تحقیقات تولیدات دامی

سال هفتم/شماره سوم/پاییز ۱۳۹۷ (۲۳-۱۳)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

# شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده در جوجه‌های آلوده به ویروس $H_5N_1$ با استفاده از فراتحلیل داده‌های ریزآرایه DNA

**مونا صالحی نسب[۱*]، قدرت الله رحیمی میانجی[۲]، اسماعیل ابراهیمی[۳]، سید علی غفوری[۴]**

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز

۴- استادیار سازمان دامپزشکی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۱۱)

## چکیده

پیدا کردن نیم‌رخ بیان ژنی در طول سال‌های اخیر، منجر به شناسایی ژن‌های خاص در پاسخ به بیماری‌های گوناگون شده-است. یکی از این بیماری‌های مهم در صنعت طیور، بیماری آنفولانزا است. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی ژن‌های موثر در بروز آنفولانزای ناشی از ویروس H5N1 با استفاده از فراتحلیل دو مجموعه داده ریزآرایه DNA که بیان ژن‌های میزبان در پاسخ به آنفولانزا را مورد بررسی قرار داده بودند، بود. فراتحلیل نشان داد که ژن‌های *STK17B*، *CCL4*، *MCM9*، *IRF7* و *IL6* با روش‌های Fisher، AW و maxP متمایز بیان می‌شوند. برای تایید تمایز بیان ژن‌های شناسایی شده در آزمایشگاه از Real-time PCR استفاده شد. بدین منظور از نمونه‌هایی استفاده شد که پیش‌تر با ویروس H5N1 چالش داده شده بودند. نتایج برای هر پنج ژن انتخابی، تمایز بیان آنها را در حالت مواجهه با آلودگی و حتی جهت تنظیمی بیان را که در فراتحلیل مشاهده شده بود، در سطوح معنی‌دار تایید نمود، به گونه‌ای که ژن‌های *IL6*، *IRF7* و *CCL4* افزایش بیان و ژن‌های *STK17B* و *MCM9* کاهش بیان نشان دادند. این نتایج پیشنهاد می‌دهند فراتحلیل روشی بسیار قوی در شناسایی ژن‌هایی است که ممکن است در پژوهش‌های انفرادی مورد توجه قرار نگیرند. این ژن‌ها ممکن است نقش حیاتی در تنظیم پاسخ میزبان ایفا نمایند.

**واژه‌های کلیدی:** آنفولانزای پرندگان، پاسخ میزبان، پی سی آر کمّی، تمایز بیان، فراتحلیل

* نویسندهٔ مسئول: Monasalehinasab@gmail.com

**مقدمه**

بیماری آنفولانزای مرغی به دلیل وارد کردن خسارات جبران ناپذیر به صنعت تولید طیور و دیگر صنعت‌های وابسته، دارای اهمیت زیادی است. علی-رغم تلاش‌های بسیار برای کنترل این بیماری، شیوع آن هر ساله اتفاق می‌افتد. در ماه فوریه ۲۰۱۵، سازمان سلامت جهانی (WHO) گزارشی مبنی بر وضعیت آنفولانزا فراهم نمود که به طور قابل توجهی بر ویروس‌های آنفولانزای مرغی تاکید داشت. گزارش مذکور نشان داد که تنوع و توزیع جغرافیایی ویروس‌های آنفولانزا که در بین پرندگان اهلی و وحشی در گردش است، بی‌سابقه می‌باشد و حتی اگر احتمال آلودگی انسان‌ها، با این ویروس‌ها بسیار کم باشد، تهدید آن برای اقتصاد مبتنی بر صنعت مرغداری، بسیار قابل توجه است.

علم ژنتیک نقشی اساسی در شناسایی پاسخ میزبان به عفونت ویروسی ایفا می‌کند (Wang *et al.*, 2012). آماده‌سازی در مقابل شیوع بیماری آنفولانزا که تولید واکسن‌های کارآمد بخش مهمی از آن است، فرایندی پیچیده بوده که نیاز به همکاری پژوهش‌های ژنتیکی به عنوان یک بخش اساسی خواهد داشت. با توجه به اینکه فنآوری‌های با توان عملیاتی بالا در بسیاری از زمینه‌ها مانند تشخیص بیماری‌ها و یا علل ژنتیکی آنها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، ردیابی سطح بیان ژن‌ها در سطح کل ژنوم، روشی موثر برای پیدا کردن تغییرات ژنتیکی غیر معمول در جوجه‌های آلوده به ویروس آنفولانزا با استفاده از فنآوری ریزآرایه DNA خواهد بود. اخیراً پژوهشگران از این تکنیک برای افزایش آگاهی پیرامون تغییرات سلولی و مولکولی در آلودگی آنفولانزا استفاده نموده اند. درک پاسخ میزبان به عفونت آنفولانزا و اثرات متقابل ویروس با پرنده، نگرش جامعی در پیشگیری و درمان این آلودگی حتی در دیگر میزبان‌ها را سبب شده و بررسی ساز و کارهای بیماری‌زایی و اثرات متقابل ویروس-میزبان در سطح بیان ژن می‌تواند منجر به توسعه واکسن‌ها و داروهای موثر برای این عفونت شود (Shinya *et al.*, 2006; Riel *et al.*, 2007).

چندین پژوهش تا کنون، پروفایل بیان ژن پاسخ میزبان را نسبت به آلودگی آنفولانزا مورد بررسی قرار داده‌اند (Reemers *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Massin *et al.*, 2013; Kuchipudi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015). اگرچه این پژوهش‌ها فهرست‌هایی از ژن‌های بیان شده به صورت متمایز را نشان داده‌اند، به نظر می‌رسد در میان نتایج، هماهنگی و ثبات کافی وجود ندارد. دلایل این امر محدودیت‌هایی نظیر اندازه کوچک نمونه‌ها، نتایج متغیر بدست آمده از گروه‌های مختلف، روش‌های آزمایشگاهی متفاوت، پلت فرم‌ها و تکنیک‌های آنالیزی متفاوت هستند (Yang *et al.*, 2014). پژوهش‌های اخیر نشان داده است که فراتحلیل داده‌های بیان ژن که ممکن است در پایگاه‌های مختلفی بارگذاری شده باشند می‌تواند توان آماری ردیابی ژن‌های بیان شده به صورت متمایز را افزایش داده و منجر به پیش‌بینی‌های صحیح‌تر و تکرار پذیرتری شود (Yang *et al.*, 2014). همچنین ازدیاد روز افزون داده‌های بارگذاری شده در پایگاه‌های اطلاعاتی که قابلیت دسترسی عمومی دارند، نیاز به روش‌های فراتحلیل را برای ارزیابی کارآمد و ادغام داده‌های مرتبط تولید شده به وسیله پژوهش‌های مستقل، ایجاد می‌نماید. اجرای فراتحلیل روی مجموعه داده‌های واقعی نشان داده است که نتایج بدست آمده از این روش، منجر به شناسایی‌های قابل اعتمادتری در مقایسه با تحلیل‌های انفرادی می‌شود (Breitling and Hong, 2008).

تاکنون چنین فراتحلیلی برای آلودگی آنفولانزا انجام نشده است. از این‌رو در این مطالعه، فراتحلیلی از داده‌های بیان ژن دو پژوهش مختلف که بیان ژن-های جوجه‌ها در حالت آلودگی به ویروس H5N1 را پروفایل نموده‌اند، انجام داده‌ایم تا بتوانیم قدرت تجزیه را در مقایسه با تجزیه انفرادی بالا برده و تا حدودی بر محدودیت‌های پژوهش‌های انفرادی غلبه نماییم و همچنین احتمال خطاهای تصادفی را که منجر به گزارش ارتباطات مثبت کاذب و منفی کاذب می‌شوند کاهش دهیم. چنین فراتحلیلی می-تواند اساسی برای آشکارسازی پاتولوژی عفونت

آنفولانزا و تولید درمان‌های جدید برای این بیماری باشد.

## مواد و روش‌ها

*انتخاب مجموعه داده‌های ریزآرایه DNA مناسب مربوط به بیان ژن‌های میزبان در آلودگی آنفولانزا:* پژوهش‌های بیان ژن میزبان در آلودگی آنفولانزا از راه جست و جو در پایگاه‌های GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) و ArrayExpress (https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress) شناسایی شدند و پس از بارگیری فایل‌های بیانی، فایل‌های حاوی اطلاعات آزمایش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا داده‌های مربوط به میزبان‌های غیر پرنده کنار گذاشته شدند و سپس فایل‌هایی که مربوط به سویه‌هایی غیر از سویه H5N1 بودند، حذف شدند. نهایتاً دو آزمایش که ژن‌های بیان شده در آلودگی پرنده به ویروس آنفولانزا را پروفایل کرده بودند برای فرا تحلیل انتخاب شدند. تنها داده‌های مربوط به آلودگی $H_5N_1$ در مرغ (*Gallus gallus*)، از این دو پژوهش استخراج شدند و همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است ۲۴ نمونه جهت انجام فرا-تحلیل استفاده شد (۱۶ نمونه آلوده به ویروس و ۸ نمونه کنترل).

*پیش پردازش داده‌ها و افزودن مستند سازی (annotation):* در این پژوهش، به منظور نرمال-سازی یکپارچه هر دو مجموعه داده ریزآرایه پیش از فراتحلیل، از بسته‌های affy و MASS در نرم‌افزار RStudio (RStudio Team, 2015) استفاده شد. نرمال سازی، تصحیح پیش زمینه و خلاصه‌سازی اعداد بیانی با استفاده از الگوریتم RMA در بسته نرم‌افزاری affy، فراهم شد. در مرحله بعد، اطلاعات مربوط به مستند سازی داده‌ها که از راه بررسی پلت‌فرم‌های قرار گرفته در سایت‌های NCBI GEO و نیز ArrayExpress و همچنین Web tool های نظیر BioMart Ensembl و BioDbNet حاصل شده بود به Probset ID ها اضافه شد. افزودن اطلاعات مربوط به مستند سازی در جهتی انجام گرفت که برای بیشتر Probset ID ها، Entrez ID متناظر آنها حاصل شود. بدین منظور برای Probset ID هایی که تنها حاوی Ensembl ID متناظرشان بودند از Ensembl BioMart و برای Probset ID هایی که حاوی هیچکدام از اطلاعات مربوط به Ensembl ID و Entrez ID نبودند از BioDbNet برای دستیابی به Entrez ID ها استفاده شد.

*فراتحلیل:* برای فراتحلیل مجموعه داده‌های ریز آرایه از پکیج MetaDE در نرم‌افزار RStudio استفاده شد. پس از اعمال دستور match با استفاده از شاخص IQR برای یکی کردن ProbSet ID هایی که معرفی کننده یک ژن بودند، دو مجموعه داده با استفاده از دستور MetaDE.rawdata مورد فراتحلیل قرار گرفتند. از چهار آزمون آماری Fisher، maxP، minP و AW و دو سطح *pValue* شامل ۰/۰۵ و ۰/۰۱ برای این منظور استفاده شد.

*چالش پرندگان با ویروس آنفولانزا جهت انجام Real-time PCR:* چالش پرندگان با ویروس آنفولانزا در کشور اندونزی انجام شد. تعدادی از جوجه‌ها تا سن ۶ هفتگی در دو گروه با شرایط کاملاً یکسان (ایزولاتور) قرار گرفتند. یکی از گروه‌ها با $10^6$ $ELD_{50}$ در ۰/۱ میلی‌لیتر در هر دوز ویروس آنفولانزای $H_5N_1$ (A/Ck/West Java/HJ-18/2007) از راه بینی آلوده شد. بعد از چالش با ویروس، تست HI انجام شد و وقوع آلودگی مورد تایید قرار گرفت. گروه دیگر به عنوان گروه کنترل بدون آلودگی در نظر گرفته شد.

*تایید بعضی از ژن‌های حاصل از فراتحلیل با استفاده از Real-time PCR:* تمایز بیان ژن‌های طحال پرندگان برای بعضی از ژن‌های خروجی فراتحلیل با استفاده از تکنیک Real-time PCR در آزمایشگاه ویروس-شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آدلاید استرالیا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، RNA از نمونه‌های طحال با استفاده از ترایزول و کیت استخراج RNA شرکت QIAGEN (RNeasy Mini Kit) استخراج شد. غلظت RNA نمونه‌های بافت با استفاده از نانودراپ تعیین شد و با استفاده از تغییر مقادیر آب اضافه شده به هر نمونه RNA در مرحله ساخت cDNA تعدیل شد.

ساخت cDNA تحت شرایط استاندارد کیت SuperScript|||| Reverse Transcriptase انجام شد.

جدول۱- خصوصیات پژوهش‌های انفرادی ریزآرایه
Table 1. Characteristics of the individual microarray studies

| GSE dataset | Host | Case: Control | Platform | Virus strain | Tissue |
|---|---|---|---|---|---|
| GSE53932 | Gallus gallus | 12:6 | GPL3213 Affymetrix Array | $H_5N_1$ | Lung |
| GSE33389 | Gallus gallus, Anas platyrhynchos | 12:8 | GPL3213 Affymetrix Array | $H_5N_1$, $H_2N_3$ | Primary lung cells |

cDNA های حاصل به همراه پرایمرهای طراحی شده (جدول ۲) و دیگر ترکیبات واکنش بر اساس دستوالعمل کیت SYBR Green FastMix (BIOSCIENCES) برای واکنش qPCR مورد استفاده قرار گرفتند. تکثیر بر اساس پروتکل زیر انجام شد: ۲ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ چرخه تکثیر (۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد). تکثیر در پلیت‌های ۴۶ چاهکی با سه تکرار برای هر نمونه و با استفاده از سیستم Eco illumina Real-time PCR انجام شد و نتایج به وسیله نرم‌افزار illumina EcoStudy مورد تحلیل قرار گرفت. نرمال‌سازی با استفاده از بیان ژن‌های خانه‌دار در هر نمونه انجام شد. مقادیر نسبی بیان ژن با استفاده از رابطه $R=2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) با در نظر گرفتن بافت‌های طحال گروه کنترل به عنوان رفرنس نسبی محاسبه شدند. مقایسه میانگین‌ها برای بررسی تغییر بیان ژن بین گروه‌های آلوده و غیر آلوده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

## نتایج

از فراتحلیل داده‌های ریز آرایه با سه روش Fisher، maxP، و AW به ترتیب تعداد ۲۶۵، ۱۲۱۹ و ۴ ژن استخراج شد که در سطح ۰/۰۵ تمایز بیان نشان دادند. تعدادی از ژن‌ها با استفاده از هر سه روش تایید شدند، اما بعضی از آنها تنها با ۱ یا ۲ روش استخراج شدند. همچنین بیشتر ژن‌هایی که از تجزیه ژن‌های دارای تمایز بیان بیرون آمدند در فهرست ژن‌های دارای افزایش بیان یا کاهش بیان قرار گرفتند، اما تعدادی از ژن‌ها جهت تنظیم، بیانی خاصی نشان ندادند که دلیل این امر جهت تنظیمی متفاوت این ژن‌ها در آزمایشات مختلف است. بدین معنی که اگرچه این ژن‌ها در حالت آلودگی به آنفولانزا تمایز بیان نشان می‌دهند اما جهت این تنظیم بسته به بسیاری از عوامل می‌تواند افزایشی یا کاهشی باشد. تعداد ۵ ژن از ژن‌های بیان شده به صورت متمایز جهت بررسی بیشتر از فهرست ژن-های خروجی انتخاب شدند. این ژن‌ها شامل *STK17B*، *CCL4*، *MCM9*، *IRF7* و *IL6* بودند که خصوصیات آنها در جدول ۳ ارائه شده است. ژن *MCM9* یکی از ژن هایی بود که جهت تنظیمی خاصی نشان نداد اما تمایز بیان آن با دو روش Fisher و maxP تایید شد.

به طور جالب توجهی، آزمایش real-time PCR تمایز بیان هر ۵ ژن انتخابی را در طحال جوجه‌های آلوده شده با ویروس H5N1 تایید نمود. تمایز بیان ژن‌های *STK17B*، *CCL4*، *MCM9* و *IRF7* در سطح ۰/۰۵ و تمایز بیان ژن *IL6* در سطح ۰/۰۰۱ معنی دار بود. مقادیر نسبی بیان این ژن‌ها در طحال جوجه‌های آلوده به ویروس H5N1 در مقایسه با طحال جوجه‌های غیر آلوده به همراه سطح معنی-داری آنها در جدول ۴ ارائه شده است.

## بحث

در این پژوهش از رویکرد فرا تحلیل استفاده شد که اطلاعات مجموعه داده‌های مختلف ریز آرایه‌های DNA را ترکیب می‌کند تا ژن‌هایی را که به صورت معنی‌دار تمایز بیان نشان می‌دهند را برجسته نماید. با استفاده از دو مجموعه داده موجود در پایگاه‌های عمومی GEO و ArrayExpress فراتحلیلی به منظور شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ پرنده به ویروس H5N1 انجام دادیم و تنظیم بعضی از ژن‌های شناسایی شده را در بافت‌های آلوده با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی نمودیم. با توجه به محدودیت تعداد تکرارهای بیولوژیکی، مطالعات انفرادی نمی‌توانند نگرش جامعی از پاسخ به

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR (بیشتر پرایمرها روی اتصال اگزون‌ها طراحی شده‌اند)
Table 2. Primer sequences used in real-time PCR (Most of primers were designed on exon-exon junction)

| Gene name | Primer Forward | Primer Reverse |
|---|---|---|
| *RPL13*(HK)[1] | GGAGGAGAAGAACTTCAAGGC | CCAAAGAGACGAGCGTTTG |
| *TBP*(HK)[1] | CTGGATAGTGCCACAGCTA | GCACGAAGTGCAATGGTTT |
| *STK17B* | TCAAGACTGCAAAGCGGAGA | CCTCCAGCGGCATATTCCAA |
| *CCL4* | CAAAGCCTGCCATCATCTTCATC | GAAGCCACGCTCTGTGTCAG |
| *MCM9* | ATGCTGCCCGAACTACCATT | GCACCTCCCTGCATAGAAGA |
| *IRF7* | TGACGCAGGTGGATTTGG | TGCCTCCAATCCTGAAACTG |
| *IL6* | AAGAAGTTCACCGTGTGCGA | CAGGCATTTCTCCTCGTCGAA |

[1]House keeping gene

جدول ۳- خروجی فراتحلیل تعدادی از ژن‌ها به همراه خصوصیات مرتبط با معنی‌داری تنظیم آن‌ها
Table 3. Characteristics of some differentially expressed genes resulted from meta-analysis

| Entrez ID | Gene symbol | Confirmation method in meta-analysis | Type of regulation | *P* value |
|---|---|---|---|---|
| 424049 | STK17B | Fisher, AW | Down regulation | 0.04, 0.04 |
| 395468 | CCL4 | Fisher, maxP | Up regulation | 0.04, 0.03 |
| 100857742 | MCM9 | Fisher, maxP | DE[1] | 0.04, 0.03 |
| 396330 | IRF7 | maxP | Up regulation | 0.04 |
| 395337 | IL6 | maxP | Up regulation | 0.04 |

[1]The differentially expressed gene which can be up regulated in some studies and down regulated in other studies

جدول ۴- مقادیر نسبی بیان ژن های خروجی فراتحلیل در طحال‌های آلوده به H5N1 در مقایسه با گروه کنترل با استفاده از Real-time PCR
Table 4. Relative amount of meta-genes expression in H5N1 infected spleens compared with control group using Real-time PCR

| Gene name | Fold change[1] |
|---|---|
| *STK17B* | 0.19* |
| *CCL4* | 30.21* |
| *MCM9* | 0.02* |
| *IRF7* | 414.6* |
| *IL6* | 33.79*** |

[1] Fold change is the mean of gene expression in three infected spleens as compared to control samples. *$P < 0.05$ and ***$P<0.001$

بیماری‌ها ایجاد نمایند، بنابراین یکی کردن آزمایشات مستقل با استفاده از فرا تحلیل، این فرصت را فراهم می‌نماید که قدرت آماری شناسایی ژن‌هایی که تفاوت بیانی نشان می‌دهند را بهبود بخشیم. یکی از ژن‌های خروجی فراتحلیل که افزایش بیان آن در پرندگان آلوده به سویه H5N1 با معنی‌داری بالایی به وسیله Real-time PCR تایید شد، ژن *IL6* بود. زمانی که ویروس وارد بدن میزبان می‌شود، سیستم ایمنی ذاتی را فعال می‌نماید که این امر موجب القای سایتوکین‌های پیش- التهاب می‌شود (Cornelissen *et al.*, 2012). نقش مهم این سایتوکین‌ها در تنظیم پاسخ میزبان، پیش‌تر به وسیله Cornelissen *et al.* (2012) نشان داده شده است. این محققین القای بالا ولی تاخیری را در پاسخ سایتوکین‌های *IL6* و *IL1B* در شش، مغز و طحال جوجه‌های آلوده به آنفولانزا مشاهده نمودند. در صورتی که این پاسخ در اردک‌ها سریع‌تر بود. این امر نشاندهنده اهمیت تمایز بیان سایتوکین‌ها در حالت آلودگی به ویروس و تاثیر آن بر حساسیت یا مقاومت پرنده به بیماری است. Cagle *et al.* (2011) و Pantin-Jackwood (2012) نیز افزایش بیان ژن *IL6* را در طحال اردک‌های آلوده به H5N1 گزارش نموده و تاکید کردند که سطوح متفاوت سایتوکین-های پیش-التهاب نظیر *IL6* در کنار دیگر عوامل مانند بار ویروسی ممکن است بر پیامدهای بالینی پرندگان درگیر با ویروس اثر بگذارد و پاکسازی

ویروس‌ها تا حدود زیادی به افزایش سریع در میزان این سایتوکین‌ها مرتبط است. نقش تنظیمی سایتوکین‌هایی نظیر *IL6* در بسیاری از بافت‌های درگیر پرندگان نظیر نای و فیبروبلاست‌های جنینی نیز در حالت آلودگی به ویروس آنفولانزا نشان داده شده است (Xing *et al.*, 2008; Reemers *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2011; Ranaware *et al.* 2016)، نشان دادند که این نقش تنظیمی قوی در پاسخ به سویه‌های شدیداً پاتوژنی نظیر H5N1 بوده و در پاسخ به سویه‌های پاتوژنی ضعیف مانند H9N2 مشاهده نمی‌شود. آنها این تفاوت را به عنوان یک عامل بسیار مهم در شدید بودن عفونت ویروس H5N1 و مرگ و میر جوجه‌های درگیر با این سویه برشمردند.

یکی دیگر از ژن‌هایی که هم به وسیله فراتحلیل و هم به وسیله real-time PCR تایید شد *IRF7* بود. Wang *et al.* (2012) نشان دادند که *IRF7* (فاکتور ۷ تنظیمی اینترفرون) یکی از ژن‌های کاندیدای قوی در تنظیم پاسخ میزبان به آلودگی آنفولانزا در بافت شش جوجه‌های گوشتی است. بیان این ژن به همراه ژن *RIG-I* برای پاسخ اینترفرون ضروری است (Zeng *et al.*, 2007). اینترفرون‌های نوع ۱ به عنوان اولین خط دفاعی در پاسخ ضد ویروسی میزبان شناخته می‌شوند و پیشنهاد شده است که *IRF7* که عضوی از عوامل تنظیمی این اینترفرون‌ها است، نقش حیاتی در تعدیل پاسخ ایمنی به عفونت ویروسی آنفولانزا در جوجه‌ها ایفا می‌کند. بسیاری از الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن، افزایش بیان *IRF7* را تحریک می‌کنند و این ژن یک فعالیت عملکردی محافظت شده در پاسخ ضد ویروسی پرندگان دارد (Kim and Zhou, 2015). ژن *IRF7* در جوجه‌ها که حتی پیش از ارتولوگ انسانی آن شناسایی شده است، در پاسخ به سویه‌های مختلف آنفولانزا تنوع بیان زیادی نشان می‌دهد که این امر نشان‌دهنده اهمیت نقش آن در تعیین میزان حساسیت و مقاومت پرنده به این بیماری است (Kim and Zhou, 2015). Westenius *et al.* (2014) طی تحقیقی روی عفونت ویروس آنفولانزای پرندگان در انسان مشاهده نمودند که پاسخ کاهش یافته و دیر هنگام اینترفرون در عفونت H9N2 با فعال‌سازی ضعیف عوامل رونویسی *IRF3* و *IRF7* در ارتباط بود. در انسان، *IRF3* و *IRF7* اصلی‌ترین عوامل رونویسی تنظیم‌کننده بیان اینترفرون‌های نوع ۱ و ۳ و سایتوکین‌های درگیر در واکنش‌های التهابی هستند (Osterlund *et al.*, 2007).

برخلاف ژن‌های *IL6* و *IRF7* که گزارشات زیادی مبنی بر تغییر تنظیم بیان آنها در حالت آلودگی به آنفولانزا وجود دارند گزارشات چندانی از اهمیت سه ژن *STK17B*، *CCL4* و *MCM9* در حالت آلودگی آنفولانزا وجود نداشت. این سه ژن که شاید تاکیدی بر برتری استفاده از روش فراتحلیل در مقایسه با تحلیل‌های انفرادی باشند عملکردهای مهمی را هدایت می‌کنند. ژن *MCM9* یکی از ژن‌هایی بود که جهت تنظیمی خاصی نشان نداد، اما تمایز بیان آن با دو روش Fisher و maxP تایید شد. با وجود اینکه بنابر جستجوی انجام شده، گزارشی مبنی بر نقش تنظیمی این ژن در عفونت آنفولانزای طیور وجود نداشت، اما گزارشات مرتبط با ارتولوگ‌های این ژن در دیگر موجودات، نقش آن در عملکرد سیستم ایمنی را پیشنهاد می‌دهد. نشان داده شده است که ژن *MCM9* که یک هلیکاز را کد می‌کند و با عمل تکثیر DNA در ارتباط است، می‌تواند نقش مهمی در سرکوب تومور ایفا نماید (Hartford *et al.*, 2011). همچنین در بعضی از انواع سرطان‌ها در انسان، غیر فعال شدن ژنتیکی یا اپی ژنتیکی *MCM9* مشاهده شده است (Lee *et al.*, 2015).

ژن *STK17B* یک پروتئین کیناز القا کننده آپوپتوزیس را کد می‌کند که به فرایند مرگ سلول مرتبط می‌شود. Ramirez-Nieto (2008) تغییر بیان ژن *STK17B* را به همراه ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی ذاتی میزبان نظیر اینترلوکین‌ها و رسپتورهای اینترلوکین در پی آلوده کردن جوجه‌ها با ویروس بیماری بورس عفونی مشاهده نمودند. همچنین این ژن یکی از ژن‌هایی بود که در پاسخ به عفونت ایمریا (عامل بیماری کوکسیدیوز) بین دو لاین ژنتیکی از جوجه‌ها که به نظر می‌رسید سطح مقاومت متفاوتی به بیماری‌ها دارند، به صورت متمایز بیان شد (Kim *et al.*, 2009). این شواهد

سرنخی از اهمیت این ژن در پاسخ به عفونت‌ها و نقش آن در پیامدهای بیماری نظیر مرگ یا مقاومت پرنده ارائه می‌نماید که نیازمند پژوهش بیشتر است.

*CCL4* یک ژن از خانواده Chemokin هاست که نام دیگر آن *MIP-1B* است. پیش‌تر نشان داده شده است بیان این ژن در پاسخ به ویروس شدیداً پاتوژنی H5N1 در اردک و نه در پاسخ به سویه ضعیف پاتوژنی این ویروس، افزایش پیدا می‌کند، به گونه‌ای که افزایش بیان این ژن به همراه بعضی دیگر از سایتوکین‌ها و Chemokin ها ممکن است نشانی از مرگ پرنده باشد (Kumar *et al.*, 2017). القای بیان این ژن به همراه دیگر Chemokin ها مانند *CXCL10* و *CCL5* در پاسخ به سویه‌های انسانی آنفولانزا نیز مشاهده شده است (Wang *et al.*, 2009). بیان Chemokin ها در عفونت ویروسی آنفولانزا با شدت بیماری و مرگ و میر در ارتباط است (de Jong *et al.*, 2006; Kobasa *et al.*, 2007; Arankalle *et al.*, 2010). این پاسخ شدید ایمنی و التهابی میزبان موجب آسیب دائمی بافت شش می‌شود که به شکست این اندام و نهایتاً مرگ میزبان منتهی خواهد شد (Kuribayashi *et al.*, 2013; Cornelissen *et al.*, 2013; Burggraaf *et al.*, 2014; Ranaware *et al.*, 2016). این پاسخ بارها در مدل‌های انسانی و حیوانی آلوده شده با ویروس‌های پاندمیک H5N1 مشاهده شده است (de Jong *et al.*, 2006; La Gruta *et al.*, 2007; Szretter *et al.*, 2007; Cameron *et al.*, 2008; Kobasa *et al.*, 2007; Cillo *et al.*, 2009; Kumar *et al.* (2016)). ژن *CCL4* را به عنوان یکی از هسته‌های مهم شبکه‌های درگیر در بیماری‌زایی مولکولی ویروس آنفولانزا برشمردند. بیان Chemokin ها به طور قابل توجه‌ای مسئول فراخوانی سلول‌های تک هسته‌ای و لنفوسیت‌ها به داخل بافت‌های آلوده به ویروس است (Kumar *et al.*, 2016).

## نتیجه‌گیری کلی

ادغام مجموعه داده‌های ترنسکریپتوم با استفاده از فراتحلیل می‌تواند درک بهتری نسبت به تجزیه‌های انفرادی ایجاد نماید. در این پژوهش به منظور پیدا کردن ژن‌های بیان شده به صورت متمایز در پاسخ به آنفولانزا، داده‌های ریزآرایه موجود در پاسخ به ویروس H5N1 را که همواره چالش‌های بزرگی در صنعت طیور ایجاد می‌نماید مورد فراتحلیل قرار دادیم. نقش ژن‌های *IL6* و *IRF7* در جوجه‌ها هنگام پاسخ به ویروس پیش از این نیز مورد تاکید قرار گرفته بود، اما ژن‌های *STK17B*، *CCL4* و *MCM9* دست‌آوردهای جدید فراتحلیل بودند که می‌توانند مورد بررسی بیشتر قرار گیرند. این ژن‌ها می‌توانند نقش حیاتی در تنظیم پاسخ میزبان به بیماری ایفا نمایند. در مراحل بعد می‌توان به پژوهش‌های مبتنی بر عملکرد نظیر تجزیه شبکه و تجزیه گروه‌های عملکردی پرداخت. این پژوهش‌ها می‌توانند نقش ژن‌های بیان شده به صورت متمایز و مکانیزم‌های تحت کنترل آنها را در پاسخ به ویروس H5N1 روشن‌تر نمایند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از Risa Indriani و NLPI Dharmayanti در مرکز تحقیقات دامپزشکی اندونزی (شهر Bogor) به جهت اجرای چالش آزمایشگاهی پرندگان با ویروس آنفولانزا و فراهم نمودن نمونه‌های مورد نیاز برای Real-time PCR و نیز آقای دکتر فرهید همت‌زاده در دانشگاه آدلاید استرالیا به جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و سایر همکاری‌های ارزنده‌شان، کمال تشکر را دارند.

## فهرست منابع


Arankalle V. A., Lole K. S., Arya R. P., Tripathy A. S., Ramdasi A. Y., Chadha M. S., Sangle S. A. and Kadam D. B. 2010. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H5N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. PLoS ONE, 5: e13099.

Burggraaf S., Karpala A. J., Bingham J., Lowther S., Selleck P., Kimpton W. and Bean A. G. 2014. H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks. Virus Research, 185: 23-31.

Cagle C., To T. L., Nguyen T., Wasilenko J., Adams S. C., Cardona C. J., Spackman E., Suarez D. L. and Pantin-Jockwood M. J. 2011. Pekin and Muscovy ducks respond differently to vaccination with a H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) commercial inactivated vaccine. Vaccine, 29: 6549-6557.

Cameron C. M., Cameron M. J., Bermejo-Martin J. F., Ran L., Xu L., Turner P. V. et al. 2008. Gene expression analysis of host innate immune responses during lethal H5N1 infection in ferrets. Journal of Virology, 82:11308-11317.

Cilloniz C., Shinya K., Peng X., Korth M. J., Proll S. C., Aicher L. D., Carter V. S., Chang J. H., Kobasa D., Feldmann F., Strong J. E., Feldmann H., Kawaoka Y. and Katze M. G.. 2009. Lethal influenza virus infection in Macaques is associted with early dysregulation of inflammatory related genes. PloS Pathogens, 5(10): e1000604.

Cornelissen J. B. W. J., Post J., Peeters B., Vervelde L. and Rebel J. M. J. 2012. Differential innate responses of chickens and ducks to low-pathogenic avian influenza. Avian Pathology, 41: 519-529.

Cornelissen J. B. W. J., Vervelde L., Post J. and Rebel J. M. J. 2013. Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. Avian Pathology, 42: 347-364.

De Jong M. D., Simmons C. P., Thanh T. T., Hien V. M., Smith G. J., Ghau T. N., Khanh T. H., Dong V. C., Qui P. T., Cam B. V., Ha do Q., Guan Y., Peiris J. S., Chinh N. T., Hien T. T. and Farrar J. 2006. Fatal outcome of human influenza a (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. Nature Medicine, 12: 1203-1207.

Hartford S. A., Luo Y., Southard T. L., Min I. M., Lis J. T. and Schimenti J. C. 2011. Minichromosome maintenance helicase paralog MCM9 is dispensible for DNA replication but functions in germ-line stem cells and tumor suppression. PNAS, 108: 43.

Hong F. and Breitling R. 2008. A comparison of meta-analysis methods for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. Bioinformatics, 24(3): 374-82.

Kim D. K., Kim C. H., Lamont S. J., Keeler J. R. and Lillehoj H. S. 2009. Gene expression profiles of two B-complex disparate, genetically inbred Fayoumi chicken lines that differ in susceptibility to *Eimeria maxima*. Poultry Science, 88: 1565-1579.

Kim T. H. and Zhou H. 2015. Functional analysis of chicken IRF7 in response to dsRNA analog poly (I:C) by integrating overexpression and knockdown. PLoS ONE, 10(7): e0133450.

Kobasa D., Jones S. M., Shinya K., Kash J. C., Copps J., Ebihara H., Hatta Y., Kim J. H., Halfmann P., Hatta M., Feldmann F., Alimonti J. B., Fernando L., Li Y., Katze M. G., Feldmann H. and Kawaoka Y. 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. Nature, 445: 319-323.

Kuchipudi S. V., Tellabati M., Sebastian S., Londt B. Z., Jansen C., Vervelde L., Brookes S. M., Brown L. H., Dunham S. P. and Chang K. C. 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).

Kumar A., Vijayakumar P., Gandhale P. N., Ranaware P. B., Kumar H., Kulkarni D. D., Raut A. A. and Mishra A. 2017. Genome-wide gene expression pattern underlying differential host response to high or low pathogenic H5N1 avian influenza virus in ducks. Acta Virologica, 61(1):66-76.

Kumar P. V., Raut A. A., Kumar A., Chingtham S., Dutta R., Singh H., Kumar Jatawa S., Pradeep N., Sudhakar S. B., Pal Singh V. and Mishra A. 2016. Reverse engineering of Genome-wide gene regulatory networks of avian influenza infection in chicken lungs. Veterinary Research International, 4(3): 99-105.

Kuribayashi S., Sakoda Y., kawasaki T., Tanaka T., Yamamoto N., Okamatsu M., Isoda N., Tsuda Y., Sunden Y., Umemura T., Nakajima N., Hasegawa H. and Kida H. 2013. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS ONE, 8: e68375.

La Gruta N. L., Kedzierska K., stambas J. and Doherty P. C. 2007. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. Immunology and Cell Biology, 85(2): 85-92.

Lee K. Y., Im J. S., Shibata E., Park J., Handa N., Kowalczykowski S. C. and Dutta A. 2015. MCM8-9 complex promotes resection of double-strand break ends by MRE11-RAD50-NBS1 complex. Nature Communications, 6: 7744.

Liang Q. L., Luo L., Zhou K., Dong J. X. and He H. X. 2011. Immune-related gene expression in response to H5N1 avian influenza virus infection in chicken and duck embryonic fibroblasts. Molecular Immunology, 48: 924-930.

Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the (-Delta Delta CT) method.

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).

Osterlund P. I., Pietila T. E., Veckman V., Kotenko S. V., Julkunen I. 2007. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type 4 IFN genes. The Journal of Immunology, 179: 3434-3442.

Pantin-Jackwood M. J., Smith D. M., Wasilenko J. L., Cagle C., Shepherd E., Sarmento L., Kapczynski D. R. and Afonso C. L. 2012. Effect of age on the pathogenesis and innate immune responses in Pekin ducks infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. Virus Research, 167: 196-206.

Ramirez-Nieto G. C. 2008. Host molecular responses in chickens infected with an avian influenza virus. Dissertation submitted to the faculty of the graduate school of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

Ranaware P. B., Mishra A., Vijayakumar P., Gandhale P. N., Kumar H., Kulkarni D. D. and Raut A. 2016. Genome wide host gene expression analysis in chicken lungs infected with avian influenza viruses. PLoS ONE, 11(14): e0153671.

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.

Reemers S. S., Groot Koerkamp M. J., Holstege F. C., van Eden W. and Vervelde L. 2009. Cellular host transcriptional responses to influenza A virus in chicken tracheal organ cultures differ from responses in *in vivo* infected trachea. Veterinary Immunology and Immunopathology, 132: 91-100.

Riel D. V., Munster V. J., de Wit E., Rimmelzwaan G. F., Foucheir R. A. M., Osterhaus A. D. M. E. and Kuiken T. 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. Immunopathology and Infectious Disease, 171: 1215–1223.

RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL http://www.rstudio.com/.

Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N. and Kawaoka Y. 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. Nature, 440: 435–436.

Smith J., Smith N., Yu L., Patron L. R., Gutowska M. W., Forrest H. L., Danner A. F., Seiler J. P., Digard P., Webster R. G. and Burt D. W. 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).

Szretter K. J., Gangappa S., Lu X., Smith C., Shieh W. J., Zaki S. R., Sambhara S., Tumpey T. M. and Katz J. M. 2007. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenz viruses in mice. Journal of Virology, 81: 2736-2744.

Wang J., Oberley-Deegan R., Wang S., Nikrad M., Funk C. J., Hartshorn K. L. and Mason R. J. 2009. Differentiaated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 in response to influenza A infection. The Journal of Immunology, 182: 1296-1304.

Wang Y., Brahmakshatriya V., Lupiani B., Reddy S. M., Soibam B., Benham A. L., Gunaratne P., Liu H., Trakooljul N., Lng N., Okimoto R. and Zhou H. 2012. Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. BMC Genomics, 13(278).

Wang Y., Brahmakshatriya V., Zhou H., Lupiani B., Reddy S. M., yoon B., Gunaratne P. H., Kim J. H., Chen R., Wang J. and Zhou H. 2009. Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. BMC Genomics, 10(512).

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.

Westenius V., Makela S. M., Ziegler T., Julkunen I. and Osterlund P. 2014. Efficient replication and strong induction of innate immune responses by H9N2 avian influenza virus in human dendritic cells. Virology, 471-473.

Xing Z., Cardona C. J., Li J., Dao N., Tran T. and Andrada J. 2008. Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2. Journal of General Virology, 89: 1288-1299.

Yang Z., Chen Y., Fu Y., Yang Y., Zhang Y., Chen Y. and Li D. 2014. Meta-analysis of differentially expressed genes in osteosarcoma based on gene expression data. BMC Medical Genetics, 15: 80.

Zeng H., Goldsmith C., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Waicharoen S., Zaki S., Tumpey T. M. and Katz J. M. 2007. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology, 81(22): 12439-12449.

**Animal Production Research**

Vol. 7, No. 3, 2018 (13-23)

University of Guilan

# Identification of differentially expressed genes in $H_5N_1$ infected chickens using meta-analysis of DNA microarray datasets

**M. Salehinasab[1*], Gh. Rahimi Mianji[2], E. Ebrahimie[3], S. A. Ghafouri[4]**

1. Ph.D student, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
2. Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3. Associate Professor, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Assistant Professor, Iran veterinary organization, Tehran, Iran

(Received: 27-01-2018 – Accepted: 01-05-2018)

**Abstract**

During the last years, gene expression profiling has revealed specific genes which are involved in the regulation of host response to several diseases. Avian Influenza infection is one of the important diseases in poultry industry. The aim of the present study was to identify significantly involved genes in H5N1 infection using the meta-analysis of two DNA microarray datasets of host response to influenza infection. The meta-analysis revealed that *STK17B*, *CCL4*, *MCM9*, *IRF7* and *IL6* were differentially expressed using Fisher, AW and maxP methods. We used real-time PCR to validate the differential expression of identified genes. For this aim, the previously H5N1-infected samples were used. The real-time PCR results of all five genes confirmed the differential expression between infected and non-infected samples and also the type of regulation obtained from meta-analysis significantly. The genes *IL6*, *IRF7* and *CCL4* were over expressed while *STK17B* and *MCM9* were down expressed in infected samples. The results suggested that the meta-analysis is a robust method to find differentially expressed genes which may be ignored in individual analysis. These genes may play some critical roles in host response.

**Keywords:** Avian influenza, Host response, Real-time PCR, Differential expression, Meta-analysis

*Corresponding author: monasalehinasab@gmail.com