

اثر کمپلکس ژنی اسپلیسوزوم در مرحله انتقال از تخمگذاری به کرچی از طریق پروفایل ترانسکرپتومی هیپوفیز بوقلمون مادر

• فاطمه بانکی زاده (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

• هدایت الله روشنفکر

گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

• محمد حسین بناءبازی

بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

• محمود نظری

گروه علوم دامی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

• رضا صفری

گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۱-۱۱-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۱۵-۰۱-۱۴۰۰

Email: Bankizadeh_f@yahoo.com



چکیده

اسپلیسوزوم یک کمپلکس بزرگ ریبونوکلئوپروتئینی است، که فرآیند پیرایش mRNA پیش ساز را در سلول‌های یوکاریوتی هدایت می‌کند. در مطالعه حاضر پروفایل ترانسکرپتوم هیپوفیز بوقلمون مادر تجاری از نژاد بیوتی طی مراحل تخم‌گذاری و کرچی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۳۴ ژن با بیان متفاوت بین دو گروه تشخیص داده شد، که ۲۲۹ ژن دارای بیان زیاد و ۱۰۵ ژن دارای بیان کم در گروه تخم‌گذار در مقایسه با گروه کرچ مشاهده شد. در این مطالعه نتایج تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی و KEGG نشان داد که ژن‌های مسیر اسپلیسوزوم نقش موثری در مرحله انتقال از تخم‌گذاری به کرچی بوقلمون‌ها داشتند ($P < 0.05$). علاوه بر این در مسیر انتقال یون کلسیم در بخش عملکرد مولکولی، فرآیند پیرایش باعث فعال‌شدن و ایجاد ایزوفرم‌های مختلف ژن مربوط به کلسیم-کالمادولین وابسته به پروتئین کیناز دو آلفا شد، که نقش مهمی در سیستم نوروترانسمیتری و هورمونی دارد. در این مطالعه نشان داده شد که، ژن‌های *SNRPA1* و *SNRPD1*، *SNRPF* مربوط به کمپلکس اسپلیسوزوم برای ساخت فولیکول‌ها و باروری ضروری هستند. ژن *HSPA8* نیز که در بوقلمون‌های تخم‌گذار نسبت به کرچ بیان کمتری داشت، در اتوفاژی و تخریب فولیکول‌ها در بوقلمون‌های کرچ نقش داشت.

کلمات کلیدی: اسپلیسوزوم، هیپوفیز، کرچی، تخمگذاری، بیان ژن

• Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 40-47

Effect of spliceosome gene complex underlying the transition between the laying and brooding phases in pituitary transcriptome profile of breeder turkey

By: Bankizadeh, F., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Roshanfekar, H., Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Banabazi, M. H., Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of IRAN (ASIR), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Nazari, M., Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Khuzestan, Mollasani, Iran. and Safari, R., Department of Animal Science, Agriculture Faculty, University of Buai Sina, Hamadan, Iran.

Received: 2021-01-30 Accepted: 2021-04-04

Email: Bankizadeh_f@yahoo.com

The spliceosome is a large ribonucleoprotein complex that guides pre-mRNA splicing in eukaryotic cells. In this research, pituitary transcriptome profile of commercial breeder turkey of BUT breed was studied during the laying and broodiness phases. A total of 334 differentially expressed genes during egg-laying phases and brooding phases were identified. There were 229 upregulated and 104 downregulated at egg-laying phases compared with brooding phases. In the present study results of both GO and KEGG analysis suggested that the genes in the spliceosome complex are critical in the transition from the egg-laying to brooding phase turkeys. In addition, in the calcium ion transport in the biological process, splicing activates and creates various isoforms of the calcium/calmodulin alpha, which plays an important role in the neurotransmitter and hormonal systems of turkeys. In this study it was revealed that SNRPD1, SNRPF and SNRPA1/U2A in spliceosome complex were essential for folliculogenesis and fertility. HSPA8 was significantly down-regulated at laying turkeys compared with broodiness turkeys was involved in autophagy and follicular regression in broody turkey.

Key words: Spliceosome, Pituitary, Broodiness, Egg-Laying, Gene Expression

علاوه بر دقت عمل دارای انعطاف پذیری نیز می باشد. دو اسپلیسوزوم منحصر به فرد در بیشتر یوکاریوت ها وجود دارند: اسپلیسوزوم وابسته به U2 که شامل snRNP های U1، U2، U4/U6 و U5 است و عمل حذف اینترون های نوع U2 را کاتالیز می کند، و به اسپلیسوزوم اصلی معروف است. اسپلیسوزوم نوع نادر شامل snRNP های U4atac، U11، U12 و U6atac هستند و با فراوانی کمتر فقط در یک زیرمجموعه از یوکاریوت ها وجود دارد (۲۲). snRNP ها دارای تعدادی پروتئین مشخص هستند که به دو گروه تقسیم می شوند، گروه اول شامل snRNP ها با پروتئین های اختصاصی که احتمالا مسوول پیرایش mRNA پیش ساز هستند و گروه دوم مربوط به snRNP ها با پروتئین های مشترک که به sm معروف هستند، و در همه ریبونوکلئوپروتئین های هسته ای کوچک وجود دارند و برای ساخت اجزای آن ها ضروری هستند. حداقل هشت مورد از snRNP ها (B'، B، D1، D2، D3، E، F، G) در سلول ها یافت شده اند (۱۸). فاکتورهای تنظیم کننده پیرایش شامل عضوی غنی از سرین و آرژنین و اجزای ریبونوکلئوپروتئین هتروژن (hnRNP) هستند (۱۳، ۱۸). فرآیند پیرایش نقش مهمی در کنترل بیان بسیاری از ژن ها (مانند ژن های

مقدمه

بیشتر ژن های یوکاریوتی به شکل mRNA های پیش ساز بیان می شوند (pre-mRNAs)، که توسط فرآیند پیرایش به mRNA بالغ تبدیل می گردند. پیرایش یک مرحله اساسی بیان ژن است که در آن توالی های غیرکدکننده (اینترن ها) حذف می شوند، سپس توالی های کدکننده (اکزون ها) به هم متصل می شوند (۲، ۱۴، ۱۵). برخی از اکزون ها دائما در پیرایش حضور دارند یعنی در هر mRNA تولید شده از یک mRNA پیش ساز (pre-mRNA) وجود دارند. پیرایش جایگزینی بطور رایج در یوکاریوت های پیشرفته تر اتفاق می افتد و به همین دلیل میزان پیچیدگی آن ها به دلیل افزایش تعداد پروتئین های بیان شده منحصر به فرد از یک ژن خاص بیشتر می شود (۱۳). پیرایش هسته ای mRNA پیش ساز توسط اسپلیسوزوم (Spliceosome) کاتالیز می شود. اسپلیسوزوم یک کمپلکس بزرگ چند مگا دالتونی شامل ریبونوکلئوپروتئین های هسته ای کوچک (snRNPs) بوده که در حذف اینترن ها از mRNA پیش ساز نقش دارند (۲۱). این کمپلکس ساختار پویایی است، که ابزار پیرایش را در اختیار دارد و

صفت کرچی است. به صورت عملی مدیریت کرچی از هفته دوم تولید آغاز می‌شود، برای این منظور روش‌های متفاوتی وجود دارد که ما در گله حاضر طبق توصیه شرکت آویژن از روش رنگ کردن و انتخاب پرنده (Paint and Take) استفاده نمودیم. در نهایت در سن ۵۶ هفتگی تعداد ۱۲ پرنده انتخاب شد، که شش عدد کاملاً کرچ و شش عدد تخمگذار بودند و همه برای نمونه‌گیری به کشتارگاه انتقال داده شدند. کشتار پرنده‌ها به صورت انفرادی انجام شد، و هیپوفیز پرنده‌ها تحت شرایط کنترل شده و در کوتاه‌ترین زمان ممکن جدا شدند و به فریزر ۸۰- انتقال پیدا کردند.

استخراج RNA و توالی‌یابی

استخراج RNA توسط تریزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانو درآپ و الکتروفورز سنجیده شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده شش نمونه RNA مختلف با غلظت یکسان از هر گروه از بوقلمون‌های کرچ و تخمگذار با هم ادغام شدند و در نهایت سه نمونه ادغام شده از هر گروه (در مجموع شش نمونه)، آماده شد. سپس توالی‌یابی دو طرفه برای حدود ۳۰ میلیون خوانش ۱۵۰ جفت بازی (به ازای هر نمونه) روی پلتفرم Illumina HiSeq 2500 انجام گرفت. کنترل کیفیت داده‌ها با فرمت fastq و توسط نرم‌افزار FastQC نسخه 0.11.2 انجام شد (۴). طول همه خوانش‌ها در همه نمونه‌ها ۱۵۰ جفت باز و میانگین تعداد نوکلئوتیدهای خوانده نشده (N) برای همه خوانش‌ها صفر بود. پس از ویرایش خوانش‌ها بار دیگر عملیات سنجش کیفیت برای اطمینان از بهبود کیفیت داده‌ها انجام شد. ویرایش داده‌های خام توالی‌یابی شده توسط Trimmomatic نسخه 0.35 انجام شد (۶)، و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت حذف شدند.

نقشه‌یابی داده‌های خام

به منظور مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع و تشکیل رونوشت، ژنوم مرجع بوقلمون و اطلاعات حاشیه‌نویسی (Annotation) آن از بانک اطلاعات (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>) ncbi GCF_000146605.3 دریافت شد. هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه، پس از

دخیل در چرخه سلولی، سیگنال انتقال، آنژیوژنسیز و آپوپتوزیس) دارد (۲۰، ۲۲). پیرایش ژنی نه تنها در سطح مولکولی اهمیت دارد بلکه از نظر پزشکی نیز حائز اهمیت است. پیرایش و اتصالات نابجا باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها شده یا در شدت بروز آنها دخالت دارند (۲۲). یکی از مسیرهای متابولیکی غنی‌شده در بافت‌های سرطانی مربوط به شبکه اسپلیسوزوم و ژن‌های دخیل در آن می‌باشد (۹، ۱۰). بررسی‌ها نشان داده که، اسپلیسوزوم به وفور در سلول‌های بنیادی دیده شده است، و رونویسی ژن‌های این شبکه از جمله *SNRPA1* و *SNRPD1* در این بافت‌ها بطور معنی‌دار افزایش یافته است (۱۰). بررسی‌ها نشان داده که در شرایط مختلف محیطی یا وقوع یک صفت خاص در پرنده‌ها پیرایش ژنی نقش مهمی دارد. به عنوان نمونه آنالیز تفاوت بیان ژن در غده تیروئید پرنده‌هایی که تحت تاثیر استرس سرمایی قرار گرفته‌اند پیرایش جایگزینی قابل قبولی را بین دو گروه نشان داد، به طوری که ایزوفرم‌های خاصی مثل TPO در اثر خاموشی آگرون‌های شماره چهار و پنج در شرایط استرس سرمایی در پرنده‌ها فعال شد (۲۵). مقایسه بافت فولیکول‌ها در دوره‌ی کرچی و تخمگذاری نشان داد، که اسپلیسوزوم در تمام مراحل تکامل فولیکول‌های زرد کوچک تا فولیکول‌های بزرگ نقش موثری دارد (۱۲). فرآیند پیرایش در برخی گونه‌ها در شکل‌گیری گنادها و تعیین جنسیت نیز نقش دارد (۱۴). در این مطالعه بررسی ترانسکرپتوم هیپوفیز بوقلمون‌های نژاد تجاری در دو مرحله تخم‌گذاری و کرچی توسط توالی‌یابی RNA انجام گرفت. علاوه بر این تفاوت بیان ژن‌های دخیل در مسیر اسپلیسوزوم و نقش آن‌ها در دو مرحله از چرخه تولید مثلی با هدف به دست آوردن نقش ژن‌های موثر جدید در رفتار تولید مثلی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پرنده‌های مورد آزمایش و نمونه‌گیری

در این مطالعه به منظور آنالیز ترانسکرپتوم، از بوقلمون‌های مادر گوشتی نژاد بیوتی (But) شرکت آویژن انگلستان استفاده شد. دوره‌ی پرورش این پرنده با جیره پیشنهادی و تحت شرایط مدیریتی کاملاً کنترل شده انجام گرفت. یکی از نکات مورد توجه در مزارع بوقلمون بررسی

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

نمونه‌ی بوقلمون‌های تجاری						خوانش‌ها
تخمگذار			کرچ			
نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱	
۵۰۴۱۱۶۶۵	۴۴۸۹۹۵۶۶	۵۵۹۲۳۵۶۶	۴۲۸۸۰۴۵۸	۴۰۶۱۸۰۲۸	۴۵۱۴۲۶۹۰	تعداد کل خوانش‌ها
۵۰۴۱۱۱۹۱	۴۴۸۹۹۳۲۱	۵۵۹۲۳۰۴۴	۴۱۰۶۳۸۶۰	۴۰۶۱۷۵۳۸	۴۱۵۰۹۹۸۴	خوانش‌های ویرایش شده
۸۱/۵۴	۸۱/۵۱	۸۱/۵۹	۸۲/۴۱	۸۲/۲۳	۸۲/۵۷	نرخ نقشه‌یابی

سنجش کیفیت، بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم افزار HISAT2 نسخه 2.0.3 انجام شد (۱۰).

شمارش خوانش‌ها

ساده‌ترین روش برای برآورد بیان ژن‌ها، شمارش خوانش‌ها به ازای هر ژن می‌باشد. عمل شمارش این خوانش‌ها توسط برنامه‌های مختلفی صورت می‌گیرد. کلیه این ابزارها هم‌ردیف‌های خوانش ژنومی را در فرمت SAM/BAM و حاشیه‌نگاری ژنومی را در فرمت GFF/GTF به عنوان ورودی دریافت می‌کنند. برای انجام شمارش خوانش‌ها از نرم‌افزار Htseq-count بخشی از نرم‌افزار Htseq استفاده شد (۳). در نرم‌افزار Htseq اگزون‌هایی که خوانش‌ها با آنها هم‌پوشانی داشت تشخیص داده شد، سپس شمارش‌های سطح اگزونی بر مبنای اسم ژنی اگزون‌ها در فایل GTF گروه بندی شد (۳).

نتایج و بحث

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

آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها

بعد از بررسی تفاوت بیان ژن‌ها در بوقلمون‌های کرچ و تخمگذار، تعداد ۳۳۴ ژن با بیان متفاوت در گروه تخمگذار نسبت به کرچ ($P < 0.05$) شناسایی شد. بعد از آنالیز هستی‌شناسی ژن و غنی‌سازی مسیر KEGG برای ژن‌های با بیان متفاوت، تعداد هفت ژن معنی‌دار مرتبط با کمپلکس اسپلیسوزوم که در فرآیند پیرایش و ایجاد ایزوفرم‌های جدید موثرند شناسایی شدند. میزان change fold ژن‌ها از $-4/0.3343$ تا $2/55756$ متغیر بود (شکل ۱)، و شامل اجزای اصلی اسپلیسوزوم ($SNRPF$ و $SNRPA/A1$ ، $SNRPD/D1$ ، $U2SURP$)، یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ($HSP70$) معروف به $HSPA8$ ، ژن پلی‌پیتیدیل ایزومراز یک ($PP1L1$) و ژن جدید ($LOC100538921$) بودند. در بخش اجزای سلولی تعداد پنج مسیر و در بخش عملکرد مولکولی یک مسیر دارای ژن‌های مرتبط با پیرایش ژنی

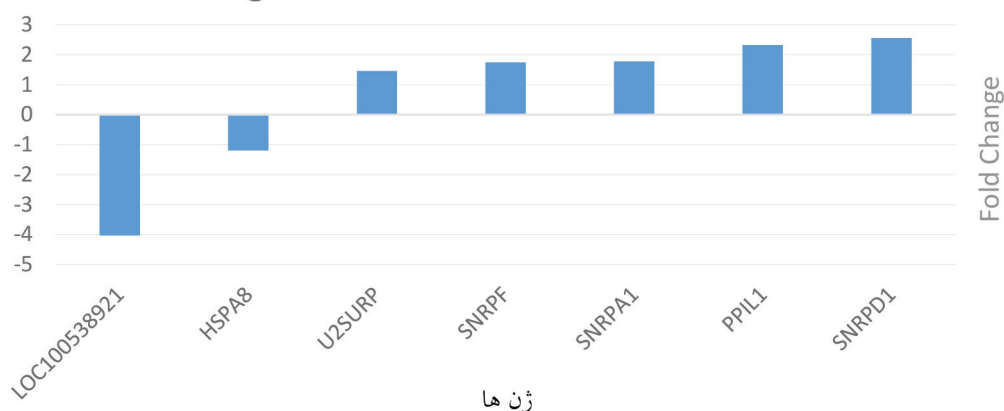
آنالیز تفاوت بیان ژن

پیش از آنالیز افتراقی بیان مبتنی بر شمارش، رونوشت‌های با بیان پایین (کمتر از ده) حذف شدند. سپس توسط edgeR نسخه 3.10.0 از بسته نرم‌افزاری Bioconductor تعداد شمارش‌های هر خوانش تصحیح شد. در نهایت آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها توسط برنامه DESeq2 مبتنی بر مدل خطی تعمیم یافته (Generalized Linear Model) انجام شد. در نهایت ژن‌هایی که از نظر آماری P تصحیح شده کمتر از ۰,۰۵ داشتند شناسایی و به عنوان ژن‌های معنی‌دار معرفی شدند (۱۶).

شناسایی و تعیین عملکرد ژن‌ها

به منظور بررسی حاشیه‌نویسی و مصور سازی ژن‌های متفاوت بیان شده در دو گروه پرنده کرچ و تخم‌گذار از پایگاه اطلاعاتی DAVID به آدرس

تفاوت بیان ژن‌ها در بوقلمون‌های تخمگذار نسبت به کرچ



شکل ۱- تفاوت بیان ژن‌های مربوط به شبکه اسپلیسوزوم در بوقلمون‌های تخمگذار نسبت به کرچ.

این ژن در فرآیند اتوفازی است. اتوفازی فرآیند تخریب داخل سلولی است که تحت تاثیر لیزوزومها اتفاق می‌افتد و برای بقای سلول‌هایی که تحت محرومیت غذایی یا سایر استرس‌ها قرار گرفته‌اند مفید است و به عنوان یک مکانیسم کنترل کیفیت برای پاکسازی سلول از پروتئین‌های آسیب دیده یا خیلی پیر، توده‌های پروتئینی و پاتوژن‌های خارجی به کار می‌رود و باعث مرگ سلولی از طریق خود هضمی نیز می‌شود. یکی از عوامل موثر در تحریک بروز اتوفازی سیگنال‌های ناشی از اختلال در کانال‌های Ca^{2+} و انتقال گلوکز است (۹). در این مطالعه نیز اینطور استنباط شده که در پرنده‌های کرچ به دلیل ایجاد تغییرات در انتقال یون کلسیم فرآیند اتوفازی نیز فعال گردید و نهایتاً منجر به تخریب و

از هیپوفیز پیشین باعث بروز کرچی می‌شود و دوپامین مانع از ترشح پرولاکتین و بروز صفت کرچی می‌گردد (۱۷، ۲۷). رسپتورهای D2 و D3 دوپامین دارای چندین نوع از ایزوفرم‌های پیرایش شده هستند و شدیداً تحت تاثیر کمپلکس اسپلایسوزوم و اثر تنظیمی کانال‌های یون کلسیم قرار می‌گیرند (۱۹، ۲۶).

HSPA8 یکی از پروتئین‌های شوک حرارتی و از خانواده HSP70 است، که در این مطالعه در بوقلمون‌های تخمگذار نسبت به کرچ بیان پایین‌تری داشت. این پروتئین‌ها جز اصلی سیستم‌های محافظتی در سلول‌ها هستند، که به ویژه در شرایط غیرعادی و استرس بیان آن‌ها افزایش پیدا می‌کند. یکی از دلایل افزایش بیان این ژن در پرنده‌های کرچ نقش

جدول ۲- نتایج مربوط به مسیر متابولیکی اسپلایسوزوم حاصل از KEGG.

نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
Spliceosome	7	2.48	0.03137768	0.905058	0.691873	33.597930

جدول ۳- نتایج مربوط به مسیر معنی‌دار در بخش فرآیند بیولوژیکی (BP) در هستی‌شناسی ژن‌های شبکه اسپلایسوزوم.

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0006816	calcium ion transport	3	3.15	0.0015929	0.9564642	0.9564642	12.696412
GO:0048168	regulation of neuronal synaptic plasticity	2	0.99	0.0375945	0.9999224	0.9911951	39.1562515

جدول ۴- نتایج مربوط به مسیرهای معنی‌دار در بخش عملکرد مولکولی (MF) در هستی‌شناسی ژن‌های شبکه اسپلایسوزوم.

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0044822	poly(A) RNA binding	27	9.121621	8.84E-05	0.010729	0.010729	0.101751

جدول ۵- نتایج مربوط به مسیرهای معنی‌دار در بخش اجزای سلولی (CC) در هستی‌شناسی ژن‌های شبکه اسپلایسوزوم.

کد شناسایی	نام مسیر	تعداد ژن	%	PValue	Bonferroni	Benjamini	FDR
GO:0005925	focal adhesion	13	4.39	4.13E-04	0.075104	0.075104	0.511658
GO:0043209	myelin sheath	8	2.70	0.007848	0.292190	0.158685	2.244967
GO:0005685	U1 snRNP	3	1.03	0.0022798	0.774438	0.310845	9.32075
GO:0070062	extracellular exosome	36	12.16	0.010262	0.857675	0.322894	12.023171
GO:0005689	U12-type spliceosomal complex	3	1.13	0.038291	0.999375	0.707670	38.420159

هورمون‌هایی مانند پرولاکتین و دوپامین که در پدیده کرچی نقش دارند فرآیند وابسته به یون کلسیم می‌باشند. HSPA8 یکی از پروتئین‌های شوک حرارتی است که در بوقلمون‌های تخمگذار نسبت به کرچ بیان پایین‌تری داشت، و دلیل افزایش بیان این ژن در پرنده‌های کرچ نقش آن در فرآیند اتوفازی است. از عواملی که باعث تحریک اتوفازی در پرنده کرچ می‌شود یکی ایجاد اختلال در کانال‌های انتقال یون کلسیم و دیگری اتصال HSPA8 به رسپتورهای استروژن و پروژسترون و جلوگیری از ترشح این هورمون‌ها می‌باشد، که هر دو فرآیند نهایتاً منجر به فعال شدن اتوفازی و تخریب و آتروفی فولیکول‌ها در بوقلمون‌های کرچ می‌شوند.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین این مطالعه با کد شماره ۹۷۰۰۱۶۰۶ و مشارکت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوریان کشور (Iran National Science Foundation: INSF) انجام شد و لازم است از حمایت‌های انجام شده این بخش نیز تشکر و قدردانی صورت گیرد.

منابع مورد استفاده

- 1- Ahmed, E., D., Z. Jianhong and D. U. Yuchun. 2016. Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER α) and Biochemical Characterization of the ER α -Hsp70 Interaction. *PLoS ONE* 8: 11.
- 2- Alwaeely, F. A., K. N. Madlum and M. A. Alsaadi. 2021. Immunomodulatory Effect of Propolis on Foxp3 Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated in vitro with Pseudomonas Aeruginosa Ag. *Archives of Razi Institute*. 76: 887-894.
- 3- Anders, S., P.T. Pyl and W. Huber. 2014. HTSeq - A Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31(2):166-169.
- 4- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online: <http://bioinformatics.Babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- 5- Bates, M. D. and P. M. Conn. 1984. Calcium mobilization in the pituitary gonadotrope: relative roles of intra- and extracellular sources. *Endocrinology* 115:1380-1385.
- 6- Bolger, A., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. *Bioinformatics* 30(15),2114-2120.
- 7- Faeqali Jan, M., H. Muneer Al-Khafaji, B. Hasan Al-Saadi and M. K. Aneed Al-Saedi. 2021. Assessment of Interleukin-8 in Bronchial Asthma in Iraq. *Archives of Razi Institute*. 76: 913-923.
- 8- Gomez Redondo, I., R. Fernandez-Gonzalez, R. Laguna-Barraza, E. Pericuesta, K. Horiuchi, J. Valcarcel and A. Gutierrez-Adan.

آتروفی فولیکول‌ها در بوقلمون‌های کرچ شد. بررسی‌های انجام شده روی غازهای کرچ و تخمگذار نیز نشان داد HSPA8 دارای بیان بالایی در پرنده‌گان کرچ بوده و در اتوفازی فولیکول‌ها نقش دارد (۲۷). همچنین در مطالعه دیگری که در محور هیپوفیز-هیپوتالاموس- گناد انجام شد برای ژن HSPA8 تفاوت معنی‌داری در هیپوفیز، هیپوتالاموس، تخمدان و فولیکول‌های پرنده‌های کرچ نسبت به تخمگذار دیده شد (۱۷)، که همگی مطابق با تحقیق حاضر هستند. همچنین نقش دیگر HSPA8 در وقوع پدیده کرچی در بوقلمون‌ها، اتصال آن به رسپتورهای استروئیدی است. در پرنده‌های کرچ مدتی بعد از شروع کرچی و با افزایش سطح هورمون پرولاکتین، میزان هورمون‌های پروژسترون و استروژن کاهش پیدا می‌کند. گیرنده آلفا استروژن یک فاکتور رونویسی است که بیان ژن‌های پاسخ دهنده استروژن را کنترل می‌کند و مانند سایر اعضای خانواده‌های دارای رسپتور استروئیدی مانند آندروژن، پروژسترون، گلکوکورتیکوئید و مینرالوکورتیکوئید پاسخگویی آن به لیگاند‌های مختلف توسط پروتئین‌های شوک حرارتی کنترل می‌شود (۱). در صورت عدم وجود لیگاند استروژنی، رسپتور استروژن به یک کمپلکس پروتئینی شوک حرارتی مثل HSPA8 متصل شده و ضمن حفظ صحیح ساختار خود، غیرفعال و از اتصال به عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن جلوگیری می‌شود، در نتیجه ترشح استروژن در پرنده کرچ کاهش پیدا می‌کند. با کاهش ترشح هورمون‌های استروژن و پروژسترون اتوفازی فولیکولی نیز اتفاق می‌افتد.

ژن LOC100538921 مربوط به خانواده فاکتورهای تنظیم کننده پیرایش معروف به (hnRNP) است که همراه با گروه‌های غنی از سرین و آرژنین از طریق ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم خود با عناصر توالی تنظیمی RNA (تقویت‌کننده‌ها و خاموش‌کننده‌های پیرایش) که در اینترون‌ها و آگزون‌ها وجود دارند، در تشخیص محل‌های پیرایش به وسیله کمپلکس اسپلیسوزوم تأثیر می‌گذارد. به نظر می‌رسد بهترین سیستمی که پیرایش سیستم‌های عصبی را کنترل می‌کند ساختار hnRNP باشد، که تعیین کننده اصلی تغییر در پیرایش است (۱۲، ۱۸) و در این مطالعه نیز حضور این ژن جدید مربوط به ژنوم بوقلمون تأکید بر نقش تنظیمی آن دارد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه اجزای مختلفی از شبکه اسپلیسوزوم شناسایی شد، که نشان‌دهنده اهمیت نقش این ژن‌ها در مراحل تخمگذاری و کرچی است. با توجه به نقش فولیکول‌ها در دوره تخمگذاری پرنده ماده و مطالعات انجام شده قبلی در این زمینه این طور نتیجه گرفته شد، که ژن‌های *SNRPA1* و *SNRPD1*، *SNRPF* تخمگذار نسبت به کرچ بودند دارای نقش کلیدی در روند تکامل و ساخت فولیکول‌ها هستند. از طرفی ژن *SNRPA1* نقش موثری در باروری در دو جنس نر و ماده دارد. در مسیر انتقال یون کلسیم چندین ژن از جمله ژن *CAMK2A* مشخص شد. *CAMK2A* در انتقال یون کلسیم دخالت دارد. و فرآیند پیرایش در فعال شدن آنها و ایجاد ایزوفرم‌های جدید از آنها دخالت داشت. همانطور که گفته شد یون کلسیم علاوه بر دخالت مستقیم در تشکیل پوسته تخم در تنظیم ترشحات هورمونی به ویژه ترشحات حاصل از غده هیپوفیز دخالت دارد. همچنین عملکرد

2018. Impaired folliculogenesis in U12 intron splicing-defective Zrsr2 mutant mice. 51st Annual Meeting in New Orleans 10-13.
- 9- Kania, E., B. Pajdk and A. Orzechowski. 2015. Calcium Homeostasis and ER Stress in Control of Autophagy in Cancer Cells. *BioMed Research International*. Article ID 352794, 12 pages.
- 10- Kim D., B. Langmead and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12:357-360.
- 11- Kim, Y.D., J. Lee, H.S. Kim, M.O. Lee, M.S. Son, C.H. Yoo. and J. K. Choi. 2017. The unique spliceosome signature of human pluripotent stem cells is mediated by SNRPA1, SNRPD1, and PNN. *Stem Cell Research* 22, 43-53.
- 12- Mingming, L.E.I., Q.I.N. Qingming and S.H.I. Zhendan. 2020. Transcriptome analysis to unravel the gene expression profile of ovarian follicular development in Magang goose. *Reproduction and Development* 66, 4.
- 13- Nilsen, T.W. and B.R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-463.
- 14- Planells, B., L. Gomez-Redondo, E. Pericueña, P. Lonergan, A. Gutierrez and A. Adan. 2019. Differential isoform expression and alternative splicing in sex determination in mice. *BMC Genomics* 20:202.
- 15- Reed, R., J. Griffith and T. Maniatis. 1988. Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell* 53, 949-961.
- 16- Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law and W. Shi. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43, 7.
- 17- Liu, H, J. Wang, L. Li, C. Han and H. Xu. 2018. Transcriptome analysis revealed the possible regulatory pathways initiating female geese broodiness within the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *PLoS ONE* 13, 2.
- 18- Luhrmann, R., B. Kastner and M. Bach. 1990. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys. Acta* 1087, 265-292.
- 19- Skelding, K.A., J.A.P. Roštas, M. Nicole and N.M. Verrills. 2011. Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle* 10:4, 631-639.
- 20- Takata, K., M. Otsuka, T. Kishikawa, Y. Kudo, T. Goto, H. Yoshida and K. Koike. 2012. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 420 (3): 564-569.
- 21- Wahl, M.C., C.L. Will and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136(4):701-719.
- 22- Wang, Z. and C.B. Burge. 2008. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14: 802-813.
- 23- Ward, A.J. and T.A. Cooper. 2010. The pathobiology of splicing. *Pathol* 220: 152-163.
- 24- Xie, J., and D.L. Black. 2001. A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature* 410:936-939.
- 25- Xie, S., X. Yang, D. Wang, F. Zhu, N. Yang and Z. Hou. 2017. Thyroid transcriptome analysis reveals different adaptive responses to cold environmental conditions between two chicken breeds. *PLoS ONE* 13(1).
- 26- Ye, P., Ge, K., Li, M., Yang, L., Jin, S. Zhang, C., Chen, X. and Geng, Z. 2019. Egg-laying and brooding stage-specific hormonal response and transcriptional regulation in pituitary of Muscovy duck (*Cairina moschata*). *Poultry Science* 98:5287-5296.
- 27- Yu, J., Y. Lou and A. Zhao. 2016. Transcriptome analysis of follicles reveals the importance of autophagy and hormones in regulating broodiness of Zhedong white goose. *Scientific Reports* 6,36877.

