

Pleiotropic Role of Vitellogenin in the Honey Bee Stress Response Network: A Protein-Protein Interaction (PPI) Network Analysis

Zahra Roudbari¹ , and Azadeh Torabi² 

1. Corresponding author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Email: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir
2. Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: azadehtorabi@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 05 June 2026

Received in revised form 07
August 2026

Accepted 09 September 2026

Available online 14 September
2026

Keywords:

Antioxidant defense,
Heat stress,
Network centrality analysis,
PPI network,
Vitellogenin

ABSTRACT

Objective: The honey bee (*Apis mellifera*), a key pollinator, plays a vital role in maintaining biodiversity and food security. However, honey bees have increasingly faced environmental challenges, including heat and oxidative stress, in recent decades. The molecular response of honey bees to these stresses is a multilayered process that involves complex protein networks. This study aimed to analyze the protein-protein interaction (PPI) network to identify key genes and functional organization patterns in the stress response, with a focus on the pleiotropic role of vitellogenin (Vg).

Method: Using the STRING database, a PPI network comprising 25 candidate proteins associated with antioxidant defense, the heat-shock response, innate immunity, and metabolic-hormonal regulation was constructed. The network was subsequently visualized and analyzed using Cytoscape. Functional modules were identified using the MCODE plugin, and centrality indices (Degree, Betweenness, Closeness, and Eigenvector) were calculated using the CytoNCA plugin. In addition, enrichment analysis of Gene Ontology biological processes and molecular functions, as well as KEGG and Reactome pathways, was performed using the STRING database, and terms with a false discovery rate (FDR) < 0.05 were considered statistically significant.

Results: The results showed that this network has an integrated structure, in which *Sod1*, *Trx-2*, and *Sod2*, with the highest degree of connectivity (Degree = 16), were identified as the main hubs and play a central role in antioxidant defense. Centrality analysis revealed that *Vg*, with the highest betweenness centrality (80.49), serves as the most important bottleneck node, linking distinct functional modules. Analysis of the induced first-degree subnetwork centered on *Vg* revealed direct connections of this protein to 11 functional neighbors in the fields of antioxidant defense, innate immunity, and metabolic-hormonal pathways. Functional enrichment analysis in the Gene Ontology, KEGG, and Reactome databases further confirmed the enrichment of processes related to oxidative stress response, metabolic regulation, and innate immunity.

Conclusions: These findings indicate that the stress response in honey bees is based on the interplay of four main axes-antioxidant defense, heat stress response, innate immunity, and metabolic regulation with *Vg* acting as an inter-modular coordinator of these systems. Identification of this integrated network and its hub nodes may facilitate the introduction of candidate molecular markers to improve stress tolerance and enhance colony survival in honey bee breeding programs.

Cite this article: Roudbari, Z., & Torabi, A. (2026). Pleiotropic relationships of vitellogenin in the honey bee stress response network: A protein-protein interaction (PPI) network analysis. *New Approaches in Animal Sciences*, 1(3), 1-21. <https://doi.org/10.22098/naas.2026.20686.1024>



© The Author(s) retain the copyright.

Publisher: University of Mohaghegh Ardabili.

DOI: <https://doi.org/10.22098/naas.2026.20686.1024>

Introduction

The honey bee (*Apis mellifera*) is a cornerstone of global biodiversity and agricultural stability, serving as a primary pollinator for a vast array of crops. However, the survival and productivity of honey bee colonies are increasingly threatened by escalating environmental challenges, most notably thermal stress and oxidative pressure. These stressors trigger complex molecular responses that aim to maintain cellular homeostasis and prevent damage to proteins and membranes. Rather than acting through isolated, independent genes, the honey bee's physiological resilience is orchestrated by an intricate, multi-layered network of interacting proteins. A key player in this molecular landscape is vitellogenin (Vg). Historically categorized primarily as a yolk precursor protein, Vg has recently been recognized as a highly pleiotropic molecule that regulates several critical physiological processes, including immunity, longevity, metabolic homeostasis, and redox balance. Given its widespread involvement in diverse biological functions, Vg is hypothesized to act as a central integrator within the stress response network. However, the precise network-level role of Vg and its interactions with key antioxidant and immune-related proteins have not been comprehensively mapped. This study was designed to bridge this knowledge gap by employing a systems biology approach, specifically protein-protein interaction (PPI) network analysis, to elucidate the structural and functional architecture of the honey bee stress response and to characterize the topological role of Vg as a potential network mediator.

Method

To construct a representative model of the honey bee stress response, a curated dataset of twenty-five candidate genes was selected based on an extensive review of existing literature, ensuring comprehensive coverage of four fundamental physiological axes: antioxidant defense (e.g., superoxide dismutases), heat-shock response (chaperones), innate immunity (antimicrobial peptides), and metabolic-hormonal regulation (signaling pathways). Subsequently, the protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database (version 12.0), applying high-confidence interaction thresholds to minimize false-positive links and ensure the reliability of the derived interactome. The resulting network was then visualized and analyzed with Cytoscape (version 3.10.4), and to quantify the importance of specific nodes within this network, several topological metrics were computed using the CytoNCA plugin, including Degree Centrality for identifying highly connected hubs, Betweenness Centrality for pinpointing bottleneck nodes that control communication flow between functional modules, Closeness Centrality for assessing the efficiency of information propagation from a specific protein, and Eigenvector Centrality for evaluating a node's influence based on its neighbors' connectivity. Furthermore, functional modules, representing densely connected protein complexes, were identified within the network using the MCODE algorithm. Finally, to validate the biological relevance of the observed network topology,

comprehensive functional enrichment analyses were performed utilizing Gene Ontology (GO) for both biological processes and molecular functions, in conjunction with pathway analyses via the KEGG and Reactome databases, with statistical significance for enrichment being defined at an FDR (False Discovery Rate) of < 0.05 .

Results

The analysis revealed that the honey bee stress response network has a highly organized, modular topology. The network is not a collection of random interactions but is instead structured into four distinct, yet interrelated, functional modules: (1) the Antioxidant/Redox Module, containing key enzymes like *Sod1*, *Sod2*, *Trx-2*, *Gtpx2*, and *GstD1*; (2) the Heat-Shock/Proteostasis Module, involving chaperones such as *Hsp90* and *Hsc70-4*; (3) the Innate Immunity Module, comprising antimicrobial peptides and signaling components like *Def1* and *ABAE-APIME*; and (4) the Metabolic-Hormonal Module, featuring regulatory proteins such as *Akt1*, *Tor*, and *Vg*. Topological metrics identified several critical hub genes that maintain the structural integrity of the network. Specifically, *Sod1*, *Trx-2*, and *Sod2* exhibited the highest degree centrality (16) and were identified as the principal network hubs. Their high connectivity underscores the paramount importance of antioxidant enzymes in the honey bee's defense against oxidative stress. Crucially, the analysis identified vitellogenin (*Vg*) as the most significant regulatory bridge in the entire network. While it did not have the highest degree, *Vg* exhibited an exceptionally high Betweenness Centrality of 80.4931, identifying it as a key bottleneck node. This high betweenness indicates that *Vg* is strategically positioned to mediate communication between the disparate functional modules (antioxidant, immune, and metabolic). In the *Vg*-centered subnetwork analysis, *Vg* exhibited Degree Centrality of 11 and Closeness Centrality of 1.0000, confirming its role as a highly accessible and central coordinator. The *Vg* subnetwork demonstrated direct protein-protein interactions with 11 unique neighbors, representing a cross-section of all four functional axes, thereby confirming its pleiotropic role in integrating stress-related signals. Functional enrichment results provided strong biological validation for these topological findings. GO Biological Process analysis was significantly enriched for terms such as cellular response to oxidative stress, response to heat, and regulation of metabolic processes. GO Molecular Function analysis highlighted antioxidant enzyme activity and chaperone-related functions. Furthermore, KEGG and Reactome pathway analyses identified significant enrichment in the Insulin/TOR signaling pathway and redox homeostasis pathways, highlighting the critical connection between energy metabolism (via *Akt1* and *Tor*) and the stress response (via *Vg*).

Conclusions

This study provides a comprehensive systems-level view of the honey bee stress response, demonstrating that it is a highly coordinated, multi-modular process. The results indicate that the antioxidant defense system, led by hubs such as *Sod1* and *Sod2*, forms the structural core of

the network. At the same time, vitellogenin (Vg) serves as the essential physiological bridge integrating antioxidant, immune, and metabolic regulatory systems. The identification of Vg as a high-betweenness node suggests that it is a master regulator capable of synchronizing different defensive modules to ensure colony-wide resilience. These findings have significant implications for honey bee biology and management; specifically, *Sod1*, *Sod2*, and *Vg* represent high-priority candidate molecular markers for breeding programs aimed at developing more resilient bee lineages. However, it is important to note that our results are derived from a prediction-based PPI analysis. While the topological evidence is robust, future research must prioritize *in vivo* experimental validation to confirm the specific biochemical interactions and functional consequences of these hubs under diverse environmental stress conditions.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Not applicable

Acknowledgements

The authors would like to thank the anonymous reviewers for their valuable suggestions during the revision of the manuscript.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.



بررسی روابط پلیوتروپیک ویتلوژنین در شبکه پاسخ به تنش زنبور عسل با استفاده از رویکرد تحلیل شبکه (PPI)

زهرا رودباری^۱ و آزاده ترابی^۲

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir
۲. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: azadehtorabi@gmail.com

چکیده

اطلاعات مقاله

هدف: زنبور عسل (*Apis mellifera*) به‌عنوان گرده‌افشان کلیدی، نقشی حیاتی در حفظ تنوع زیستی و امنیت غذایی دارد اما در دهه‌های اخیر با چالش‌های محیطی از جمله تنش‌های گرمایی و اکسیداتیو مواجه شده است. پاسخ مولکولی زنبور عسل به این تنش‌ها فرایندی چندلایه است که شبکه‌های پیچیده‌ای از پروتئین‌ها را در بر می‌گیرد. هدف از این پژوهش، تحلیل شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) برای شناسایی گره‌های کلیدی و الگوهای سازمان‌یابی عملکردی در پاسخ به تنش، با تمرکز بر نقش پلیوتروپیک ویتلوژنین (Vg) بود.

روش پژوهش: با استفاده از پایگاه داده STRING، شبکه‌ای متشکل از ۲۵ ژن کاندید مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ به شوک حرارتی، ایمنی ذاتی و تنظیم متابولیک-هورمونی ساخته و در نرم‌افزار Cytoscape مصورسازی و تحلیل شد. ماژول‌های عملکردی شبکه با افزونه MCODE شناسایی و شاخص‌های مرکزیت (Degree, Betweenness, Closeness) و Eigenvector با افزونه CytoNCA محاسبه شدند. همچنین، تحلیل غنی‌سازی فرایندهای زیستی و کارکردهای مولکولی Gene Ontology و نیز مسیرهای KEGG و Reactome با استفاده از پایگاه داده STRING انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که این شبکه ساختاری منسجم دارد که در آن ژن‌های Sod1، Trx-2 و Sod2 با بالاترین درجه اتصال (Degree=16) به‌عنوان هاب‌های اصلی شناسایی شدند و نقش محوری در دفاع آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند. تحلیل مرکزیت شبکه نشان داد که Vg با بالاترین مقدار Betweenness centrality به‌عنوان مهمترین گره واسط عمل می‌کند و ماژول‌های عملکردی مجزا را به یکدیگر پیوند می‌زند. واکاوی زیرشبکه القاشده درجه‌اول متمرکز بر Vg ارتباط مستقیم این پروتئین با ۱۱ همسایه عملکردی در حوزه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، ایمنی ذاتی و مسیرهای متابولیک-هورمونی را آشکار ساخت. تحلیل غنی‌سازی عملکردی در پایگاه‌های Gene Ontology، KEGG و Reactome برجستگی فرایندهای مرتبط با پاسخ به تنش اکسیداتیو، تنظیم متابولیسم و ایمنی ذاتی را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند که پاسخ به تنش در زنبور عسل بر تعامل چهار محور اصلی دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ حرارتی، ایمنی و تنظیم متابولیک استوار است و Vg به‌عنوان هماهنگ‌کننده میانماژولی این سامانه‌ها عمل میکند. شناسایی این شبکه یک‌پارچه و گره‌های هاب می‌تواند به معرفی نشانگرهای مولکولی کاندید برای بهبود تحمل تنش و افزایش بقای کلنی‌های زنبور عسل در برنامه‌های اصلاح نژادی کمک کند.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۵/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۳۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۲۳

کلیدواژه‌ها:

تحلیل مرکزیت شبکه،

تنش گرمایی،

دفاع آنتی‌اکسیدانی،

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین،

ویتلوژنین.

استناد: رودباری، زهرا و ترابی، آزاده (۱۴۰۵). بررسی روابط پلیوتروپیک ویتلوژنین در شبکه پاسخ به تنش زنبور عسل با استفاده از رویکرد تحلیل شبکه (PPI).

یافته‌های نوین علوم دامی، ۱ (۳)، ۲۱-۱. <https://doi.org/10.22098/naas.2026.20686.1024>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه محقق اردبیلی.

۱. مقدمه

زنبور عسل (*Apis mellifera*) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حشرات گرده‌افشان، نقش حیاتی در حفظ تنوع زیستی، پایداری اکوسیستم‌ها و امنیت غذایی جهان ایفا می‌کند (Di Pasquale و همکاران، ۲۰۱۳؛ Potts و همکاران، ۲۰۱۰؛ Klein و همکاران، ۲۰۰۶). با این حال، در دهه‌های اخیر، افزایش بسامد و شدت امواج گرمایی ناشی از تغییرات اقلیمی، بقای کلنی‌های زنبور عسل را با چالش‌های فیزیولوژیکی و اکولوژیکی کم‌سابقه‌ای روبه‌رو کرده است (Goulson و همکاران، ۲۰۱۵). در شرایط تنش گرمایی حاد، فراتر رفتن دمای کندو از محدوده بهینه تنظیم حرارتی ($34.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$)، از یک‌سو به اختلال در رفتار تجمعی و افزایش هزینه انرژی کارگران برای تهویه منجر می‌شود و از سوی دیگر، با تشدید نفوذپذیری پاتوژن‌ها، تلفات کلنی و کاهش محسوس طول عمر زنبوران کارگر را رقم می‌زند (Di Pasquale و همکاران، ۲۰۱۳؛ Bordier و همکاران، ۲۰۱۷).

استرس گرمایی به‌طور مستقیم با اختلال در هموستاز سلولی و القای استرس اکسیداتیو از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مرتبط است (González-Tokman و همکاران، ۲۰۲۵). تجمع ROS منجر به آسیب‌های اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلولی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA شده و در نهایت زوال فیزیولوژیک زنبور عسل را تسریع می‌کند (Margotta و همکاران، ۲۰۱۸). بنابراین، شناخت سازوکارهای مولکولی و شبکه‌های تنظیمی پاسخ به استرس گرمایی و اکسیداتیو جهت بهبود پایداری و مدیریت کلنی‌ها اهمیت شایانی دارد. پاسخ سلولی زنبور عسل به استرس‌های محیطی، یک فرایند چندلایه و هماهنگ است که بازوهای حفاظتی متعددی را در بر می‌گیرد. یکی از مهم‌ترین این بازوها، خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) است. چاپرون‌های مولکولی نظیر Hsp90، Hsp70 و Hsc70-4 از طریق تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و جلوگیری از تجمع پروتئین‌های دناتوره‌شده، پایداری سلولی را حفظ می‌کنند (Alqarni و همکاران، ۲۰۱۹). بازوی دوم، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است که شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (Sod1 و Sod2)، کاتالاز (Cat)، گلوکاتایون پراکسیداز (Gpx) و به‌ویژه سامانه تیوردوکسین (شامل تیوردوکسین Trx-2 و تیوردوکسین پراکسیداز Tpx-5) است که از طریق حفظ تعادل ردوکس سلولی و احیای پروتئین‌های اکسیدشده، از آسیب اکسیداتیو به سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Balieira و همکاران، ۲۰۱۸). افزون بر این، مسیرهای تنظیمی مرتبط با بقا و متابولیسم، از جمله بازوهای سیگنالینگ وابسته به

Akt1 و Tor، می‌توانند در هماهنگی این پاسخ‌ها و حفظ تعادل انرژی نقش داشته باشند (Hay، ۲۰۱۱). با وجود شناخت این مسیرهای مجزا، شواهد اخیر در بیولوژی سیستم‌ها نشان می‌دهد که پاسخ به استرس در زنبور عسل با وضعیت فیزیولوژیک، متابولیک و هورمونی کل حشره گره خورده است و در این میان، ویتلوزنین (Vg) به‌عنوان یک ژن مؤثر عمل می‌کند (Havukainen و همکاران، ۲۰۱۳؛ Seehuus و همکاران، ۲۰۰۶). ویتلوزنین در زنبور عسل فراتر از نقش سنتی خود به‌عنوان پیش‌ساز پروتئین زرده تخم، یک گلیکولیپوفسفوپروتئین پلی‌تروپیک است که طول عمر، رفتار اجتماعی (تقسیم کار بین کارگران و چراگرها)، ایمنی ذاتی و تعادل اکسیداتیو را کنترل می‌کند (Havukainen و همکاران، ۲۰۱۳). ویتلوزنین با متصل شدن به رادیکال‌های آزاد، مستقیماً به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از سلول‌های زنبور عسل در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (Seehuus و همکاران، ۲۰۰۶). از سوی دیگر، عملکرد Vg با وضعیت هورمونی و متابولیک حشره در ارتباط است و مسیرهای تنظیمی پایین‌دستی آن، از جمله ژن پاسخ‌دهنده به هورمون جوانی یعنی Kr-h1، در هماهنگی این شبکه نقش دارند (Wang و همکاران، ۲۰۱۲؛ Corona و همکاران، ۲۰۰۷).

اگرچه مطالعات پیشین نقش ویتلوزنین را در فیزیولوژی زنبور عسل و همچنین اهمیت چاپرون‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در پاسخ سلولی به تنش به‌طور جداگانه بررسی کرده‌اند، اما برهم‌کنش‌های متقابل و ساختار شبکه‌ای که این دو سیستم را به یکدیگر پیوند می‌دهد، به‌خوبی تبیین نشده است. تحلیل شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) ابزار قدرتمندی در زیست‌شناسی سیستم‌ها فراهم می‌کند تا بتوان گره‌های رابط و هاب‌های اصلی مسئول یکپارچه‌سازی این پاسخ‌ها را شناسایی کرد (Akinlaja و همکاران، ۲۰۲۱). در این ساختار، پروتئین‌هایی مانند Sod1 و Hsp90 به‌عنوان نقاط کلیدی اتصال‌دهنده بین ماژول‌های پاسخ به استرس و هموستاز انرژی عمل می‌کنند. همچنین، فاکتور رونویسی FoxO (Forkhead box O) به‌عنوان یک پل ارتباطی و حسگر محوری در محور سیگنال‌دهی انسولین/فاکتور رشد شبه‌انسولین (IIS) عمل می‌نماید؛ به این صورت که با کاهش سیگنال IIS یا در شرایط استرس اکسیداتیو، FoxO با ورود به هسته (Nuclear translocation)، به‌طور مستقیم رونویسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند Sod و Cat) را القا کرده و از طریق یک حلقه بازخوردی متقابل با هورمون جوانی (JH) و مسیر TOR، بیان و پایداری ویتلوزنین (Vg) را برای حفظ مقاومت به تنش و بقای سلولی هماهنگ

انسولین/IGF، مسیرهای TOR و AMPK، تنظیم هورمونی و کنترل صفات فیزیولوژیک وابسته به ویتلوژنین انجام شد. پس از گردآوری اولیه، نام ژن‌ها و پروتئین‌ها یک‌دست‌سازی شد و موارد تکراری حذف گردید تا فهرست نهایی برای تحلیل شبکه‌ای تهیه شود. بر این اساس، مجموعه نهایی شامل ۲۵ ژن و پروتئین بود: Duox, Def2, Def1, Akt1, APID73, ABAE-APIME, Hex110, HYTA-APIME, Gtpx2, GstS4, GstS1, GstD1, Sod1, Prx5, LOC724197, Kr-h1, Hsp90, Hsf, Hsc70-4, Sod2, Tor, Tpx-5, Trx-2, Vg و eIF-1A. این مجموعه به‌عنوان ورودی اولیه برای ساخت شبکه تعامل پروتئین-پروتئین و تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

۲.۲. ساخت و مصورسازی شبکه تعامل پروتئین-پروتئین

به‌منظور بررسی روابط عملکردی میان ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب، شبکه برهم‌کنش‌های عملکردی پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING v12.0 (Szkarczyk et al., 2023) برای گونه *Apis mellifera* استخراج گردید. فهرست ژن‌های منتخب به‌عنوان داده ورودی در STRING وارد گردید. برای ساخت شبکه حداقل امتیاز اطمینان برابر با ۰.۴۰ در نظر گرفته شده است و شبکه بر اساس شواهد شناخته‌شده و پیش‌بینی‌شده تعاملات زیستی، شامل داده‌های تجربی، پایگاه‌های داده curated، هم‌بیانی، هم‌وقوعی و سایر شواهد محاسباتی تولید شد. همچنین گزینه "maximum number of interactors to show" روی صفر تنظیم شد تا شبکه صرفاً بین ژن‌های ورودی تشکیل شود. در ادامه، داده‌های شبکه استخراج و برای مصورسازی و پردازش بیشتر به نرم‌افزار (Version Cytoscape (v3.10.4 (Shannon et al., 2003) منتقل شدند. مصورسازی نهایی شبکه در Cytoscape انجام شد؛ به‌طوری‌که هر گره نماینده یک ژن یا پروتئین و هر یال نشان‌دهنده وجود تعامل عملکردی یا فیزیکی میان دو گره بود. تنظیمات مربوط به چیدمان شبکه، رنگ‌بندی گره‌ها و نمایش ارتباطات برای تسهیل تفسیر زیستی شبکه و بررسی سازمان‌یابی عملکردی ژن‌ها اعمال شد.

۳.۲. شناسایی ماژول‌های عملکردی

ماژول‌های عملکردی، گروه‌ها یا مجتمع‌های پروتئینی متراکمی در شبکه هستند که اعضای آن‌ها تعاملات بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند و یک وظیفه فیزیولوژیک هماهنگ و مشخص را در سلول اجرا می‌کنند. به‌منظور شناسایی مجتمع‌های پروتئینی متراکم و ماژول‌های عملکردی کلیدی در شبکه تعاملی، از افزونه MCODE v2.0 (Bader & Hogue., 2003) بر پایه الگوریتم خوشه‌بندی

می‌سازد (Corona و همکاران، ۲۰۰۷؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۲).

اگرچه پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SODها و CAT) مجریان مستقیم خنثی‌سازی استرس در سطح سلولی هستند، اما سازمان‌دهی این پاسخ‌ها در سطح سیستمیک و تخصیص منابع انرژی، نیازمند فاکتورهای پلیوتروپیک بالادست است. در این میان، ویتلوژنین (Vg) در زنبور عسل فراتر از نقش سنتی خود در تولیدمثل، به‌عنوان یک مولکول هماهنگ‌کننده چندمنظوره با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مستقیم و به‌عنوان گره تلافی میان مسیرهای سیگنال‌دهی انسولین (IIS)، TOR و هورمون جوانی (JH) عمل می‌کند. با این حال، چگونگی ارتباط عملکردی و ساختاری Vg با مسیرهای حفاظت سلولی و پاسخ به استرس گرمایی در قالب یک شبکه جامع زیست‌شناسی سیستم‌ها مشخص نشده است. از این رو، هدف از این مطالعه، تلفیق داده‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) به منظور ارائه یک مدل بیولوژی سیستم‌ها از پاسخ به استرس‌های گرمایی و اکسیداتیو در زنبور عسل با محوریت ویتلوژنین به‌عنوان یک گره گلوگاهی (Bottleneck) و یک پارچه‌ساز است. در این پژوهش با ساخت و تحلیل توپولوژیکی شبکه ترکیبی، چگونگی هماهنگی و پل‌زدن Vg میان ماژول‌های تنظیمی بالادست (متابولیسم و هورمون‌ها)، پاسخ‌های چابرونی (شوک حرارتی) و بازوهای دفاع آنتی‌اکسیدانی تبیین شده است. شناسایی این ساختار یک‌پارچه و کشف گره‌های کلیدی (هاب/ Bottleneck) می‌تواند زمینه معرفی نشانگرهای مولکولی کاندید را جهت برنامه‌های اصلاح نژادی دقیق با هدف ارتقای هم‌زمان بقا، طول عمر و عملکرد تولیدی کلنی‌های زنبور عسل در شرایط تنش‌های حرارتی ناشی از تغییر اقلیم فراهم سازد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. گردآوری ژن‌ها و پروتئین‌های کاندید

ژن‌ها و پروتئین‌های کاندید مورد استفاده در این مطالعه با هدف تحلیل یک‌پارچه شبکه‌ای پاسخ به تنش گرمایی و نقش ویتلوژنین در زنبور عسل از دو محور مفهومی اصلی گردآوری شدند: نخست، ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش گرمایی و استرس اکسیداتیو، دوم، ژن‌های درگیر در سنتز، تنظیم و عملکرد چند اثری ویتلوژنین. انتخاب این ژن‌ها بر اساس شواهد گزارش‌شده در مطالعات پیشین و نقش شناخته‌شده آن‌ها در مسیرهای زیستی کلیدی شامل حفاظت پروتئینی، دفاع آنتی‌اکسیدانی، تنظیم هموستاز انرژی، سیگنالینگ

K- Node Score Cutoff = 0.2, Degree Cutoff = 2
Core = 2 و Max. Depth = 100. سپس ماژول‌های استخراج‌شده
بر اساس انوتیشن‌های عملکردی GO و KEGG مورد اعتبارسنجی
و نام‌گذاری قرار گرفتند.

موضوعی مبتنی بر ضریب خوشه‌بندی هسته (Core Clustering Coefficient) در محیط Cytoscape استفاده گردید. پارامترهای
الگوریتم مطابق با مقادیر پیش‌فرض بهینه‌شده به این شرح تنظیم
شدند.

جدول ۱. مشخصات و نقش‌های عملکردی ۲۵ ژن/پروتئین منتخب در پاسخ به تنش در زنبور عسل

Table 1. Criteria and Functional Roles of Selected 25 Key Genes/Proteins in Stress Response of *Apis mellifera*

ردیف	ژن/پروتئین	شناسه ژن/پروتئین	گروه عملکردی	نقش زیستی در پاسخ به تنش
Row	Gene/Protein	Gene/Protein ID	Functional group	Biological Role in Stress Response
1	Sod1	P00332	آنتی‌اکسیدان	سوپراکسید دیسموتاز ۱؛ آنزیم کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌های سوپراکسید.
2	Sod2	P30015	آنتی‌اکسیدان	سوپراکسید دیسموتاز ۲ (میتوکندریایی)؛ کاهش تنش اکسیداتیو در میتوکندری
3	Trx-2	P68139	آنتی‌اکسیدان	تریوردوکسین ۲؛ حفظ هموستاز ردوکس و پاکسازی ROS در میتوکندری
4	Gtpx2	O61803	آنتی‌اکسیدان	گلوتاتیون پراکسیداز-۲؛ سمیت‌زدایی از هیدروژن پراکسید با استفاده از گلوتاتیون
5	GstD1	Q9U6R5	آنتی‌اکسیدان	گلوتاتیون-S ترانسفراز D1؛ آنزیم سمیت‌زدایی فاز II و حذف ROS
6	GstS1	Q1W8G3	آنتی‌اکسیدان	گلوتاتیون-S ترانسفراز S1؛ کوژوگاسیون زنبوتیک‌ها و کاهش آسیب اکسیداتیو
7	GstS4	Q1W8G0	آنتی‌اکسیدان	گلوتاتیون-S ترانسفراز S4؛ سمیت‌زدایی و پاسخ به استرس اکسیداتیو
8	Tpx-5	Q1W8G5	آنتی‌اکسیدان	تیوردوکسین پراکسیداز-۵ (پراکسیدوکسین)؛ بخشی از سامانه آنتی‌اکسیدانی تیوردوکسین/پراکسیدروکسین
9	Prx5	Q69L60	آنتی‌اکسیدان	پراکسیدروکسین-۵؛ احیای پراکسید و حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو
10	Duox	H9IFX4	آنتی‌اکسیدان	NADPH اکسیداز دوگانه (دوال اکسیداز)؛ تولید ROS به عنوان سیگنال حفاظتی
11	Hsp90	P04637	پروتئین شوک حرارتی	پروتئین چاپرون؛ حفظ پایداری و عملکرد پروتئین‌ها تحت شرایط تنش
12	Hsc70-4	P07630	پروتئین شوک حرارتی	چاپرون بافتی خانواده Hsp70؛ تاخوردگی پروتئین و مقاومت حرارتی سلولی
13	Hsf	Q9Y5R8	پروتئین شوک حرارتی	فاکتور رونویسی شوک حرارتی؛ تنظیم‌کننده بالادستی بیان ژن‌های HSP
14	Def1	P17721	پاسخ ایمنی	پپتید ضد میکروبی دفنسن-۱؛ دفاع ایمنی ذاتی ضد باکتریایی
15	Def2	P17722	پاسخ ایمنی	پپتید ضد میکروبی دفنسن-۲؛ دفاع ایمنی ذاتی
16	ABAE_APIME	P15450	پاسخ ایمنی	پپتید ضد میکروبی آبائسین؛ نقش مستقیم در ایمنی ذاتی علیه باکتری‌ها
17	APID73	P81463	پاسخ ایمنی	پپتید آپیدسین ۷۳؛ مشارکت در دفاع میزبان و مقابله با میکروب‌ها
18	HYTA_APIME	Q08169	پاسخ ایمنی	آنزیم هیالورونیداز؛ نقش در تحریک سیستم ایمنی و پاسخ به پاتوژن‌ها
19	Vg	P0DMV9	ویتلونین	پیش‌ساز اصلی پروتئین زرده؛ نقش چندگانه در ایمنی، متابولیسم و تنش.
20	Kr-h1	Q6Q0H5	تنظیم متابولیک	فاکتور رونویسی پاسخ‌دهنده به هورمون جوانی (JH)؛ واسطه عمل JH و سیگنال‌دهی مرتبط با تنش
21	Akt1	P31749	تنظیم متابولیک	کیناز سرین/تروئونین مسیر سیگنال‌دهی انسولین (IIS)؛ هماهنگ‌کننده رشد، متابولیسم و پاسخ به تنش
22	Tor	Q5U3Y5	تنظیم متابولیک	پروتئین هدف رایامایسین (TOR)؛ حسگر وضعیت انرژی/مغذی و تنظیم رشد و پاسخ به تنش
23	eIF-1A	P41567	تنظیم متابولیک-هورمونی	فاکتور آغاز ترجمه یوکاریوتی ۱ (eIF1A)؛ تنظیم سنتز پروتئین در شرایط تنش
24	Hex110	Q868Z2	تنظیم متابولیک-هورمونی/ذخیره‌ای	هگزامرین ۱۱۰ کیلودالتونی؛ ذخیره مواد مغذی و پاسخ به تنش‌های متابولیک
25	LOC724197	XP_393040	تنظیم متابولیک-هورمونی/ذخیره‌ای	پروتئین فرضی با عملکرد ناشناخته؛ برای بررسی اتصال شبکه لحاظ شده

۴.۲. تحلیل توپولوژیک شبکه

پروتئین حاصل از پایگاه داده STRING به نرم‌افزار Cytoscape منتقل شد و تحلیل توپولوژیک آن با استفاده از افزونه CytoNCA (Tang et al., 2015) در محیط نرم‌افزار Cytoscape صورت گرفت. شبکه به صورت بدون جهت (Undirected) و بدون وزن‌دهی به یال‌ها (Unweighted) تحلیل شد. به‌منظور شناسایی گره‌های کلیدی شبکه، شاخص‌های مرکزیت شبکه شامل Degree

تحلیل توپولوژیک به معنای مطالعه ساختار هندسی و الگوی اتصالات پروتئین‌ها در شبکه بر اساس تئوری گراف است. هدف از این تحلیل، شناسایی پروتئین‌های کلیدی است که بیشترین تأثیر را در انتقال پیام‌های سلولی، حفظ یکپارچگی ساختار سلول و مدیریت پاسخ به تنش در زنبور عسل ایفا می‌کنند. شبکه تعامل پروتئین-

گردیدند. نمودارهای شبکه‌ای غنی‌سازی نیز بر اساس خروجی STRING تهیه شدند. در این نمودارها، اندازه گره نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با هر اصطلاح یا مسیر و رنگ گره بیانگر مقدار FDR بود؛ به‌طوری‌که شدت رنگ بیشتر نشان‌دهنده مقدار FDR کمتر و در نتیجه معنی‌داری آماری بالاتر بود. نتایج غنی‌سازی در کنار ساختار شبکه، مازول‌های عملکردی و شاخص‌های توپولوژیک تفسیر شدند تا فرایندهای زیستی کلیدی مرتبط با پاسخ به تنش اکسیداتیو و حرارتی، دفاع آنتی‌اکسیدانی، ایمنی ذاتی، تنظیم متابولیسم انرژی و عملکردهای چند اثری ویتلوژنین شناسایی شوند.

۶.۲. استخراج و تحلیل توپولوژیک زیرشبکه متمرکز بر ویتلوژنین (Vg)

زیرشبکه القاشده درجه اول ویتلوژنین، شامل خود پروتئین ویتلوژنین (Vg)، تمامی ۱۱ پروتئینی که مستقیماً با آن تعامل فیزیکی/عملکردی دارند و یال‌های اتصال میان خود این همسایگان است. تحلیل این زیرشبکه به محقق اجازه می‌دهد تا شعاع اثرگذاری مستقیم، ارتباطات اختصاصی و نقش تنظیمی و چندگانه (پلیوتروپیک Vg) را در تقاطع مسیرهای دفاعی و فیزیولوژیک زنبور عسل با وضوح بالا رصد نماید. به‌منظور بررسی جایگاه موضعی و بررسی دقیق برهم کنش‌های مستقیم ویتلوژنین (Vg)، زیرشبکه القا شده درجه اول متمرکز بر این گره از شبکه اصلی استخراج گردید. شبکه اصلی در نرم‌افزار Cytoscape وارد شد و پس از انتخاب گره Vg، همسایگان درجه اول آن با استفاده از مسیر `Select > Nodes > First Neighbors of Selected Nodes > Undirected` شناسایی شدند. سپس زیرشبکه حاوی Vg، تمام همسایگان مستقیم آن و تمامی یال‌های موجود میان گره‌های انتخاب‌شده، از مسیر `File > New Network > From Selected Nodes, All Edges` ایجاد شد. تحلیل ویژگی‌های توپولوژیک این زیرشبکه با استفاده از ابزار `NetworkAnalyzer` و افزونه `CytoNCA` به‌صورت گراف بدون جهت انجام گرفت و شاخص‌های `Betweenness centrality`، `Closeness centrality` و `Average shortest path length` برای همه گره‌ها محاسبه شدند. به‌منظور مصورسازی و تفسیر زیستی، گره‌های موجود در زیرشبکه بر اساس اصطلاحات فرآیند زیستی در هستی‌شناسی ژن، مسیرهای پایگاه KEGG و شواهد عملکردی تاییدشده در متون تجربی، در چهار گروه دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ به تنش حرارتی، ایمنی ذاتی و تنظیم متابولیک-هورمونی طبقه‌بندی و رنگ‌بندی شدند. گره Vg، با وجود قرارگرفتن در گروه تنظیم متابولیک-هورمونی، به‌منظور تأکید بر نقش کانونی

`centrality`، `Betweenness centrality`، `Closeness centrality` و `Eigenvector centrality` محاسبه شدند. در این تحلیل، گره‌هایی با مقدار بالای `Degree` به‌عنوان گره‌های دارای بیشترین تعداد ارتباط مستقیم یا هاب‌های شبکه در نظر گرفته شدند. همچنین، گره‌هایی با مقدار بالای `Betweenness` به‌عنوان گره‌های رابط یا میانجی شناسایی شدند؛ زیرا این گره‌ها می‌توانند در اتصال میان بخش‌های مختلف شبکه و انتقال اطلاعات زیستی نقش مهمی داشته باشند. شاخص `Closeness` برای ارزیابی میزان نزدیکی هر گره به سایر گره‌های شبکه و شاخص `Eigenvector` برای شناسایی گره‌هایی با ارتباط با سایر گره‌های مهم شبکه به‌کار رفت. این شاخص‌ها برای تعیین اجزای مرکزی شبکه و شناسایی پروتئین‌های کلیدی دخیل در پاسخ به تنش، دفاع آنتی‌اکسیدانی، تنظیم انرژی، عملکردهای وابسته به ویتلوژنین و سایر فرایندهای زیستی مرتبط استفاده شدند.

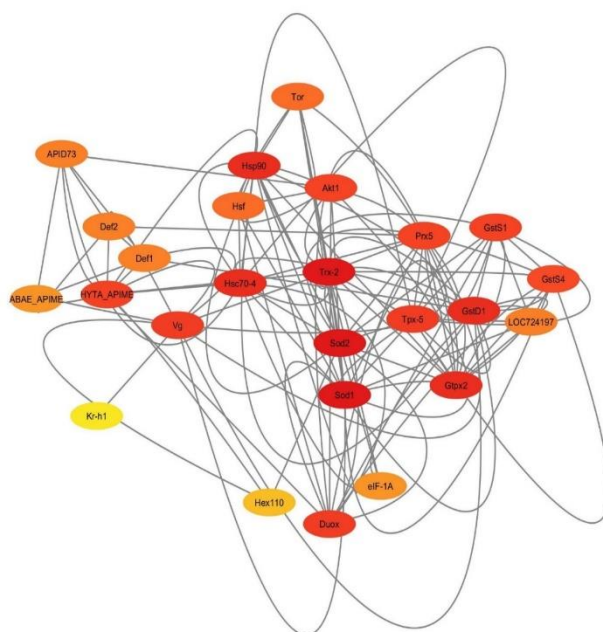
۵.۲. تحلیل غنی‌سازی عملکردی و مسیرهای زیستی

تحلیل غنی‌سازی عملکردی یک روش آماری برای شناسایی فرایندهای زیستی، عملکردهای مولکولی و مسیرهای متابولیکی است که حضور ژن‌های مورد مطالعه در آن‌ها فراتر از حد تصادف آماری است. با این تحلیل، مشخص می‌شود که پروتئین‌های شبکه به‌طور دسته‌جمعی در چه فرایندهای فیزیولوژیکی (نظیر مهار استرس اکسیداتیو، ایمنی ذاتی، یا متابولیسم لیپید) ایفای نقش می‌کنند. به‌منظور تفسیر عملکردی ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب در شبکه تعامل پروتئین-پروتئین، تحلیل غنی‌سازی عملکردی با استفاده از پایگاه داده STRING نسخه ۱۲:۰ برای گونه *Apis mellifera* انجام شد. مجموعه ۲۵ ژن و پروتئین منتخب به‌عنوان ورودی در STRING وارد شد و اصطلاحات غنی‌شده از پایگاه‌های `Gene Ontology` شامل فرایندهای زیستی (Biological Process) و فعالیت‌های مولکولی (Molecular Function)، همچنین مسیرهای زیستی KEGG و Reactome استخراج شدند. در تحلیل غنی‌سازی STRING، معنی‌داری بیش‌نمایی هر اصطلاح یا مسیر با استفاده از آزمون فوق‌هندسی یک‌طرفه ارزیابی شد. برای کنترل خطای ناشی از آزمون‌های متعدد، مقادیر p با روش `Hochberg-Benjamini` اصلاح شدند و مقدار حاصل به‌صورت `False Discovery Rate (FDR)` گزارش گردید. بنابراین، مقادیر FDR مورد استفاده در این مطالعه مستقیماً از خروجی ابزار `Functional Enrichment` در STRING استخراج شدند و اصلاح چندآزمونی مجددی توسط پژوهشگر انجام نشد. اصطلاحات و مسیرهای دارای مقدار $FDR < 0.05$ به‌عنوان نتایج غنی‌شده معنی‌دار در نظر گرفته شدند و بر اساس مقدار FDR رتبه‌بندی و تفسیر

تنش حرارتی، تنظیم ترجمه، ایمنی ذاتی و هموستاز انرژی در قالب یک شبکه واحد سازمان یافته بودند (شکل ۱-). در این شبکه، ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و حفظ تعادل اکسیداسیون و احیا در بخش عمده هسته مرکزی را تشکیل دادند و در کنار آن‌ها، ژن‌های دخیل در پاسخ به شوک حرارتی و برخی گره‌های مرتبط با میتوژنیز و تنظیم هورمونی نیز حضور داشتند. این الگو نشان می‌دهد که پاسخ زنبور عسل به تنش، حاصل فعالیت منفرد یک مسیر نیست، بلکه از هم‌پیوندی چندین سامانه حفاظتی و تنظیمی به وجود می‌آید.

۱.۳. ساختار کلی شبکه تعامل پروتئین-پروتئین

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین حاصل از ژن‌ها و پروتئین‌های کاندید مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل، یک ساختار به‌هم‌پیوسته را نشان داد که در آن گره‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدان، پاسخ به



شکل ۱. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌ها و پروتئین‌های کاندید مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل (*Apis mellifera*). گره‌ها نمایانگر ژن‌ها/پروتئین‌ها و یال‌ها نشان‌دهنده تعاملات عملکردی میان آن‌ها هستند. رنگ گره‌ها بر اساس شاخص درجه اتصال (Degree) تنظیم شده است؛ به‌طوری‌که گره‌های دارای رنگ قرمزتر درجه اتصال بالاتری دارند و گره‌های زردتر نشان‌دهنده درجه اتصال پایین‌تر هستند.

Figure 1. Protein-protein interaction (PPI) network of candidate genes and proteins associated with the stress response in the honey bee (*Apis mellifera*). Nodes represent genes/proteins, whereas edges represent functional interactions between them. Node color is scaled according to degree centrality, with red nodes indicating higher connectivity and yellow nodes indicating lower connectivity.

۲.۳. سازمان‌یابی شبکه در قالب کلاسترهای عملکردی

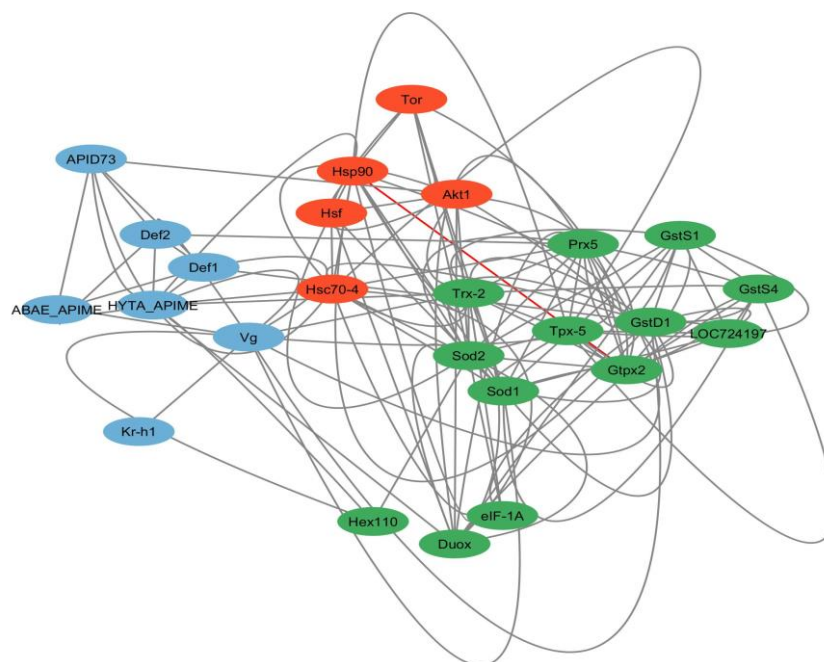
تحلیل کلاستر بندی شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با استفاده از الگوریتم (Molecular Complex Detection) MCODE نشان داد که ژن‌ها و پروتئین‌های مورد بررسی در قالب ۴ خوشه عملکردی متراکم و مجزا با امتیازدهی توپولوژیک بالا سازمان یافته‌اند (شکل ۲).

یکی از خوشه‌های اصلی شامل ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی و حفظ تعادل اکسیداسیون-احیای سلولی بود. در این خوشه، ژن‌هایی مانند Sod1، Sod2، Trx-2، Gtpx2، Tpx-5، Prx5، GsdD1، GsdS1 و GsdS4 قرار گرفتند. تجمع این

ژن‌ها در یک کلاستر نشان می‌دهد که فرایندهای خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، سم‌زدایی سلولی و کاهش آسیب اکسیداتیو، بخش مهمی از پاسخ مولکولی زنبور عسل به تنش را تشکیل می‌دهند. کلاستر دیگری از شبکه شامل ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش حرارتی و حفظ پایداری پروتئین‌ها، از جمله Hsp90، Hsc70-4 و Hsf بود. حضور این ژن‌ها در یک خوشه جداگانه نشان می‌دهد که سامانه چارپرونی و تنظیم پاسخ شوک حرارتی، یکی از زیرسامانه‌های مشخص شبکه را تشکیل می‌دهد. این خوشه در ارتباط با بخش دفاع آنتی‌اکسیدانی شبکه قرار داشت که بیانگر هم‌زمانی حفاظت از ساختار پروتئین‌ها و مقابله با

و Hex110 در بخش‌های تنظیمی شبکه دیده شدند. این گره‌ها با فرایندهای مرتبط با متابولیسم انرژی، تنظیم هورمونی، سنتز پروتئین و عملکردهای فیزیولوژیک ویتلوژنین ارتباط دارند. در مجموع، کلاستر بندی شبکه نشان داد که پاسخ به تنش در زنبور عسل از چند بخش عملکردی شامل دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ به شوک حرارتی، ایمنی ذاتی و تنظیم متابولیک-هورمونی تشکیل شده است.

آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو است. بخش دیگری از شبکه به ژن‌های مرتبط با ایمنی ذاتی و پپتیدهای ضد میکروبی اختصاص داشت. ژن‌های Def1، Def2، ABAE-APIME، APID73 و HYTA-APIME در این بخش قرار گرفتند. سازمان‌یافتگی این ژن‌ها در یک خوشه مشخص نشان می‌دهد که پاسخ ایمنی ذاتی نیز در کنار پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و حرارتی، یکی از اجزای شبکه پاسخ به تنش در زنبور عسل است. علاوه بر این، گره‌هایی مانند Tor، Vg، Kr-h1، eIF-1A، Akt1



شکل ۲. کلاستر بندی عملکردی شبکه تعامل پروتئین-پروتئین ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل (*Apis mellifera*). رنگ‌های متفاوت، کلاسترهای شناسایی شده در شبکه را نشان می‌دهند.

Figure 2. Functional clustering of the protein-protein interaction (PPI) network of genes involved in the stress response of the honey bee (*Apis mellifera*). Distinct colors represent the different clusters identified within the network.

۳.۳. تحلیل توپولوژیک شبکه

این نتایج نشان‌دهنده نفوذ ساختاری و پیوند ترجیحی این ژن‌ها با سایر گره‌های با رتبه مرکزی بالا در شبکه است، نشان می‌دهد. همچنین، Sod1 و Trx-2 با مقدار Closeness و centrality برابر با ۰,۷۵۰۰، دارای کمترین میانگین فاصله ژئودزیک (Shortest Geodesic Distance) تا تمام گره‌های شبکه هستند؛ امری که نشان‌دهنده موقعیت استراتژیک آن‌ها در انتشار سریع و کم‌واسطه پاسخ‌های سیگنالینگ و انتقال پیام‌های تنش در سراسر ساختار شبکه است. مقدار Closeness برای Sod2 نیز نسبتاً بالا و برابر با ۰,۷۰۵۹ بود. از نظر Betweenness centrality، ژن Vg با مقدار ۸۰,۴۹۳۱ بالاترین رتبه را به دست

نتایج تحلیل توپولوژیک شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با استفاده از افزونه CytoNCA نشان داد که ژن‌های Trx-2، Sod1 و Sod2 برجسته‌ترین گره‌های شبکه از نظر شاخص‌های مختلف مرکزیت بودند (جدول ۲). هر سه ژن دارای بالاترین مقدار Degree centrality برابر با ۱۶ بودند، بنابراین، به‌عنوان هاب‌های اصلی شبکه با بیشترین تعداد تعامل مستقیم شناسایی شدند. پس از آن‌ها، Gtpx2، Gstd1، Hsc70-4 و هر کدام با Degree برابر با ۱۳ در جایگاه بعدی قرار گرفتند. بیشترین مقدار Eigenvector centrality به‌ترتیب در Sod1 (۰,۳۱۸۶)، Trx-2 (۰,۳۱۶۰) و Sod2 (۰,۳۰۹۵) مشاهده شد.

آنتی‌اکسیدانی، پاسخ به تنش و تنظیمات فیزیولوژیک وابسته به ویتلوژنین است. در مجموع، Sod1 و Trx-2 و Sod2 به‌عنوان هاب‌های اصلی و گره‌های مرکزی چندمعیاره شبکه شناسایی شدند، درحالی‌که Vg مهم‌ترین گره واسط شبکه بر اساس شاخص Betweenness centrality بود.

آورد و به‌عنوان مهم‌ترین گره میانجی شبکه شناسایی شد. پس از Vg، ژن‌های GstD1 (۴۲,۶۵۰)، Sod2 (۴۲,۵۸۴۳) و HYTA-APIME (۳۸,۰۳۹۲)، Trx-2 (۳۷,۱۶۵۰) و Sod1 (۳۴,۰۲۴۸) بیشترین مقادیر Betweenness را نشان دادند. این یافته بیانگر نقش احتمالی Vg در برقراری ارتباط میان زیرشبکه‌ها یا گروه‌های عملکردی متفاوت، از جمله فرایندهای دفاع

جدول ۲. شاخص‌های مرکزیت گره‌های شبکه تعامل پروتئین-پروتئین، محاسبه‌شده با افزونه CytoNCA در Cytoscape

Table 1. Centrality measures of the protein-protein interaction (PPI) network nodes, calculated using the CytoNCA plugin in Cytoscape.

مرکزیت بردار ویژه Eigenvector centrality	مرکزیت نزدیکی Closeness centrality	مرکزیت بینابینی Betweenness centrality	مرکزیت درجه Degree centrality	ژن/پروتئین Gene/Protein
0.3186	0.7500	38.0392	16	Sod1
0.3160	0.7500	37.1650	16	Trx-2
0.3095	0.7059	42.5843	16	Sod2
0.2730	0.6486	12.8464	13	Gtpx2
0.2578	0.6857	26.3248	13	Hsp90
0.2549	0.6857	42.6500	13	GstD1
0.2513	0.6667	28.7774	13	Hsc70-4
0.2444	0.6154	6.2534	11	Tpx-5
0.2309	0.6316	12.8870	11	Duox
0.2217	0.5854	3.6277	10	GstS1
0.2112	0.6316	23.0611	10	Prx5
0.2080	0.6154	14.4435	10	Akt1
0.2045	0.5581	2.1524	9	GstS4
0.1631	0.5333	0.6190	7	Tor
0.1544	0.5333	0.9167	7	Hsf
0.1532	0.6486	80.4931	11	Vg
0.1346	0.5000	0.0000	6	LOC724197
0.1329	0.6154	34.0248	10	HYTA_APIME
0.1234	0.5217	0.0000	5	eIF-1A
0.0674	0.5217	11.8093	6	APID73
0.0633	0.5455	7.7195	6	Def1
0.0597	0.5106	5.2720	6	Def2
0.0530	0.5217	1.3333	3	Hex110
0.0425	0.4615	1.0000	5	ABAE_APIME
0.0136	0.4000	0.0000	1	Kr-h1

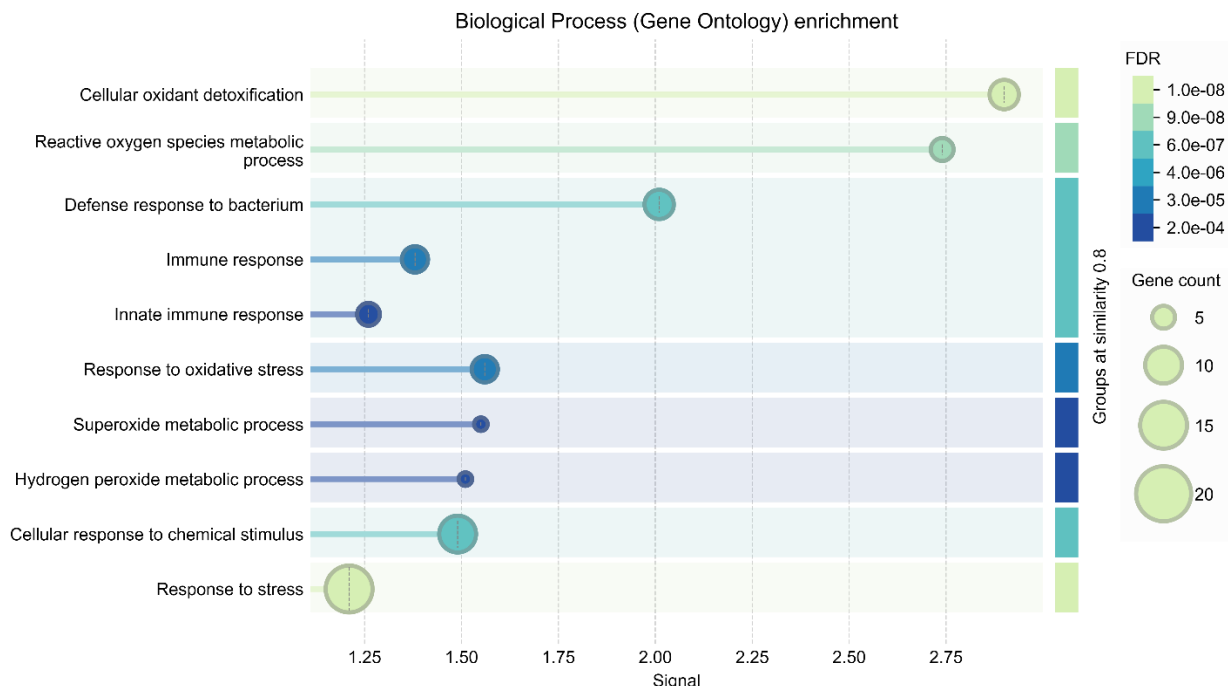
شاخص‌های مرکزیت با استفاده از افزونه CytoNCA در نرم‌افزار Cytoscape محاسبه شدند. Degree، نشان‌دهنده تعداد ارتباطات مستقیم هر گره، Betweenness بیانگر نقش میانجی گره در ارتباط میان سایر گره‌ها، Closeness نشان‌دهنده نزدیکی گره به سایر اجزای شبکه و Eigenvector بیانگر ارتباط گره با گره‌های مهم شبکه است.

۴.۳. تحلیل غنی‌سازی عملکردی و مسیرهای زیستی

نتایج تحلیل غنی‌سازی عملکردی در STRING نشان داد که مجموعه ژن‌های منتخب به‌طور عمده در فرایندهای زیستی مرتبط با پاسخ به تنش، تنظیم تعادل اکسیداسیون-احیا، دفاع آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم انرژی و ایمنی ذاتی مشارکت دارند. شبکه غنی‌سازی فرایندهای زیستی GO نشان داد که اصطلاحات مرتبط با پاسخ سلولی به تنش، پاسخ به تنش اکسیداتیو، تنظیم فرایندهای متابولیک و دفاع در برابر آسیب سلولی در میان گروه‌های عملکردی برجسته قرار داشتند (شکل ۳). اندازه گره‌ها در این نمودار بیانگر تعداد ژن‌های مرتبط با هر فرایند و رنگ گره‌ها نشان‌دهنده سطح معنی‌داری بر اساس مقدار FDR است.

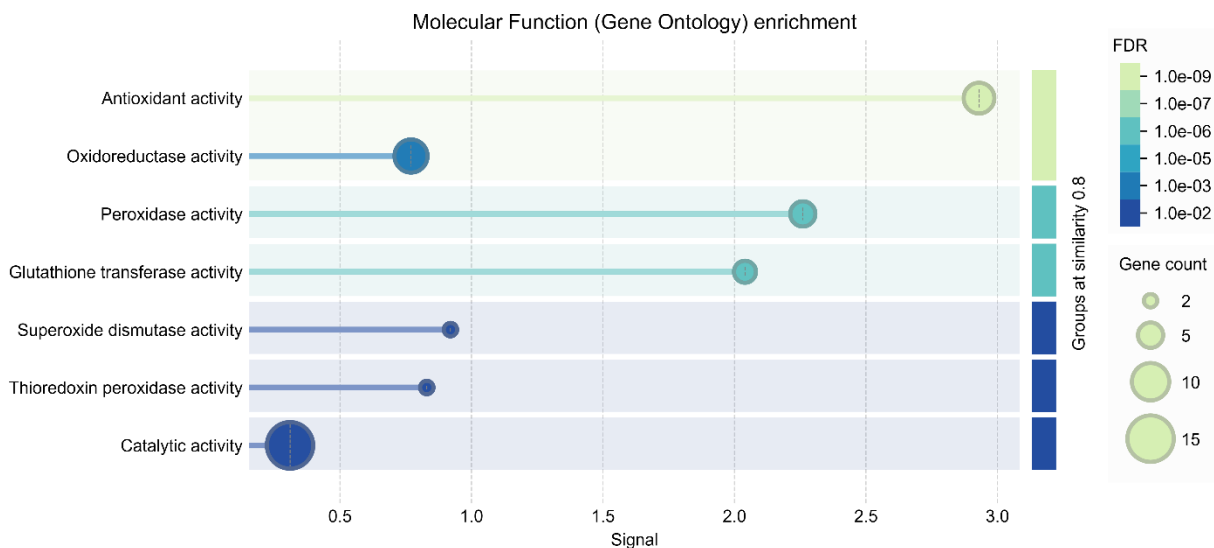
تحلیل غنی‌سازی کارکردهای مولکولی GO نیز غلبه فعالیت‌های مرتبط با اتصال مولکولی، فعالیت‌های آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی، عملکرد چارپرونی و عملکردهای مرتبط با تنظیم پروتئین را نشان داد (شکل ۴).

این نتایج با حضور ژن‌های Sod1، Sod2، Trx-2، Gtpx2، Hsp90 و Hsc70-4 در شبکه PPI هم‌خوانی داشته و با نقش احتمالی هماهنگ سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و چارپرونی‌های مولکولی (حفظ پایداری پروتئین‌ها) در تعدیل پاسخ به تنش سازگار است.



شکل ۳. شبکه غنی‌سازی فرایندهای زیستی Gene Ontology برای مجموعه ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل. اندازه گره‌ها نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با هر فرایند بیولوژیکی و رنگ گره‌ها بیانگر مقدار FDR است.

Figure 3. Gene Ontology biological process (BP) enrichment network for the selected genes and proteins associated with the stress response in the honey bee. Node size represents the number of genes associated with each term, and node color indicates the adjusted P-value (FDR).

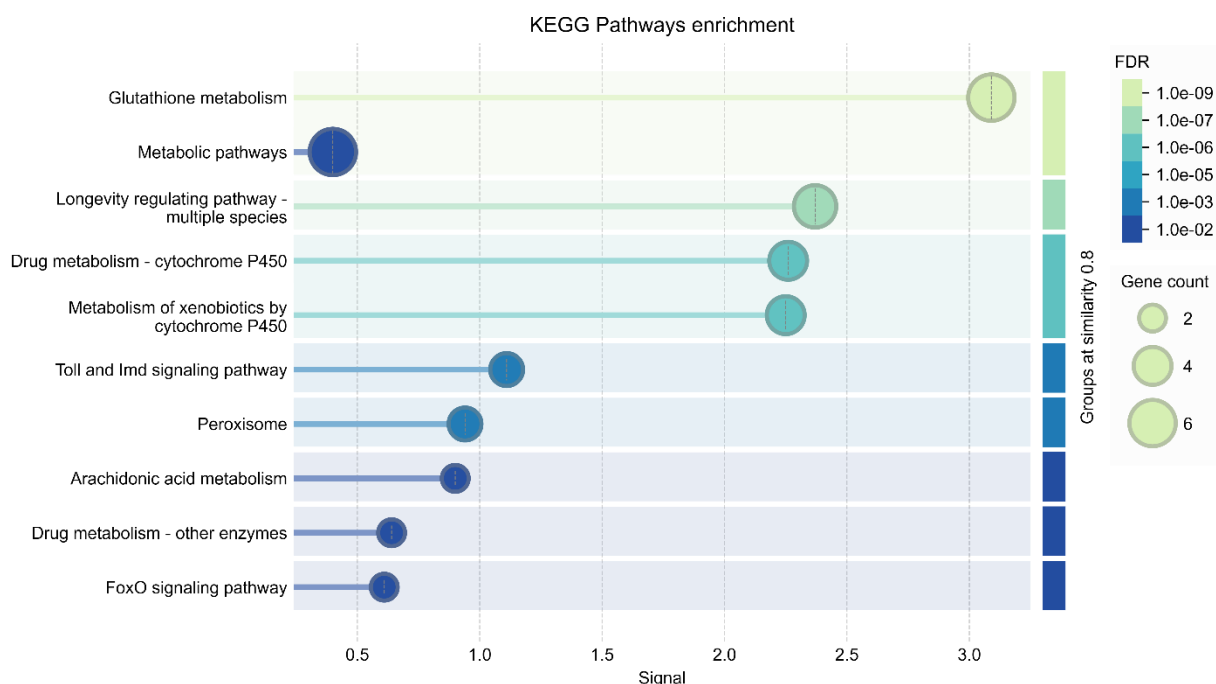


شکل ۴. شبکه غنی‌سازی کارکردهای مولکولی Gene Ontology برای مجموعه ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل. اندازه گره‌ها نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با هر کارکرد مولکولی و رنگ گره‌ها بیانگر مقدار FDR است.

Figure 4. Gene Ontology molecular function (MF) enrichment network for the selected genes and proteins associated with the stress response in the honey bee. Node size represents the number of genes associated with each molecular function, and node color indicates the adjusted P-value (FDR).

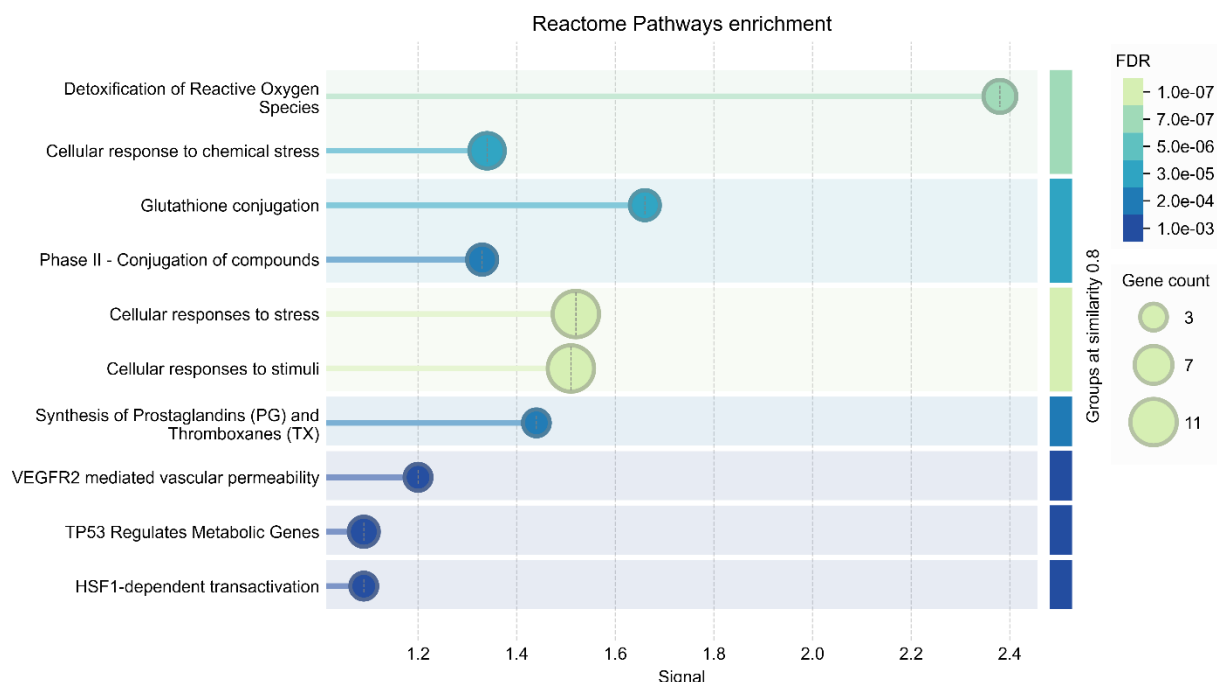
۲۰۱۳؛ Salmela و Sundström، ۲۰۱۸)، بیانگر یکپارچگی عملکردی میان دفاع اکسیداتیو، حفظ هموستاز پروتئینی و ایمنی ذاتی در مواجهه زنبور عسل با عوامل تنش‌زا است؛ به‌طوری‌که مهار رادیکال‌های آزاد و پایداری چپرونی ساختار پروتئین‌ها، پیش‌نیاز اساسی برای تداوم پاسخ‌های ایمنی پتیدی در شرایط تنش سلولی به شمار می‌رود. در مجموع، نتایج غنی‌سازی عملکردی و مسیرهای زیستی نشان داد که پاسخ به تنش در زنبور عسل بر تعامل چهار محور اصلی دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ به شوک حرارتی، تنظیم متابولیک-هورمونی و ایمنی ذاتی استوار است. قرارگیری *Vg* در ارتباط با چندین محور عملکردی، با نقش چند اثری این پروتئین در پیوند دادن وضعیت انرژی، دفاع سلولی و تنظیمات فیزیولوژیک سازگار است.

مسیرهای غنی‌شده در پایگاه KEGG عمدتاً با سازوکارهای پاسخ به تنش، تنظیم متابولیسم و مسیرهای مرتبط با بقا و هموستاز سلولی ارتباط داشتند (شکل ۵). حضور ژن‌های *eIF*، *Tor*، *Akt1* و *Vg* در این مسیرها، ارتباط میان تنظیم انرژی، سنتز پروتئین و پاسخ فیزیولوژیک به تنش را نشان می‌دهد. همچنین، تحلیل مسیرهای Reactome نشان داد که مسیرهای مرتبط با پاسخ به تنش، فرایندهای دفاعی سلول، تنظیم پروتئین و ایمنی ذاتی در مجموعه ژن‌های منتخب برجسته هستند (شکل ۶). حضور هم‌زمان و پیوستگی ساختاری ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، پروتئین‌های شوک حرارتی و پپتیدهای ضد میکروبی در توپولوژی شبکه و غنی‌سازی عملکردی، در توافق با مطالعات پیشین (Seehuus و همکاران، ۲۰۰۶؛ Havukainen و همکاران،



شکل ۵. شبکه غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای مجموعه ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل. اندازه گره‌ها تعداد ژن‌های مرتبط با هر مسیر و رنگ گره‌ها بیانگر مقدار FDR است.

Figure 5. KEGG pathway enrichment network for the selected genes and proteins associated with the stress response in the honey bee. Node size represents the number of genes associated with each pathway, and node color indicates the adjusted P-value (FDR).



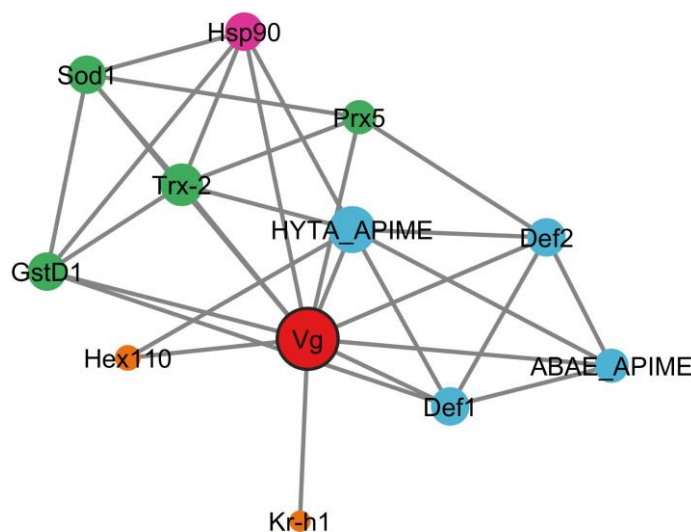
شکل ۶. شبکه غنی‌سازی مسیرهای Reactome برای مجموعه ژن‌ها و پروتئین‌های منتخب مرتبط با پاسخ به تنش در زنبور عسل. اندازه گره‌ها نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با هر مسیر و رنگ گره‌ها بیانگر مقدار FDR است.

Figure 6. Reactome pathway enrichment network for the selected genes and proteins associated with the stress response in the honey bee. Node size represents the number of genes associated with each pathway, and node color indicates the adjusted P-value (FDR).

Betweenness centrality برابر با 0.0909، در جایگاه دوم قرار گرفت و از نظر ساختاری به‌عنوان گره واسطه ثانویه در تسهیل جریان اطلاعات شبکه شناسایی شد. همچنین Trx-2 با Degree برابر با ۶ و Betweenness centrality برابر با 0.0288 از گره‌های نسبتاً مرکزی زیرشبکه بود. در مقابل، Kr-h1 با Degree برابر با ۱ و Betweenness centrality صفر، در حاشیه شبکه قرار داشت و Hex110 نیز با Degree برابر با ۲، ارتباطات محدودتری نشان داد (جدول ۲). همسایگان مستقیم Vg شامل پروتئین‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی (Sod1، Trx-2، Prx5 و GstD1)، پاسخ به استرس (Hsp90)، ایمنی ذاتی (Def1، Def2، ABAE-APIME و HYTA-APIME) و تنظیم متابولیک-هورمونی (Hex110 و Kr-h1) بودند (شکل ۷). حضور هم‌زمان این گروه‌های عملکردی در زیرشبکه Vg، همراه با شاخص‌های بالای مرکزیت آن، از نقش بالقوه ویتلوژنین به‌عنوان یک مولکول پلیوتروپیک و یکپارچه‌کننده میان پاسخ‌های اکسیداتیو، ایمنی، تنشی و متابولیکی حمایت می‌کند.

۵.۳. تحلیل توپولوژیک و سازمان عملکردی زیرشبکه متمرکز بر ویتلوژنین (Vg)

زیرشبکه متمرکز بر Vg شامل ۱۲ گره، مشتمل بر Vg و ۱۱ همسایه درجه اول آن بود و ساختاری به‌شدت متمرکز را نشان داد. گره Vg با Degree برابر با ۱۱، با همه گره‌های دیگر زیرشبکه ارتباط داشت و بالاترین مقدار Betweenness centrality (0.4288) و Closeness centrality (1.0000) را به خود اختصاص داد. افزون بر این، Vg دارای کمترین Average shortest path length (1.0000) بود که جایگاه مرکزی آن را در ساختار زیرشبکه تأیید می‌کند (جدول ۳). در مجموع، این شاخص‌های مرکزی نشان می‌دهند از دیدگاه توپولوژیک، Vg مهم‌ترین هاب و گره واسطه در زیرشبکه مورد بررسی است و می‌تواند به‌طور بالقوه در برقراری ارتباط ساختاری میان ماژول‌ها و اجزای عملکردی مختلف نقش میانجی ایفا کند. پس از Vg، گره HYT-APIME با Degree برابر با ۷ و



شکل ۷. زیر شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین متمرکز بر ویتلوژنین (Vg) در زنبور عسل (*Apis mellifera*). زیر شبکه شامل Vg و ۱۱ همسایه درجه اول آن است که از شبکه اصلی PPI استخراج شدند. رنگ گره‌ها نشان‌دهنده طبقه عملکردی آن‌ها است: سبز، دفاع آنتی‌اکسیدانی؛ بنفش، پاسخ به تنش حرارتی؛ آبی، ایمنی ذاتی؛ و نارنجی، تنظیم متابولیک-هورمونی. گره کانونی Vg به منظور تمایز بصری با رنگ قرمز و حاشیه مشکی نمایش داده شده است. اندازه گره‌ها متناسب با مقدار Degree تنظیم شده است؛ بنابراین، گره‌های بزرگ‌تر دارای تعداد تعاملات بیشتری در زیر شبکه هستند. این زیر شبکه، جایگاه مرکزی Vg و ارتباط مستقیم آن با اجزای مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی، پاسخ تنشی، ایمنی ذاتی و تنظیم متابولیک-هورمونی را نشان می‌دهد.

Figure 7. Vitellogenin (Vg)-centered protein-protein interaction (PPI) subnetwork in the honey bee (*Apis mellifera*). The subnetwork comprises Vg and its 11 first-degree neighbors extracted from the main PPI network. Node colors represent functional categories: green, antioxidant defense; purple, heat-stress response; blue, innate immunity; and orange, metabolic-hormonal regulation. The focal Vg node is shown in red with a black border for visual distinction. Node size is proportional to degree centrality; therefore, larger nodes have a greater number of interactions within the subnetwork. This subnetwork highlights the central position of Vg and its direct associations with components involved in antioxidant defense, heat-stress response, innate immunity, and metabolic-hormonal regulation.

جدول ۳. مشخصات شبکه‌ای و گروه‌بندی عملکردی همسایگان مستقیم ویتلوژنین در زیر شبکه PPI.

Table 2. Topological features and functional categorization of the first-degree neighbors of vitellogenin (Vg) in the PPI subnetwork.

تفسیر شبکه‌ای در زیر شبکه Network interpretation in the subnetwork	مرکزیت بینابینی Betweenness centrality	مرکزیت درجه Degree centrality	گروه عملکردی Functional group	ژن/پروتئین Gene/Protein
هاب اصلی و گره مرکزی زیر شبکه	0.4288	11	تنظیم متابولیک-هورمونی	Vg
گره واسطه ثانویه و رابط ایمنی	0.0909	7	ایمنی ذاتی	HYTA_APIME
رابط کلیدی پاسخ‌های اکسیداتیو	0.0288	6	دفاع آنتی‌اکسیدانی	Trx-2
گره فعال در پاسخ‌های ایمنی	0.0242	5	ایمنی ذاتی	Def2
گره فعال در پاسخ‌های ایمنی	0.0227	5	ایمنی ذاتی	Def1
درگیر در سم‌زدایی و استرس	0.0212	5	دفاع آنتی‌اکسیدانی	Gstd1
آنزیم کلیدی مقابله با ROS	0.0121	5	دفاع آنتی‌اکسیدانی	Sod1
چاپرون اصلی پاسخ به استرس	0.0106	5	پاسخ حرارتی	Hsp90
آنزیم دفاعی در برابر تنش	0.0152	4	دفاع آنتی‌اکسیدانی	Prx5
گره همکار در مازول ایمنی	0.0000	4	ایمنی ذاتی	ABAE_APIME
گره متصل به Vg در سطح متابولیک	0.0000	2	تنظیم متابولیک	Hex110
گره پیرامونی در تنظیم رشد	0.0000	1	تنظیم هورمونی	Kr-h1

پژوهش حاضر با هدف تبیین نقش پلیوتروپیک ویتلوژنین (Vg) در شبکه پاسخ به تنش‌های محیطی زنبور عسل از طریق تحلیل برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین (PPI) انجام شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که پاسخ زنبور عسل به تنش نه محصول فعالیت یک مسیر منفرد، بلکه برآیند هم‌پیوندی چند سامانه حفاظتی در قالب یک شبکه یکپارچه است. ساختار مدولار شبکه، با تجمع ژن‌های هم‌عملکرد در خوشه‌های مجزا اما مرتبط، با اصول عمومی زیست‌شناسی شبکه سازگار است، در شبکه‌های زیستی واقعی، توزیع درجه اتصال از الگوی بدون مقیاس پیروی می‌کند و تعداد اندکی از گره‌ها بخش عمده اتصالات را بر عهده دارند (Barabási و Oltvai، ۲۰۰۴). این سازمان‌یابی خوشه‌ای از ویژگی‌های شناخته‌شده شبکه‌های تعامل پروتئینی است که در آن فرایندهای زیستی مرتبط در ماژول‌های عملکردی مجزا اما به هم پیوسته تجمع می‌یابند (Hartwell و همکاران، ۱۹۹۹). شناسایی Sod1، Trx-2 و Sod2 به عنوان هاب‌های چندمعیاره شبکه (بالاترین Degree برابر با ۱۶) با نقش محوری تنش اکسیداتیو در پاسخ حشرات به عوامل تنش‌زا هم‌خوانی دارد. تنش‌های محیطی گوناگون از جمله تنش گرمایی، آفت‌کش‌ها و عوامل بیماری‌زا از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به مسیر مشترک آسیب اکسیداتیو منتهی می‌شوند؛ از این رو آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و سامانه تیوردوکسین/پراکسی‌ردوکسین در خط مقدم دفاع سلولی قرار می‌گیرند (Kodrík و همکاران، ۲۰۱۵). در تحلیل فیلوژنتیک ژن‌های سامانه آنتی‌اکسیدانی زنبور عسل نشان دادند که این ژنوم مجموعه کاملی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را داراست که در حفظ هموستاز اکسیداسیون-احیا نقش کلیدی دارند (Corona و Robinson، ۲۰۰۶). مقادیر بالای Closeness centrality در Sod1 و Trx-2 برابر با (0.7500) نشان می‌دهد که این گره‌ها از نظر توپولوژیک به سایر اجزای شبکه نزدیک‌اند و می‌توانند سیگنال‌های تنش را به سرعت در سراسر شبکه منتشر کنند. این یافته با شواهد تجربی مبنی بر ضروری بودن هاب‌ها در شبکه‌های زیستی سازگار است، حذف یا اختلال در گره‌های پرتعامل معمولاً پیامدهای فنوتیپی گسترده‌تری نسبت به گره‌های حاشیه‌ای دارد (Jeong و همکاران، ۲۰۰۱). قرارگیری خوشه پروتئین‌های شوک حرارتی Hsp90، Hsc70-4 و Hsf در مجاورت خوشه آنتی‌اکسیدانی، هم‌زمانی دو راهبرد بنیادین سلولی را در پاسخ به تنش نشان می‌دهد: مقابله با آسیب اکسیداتیو و حفظ پایداری ساختاری پروتئین‌ها. پروتئین‌های شوک حرارتی به عنوان

چاپرون‌های مولکولی از تاخوردگی نادرست و تجمع پروتئین‌های آسیب‌دیده جلوگیری می‌کنند و نقش آن‌ها در تحمل تنش گرمایی به خوبی مستند شده است (Richter و همکاران، ۲۰۱۰). در زنبور عسل، القای بیان ژن‌های Hsp70 در پاسخ به تنش گرمایی و در ارتباط با تحمل حرارتی وابسته به رفتار نشان داده شده است. (Elekonich، ۲۰۰۹) ارتباط توپولوژیک این دو خوشه در شبکه حاضر با این ایده هم‌سو است که آسیب اکسیداتیو و بی‌ثباتی پروتئینی دو پیامد به هم پیوسته از یک وضعیت تنشی مشترک هستند و سلول برای بقا هر دو را به طور هماهنگ مدیریت می‌کند. حضور خوشه مجزای ژن‌های ایمنی ذاتی Def1، Def2، ABAE-APIME و HYTA-APIME در کنار ماژول‌های آنتی‌اکسیدانی و حرارتی نشان‌دهنده آن است که پاسخ ایمنی جزئی تفکیک‌ناپذیر از پاسخ کلی به تنش است. زنبور عسل در مقایسه با سایر حشرات مجموعه نسبتاً محدودی از ژن‌های ایمنی متعارف دارد، اما پپتیدهای ضد میکروبی مانند دیفنسین‌ها، آبائسین و هایمونوتائسین به عنوان بازوی مؤثر ایمنی ذاتی آن شناخته شده‌اند (Evans و همکاران، ۲۰۰۶؛ Danihlík و همکاران، ۲۰۱۵). تجمع این ژن‌ها در یک ماژول مشخص و ارتباط آن‌ها با محور Vg با مفهوم تلفیق تنش-ایمنی در حشرات اجتماعی هماهنگ است. یکی از برجسته‌ترین یافته‌های این پژوهش، شناسایی Vg به عنوان مهم‌ترین گره واسط شبکه بر پایه Betweenness centrality است که مقدار خام این شاخص برای Vg برابر با 80.4931 شد، در حالی که این ژن از نظر Degree centrality جزو هاب‌های اصلی محسوب نمی‌شود. این الگوی تفکیک میان بالا بودن Betweenness و پایین تر بودن Degree، مشخصه گره‌های موسوم به گلوگاه (bottleneck) است. Yu و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گلوگاه‌ها ارتباط قوی‌تری با ضروری بودن ژن دارند و اغلب نقش نقاط اتصال میان ماژول‌های عملکردی مختلف را ایفا می‌کنند. بنابراین جایگاه توپولوژیک Vg حاکی از آن است که این پروتئین به عنوان یک هماهنگ‌کننده میان‌ماژولی عمل می‌کند و مسیرهای دفاع آنتی‌اکسیدانی، ایمنی ذاتی، پاسخ حرارتی و تنظیم متابولیک-هورمونی را به هم پیوند می‌دهد. این یافته توپولوژیک با نقش زیستی پلیوتروپیکی s شناخته‌شده ویتلوژنین در زنبور عسل به خوبی هم‌خوانی دارد. Seehuus و همکاران (۲۰۰۶) به طور تجربی نشان دادند که ویتلوژنین از کارگران زنبور عسل در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند و کاهش بیان آن با افزایش آسیب‌پذیری در برابر ROS همراه است، این یافته پیوند مستقیم

(centrality)، نقش یک گره گلوگاهی و واسطه کلیدی را ایفا کرده و از منظر ساختاری، ماژول‌های آنتی‌اکسیدانی، چاپرونی، ایمنی و تنظیمی را به یکدیگر متصل می‌سازد که این امر می‌تواند به‌طور بالقوه مؤید جایگاه پلیوتروپیک آن در هماهنگی پاسخ به تنش باشد. همچنین، الگوهای به‌دست‌آمده از غنی‌سازی عملکردی نشان داد که سازوکارهای مرتبط با دفاع اکسیداتیو، پاسخ به استرس پروتئینی و تنظیم متابولیسم، اجزای برجسته این شبکه را تشکیل می‌دهند. به‌طور کلی، این تحلیل بیوانفورماتیکی بر پایه تعاملات پیش‌بینی‌شده در پایگاه داده STRING، شواهدی ساختاری فراهم می‌آورد که بر اهمیت *Vg* و ژن‌های هاب آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان کاندیداهای کلیدی برای مطالعات عملکردی آینده تأکید دارد. با این حال، با توجه به ماهیت پیش‌بینی‌محور تحلیل PPI، تفسیر این تعاملات مستلزم احتیاط بوده و اعتبارسنجی تجربی در سطح *in vivo* برای تأیید نهایی نقش عملکردی این گره‌ها ضروری است. از منظر کاربردی، یافته‌های حاضر می‌تواند مبنایی ساختاری برای شناسایی نشانگرهای مولکولی کاندید و توسعه راهبردهای به‌نژادی با هدف ارتقای تاب‌آوری کلنی‌های زنبور عسل در مواجهه با تنش‌های اقلیمی فراهم سازد.

سپاسگزاری

نویسندگان از داوران ناشناس به‌دلیل ارائه دیدگاه‌های ارزشمند و پیشنهاد‌های سازنده در فرایند داوری این مقاله سپاسگزاری می‌کنند.

تضاد منافع نویسندگان

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص نگارش و انتشار مطالب و نتایج این پژوهش ندارند.

دسترسی به داده‌ها

همه اطلاعات و نتایج در متن مقاله ارائه شده است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان به‌طور مشترک در مفهوم‌سازی، انجام تحلیل‌های نرم‌افزاری/آماري، نگارش نسخه اولیه و نهایی مقاله مشارکت داشتند.

Reference

Akinlaja, M., Stacey, G., & Foster, L. (2021). Characterizing the Honey Bee Interactome using Mass Spectrometry-Based Proteomics. *The FASEB Journal*, 35. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.02194>

میان *Vg* و همسایگان آنتی‌اکسیدانی آن *Sod1*، *Trx-2*، *Prx5* و *GstD1* در زیرشبکه حاضر را از منظر عملکردی توجیه می‌کند. افزون بر این، *Amdam* و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که ویتلوژنین عملکرد ایمنی و طول عمر را در زنبور عسل تنظیم می‌کند، که با ارتباط مستقیم *Vg* با ماژول ایمنی ذاتی در زیرشبکه سازگار است. همچنین ویتلوژنین در قالب شبکه تنظیمی دوگانه با هورمون نوجوانی و مسیر انسولین *TOR* در کنترل تقسیم کار، طول عمر و انتقال میان فازهای فیزیولوژیک نقش محوری دارد (*Amdam* و *Omholt*، ۲۰۰۳؛ *Corona* و همکاران، ۲۰۰۷).

تحلیل اختصاصی زیرشبکه متمرکز بر *Vg* این تفسیر به روشنی تأیید می‌کند، گره *Vg* با Degree برابر با 11 و centrality Closeness برابر با 1.0000، به‌طور مستقیم با همه اجزای هر چهار گروه عملکردی در ارتباط بود. این معماری شعاعی که در آن یک گره مرکزی به‌صورت مستقیم با نمایندگان ماژول‌های متفاوت پیوند دارد، دقیقاً همان الگویی است که برای یک مولکول یکپارچه‌کننده انتظار می‌رود. نتایج غنی‌سازی عملکردی در پایگاه‌های *GO*، *KEGG* و *Reactome*، نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل توپولوژیک را از منظر مستقل تأیید کرد. برجسته‌بودن اصطلاحات مرتبط با پاسخ سلولی به تنش، پاسخ به تنش اکسیداتیو و تنظیم فرایندهای متابولیک در فرایندهای زیستی *GO*، و غلبه فعالیت‌های آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی و عملکرد چاپرونی در فعالیت‌های مولکولی، با ترکیب ژنی هسته مرکزی شبکه هم‌خوانی کامل دارد. حضور *Tor*، *Akt1*، *eIF-1A* و *Vg* در مسیرهای *KEGG* مرتبط با تنظیم متابولیسم و بقای سلولی نیز پیوند میان تنظیم انرژی، سنتز پروتئین و پاسخ فیزیولوژیک به تنش را که مسیر انسولین *TOR* واسطه آن است بازتاب می‌دهد. *Corona* و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای این هم‌گرایی میان دو رویکرد مستقل تحلیل مرکزیت شبکه و غنی‌سازی عملکردی اعتبار درونی یافته‌ها را گزارش کرده است.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پاسخ زنبور عسل به تنش‌های گرمایی و اکسیداتیو در قالب یک شبکه تعاملی منسجم و چندماژولی سازمان یافته است؛ به‌گونه‌ای که ژن‌های *Sod1*، *Sod2* و *Trx-2* بر پایه شاخص‌های مرکزیت، به‌عنوان هاب‌های ساختاری اصلی شناسایی شده و از دیدگاه توپولوژیک در موقعیت مرکزی شبکه دفاع آنتی‌اکسیدانی قرار دارند. در مقابل، *Vg* با برخورداری از بالاترین شاخص بینابینی (Betweenness)

- consequences at the individual level in honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 7, 3760. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03944-x>.
- Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., & Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128–7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123–136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretschmar, A., & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, 8(8), e72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Elekonich, M. M. (2009). Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. *Cell Stress and Chaperones*, 14(5), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0106-x>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645–656.
- Alqarni, A. S., Ali, H., Iqbal, J., Owayss, A. A., & Smith, B. H. (2019). Expression of heat shock proteins in adult honey bee (*Apis mellifera* L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1372–1376. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.017>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 451–464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. L., & Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39(5), 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.02.010>
- Bader, G. D., & Hogue, C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>
- Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. D. J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, 49(5), 562–572. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0583-1>
- Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrg1272>
- Bordier, C., Dechatre, H., Suchail, S., Peruzzi, M., Soubeyrand, S., Kremer, N., and Alaux, C. (2017). Colony adaptive response to simulated heat waves and

- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects: an update. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 25788-25816. <https://doi.org/10.3390/ijms161025788>
- Margotta, J. W., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 221(14), jeb183228. <https://doi.org/10.1242/jeb.183228>
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E., & Amdam, G. V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS biology*, 5(3), e62. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., et al. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253-266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- Salmela, H., & Sundström, L. (2017). Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. *Inflammation and Cell Signaling*, 4, e1506. <https://doi.org/10.14800/ics.1506>
- Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187-197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- González-Tokman, D., Villada-Bedoya, S., Hernández, A., & Montoya, B. (2025). Antioxidants, oxidative stress and reactive oxygen species in insects exposed to heat. *Current Research in Insect Science*, 7, 100114. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2025.100114>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402(Suppl), C47-C52. <https://doi.org/10.1038/35011540>
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., & Amdam, G. V. (2013). Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28369-28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>
- Hay, N. (2011). Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1965-1970. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.013>
- Jeong, H., Mason, S. P., Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2001). Lethality and centrality in protein networks. *Nature*, 411(6833), 41-42. <https://doi.org/10.1038/35075138>

- sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 962–967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Tang, Y., Li, M., Wang, J., Pan, Y., & Wu, F. X. (2015). CytoNCA: a Cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks. *Biosystems*, 127, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2014.11.005>
- Wang, Y., Brent, C. S., Fennern, E., & Amdam, G. V. (2012). Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. *PLoS genetics*, 8(6), e1002779.
- Yu, H., Kim, P. M., Sprecher, E., Trifonov, V., & Gerstein, M. (2007). The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Computational Biology*, 3(4), e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030059>