

Research Paper

A Study on the Protein-Protein Interaction Network Based on Gene Expression Changes in the Spleen Tissue of Broiler Chickens Infected with the Newcastle Virus Strain JS5-05

Farhad Ghafouri-Kesbi 

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran,
(Corresponding author: f.ghafouri@basu.ac.ir)

Received: 15 March, 2025

Revised: 05 July, 2025

Accepted: 12 August, 2025

Extended Abstract

Background: Newcastle disease is one of the important diseases in the flock of chickens and roosters, which can result in many casualties. The disease is very dangerous and causes up to 90% death in the commercial flocks of broilers and laying hens in the case of an outbreak. This disease is caused by infection with malignant strains of Newcastle paramyxovirus. In addition to affecting chicken flocks and roosters, this contagious disease can spread to other poultry, such as turkeys, ducks, geese, quails, pheasants, and pigeons, and even ornamental birds, such as parrots. Fortunately, this disease has a vaccine, and if the necessary vaccines are injected into the herd at the appointed time, it will prevent its spread to the herd. The JS5-05 virus strain is one of the reference viruses that cause Newcastle disease, and other virus strains are compared with this strain in terms of pathogenicity and other characteristics. Previous reports suggest that immune responses to Newcastle disease have a genetic origin. Therefore, it can be expected that the expression of some genes will increase and the expression of others will decrease during the outbreak of this disease. These genes form a network in which they interact with each other. The gene network and protein-protein interaction in Newcastle disease caused by JS5-05 virus were investigated in the present study.

Methods: Gene expression data related to spleen cells of broiler chickens infected with the JS5-05 virus (patient treatment, three samples) and healthy broiler chickens (control treatment, three samples) were extracted from the NCBI website and the GEO Expression Omnibus database with the accession number GSE40100. Quality control and data normalization, as well as determining genes with different expressions, between the control and patient treatments at the level of $p < 0.05$ p-value and LogFC statistic ($-2 < \text{LogFC} < +2$), were done with GEO2R online software. The STRING resource was used to obtain the gene network. The network analyzer algorithm, which is a program loaded in CYTOSCAPE software, was used for network analysis. Three parameters were used to identify key genes in the network: the degree of centrality, betweenness centrality, and closeness centrality. These network topology measures were calculated using the CytoNCA plugin. Finally, DAVID online software was used to investigate the relationship between the central genes identified in the interactive network and Newcastle infection.

Results: In total, 4,720 out of 33,815 studied genes showed different expressions, of which significant differences were observed in the expression of 414 genes ($p < 0.05$ and $-2 < \text{LogFC} < +2$). These genes were located in an interactive network where each gene interacted with other genes. The 10 most important genes, including IFIH1, MX1, RSAD2, IFIT5, EIF2AK2, OASL, USP41, DHX58, CMPK2, and IFI6, formed the central core of the network, which involved various biological processes, including stopping the translation of the virus genome, stimulating the production of interferons and macrophages and stimulating the activity of some enzymes during Newcastle infection. The most important gene in the central network was the IFIH1 gene, which encodes a cell cycle protein called MAD5, an intracellular sensor for viral RNA that stimulates the innate immune response by stimulating the production of interferons. The results of the analysis of signaling pathways showed that the genes identified in this study were not only involved in Newcastle virus infection but were also active in other pathways, including infection with influenza A virus and herpes virus, as well as pathways that were active in the immune system.



Conclusion: All the genes in the central core of the gene network involved in response to the Newcastle virus had relationships with immune processes and defense responses to Newcastle infection, and therefore, a change was expected in their expressions during virus infection. Since there are different genotypes for these genes, it is suggested to examine the level of resistance to Newcastle disease in different genotypic groups for each gene and select the birds that have the superior genotype for the genes present in the central network to increase genetic resistance to Newcastle.

Keywords: Broiler, Gene, Gene network, Newcastle

How to Cite This Article: Ghafouri Kesbi, F. (2025). A Study on the Protein-Protein Interaction Network Based on Gene Expression Changes in the Spleen Tissue of Broiler Chickens Infected with the Newcastle Virus Strain JS5-05. *Res Anim Prod*, 16(4), 18-28. DOI: 10.61882/rap.2025.1496

مقاله پژوهشی

مطالعه شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین بر اساس تغییر بیان ژن‌ها در بافت طحال مرغان گوشتی آلوده به سویه JS5-05 از ویروس نیوکاسل

فرهاد غفوری کسبی^{ID}

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، (نویسنده مسوول: f.ghafouri@basu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۴
صفحه ۱۸ تا ۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۵

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: یکی از بیماری‌های مهم و قابل توجه در گله مرغ و خروس و یا ماکیان که تلفات بسیاری از آن‌ها را در پی خواهد داشت، بیماری نیوکاسل است. بیماری بسیار خطرناک است و در صورت شیوع تا ۹۰٪ تلفات در گله‌های تجاری مرغان گوشتی و تخم‌گذار برجای می‌گذارد. این بیماری بر اثر عفونت با سویه‌های بدخیم ویروس پارامیکسوویروس نیوکاسل ایجاد می‌شود و علاوه بر این که می‌تواند گله‌مرغ و خروس‌ها را درگیر کند، توانایی سرایت به سایر ماکیان مانند بوقلمون، اردک و غاز، بلدرچین، قرقاول، کبوتر و حتی پرندهای زینتی مانند طوطی‌سانان را دارد. خوشبختانه، این بیماری دارای واکسن است و اگر در زمان مقرر واکسن‌های لازم به گله تزریق شوند مانع از سرایت آن به گله خواهند شد. سویه ویروس JS5-05 یکی از ویروس‌های مرجع ایجادکننده نیوکاسل است که سایر سویه‌های ویروس از نظر شدت بیماری‌زایی و خصوصیات دیگر با این سویه مقایسه می‌شوند. گزارشات قبلی نشان می‌دهند که پاسخ‌های ایمنی به بیماری نیوکاسل متشابه ژنتیکی دارند. بنا بر این، قابل انتظار است که در زمان شیوع این بیماری بیان برخی ژن‌ها افزایش و بیان برخی دیگر کاهش یابد. این ژن‌ها احتمالاً شبکه‌ای را تشکیل می‌دهند که در آن شبکه در تعامل با یکدیگر خواهند بود. در مطالعه حاضر، شبکه ژنی و تعامل پروتئین-پروتئین در بیماری نیوکاسل ناشی از ویروس JS5-05 بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: داده‌های بیان ژن مربوط به سلول‌های طحال جوجه‌های گوشتی آلوده‌شده با ویروس JS5-05 (تیمار بیمار، ۳ نمونه) و همچنین جوجه‌های گوشتی سالم (تیمار کنترل، سه نمونه) از سایت NCBI و پایگاه GEO Expression Omnibus با شماره دسترسی GSE40100 استخراج شدند. کنترل کیفیت و نرمال‌سازی داده‌ها و همچنین تشخیص ژن‌های با بیان متفاوت بین دو تیمار کنترل و بیمار در سطح احتمال $p < 0.05$ و آماره LogFC ($2 < \text{LogFC} < -2$) با استفاده از نرم‌افزار برخط GEO2R انجام شد. برای به‌دست‌آوردن شبکه‌ژنی از منبع STRING استفاده شد. الگوریتم Network Analyzer که یک برنامه بارگذاری‌شده در نرم‌افزار Cytoscape است، برای آنالیز شبکه به‌کار برده شد. برای شناسایی ژن‌های کلیدی در شبکه، از سه پارامتر درجه مرکزیت، مرکزیت بینایی، و مرکزیت نزدیکی استفاده شد. این معیارهای توپولوژی شبکه با استفاده از افزونه CytonCA محاسبه شدند و سپس با استفاده از افزونه Cytohubba، ده ژن کلیدی در شبکه (ژن‌های هاب) به‌صورت یک شبکه رسم گردید. در نهایت، جهت بررسی ارتباط ژن‌های مرکزی شناسایی‌شده در شبکه تعاملی با بیماری نیوکاسل و بررسی مسیرهای سیگنال‌دهی آن‌ها، از نرم‌افزار برخط DAVID استفاده شد.

یافته‌ها: در مجموع، از ۳۳۸۱۵ ژن مطالعه‌شده، ۴۷۲۰ ژن بیان متفاوتی داشتند که از این تعداد، تفاوت بیان ۴۱۴ ژن معنی‌دار بود ($p < 0.05$ و $2 < \text{LogFC}$). این ژن‌ها در یک شبکه تعاملی قرار داشتند که در آن هر ژن در تعامل با سایر ژن‌ها بود. ۱۰ ژن با اهمیت بیشتر شامل RSAD2، MX1، IFIH1، IFI6، HST2، DHX58، USP41، OASL، EIF2AK2، IFIT5، و IFIT5 شامل توقف رونویسی از ژنوم ویروس، تحریک تولید اینترفرون‌ها و ماکروفاژها و تحریک فعالیت برخی آنزیم‌ها را در هنگام بروز عفونت نیوکاسل منجر می‌شدند. مهم‌ترین ژن در شبکه مرکزی، ژن IFIH1 بود. این ژن پروتئینی درون‌سلولی به نام MAD5 را کد می‌کند که یک حسگر درون‌سلولی برای RNA ویروسی است و از طریق تحریک تولید اینترفرون‌ها پاسخ ایمنی‌ذاتی را تحریک می‌نماید. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مسیرهای سیگنال‌دهی نشان دادند که ژن‌های مشخص‌شده در این تحقیق نه تنها با عفونت ناشی از ویروس نیوکاسل درگیر بودند بلکه این ژن‌ها در مسیرهای دیگری نیز فعال بودند. عفونت ناشی از ویروس آنفلوانزا A و ویروس هرپس و درضمن مسیرهای فعال در سیستم ایمنی از جمله این مسیرها بودند.

نتیجه‌گیری: تمامی ژن‌های موجود در هسته مرکزی شبکه‌ژنی دخیل در پاسخ به ویروس نیوکاسل با فرایندهای ایمنی و پاسخ‌های دفاعی به عفونت نیوکاسل در ارتباط بودند و از این رو، تغییر در میزان بیان آن‌ها در زمان آلودگی با ویروس قابل انتظار بود. از آن جا که برای این ژن‌ها ژنوتیپ‌های مختلفی وجود دارند، پیشنهاد می‌شود که میزان مقاومت به بیماری نیوکاسل در گروه‌های مختلف ژنوتیپی برای هر ژن بررسی شود و پرنده‌گانی که برای ژن‌های حاضر در شبکه مرکزی دارای ژنوتیپ برتر باشند را جهت افزایش مقاومت ژنتیکی به نیوکاسل انتخاب نمود.

واژه‌های کلیدی: جوجه گوشتی، ژن، شبکه‌ژنی، نیوکاسل

مقدمه

نگهداری می‌شوند (Mohammadabadi et al., 2010). این به‌دلیل وجود صفات ارزشمند مرغ مانند مقاومت به بیماری، سازگاری با محیط‌های سخت و توانایی استفاده از خوراک‌های بی کیفیت است (Khabiri et al., 2023).

بیماری نیوکاسل (Newcastle Disease) نوعی بیماری بسیار مسری پرنده‌گان است که توسط ویروس پارامکسو ایجاد می‌شود (Zhang et al., 2023). پرنده‌گان مبتلا به این بیماری شامل بوقلمون‌ها، غازها، اردک‌ها، قرقاول‌ها، کبک‌ها، مرغ‌های دریایی و سایر پرنده‌گان وحشی و از جمله شترمرغ‌ها می‌شوند (Aziz Ali-Abadi et al., 2017). بر اساس آخرین طبقه‌بندی در اواخر سال ۲۰۱۸، ویروس این بیماری در جنس

تولیدات دامی، به‌ویژه تولیدات طیور نقش حیاتی اجتماعی-اقتصادی را برای افرادی که در کشورهای کم‌درآمد آفریقا و آسیا زندگی می‌کنند ایفا می‌کنند (Ghasemi et al., 2022; Mohammadifar et al., 2014). طیور اهلی به‌دلیل فاصله نسلی کوتاه و سازگاری آن‌ها در طیف وسیعی از اکولوژی‌های زراعی، از گونه‌های پرنده‌گانی هستند که پراکندگی گسترده‌ای در سراسر جهان دارند (Mohammadifar & Mohammadabadi, 2018). مرغ‌های خانگی پروتئین و درآمد با کیفیت بالایی را برای خانوارهای روستایی فقیر فراهم می‌کنند و به‌طور گسترده‌ای

(Biochip) نیز گفته می‌شود متشکل از تعداد زیادی نقطه (حفره) کوچک بر روی یک سطح جامد است که به‌منظور اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها از آن‌ها استفاده می‌کنند (Bumgarner, 2013). با استفاده از این تکنیک می‌توان به‌طور هم‌زمان بیان هزاران ژن را در حداقل زمان در بافت‌های مختلف اندازه‌گیری نمود. هر نقطه‌ای که بر روی صفحه ریزآرایه قرار دارد حاوی 10^{-12} مول از یک توالی خاص DNA است. هر توالی نماینده یک ژن است که می‌تواند بخش کوچکی از آن ژن یا بخش متصل شونده به یک cDNA باشد که تحت شرایط خاصی به توالی مکمل متصل می‌گردند. به این منظور، mRNA از جاندار یا نمونه مورد نظر استخراج و سپس در شرایط آزمایشگاهی از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس جهت کپی‌کردن از روی آن و ایجاد cDNA استفاده می‌شود. cDNA قطعه‌قطعه و نشاندار می‌گردد. این قطعات نشان‌دار به الگوهای مکمل خود که بر روی صفحه جامد (چیپ) تثبیت شده‌اند متصل می‌گردند. شدت فلوئورسنت حاصل از این اتصال توسط نرم‌افزارهای ویژه‌ای کمی‌سازی می‌شود و نشان‌دهنده فراوانی توالی مورد نظر و به‌عبارتی میزان بیان ژن است (Dufva, 2009). تغییر بیان پروتئین‌های کلیدی در یک شبکه تعاملی با خصوصیات توپولوژیکی خاص که نشان‌دهنده اهمیت آن پروتئین در تعامل با سایر پروتئین‌ها در یک مسیر زیستی باشد می‌تواند موجب بروز تغییرات مهمی در مسیرهای بیولوژیکی شود. در این صورت، یک فنوتیپ غیر سالم می‌تواند شکل بگیرد و در صورتی که تغییرات عمده باشند، می‌توانند منجر به بروز بیماری شوند (Torabi & Roudbari, 2023). از این‌رو، بررسی شبکه ژنی درگیر و فعل و انفعالات پروتئینی می‌تواند اطلاعات مفیدی را در رابطه با احتمال شروع یک بیماری یا ادامه آن ارائه دهد. بر این اساس، در مطالعه حاضر به بررسی شبکه ژنی و تعامل پروتئین-پروتئین در بیماری نیوکاسل از سویه ویروس JS5-05 با استفاده از اطلاعات ذخیره شده در سایت NCBI با شماره دسترسی GSE40100 پرداخته شد. شبکه ژنی اطلاعات مذکور تاکنون بررسی نشده است. لذا این اطلاعات مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

داده‌های بیان ژن مربوط به سلول‌های طحال جوجه‌های گوشتی آلوده‌شده با ویروس JS5-05 (تیمار بیمار، سه نمونه) و همچنین جوجه‌های گوشتی سالم (تیمار کنترل، سه نمونه) از سایت NCBI و پایگاه GEO Expression Omnibus با شماره دسترسی GSE40100 استخراج شدند. چیپ مورد استفاده برای این تحقیق ساخت شرکت Affymetrix (Chicken Genome Array) است که در آن برای سنجش بیان ژنی ۳۳۸۱۵ پروپ (ژن) از پلتفرم GPL3213 استفاده می‌شود. با استفاده از mRNA استخراج شده از سلول‌های سالم و بیمار و چیپ مورد نظر، تفاوت بیان ژن‌ها در بافت‌های سالم و بیمار مشخص می‌شود. شماره‌های دسترسی نمونه‌های استفاده شده در تحقیق در جدول ۱ آورده شده‌اند.

اورتوآوالو ویروس از خانواده پارامیکسوویریده قرار دارد و دارای ژنوم RNA است (Behboudi & Hamidi Sofiani, 2021). این ویروس انتشار جهانی دارد و موجب خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت پرورش طیور می‌شود. علی‌رغم این‌که این ویروس فقط یک سروتیپ دارد، حدت سویه‌های ویروس بسیار متفاوت است. سویه‌های متفاوتی از این ویروس وجود دارند که براساس شدت بیماری‌زایی به سه دسته کلی لنتوژن (lentogen)، مزوژن (mesogen) و ولوژن (velogen) تقسیم‌بندی می‌شوند (Ashraf & Shah, 2014). علائم بالینی پرندگان آلوده بسته به گونه میزبان، حدت و میزان ویروس آلوده‌کننده، شرایط ایمنی و سن میزبان متفاوت هستند؛ بنا بر این، تشخیص بیماری می‌تواند مشکل باشد. علائم بالینی می‌توانند از تلفات ۱۰۰ درصد در میان مرغان واکسینه نشده تا افت تولید تخم مرغ در میان گله‌های تخم‌گذار به ظاهر سالم و واکسینه متفاوت باشند. انسان به‌طور عادی تحت‌تأثیر قرار نمی‌گیرد، اما افرادی که در تماس مستقیم با پرندگان آلوده هستند ممکن است به عفونت چشم کوتاه‌مدت مبتلا شوند که بدون درمان بهبود می‌یابد. این بیماری از طریق مدفوع و ترشحات پرندگان آلوده از بینی، دهان و چشم منتقل می‌شود. این بیماری در درجه اول از طریق تماس مستقیم بین پرندگان سالم و ترشحات بدن پرندگان آلوده منتشر می‌شود (Behboudi & Hamidi Sofiani, 2021). مواد حاوی ویروس را می‌توان روی کفش و لباس نیز برداشت و از گله آلوده به یک گله سالم منتقل کرد. در حال حاضر، در ایران سیاست کنترل بیماری بر اساس واکسیناسیون است. در دهه‌های گذشته، اتخاذ برنامه واکسیناسیون گسترده در مزارع تجاری طیور و تاحدودی در طیور بومی میزان بروز بیماری نیوکاسل را در ایران کاهش داده است. با این حال، علی‌رغم استفاده از واکسن، بروز بیماری کماکان گزارش می‌شود و نگرانی‌ها را در رابطه با کیفیت برنامه‌های واکسیناسیون انجام‌شده، افزایش می‌دهد. استفاده از ابزارهای ژنومی برای شناسایی بیومارکرهای ژنتیکی مرتبط با مقاومت به بیماری نیوکاسل برای انتخاب پرندگانی با مقاومت بالاتر بسیار مفید خواهد بود. بنا بر این، درک نقش فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین در مکانیسم‌های مقاومت ژنتیکی به نیوکاسل می‌تواند به توسعه استراتژی‌های پیشگیری و درمان بیماری کمک کند (Torabi & Roudbari, 2023). داده‌های بیان ژن اطلاعات ارزشمندی را در مورد شبکه‌های بیولوژیک، حالات سلولی و فهم عملکرد ژن‌ها ارائه می‌دهند. یک هدف از تحلیل داده بیان ژن تعیین چگونگی تأثیر بیان هر ژن منفرد بر روی بیان ژن‌های دیگر در همان شبکه ژنتیکی است و هدف دیگر مشخص کردن این نکته است که چگونه ژن‌ها در سلول‌های سالم و بیمار بیان می‌شوند (Zvara et al., 2015). برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از روش‌های کارآمد که هم‌زمان میزان بیان تعداد زیادی ژن را آن هم در دو نمونه مقایسه می‌کند ریزآرایه DNA است. ریزآرایه DNA یا میکروآرای DNA که به آن بیوچیپ

جدول ۱- شماره دسترسی نمونه‌های بافت تخمدان

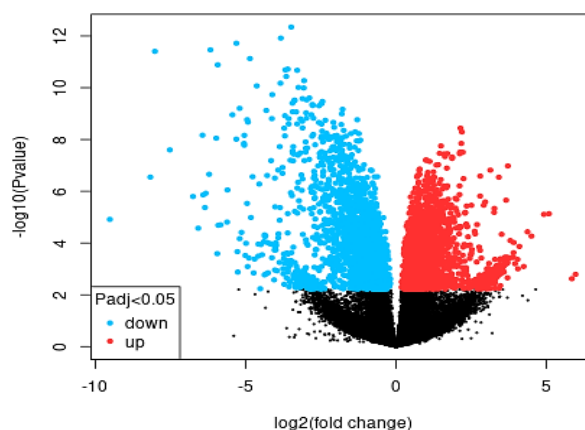
Table 1. Accession numbers of ovarian tissues	
GSM984904	طحال سالم (Normal spleen)
GSM984905	طحال سالم (Normal spleen)
GSM984906	طحال سالم (Normal spleen)
GSM984907	طحال آلوده به ویروس (Infected spleen with JS5-05 virus-JS5-05)
GSM984908	طحال آلوده به ویروس (Infected spleen with JS5-05 virus-JS5-05)
GSM984909	طحال آلوده به ویروس (Infected spleen with JS5-05 virus-JS5-05)

افزونه Cytohubba، شبکه‌ای شامل ده ژن کلیدی (ژن‌های هاب) رسم گردید. در نهایت، جهت بررسی ارتباط ژن‌های مرکزی شناسایی‌شده در شبکه تعاملی با بیماری نیوکاسل و همچنین غنی‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی که ژن‌های هاب در آن‌ها دخیل بودند، از نرم‌افزار برخط DAVID (Sherman *et al.*, 2022) استفاده شد.

نتایج و بحث

در شکل ۱ (Volcano Plot) ژن‌های با بیان متفاوت در سلول‌های بیمار نسبت به سلول‌های سالم نشان داده شده است. در این شکل، نقاط قرمز رنگ ژن‌هایی هستند که در سلول‌های بیمار بیان بیشتری نسبت به سلول‌های سالم دارند و نقاط آبی‌رنگ ژن‌هایی هستند که در سلول‌های بیمار بیان کمتری نسبت به سلول‌های سالم دارند و نقاط سیاه‌رنگ نیز ژن‌هایی هستند که در سلول‌های بیمار و سالم به یک اندازه بیان شده‌اند. در مجموع، از ۳۳۸۱۵ ژن مطالعه شده، ۴۷۲۰ ژن بیان متفاوتی داشتند که از بین آن‌ها مقادیر بیان ۴۱۴ ژن تفاوت معنی‌دار داشتند.

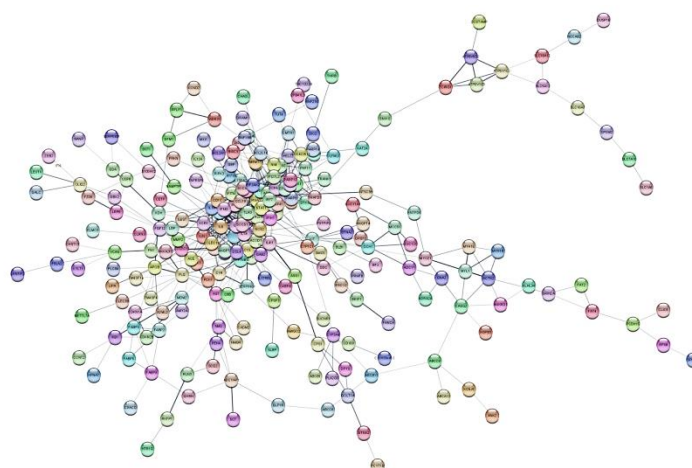
در مرحله بعد، کنترل کیفیت و نرمال‌سازی داده‌ها توسط نرم‌افزار برخط GEO2R (Barrett *et al.*, 2005) انجام شدند. ژن‌های با بیان متفاوت بین دو تیمار کنترل و بیمار در سطح احتمال $p\text{-value} < 0.05$ و آماره $\text{LogFC} > 2$ (LogFC $< +2$) مشخص گردیدند. برای به‌دست‌آوردن شبکه‌ژنی از منبع STRING (Szklarczyk *et al.*, 2023) استفاده شد. فایل مربوط به رسم شبکه به فرمت tsv ذخیره شد تا برای آنالیزهای بعدی استفاده گردد. فایل tsv به‌دست‌آمده از مرحله قبل در نرم‌افزار Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) قرار داده شد تا به کمک الگوریتم‌های آن جهت آنالیز شبکه استفاده شود. الگوریتم Network Analyzer که یک برنامه بارگذاری‌شده در نرم‌افزار Cytoscape است، برای آنالیز شبکه به‌کار برده شد. برای شناسایی ژن‌های کلیدی (ژن‌های هاب) در شبکه، از سه آماره درجه مرکزیت (Degree of Centrality, DC)، مرکزیت بینایی (Betweenness Centrality, BC) و نزدیکی (Closeness Centrality, CS) استفاده شد. این معیارهای توپولوژی شبکه با استفاده از افزونه CytoNCA (Tang *et al.*, 2015) محاسبه شدند و سپس با استفاده از



شکل ۱- ژن‌های با بیان کمتر (آبی رنگ) و بیشتر (قرمز رنگ) در سلول‌های مبتلا در مقایسه با سلول‌های سالم
Figure 1: Genes with lower (Blue) & higher (Red) expressions in infected cells vs normal cells

معنی‌دار است. برخی ژن‌ها از مرکزیت بیشتری برخوردار هستند و به عبارتی با ژن‌های بیشتری تعامل دارند. از طرف دیگر، برخی ژن‌ها در حاشیه قرار دارند و تعامل کمتری با بقیه ژن‌ها دارند.

شبکه ژنی شامل ۴۱۴ ژن با بیان متفاوت در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ و دارای LogFC کمتر از ۲- و بیشتر از ۲+ در شکل ۲ نشان داده شده‌است. این شبکه ژنی شامل ژن‌هایی است که در سلول‌های بیمار نسبت به سلول‌های سالم بیان متفاوتی (کمتر یا بیشتر) دارند و تفاوت بیان آن‌ها



شکل ۲- شبکه ژن‌های با بیان متفاوت (معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ و دارای LogFC کمتر از -۲ یا بیشتر از +۲)
Figure 2. The network of genes with different expressions (significant at $p < 0.05$ with LogFC lower than -2 & higher than +2)

عفونت نیوکاسل درگیر هستند در مسیرهای دیگر مانند آنفلوانزا A، عفونت ناشی از ویروس هرپس و بقیه مسیرهای دیگر که به نوعی با ایمنی‌سازی در برابر ویروس‌ها نقش دارند نیز حضور دارند.

مسیرهای زیستی مرتبط با ژن‌های دخیل در بیماری نیوکاسل با استفاده از پایگاه داده DAVID بررسی شدند. جزئیات کامل این مسیرهای زیستی به همراه اسامی ژن‌های کاندید در هر مسیر در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، برخی ژن‌ها که در قالب یک شبکه در

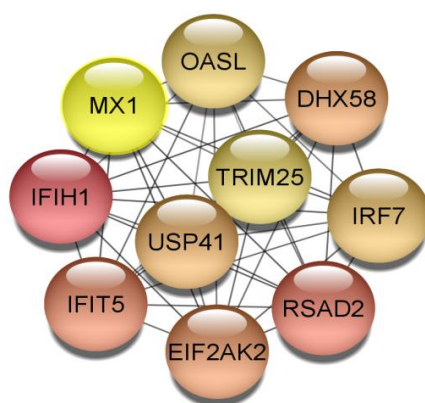
جدول ۲- مهم‌ترین مسیرهای غنی‌شده مرتبط با ژن‌های درگیر در عفونت نیوکاسل.

Table 3. Important enriched pathways associated with Newcastle infection.

آماره P P-value	ژن‌های کاندید Candidate genes	تعداد ژن‌های معنی‌دار No. of significant genes	مسیر Pathway
8.5×10^{-8}	MX1, PML, EIF2AK2, IFIH1, IRF7, IL1B, IL12A, IL18, IL6, IL8, IL1, BLB1, RSAD2, STAT1, SOCS3, TLR3, TRIM25	16	Influenza A
2.4×10^{-4}	PML, BIRC2, EIF2AK2, IFIH1, IRF7, IL1B, IL12A, IL6, BLB1, STAT1, SOCS3, TLR3, TMEM173	13	Herpes simplex virus 1 infection
5.4×10^{-4}	DHX58, IFIH1, IRF7, IL12A, IL8, IL1, TMEM173, TRIM25, ZNFX1	8	RIG-I-like receptor signaling pathway
0.0031	CCL4, CD86, IRF7, IL1B, IL12A, IL6, IL8, IL1, STAT1, TLR3	9	Toll-like receptor signaling pathway
0.0014	BIRC2, GBP, IRF7, IL1B, IL18, IL6, IL8, IL1, PLCB4, RIPK3, STAT1, TMEM173	11	NOD-like receptor signaling pathway
0.0011	CCL4, IRF7, IL1B, IL18, IL6, TMEM173	6	Cytosolic DNA-sensing pathway
0.011	CCL19, CCL4, CCR6, CXCL13, IL2, TNFRSF8, XCR1, IL1B, IL12A, IL13, IL1, IL6, IL8, IL1	12	Cytokine-cytokine receptor interaction
0.015	LDB3, ACTN2, ANK2, ANKRD1, COMP, COL9A3, FN1, ITGA11, MYH1E, MYL1, MYOZ1, VCAN	12	Cytoskeleton in muscle cells
0.016	ATP6V1C2, ATP6V1G3, TCIRG1, COMP, COLEC11, COLEC12, C1R, BLB1	8	Phagosome

بیماری نقش دارد. ژن IFIH1 از نظر مرکزیت دارای بیشترین اهمیت است و ژن TRIM25 در رتبه دهم قرار گرفته است. برخی از ژن‌های حاضر در مسیرهای غنی‌سازی شده (جدول ۲) در بین ژن‌های هاب حضور دارند. ژن‌هایی مانند MX1، IFR7، TRIM25، DHX58، EIF2AK2، و RSAD2 که هم در مسیرهای غنی‌سازی شده و هم در مجموعه ژن‌های هاب شناسایی شدند.

شکل ۳ گروهی از ژن‌ها را نشان می‌دهد که هسته مرکزی شبکه ژنی را تشکیل می‌دهند و همان ژن‌های Hub هستند. این ژن‌ها از نظر معیارهای اهمیت شامل درجه مرکزیت، درجه بینابینی و درجه نزدیکی در رتبه‌های ۱ تا ۱۰ قرار گرفتند (جدول ۳). همان‌گونه که مشاهده می‌شود این ژن‌ها خود شبکه‌ای از ژن‌ها را تشکیل می‌دهند که با یکدیگر برهم‌کنش دارند به‌صورتی که هریک از این ژن‌ها به‌تنهایی و همچنین در تعامل با دیگر ژن‌های شبکه در پاسخ ایمنی به



شکل ۳- شبکه ژن‌های هاب درگیر در التهاب ناشی از سویه JS5-05 ویروس و برهمکنش آن‌ها
Figure 3. Central gene networks involved with infection caused by THE JS5-05 virus and their interactions.

جدول ۳- ژن‌های Hub رتبه‌بندی‌شده بر اساس معیارهای CytoNCA

Table 2. Gene hub ranking based on CytoNCA criteria

ژن	نام ژن	Log FC	درجه مرکزیت Degree of centrality	درجه بینابینی Betweenness centrality	درجه نزدیکی Closeness centrality
IFIH1	Interferon Induced With Helicase C Domain 1	+3.77	64	35111.34	0.008739
MX1	MX Dynamin Like GTPase 1	+5.30	64	31456.76	0.008735
RSAD2	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2	+6.43	62	27234.43	0.007633
IFIT5	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 5	+3.43	53	23456.20	0.008729
EIF2AK2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 2	+2.41	50	17950.27	0.008723
DHX58	DExH-Box Helicase 58	+3.71	47	16678.28	0.008725
USP41	Ubiquitin Specific Peptidase 41, Pseudogene	-3.08	45	17290.35	0.008720
IRF7	Interferon Regulatory Factor 7	+2.07	41	14567.28	0.008716
OASL	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Like Fibroblast growth factor 10	+5.19	36	10436.21	0.008712
TRIM25	Tripartite Motif Containing 25	+3.72	35	11489.86	0.008711

تغییرات (Fold change) بالای ۲ دارند (شکل ۱) به این معنی که در مواجهه با التهاب ناشی از ویروس JS5-05، بیان این ژن‌ها افزایش یافته است (افزایش بیان با مقادیر مثبت LogFC مشخص می‌شود). در مقابل، ژن USP41 تنظیم منفی است (Down regulate) که نشان می‌دهد در مواجهه با التهاب ناشی از ویروس JS5-05، بیان این ژن کاهش یافته است (کاهش بیان با مقادیر منفی LogFC مشخص می‌شود). نتایج ما نشان می‌دهند که ژن‌های مشخص‌شده در این تحقیق نه تنها با عفونت ناشی از ویروس نیوکاسل درگیر هستند بلکه این ژن‌ها در مسیرهای دیگری نیز فعال‌اند که به برخی بیماری‌ها مانند آنفلوآنزا A ختم می‌شوند. همچنین، برخی ژن‌ها در مسیرهای مرتبط با عفونت ویروس هرپس دخیل بودند. مسیرهای دیگر نیز عمدتاً عضوی از سیستم ایمنی بودند. برای مثال، مسیر سیگنال‌دهی RIG-I-like receptor signaling pathway سنسور درون‌سلولی برای عفونت‌های ویروسی است و از طریق تحریک تولید اینترفرون‌ها پاسخ‌های ایمنی را موجب می‌شود (Rehwinkel & Gack, 2020). مسیر Toll-like receptor signaling pathway نقش کلیدی در ایمنی سلولی دارد و وظیفه آن شناسایی ویروس‌ها و سایر پاتوژن‌ها است (Kawasaki & NOD-like receptor signaling pathway). مسیر NOD-like receptor signaling pathway نیز در سیستم ایمنی نقش دارد و از طریق تحریک تولید مولکول‌های MHC (مولکول‌هایی که بر روی غشاء

برای ایجاد مقاومت ژنتیکی در برابر یک بیماری، اولین قدم شناخت ژن‌هایی است که در زمان بروز بیماری در فرایندهای التهابی در پاسخ به عفونت ایجادشده درگیر می‌شوند. آنالیزهای بر پایه شبکه می‌توانند به تشخیص ژن‌های درگیر در بیماری و مازول عملکردی بپردازند، که این امر می‌تواند کمک قابل توجهی در شناسایی عوامل تنظیم‌کننده و فرایندهای زیستی دخیل در پاسخ به بیماری‌ها داشته باشد. از بین ۳۳۸۱۵ ژن مطالعه‌شده، فقط ۴۱۴ ژن تغییر بیان معنی‌دار در سلول‌های بیمار داشتند. به عبارت دیگر، اکثر ژن‌های مطالعه‌شده ارتباطی با سیستم ایمنی درون‌سلولی ندارند و با فرایندهای زیستی دیگر در ارتباط هستند. برخی از ژن‌ها علی‌رغم این که نقش مهمی در بیماری نیوکاسل دارند ممکن است بالاترین سطح بیان را نداشته باشند. برای مثال، ژن RSAD2 با آن که بیشترین سطح بیان در مواجهه به بیماری نیوکاسل را دارد، از نظر اهمیت در رتبه سوم قرار گرفته است که در سایر گزارشات نیز مشاهده شده است (Torabi & Roudbari, 2023). این محققین گزارش کردند که در مواجهه با التهاب ناشی از بیماری مارک، ژن DDX60 از نظر افزایش بیان رتبه اول را داشت اما از نظر اهمیت درون شبکه‌ای حافظ رتبه نهم در بین ده ژن شد. اهمیت یک ژن در شبکه به تعامل آن با ژن‌های دیگر و فرایندهای بیولوژیکی که در آن دخیل است مربوط است. اکثر ژن‌های مرکزی شناخته‌شده تنظیم مثبت (Up regulate) هستند و ضریب

(Mpenda *et al.*, 2023). در یک مطالعه دیگر، تأثیر سرکوب نمودن (knockout) ژن MX1 در بیماری نیوکاسل بررسی شد. بر اساس نتایج، در نبود این ژن، ویروس نیوکاسل با سرعت بالایی تکثیر می‌شود و در این حالت سلول‌های بدن فقط از طریق به تاخیر انداختن چرخه سلولی و افزایش آپوپتوز سلولی آسیب ناشی از عفونت ویروسی را کاهش می‌دهند (Wang *et al.*, 2023). ژن RSAD2 تولید اینترفرون‌ها در سلول‌های میزبان آلوده به ویروس را تحریک می‌کند و از این طریق موجب تحریک دستگاه ایمنی و افزایش مقاومت بدن در برابر ویروس می‌شود. در ضمن، بیان این ژن در زمان وقوع برخی سرطان‌ها مانند سرطان سینه و سرطان تخمدان افزایش می‌یابد و در سلول‌های سالم اثرات ضد سرطانی دارد (Li *et al.*, 2024). ژن IFIT5 از خانواده ژن‌های IFIT است (IFIT1-IFIT5) و با بیماری‌های دیگر مانند سندروم زیکا در انسان و آنفلوآنزای طیور در ارتباط است. این ژن در کاهش فعالیت ویروس از طریق متوقف کردن رونویسی از ژنوم ویروس دخیل است و به‌طور کلی یکی از ژن‌هایی است که بیان آن منجر به تقویت ایمنی ذاتی (Innate Immunity) می‌شود (Zhang *et al.*, 2023). در جوجه‌های گوشتی، میزان بیان این ژن در مواجهه با ویروس نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در هنگام عفونت نیوکاسل، این ژن بیشترین بیان را در سلول‌های طحال، قلب و ریه داشت. به علاوه، بیان ژن IFIT5 منجر به تحریک بیان ژن‌های خانواده IRF (Interferon regulatory factors) می‌شود که در نتیجه آن تولید اینترفرون‌ها افزایش می‌یابد که در جای خود افزایش مقاومت سلول‌ها به ویروس را در پی دارد (Li *et al.*, 2020). ژن EIF2AK2 که با نام پروتئین کیناز R هم شناخته می‌شود عضوی از خانواده ژن‌های EIF است و نقشی کلیدی در سنتز پروتئین دارد. این ژن رونویسی از ژنوم ویروس را متوقف و از این طریق تولید پوشش پروتئینی ویروس را مختل می‌کند (Ge *et al.*, 2021). این ژن یکی از ژن‌های کاندید مقاومت به نیوکاسل به‌شمار می‌رود و میزان بیان آن در روز دوم پس از آلودگی به نیوکاسل حداکثر می‌شود و در این زمان بیشترین تأثیر بر پاکسازی ویروسی دارد. ژن DHX58 که با نام LGP2 هم شناخته می‌شود یک هلیکاز و جزئی از دستگاه ایمنی ذاتی (Innate Immune System) است و از طریق تحریک تولید اینترفرون‌ها در سلول‌های میزبان آلوده به ویروس موجب تحریک دستگاه ایمنی در برابر ویروس می‌شود. این ژن در جوجه‌های گوشتی و انسان شناسایی شده است. در مواجهه با بیماری نیوکاسل به‌شدت بیان می‌شود و با تأثیر بر RNA ویروس از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند (Alqazlan *et al.*, 2021). ژن USP41 که یک شبه‌ژن (Pseudogene) است با برخی عفونت‌های خاص ریه و نقص‌های کروموزومی در ارتباط است، مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با آن به‌طور کامل مشخص نشده است. در یک مطالعه، نشان داده شد که سرکوب بیان این ژن با رشد تومورهای سرطانی در ارتباط بود. در مطالعه حاضر، این ژن در سلول‌های بیمار نسبت به سلول‌های سالم کاهش بیان داشت که نشان می‌دهد احتمالاً

سلول‌های بدن وجود دارند و به لنفوسیت‌های T اجازه می‌دهند تا پاتوژن‌ها را شناسایی کنند) منجر به بروز پاسخ‌های ایمنی می‌شود (Almeida-da-Silva *et al.*, 2023). مسیر سیگنال‌دهی Cytosolic DNA-sensing pathway نیز از اجزاء سیستم ایمنی است و نقش آن شناسایی و سرکوب RNA ویروسی است (Yu & Liu, 2022). مسیر Cytokine-cytokine receptor interaction عضو بسیار مهم از سیستم ایمنی است. سیتوکین‌ها حتی به‌عنوان نشانگر برای شناسایی بیماری‌های عفونی به‌کار می‌روند و در بروز التهاب در مقابله با ویروس‌ها اهمیت دارند (Spangler *et al.*, 2015). در نهایت، مسیر Phagosome در عمل فاگوسیتوز ویروس‌ها و باکتری‌ها توسط لنفوسیت‌ها نقشی فعال دارد (Kinchen & Ravichandran, 2008).

IFIH1 مهم‌ترین ژن در شبکه ژن‌های هاب است که پروتئینی درون سلولی به‌نام MAD5 را کد می‌کند که یک حسگر درون سلولی برای RNA ویروسی است و پاسخ ایمنی ذاتی را تحریک می‌کند. MDA5 با تخمین طول RNA و ساختار ثانویه آن، یک هسته هلیکاز DExD/H-box و یک دامنه C ترمینال را به الیگونوکلوئیدهای RNA متصل می‌کند و منجر به یک پاسخ پیش التهابی شامل تولید اینترفرون‌ها می‌شود. تولید اینترفرون‌ها سلول‌های میزبان آلوده به ویروس را تحریک می‌کند و از این طریق موجب تحریک دستگاه ایمنی و افزایش مقاومت بدن در برابر ویروس می‌شوند (Rice *et al.*, 2021). در بیماری نیوکاسل، IFIH1 به‌عنوان یک آنتی‌ویروس عمل می‌کند و به‌طور قابل‌توجهی پاسخ ضدویروسی ایجاد می‌نماید (Yang *et al.*, 2020). علاوه بر نقش محافظتی آن در پاسخ‌های ضدویروسی، ژن MDA5 در بیماری‌های خودایمنی و خود التهابی مانند دیابت نوع ۱، لوپوس اریتماتوز سیستمیک و سندرم Aicardi-Goutieres نقش دارد. توالی اسیدآمینه MDA5 به‌طور خاصی بین گونه‌ها حفظ شده است. در مواجهه با ویروس نیوکاسل، بیان این ژن افزایش می‌یابد و از طریق تحریک ژن IFN β تولید اینترفرون‌ها را افزایش می‌دهد که در نتیجه آن، مقاومت سلولی در برابر ویروس افزایش می‌یابد (Wang *et al.*, 2022). MX1 در پاسخ دفاعی به ویروس نقش دارد. پروتئین مقاوم به میکسویروس ۱ (MX1) یک گوانوزین تری فسفات شبیه دینامین است که رونویسی اولیه ویروس را با اتصال به نوکلئوپروتئین‌های ویروسی مسدود می‌کند. بنا بر این، این پروتئین بر انتشار و پاسخ میزبان به این عفونت تأثیر می‌گذارد. MX1 یک فاکتور رونویسی است که دارای خواص ضدویروسی در برابر تعداد زیادی ویروس است که از آن جمله می‌توان به ویروس بیماری مارک اشاره کرد (Torabi & Roudbari, 2023). در یک مطالعه، وقوع جهش در ژن MX1 در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. در این ژن، یک جهش تک‌نوکلئوتیدی مشخص شد که در آن آدنین (A) جایگزین گوانین (G) شده بود. افراد دارای ژنوتیپ AA حساسیت کمتری به بیماری داشتند و افراد با ژنوتیپ AG و GG از حساسیت بالایی به نیوکاسل برخوردار بودند

می‌نماید. در جوجه‌های گوشتی نشان داده شد که این ژن از تکثیر ویروس لکوز جلوگیری کرد (Liu et al., 2022). همچنین در جوجه‌های گوشتی، نشان داده شد که سرکوب شدن (knockout) این ژن منجر به تکثیر سریع ویروس نیوکاسل شد (Diaz-Beneitez et al., 2021).

نتیجه‌گیری کلی

همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تقریباً تمامی ژن‌های موجود در هسته مرکزی شبکه‌ی دخیل در پاسخ به ویروس نیوکاسل با فرایندهای ایمنی و پاسخ‌های دفاعی به عفونت در ارتباط هستند و از این رو، تغییر در میزان بیان آن‌ها در زمان آلودگی با ویروس قابل انتظار است. از آن جا که برای این ژن‌ها ژنوتیپ‌های مختلفی وجود دارند، پیشنهاد می‌شود که میزان مقاومت به بیماری نیوکاسل در گروه‌های مختلف ژنوتیپی برای هر ژن بررسی گردد. در صورتی که میزان مقاومت به بیماری نیوکاسل در گروه‌های مختلف ژنوتیپی متفاوت باشد می‌توان پرنده‌گانی که برای ژن‌های حاضر در شبکه مرکزی دارای ژنوتیپ برتر باشند را جهت افزایش مقاومت ژنتیکی به نیوکاسل انتخاب نمود. با انجام این کار می‌توان برای چندین نسل متوالی فراوانی آلل‌های مطلوب این ژن‌ها را در جمعیت افزایش داد و در نهایت مقاومت ژنتیکی به بیماری را بالا برد.

نوعی فرایند ایمنی است چرا که کاهش فرآورده حاصل از بیان آن ممکن است به کاهش شدت عفونت کمک کند (Huang et al., 2021). ژن IRF7 از خانواده فاکتورهای تنظیم‌کننده اینترفرون‌ها است و جزئی ضروری برای تولید اینترفرون نوع ۱ است. این ژن در پاسخ‌های التهابی به عفونت‌ها دخیل است. همچنین بیان آن رشد تومورهای سرطانی را سرکوب می‌کند (Qing & Liu, 2023). این ژن یکی از ژن‌های کاندید مقاومت به بیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی است به‌صورتی که بیان آن باعث مقاومت به نیوکاسل می‌شود (Wilden et al., 2009). ژن OASL یک ژن ضدویروس (Antiviral gene) است و از طریق توقف رونویسی از ژنوم ویروس و دخالت در مسیرهای بیولوژیکی اینترلوکین-۲۷ موجب کاهش فعالیت ویروس می‌شود. این ژن یک پروتئین شامل ۵۰۸ اسیدآمینه را رمزدهی می‌کند. در غازهای چینی، نشان داده شد که تکثیر ویروس نیوکاسل در شرایط بیان این ژن به‌شدت کاهش یافت (Yang et al., 2015). در هنگام شیوع عفونت نیوکاسل در طیور گوشتی نشان داده شد که سرکوب این ژن به‌سرعت منجر به افزایش تکثیر ویروس گردید (Del Vesco et al., 2021). ژن TRIM25 نیز عضوی از خانواده بزرگ پروتئین‌های TRIM است که اثرات ضد ویروسی دارند. در موش این ژن از تکثیر ژنوم ویروس لوسمی جلوگیری

References

- Alqazlan, N., Astill, J., Raj, S., & Sharif, S. (2022). Strategies for enhancing immunity against avian influenza virus in chickens: A review. *Avian Pathology*, 51, 211-235.
- Almeida-Da-Silva, C.L.C., Savio, L.E.B., Coutinho-Silva, R., Ojcius, D.M. (2023). The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 14, 1122586.
- Ashraf, A., & Shah, M. (2014). Newcastle disease: present status and future challenges for developing countries. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 411-416.
- Aziz Ali-Abadi, F., Darmani Kuhi, H., Mohammadi, M., & Nazaran, M.H. (2017). Main and interaction effects of dietary protein and nano adjuvant on performance, antibody titres against Newcastle disease and white blood cells counts of broiler chickens. *Research on Animal Production*, 8, 63-69. [In Persian]
- Barrett, T., Suzek, T.O., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ngau, W.C., Ledoux, P., Rudnev, D., Lash, A.E., Fujibuchi, W., & Edgar, R. (2005). NCBI GEO: mining millions of expression profiles—database and tools. *Nucleic Acids Research*, 33, 562-566.
- Behboudi, E., & Hamidi Sofiani, V. (2021). Immune responses to Newcastle disease virus as a minor zoonotic viral agent. *Journal of Zoonotic Diseases*, 5, 12-23.
- Bumgarner, R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current Protocols in Molecular Biology*, 101, 22.
- Del Vesco, A.P., Jang, H.J., Monson, M.S., & Lamont, S.J. (2021). Role of the chicken oligoadenylate synthase-like gene during in vitro Newcastle disease virus infection. *Poultry Science*, 100, 101067.
- Diaz-Beneitez, E., Cubas-Gaona, L.L., Candelas-Rivera, O., Benito-Zafra, A., Sánchez-Aparicio, M.T., Miorin, L., Rodríguez, J.F., García-Sastre, A., & Rodríguez, D. (2022). Interaction between chicken TRIM25 and MDA5 and their role in mediated antiviral activity against IBV infection. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1068328.
- Dufva, M., 2009. Introduction to microarray technology. *DNA Microarrays for biomedical research: Methods and Protocols*, 1-22.
- Ge, L., Zhang, Y., Zhao, X., Wang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Yu, H., Zhang, Y., & You, Y. (2021). EIF2AK2 selectively regulates the gene transcription in immune response and histones associated with systemic lupus erythematosus. *Molecular Immunology*, 132, 132-141.
- Ghasemi, M., Ghazvinian, K., Ahmadi Hamedani M., & Kafshdoozan, K. (2022). The Effect of *Ceratonia siliqua* in comparison with antibiotics and prebiotics on performance, carcass characteristics, immune system and blood parameters of broiler chickens. *Research on Animal Production*, 34, 1-10. [In Persian]

- Huang, M., Xiao, J., Yan, C., Wang, T., & Ling, R. (2021). USP41 promotes breast cancer via regulating RACK1. *Annals of Translational Medicine*, 9, 1566.
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S.E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4), e221.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5, 461.
- Kinchen, J.M., & Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 9, 781-95.
- Li, Y., Cui, Q., Zhou, B., Zhang, J., Guo, R., Wang, Y., & Xu, X. (2024). RSAD2, a pyroptosis-related gene, predicts the prognosis and immunotherapy response for colorectal cancer. *American Journal of Cancer Research*, 14, 2507.
- Li, J.J., Yin, Y., Yang, H.L., Yang, C.W., Yu, C.L., Wang, Y., Yin, H.D., Lian, T., Peng, H., & Zhu, Q. (2020). mRNA expression and functional analysis of chicken IFIT5 after infected with Newcastle disease virus. *Infection Genetics and Evolution*, 86, 104585.
- Liu, J., Gu, T., Chen, J., Luo, S., Dong, X., Zheng, M., Chen, G., & Xu, Q. (2022). The TRIM25 gene in ducks: cloning, characterization and antiviral immune response. *Genes*, 13, 2090.
- Mohammadabadi, M.R., Nikbakhti, M., & Mirzaee, H.R. (2010). Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46(4), 505-509.
- Mohammadifar, A., Faghih Imani, S.A., Mohammadabadi, M.R., & Soflaei, M. (2014). The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5, 125-136.
- Mohammadifar, A., & Mohammadabadi, M.R. (2018). Melanocortin-3 receptor (MC3R) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malaysian Applied Biology*, 47, 85-90.
- Mpenda, F.N., Lyantagaye, S.L., & Buza, J. (2020). Association of chicken Mx1 polymorphisms with susceptibility in chicken embryos challenged with virulent Newcastle disease virus. *Asian Journal of Animal Science*, 14, 9-15.
- Qing, F., & Liu, Z. (2023). Interferon regulatory factor 7 in inflammation, cancer and infection. *Frontiers in Immunology*, 14, 1190841.
- Rehwinke, J., & Gack, M.U. (2020). RIG-I-Like Receptors: Their Regulation and Roles in RNA Sensing. *Nature Immunology Review*, 20: 537-51.
- Rice, G.I., del Toro Duany, Y., Jenkinson, E.M., Forte, G.M., Anderson, B.H., Ariaudo, G., Bader-Meunier, B., Baidam, E.M., Battini, R., & Beresford, M.W. (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nature Genetics*, 46, 503-509.
- 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, 2498-2504.
- Sherman, B.T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M.W., Lane, H.C., Imamichi, T., & Chang, W., (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50, 216-221.
- Spangler, J. B., Moraga, I., Mendoza, J. L. & Garcia, K. C. (2015). Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annual Review of Immunology*, 139-167.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., & Pyysalo, S. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51, D638-D646.
- Torabi, A., & Roudbari, Z. (2023). Analysis of protein-protein interaction network based on altered genes expressed in lung tissue for avian influenza disease. *Veterinary Research & Biological Products*, 36, 68-76.
- Wang, J., Lin, Z., Liu, Q., Fu, F., Wang, Z., & Ma, J. (2022). Bat employs a conserved MDA5 gene to trigger antiviral innate immune responses. *Frontiers in Immunology*, 13, 904481.
- Wang, L., Xue, Z., Wang, J., Jian, Y., Lu, H., Ma, H., Wang, S., Zeng, W. & Zhang, T. (2023). Targeted knockout of Mx in the DF-1 chicken fibroblast cell line impairs immune response against Newcastle disease virus: Mx knockout impairs response against NDV. *Poultry Science*, 102, 102855.
- Wilden, H., Fournier, P., Zawatzky, R. & Schirmacher, V. (2009). Expression of RIG-I, IRF3, IFN- β and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *International Journal of Oncology*, 34, 971-982.
- Yang, X., Arslan, M., Liu, X., Song, H., Du, M., Li, Y., & Zhang, Z. (2020). IFN- γ establishes interferon-stimulated gene-mediated antiviral state against Newcastle disease virus in chicken fibroblasts. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 20 1-13.

- Yang, C., Liu, F., Chen, S., Wang, M., & Jia, R. (2015). Identification of 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like gene in goose: Gene structure, expression patterns, and antiviral activity against Newcastle disease virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 36, 563–572.
- Yu, L., & Liu, P. (2021). Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 170.
- Zhang, B., Liu, X., Chen, W., & Chen, L. (2013). IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45, 867-874.
- Zhng, D., Ding, Z., & Xu, X. (2023). Pathologic mechanisms of the Newcastle disease virus. *Viruses*, 15, 864.
- Zvara, Á., Kitajka, K., Faragó, N., & Puskás, L.G. (2015). Microarray technology. *Acta Biologica Szegediensis*, 59, 51-67.