

بررسی پروتئین‌های مهم در ایجاد عفونت به‌واسطه ویروس نیل غربی در سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه^۱

رضا حسین‌زاده^۱، مهناز محمدی^۱، صبا طاهری^{۱*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: ویروس نیل غربی عفونتی بوده که از طریق بندپایان خونخوار منتقل می‌شوند. تظاهرات چشمی یکی از ویژگی‌های عفونت ویروس نیل غربی است. آن‌ها بیشتر در ارتباط با بیماری عصبی شدید رخ می‌دهند. در این مطالعه با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک به بررسی و کاندید نمودن ژن‌های موجود در مسیرهای وابسته به عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم پرداختیم.

روش بررسی: در این مطالعه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و با مراجعه به پایگاه داده GEO دیتاست مناسب برای آنالیز انتخاب گردید. این دیتاست شامل پروفایل بیان ژنی در عفونت ویروس نیل غربی با سلول‌های رنگدانه‌ای شبکیه بود. کلاسترها ژنی با بیان بالا و پایین دسته‌بندی شدند. برای ارزیابی دقیق‌تر داده از پایگاه‌های داده غنی همچون Enrichr و STRING و Networkanalyst استفاده شد. ژن‌های کاندید شده را جدا نمودیم و ارتباط پروتئینی آن با استفاده از نرمافزار cytoescape ورژن ۳.۷.۱ سنجیده شد. مقادیر به دست آمده که $P < 0.05$ به عنوان داده‌های معنی‌دار انتخاب شد.

نتایج: ۸۳۰ ژن با بیان بالا و ۵۰۰ ژن با بیان پایین در مسیرهای پیشرفت عفونت ویروسی نیل غربی در چشم نقش دارند. مسیرهای آپوپتوز، نکروپتوزیس، اتوفاژی AMPK و MAPK به صورت بارزی مشاهده شدند. پس از ارزیابی ارتباط بین شبکه‌های پروتئینی، JAK2 و STAT1/RIPK1 افزایش بیان و ژن‌های MAPK8.GSK3B و TSC2 کاوش بیان داشتند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌ها و ژن‌های مهمی در تقویت التهاب ویروس نیل غربی در شبکیه چشم نقش عمده‌ای داشته که از میان آن‌ها JAK2 و STAT1، TSC2 و RIPK1 نقش بارزتری را در این مسیر نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ویروس نیل غربی، پروفایل بیان ژن، آنالیز بیوانفورماتیک، سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه

ارجاع: حسین‌زاده رضا، محمدی مهناز، طاهری صبا. بررسی پروتئین‌های مهم در ایجاد عفونت به‌واسطه ویروس نیل غربی در سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی بزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۱): ۷۰-۷۴۵۹.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱۵۶۳۵۸۱۰۵، پست الکترونیکی: s.taheri@iiau.ac.ir، صندوق پستی: ۳۳۱۴۷ - ۶۷۶۵۳

مقدمه

توزیع پراکنده یا خطی ضایعات کوریورتینال ببرد. دلیل الگوی توزیع چنین ضایعاتی نامشخص بود، اما تصور می‌شد که رگهای خطی سیر عروق مشیمیه را دنبال می‌کنند (۶-۸) (شکل ۱). به همین دلیل یافتن مسیرهای سیگنالی، ژن‌ها و محصولات پروتئینی مرتبط با ویروس نیل غربی یک راهکار درمان با پتانسیل بالا را ارائه می‌دهد. هر یک از پروتئین‌های ویروسی، اعم از ساختاری یا غیرساختاری، نقش متفاوت و خاصی در بیولوژی و یا پاتوژن عفونت‌های WNV ایفا می‌کنند. در یک دهه گذشته استفاده از دانش بیوانفورماتیک کمک شایانی به یافتن انواع بیومارکرها از سطح ژنوم تا پروتئوم را در انواع مختلف بیماری‌ها و به خصوص بیماری‌های عفونی به همراه داشته است (۹-۱۱). این امر موجب شده که در این مطالعه با استفاده از آنالیزهای پیوسته و یکپارچه بیوانفورماتیک به بررسی پروفایل بیان ژن عفونت به‌واسطه ویروس نیل غربی در سلول‌های رنگدانه شبکیه پرداخته و مسیرها و پروتئین‌های اختصاصی در این سلول‌ها را جداسازی و مورد ارزیابی بیشتر قرار دهیم.

روش بررسی

دیتاست پروفایل بیان ژن ویروس نیل غربی با سلول‌های رنگدانه شبکیه چشم: در این مطالعه دیتاست GSE30719 از GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) پایگاه داده داده انتخاب شده و مورد استفاده قرار گرفت. این دیتاست دارای ۸ نمونه است که شامل دو گروه ۴ عضوی به صورت سلول‌های سالم شبکیه چشم و سلول‌هایی که ۲۴ ساعت از عفونت آن‌ها به WNV گذشته است بود. پلتفرم استفاده شده در این دیتاست GPL6244 - Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array بود.

آماده‌سازی داده‌های پروفایل بیان ژن برای انجام آنالیزهای تکمیلی: دیتاست GSE30719 را به کمک آنالیز GEO2R جداسازی کرده سپس ژن‌های با $\log_{10}FC < -1.4, p < 0.05$ ، $\log_{10}FC > 1$ جدا نموده و پس از آن ژن‌های با بیان بالا و پایین را دسته‌بندی نمودیم. در نهایت داده‌ها را در فایل اکسل ذخیره نموده و برای سایر آنالیزها آماده کردیم (شکل ۲).

در میان ویروس‌های نوظهور منتقله از بندپایان (arbovirus)، ویروس نیل غربی (WNV) یک فلاوی ویروس است که می‌تواند با عفونت‌های عصبی شدید در انسان مرتبط باشد. در سال ۲۰۱۸، اپیدمی WNV اروپا منجر به بیش از ۲۰۰۰ مورد شد که نشان دهنده مهم‌ترین ابیدمی آربوویروس در قاره اروپا است. مشخص کردن التهاب و بیومارکرهای عصبی منتشر شده در طول عفونت WNV، بهویژه در زمینه اختلالات عصبی، می‌تواند بینشی در مورد توسعه ابزارهای پیش‌بینی که می‌تواند برای نتایج بیمار مفید باشد، ارائه دهد (۱). تظاهرات چشمی یکی از ویژگی‌های عفونت ویروس نیل غربی است. آن‌ها بیشتر در ارتباط با بیماری عصبی شدید رخ می‌دهند. کوریورتینیت خطی نشان دهنده تشخیص است و ممکن است در صورت همراهی با علائم سیستمیک تحریک کننده و در یک زمینه اپیدمی، شک تشخیصی را ایجاد کند. تظاهرات التهابی چشمی متفاوت دیگری از جمله یووئیت قدامی، واسکولیت انسدادی شبکیه، نوریت بینایی و دوبینی گزارش شده است. پاتوفیزیولوژی بیماری چشمی نامشخص است، اما نشان دهنده تهاجم به سلول‌های عصبی است. اگرچه در گیری چشمی اغلب بدون عواقب بینایی برطرف می‌شود، برخی از بیماران ممکن است بینایی دائمی خود را از دست بدهنند که نیاز به توسعه یک درمان و/یا واکسن خاص را افزایش می‌دهد (۲). مطالعات اخیر بر کوریورتینیت چند کانونی با ظاهر معمولی فوندوسکوپیک و آنژیوگرافی فلورسینی ضایعات کوریورتینال به عنوان یک یافته اولیه و مکرر در عفونت ویروس نیل غربی (WNV) مشخص شده است. نشانگر اختصاصی بیماری، بهویژه در بیمارانی که با منژروانسفالیت مراجعه می‌کنند. مشخص شد که خوشبندی خطی ضایعات کوریورتینال یک ویژگی برجسته است که در بیش از ۸۰ درصد چشم‌های مبتلا به کوریورتینیت مرتبط با WNV رخ می‌دهد (۳-۵). پاتوژن کوریورتینیت مرتبط با WNV هنوز مشخص نشده است. حدس زده شده است که انتشار هماتوژن WNV به کوریوکاپیلاریس در طی ویرمی ممکن است مشیمیه را برای ایجاد کوریورتینیت چند کانونی با

چشم نشان دادند. آنالیز پروفایل بیان ژن GSE30719 نشان داد که ۸۱۲ ژن با بیان بالا و ۵۰۰ ژن با بیان پایین می‌توانند در مسیرهای عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم نقش داشته باشند. مسیرهای نکروپتوز، آپوپتوز، NK Kappa B, TNF alpha, NOD like receptor کرونا ویروس، هپاتیت C و نقص ایمنی بیان بالا داشته و مسیرهای هدایت آکسونی، AMPK، Mtor، اتوفاژی، مقاومت به انسولین و مسیر وابسته به هرپس ویروس بیان پایین داشتند (شکل ۴ و جدول ۱).

آنالیز Gene Ontology: در این قسمت ما ژن‌های با بیان بالا و پایین را در دو بخش فرآیندهای سلولی و عملکردهای مولکولی ارزیابی کردیم. در بخش فرایندهای زیستی مسیرهای چرخه سلولی، پردازش فرایندهای سلولی، خود تنظیمی مثبت در مسیرهای متابولیسمی، تنظیم فرایندهای بیوسنتزی و انتقالات درون سلولی، همچنین در عملکردهای مولکولی فسفات‌ها، اتصالات فریزلد، اتصالات اینترگرین‌ها، فاکتور رشد رگ‌های اندوتیالی ۲ و فعالیت سایتوکاین‌ها وجود داشتند. همین بررسی به طور مشابه برای ژن‌های با بیان پایین نیز صورت گرفت که مسیرهای تنظیم متابولیسم فسفر، تنظیم تحرک سلولی، پاسخ به استرس‌های سلولی، پاسخ به مولکول‌های آلی، سازماندهی اندامک‌های سلولی و اصلاح ساختار ماکرومولکول‌ها در فرآیندهای زیستی و فعالیت NADH dehydrogenase و ATP در عملکردهای مولکولی شرکت داشتند.

آنالیز شبکه پروتئینی: در این مرحله ژن‌های با بیان بالا و پایین را که در مسیرهای مهم شرکت داشتند، بررسی نمودیم. بر این اساس در شبکه پروتئینی با بیان بالا ۱۴۷ گره و ۷۱۰ لبه و برای شبکه پروتئینی با بیان پایین ۱۳۸ گره و ۳۱۰ لبه تشکیل شده است که ارتباط بین پروتئین‌ها در مسیرهای عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم مشخص شده‌اند (شکل ۷).

بررسی مسیرهای سیگنالی: از دیتاست GSE30719 ژن‌هایی که دارای افتراق بیان بودند را به صورت جداگانه با Enrichr پایگاه داده (https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) و به کمک KEGG مسیرهای سیگنالی مرتبط و ژن‌های دخیل در هر کدام را انتخاب کردیم. لازم به ذکر است که $p < 0.05$ را برای مطالعه مسیرهای سیگنالی مورد بررسی قرار دادیم (شکل ۳).

بررسی ماهیت ژن‌ها: در این قسمت، از مسیرهای سیگنالی منتخب و مرتبط با عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم ژن‌های آن‌ها را جدا نموده و به کمک پایگاه panther (http://www.pantherdb.org/) و Enrichr (geneListAnalysis.do) دو بخش، فرایندهای زیستی (BP) و عملکردهای مولکولی (MF) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه سنجش ژن‌های با بیان بالا به دلیل انتخاب بیومارک مناسب به خصوص در اجزای سلولی بیشتر حائز اهمیت بود. در قدم بعدی ده ژنی که بیشترین بیان و کمترین بیان را داشتند نیز به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این قسمت نیز برای انتخاب بهترین ژن‌ها $p < 0.05$ بررسی گردید.

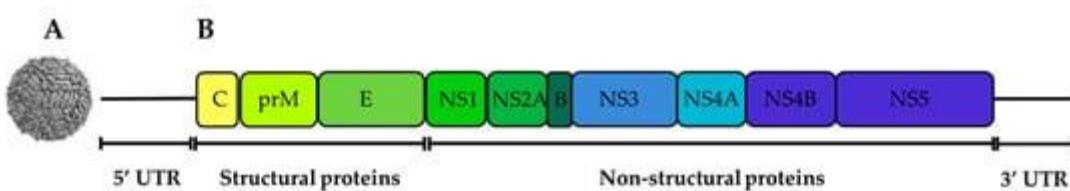
بررسی ارتباط بین پروتئین‌ها: ژن‌های انتخاب شده از مسیرهای سیگنالی و GO در پایگاه داده STRINGs (https://string-db.org) آپلود شده و شبکه ارتباط بین پروتئین‌ها را به دست آوردیم. برای نمایش بهتر داده‌ها از نرم‌افزار cytoescape ورژن ۳.۷.۱ استفاده نمودیم.

تجزیه و تحلیل آماری

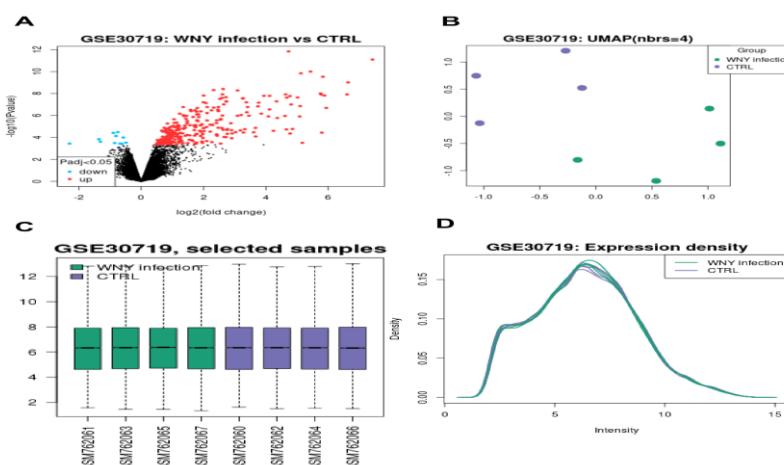
داده‌های بیوانفورماتیک در این مطالعه بر اساس روش‌های قید شده و به صورت پیوسته و یکپارچه مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین مقادیر به دست آمده که $p < 0.05$ به عنوان داده‌های معنی‌دار انتخاب شد.

نتایج

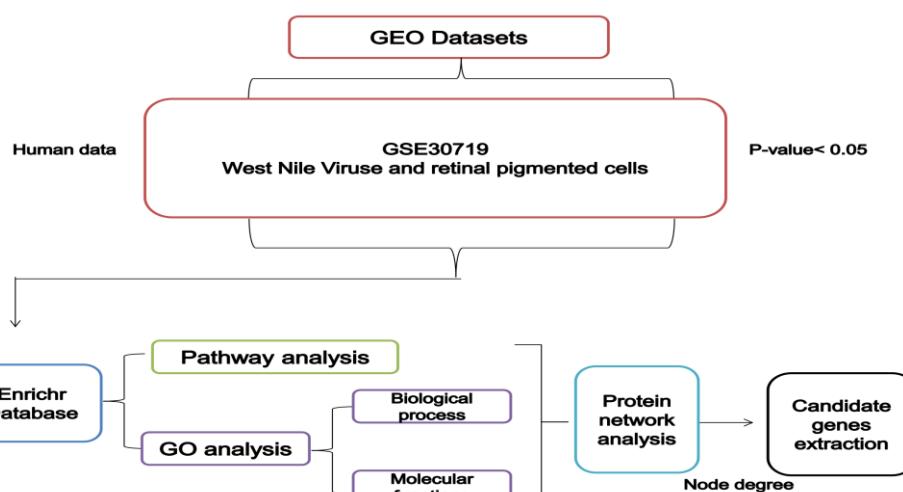
ژن‌های آپوپتوز، نکروپتوز، Wnt و toll like receptor افتراق بیان بارزتری در عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه



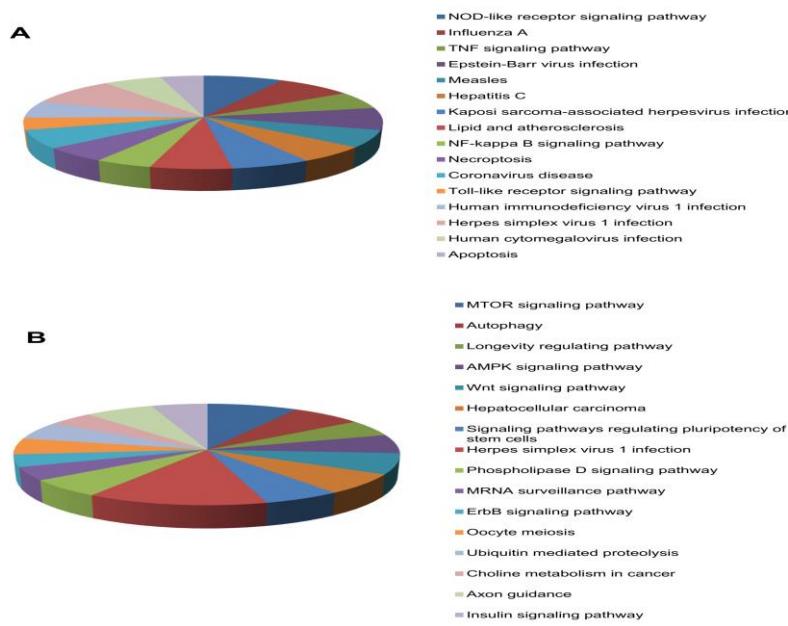
شکل ۱: ساختار ویریون (WNV) و ژنوم ویروسی با طول ۱۱ کیلو جفت باز که با یک ORF کد کننده: B ۳ پروتئین ساختاری و ۷ پروتئین غیر ساختاری نشان داده شده است منبع: اقتباس شده از De Filette و همکاران (۷،۸).



شکل ۲: اطلاعات کلی از پروفایل بیان ژن دیتاست GSE30719 که مرتبط با عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم است به دست آمده است. بر همین اساس تصویر A نموار ولکانو افتراق بیان ژن‌ها را بین این دو گروه نشان داده است. در تصویر B نمودار تراکم بیان ژن‌ها نشان می‌دهد برای آنالیز گزینه مناسبی هستند. تصویر C بار پلات از میزان تعداد ژن‌های معنی‌دار بوده و نمودار در اراباط با شاخص T STATIC است. نمودار جعبه‌ای نمونه‌های هر گروه را نیز نشان می‌دهد. تصویر D میزان تراکم افتراق بیان ژن‌ها را در هر گروه نشان داده است.



شکل ۳: مسیر شماتیک نحوه انجام آنالیز بیوانفورماتیک

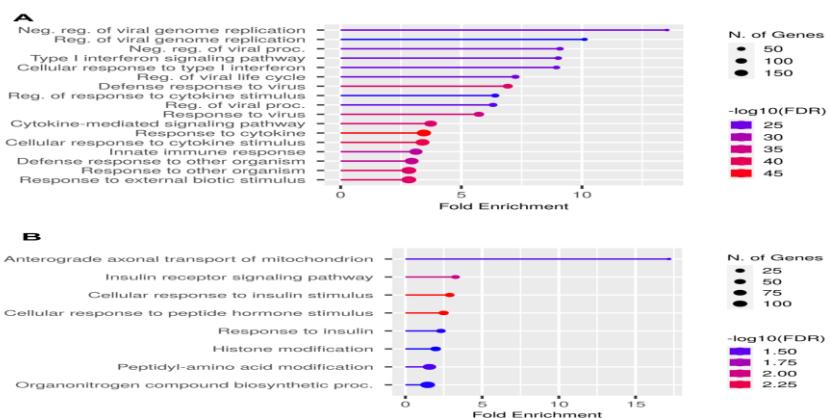


شکل ۴: ارزیابی مسیرهای سیگنالی که A برای ژن‌های با بیان بالا و B برای ژن‌های با بیان پایین مشخص شده‌اند.

جدول ۱: ده ژن اول که بیشترین اختراق بیان را در عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم، داشتند

Genes	LogFC	p
Upregulated genes		
<i>IFIT2</i>	7.417827	8.04E-12
<i>RSAD2</i>	6.635931	9.78E-10
<i>IFIT1</i>	6.602351	1.22E-08
<i>HERC5</i>	5.936329	2.05E-07
<i>MX1</i>	5.879933	1.53E-08
<i>IFIT3</i>	5.825981	2.98E-10
<i>CXCL10</i>	5.792486	3.72E-05
<i>IFIH1</i>	5.776979	1.26E-08
<i>IFI44</i>	5.752388	9.97E-09
<i>IFI44L</i>	5.431245	1.01E-10
Downregulated genes		
<i>TNFRSF10D</i>	-2.29697	3.66E-04
<i>NT5DC2</i>	-1.35334	1.47E-04
<i>FAM172A</i>	-1.30904	2.47E-04
<i>CERK</i>	-1.06265	4.65E-03
<i>RPL27A</i>	-1.03198	6.24E-03
<i>APPL2</i>	-1.02492	5.19E-03
<i>FAM173B</i>	-1.01513	2.66E-02
<i>WRB</i>	-1.00331	2.52E-03
<i>ZMAT3</i>	-0.99858	3.97E-02
<i>SESN3</i>	-0.99609	1.71E-03

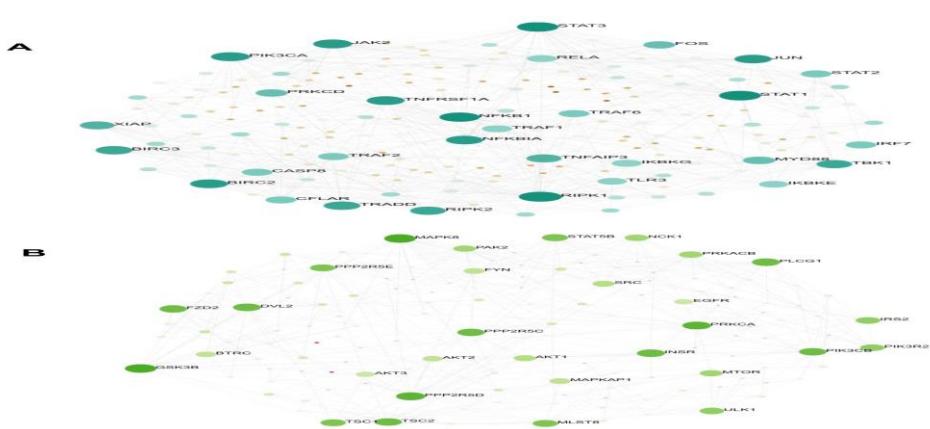
بررسی پروتئین‌های مهم در ایجاد عفونت به‌واسطه ویروس نیل غربی



شکل ۵: بار پلاٹ بین فرایندهای زیستی در عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم که بیان بالا و پایین داشتند به کمک پایگاه داده GO ترسیم شدند.



شکل ۶: در این تصویر که به صورت خوشبندی سلسله مراتبی است، عملکردهای مولکولی بین ژن‌های با بیان بالا و پایین عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم مشخص شدند.



شکل ۷: شبکه پروتئینی بین ژن‌های با بیان بالا و پایین در عفونت ویروس نیل غربی در شبکیه چشم مشخص شده‌اند.

جدول ۲: بیشترین ارتباطات پروتئین‌های با بیان بالا و پایین در شبکه ترسیم شده

Proteins	Degree	Betweenness
Upregulated proteins		
RIPK1	44	1489.76
STAT1	40	2132.44
STAT3	39	1473.57
NFKB1	36	1949.96
PIK3CA	32	1700.75
JAK2	32	1637.49
TNFRSF1A	30	593.55
BIRC2	30	414.34
JUN	28	943.36
NFKBIA	28	677.21
Downregulated proteins		
GSK3B	25	1307.92
MAPK8	25	924.36
PPP2R5D	21	834.75
PRKCA	20	1304.65
DVL2	19	733.84
PLCG1	19	708.55
INSR	19	563.78
TSC2	18	571.63
PIK3CB	18	554.25
FZD2	18	540.31

با ضایعات به طور گستردگی یا در آرایه‌های خطی، یووئیت بدون ضایعات کانونی، واسکولیت انسدادی شبکیه، اسکار کوریورتینیال مادرزادی ثانویه به انتقال داخل رحمی، و نوریت بینایی (۱۲، ۱۳)، به همین دلیل این ویروس اگر ساده انگاشته شود می‌تواند عاقب جبران ناپذیری را به همراه داشته باشد. ما در این مطالعه به طور دقیق و همه‌جانبه به شفاف‌سازی ژن‌های دخیل در این عفونت خطرناک چشمی پرداخته و مسیرهای سیگنالی، ژن‌ها و محصولات پروتئینی مهم و دخیل در تضعیف ساختار شبکیه را ارزیابی کردیم. تا کنون فقط یک مطالعه با رویکرد نزدیک به این مطالعه صورت گرفته است. مطالعه Erazo و همکاران نشان داد، خوشبندی عملکردی داده‌های میکروواری نشان داد که خوشه‌های ژنی درگیر در پاسخ‌های ایمنی و ضد ویروسی، شامل ژن‌هایی مانند کموکاین (موتیف C-C) لیگاند ۲ (CCL2)، کموکاین (موتیف C-C)، لیگاند ۵ (CCL5) و

بحث

شیوع بیماری‌های وابسته به عفونت‌های ویروسی در کشور ایران نیز رو به افزایش است. از سوی دیگر سیستم ایمنی افراد در دراز مدت تضعیف شده و یا خود بدن در دوران کهولت سنی رو به زوال می‌رود و از این‌رو که جمعیت کشور ایران به سمت کهن‌سالی در حرکت است یکی از علل مهم و چالش‌برانگیز در آینده نزدیک ایران خواهد بود و این مطالعه می‌تواند مخاطرات این موضوع را برای ما شفاف کرده تا بتوانیم مدیریت درمان بهتری را اتخاذ کنیم. از زمان اولین توصیف درگیری داخل چشمی ثانویه به عفونت WNV در سال ۲۰۰۳، چندین عاقب چشمی شناسایی شده است. بر اساس تجربه بالینی بیماران و بررسی مطالعات دیگر، پنج دسته از تظاهرات داخل چشمی عفونت WNV شناسایی شدند. اینها عبارتند از کوریورتینیت

کمک شایانی به پیشرفت عفونت در شبکیه چشم نموده و شاید منجر به نابینایی گردد. مبدل‌های سیگنال و فعال‌کننده‌های رونویسی STAT1 برای پاسخ‌های سلولی به اینترفرون‌های نوع IFN-Is (I)، با ظرفیت تعیین نتیجه عفونت ویروسی حیاتی است. قبلًا نشان داده شد که در حالی که موش‌های نوع وحشی (WT) دچار بیماری خفیف می‌شوند و از عفونت با ویروس LCMV مosh‌های دارای کمبود STAT1 عفونت LCMV می‌شود که باسته به سلول‌های CD4+ و IFN-I است. IFN-I به عنوان پلی‌بین ایمنی ذاتی و انطباقی عمل می‌کند. Junag و همکاران سهم نسبی STAT1 را در ایمنی ذاتی و تطبیقی در طول عفونت LCMV تعیین کردند. این گروه نشان داد که کمبود STAT1 منجر به یک بیماری دوفازی به دنبال عفونت LCMV می‌شود. فاز اولیه بیماری مبتنی بر ایمنی ذاتی با کاهش وزن سریع، ترومبوسیتوپنی، پاسخ‌های سیتوکین و کموکاین سیستمیک و نفوذ لکوسیت در اندام‌های آلوده مشخص می‌شود. در غیاب پاسخ ایمنی تطبیقی، این مرحله اول بیماری تا حد زیادی برطرف شده و منجر به بقای میزان آلوده می‌گردد. با این حال، در حضور ایمنی تطبیقی، بیماری به مرحله دوم با ادامه تولید سیتوکین و کموکین، تخلیه مداوم لکوسیت به بافت‌های آلوده و در نهایت مرگ میزان پیشرفت نمود (۲۰). عفونت سیتومگالوویروس انسانی (HCMV) چندین فعالیت متابولیکی را القا می‌کند که برای تکثیر ویروس ضروری هستند. علی‌رغم نقش مهمی که این مدولاسیون متابولیک در طول عفونت ایفا می‌کند، مکانیسم‌های ویروسی درگیر تا حد زیادی نامشخص است. Sanchez و همکاران متوجه شدند که پروتئین UL38 HCMV مسئول بسیاری از جنبه‌های فعال‌سازی متابولیکی با واسطه HCMV است، به‌طوری که UL38 برای تحریک فعال‌سازی گلیکولیتیک و القای کاتابولیسم اسیدهای آمینه خاص ضروری و کافی است. نقش برنامه‌ریزی مجدد متابولیک UL38 به تعامل آن با TSC2، یک سرکوب کننده تومور که سیگنال‌دهی mTOR را مهار می‌کند، بستگی دارد. علاوه بر این، از بین بردن TSC2 با واسطه shRNA

(CXCL10) لیگاند ۱۰ (mokine) و گیرنده مشابه TLR3). در ارتباط با تجزیه و تحلیل کمی PCR، سایر ژن‌های جدید تنظیم‌شده توسط عفونت WNV شامل ایندول آمین ۲،۳-دی‌اکسیژناز (IDO1)، ژن‌های دخیل در مسیر تبدیل فاکتور رشد-β (پروتئین مورفوژنتیک استخوان و همولوگ مهارکننده متصل به غشاء اکتیوین هستند. [BAMBI] و فاکتور رونویسی فعال کننده ATF3)، ژن‌های دخیل در آپوپتوز درخانواده گیرنده فاکتور نکروز تومور، عضو d ۱۰ TNFRSF10D)، RPE تولید نمی‌کند، که نشان می‌دهد IDO1 توسط سایر عوامل محلول، توسط ویروس به تنها یا هر دو القا می‌شود (۱۴). سرین/ترئونین - پروتئین کیناز ۱ (RIPK1) با گیرنده برهم‌کنش برای اولین بار به عنوان پروتئینی کشف شد که با گیرنده مرگ (Fas1)، در مسیر انتقال سیگنال که منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود، در تعامل است (۱۵،۱۶). از آن زمان، RIPK1 به عنوان یک مولکول مرکزی که مسیرهای بیولوژیکی متعددی را که منجر به مرگ و التهاب سلولی می‌شود، تنظیم می‌کند. نقش آن در تنظیم ایمنی اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۷). هدف اولیه سیستم ایمنی محافظت از میزان در برابر عوامل بیماری زا است. RIPK3 همراه با RIPK1 سیگنال‌هایی را برای بیان کموکاین و برای فراخوانی لکوسیت‌های ضد ویروسی نفوذی در سیستم عصبی مرکزی در طول عفونت WNV نشان می‌دهد. موش‌هایی که فرم مرده کیناز RIPK1 را بیان می‌کردن، حساسیت بیشتری به عفونت WNV نشان دادند. حتی اگر مکانیسم‌های مولکولی این اثر کاملاً درک نشده باشند، این داده‌ها نقش محافظتی RIPK1 در برابر WNV را نشان می‌دهند. مطالعات سطح RIPK1 بر عفونت WNV می‌تواند به تعیین اینکه آیا WNV مانع از سیگنال‌دهی با واسطه RIPK1 می‌شود کمک کند (۱۸،۱۹). پروتئین‌هایی که در این مطالعه مورد انتخاب قرار گرفتند، به خاطر مطالعات محدود مولکولی بر روی این ویروس اطلاعاتی مستقیمی از آن‌ها در دسترس نیست اما به‌طور کلی این امر مشخص است که این پروتئین‌ها در مسیرهای التهابی نقش کلیدی داشته و می‌توانند در موقع عفونت

مؤثر ضد WNV IFN هدایت می‌کند. عفونت WNV در سلول‌های موش $\text{IFIT2}^{-/-}$ یا $\text{IKK}\epsilon^{-/-}$ یا $\text{IFIT2}^{-/-}$ - $\text{IKK}\epsilon$ افزایش یافت. در سلول‌های $\text{IFIT2}^{-/-}$ ، از دست دادن بیان IFN ناشی از STAT1 با کمبود Tyr-708 در STAT1 مرتبه بود، اما نه Ser-708 . فسفوریلاسیون STAT1 Ser-708 به طور مستقل از IRF-3 رخ می‌دهد، اما نیاز به سیگنال‌دهی از طریق گیرنده $\text{IFN-}\alpha/\beta$ به عنوان یک رویداد دیرهنگام در پاسخ ایمنی ذاتی ناشی از IFN دارد که با بیان ISGs پاسخگو به همزمان است. تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد که دفسفوریلاسیون STAT1 و انتقال هسته‌ای سیتوپلاسمی STAT1 با واسطه CRM1 برای فسفوریلاسیون WT ، STAT1 Ser-708 مورد نیاز است. در مقایسه با موش‌های WT ، STAT1 Ser-708 IFIT2 و بیان STAT1 Ser-708 فسفوریلاسیون STAT1 Ser-708 و بیان IFIT2 را نشان می‌دهند. نتایج یک مسیر سیگنالینگ ϵ IKK ناشی از IFN را تعریف می‌کند. فسفوریلاسیون خاص STAT1 و بیان IFIT2 را مطالعه WNV که ایمنی ضد ویروسی ذاتی را برای محدود کردن عفونت WNV و کنترل پاتوژن ویروسی ایجاد می‌کند (۲۳-۲۵). مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌ها و ژن‌های مهمی در تقویت التهاب ویروس نیل غربی در شبکیه چشم نقش عمده‌ای داشته که از میان آن‌ها JAK2 ، STAT1 ، TSC2 و RIPK1 نقش بارزتری را در این مسیر نشان دادند. البته که مطالعات مولکولی بیشتری برای اثبات دقیق‌تر مسیرهای ویروسی در چشم مورد نیاز است.

سپاس‌گزاری

این تحقیق، برگرفته از پایان‌نامه‌ای می‌باشد، که تمام منشور اخلاقی در آن رعایت و در دانشگاه آزاد واحد اسلامشهر- تهران انجام گرفته است. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، اعلام می‌نماییم.

حامي مالي: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

فنتوپهای متابولیکی مرتبط با بیان UL38 را خلاصه می‌کند. قابل‌توجه است، این گروه نشان داد که در بسیاری از موارد، فعال‌سازی شار متابولیک مرتبط با بیان UL38 تا حد زیادی mTOR مستقل از فعالیت mTOR است، زیرا مهار طیف وسیع بر القای گلیکولیز با واسطه UL38 ، مصرف گلوتامین یا ترشح پرولین یا آلانین تأثیری ندارد. در مقابل، القای غلظت متابولیت مشاهده شده با بیان UL38 تا حد زیادی به mTOR فعال وابسته است (۲۱،۲۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اینترفرون نوع IFN- I تکثیر و پاتوژن ویروس نیل غربی (WNV) را در بافت‌های سیستم عصبی محیطی و مرکزی (CNS) محدود می‌کند. با این حال، نقش درون‌تنی ژن‌های ضد ویروسی خاص که توسط IFN-I در برابر عفونت WNV القا می‌شوند، به خوبی مشخص نشده است. در مطالعه Cho و همکاران، با استفاده از موش $\text{Ifit2}^{-/-}$ ، عملکرد ضد ویروسی ژن تحریک شده با اینترفرون ISG را در محدود کردن عفونت و بیماری در داخل بدن توسط یک سویه خطرناک آمریکای شمالی WNV تعریف کردند. در مقایسه با کنترل‌های همزاد نوع وحشی، موش‌های $\text{Ifit2}^{-/-}$ عفونت WNV را به شیوه‌ای محدود بافتی با تکثیر ترجیحی در حیوانات فاقد Ifit2 نشان دادند. تجزیه و تحلیل ویروسی ماکروفازهای کشت داده شده، سلول‌های دندربیتیک، فیبروبلاست‌ها، نورون‌های سلولی گرانول مخچه، و نورون‌های قشر مغز، عملکردهای ضد ویروسی نوع سلولی خاص Ifit2 را در برابر WNV نشان داد. در مقایسه، اثرات کوچک Ifit2 بر القا یا بزرگی پاسخ‌های ایمنی ذاتی یا تطبیقی مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که Ifit2 عفونت و پاتوژن WNV را در بافت‌های مختلف به شیوه‌ای خاص نوع سلولی محدود می‌کند. ویروس نیل غربی یک ویروس در حال ظهور است که حدت آن به فرار ویروسی از IFN و دفاع ایمنی ذاتی وابسته است. فعالیت‌های ژن‌های تحریک شده با ISG (ISGs) کنترل عفونت ویروسی را ایجاد می‌کنند، اما WNV های خاص و مسیرهای ناظری که ویروس نیل غربی (WNV) را محدود می‌کنند، تعریف نشده‌اند. در اینجا نشان داده که مهارکننده فسفوریلاسیون B STAT1 ϵ $\text{IKK}\epsilon$ در سرین ۷۰۸ (Ser-708) IFIT2 بیان را برای واسطه‌سازی عملکرد

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر تایید و تمام نکات اخلاقی در آن رعایت شده است.

مشارکت نویسندها

خانم دکتر مهناز محمدی در طراحی مطالعه، خانم دکتر صبا طاهری در جمع‌آوری داده‌ها، آقای رضا حسین‌زاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندها در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

- 1-Constant O, Barthelemy J, Nagy A, Salinas S, Simonin Y. *West Nile Virus Neuroinfection in Humans: Peripheral Biomarkers of Neuroinflammation and Neuronal Damage*. Viruses 2022; 14(4): 756.
- 2-Rousseau A, Haigh O, Ksiaa I, Khairallah M, Labetoulle M. *Ocular Manifestations of West Nile Virus*. Vaccines(Basel) 2020; 8(4): 641.
- 3-Bains HS, Jampol LM, Caugron MC, Parnell JR. *Vitritis and Chorioretinitis in a Patient with West Nile Virus Infection*. Arch Ophthalmol 2003; 121(2): 205-10.
- 4-Garg S, Jampol LM. *Systemic and Intraocular Manifestations of West Nile Virus Infection*. Surv Ophthalmol 2005; 50(1): 3-13.
- 5-Vandenbelt S, Shaikh S, Capone A Jr, Williams GA. *Multifocal Choroiditis Associated with West Nile Virus Encephalitis*. Retina 2003; 23(1): 97-9.
- 6-Khairallah M, Ben Yahia S, Attia S, Zaouali S, Ladjimi A, Messaoud R. *Linear Pattern of West Nile Virus-Associated Chorioretinitis is Related to Retinal Nerve Fibres Organization*. Eye(Lond) 2007; 21(7): 952-5.
- 7-De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN. *Recent Progress in West Nile Virus Diagnosis and Vaccination*. Vet Res 2012; 43(1): 16.
- 8-Venkatesan N, Deepa P, Vasudevan M, Khetan V, Reddy AM, Krishnakumar S. *Integrated Analysis of Dysregulated Mirna-Gene Expression in HMGA2-Silenced Retinoblastoma Cells*. Bioinform Biol Insights 2014; 8: 177-91.
- 9-Chen J, Sun J, Liu X, Liu F, Liu R, Wang J. *Structure-Based Prediction of West Nile Virus-Human Protein-Protein Interactions*. J Biomol Struct Dyn 2019; 37(9): 2310-21.
- 10-Pichler S, Gu W, Hartl D, Gasparoni G, Leidinger P, Keller A, et al. *The Mirnome of Alzheimer's Disease: Consistent Downregulation of the Mir-132/212 Cluster*. Neurobiol Aging 2017; 50: 167. e1-167. e10.
- 11-Nalini V, Segu R, Deepa PR, Khetan V, Vasudevan M, Krishnakumar S. *Molecular Insights on Post-Chemotherapy Retinoblastoma by Microarray Gene Expression Analysis*. Bioinform Biol Insights 2013; 7: 289-306.
- 12-Garg S, Jampol LM. *Systemic and Intraocular Manifestations of West Nile Virus Infection*. Surv Ophthalmol 2005; 50(1): 3-13.

- 13-**Appler KK, Brown AN, Stewart BS, Behr MJ, Demarest VL, Wong SJ, et al. **Persistence of West Nile Virus in the Central Nervous System and Periphery of Mice.** PLoS One 2010; 5(5): e10649.
- 14-**Munoz-Erazo L, Natoli R, Provis JM, Madigan MC, King NJ. **Microarray Analysis of Gene Expression in West Nile Virus-Infected Human Retinal Pigment Epithelium.** Mol Vis 2012; 18: 730-43.
- 15-**Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. **RIP: A Novel Protein Containing a Death Domain that Interacts with Fas/APO-1 (CD95) in Yeast and Causes Cell Death.** Cell 1995; 81(4): 513-23.
- 16-**Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA. **Keratinocytes are Cell Targets of West Nile Virus in Vivo.** J Virol 2011; 85(10): 5197-201.
- 17-**Nagata S, Golstein P. **The Fas Death Factor.** Science 1995; 267(5203): 1449-56.
- 18-**Daniels BP, Snyder AG, Olsen TM, Orozco S, Oguin TH 3rd, Tait SWG, et al. **RIPK3 Restricts Viral Pathogenesis Via Cell Death-Independent Neuroinflammation.** Cell 2017; 169(2): 301-13.e11.
- 19-**Wang H, Siddharthan V, Hall JO, Morrey JD. **West Nile Virus Preferentially Transports Along Motor Neuron Axons after Sciatic Nerve Injection of Hamsters.** J Neurovirol 2009; 15(4): 293-9.
- 20-**Jung SR, Ashurst TM, West PK, Viengkhoun B, King NJC, Campbell IL, et al. **Contribution of STAT1 to Innate and Adaptive Immunity during Type I Interferon-Mediated Lethal Virus Infection.** PLoS Pathog 2020; 16(4): e1008525.
- 21-**Rodríguez-Sánchez I, Schafer XL, Monaghan M, Munger J. **The Human Cytomegalovirus UL38 Protein Drives Mtor-Independent Metabolic Flux Reprogramming by Inhibiting TSC2.** PLoS Pathog 2019; 15(1): e1007569.
- 22-**Maximova OA, Bernbaum JG, Pletnev AG. **West Nile Virus Spreads Transsynaptically within the Pathways of Motor Control: Anatomical and Ultrastructural Mapping of Neuronal Virus Infection in the Primate Central Nervous System.** PLoS Negl Trop Dis 2016; 10(9): e0004980.
- 23-**Wu S, Ye S, Lin X, Chen Y, Zhang Y, Jing Z, et al. **Small Hepatitis B Virus Surface Antigen Promotes Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma Via Endoplasmic Reticulum Stress-Induced FGF19/JAK2/STAT3 Signaling.** Cancer Lett 2021; 499: 175-87.
- 24-**Ferguson DD, Gershman K, LeBailly A, Petersen LR. **Characteristics of the Rash Associated with West Nile Virus Fever.** Clin Infect Dis 2005; 41(8): 1204-7.
- 25-**Anderson RC, Horn KB, Hoang MP, Gottlieb E, Bennin B. **Punctate Exanthem of West Nile Virus Infection: Report of 3 Cases.** J Am Acad Dermatol 2004; 51(5): 820-3.

Investigating the important proteins in causing West Nile virus infection in retinal pigment cells

Reza Hosseinzadeh¹, Mahnaz Mohammadi¹, Saba Taheri^{†1}

Original Article

Introduction: West Nile virus is an infection transmitted through blood-sucking arthropods. Ocular manifestations are one of the characteristics of West Nile virus infection. They occur mostly in connection with severe neurological disease. In this study, using bioinformatics analysis, we investigated and identified the genes in the pathways related to West Nile virus infection in the retina.

Methods: In this study, using bioinformatics methods and referring to the GEO dataset, the appropriate dataset was selected for analysis. This dataset included gene expression profiles in West Nile virus infection with retinal pigment cells. Gene clusters with high and low expression were categorized. For more accurate data evaluation, databases such as Enrichr, STRING and Network analyst were used. The candidate genes were isolated and their protein relationship was also measured using cytoescape software version 3.7.1. The obtained values with P-Value<0.05 were selected as significant data.

Results: The number of 830 genes with high expression and 500 genes with low expression was involved in the development pathways of West Nile virus infection in the eye. Apoptosis, necroptosis, AMPK and MAPK autophagy pathways were clearly observed. After evaluating the relationship between protein networks, RIPK1, STAT1/3 and JAK2 increased expression and GSK3B, MAPK8 and TSC2 genes had decreased expression.

Conclusion: The present study showed that important proteins and genes played a major role in strengthening West Nile virus inflammation in the retina, among which RIPK1, TSC2, STAT1 and JAK2 showed a more prominent role in this pathway.

Keywords: West Nile Virus, Gene Expression Profile, Bioinformatics Analysis., Retinal Pigment Cells.

Citation: Hosseinzadeh R, Mohammadi M, Taheri T. Investigating the important proteins in causing West Nile virus infection in retinal pigment cells. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(1): 7459-70.

¹Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Islamshahr Branch of Islamic Azad University, Islamshahr, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 02156358105, email: sabataheri@yahoo.com