(مقاله کوتاه)
دوره پانزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۸
DOI: 10.22055/ivj.2019.136126.2048

بررسی تفاوت بیان ژن *RASGRP3* در پاسخ پرنده به آنفلوانزا نسبت به پرنده‌ی سالم با استفاده از آنالیز داده‌های بیان ژن و PCR کمی

مونا صالحی‌نسب[۱*]، قدرت‌الله رحیمی‌میانجی[۲]، اسماعیل ابراهیمی[۳] و سیدعلی غفوری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۳

چکیده

ژن *RASGRP3* یکی از ژن‌هایی است که اثرگذاری آن بر پیامد آلودگی آنفلوانزا در میزبان بسیار محتمل است. این ژن پاسخ التهابی را کاهش داده و در واقع آستانه‌ای برای ممانعت از پاسخ التهابی شدید که منجر به آسیب بافت‌های میزبان می‌شود، تنظیم می‌نماید. به منظور بررسی دخالت این ژن در پاسخ میزبان به آنفلوانزا از آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم موجود در پایگاه‌های داده‌ای و سپس PCR کمی استفاده نمودیم. در این راستا از سه مطالعه‌ی مرتبط با بیان ژن‌های میزبان در پاسخ به آنفلوانزا استفاده شد تا تغییرات بیان ژن مورد نظر در حالت آلودگی نسبت به حالت سلامت، مورد بررسی قرار گیرد. سپس بر روی نمونه‌های آلوده شده با سویه‌ی H5N1، PCR کمی انجام گردید. آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم در نرم‌افزار R و با استفاده از پکیج MetaDE و روش آماری Fisher، تفاوت بیان ژن *RASGRP3* را با احتمال بسیار بالا تأیید نمود. نتایج Real-time PCR نشان داد که این ژن در پاسخ به سویه‌ی H5N1 به طور معنی‌داری کاهش بیان یافت. این نتایج نشان می‌دهد ژن *RASGRP3* از ژن‌های کاندید قوی در مکانیزم تنظیمی پاسخ میزبان به آنفلوانزاست که می‌تواند با دخالت در مکانیزم دفاعی میزبان منجر به تنظیم شدت پاسخ به آلودگی شده و بر پیامد آلودگی و بقای پرنده پس از جدال با ویروس اثر بگذارد.

کلمات کلیدی: ژن *RASGRP3*، پاسخ التهابی، آنفلوانزا، بیان ژن، پی‌سی‌آر کمی

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان (AIV)، به طور دوره‌ای در پرندگان اتفاق می‌افتد و خسارات جبران‌ناپذیری به صنعت طیور وارد می‌نماید. کلید اصلی برای تولید داروهای موفق، درک بیماری‌زایی ویروس و اثرات متقابل ویروس- میزبان است. پژوهش‌های زیادی، بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزا و سیر تکاملی آن‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند. به علاوه، پروفایل بیان ژن میزبان از طریق تکنولوژی‌های Transcriptomics به طور گسترده مورد پژوهش واقع شده‌اند (Wang et al. 2012, Reemers et al. 2009, Massin et al. 2013, Wang et al. 2014, Kuchipudi et al. 2014, Smith et al. 2015).

ژن‌های زیادی وجود دارند که نحوه‌ی تنظیم بیان آن‌ها در میزبان می‌تواند بر پیامد آلودگی اثر بگذارد. ژن *RASGRP3* یکی از ژن‌هایی‌ست که اثرگذاری آن در پاسخ میزبان به آلودگی بسیار محتمل است. این ژن یک فاکتور مبادله‌ی نوکلئوتید گوانین و فعال کننده‌ی Ras و Rap1 است که تولید سایتوکین‌های پیش التهابی به خصوص IL6 را در ماکروفاژها از طریق فعال کردن Rap1 محدود می‌کند (Tang et al. 2014, Irudayam et al. 2015). سایتوکین‌های پیش‌التهابی به وسیله‌ی Toll-like receptor ها تحریک می‌شوند. *RasGRP3* در واقع

[۱*] دانش آموخته دکترای تخصص ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(نویسنده‌ی مسئول) E-mail: Monasalehinasab@gmail.com
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
[۳] دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۴] کارشناس ارشد سازمان دامپزشکی ایران، تهران، ایران

عضوی منحصر به فرد از RasGRP هاست که با اختلال در تولید IL6 القا شده توسط TLR3/4/9 در ماکروفاژها، باعث کاهش آماس‌ها و آرتریت‌های القا شده از کلاژن می‌شود (Yamashita et al. 2000, Tang et al. 2014). با توجه به نقش تنظیمی ژن *RASGRP* در مکانیزم پاسخ التهابی احتمال می‌رود این ژن در بافت‌های آلوده‌ی میزبان در پاسخ به آنفلوانزا نسبت به بافت نرمال، تمایز بیان داشته باشد. به منظور بررسی این احتمال، در مطالعه‌ی حاضر هم از داده‌های ترنسکریپتوم و هم از تکنیک آزمایشگاهی Real-time PCR در طحال‌های آلوده به H5N1 استفاده نمودیم.

مواد و روش کار

آزمایش‌های ترنسکریپتوم از طریق جست و جوی پایگاه‌های GEO و ArrayExpress شناسایی شدند. به منظور مقایسه‌پذیر بودن داده‌ها، از پژوهش‌هایی استفاده شد که همگی از پلت‌فرم microarray استفاده کرده بودند. بعد از بارگیری داده‌ها، نمونه‌های تیمار و کنترل شناسایی و داده‌های میزبان‌های غیر از جوجه کنار گذاشته شده و سه پژوهش شامل ۸۹ نمونه (۶۹ آلوده و ۲۰ کنترل) انتخاب شدند. جزئیات این آزمایش‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱: جزئیات مطالعات میکروواری منتخب

شناسه آزمایش در GEO یا ArrayExpress	میزبان	پلت فرم	سویه ویروس	بافت
GSE53932	مرغ	GPL3213 Affymetrix Chicken Genome Array	H_5N_1	شش
GSE33389	مرغ، اردک	GPL3213 Affymetrix Chicken Genome Array	H_5N_1, H_2N_3	سلول‌های اولیه شش
E-GEOD-31524	مرغ	GPL3213 Affymetrix Chicken Genome Array	H_5N_2, H_9N_2,H_5N_3,H_1N_1	سلول‌های فیبروبلاست جنینی

برای نرمال‌سازی داده‌های میکروواری از پکیج Affy در نرم‌افزار R و الگوریتم RMA، استفاده شد. در مرحله‌ی بعد اطلاعات مربوط به مستندسازی عملکرد ژن‌ها به Probset ID ها اضافه گردید. آنالیز داده‌های میکروواری برای ردیابی ژن‌های متفاوت بیان شده در پکیج MetaDE (Wang et al. 2015) در نرم‌افزار R اجرا شد. روش آماری Fisher، برای انجام آنالیز تمایز بیان مورد استفاده قرار گرفت.

برای بررسی آزمایشگاهی تمایز بیان ژن *RASGRP3*، در مرکز دامپزشکی اندونزی تعدادی پرنده با ویروس‌های آنفلوانزای H5N1 (A/Ck/West Java/HJ-18/2007) از طریق تزریق درون نای آلوده شدند و گروه دیگری از جوجه‌ها به عنوان گروه کنترل، بدون آلوده‌سازی باقی ماندند. سپس تمایز بیان ژن *RASGRP* در طحال‌های آلوده‌ی جوجه‌ها به وسیله‌ی Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. ترایزول و RNeasy Mini Kit (QIAGEN) برای استخراج RNA از نمونه‌ی طحال‌های آلوده و غیرآلوده، استفاده شدند. ساخت cDNA تحت شرایط استاندارد کیت SuperScript Reverse Transcriptase با استفاده از پرایمرهای طراحی شده‌ی مختص ژن *RASGRP* و ژن خانه‌دار (جدول ۲) و دیگر اجزا بر اساس کیت SYBR Green FastMix (BIOSCIENCES) انجام شد.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

نام ژن	پرایمر forward	پرایمر reverse
RPL13(HK)[1]	GGAGGAGAAGAACTTCAAGGC	CCAAAGAGACGAGCGTTTG
RASGRP3	CGGAAGTCACAAAGGACTGGA	TGAAGCCAACACAGTCAGCA

تکثیر در پلیت‌های ۴۶ چاهکی با ۳ تکرار برای هر نمونه در سیستم Eco illumina Real-time PCR انجام و مقادیر نسبی بیان با استفاده از معادله‌ی $R=2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شدند (Livak and Schmittgen 2001). نرم‌افزار SPSS برای بررسی معنی‌داری مقادیر نسبی بیان ژن در طحال‌های آلوده در مقایسه با طحال‌های کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

آنالیز بیان ژن با روش آماری Fisher و همچنین PCR کمی، تمایز بیان ژن *RASGRP3* را با احتمال بالا تأیید نمودند. نتیجه‌ی آنالیز بیان ژن داده‌های میکروواری و نیز مقدار نسبی بیان این ژن در طحال‌های آلوده به H5N1 در مقایسه با گروه کنترل در جدول ۳ نشان داده شده است. این ژن در طحال‌های آلوده به H5N1 کاهش بیان معنی‌دار نشان داد.

جدول ۳: نتایج آنالیز تمایز بیان و Real-time PCR

نماد ژن (شناسه ژن)	P-value حاصل از آنالیز تمایز بیان	Fold change[1] حاصل از real-time PCR	نوع تنظیم بیان ژن
RASGRP3 (421460)	0.0006	0.04**	*کاهشی*

۱ Fold change میانگین بیان ژن در ۳ نمونه‌ی طحال آلوده در مقایسه با نمونه‌های کنترل است.

** $p<0.01$

همان طور که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود، محصولات پی‌سی‌آر برای ژن *RASGRP3*، قطعاتی بلندتر از محصولات حاصل از تکثیر ژن خانه‌دار (*RPL13*) بودند. پرایمرهای طراحی شده برای ژن RASGRP3 قطعات ۹۹ جفت بازی و پرایمرهای ژن RPL13 قطعات ۶۵ جفت بازی مورد انتظار را تکثیر نمودند.

تصویر ۱: تصویر ژل محصولات Real-time PCR

بحث

تمایز بیان ژن *RASGRP3* به وسیله‌ی آنالیز داده‌های بیانی و PCR کمی در مطالعه‌ی ما تأیید شد. پی‌سی‌آر کمی در بافت طحال آلوده به H5N1 نشان داد که ژن *RASGRP3* در مواجهه با این سویه، کاهش بیان می‌یابد. جهت‌های مختلف تنظیمی این ژن در پاسخ به سویه‌های مختلف پاتوژنی بسته به شدید یا خفیف بودن آن‌ها مورد انتظار است. اما کاهش بیان این ژن در مواجهه با ویروس H5N1، ایجاد پاسخ التهابی شدید در مواجهه با این سویه را که شدیداً پاتوژنی است، تأیید کرد. Tang و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش نمودند که سلول‌های میزبان، شدت آلودگی را تشخیص می‌دهند و پاسخ مناسبی برای اجتناب از پاسخ افراطی میزبان و ایمن نگه داشتن سلول‌هایش تنظیم می‌کنند. *RASGPR3* جلوی پاسخ التهابی افراطی در مقابل آلودگی پاتوژنی را می‌گیرد. در مواجهه با سویه‌های شدیداً پاتوژنی، کاهش بیان ژن *RASGPR3* منجر به عدم توانایی ماکروفاژها در کنترل پاسخ التهابی و در نتیجه درگیری بیش از حد با ویروس و در موارد زیادی منجر به مرگ پرنده می‌شود.

سلول‌های ایمنی میزبان، به گیرنده‌های محافظتی تحت عنوان گیرنده‌های تشخیص الگو (pattern recognition receptors) برای ردیابی و حذف پاتوژن‌های مهاجم از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی و تولید سایتوکین‌های پیش التهابی و اینترفرون‌های نوع یک مجهز هستند و

از این طریق هجوم پاتوژن‌ها را ردیابی و تخریب می‌کنند (Kawai and Akira 2010) . گیرنده‌های Toll-like (TLRs) می‌توانند اجزای پاتوژنی را شناسایی و MAPK ها که نوعی پروتئین کیناز هستند را فعال کنند. توازن متعادل سیگنال PRR ها برای پاکسازی پاتوژن‌ها و جلوگیری از آسیب به سلول‌های میزبان، حیاتی است. به دلیل شدت‌های متفاوت هجوم پاتوژن‌ها طی یک آلودگی طبیعی، سلول‌های میزبان نیاز دارند که قدرت آلودگی را تشخیص دهند و برای پرهیز از آسیب ناشی از پاسخ بیش از حد، به صورت مناسبی ایجاد پاسخ نمایند. در این فرایند Small Rap GTPase ها به عنوان سوئیچ‌های مولکولی محافظت شده که سیگنال‌های فرا سلولی را به پاسخ‌های سلولی مختلف جفت می‌کنند عمل می‌نمایند و به عنوان تنظیم کننده در Toll-like receptor signaling نیز نقش دارند. *RASGRP* نیز که در کنار IRF7 و تعداد دیگری از ژن‌ها، به عنوان ژن‌های محرک اینترفرون محسوب می‌شود، پاسخ التهابی تحریک شده به وسیله‌ی toll-like receptor را در ماکروفاژها از طریق فعال کردن Rap1 small GTPase ها محدود می‌کند (Tang et al. 2014, Schwarts et al. 2016).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ژن *RASGRP3* یکی از ژن‌های حیاتی در مکانیزم‌های بیولوژیکی پاسخ پرنده به عفونت ویروسی است و می‌تواند بر پیامد آلودگی به ویروس در میزبان مؤثر باشد. به گونه‌ای که کاهش بیان آن در جوجه‌های آلوده به سویه‌ی شدیداً پاتوژنی ممکن است منجر به افزایش شدت درگیری و نهایتاً مرگ پرنده شود. با این وجود مطالعات عملکردی بیش‌تر نظیر آنالیز شبکه‌های ژنی برای حصول آگاهی دقیق از مکانیزم‌های درگیر، مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از Risa Indriani و همکارانشان در مرکز تحقیقات دامپزشکی اندونزی (شهر Bogor) و نیز آقای دکتر فرهید همت‌زاده در دانشگاه ادلاید استرالیا به جهت همکاری‌های ارزنده‌شان، کمال تشکر را دارند.

منابع

Irudayam, J.I.; Contreras, D.; Spurka, L.; Subramanian, A.; Allen, J.; Ren, S. et al. (2015). Characterization of type I interferon pathway during hepatic differentiation of human pluripotent stem cells and hepatitis C virus infection. Stem Cell Research, 15: 354-364.

Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature Immunology, 11: 373-384.

Kuchipudi, S.V.; Tellabati, M.; Sebastian, S.; Londt, B.Z.; Jansen, C.; Vervelde, L. et al. (2014). Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. Veterinary Research, 45:118-136.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time guantitative PCR and the 2-[delta][delta] CT-method. Methods, 25: 402-408.

Massin, P.; Deleage, C.; Oger, A.; Briand, F.X.; Quenault, H. and Blanchard, Y. (2013). Differential cellular gene expression in duck trachea infected with a highly or low pathogenic H5N1 avian influenza virus. Virology Journal, 10:279-291.

Reemers, S.S.; van Haarlem, D.A.; Groot Koerkamp, M.J. and Vervelde, L. (2009). Differential gene-expression and host-response profiles against avian influenza virus within the chicken lung due to anatomy and airflow. Journal of General Virology, 90: 2134-2146.

Schwartz, R.E.; Bram, Y. and Frankel, A. (2016). Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells: a tool to study infectious disease. Current Pathobiology Reports, 4: 147-156.

Smith, J.; Smith, N.; Yu, L.; Paton, I.R.; Gutowska, M.W.; Forrest, H.L. et al. (2015). A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in viral resistance. BMC Genomics, 16: 574-593.

Tang, S.; Chen, T.; Yu, Z.; Zhu, X.; Yang, M.; Xie, B. et al. (2014). RasGRP3 limits Toll-like receptor-triggered inflammatory response in macrophages by activating Rap1 small GTPase. Nature Communications, 5: 4657-4671.

Wang, X.; Li, J. and Tseng, G.C. (2015). Package MetaDE: Microarray meta-analysis for differentially expressed gene detection. Version 1.0.5.

Wang, Y.; Lupiani, B.; Reddy, S.M.; Lamont, S.J. and Zhou, H. (2014). RNA-seq analysis revealed novel genes and signaling pathway associated with disease resistance to avian influenza virus infection in chickens. Poultry Science, 93: 485-493.

Wang, Y.; Brahmakshatriya, V.; Lupiani, B.; Reddy, S.M.; Soibam, B.; Benham, A.L. et al. (2012). Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. BMC Genomics, 13: 278-293.

Yamashita, S.; Mochizuki, N.; Ohba, Y.; Tobiume, M.; Okada, Y.; Sawa, H. et al. (2000). CaLDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1. The Journal of Biological Chemistry, 275: 25488-25493.

Vol. 15, No. 4, Winter, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2019.136126.2048

Short Communication

Study of differential expression of RASGRP3 in the bird's response to AIV infection compared to non-infected birds using transcriptomic analysis and real-time PCR

Salehinasab, M.[1]; Rahimi Mianji, Gh.[2]; Ebrahimi, E.[3] and Ghafouri, S.A.[4]

Received: 15.10.2018 Accepted: 23.01.2019

Abstract

RasGRP3 is one of the genes which are probably effective in the outcome of influenza infection. This gene reduces the inflammatory response and sets a threshold to decrease intensive response which usually causes harm to host tissues. In order to evaluate the role of this gene in the host response to Influenza infection, we analyzed transcriptomic data available in data banks and then performed Real-time PCR. We used 3 transcriptomic experiments to study the gene expression changes through infection compared to control groups. Then, we performed Real-time PCR on H5N1 infected samples. Transcriptomic data analysis using R software and MetaDE package via Fisher statistical method confirmed the differential expression of RasGRP3 significantly. Real-time PCR results indicated that RasGRP3 was down regulated in response to H5N1, significantly. The results show that RasGRP3 is one of the strong candidate genes in host regulatory mechanisms against Influenza infection which can set the intensity of host response through regulating the defensive system and can also affect the outcome of infection and survival.

Key words: RasGRP3, Inflammatory response, Influenza, Gene expression, Real-time PCR

1- PhD Graduated of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Associate Professor, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran
4- Expert, Iran Veterinary Organization, Tehran, Iran
Corresponding Author: Salehinasab, M., E-mail: Monasalehinasab@gmail.com