ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۲۱۵ - ۲۰۷

شناسایی ژن‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی با استفاده از داده‌های RNA-Seq لوکوسیت گاو

Identifying Regulatory genes affected on Immune system by using Bos Taurus leukocyte RNA-Seq data

الهام بهدانی*[۱]، هدایت‌اله روشنفکر[۱]، مصطفی قادری زفره‌ای[۲]، جمال فیاضی[۱]، محمدرضا بختیاری‌زاده[۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رامین، خوزستان
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج
۳- استادیار، گروه دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Behdani E*[1], Roshanfekr H[1], Ghaderi Zefrehei M[2], Fayazi J[1], Bakhtiarizadeh MR[3]

1- PhD students, Associate Professors, Department of Animal Sciences , faculty of Agriculture and Natural Resources, Ramin University, Khozestan, Iran
2- Assisstant Professor, Department of Animal Sciences, University of Yasouj
3- Assisstant Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, University College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: El_behdani86@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹٤/۳/٦ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

بررسی شبکه‌های ژنی از جمله مطالعاتی است که بر روی داده‌های توالی‌یابی رونوشت سلولی انجام می‌شود. مطالعه حاضر با بررسی شبکه ژنی داده‌های رونوشت سلول‌های لوکوسیت گاوی، سعی بر شناسایی ژن‌های مؤثر بر سیستم ایمنی و فعالیت سلول‌های لوکوسیت دارد. در این مطالعه پس از شناسایی ژن‌ها و ایزوفرم‌های مختلف و اندازه‌گیری سطح بیان آن‌ها، شبکه ژنی با بسته آماری GeneNet که مرتبط با نرم‌افزار R می‌باشد، مورد مطالعه قرار گرفت. ژن‌هایی که به‌عنوان تنظیم کننده در این شبکه‌ی ژنی به آن‌ها پرداخته شده‌است غالباً بر فرآیندهای مختلفی نظیر مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با فعالیت لوکوسیت‌ها، نابودی سلولی و عفونت‌ها، پلاریزه شدن ماکروفاژ، مهاجرت لوکوسیت‌ها و کموتاکسیس و فاگوسیتوز در نوتروفیل‌ها مؤثرند. با وجود این‌که عملکرد تعدادی از این ژن‌ها هنوز به‌خوبی شناسایی نشده‌است ولی با توجه به نقش اصلی این ژن‌ها در شبکه ژنی، احتمال می‌رود با بررسی پلی‌مورفیسم این ژن‌ها و ارتباط آلل‌های مختلف آنان با پاسخ‌های ایمنی، بهترین آلل‌ها شناسایی شده و در انتخاب دام‌ها به کمک ژن‌ها، طراحی ریزآرایه و انتخاب ژنومی از آن‌ها استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

داده‌های RNA-Seq لوکوسیت گاوی
ژن‌های تنظیمی سیستم ایمنی
شبکه ژنی

مقدمه

داده‌های حاصل از توالی‌یابی رونوشت[1] که با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید بدست می‌آید، اطلاعات دقیقی از رونوشت‌های سلولی، حتی آن دسته از رونوشت‌هایی که نیمه عمر کوتاهی دارند و یا سطح بیان آن‌ها در سلول بسیار پایین است، را تهیه می‌کند (Wilhelm et al. 2008). این داده‌ها به طور گسترده در مطالعات مختلفی جهت شناسایی ژن‌ها (Mortazavi et al. 2008b) و رونوشت‌های جدید (Cloonan et al. 2008)، شناسایی جهش‌ها، بررسی تفاوت بیان در ژن‌ها (Oshlack et al. 2010 ; Ozsolak and Milos 2011) و بررسی شبکه ژنی (zhu et al. 2012) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از جمله کاربردهای مطالعه شبکه‌های ژنی، بررسی ارتباطات بین ژن‌های مختلف (Taub and Oppenheim 1994) و تخمین عملکردهای احتمالی برای ژن‌های ناشناخته (Rishi and Gupta Luke 2007) در مسیرها و یا سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشد. سیستم ایمنی نیز یکی از سیستم‌های بیولوژیکی است که سلامت و تولیدمثل دام را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ژن‌های زیادی وجود دارد که بر پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی مؤثر است. این ژن‌ها شامل ژن‌های کدکننده‌ی گیرنده‌های ایمنی ذاتی، سیتوکین‌ها، گیرنده‌های سیتوکین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها می‌شود (Schwartz 2002). علاوه بر این، ژن‌های کدکننده مولکول‌های مؤثر بر مسیرهای سیگنال‌دهی برون سلولی که در انتقال اطلاعات دخالت دارند را نیز می‌توان جزء ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی سلولی به شمار آورد (Yu et al. 2004; Burch et al. 2006).

بررسی ارتباطات این ژن‌ها به کمک مطالعات شبکه‌های ژنی، کمک می‌کند تا به ژن‌های اصلی کنترل کننده سیستم ایمنی نزدیک شده و ژن‌های مؤثری را شناسایی نمود که قابلیت استفاده در اصلاح نژاد دام به‌منظور بهبود سیستم ایمنی به کمک روش انتخاب بر اساس ژن‌ها و یا روش انتخاب ژنومی را دارند. در این مطالعه سعی شده‌است که با برازش شبکه ژنی که مبتنی بر روابط همبستگی جزیی بین ژن‌ها است، ژن‌های کنترل کننده سیستم ایمنی و فعالیت لوکوسیت‌ها مورد بررسی قرار گیرد و پس از شناسایی ژن‌های کنترل کننده، این ژن‌ها به عنوان ژن‌هایی که احتمالاً نقش کلیدی‌تری در سیستم ایمنی دارند، برای بررسی پلی مورفیسم و رابطه آللی چند شکلی آن‌ها با فنوتیپ پیشنهاد شود.

مواد و روش‌ها

پیاده سازی داده‌ها

در ابتدا داده‌های مربوط به توالی‌یابی رونوشت‌های مربوط به لوکوسیت گاوی با کد شناسایی GSE37447، از شبکه جهانی اینترنت (پایگاه GEO) پیاده‌سازی شد. داده‌ها از آزمایش انجام شده بر روی گاو بدست آمده بود. در آزمایش انجام گرفته، اثر تنش از شیرگیری گوساله بر محتوای ترانسکریپتوم لوکوسیت در دو گروه از گوساله‌ها مورد ارزیابی واقع شد. در یک گروه از گوساله‌ها فرآیند از شیرگیری در حضور مادر انجام گرفته بود (گروه کنترل) و در گروه دوم این تنش در غیاب مادر اعمال شد (گروه تیمار). نمونه‌برداری از شش گوساله از هر گروه و در روزهای صفر، یک، دو و هفت روز پس از اعمال تنش انجام شد. توالی‌یابی با استفاده از پایگاه توالی‌یابی ایلومینا در دانشگاه دوبلین ایرلند انجام شده بود (O'Loughlin et al. 2012).

بررسی کیفیت خوانش‌ها

در این مرحله از نرم‌افزار FastQC (Andrews 2010) استفاده شد. به کمک این نرم‌افزار کیفیت بازها و خوانش‌ها، میزان آلودگی به آداپتور و ... مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده کیفیت پایین، داده‌ها با نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger et al. 2014) مورد ویرایش قرار گرفتند تا مورد آنالیز و یا به عبارت دیگر پیاده‌سازی الگوریتم‌هایی به‌منظور استخراج اطلاعات، قرار گیرند.

نقشه‌یابی خوانش‌های کوتاه

در این مرحله خوانش‌های توالی‌یابی شده ترانسکریپتوم که از کیفیت آن‌ها اطمینان حاصل شده‌است بر روی ژنوم مبدأ که از سایت asia.ensemble.org پیاده‌سازی شده، مکان‌یابی شد. پیچیدگی توالی‌های ژنومی تأثیر مستقیم بر روی دقت مکان‌یابی

[1] RNA-sequencing

خوانش‌های کوتاه دارد. ژنوم یوکاریوت‌ها بسیار بزرگ بوده و همچنین دارای توالی‌های تکراری و هومولوگ‌های[1] بسیاری می‌باشند. این شباهت گسترده‌ی توالی‌ها چالش بسیار مهمی در مکان‌یابی خوانش‌ها به شمار می‌روند. نرم‌افزارهای مختلفی جهت مکان‌یابی خوانش‌ها وجود دارند. برخی از این نرم‌افزارها مکان‌یابی را بدون در نظر گرفتن و بررسی ترکیبات اگزونی مختلف در یک اسید ریبونوکلئیک پیک[2] انجام می‌دهند (مانند Bowtie، BWA، Stampy و SHRiMP)، ولی برخی دیگر مکان‌یابی خوانش‌ها را با منظور کردن و بررسی ترکیبات اگزونی مختلف در یک اسید ریبونوکلئیک پیک انجام می‌دهند (مانند MapSpline، TopHat، GSNAP و QPALMA) (Mortazavi et al. 2008a).

در این مرحله، از میان نرم‌افزارهای ذکر شده، از نرم‌افزار Tophat2 که نرم‌افزاری رایگان برای شناسایی ژن‌ها و انواع ترکیبات اگزونی مختلف در یک اسید ریبونوکلئیک پیک می‌باشد (Trapnell et al. 2009)، استفاده شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌ها و ایزوفرم‌ها

در این مرحله اطلاعات بیان ژن‌ها و ایزوفرم‌های آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بسیاری از ژن‌های چند اگزونه[3] چندین نوع ایزوفرم در طی بیان خود تولید می‌نمایند که این ایزوفرم‌های مختلف می‌توانند دارای عملکردهای متفاوتی باشند. لذا جهت درک کامل عملکرد ترانسکریپتوم، مطالعه ژن‌ها در سطح ایزوفرمیک[4] ضروری می‌باشد. برای اجرای این مرحله، خروجی نرم‌افزار Taphat2 توسط نرم‌افزار Htseq مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Anders et al. 2014).

آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها

در این مرحله پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها می‌باشد، با استفاده از بسته آماری edgeR به تعیین ژن‌هایی که میزان بیان آن‌ها در طول زمان بین تیمارهای مختلف متفاوت بوده، پرداخته شد. برای انجام تجزیه این مرحله ابتدا نرم‌افزار R دانلود شد و پس از فراخوانی بسته edgeR (Robinson et al. 2010) و معرفی فایل داده، تفاوت بیان ژن‌ها بررسی گردید. بررسی تفاوت بیان ژن‌ها با مقایسه گروه تیمار در برابر کنترل در طول روزهای ۱، ۲ و ۷ نسبت به روز صفر انجام شد. سطح معنی‌داری ۹۵ درصد (FDR<۰/۰۵[5]) به‌عنوان معیار معنی‌داری مورد استفاده قرار گرفت.

ایجاد شبکه ژنی

در این مرحله با استفاده از بسته آماری GeneNet (Schäfer et al. 2006) که مرتبط با نرم‌افزار R می‌باشد، به بررسی شبکه ژنی پرداخته شد. ژن‌هایی که بیان متفاوتی را در مرحله قبل نشان داده بودند، به‌همراه اطلاعات مربوط به سطح بیان‌شان، به‌عنوان ورودی این بسته آماری مورد استفاده قرار گرفت. این برنامه بر اساس میزان همبستگی که در میزان سطح بیان ژن‌های مربوطه وجود دارد، به ترسیم شبکه می‌پردازد.

نتایج و بحث

در این مطالعه با آنالیز داده‌های لوکوسیت گاو با کد شناسایی GSE37447، ۱۷۸۱۷ ژن و ایزوفرم توسط نرم‌افزار Tophat2 شناسایی شد. سطح بیان این مجموعه‌ی ژنی به کمک نرم‌افزار Htseq اندازه‌گیری شد. از میان این ژن‌ها و ایزوفرم‌ها ۱۷۰۳ ژن و ایزوفرم توسط بسته آماری EdgeR، به‌عنوان ژن‌هایی با بیان متفاوت در بین تیمارها، شناسایی شدند. به‌عبارت دیگر این ژن‌ها، ژن‌هایی بودند که در طول روزهای ۱، ۲ و ۷ نسبت به روز شروع اعمال تنش (روز صفر)، در نمونه‌های حاصل از لوکوسیت‌های گوساله‌هایی که در غیاب ماده گاو، تنش از شیرگیری به آن‌ها اعمال شده بود، نسبت به گروه کنترل (گوساله‌هایی که در کنار مادرشان تنش از شیرگیری به آن‌ها اعمال شده بود) بیان متفاوت و معنی‌داری (FDR>۰/۰۵) را نشان داده‌اند. در این مقایسه ۵۸ ژن کاهش بیان داشتند و بقیه ژن‌ها در این مقایسه افزایش بیان داشتند.

نتایج بسته آماری GeneNet نشان داد که از این مجموعه‌ی ژنی تعداد ۱۵٤٦ ژن به عنوان شروع کننده کمان در شبکه ژنی مطرح می‌باشند. تعداد کمان‌های حاصل شده از این ژن‌ها، در این شبکه

[1] homologous sequences
[2] Alternative splicing
[3] multi-exon genes
[4] isoformic level
[5] false discovery rate

بین ۱ و ۷۲۳ کمان متغیر بود. تعدادی از ژن‌هایی که بیش‌ترین کمان از آن‌ها حاصل شده بود، در جدول ۱ ارائه شده‌است. این ژن‌ها را می‌توان به علت این‌که بیش‌ترین کمان از آن‌ها حاصل شده‌است، به عنوان کلیدی‌ترین ژن‌های مؤثر بر سیستم ایمنی و فعالیت لنفوسیت‌ها مطرح نمود. اولین ژن مطرح در این شبکه ژن *PSTK*[1] بود که شروع‌کننده ۷۲۳ کمان در شبکه ژنی بود. مطالعه‌ای که به بررسی پروتیئن‌های دخیل در انتقال و ذخیره عنصر سلنیوم پرداخته شده بود، پروتیئن حاصل از این ژن را، مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر عملکرد کمپلکس سلنوپروتیئن گزارش کرده است (Renko et al. 2009). این کمپلکس متابولسیم، ذخیره و تأمین عنصر سلنیوم را برای بافت‌های پیرامونی عهده‌دار است. گزارش شده‌است که مقادیر کافی از عنصر سلنیوم برای حفاظت سیستم ایمنی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و سرطان الزامی می‌باشد (Savitha 2014). پیشنهاد شده که سلنیوپروتیئن‌ها از چند طریق سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. یکی از این مسیرها، مسیرها سیگنال‌دهی ردوکس۲ می‌باشد (Lu et al. 2009) که این مسیر توسط رادیکال‌های آزاد شروع می‌شود. تولید این رادیکال‌های آزاد توسط سلول‌های التهابی انجام می‌پذیرد.

[1] phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase

[2] Redox signaling

جدول۱- تعدادی از ژن‌های شبکه ژنی که بیش‌ترین کمان از آن‌ها حاصل شده است.

ردیف	کد شناسه ژن	نام ژن	تعداد کمان حاصل شده از ژن	توضیحات
۱	ENSBTAG00000014028	PSTK	۷۲۳	مراجعه به متن
۲	ENSBTAG00000045172	bta-mir-2358	۵۱۸	با عملکرد نا مشخص
۳	ENSBTAG00000017981	ADRB3	۵۰۲	باعث افزایش مهاجرت ماکروفاژها و پاسخ ایمنی (Nishimura et al 2009) می‌شود.
٤	ENSBTAG00000029996	bta-mir-27a	٤۷۷	مراجعه به متن
۵	ENSBTAG00000007878	ARHGAP22[3]	٤٤۲	بر مهاجرت سلولی (Parsons et al 2010) اثرگذار است.
٦	ENSBTAG00000027684	FOLR2	٤۳۳	مراجعه به متن
۷	ENSBTAG00000017016	H3F3C	٤۲۱	با عملکرد نا مشخص
۸	ENSBTAG00000014782	STAB1	٤۲۰	مراجعه به متن
۹	ENSBTAG00000000195	-	٤۱۹	با عملکرد نا مشخص
۱۰	ENSBTAG00000001060	CXCR4	٤۱۱	مراجعه به متن
۱۱	ENSBTAG00000037582	-	۳۹۵	با عملکرد نا مشخص
۱۲	ENSBTAG00000010238	LTB4R	۳۸۵	با عملکرد نا مشخص
۱۳	ENSBTAG00000019107	GAS7	۳۸٤	با عملکرد نا مشخص
۱٤	ENSBTAG00000011616	MPO	۳۸۳	مراجعه به متن
۱۵	ENSBTAG00000031184	[4]CDKN1C	۳۸۲	مراجعه به متن
۱٦	ENSBTAG00000007931	[5]SLC38A6	۳٦٤	با عملکرد نا مشخص
۱۷	ENSBTAG00000004505	NLRC3	۳٤۰	مراجعه به متن
۱۸	ENSBTAG00000039129	TNFRSF10A	۳۳۷	در مسیر سیگنال‌دهی TNF نقش دارد.
۱۹	ENSBTAG00000010778	NDUFAF1	۳٦۲	با عملکرد نا مشخص

[3] Rho GTPase-activating protein 22
[4] cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
[5] Solute carrier family 38, member 6

این رادیکال‌های آزاد علاوه بر این‌که در انهدام پاتوژن‌ها کمک می‌کنند بر روی سلول‌های التهابی اثر گذاشته و با تغییر تعادل اکسایش و کاهش در فضای خارج سلولی، بر بیان ژن‌های التهابی اثر می‌گذارند (Reynaert 2006). مسیر دیگری که سلنیوپروتیئن-ها به واسطه آن سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، انهدام اکسیداتیو[1] می‌باشد (Forman and Torres 2002). در این فرآیند گرانولوسیت‌ها با تولید یک سری آنزیم‌هایی مانند اکسیدازها و کاتالازها باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند.

این رادیکال‌ها باعث نابودی باکتری‌های بلعیده شده توسط ماکروفاژها و یا حمله کردن به پارازیت‌های بزرگ خارج سلول ماکروفاژ می‌شود (Forman and Torres 2002). علاوه بر این سلنیوپروتیئن‌ها بر جریان کلسیم[2] نیز تأثیرگذار هستند (Lewis 2001). در تحقیقی بر روی موش که با معیوب کردن سلنیوپروتئین انجام شد، مشخص شد که جریان کلسیم در سلول-های نوع T، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها کاهش می‌یابد (Verma et al. 2011). این کاهش بر روی فعالیت‌های وابسته به کلسیم مانند تکثیر سلول‌های T (Hoffmann et al. 2010)، مهاجرت نوتروفیل‌ها و سلول‌های T و فرآیندهای اکسیداتیو در ماکروفاژها تأثیر نامطلوب می‌گذارد (Zhou et al. 2006). لذا جریان کلسیمی به‌عنوان یک محرک برای سلول‌های ایمنی مطرح است. در مطالعه دیگری این ژن یکی از ژن‌هایی بود که در بررسی تفاوت بیان ژن به کمک ریزآرایه در حالت اسیدوز شکمبه‌ای تحت حاد[3] نسبت به حالت کنترل بیان بسیار متفاوتی را نشان داد. نتایج تمامی این گزارش‌ها به اهمیت این ژن در سیستم ایمنی تأکید می‌کنند.

یکی دیگر از ژن‌های مطرح در بررسی شبکه ژنی ژن *bta-mir-27a* بود که ٤٧٧ کمان از آن حاصل شده بود. این ژن کدکننده یک اسید ریبونوکلئیک کوچک[4] می‌باشد. اسید ریبونوکلئیک‌های کوچک، توالی‌های غیرکدکننده‌ای هستند که نقش تنظیمی آن‌ها در توسعه، تمایز، نابودی سلولی و عفونت‌های ویروسی شناخته شده است (Gantier et al. 2007). نقش مهم دیگر آن‌ها تنظیم پاسخ-های ایمنی ذاتی و اکتسابی است (O'Connell et al. 2010)، به طوری که این آثار از ضروری‌ترین آثار تنظیمی در سیستم ایمنی پستانداران می‌باشد (Lee et al. 2014). در مطالعه‌ای که به میزان بیان اسید ریبونوکلئیک‌های کوچک در عفونت سلول‌های اپیتلیال پستان گاو به *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* پرداخته شده بود، مشاهده شد که بیان این ژن در زمان عفونت به همراه چندین اسید ریبونوکلئیک کوچک دیگر افزایش می‌یابد (Jin et al. 2014). در تحقیق دیگری که میزان و چگونگی بیان اسید ریبونوکلئیک‌های کوچک در هنگام آلودگی باکتری *Streptococcus uberis*، که یکی دیگر از عوامل بیماریزای ورم پستان گاو می‌باشد، تحت بررسی بود، گزارش شد که *bta-mir-27a* به‌همراه تعدادی دیگر از اسید ریبونوکلئیک‌های کوچک، تنظیم‌کننده مرکزی بیان ژن‌های ایمنی در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی گرم مثبت می‌باشند (Lawless et al. 2013).

ژن دیگری که نتایج این تحقیق به مؤثر بودن آن در سیستم ایمنی اشاره داشت، ژن *FOLR2*[5] می‌باشد. باید اشاره کرد که فعال شدن شدن ماکروفاژها در حالات آسیب شناختی شامل یک سری مراحل پشت سر هم می‌باشد (Mantovani et al. 2002). ماکروفاژها بر اساس نوع تحریک، عملکردهای متفاوتی را از خود نشان می‌دهد. مثلاً در پاسخ به تحریکی ممکن است به‌عنوان منهدم‌کننده باکتری عمل کنند و یا به‌عنوان یک عامل پیش‌التهابی وارد عرصه شوند و یا فعالیت ضد توموری داشته باشند. هرچند گاهی در فعالیت‌هایی مانند ترمیم بافت و بهبود التهاب نیز دخالت می‌کنند (Goerdt and Orfanos 1999). پروتیئن تولید شده توسط این ژن باعث افزایش پلاریزه شدن ماکروفاژها شده، به طوری‌که گزارش‌ها بیان کرده‌اند که می‌توان از این ژن به‌عنوان مارکری برای ماکروفاژها استفاده کرد (Leamon and Jackman 2008).

ژن مهم دیگرمورد بررسی در شبکه ژنی در این مطالعه ژن *STAB1*[6] بود. این ژن تولید پروتیئنی می‌کند که به‌عنوان یک گیرنده، سیگنال‌های محیط خارج سلولی را به فرآیندهای داخل

[1] oxidative burst
[2] calcium flux
[3] subacute ruminal acidosis
[4] miRNA
[5] Folate receptor 2
[6] Stabilin-1

سلولی مرتبط می‌سازد، مثلاً موجب فعال شدن و بیرون ریختن موادی از ماکروفاژها می‌شود (Politz et al. 2002).

ماکروفاژها و سلول‌های سینوسی طحال از مکان‌هایی می‌باشد که این ژن در آن‌ها بیان می‌شود. وظیفه هر دوی این سلول‌ها پاکسازی موادغیر مصرفی و زاید از جریان خون، لنف (به کمک سلول‌های سینوسی) و فضای خارج سلولی (از طریق ماکروفاژ) می‌باشد. این فعالیت پاکسازی به همئوستازی بافت و ارگان کمک می‌کند. در آزمایشی فعال شدن این جریان در ماکروفاژها را وابسته به تحریک گلوکوکورتیکوییدها دانسته‌اند (Gratchev et al. 2005). مشاهدات غیر مستقیم بازگو کننده این حقیقت هستند که این ژن، کدکننده پروتیئنی است که در اتصال و مهاجرت انواع مختلفی از سلول‌ها شامل سلول‌های توموری، لوکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها دخالت دارند (Kzhyshkowska et al. 2004).

حضور این گیرنده سطح، بر روی ماکروفاژهای فعال به چند عملکرد ممکن است مرتبط باشد که مهم‌ترین آن‌ها این است که این گیرنده، لیگاندهایی از جنس لیپوپروتیئن را به داخل ماکروفاژ فرستاده و در اندوزوم‌ها مورد هضم و نابودی قرار می‌گیرند (Greaves and Greaves 2005). از این پروتیئن به عنوان یک نشانگر اختصاصی در رابطه با ماکروفاژهای فعال شده بهره می‌برند (Goerdt et al. 1999).

از دیگر ژن‌های مؤثر بر سیستم ایمنی در این مطالعه ژن *CXCR4*[1] بود. کموکین‌ها خانواده‌ی پپتیدی هستند که به برخی پپتیدهای شیمیایی پاسخ می‌دهند و مهم‌ترین سیتوکین‌های مؤثر بر لوکوسیت‌ها در طی التهاب می‌باشند (Edgington 1993). سنتز کموکین‌ها در پاسخ به محرک‌های التهاب القا می‌شود (Takane 2003). محصول این ژن، یک گیرنده کموکینی می‌باشد (Oberlin et al. 1996) که در سیستم ایمنی و سیستم عصبی مرکزی به طور گسترده بیان شده (Jazin et al. 1997) و باعث مهاجرت لوکوسیت‌ها و سلول‌های مولد سلول‌های خونی در پاسخ به لیگاندهایشان می‌شوند (Oberlin et al. 1996). گزارش دیگری بیان کرد که محرک *SCF-1* و گیرنده *CXCR4* یک تنظیم کننده کلیدی برای سیستم ایمنی می‌باشد (Stumm et al. 2002). علاوه بر این *CXCR4* در تنظیم پاسخ‌های لنفوسیت نوع T مؤثر است (Contento et al. 2008). بطوری‌که در طی فعال شدن سلول‌های نوع T توسط آنتی‌ژن، *CXCR4* در محل سیناپس برای منتقل کردن سیگنال‌های محرک حضور دارد (Choudhuri et al. 2014).

ژن دیگری که در شبکه بیان ژنی جزء ژن‌های اصلی قرار گرفت، *MPO*[2] بود. باید اشاره کرد که نوتروفیل‌ها با عملکردهایی مانند کموتاکسیس، فاگوسیتوز، انهدام اکسیداتیو و از دست دادن گرانول‌ها، مهم‌ترین سلول‌های مسئول ایمنی ذاتی می‌باشد (Pillay et al. 2013). *MPO* یکی از فراوان‌ترین پروتیئن‌های نوتروفیل‌ها است که تقریباً پنج درصد وزن خشک سلولی را به خود اختصاص می‌دهد (Schultz and Kaminker 1962). برخی ترکیبات که محرک‌های نوتروفیلی می‌باشند با اثر بر *MPO*، عملکرد سلول‌های نوع T را تحت تأثیر قرار داده (Odobasic et al. 2013) و از طرفی باعث افزایش فعالیت نوتروفیلی شده و ایمنی ذاتی را بهبود می‌دهند (Rusu et al. 2009). *MPO* در گرانول‌های اولیه ذخیره و با تحریک نوتروفیل‌ها آزاد شده و اکسیداسیون کلریدها و سایر یون‌های هالوژن را در حضور هیدروژن پروکسیداز کاتالیز می‌کند (Klebanoff 1968) تا هایپوکلوروس‌اسید ۳ و سایر محصولات فعال که خاصیت ضد-میکروبی دارند تولید شود (Klebanoff 2005). ایجاد برخی جهش و حذف در ژن *MPO* باعث کاهش آنزیم تولیدی و فعالیت آنزیمی می‌شود (Hansson et al. 2006). در گزارشی آمده‌است موش‌هایی که این ژن در آن‌ها غیر فعال شده بود بسیار حساس به عفونت‌های باکتریایی و قارچی بودند (Aratani et al. 2000). قسمتی از پاسخ نوتروفیلی به میکروب‌ها به تله اندازی خارج سلولی نوتروفیل‌ها مربوط می‌باشد. در این فرآیند نوتروفیل‌های فعال شده از بین می‌روند و ترکیبات‌شان آزاد شده و باعث اثر مخرب بر میکروب‌ها می‌شود (Metzler et al.

[1] C-X-C motif chemokine receptor-4

[2] Myeloperoxidase

[3] Hypochlorous acid

2011). در گزارش دیگری بیان شد که *MPO* برای به تله‌اندازی خارج سلولی نوتروفیل‌ها الزامی می‌باشد، بطوری‌که نقص در *MPO* باعث معیوب شدن این فرآیند در نوتروفیل‌ها می‌شود (Metzler et al. 2011).

علاوه بر این گزارش‌ها بیان کرده‌اند سطح *MPO* در طی ورم پستان زمانی که لوکوسیت‌ها فعال می‌شوند، افزایش می‌یابد (Mukherjee et al 2010). بطوری‌که می‌توان از سطح آنزیمی *MPO* جهت نشانگری برای تشخیص ورم پستان تحت کلینکی در گاو بهره برد (De and Mukherjee 2001).

ژن مطرح دیگر در شبکه مورد بررسی در این مطالعه ژن *NLRC3* بود. مطالعات نشان داد که این ژن و خانواده مربوط به آن، گروهی از گیرنده‌های خارج سلولی می‌باشد و به‌عنوان گیرنده-های تشخیص الگو[1] در تشخیص و پاسخ به میکروب‌ها نقش مهمی دارد (Fritz et al 2006) و از این طریق سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Brubaker et al 2015). به‌طوری‌که فعال شدن این گیرنده‌ها باعث شروع مسیرهای سیگنال‌دهی در سلول می‌شود که رسیدن به حداکثر پاسخ ایمنی را مهیا می‌کند (Palm and Medzhitov 2009).

[1] Pattern Recognition Receptors (PRRs)

نتیجه‌گیری

مقاومت به بیماری‌ها و پاسخ ایمنی از جمله صفاتی هستند که کمتر در برنامه‌های اصلاح نژادی به آن‌ها توجه می‌شود. پیشرفت در ایمنولوژی و بیولوژی مولکولی کمک کرده است تا چگونگی تأثیر ژنتیک بر روی این صفات مورد مطالعه قرار گیرد. سیستم ایمنی از طریق ژنتیک کنترل می‌شود و به کمک انتخاب ژنتیکی قابل تغییر است. از طرفی با توجه به اینکه سیستم ایمنی، بدن را در برابر دامنه وسیعی از میکروارگانسیم‌های پاتوژن حمایت می-کند، شناسایی گاوهای شیری که توانایی ذاتی بالایی در ایجاد پاسخ ایمنی هستند باعث کاهش بیماری‌ها، افزایش بازدهی گله و بهبود کیفیت شیر تولیدی می‌شود. بهبود سیستم ایمنی از طریق توجه به ژنتیک دام با شناسایی ژن‌های تنظیم‌کننده این سیستم می‌تواند جایگزین مناسبی در برابر روش‌هایی مانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ایزولاسیون باشد و به همراه روش‌های تکمیلی مانند واکسیناسیون و مکمل‌های غذایی ایده‌آل‌ترین شرایط ایمنی را برای دام تهیه می‌نماید. در این مطالعه به تعدادی از ژن‌ها اشاره شد که می‌توان با بررسی چندشکلی آن‌ها و ارتباط این چندشکلی با فنوتیپ، بهترین آلل‌ها را شناسایی و در انتخاب ژنتیکی و طراحی ریز آرایه مورد استفاده قرار داد.

منابع

Anders S, Pyl PT, Huber W (2014) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatic 31:166-9.

Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Aratani Y, Kura F, Watanabe H (2000) Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. The Journal of Infectious Diseases 182:1276-1279.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics 21: 11-17.

Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015) Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. Annual Review of Immunology 33:101-114.

Burch LH, Yang IV, Whitehead GS, Berman KG, Chao FG, Schwartz DA (2006) Transcriptional response to endotoxin reveals role for interferon γ in lung neutrophil recruitment. Lung Cellular and Molecular Physiology 291:677-682.

Choudhuri K, Llodra J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpfennig KW (2014) Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. Nature 507:118-123.

Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, Taylor DF, Steptoe AL (2008) Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. Nature Methods 5: 613-619.

Contento RL, Molon B, Boularan C, Pozzan T, Manes S, Marullo S (2008) CXCR4-CCR5: A couple modulating T cell functions. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105:10101-10106.

De KU, Mukherjee R (2001) Potential of indigenous potential of indigenous enzymatic activities, nitric oxide and ceruloplasmin in bovine milk to diagnose subclinical mastitis. Journal of Veterinary Science and Technology 12:22-32.

Edgington SM (1993) Chemokines in cardiovascular disease. Do chemoattractant cytokines regulate the progression of atherosclerosis Journal of Biotechnology 11:676-681.
Forman HJ, Torres M (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 166:S4-S8.
Fritz J H, Ferrero R L, Philpott, D J, Girardin S E (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nature Immunology 7:54 59.
Gantier M P, Sadler A J, Williams B R (2007) Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. Immunology and Cell Biology 85:458-462.
Goerdt S, Orfanos CE (1999) Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 10:137-142.
Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE (1999) Alternative versus classical activation of macrophages. Pathobiology 67:222-226.
Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdt S (2005) Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extra-cellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2macrophages. Scandinavian Journal of immunology 61:10-17.
Greaves DR, Gordon S (2005) Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. Journal of Lipid Research 46:11-20.
Hansson M, Olsson I, Nauseef WM (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myelopeoxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 445:214-224.
Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann PR (2010). Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. Journal of Nutrition 140:1155-1161.
Jazin EE, Soderstrom S, Ebendal T, Larhammar D (1997) Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. Journal of Neuroimmunol 79:148-154.
Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Guan L (2014) Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC Genomics 15:181-186.
Klebanoff SJ (1968) Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. Journal of Bacteriology 6:2131-2138.
Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of Leukocyte Biology 77:598-625.
Kzhyshkowska J, Gratchev A, Martens JH, Pervushina O, Mamidi S, Johansson S, Schledzewski K, Hansen B, He X, Tang J, Nakayama K (2004) Stabilin-1 localizes to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGAadaptors. Journal of Leukocyte Biology 76:1151-1161.
Lawless N, Foroushani AB, McCabe MS, O'Farrelly C, Lynn DJ (2013). Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. Public Library of Science 8, e57543.
Leamon CP, Jackman AL (2008) Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease. Vitamins and Hormones 79:203-233.
Lee HM, Nguyen DT, Lu LF (2014) Progress and challenge of microRNA research in immunity. Frontiers of Genetics 5:178-185.
Lewis RS (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. Annual Review of Immunology 19:497-521.
Lu J, Berndt C, Holmgren A (2009) Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. Biochimica et Biophysica Acta 34:1513-1519.
Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclea phagocytes. Trends in Immunology 23:549-555.
Metzler KD, Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky, A (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood 117:953-959.
Mortazavi A, Brian AW, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008a) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods 23:104-115.
Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008b) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. Nature Methods 5:621-628.
Mukherjee R, De UK, Ram GC (2010) Evaluation of mammary gland immunity and therapeutic potential of Tinospora cordifolia against bovine subclinical mastitis. Tropical Animal Health and Production 42: 645-651.
Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R (2009) $CD8^+$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nature Method 15:914-920.
O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nature Reviews Immunology 10:112-122.
Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JL, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell line-adapted HIV-1. Nature 382:833-835.
Odobasic D, Kitching AR, Yang Y (2013) Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. Blood 121:4195-4204.
O'Loughlin A, Lynn DJ, McGee M, Doyle S, McCabe M (2012) Transcriptomic analysis of the stress response to

weaning at housing in bovine leukocytes using RNA-seq technology. BMC Genomics 13:250-262.
Oshlack A, Robinson MD, Young MD (2010) From RNA-seq reads to differential expression results. Genome Biology 11: 220-228.
Ozsolak F, Milos PM (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities, Nature Reviews Genetics 12:87-98.
Palm NW, Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunology Review 227:221-233.
Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nature Reviews Molecular Cell Biology 11:633-643.
Pillay J, Tak T, Kamp VM, and Koenderman L (2013) Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. Cellular and Molecular Life Science 70:3813-3827.
Politz O, Gratchev A, McCourt PA, Schledzewski K, Guillot P, Johansson S, Svineng G, Franke P, Kannicht C, Kzhyshkowska J, Longati P, Velten FW, Johansson S, Goerdt S (2002) Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. Biochemical Journal 362:155-164.
Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Kohrle J, Schweizer U, Schomburg L (2009) Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology 23:1758-1765.
Reynaert NL, Vliet A et al. (2006) Dynamic redox control of NF-kappa through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 35:103-114.
Rishi R, Gupta Luke EK (2007) A network model for gene regulation. Journal of Computers and Chemical Engineering 31:950-961.
Robinson MD, McCarthy J, Gordon K (2010) edger: A bioconductor package fordierential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139-145.
Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE (2009) A bovine whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. Journal of Nutrition 139:386-393.
Savitha P (2014) Role of selenium. Journal of Pharmaceuticl Science and Research 6:56-59.
Schäfer J, Opgen Rhein R, Strimmer K, Opgen Rhein R, Strimmer K, Strimmer K, (2006) Reverse Engineering Genetic Networks using the GeneNet Package. R News 6:50-53.
Schultz J, Kaminker K, (1962) Myeloperoxidase of leucocyte of normal human blood. Content and localization. Archives of Biochemistry and Biophysics 96:465-467.
Schwartz DA (2002) The genetics of innate immunity. Chest 121:62-68.
Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Krieglstein J (2002) Dual Role for the SDF-1/CXCR4 Chemokine Receptor System in Adult Brain: Isoform-Selective Regulation of SDF-1 Expression Modulates CXCR4-Dependent Neuronal Plasticity and Cerebral Leukocyte Recruitment after Focal Ischemia. Journal of Neuroscience 22:5865-5878.
Takane M (2003) Inference of Gene Regulatory Networks from Large Scale Gene Expression Data. School of Computer Science McGill University, August.
Taub DD, Oppenheim JJ (1994) Chemokines, inflammation and the immune system. Journal of Immunology 1:229-246.
Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. Bioinformatics 25:1105-1111.
Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E, Hashimoto AS, Hoffmann PR (2011) Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. Journal of Immunology 186:2127-2137.
Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bahler J (2008) Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. Nature 453:1239-1243.
Yu S L, Chen H W, Yang P C, Peck K, Tsai M H, Chen J J, Lin F Y (2004) Differential gene expression in gram-negative and gram-positive sepsis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 169:1135-1143.
Zhou X, Yang W, Li J (2006) Ca2+ and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopoly-saccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. Journal of Biological Chemistry 281:31337-31347.
Zhu M, Deng X, Joshi T, Xu D, Stacey G, Cheng J (2012) Reconstructing differentially co-expressed gene modules and regulatory networks of soybean cells. BMC Genomics 13:437-442.

Modern Genetics Journal

Vol 11, Number 2, Summer 2016, Quaternary

Identifying Regulatory genes affected on Immune system by using Bos Taurus leukocyte RNA-Seq data

Behdani E[*1], Roshanfekr H[1], Ghaderi Zefrehei M[2], Fayazi J[1], Bakhtiarizadeh MR[3]

1. PhD students, Associate Professors, Department of Animal Sciences , faculty of Agriculture and Natural Resources, Ramin University, Khozestan, Iran
2. Assisstant Professor, Department of Animal Sciences, University of Yasouj
3. Assisstant Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, University College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* Corresponding Author, Email: El_behdani86@yahoo.com

A B S T R A C T

Study of gene networks is one of the research fields that carried out on RNA-Seq data.The present study trying to identify effective genes on immune system and leukocytes activity by gene network of bovine leukocyte RNA-Seq data. In this research, gene network was studied by statistical GeneNet package related to R software, after identifying and measuring the expression level of genes and isoforms. Genes in this gene network that deal with them as regulator genes, often effect on some activities such as signaling pathways of leucocytes processes, cell destruction and infections, polarization of macrophages, migration and chemotaxis of leucocytes and neutrophils' phagocytosis. Considering to the key role of these genes in this gene networks, it suggests to searching about these genes' polymorphisms and evaluating relationship between different alleles and the immune responses. The best identified alleles could be used in gene assessed selection, microarray designing and genomic selection.

Key Words

Bos Taurus leukocyte RNA-Seq data, Regulator gene in immune system, Gene network