

## شناسایی محاسباتی فاکتورهای تنظیمی مؤثر در بیماری برونشیت عفونی طیور با استفاده از داده‌های RNA-Seq

• زهره مزدوری (نویسنده مسئول)

دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دام و  
طیور پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

• محمد قادرزاده

دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و شیلات،  
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: مرداد ۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۵

Email: mozduri.z@alumni.ut.ac.ir



### چکیده

بیماری برونشیت عفونی یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار عفونی و شایع طیور می‌باشد. در این مطالعه به منظور درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در بیماری برونشیت عفونی، در ابتدا ژن‌های با بیان بالا و مشابه با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های یک مطالعه RNA-Seq در چهار حالت متفاوت شامل مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفته‌گی و سه هفته‌گی و مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت بالای سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفته‌گی و سه هفته‌گی شناسایی شد. سپس توالی پروموتری این ژن‌ها جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی‌ی‌کننده درگیر در این مکانسیم استخراج شد. نتایج تجزیه و تحلیل پروموتری با استفاده از نرم‌افزار Genomatix منجر به شناسایی ۶۱ فاکتور رونویسی‌کننده جدید احتمالی مؤثر در مراحل تنظیمی برونشیت عفونی گردید. افزون بر این، به منظور مصورسازی شبکه‌های تنظیمی شامل فاکتورهای رونویسی‌کننده که ژن‌های مورد نظر را تنظیم می‌کنند از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد. بر اساس نتایج، ۶۱ فاکتور رونویسی‌کننده جدید معرفی شده در این مطالعه دارای پتانسیل مناسبی برای بررسی بیشتر در سطح آزمایشگاهی می‌باشند و می‌توانند اطلاعات جدیدی را در درک بهتر شبکه‌ی تنظیمی مؤثر در بیمار برونشیت عفونی طیور فراهم کنند.

کلمات کلیدی: شبکه تنظیمی، پروموتر، فاکتورهای رونویسی، بیان ژن

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 50-62

Computational identification of the regulatory elements involved in infectious bronchitis in chickens by using RNA-Seq data

By: Mozduri, Z., (Corresponding Author) MSc Graduated of Genetics & Animal Breeding, Department of Animal and Poultry Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran. and Ghaderzadeh, M., PhD Student of Genetics & Animal Breeding, College of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

Received: 2016-07-24 Accepted: 2016-08-14

Email: mozduri.z@alumni.ut.ac.ir

Infectious bronchitis is one of the widespread and highly infectious viral disease of poultry. In this study to gain insights into transcriptional regulation of infection bronchitis, at the first high expression genes in infection bronchitis in four different conditions were identified by RNA-Seq data analysis. In this study to gain insights into transcriptional regulation of infection bronchitis, at the first high expression genes in infection bronchitis were identified by RNA-Seq data analysis in four different conditions including comparison of the spleen chickens with bronchitis versus healthy with low serum concentration of mannose-binding lectin at the age of one and three weeks, comparison of the spleen chickens with bronchitis versus healthy with high serum concentration of mannose-binding lectin at the age of one and three weeks. Then promoter regions of these genes were extracted to identify candidate transcription factors involved in this mechanisms. Promoter analysis by using Genomatix software lead to identify of 61 novel transcription factors candidates activating in infection bronchitis. In this study in order to visualization of regulatory networks containing transcription factors and that regulate the genes, the were used Cytoscape software. According to the results, 61 new candidates transcription factor introduced in this study has good potential for more investigation in the laboratory level and can provide new information to better understanding of regulatory networks in infectious bronchitis in poultry.

**Key words:** Gene Expression, Promoter, Transcription Factors, Regulatory Network.

#### مقدمه

برونشیت عفونی (Infectious bronchitis) ماکیان، بیماری حاد و بسیار واگیردار دستگاه‌های تنفسی و ادراری تناسلی با انتشار جهانی می‌باشد که توسط ویروس برونشیت عفونی (Infectious bronchitis virus) ایجاد می‌گردد (۸). این ویروس عضوی از خانواده‌ی Coronaviridae می‌باشد و سویه‌ها و سرروتیپ‌های متنوعی دارد (۳۴). ژنوم این ویروس متشکل از یک رشته RNA به طول ۲۷۶۰۰ نوکلئوتید می‌باشد (۹). تکثیر زیاد به همراه جهش و نوترکیبی بالا از علل تنوع بالای این سرروتیپ‌های مشاهده شده برونشیت می‌باشد (۳۴). امروزه، بیماری برونشیت عفونی طیور، به دلیل تأثیر منفی در کاهش تولید، کیفیت تخم مرغ و تلفات بالا، اهمیت زیادی در اقتصاد صنعت طیور دارد (۶۸). تغییر در میزان بیان ژن‌های طحال در این بیماری مانند اکثر بیماری‌های دیگر، یکی از علل مهم ایجاد مشکلات فوق می‌باشد. طحال به عنوان یک اندام لمفوئیدی ثانویه می‌تواند در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی کارآمد عمل نماید. همچنین، به دلیل توسعه‌ی بسیار ضعیف گره‌ها و عروق لنفاوی در پرندگان، طحال نقش ایمنولوژیکی بسیار مهمی دارا می‌باشد (۱۸). بر همین اساس و با توجه به

اهمیت این موضوع تا به حال مطالعات متعددی به منظور کاهش اثرات این بیماری و شناسایی ژن‌های مهم مؤثر در بیماری برونشیت عفونی با روش‌های مختلفی از جمله ریزآرایه (۷۶) و RNA-Seq (۲۸) صورت گرفته است. نتایج یک تحقیق با تکنیک ریزآرایه نشان داد که ۳۶۵ ژن به طور متمایز در جوجه‌ها در شرایط برونشیت عفونی به طور متمایز بیان شدند. از میان ۲۵۰ ژن با بیان بالا، ۲۵ ژن بطور مستقیم با پاسخ‌های ایمنی مرتبط بودند. این ژن‌های با بیان بالای پاسخ به ایمنی شامل TLR۳، TLR۲، و ژن‌های مسئول سلول‌های T کشنده مانند آنتی‌ژن Fas و granzyme-A بودند (۷۶). همچنین در تنها مطالعه RNA-Seq موجود در این زمینه ژن‌های درگیر در فعال‌سازی لمفوسیت‌های دخیل در پاسخ ایمنی، پاسخ ایمنی داخلی و غیره شناسایی شدند (۳۶). با این حال، علی‌رغم مطالعات انجام شده در این حوزه، مکانیسم‌های تنظیمی و ژنی درگیر در بیماری برونشیت عفونی در ماکیان به خوبی و به طور کامل شناسایی نشده است. فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند و به عنوان تنظیم‌گرهای اصلی ژن‌ها شناخته شده‌اند (۳۸). این پروتئین‌ها به محل‌های تنظیمی DNA (نواحی تنظیمی ژن هدف مانند پروموتور و

حالت مختلف ذکر شده به نرم‌افزار معرفی و عبارات معنادار ( $P < 0.05$ ) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. تنها عبارات معنادار مربوط به مراحل بیولوژیکی در نظر گرفته شد.

### استخراج توالی‌های پروموتری و تجزیه و تحلیل آن‌ها

به منظور انجام تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتری و تشخیص TFBS موجود در ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل، توالی پروموتری ژن‌های شناسایی شده (پروموتر ژن‌های Gallus gallus) در مرحله قبل توسط بانک اطلاعاتی موجود در بسته نرم‌افزاری Genomatix و با استفاده از قسمت Gene2Promoter استخراج گردید (۱۰). برای ژن‌هایی با بیش از یک توالی پروموتری، معتبرترین توالی بر اساس پیشنهاد خود نرم‌افزار انتخاب شد. همچنین نواحی پروموتری همه ژن‌ها به صورت ۱۰۰۰ جفت باز بالادست و ۲۰۰ جفت باز پایین دست محل آغاز رونویسی ژن مورد نظر تعریف و استخراج گردید. به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی مشابه در توالی‌های پروموتری ژن‌ها از نرم‌افزار MatInspector استفاده شد (۱۰). این نرم‌افزار با استفاده از ماتریس‌های وزنی- مکانی (Position Weight Matrix)، TFBS‌ها را در توالی‌های DNA شناسایی می‌کند (۱۰). بدین منظور از بانک اطلاعاتی جامع MatBase موجود در Genomatix که حاوی PWM مرتبط با TFBS می‌باشد، استفاده گردید. در ابتدا هر یک از توالی‌های پروموتری با استفاده از ماتریس‌های PWM این بانک اطلاعاتی بررسی شدند و TFBS معنادار ( $P < 0.05$ ) مرتبط با هر یک از توالی‌های پروموتری این ژن‌ها شناسایی شدند. در نهایت TFBS‌های معنادار ( $P < 0.05$ ) به عنوان کاندیدهای جدید مؤثر در تنظیم بیماری برونشیت عفونی معرفی شدند.

### ترسیم شبکه تنظیمی

در مطالعه حاضر به منظور مصورسازی و یکپارچه‌سازی شبکه‌های تنظیمی حاوی فاکتورهای رونویسی که mRNAs را تنظیم می‌کنند از نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳,۲,۱ استفاده گردید. در ادامه جهت ایجاد طرح‌بندی شبکه با استفاده از الگوریتم Circular و Organic از منوی Layout موجود در نرم‌افزار Cytoscape، شبکه بدست آمده مجدداً سازماندهی شد (۶۲).

### نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq در چهار حالت مختلف ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها نشان داد که به ترتیب در حالت‌های فوق، تعداد ۱۱، ۱۰، ۱ و ۴ ژن بیان بالایی داشتند. در ادامه هر یک از چهار حالت مورد نظر به طور کامل بررسی شده است.

### الف) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفتگی

نتایج نشان داد که ۹۳۴ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفتگی داشتند ( $P < 0.05$ ).

نواحی افزایش یافته که مکان‌های اتصال فاکتورهای رونویسی (Transcription Factor Binding Sites) نامیده می‌شوند، متصل می‌شوند. این اتصال منجر به افزایش یا کاهش در سطوح بیان ژن‌های هدف می‌شود (۲۱). اگر در نواحی تنظیمی ژن‌های هم بیان، TFBS و یا عوامل تنظیمی مشابه وجود داشته باشد، احتمال هم‌تنظیم بودن و همچنین عملکرد مشابه وجود خواهد داشت. بدین منظور امروزه از روش‌های محاسباتی پیچیده برای بررسی این موضوع استفاده می‌شود که در حال حاضر با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در این حوزه در حال گسترش نیز می‌باشند. بنابراین، یک راه‌کار مناسب برای درک بهتر مکانیسم تنظیمی درگیر در یک مرحله بیولوژیکی خاص، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتری ژن‌های با بیان مشابه در آن مرحله با استفاده از روش‌های محاسباتی و با فرض اینکه این ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی مشابه در توالی پروموتری خود هستند، می‌باشد (۶). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل پروموتر ژن‌های با بیان بالا و مشابه در برونشیت عفونی طیور در حالت عفونی نسبت به حالت سالم به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی درگیر در این مراحل و همچنین ترسیم شبکه ژنی مرتبط با فاکتورهای رونویسی شناسایی شده و فرآیندهای بیولوژیکی مربوطه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### داده‌های مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور شناسایی ژن‌های با بیان بالا در جوجه‌های مبتلا به ویروس برونشیت عفونی در برابر جوجه‌های سالم، داده‌های مربوط به یک مطالعه RNA-Seq با شماره دسترسی GSE73423 از سایت NCBI (Gene Expression Omnibus DataSets (GEO)) استخراج گردید. در مطالعه حاضر ساختار بیان ژن‌های مربوط به بافت طحال ۶۴ قطعه جوجه (شامل دو لاین و از هر لاین ۳۲ جوجه، شامل ۱۶ جوجه مبتلا به ویروس برونشیت عفونی و ۱۶ جوجه سالم در هر لاین) برای چهار حالت شامل: الف) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین (Low serum concentration of mannose-binding lectin) در سن یک هفتگی، ب) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی، ج) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت بالای سرم مانوز باند شده با لکتین (Low serum concentration of mannose-binding lectin) در سن یک هفتگی، د) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت بالای سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی که با استفاده از فناوری RNA-Seq مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۸) بررسی گردید. در ادامه ژن‌های با بیان بالا و معنادار ( $P > 0.05$ ) مربوط به مطالعه RNA-Seq ذکر شده در چهار حالت مورد نظر فوق به عنوان ژن‌های نهایی برای انجام تجزیه و تحلیل پروموتر انتخاب شدند.

#### بررسی گروه‌های کارکردی

به منظور بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های معنادار با بیان بالا در چهار حالت مختلف ذکر شده، از نرم‌افزار DAVID استفاده شد (۳۲). بدین منظور ژن‌های معنادار حاصل از داده‌های مطالعه‌ی RNA-Seq در چهار

خانواده‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده‌اند. در ادامه شبکه تنظیمی ترسیم شده حاصل از معرفی ۲۴ فاکتور رونویسی جدید شناسایی شده و ۱۱ ژن هدفشان به نرم‌افزار Cytoscape در شکل ۲ ارائه شده است.

### ب) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی

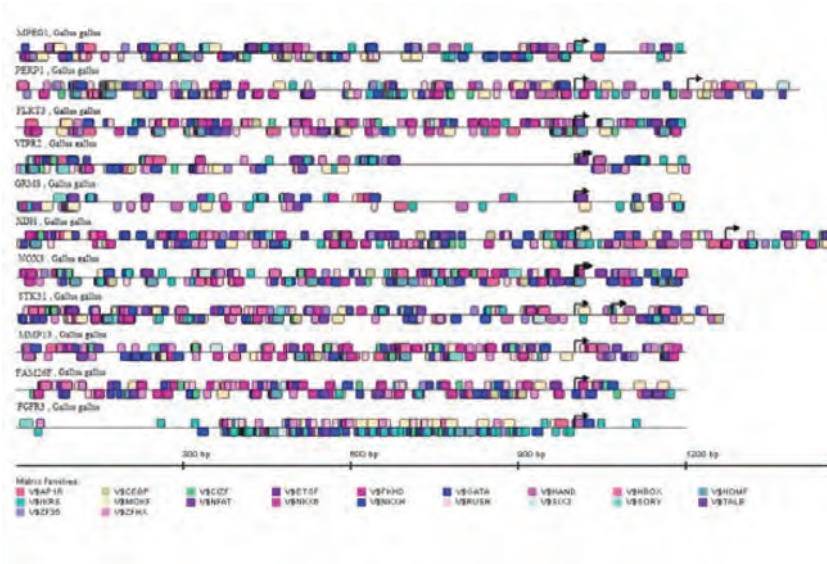
نتایج نشان داد که ۱۶۰ ژن معنادار بیان بالاتری در مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی داشتند ( $p < 0.05$ ). پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۱۶۰ ژن با بیان بالا و معنادار، ۳۵ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ( $p < 0.05$ ) که بیشتر آنها مرتبط با پاسخ دفاعی به باکتری و غیره بودند. در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۰ ژن برتر ( $p < 0.01$ )، شامل FABP3، NPC2، ALOX5AP، S100A9، GSTA3، CTSS، CD300A، PPP1R3B و PCSK7 انتخاب شدند. سپس ۱۰ ژن مورد نظر برای بررسی ساختار پروموتوری آنها و شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید جدید در بیماری برونشیت عفونی استفاده شد. در پایان با تجزیه و تحلیل این ۱۰ ژن، ۳۱ فاکتور رونویسی شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی همه‌ی توالی‌های پروموتوری بودند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری این ۱۰ ژن در شکل ۳ گزارش شده است. از آنجا که فاکتورهای رونویسی با محل تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند، ۳۱ فاکتور رونویسی شناسایی شده در این مطالعه در ۲۷ خانواده قرار گرفتند که در شکل ۳ مشخص است. به عنوان مثال فاکتورهای رونویسی Ikaros1 و Ikaros2 متعلق به خانواده Ikaros (zinc finger family). همچنین فاکتورهای رونویسی MES1 و TGIF1

پس از شناسایی ژن‌های با بیان بالا و معنادار، گروه‌های کارکردی مرتبط با این ژن‌ها بررسی شد. در نتیجه بررسی ۹۳۴ ژن با بیان بالا و معنادار، ۱۱۶ عبارت بیولوژیکی معنادار شناسایی شد ( $p < 0.05$ ) که بیشتر آنها مرتبط با پاسخ دفاعی نسبت به باکتری، تنظیم فرآیندهای سیستم ایمنی و تنظیم تکثیر سیستم ایمنی بودند. برخی از عبارات بیولوژیکی معنادار و مهم حاصل از این تجزیه و تحلیل در جدول ۱ ارائه شده است.

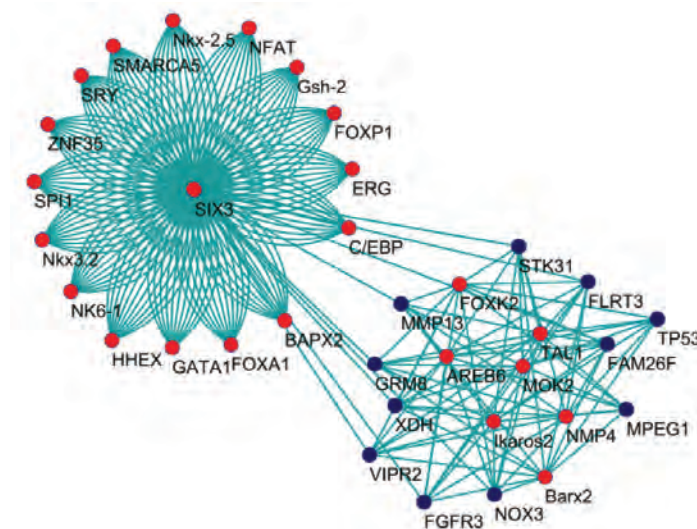
در ادامه با بررسی برترین و معنادارترین ژن‌های شناسایی شده، به عنوان مثال ۱۰ ژن برتر ( $p < 0.01$ )، شامل MPEG1، P53، FLRT3، VIPR2، GRM8، FGFR3، FAM26F، MMP13، STK31، NOX3، XDH انتخاب شدند. با توجه به اهمیت این ژن‌ها در مطالعه‌ی حاضر، از این ۱۱ ژن برای بررسی ساختار پروموتوری آنها و شناسایی فاکتورهای رونویسی کاندید جدید در بیماری برونشیت عفونی استفاده شد. در پایان با تجزیه و تحلیل این ۱۱ ژن، ۲۴ فاکتور رونویسی شامل AREB6، C/EBP beta، Barx2، ERG، FOXA1، FOXP1، GATA1، Gsh-2، HHEX، NFAT، NK6-1، Nkx-2.5، BPAX2 (Nkx 3-1)، SMARCA5، SPI1، SRY، ZNF35، FOXK2، Ikaros 2، MOK-2، NMP4، SIX3، ERG و TAL1 شناسایی شد که تمام این فاکتورهای رونویسی به طور مشترک دارای محل اتصال روی تمامی توالی‌های پروموتوری ۱۱ ژن مورد نظر قرار داشتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌های پروموتوری این ۱۱ ژن در شکل ۱ گزارش شده است. در این شکل، محل اتصال این ۲۴ فاکتور رونویسی شناسایی شده برای هر یک از توالی‌های پروموتوری ۱۱ ژن بررسی شده، ارائه شده است. از آنجا که فاکتورهای رونویسی در قالب خانواده‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (فاکتورهای رونویسی با محل تقریباً مشابه در یک خانواده قرار می‌گیرند)، ۲۴ فاکتور رونویسی شناسایی شده در این مطالعه در ۲۰ خانواده قرار گرفتند که در شکل ۱ مشخص است. به عنوان مثال فاکتورهای رونویسی Nkx3-1، Nkx 2.5، Nkx 3-2، متعلق به خانواده (NKX homeodomain factors)، و همچنین فاکتور رونویسی SPI1 متعلق به خانواده (Human and murine ETS1 factors) هستند. در شکل ۱ این

جدول ۱- عبارات بیولوژیکی معنادار حاصل از بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های با بیان بالا و معنی‌دار (مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفتگی) حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq.

P-value	عبارات مراحل بیولوژیکی
۰/۰۰۲۲۹۱۰۹۱	تنظیم تکثیر سلولی
۰/۰۰۲۵۹۰۹۵۴	پاسخ دفاعی به باکتری
۰/۰۰۸۷۵۵۶۴۶	تنظیم فرآیندهای سیستم ایمنی
۰/۰۰۲۶۹۲۸۶۷۳	تنظیم مهاجرت سلولی
۰/۰۰۳۹۷۸۸۱۶۴	تمایز لوکوسیت
۰/۰۰۴۱۳۷۸۴۳۲	تنظیم پاسخ ایمنی



شکل ۱- فاکتورهای رونویسی مشترک شناسایی شده در پروموتور ژن‌های دخیل در بیماری برونشیت عفونی) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفته‌گی (که در تمام ۱۱ ژن مورد نظر حضور دارند. علامت فلش مربوط به نقطه شروع رونویسی برای هر یک از ژن‌ها است. هر یک از خانواده‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی با رنگ مجزا مشخص شده‌اند ( توضیحات در متن ارائه شده است).



شکل ۲- شبکه تنظیمی مؤثر در بیماری برونشیت عفونی در مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفته‌گی. ۴۲ فاکتور رونویسی شناسایی شده به رنگ قرمز و ۱۱ ژن هدف تمام این فاکتورهای رونویسی با رنگ سرم‌های مشخص شده‌اند.



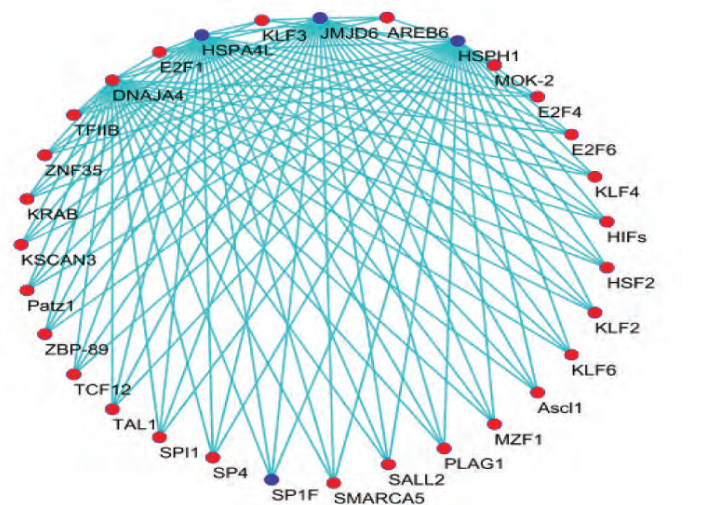




شناسایی شده را می‌توان با توجه به عملکردشان به چند دسته تقسیم‌بندی کرد که عبارتند از: ۱. فاکتورهای رونویسی که نقش شناخته شده‌ای در برونشیت عفونی برای آنها گزارش نشده است اما به نحوی مرتبط با بیماری برونشیت عفونی می‌باشند. از ۲۴ فاکتور شناسایی شده در مطالعه حاضر در حالت الف، ۱۶ فاکتور رونویسی Ikaros2، AREB6، TAL1، BPAX1(Nkx3.2)، NMP4، SPI1، FOXP1، SMARCA5، C/EBP، ERG، GATA1، FOXA1، BAPX2، HHEX، ILF(FOXK2)، NFAT فاکتورهایی هستند که به عنوان فاکتورهای درگیر و مرتبط با فرآیندهای ایمنی شناخته شده بوده، اما در بیماری برونشیت عفونی طیور گزارشی در مورد آنها وجود ندارد. به عنوان مثال نقش فاکتور رونویسی TAL1 در توسعه سلول‌های T گزارش شده است (۷۰). نقش فاکتور رونویسی AREB6 در تنظیم ایمنی و التهاب گزارش شده است (۲۶). نقش فاکتورهای رونویسی نقش 2 Ikaros در تنظیم توسعه سلول‌های لنفوسیت B و T گزارش شده است (۶۰). گزارش شده است که FOXP1 یک فاکتور رونویسی ضروری برای تنظیم توسعه سلول‌های لنفوسیت B می‌باشد (۳۱). نقش فاکتور رونویسی BAPX1 (Nkx3.2) در کنترل لنفوسیت‌ها در طحال گزارش شده است (۱۷). بیان فاکتور رونویسی NMP4 در طحال گزارش شده است (۲). گزارش شده است که SPI1 در تکثیر ماکروفاژها و توسعه لنفوسیت‌های B دخیل است (۱۱). نقش SMARCA5 (SWI/SNF) در تمایز ماکروفاژها گزارش شده است (۷۷). نقش C/EBP در تنظیم سلول‌های لنفوسیت B گزارش شده است (۵). نقش GATA1 در تمایز سلول‌های لنفوسیت گزارش شده است (۱۴). گزارش شده است که HHEX نقش مهمی در توسعه

### الف) مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن یک هفتگی

همانطور که در بخش نتایج ذکر شد در این حالت ۱۱ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال نقش ژن FGFR3 در بیماران با لوسمی لنفوسیتی مزمن گزارش شده است (۱۲). گزارش شده است که ژن FLRT3 بوسیله عفونت باکتریایی القاء می‌شود (۴۹). بیان ژن VIPR2 در افراد سیگاری با برونشیت مزمن گزارش شده است، بنابراین این ژن احتمالاً در پاتوژنز برونشیت مزمن دخیل است (۴۸). گزارش شده است که ژن NOX3، یک آنزیم کلیدی سیستم ایمنی داخلی است که در سلول‌های مونوسیت، لوکوسیت، پلاکت‌ها و سلول‌های اندوتلیال حضور دارد (۵۵). بیان بسیار بالای ژن STK31 در حیوانات مقاوم به مایکوباکتریوم گزارش شده است و با پاسخ دفاعی میزبان و تحریک اینترفرون نوع یک مرتبط است (۴۴). نقش ژن MMP13 در برونشیت مزمن در انسان گزارش شده است (۱). نقش ژن FAM26F در تنظیم پاسخ ایمنی داخلی گزارش شده است (۳). نقش ژن MPEG1 در ایمنی داخلی همراه با بیان این ژن در ماکروفاژها نشان می‌دهد که MPEG1، باکتری‌های گرم مثبت فاگوسیت‌کننده را تخلیه می‌کند (۵۶). همچنین گزارش شده است که توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوسیز بوسیله ویروس برونشیت عفونی در غیاب p53 گزارش شده است (۴۰). با بررسی مطالعات قبلی مشخص شده است که فاکتورهای رونویسی



شکل ۶- شبکه تنظیمی مؤثر در بیماری برونشیت عفونی در حالت مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت بالای سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی. ۲۷ فاکتور رونویسی شناسایی شده به رنگ قرمز و ۴ ژن هدف تمام این فاکتورهای رونویسی با رنگ سرمه‌ای مشخص شده‌اند.



عفونی در طیور معرفی گردند. به عنوان مثال نقش فاکتور رونویسی KLF3 در شکل‌گیری سلول‌های لنفوسیت B گزارش شده است (۷۴). گزارش شده است که فعال شدن فاکتور رونویسی HIF5 مانع از توسعه برونشیت در موش شده است (۲۹). گزارش شده است که JARID2 در توسعه و عملکرد سلول‌های T نقش دارد (۴۳). نقش فاکتور رونویسی PLAG1 در لوسمی لنفوسیتی مزمن گزارش شده است (۵۳). نقش INSM1 در عفونت بوسیله ویروس Ad-LacZ گزارش شده است (۱۳). نقش KRAB در کنترل سیستم ایمنی تطبیقی انسان و موش گزارش شده است (۵۹). نقش فاکتورهای رونویسی MZF1 به عنوان تنظیم‌گرهای سیستم ایمنی گزارش شده است (۵۷). نقش فاکتور رونویسی OLIG2 در لوسمی لنفوبلاستی حاد گزارش شده است (۷). نقش فاکتور رونویسی HIC1 در بیماری ویروسی مارک در طیور گزارش شده است (۶۶). نقش فاکتور رونویسی c-Myb در تمایز سلول‌های B و ایمنی گزارش شده است (۵۲). نقش ZKSCAN3 در افزایش اتوفژی در طی عفونت گزارش شده است (۷۱). نقش TGIF1 در التهاب مزمن گزارش شده است (۷۲). نقش SPZ1 در پاسخ به ایمنی گزارش شده است (۶۴). نقش تنظیمی SMAD در تنظیم سیستم ایمنی گزارش شده است (۴۵). نقش ZBTB17 در توسعه لنفوسیت‌ها گزارش شده است (۳۹). نقش MEIS1 در تمایز لنفوسیت‌ها گزارش شده است (۶۵). بیان XRE در لنفوسیت‌ها گزارش شده است (۵۰). نقش Ikaros 1 در کنترل توسعه لنفوسیت‌ها گزارش شده است (۱۶). همچنین در رابطه با سه فاکتور رونویسی دیگر شناسایی شده در حالت B شامل: MOK-2، ZNF35، NKX-2.5، که در حالت الف هم حضور داشتند و همانطور که ذکر شد دارای نقش مرتبط با برونشیت عفونی نیستند اما در کنار دیگر فاکتورهای مرتبط با برونشیت عفونی حضور دارند، بنابراین احتمالاً دارای نقش در برونشیت عفونی می‌باشند و به عنوان ژن‌های کاندیدای جدید معرفی می‌گردند.

### ج مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت بالای سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی

در این حالت چهار ژن شامل HSPA1، HSOA4L، Hsp40 و JMJD6 بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال گزارش شده است که نقش ژن DNAJA4 (Hsp40) در ایمنی و عفونت گزارش شده است. بیان ژن DNAJA4 در گره‌های لنفوی خوک در هنگام عفونت با *S. cholerae* گزارش شده است (۷۵). همچنین ژن HSOA4L می‌تواند پاسخ ایمنی هومورال را در بیماران سرطان خون تحریک کند (۶۹). نقش ژن HSPA1 در بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتر گزارش شده است (۳۶). ژن JMJD6 تکثیر سلول‌های T را القا می‌کند (۶۵). از ۲۷ فاکتور رونویسی شناسایی شده در حالت د، ۲۱ فاکتور رونویسی AREB6، KLF3، E2F1، E2F4، KLF4، HIF5، HSF2، KLF2، KLF6، MZF1، SMARCA5، SPI1، SP4، SPI1، TCF12، PLAG1، SCL(TAL1)، ZBP-89، patz1، KSCAN3 و KRAB به عنوان فاکتورهای درگیر و مرتبط با فرایندهای ایمنی شناخته شده بوده اما در بیماری برونشیت عفونی در طیور گزارشی از آنها وجود ندارد و به عنوان کاندید جدید در برونشیت عفونی معرفی می‌گردند. به عنوان نقش فاکتور رونویسی E2F1 در ایمنی داخلی گزارش

سیستم ایمنی بازی می‌کند (۳۵). بیان FOXK2 (ILF) در لنفوسیت B و پاسخ‌های ایمنی گزارش شده است (۴۷). نقش FOXA1 در تمایز و تنظیم سلول‌های T گزارش شده است (۴۷). نقش فاکتور رونویسی BAPX2 در تنظیم سلول‌های T گزارش شده است (۲۵). نقش فاکتور رونویسی NFAT در کنترل ژن‌های سایتوکین دخیل در پاسخ‌های ایمنی گزارش شده است (۴۶). بطور کلی با توجه به نقش ۱۵ فاکتور رونویسی ذکر شده که به نوعی مرتبط با برونشیت می‌باشند، این فاکتورهای رونویسی می‌توانند به عنوان کاندید جدید مؤثر در برونشیت عفونی در طیور معرفی گردند.

۲. فاکتورهای رونویسی که دارای نقش اثبات شده در برونشیت عفونی نیستند و در مراحل مشابه نقش برای آنها گزارش نشده است. فاکتورهای رونویسی این گروه شامل فاکتورهای رونویسی SRY، NKX-2.5، MOK-2، NKX-2.5، SIX3، Gsh-2، NK6-1، BARX2 می‌باشند. با توجه به اینکه فاکتورهای این گروه به طور مشترک روی توالی‌های پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه و درگیر در برونشیت عفونی شناسایی شده‌اند و همچنین در کنار فاکتورهایی شناسایی شده‌اند که دارای نقش مرتبط با برونشیت عفونی می‌باشند، کاندیدهای جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش در طحال جوجه‌ها تحت شرایط برونشیت عفونی می‌باشند.

### ب مقایسه‌ی بافت طحال جوجه‌های مبتلا به برونشیت با جوجه‌های سالم با غلظت پایین سرم مانوز باند شده با لکتین در سن سه هفتگی

همانطور که در بخش نتایج ذکر شد در این حالت ۱۰ ژن که در بخش نتایج ذکر گردید بطور معنی‌داری بیان بالایی داشتند. به عنوان مثال گزارش شده است که ژن NPC2 نقش مهمی در متابولیسم چربی‌ها و مسیر سیگنال ایمنی ذاتی بازی می‌کند (۶۳). بیان بالای CYTH1 سلول‌های لنفوسیت T گزارش شده است (۳۷). اخیراً نشان داده شده است که CTSS نقش کلیدی در پردازش لیمفوسیت‌های B انسان بازی می‌کند (۵۸). جالب توجه است که PCSK7 برای بیان ژن کدکننده پروتئین‌های سیستم ایمنی ضروری می‌باشد (۵۱). گزارش شده است که لوکوسیت‌ها ایزوتایپ‌های ویژه‌ای از FABP را دارند. برای مثال در مونوسیت‌ها و ماکروفاژها FABP3 بیان می‌شود (۱۵). گزارش شده است که ALOX5AP به عنوان برجسته‌ترین لیپوکسیژناز سلول‌های میلوئید بوده و به شدت در بافت پستان عفونی افزایش می‌یابد (۶۳). ژن S100A9 در اصل به عنوان پروتئین ایمنی شناخته شده و توسط نوتروفیل‌ها ترشح می‌شود. همچنین گزارش شده است که در التهاب حاد و مزمن نقش دارد (۲۴). ژن GSTA3 در پاسخ ایمنی در جنین‌های جوجه گزارش شده است (۲۰). ژن PPP1R3B در سلول‌های لمفوسیت T گزارش شده است (۴۲). گزارش شده است که CD300a در لنفوسیت B، مونوسیت‌ها و انواع مختلف لوکوسیت‌ها در جوجه یافت شده است (۶۷).

در ادامه از ۳۰ فاکتور رونویسی شناسایی شده ۲۷ فاکتور رونویسی شامل AREB6، Foxp1، Ikaros 2، SPI1، BAPX1، TAL1، SMARCA5، NFAT، c-Myb، ILF(FOXK2)، KSCAN3، KLF3، HIF5، JARID2، PLAG1، KRAB، MZF1، OLIG2، HIC1، TGIF1، SPZ1، SMAD، ZBTB17، MEIS1، INSM1، XRE، Ikaros 1 که برخی در حالت الف هم حضور داشتند، نیز می‌توانند به عنوان کاندید جدید مؤثر در برونشیت

- 4- Ashburner, M., C.A. Ball, J. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. Cherry, A. Davis, K. Dolinski, S. Dwight, J. Eppig, M. Harris, D. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. Matese, J. Richardson, M. Ringwald, G. Rubin and Sherlock G. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*: 25: 25-29.
- 5- Baccam, M., S.Woo, C. Vinson and G. Bishop. 2003. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF- $\kappa$ B, AP-1, and C/EBP. *The Journal of Immunology* 170: 3099-3108.
- 6- Bakhtiarzadeh, M.R., Moradi-Shahrbabak, and E. Ebrahimie, 2014. Transcriptional regulatory network analysis of the over-expressed genes in adipose tissue. *Genes & Genomics* 36:105-117.
- 7- Birdsall, B., D. V. Griffiths, G. Roberts, J. Feeney and Burgen G. 1977. Nuclear magnetic resonance studies of *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase: effects of substrate and inhibitor binding on the histidine residues. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences* 196: 251-265.
- 8- Boltz, D.A., M. Nakai, and J.M Bahr. 2004. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Diseases* 48: 909-915.
- 9- Bournsnel, M.E., T. Brown, I. Foulds, P. Green, F. Tomley and M Binns. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 68: 57-77.
- 10- Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein and T Werner. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933-2942.
- 11- Celada, A., E. Borràs, C. Soler, J. Lloberas, M. Klemsz, C. Van Beveren, S. McKercher and R. Maki. 1996. The transcription factor PU. 1 is involved in macrophage proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 184: 61-69.
- 12- Cerny, J., H. Yu and P.M. Miron. 2013. Novel FGFR3 rearrangement t (4; 22)(p16; q11. 2) in a patient with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Annals of Hematology* 92:1433-1435.
- 13- Chen, C., M.B. Breslin and M. Lan. 2016. Ectopic expression of a small cell lung cancer transcription factor, INSM1 impairs alveologenesis in lung development. *BMC pulmonary medicine* 16: 1.
- 14- Cobaleda, C. and M. Busslinger. 2008. Developmental plasticity of lymphocytes. *Current opinion in immunology* 20: 139-148
- 15- Contreras, G.A. and L.M. Sordillo. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34: 281-289.

شده است (۷۳). فاکتور رونویسی KLF4 به عنوان یک تنظیم‌گر حیاتی تمایز مونوسیت‌ها گزارش شده است (۲۲). گزارش شده است که SP4 در برانگیختن پاسخ‌های ایمنی کمک می‌کند (۴۱). فاکتورهای رونویسی HSF پاسخ‌های ایمنی را تنظیم می‌کنند (۲). فاکتور رونویسی KLF4 به عنوان یک تنظیم‌گر حیاتی تمایز مونوسیت‌ها گزارش شده است (۲۲). گزارش شده است که فاکتورهای رونویسی HSF پاسخ‌های ایمنی را تنظیم می‌کنند (۲). نقش ZNF148 (ZBP-89) در تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها گزارش شده است (۵۴). فاکتور رونویسی KLF۲ مهاجرت سلول‌های لنفوسیت T را تنظیم می‌کند (۶۱). نقش فاکتور رونویسی patz۱ در فعالیت و تمایز لنفوسیت‌ها، فعالیت و تمایز سلول T گزارش شده است (۲۳). اما شش فاکتور رونویسی TFIIIB، E2F6، Ascl1، MOK-2، SALL2 و ZNF35، فاکتورهای رونویسی می‌باشند که دارای نقش اثبات شده در برونشیت عفونی نیستند و در مراحل مشابه نقش برای آنها گزارش نشده است اما با توجه به نقش دیگر فاکتورهای رونویسی ذکر شده که به برونشیت مرتبط می‌باشند، به عنوان کاندیدهای جدید مؤثر در برونشیت معرفی می‌شوند.

### نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی در مطالعه حاضر با فرض مشابه بودن ساختار پروموتوری ژن‌های با بیان مشابه در برونشیت عفونی، ۶۱ فاکتور رونویسی کاندید جدید در برونشیت عفونی شناسایی گردید. با بررسی نتایج کلیه حالات مورد نظر و بررسی نتایج گروه‌های کارکردی و با توجه به اینکه تنظیم‌گرها (فاکتورهای رونویسی) و ژن‌های ذکر شده دارای نقش اثبات شده و یا مرتبط با برونشیت می‌باشند اما تا کنون در طحال جوجه‌ها در شرایط برونشیت عفونی گزارش نشده‌اند، بنابراین فاکتورهای رونویسی ذکر شده کاندیدهای مهم و جدیدی هستند که احتمالاً دارای نقش تنظیمی در طحال جوجه‌ها تحت شرایط برونشیت عفونی بوده و دارای پتانسیل مناسبی برای بررسی بیشتر در سطح آزمایشگاهی می‌باشند. از روش استفاده شده در مطالعه حاضر می‌توان برای درک سازوکارهای تنظیمی مؤثر در بافت‌ها و شرایط مختلف نیز بهره برد.

### منابع مورد استفاده

- 1- Akhmadishina, L., G. Korytina, O. Kochetova, E. Viktorova and T.Viktorova. 2014. Analysis of polymorphisms of genes associated with immune response and tissue remodeling in occupational chronic bronchitis. *Russian Journal of Genetics* 50:1208-1217.
- 2- Alvarez, M., P. Thunyakitpisal, Rhodes, S. Everett and E. Bidwell, J. 2002. Assignment1 of Nmp4 to mouse chromosome 6 band F1 flanked by D6Mit134 and D6Mit255 using radiation hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 94: 244-245.
- 3- Aneela, J. 2012. Gene expression pattern and functional analysis of CD8+ T cells from individuals with or without anti HIV/SIV noncytolytic activity. Ph.D thesis. Georg-AugustUniversity Göttingen. Göttingen, Germany.

- 16- Cortes M., E. Wong, J. Koipally and K. Georgopoulos. 1999. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Current Opinion in Immunology* 11: 167-171.
- 17- Czömpöly, Á., Z. Kellermayer, K. Olasz, H. Arnold and P. Balogh. 2011. Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *The Journal of Immunology* 186: 6981-6989.
- 18- Davison, F. 2011. *Avian Immunology*. 2011: Academic Press 5.
- 19- Delgoffe, G.M. and D.A. Vignali. 2014. A Fox of a different color: FoxA1 programs a new regulatory T cell subset. *Nature medicine* 20: 236-237.
- 20- Farhat, A., K. Buick, L. Williams, C. Yauk, J. O'Brien, D. Crump, K. Williams, S. Chiu and S. Kennedy. 2014. Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate perturbs the expression of genes involved in immune response and lipid and steroid metabolism in chicken embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 275: 104-112.
- 21- Fatima, A., S. Waters, P. O'Boyle, C. Seoighe and D. Morris. 2014. Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics* 15:28.
- 22- Feinberg, M.W., A. Wara, Z. Cao, M. Lebedeva, F. Rosenbauer, H. Iwasaki, H. Hirai, J. Katz, R. Haspel, S. Gray, K. Akashi, J. Segre, K. Kaestner, D. Tenen and M. Jain. 2007. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO journal* 26: 4138-4148.
- 23 - Fornari, T.A., B. Paula, C. Macedo, E. Sakamoto-Hojo, A. Eduardo Donadi and A. Geraldo. 2011. Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. *Clinical and Developmental Immunology* 12: 1-12.
- 24- Gebhardt, C., J. Németh, P. Angel and J. Hess., 2006. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology* 72: 1622-1631.
- 25- Grolleau, A., J. Bowman, B. Pradet-Balade, E. Puravs, S. Hanash, J. Garcia-Sanz and L. Beretta. 2002. Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *Journal of Biological Chemistry* 25:1-37.
- 26- Gu, L., J. Dean, A. Oliveira, N. Sheehy, W. Hall, V. Gautier. 2009. Expression profile and differential regulation of the Human I-mfa domain-Containing protein (HIC) gene in immune cells. *Immunology Letters* 123: 179-184.
- 27- Günther, J., J. Günther, D. Koczan, W. Yang, G. Nürnberg, D. Repsilber, H. Schubert, Z. Park, N. Maqbool, A. Molenaar and H. Seyfert. 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary Research* 40: 1-14.
- 28- Hamzić, E., R. Kjærup, N. Mach, G. Minozzi, F. Strozzi, V. Gualdi, J. Williams, J. Chen, E. Wattrang, B. Buitenhuis, H. Risdahl Juul-Madsen and T. Sørensen. 2016. RNA sequencing-based analysis of the spleen transcriptome following infectious bronchitis virus infection of chickens selected for different mannose-binding lectin serum concentrations. *BMC genomics* 17:1-13.
- 29- Heim, C., B. Motsch, S. Jalilova, W. Bernhardt, M. Ramsperger-Gleixner, N. Burzlaff, M. Weyand, K. Eckardt and S. Ensminger. 2013. Reduction of Obliterative Bronchiolitis (OB) by Prolyl-Hydroxylase-Inhibitors Activating Hypoxia-Inducible Transcription Factors in an Experimental Mouse Model. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 32: 56-91
- 30 - Hosseini Aliabad, S., R. Momayez, R. Mahmodzadeh, M. and Yosefi Amin, A. 2013. Detection of 793/B serotype of infection bronchitis virus from broiler flocks with respiratory signs in west of Mazandran province. *Journal of Veterinary Clinical Research* 4:91-97.
- 31- Hu, H., B. Wang, M. Borde, J. Nardone, Sh. Maika, L. Allred, P. W. Tucker and A. Rao. 2006. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nature Immunology* 7: 819-826.
- 32- Huang, D.W., B. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4: 44-57.
- 33- Ikuta, T., M. Ohba, Ch. Zouboulis, Y. Fujii-Kuriyama, K. Kawajiri. 2010. B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Dermatological Science* 58: 211-216.
- 34- Jackwood, M.W., D. Hall, and A. Handel. 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 1305-1311.
- 35- Jin, B., Q. Tao, J. Peng, H. Soo, W. Wu, J. Ying, C. Fields, A. Delmas, X. Liu, J. Qiu, K. Robertson. 2008. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Human Molecular Genetics* 17: 690-709.
- 36- Kim, K. and H. Kim. 2009. Protein interaction network related to *Helicobacter pylori* infection response. *World J Gastroenterol* 15: 4518-4528.
- 37- Kolanus, W., W. Nagel, B. Schiller, L. Zeitlmann, S. Godar, H. Stockinger and B. Seed. 1996.  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86: 233-242.

- 38- Le, T., L. Liu, J. Zhang, B. Liu and J. Li. 2015. From miRNA regulation to miRNA-TF co-regulation: computational approaches and challenges. *Briefings in Bioinformatics* 16: 475-496.
- 39- Lee, S. and T. Maeda. 2012. POK/ZBTB proteins: an emerging family of proteins that regulate lymphoid development and function. *Immunological Reviews* 247: 107-119.
- 40- Li, F.Q., J. Tam, and D. Liu. 2007. Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53. *Virology*, 365: 435-445.
- 41- Lin, K., C. Lin, S. Chiou, A. Hsu, M. Lee, C. Chang, T. Chang and J. Shien and W. Hsu. 2012. Application of purified recombinant antigenic spike fragments to the diagnosis of avian infectious bronchitis virus infection. *Applied Microbiology And Biotechnology* 95: 233-242.
- 42- Lu, Y.-C., M. Dudley, J. Yang, J Almeida, D. Douek, Samuels, Y. Rosenberg, P. Robbins. 2013. Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression. *The Journal of Immunology* 190: 6034-6042.
- 43- Macián, F., F. Macián, F. García-Cózar, S. Im, H. Horton, M. Byrne, A. Rao. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 6: 719-731.
- 44- Mackintosh, C., J. Griffinb, I. Scotta, R. O'Brienb, J. Stantonc, P. MacLe and R. Brauning. 2016. SOLiD SAGE sequencing shows differential gene expression in jejunal lymph node samples of resistant and susceptible red deer (*Cervus elaphus*) challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology And Immunopathology* 169: 102-110.
- 45- Malhotra, N. and J. Kang. 2013. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system. *Immunology* 139: 1-10.
- 46- Mazière, C., P. Morlière, Z. Massy, S. Kamel, C. Louandre, M. Conte and J. Mazière. 2005. Oxidized low-density lipoprotein elicits an intracellular calcium rise and increases the binding activity of the transcription factor NFAT. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 472-480.
- 47- McDonald, K.G., S. Jacquelyn, C. Wang, T. Kucharzik, I. Williams, and R. Newberry. 2007. CC chemokine receptor 6 expression by B lymphocytes is essential for the development of isolated lymphoid follicles. *The American Journal of Pathology*, 170: 1229-1240.
- 48- Miotto, D., P. Boschetto, I. Bononi, E. Zeni, G. Cavallesco, L. Fabbri and C. Mapp. 2004. Vasoactive intestinal peptide receptors in the airways of smokers with chronic bronchitis. *European Respiratory Journal* 24: 958-963.
- 49- Ng, A. 2013. Microbes and Health Sackler Colloquium: Human leucine-rich repeat proteins: a genomewide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci US A. E-pub ahead of print*. 1:1-10.
- 50- Nijnik, A., S. Clare, C. Hale, C. Raisen, R. McIntyre, K. Yusa, A. Everitt, L. Mottram, C. Podrini, M. Lucas, J. Estabel, D. Goulding, N. Adams, R. Ramirez-Solis, J. White, D. Adams, R. Hancock and Dougan G. 2012. The critical role of histone H2A-deubiquitinase Mym1 in hematopoiesis and lymphocyte differentiation. *Blood* 119: 1370-1379.
- 51- Oksanen, A., 2015. Proprotein Convertase Enzymes FURIN and PCSK7 in Immune Regulation. Ph.D thesis. UNIVERSITY OF TAMPERE. Finland.
- 52- Okuyama, K. and A. James. 2013. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 13410-13415.
- 53- Pallasch, C.P., M. Patz., Y. Jung, P. Susanne Hagist, D. E.Rainer Claus, S. Debey-Pascher, A. Schulz, L.Frenzel, J. Claassen, N. Kutsch, G. Krause, C.hristine Mayr, A. Rosenwald, C. Plass, J.Schultze, M. Hallek. and C.Wendtner. 2009. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114: 3255-3264.
- 54- Park, H. 2001. ZBP-89 represses CD11b gene expression during the differentiation of monocytes into macrophages. in BLOOD. AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- 55- Pignatelli, P., R. Carnevale, R. Cangemi, L. Loffredo, V. Sanguigni, C. Stefanutti, S. Basili and F. Violi. 2010. Atorvastatin inhibits gp91phox circulating levels in patients with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30: 360-367.19.
- 56- Podack, E., V. Deyev and M Shiratsuchi. 2007. Pore formers of the immune system, in Current Topics in Innate Immunity. Springer, p. 325-341.
- 57- Polouliakh, N., R. Nock, F. Nielsen and H. Kitano. 2009. G-protein coupled receptor signaling architecture of mammalian immune cells. *PLoS One* 4: e4189.
- 58- Riese, R.J., R. Mitchell, J. Villadangos, G. Shi, J. Palmer, E. Karp, D. Sanctis, H. Ploegh and H. Chapman. 1998. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *Journal of Clinical Investigation* 101: 2351.
- 59- Santoni de Sio, F.R. 2014. Kruppel-associated box (KRAB) proteins in the adaptive immune system. *Nucleus* 5: 138-148.
- 60- Schmitt, C., C. Tonnelle, A. Dalloul, C. Chabannon, P. Debré and A. Rebollo. 2002. Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte



- development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis* 7: 277-284.
- 61- Sebzda, E., Z. Zou, J. Lee, T. Wang and M. Kahn. 2008. Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nature Immunology* 9: 292-300.
- 62- Shannon, P., A. Markiel, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B and Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13: 2498-2504.
- 63- Shi, X.-Z., X. Zhong, and X.-Q. Yu. 2012. Drosophila melanogaster NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* 42: 545-556.
- 64- Shin, W., G. Bian, and A.S. Raikhel. 2006. A toll receptor and a cytokine, Toll5A and Spz1C, are involved in toll antifungal immune signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 39388-39395.
- 65- Siwek, M., A. Slawinska, M. Rydzanicz, J. Wesoly, M. Fraszczak, T. Suchocki, J. Skiba, K. Skiba, J. Szyda. 2015. Identification of candidate genes and mutations in QTL regions for immune responses in chicken. *Animal Genetics* 46: 247-254.
- 66- Smith, J., J. Sadeyen, I. Paton, Paul. Hocking, N. Salmon, M. Fife, V. Nair, D. W. Burt and P. Kaiser. 2011. Systems analysis of immune responses in Marek's disease virus-infected chickens identifies a gene involved in susceptibility and highlights a possible novel pathogenicity mechanism. *Journal of Virology*, 85: 11146-11158.
- 67- Sperling, B., B. Viertelboeck and T. Göbel. 2015. Chicken CD300a homolog is found on B lymphocytes, various leukocytes populations and binds to phospholipids. *Developmental & Comparative Immunology* 50: 121-128.
- 68- Swayne, D.E., 2013. Diseases of poultry. John Wiley & Sons.
- 69- Takahashi, H., T. Furukawa, T. Yano, N. Sato, J. Takizawa, T. Kurasaki, T. Abe, Narita, M. Masuko, S. Koyama, K.Toba, M. Takahashi, Y. Aizawa. 2007. Identification of an overexpressed gene, HSPA4L, the product of which can provoke prevalent humoral immune responses in leukemia patients. *Experimental Hematology* 35: 1091-1099.
- 70- Talora, C., S. Cialfi, C. Oliviero, R. Palermo, M. Pascucci, L. Frati, A. Vacca, A. Gulino and I. Screpanti. 2006. Cross talk among Notch3, pre-TCR, and Tal1 in T-cell development and leukemogenesis. *Blood* 107: 3313-3320.
- 71- Tanner, K., 2016. Shigella Effector IpaH9. 8 Interacts with Autophagy Transcription Factor ZKSCAN3 and Increases Autophagy During Infection.
- 72- Tateossian, H. 2013. Otitis media in the Tgfr knockout mouse implicates TGFβ signalling in chronic middle ear inflammatory disease. *Human molecular Genetic* 22: 2553-2565.
- 73- Taura, M., M. Suico, K. Koyama, K. Komatsu, R. Miyakita, C. Matsumoto, E. Kudo, R. Kariya, H. Goto, S. Kitajima, C. Takahashi, T. Shuto, M. Nakao, S. Okada, H. Kai. 2012. Rb/E2F1 regulates the innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. *Molecular And Cellular Biology* 32: 1581-1590.
- 74- Turchinovich, G., T. Vu, F. Frommer, J. Kranich, S. Schmid, M. Alles, J. Loubert, J. Goulet, Z. Strobl, P. Schneider, J. Bachl, R. Pearson, M. Crossley, F. Agenès, J. Kirberg. 2011. Programming of marginal zone B-cell fate by basic Krüppel-like factor (BKLf/KLF3). *Blood*, 117: 3780-3792.
- 75- Uthe, J., T. Stabel, S. Zhao, C. Tuggle, S. Bearson. 2006. Analysis of porcine differential gene expression following challenge with *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis using suppression subtractive hybridization. *Veterinary Microbiology* 114: 60-71.
- 76- Wang, X., Rosa A, H. Oliverira, G. Rosa, X. Guo, M. Travnicek, T. Girshick. 2006. Transcriptome of local innate and adaptive immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection. *Viral Immunology* 19: 768-774.
- 77- Xu, Y.Z., Y. Zhong Xu, T. Thuraisingam, R. Marino, and D. Radzioch. 2011. Recruitment of SWI/SNF complex is required for transcriptional activation of the SLC11A1 gene during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 12839-12849.

