co-expression network analysis identifies potential candidate hub genes in severe influenza patients needing invasive mechanical ventilation. *BMC Genomics,* 23(1), 703. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08915-9

van Dam, S., Craig, T., & de Magalhães, J. P. (2015). GeneFriends: a human RNA-seq-based gene and transcript co-expression database. *Nucleic Acids Research,* 43(D1), D1124-D1132. https://doi.org/10.1093/nar/gku1042

Das, R., Ganapathy, S., Mahabeleshwar, G. H., Drumm, C., Febbraio, M., Jain, M. K., & Plow, E. F. (2013). Macrophage Gene Expression and Foam Cell Formation Are Regulated by Plasminogen. *Circulation*, 127(11), 1209–1218. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001214

Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., & Jensen, L. J. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Journal of Proteome Research*, *18*(2), 623–632. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702

Golpasand, S., Ghovvati, S., & Pezeshkian, Z. (2024). Unraveling the H5N1 influenza infection response: A comparative gene expression networks and functionally enriched pathways analysis in chickens and ducks. *Animal Production Research*, *12*(4), 1–22. https://doi.org/10.22124/ar.2023.24839.1773 [In Persian]

Hu, J., Mo, Y., Wang, X., Gu, M., Hu, Z., Zhong, L., ... & 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. https://doi.org/10.1128/JVI.02132-14

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 1–13. https://doi.org/10.1093/nar/gkn923

Huang, T., Wang, J., Cai, Y.-D., Yu, H., & Chou, K.-C. (2012). Hepatitis C Virus Network Based Classification of Hepatocellular Cirrhosis and Carcinoma. *Plos One*, *7*, e34460. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034460

Huang, T., Wang, P., Ye, Z.-Q., Xu, H., He, Z., Feng, K.-Y., Hu, L., Cui, W., Wang, K., Dong, X., Xie, L., Kong, X., Cai, Y.-D., & Li, Y. (2010). Prediction of Deleterious Non-Synonymous SNPs Based on Protein Interaction Network and Hybrid Properties. *PloS One*, *5*(7), e11900.

Hwang, W., & Han, N. (2022). Identification of potential pan-coronavirus therapies using a computational drug repurposing platform. *Methods*, *203*, 214–225. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.11.002

Ibrahim, B., McMahon, D. P., Hufsky, F., Beer, M., Deng, L., Mercier, P. Le, Palmarini, M., Thiel, V., & Marz, M. (2018). A new era of virus bioinformatics. *Virus Research*, *251*, 86–90. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.009

Jersmann, H. P. A., Dransfield, I., & Hart, S. P. (2003). Fetuin/α2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clinical Science*, *105*(3), 273–278. https://doi.org/10.1042/CS20030126

Jiang, M., Chen, Y., Zhang, Y., Chen, L., Zhang, N., Huang, T., Cai, Y.-D., & Kong, X. (2013). Identification of hepatocellular carcinoma related genes with k-th shortest paths in a protein-protein interaction network. *Molecular BioSystems*, *9*(11), 2720–2728. https://doi.org/10.1039/c3mb70089e

Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J. F., Faraut, T., Wu, C., Muzny, D. M., Li, Y., Zhang, W., Stanton, J.-A., Brauning, R., Barris, W. C., Hourlier, T., Aken, B. L., Searle, S. M. J., Adelson, D. L., Bian, C., Cam, G. R., … Dalrymple, B. P. (2014). The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science*, *344*(6188), 1168–1173. https://doi.org/10.1126/science.1252806

Kalabay, L., Cseh, K., Pajor, A., Baranyi, É., Csákány, G. M., Melczer, Z., Speer, G., Kovács, M., Siller, G., Karádi, I., & Winkler, G. (2002). Correlation of maternal serum fetuin/alpha2-HS-glycoprotein concentration with maternal insulin resistance and anthropometric parameters of neonates in normal pregnancy and gestational diabetes. *European Journal of Endocrinology*, *147*(2), 243–248. https://doi.org/10.1530/eje.0.1470243

Kang, D., Gopalkrishnan, R. V, Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M., & Fisher, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(2), 637–642. https://doi.org/10.1073/pnas.022637199

Karpala, A. J., Stewart, C., McKay, J., Lowenthal, J. W., & Bean, A. G. D. (2011). Characterization of Chicken Mda5 Activity: Regulation of IFN-β in the Absence of RIG-I Functionality. *The Journal of Immunology*, *186*(9), 5397–5405. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003712

Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 559. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559

Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., & Wang, J. (2017). CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International Journal of Molecular Sciences,* 18(9), 1880. https://doi.org/10.3390/ijms18091880

Li, Q., Yuan, X., Wang, Q., Chang, G., Wang, F., Liu, R., Zheng, M., Chen, G., Wen, J., & Zhao, G. (2016). Interactomic landscape of PA-X-chicken protein complexes of H5N1 influenza A virus. *Journal of Proteomics*, *148*, 20–25. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.009

Liu, J., Gu, T., Chen, J., Luo, S., Dong, X., Zheng, M., ... & Xu, Q. (2022). The TRIM25 gene in ducks: cloning, characterization and antiviral immune response. *Genes,* 13(11), 2090. https://doi.org/10.3390/genes13112090

Lord, J. M. (2003). A physiological role for α2-HS glycoprotein: stimulation of macrophage uptake of apoptotic cells. *Clinical Science*, *105*(3), 267–268. https://doi.org/10.1042/CS20030177

Miles, L. A., Hawley, S. B., Baik, N., Andronicos, N. M., Castellino, F. J., & Parmer, R. J. (2005). Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Frontiers in Bioscience*, *10*, 1754–1762.

Nabieva, E., Jim, K., Agarwal, A., Chazelle, B., & Singh, M. (2005). Whole-proteome prediction of protein function via graph-theoretic analysis of interaction maps. *Bioinformatics,* 21(suppl_1), i302-i310. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1054

Plow, E. F., & Hoover-Plow, J. (2004). The Functions of Plasminogen in Cardiovascular Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *14*(5), 180–186. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.04.001

Qiu, L., Ma, T., Chang, G., Liu, X., Guo, X., Xu, L., Zhang, Y., Zhao, W., Xu, Q., & Chen, G. (2017). Expression patterns of NLRC5 and key genes in the STAT1 pathway following infection with Salmonella pullorum. *Gene*, *597*, 23–29. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.026

Ranaware, P. B., Mishra, A., Vijayakumar, P., Gandhale, P. N., Kumar, H., Kulkarni, D. D., & Raut, A. A. (2016). Genome Wide Host Gene Expression Analysis in Chicken Lungs Infected with Avian Influenza Viruses. *PloS One*, *11*(4), e0153671.

Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, *20*(9), 537–551. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3

Rohaim, M. A., Santhakumar, D., Naggar, R. F. El, Iqbal, M., Hussein, H. A., & Munir, M. (2018). Chickens Expressing IFIT5 Ameliorate Clinical Outcome and Pathology of Highly Pathogenic Avian Influenza and Velogenic Newcastle Disease Viruses. *Frontiers in Immunology*, *9*.

Saberi Anvar, M., Minuchehr, Z., Shahlaei, M., & Kheitan, S. (2018). Gastric cancer biomarkers; A systems biology approach. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *13*, 141–146. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.01.001

Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., Lotia, S., Pico, A. R., Bader, G. D., & Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*, *9*(11), 1069–1076. https://doi.org/10.1038/nmeth.2212

Scardoni, G., & Lau, C. (2012). Centralities Based Analysis of Complex Networks. *New Frontiers in Graph Theory*, *March 2012*. https://doi.org/10.5772/35846

Schulz, O., Pichlmair, A., Rehwinkel, J., Rogers, N. C., Scheuner, D., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Kaufman, R. J., & Reis e Sousa, C. (2010). Protein Kinase R Contributes to Immunity against Specific Viruses by Regulating Interferon mRNA Integrity. *Cell Host & Microbe*, *7*(5), 354–361. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.04.007

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* , *13*(11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303

Sue-Jane, L., Kai-Min, L., Jill, C. S.-Y., Chia-Chi, K., Chen-Wei, H., Chi-Hsiang, H., Michael, G., & Ching-Hwa, T. (2023). Type I Interferon Orchestrates Demand-Adapted Monopoiesis during Influenza A Virus Infection via STAT1-Mediated Upregulation of Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Expression. *Journal of Virology*, *97*(4), e00102-23. https://doi.org/10.1128/jvi.00102-23

Tieri, P., Farina, L., Petti, M., Astolfi, L., Paci, P., & Castiglione, F. (2019). *Network Inference and Reconstruction in Bioinformatics* (S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. B. T.-E. of B. and C. B. Schönbach (Eds.); pp. 805–813). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20290-2

van Dam, S., Võsa, U., van der Graaf, A., Franke, L., & de Magalhães, J. P. (2018). Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(4), 575–592. https://doi.org/10.1093/bib/bbw139

Yang, J., Zhang, J., Fan, R., Zhao, W., Han, T., Duan, K., ... & Yang, X. (2020). Identifying potential candidate hub genes and functionally enriched pathways in the immune responses to quadrivalent inactivated influenza vaccines in the elderly through Co-Expression network analysis. *Frontiers in Immunology,* 11, 603337.

Yang, J., Zhang, J., Fan, R., Zhao, W., Han, T., Duan, K., ... & Yang, X. (2020). Identifying potential candidate hub genes and functionally enriched pathways in the immune responses to quadrivalent inactivated influenza vaccines in the elderly through Co-Expression network analysis. *Frontiers in*

Immunology, 11, 603337.

Yang, Y., Han, L., Yuan, Y., Li, J., Hei, N., & Liang, H. (2014). Gene co-expression network analysis reveals common system-level properties of prognostic genes across cancer types. *Nature Communications*, *5*(1), 3231. https://doi.org/10.1038/ncomms4231

Zhang, B., Goraya, M. U., Chen, N., Xu, L., Hong, Y., Zhu, M., & Chen, J. L. (2020). Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 restricts the viral replication by positively regulating type I interferon response. *Frontiers in Microbiology,* 11, 1912.

Zhang, Bianhong, Liu, X., Chen, W., & Chen, L. (2013). IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *45*(10), 867–874. https://doi.org/10.1093/abbs/gmt088

Zhang, Q., Liu, Y., Zhang, J., Wang, Q., Ying, F., Liu, D., Wen, J., Zhao, G., & Li, Q. (2024). Gene expression response to Salmonella Typhimurium in the cecal tonsil reveals a potential mechanism of resistance in chickens. *Poultry Science*, *103*(3), 103356. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103356

Zhao, Y., Li, H., Fang, S., Kang, Y., Wu, W., Hao, Y., ... & Chen, R. (2016). NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research,* 44(D1), D203-D208. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1252