نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۶، پاییز ۱۳۹۶
ص‌ص: ۱۶۱~۱۷۶

بررسی سازوکار مولکولی فعال‌سازی سامانه ایمنی گاو با استفاده از داده‌های بیان دیجیتالی لوکوسیت‌ها

- **الهام بهدانی**(نویسنده مسئول)
  دانشجو مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین–خوزستان
- **هدایت اله روشنفکر**
  استاد، گروه علوم دامی، دانشگده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین–خوزستان
- **مصطفی قادری زفره‌ای**
  استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج
- **جمال فیاضی**
  استادیار، گروه علوم دامی، دانشگده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین–خوزستان
- **محمد رضا بختیاری‌زاده**
  استادیار، گروه دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : اسفند ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۶۱۴۲۷۳
Email: el_behdabi86@yahoo.com

چکیده

کاربرد مسیرهای ژنی مؤثر در بروز صفات مختلف در اصلاح نژاد به راحتی امکان‌پذیر نمی‌باشد، اما شناسایی مسیرهای ژنی بدست آمده از برهم کنش داده‌های ترانسکریپتومی تأثیرگذار بر یک فرآیند زیستی، می‌تواند گام مهمی در فهم بهتر سازوکارهای تنظیمی آن فرآیند باشد. در این پژوهش، چگونگی سازوکار مولکولی تقویت پاسخ ایمنی با در نظر گرفتن مسیرهای ژنی فعال شده در لوکوسیت‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. برای رسیدن به این هدف، پس از پیاده‌سازی داده‌های حاصل از تکنیک توالی‌یابی رونوشت‌ها (RNA-Seq) با شماره دسترسی GSE37447 از پایگاه داده NCBI، کنترل کیفیت داده‌ها با نرم‌افزار FastQC بررسی گردید. مکان‌یابی ژن‌ها و ایزوفرم‌ها با استفاده از نرم افزار TopHat2 انجام شد و تعیین میزان بیان هر ژن و ایزوفرم با نرم‌افزار HT-Seq انجام گرفت و نهایتاً بررسی ژن‌های متفاوت بیان شده با edgeR انجام گرفت. آنالیز مسیرهای ژنی بر اساس ژن‌هایی که تفاوت بیان داشتند، با پایگاه اطلاعاتی DAVID صورت گرفت. آنالیز مسیرهای ژنی نشان داد، مسیرهای اسپلایسوزم و ترمیم اتصالات نادرست ژنوم در لوکوسیت‌ها فعال می‌شود. بنابراین، مسیرهای ژنی یاد شده می‌توانند چگونگی تقویت پاسخ ایمنی را تفسیر نمایند و به روشن شدن بهتر مسیرهای تنظیمی در این فرآیند بیولوژیکی کمک کنند. به نظر می‌رسد جهت بهبود سامانه ایمنی به کمک برنامه‌های اصلاح نژادی می‌توان از ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی، میکرو ریبونوکلئیک اسیدها و یا کوفاکتورهای دخیل در این دو مسیر ژنی (مسیر ژنی اتصال جایگزین و مسیر ترمیم اتصالات نادرست) کمک گرفت، زیرا این دو مسیر ژنی به طور مستقیم در فعال‌سازی و تنظیم فعالیت سامانه ایمنی مؤثر هستند.

واژه‌های کلیدی: داده‌های **RNA-Seq**، مسیر ژنی اسپلایسوزم، مسیر ژنی ترمیم اتصالات نادرست ژنوم ، تقویت پاسخ ایمنی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 116 pp: 161-176

Investigation on the Molecular Mechanisms of the Bovine Immune System Activation by Leukocyte Transcriptomics Data

By:1: Elham Behdani (corresponding author), PhD student, Department of Animal Sciences, faculty of Animal science and Food Industry, of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, ,Khozestan
2: Hedayatallah Roshanfekr, Professore, Department of Animal Sciences, faculty of Animal science and Food Industry, of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan
3: Mostafa Ghaderi-Zefrehei, Assisstant Professor, Department of Animal Sciences, faculty of Agriculture and Natural Resources, Yasouj University, Yasouj, Iran.
4:Jamal Fayazi, Assisstant Professor, Department of Animal Sciences, faculty of Animal science and Food Industry, of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan,
5: Mohammad Reza Bakhtiyarizadeh, Assisstant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: January 2017 **Accepted: March 2017**

It is not easy to apply gene pathway in different traits in animal breeding, But identifying of gene pathways which obtain from transcriptomics data and influence a biological process could be an important step to better understanding the regulatory mechanisms of this process. In this study, leukocyte transcriptomics data was applied to evaluation of molecular mechanism related to improving the immune response by analysis of gene pathways. To achieve this, RNA-Seq data with accession number GSE37447 was downloaded from NCBI data bank and data quality control was done by FastQC software. Detection of genes and isoforms was performed by TopHat2 software and then level of genes' and isoforms' gene expression was conducted by HT-Seq. differentially gene expression was analyzed by edgeR. Analysis of gene pathways was done by online software DAVID based on genes which had differentially gene expression. Gene pathway analysis showed spliceosome and mismatch repair pathway were activated in leukocytes. Therefore, mentioned gene pathways could explain how to strengthen of the immune response and better clarify of regulatory pathways in this biological process. It seems genes, transcription factors, microRNA and/or cofactors which involve in these gene pathways (spliceosome and mismatch repair pathway) could be helped in order to improve the immune system by inbreeding programs because these gene pathways directly influence on the immune system activation and regulation of its functions.

Key words: RNA-Seq data, spliceosome gene pathway, mismatch repair gene pathway, improvement of the immune response

مقدمه

بیماری در حیوانات باعث افزایش مرگ و میر و یا کاهش سودآوری در گله می‌شود. از طرف دیگر گاوهایی که پاسخ ایمنی بالاتری دارند، کمتر به بیماری مبتلا شده، سودآوری گله را افزایش داده و کیفیت شیر بهتری دارند. درک درست و دقیق روابط زیستی و مسیرهای ژنی(متابولیکی) که در داخل سامانه ایمنی در طی دوره‌های تنش (شامل واکسیناسیون، از شیرگیری و یا بیماری) وجود دارد، می‌تواند سازوکارهای کنترلی این سامانه ایمنی را شفاف سازد. سامانه ایمنی یکی از سامانه‌های زیست شناسی است که فعالیت آن تحت تأثیر ترکیبی از گروه‌های سلولی و مولکولی قرار دارد. این گروه‌های وسیع مولکولی از طریق مسیرهای مختلف ژنی و پیام‌دهی عملکرد این سامانه زیستی را تنظیم می‌کنند. وظیفه اصلی این سامانه پاسخ به محرک‌های درونی و بیرونی (میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا) می‌باشد. به بیان دیگر سامانه ایمنی که مجموعه‌ای از فرآیندهای مختلف زیستی را به عهده دارد با سه وظیفه دفاع، هموستازی و مراقبت مسئول سلامت و تولید بهینه حیوانات هستند (Galyean و همکاران، 1999).

نقص در سامانه ایمنی نه تنها سلامت عمومی دام را مختل می‌کند، بلکه تولید و تولید مثل حیوان را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. به همین علت است که بررسی این سامانه و شناسایی سازوکارهای مولکولی که باعث تنظیم عملکرد آن می‌شوند، یکی از زمینه‌های پژوهشی عمده هستند.

در رابطه با چگونگی راه‌اندازی پاسخ ایمنی و تفسیر سازوکار کنترلی این سامانه پژوهش‌های محدودی انجام شده است. برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند سازه‌های محرکی مانند تنش، اثر خود را بر سامانه ایمنی از طریق ایمنی ذاتی اعمال می‌کند (Elenkov and Chrousos, 1999). ایمنی ذاتی مسئول شناسایی و پاک-سازی آنتی‌ژن خارجی است و عملکرد آن به شدت بسته به گروه-های لوکوسیتی در میزبان دارد. به‌طور کلی، ایجاد سریع ایمنی ذاتی و ترشح فاکتورهای مرتبط با التهاب باعث نفوذ سلول‌های ایمنی به محل عفونت می‌شوند. لوکوسیت‌ها عوامل مهمی در سامانه ایمنی ذاتی هستند و نسبت این سلول‌ها بسته به میزان واکنش در برابر عفونت تغییر می‌یابد (Medzhitov and Janeway, 1997). ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها [1] نقش ابتدایی را به همراه پلاکت‌ها در این فرآیند دارند. O'Loughlin و همکاران در سال ۲۰۱۲ که اثر تنش از شیرگیری را بر سامانه ایمنی بررسی نمودند، گزارش کردند که طی تنش از شیرگیری تعداد کلی نوتروفیل‌ها، نسبت نوتروفیل‌ها به لنفوسیت‌ها و بیان ژن‌های مرتبط با سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IFN-γ ، IL-8، این IL-1β و TNFα افزایش می‌یابد. IFN-γ سیتوکینی است که در فرآیندهای پیش‌التهابی در عفونت‌های ویروسی ترشح می‌شود. IFN-γ باعث تقویت ایمنی سلولی می‌شود. در نتیجه افزایش IFN-γ از سلول‌های T کمک کننده نوع اول [2] باعث افزایش ایمنی ذاتی، فعال شدن نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها تحریک CD4 و مهار IL-4 از سلول‌های کمک کننده T نوع دوم [3] می‌گردد (Gajewski and Fitch, 1988؛ Boehm و همکاران، 1997). علاوه‌براین، IFN-γ باعث افزایش تعدادی از مولکول‌های چسبندگی [4] و کموکین‌ها می‌شوند. این مولکول‌ها با کمک IL-1β و TNFα باعث افزایش مهاجرت لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌گردد (Boehm و همکاران، 1997). نتایج تحقیقات نشان می‌دهند که مولکول چسبیدگی به نام CD62L نقش مهمی در مهاجرت نوتروفیل‌ها به محل عفونت و التهاب دارد (O'Loughlin و همکاران، 2011). هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی باعث افزایش نوتروفیل‌ها از طریق کاهش مولکول CD62L می‌شود (O'Loughlin و همکاران، 2011). بیان گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نوع آلفا [5]، ژن‌های مرتبط به فرآیندهای قبل از شروع مرگ سلولی و گیرنده‌های مرتبط با شناسایی باکتری‌های گرم منفی [6] از جمله سازه‌هایی بودند که بیان آنها در گوساله‌های تحت تنش از شیرگیری افزایش یافت (O'Loughlin و همکاران، 2011). کاهش تعداد لنفوسیت‌ها در این شرایط آزمایشی گزارش شده است (Cole, 2008). علت کاهش تعداد لنفوسیت‌ها احتمالاً به افزایش تراکم آنان از جریان خون به بافت‌ها و اندام‌های در معرض عفونت برمی‌گردد (Henn و همکاران، 1998). پروتئین IL-8 توسط ماکروفاژهای موجود در محل التهاب بیان می‌شوند و در جریان خون وجود ندارند. نتایج نشان می‌دهند که بیشترین غلظت این ماده در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش از شیرگیری رخ می‌دهد (O'Loughlin و همکاران، 2011). از مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که تنش، اثر عمیقی بر توزیع سلولی و عملکرد سامانه ایمنی دارد (Dhabhar, 2009؛ Saul و همکاران 2005). بنابراین، منطقی به نظر می‌رسد که با بررسی محتوای رونوشت لوکوسیت گوساله‌های در معرض تنش از شیرگیری بتوان به مسیرهای ژنی(متابولیکی) رسید که سازه اصلی فعال‌سازی سامانه ایمنی باشند.

در این پژوهش به منظور بررسی مسیرهای ژنی دخیل در فعال-سازی سامانه ایمنی از داده‌های RNA-Seq مربوط به لوکوسیت

[1] Macrophages, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, basophils

[2]. T helper 1 (Th1)

[3]. Th2

[4]. Adhesion molecules

[5]. Glucocorticoid receptor alpha (GRα)

[6]. The Gram-negative pattern recognition receptor

گوساله‌هایی استفاده شد که اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی مربوط به این گوساله‌ها نشان داده بود که سامانه ایمنی به حالت فعال در آمده و قدرت شناسایی و انهدام پاتوژن را دارند (O'Loughlin و همکاران، 2012). با توجه به اینکه هر سلول بر اساس محتوای و مقدار پروتئین موجود در آن برنامه‌ریزی می‌گردد، داده‌های بیان دیجیتالی ژن یا RNA-Seq اطلاعات بسیار دقیق و در سطح وسیعی را در رابطه با برنامه‌های جاری در سلول در اختیار قرار می‌دهد. در این پژوهش با استفاده از این اطلاعات مسیرهای ژنی مرتبط با فعال‌سازی سامانه ایمنی مورد بحث قرار گرفت. بررسی مسیریابی زیستی- ژنی حاصل از تنش یاد شده تا کنون انجام نشده است؛ لذا بررسی این موضوع، با توجه به پهنه وسیعی که سامانه ایمنی در سلامت زیستی گاو دارد، می‌تواند مدیریت ایمنی را بهتر کند. این موضوع بلاخص در مورد کشورهایی که مدیریت بسته پرورش گاو شیری دارند، که خود باعث افزایش بار تنشی بیشتر به گاو می‌شود، از اهمیت بالاتری برخوردار است.

مواد و روش‌ها

پیاده‌سازی داده‌ها و بررسی کیفیت آنها

در این پژوهش از داده‌های بیانی دیجیتالی RNA-Seq با شماره دسترسی GSE37447 استفاده شد. این داده‌ها متعلق به بررسی اثر تنش از شیرگیری بر روی ۱۲ گوساله بودند. این گوساله‌ها در دو گروه تیمار (۶ گوساله) و کنترل (۶ گوساله) مورد آزمایش قرار گرفته بودند. بر روی گوساله‌های گروه کنترل، عملیات از شیرگیری در حضور ماده گاو انجام شد و در گروه تیمار بدون حضور ماده گاو گوساله‌ها از شیر گرفته شدند. نمونه‌برداری خون در روز شروع آزمایش و روزهای ۱، ۲ و ۷ پس از اعمال تنش انجام گرفت. در مجموع ۴۸ سری داده (۲ گروه، ۱۲ گوساله و ۴ زمان نمونه‌برداری) بدست آمد. توالی‌یابی ریبونوکلئیک اسیدهای پیک موجود در لوکوسیت‌ها با استفاده از دستگاه توالی‌یاب الومینا در دانشگاه دوبلین ایرلند انجام شد (O'Loughlin و همکاران، 2012).

هدف از کنترل کیفیت بر روی داده‌های حاصل از توالی‌یابی بررسی مشکلات ناشی از دستگاه توالی‌یابی و یا مراحل آماده-سازی نمونه‌ها قبل از توالی‌یابی می‌باشد. در این پژوهش نرم‌افزار FastQC برای بررسی کنترل کیفیت بازها و خوانش‌ها، آلودگی به آداپتور استفاده شد (Andrews, 2010).

ویرایش داده‌ها و مکان‌یابی آنها بر روی ژنوم مرجع

جهت نشان دادن چگونگی کیفیت و توزیع نوکلئوتیدها، کوتاه کردن خوانش‌ها برای از بین بردن بارکد یا خطا در داده‌ها، جدا کردن توالی‌های آداپتور یا لینکر، فیلتر کردن توالی‌ها بر اساس کیفیت آنها، جداکردن برخی توالی‌ها با کیفیت پایین و تغییر نوکلئوتیدهایی با کیفیت پایین از نرم‌افزارهای fastx و trimmomatic (Bolger و همکاران، 2014) استفاده شد.

جهت مکان‌یابی خوانش‌ها، از ژنوم مرجع گاو با نام UMD3.1 از بانک اطلاعاتی ensemble، استفاده شد. برای انجام این مرحله، نرم‌افزار tophat2 (v2.0.9) مورد استفاده قرار گرفت. این نرم‌افزار قادر است مکان‌یابی را با در نظر گرفتن جایگاه‌های اتصالات جایگزین انجام دهد (Trapnell و همکاران، 2009). بدین صورت که ابتدا به مکان‌یابی خوانش‌ها می‌پردازد. در مرحله بعد خوانش‌ها را به بخش‌های کوچکتر تقسیم و آن را مکان‌یابی می‌کند. پس از مکان‌یابی یک بخش کوچک از یک خوانش، توالی را به دو طرف گسترش داده تا زمانی که دیگر نتواند توالی مکمل آن بخش خوانش را بر روی ژنوم مبدأ پیدا کند. ادامه این خوانش را در بقیه ژنوم جستجو می‌کند و از این طریق مکان‌یابی را با منظور کردن اتصالات جایگزین انجام می‌دهد(Trapnell و همکاران، 2009).

تعیین سطح بیان ژن‌ها و بررسی ژن‌ها متفاوت بیان شده

به منظور رسیدن به ژن‌هایی که در دو حالت وجود تنش و عدم وجود تنش در طول روزهای نمونه‌برداری تفاوت بیان معنی‌داری داشتند، لازم است که سطح بیان هر ژن و ایزوفرم شناسایی شده در مرحله قبل، تعیین گردد. برای تعیین سطح بیان هر ژن و ایزوفرم‌های آن، از نرم‌افزار HT-Seq (v0.6.1) استفاده شد (Anders و همکاران، 2014). این نرم‌افزار با استفاده از سه

الگوریتم متفاوت به بررسی میزان بیان ژن‌های مختلف می‌پردازد (Anders و همکاران، 2014). جهت تعیین ژن‌ها و ایزوفرم‌های متفاوت بیان شده در طول زمان و یا در اثر تیمار از edgeR که یک بسته آماری مرتبط با R می‌باشد، استفاده شد (Robinson و همکاران، 2010). در این بسته آمار از مدل‌های خطی تعمیم یافته[7] برای آزمایشات چند عاملی و از روش‌های بیزین تجربی[8] برای تخمین واریانس بیولوژیکی در نمونه‌هایی که تعداد تکرار در آنها کم می‌باشد؛ استفاده می‌گردد.

آنالیز مسیرهای ژنی

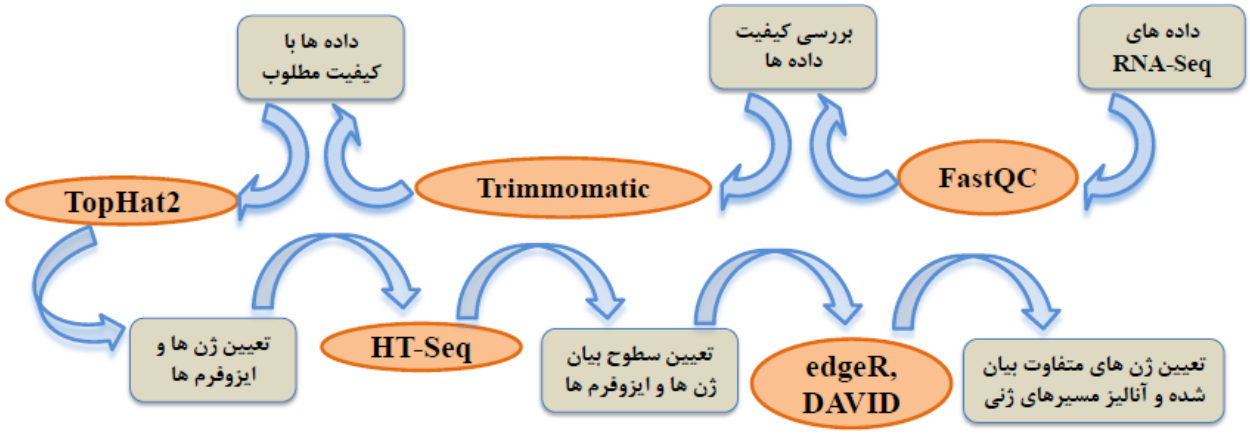
آنالیز مسیرهای ژنی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)، بر روی ژن‌ها و ایزوفرم‌هایی که بیان آنها در بین دو گروه متفاوت بود، انجام شد. این ژن‌ها در واقع ژن‌هایی هستند که سازوکار فعال‌سازی سامانه ایمنی در نحوه عملکردشان نهفته است. بررسی مسیرهای ژنی مرتبط با این ژن‌ها می‌تواند سازوکار مولکولی تنظیم فعالیت سامانه ایمنی را آشکار سازد. باید توجه داشت که استخراج اطلاعات زیستی از گروه‌های بزرگ ژنی در مطالعات ژنومیک، پروتئومیک و ترانسکریپتومیک یک چالش بزرگ می‌باشد. از این میان می‌توان به عبارات آنتولوژی مربوط به هر ژن، بررسی فرآیندهای زیستی خاص که ژن‌ها در آن دخالت دارند و همچنین رتبه‌بندی این فرآیندها ذکر نمود. نرم‌افزار DAVID در دسته‌بندی زیستی گروهی از ژن‌ها جهت استخراج اطلاعات زیستی و آنالیز عملکردی آنها کارآمد است. شمایی از استخراج مسیرهای ژنی (متابولیکی) و مراحل آن در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج

با آنالیز داده‌های RNA-Seq لوکوسیت گاوی با کد شناسایی GSE37447، ۱۷۸۱۷ ژن و ایزوفرم متفاوت توسط نرم‌افزار TopHat2 شناسایی شد (جدول ۱). از میان این ژن‌ها و ایزوفرم‌ها ۲۲۰ ژن و ایزوفرم توسط بسته آماری edgeR، به عنوان ژن‌هایی با بیان متفاوت در بین تیمارها، شناسایی گردید. به عبارت دیگر این ژن‌ها، در 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 ($P>0/05$) را نشان دادند. با توجه به اینکه اندازه‌گیری‌های فیزیولوژی نشان داده‌اند که در هنگام تنش از شیرگیری سامانه ایمنی فعال شده و به حالت آماده باش در می‌آید (O'Loughlin و همکاران، 2011)، پس چگونگی این سازوکار را باید در عملکرد ژن‌هایی (۲۲۰ ژن شناسایی شده توسط edgeR) جستجو کرد که در اثر اعمال تنش بیان آنها به طور معنی‌داری تغییر می‌کند.

[7]. Generalized Linear Models (glms)

[8]. Empirical Bayes methode



شکل ۱- شمایی از مراحل انجام آنالیز مسیرهای ژنی

یکی از مسیرهای ژنی که نتایج این پژوهش نشان داد می‌تواند به عنوان یک مسیر ژنی کاندید جهت راه‌اندازی پاسخ ایمنی مطرح باشد، مسیر اسپلایسوزوم[9] بود. مسیر اسپلایسوزوم باعث تولید چندین رونوشت متفاوت از یک ژن با فرآیندی به نام اتصال جایگزین[10] می‌شود. در این فرآیند با فرآوری رونوشت اولیه توالی کد کننده از طریق حذف و یا اضافه دومین‌های پپتیدی و یا ایجاد کدون پایان، تغییر می‌کند. اتصال جایگزین مختلف انجام شده در نواحی غیرکدکننده[11] 3ً و یا 5ً باعث تغییر در توالی‌های تنظیمی و محل اتصال اسید ریبونوکلیئک‌های میکرو شده و از این طریق پایداری، بیان و ترجمه ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Moore and Proudfoot, 2009). اتصال جایگزین به عنوان سازوکار رایج پس از رونویسی بیش از ۹۰ درصد ژن‌های دارای چند اگزون را مورد هدف قرار داده و با این کار بیان ژن‌های مذکور را تنظیم می‌کند (Martinez و همکاران، 2012). آنالیز مسیرهای ژنی نشان داد که ژن‌های متفاوت بیان شده در اثر اعمال تنش دو مسیر ژنی فوق را با میزان خطای کمتر از ۰/۰۱ فعال می‌کنند.

آنالیز میسر بر روی داده‌های توالی‌یابی رونوشت لوکوسیت گاوی نشان داد که مسیر ترمیم اتصالات نادرست[12] نیز از جمله مسیرهایی می‌باشد که در اثر تنش از شیرگیری فعال شده ($p<0/01$) و یا به عبارت دیگر ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم اتصالات نادرست در گوساله‌هایی که در غیاب مادر از شیرگرفته شدند، بیان متفاوتی را نسبت به گروه کنترل (گوساله‌هایی که در کنار مادر از شیر گرفته شدند) نشان دادند. در شرایط تنش، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها نرخ انفجار تنفسی[13] را افزایش داده و از این طریق غلظت انواع اکسیژن‌های برانگیخته[14] را افزایش داده و یک شرایط تنش اکسیداتیو را در بدن ایجاد می‌کند. ژنوم از جمله ماکرومولکول‌های داخل سلولی می‌باشد که بر اثر فعالیت رادیکال‌های آزاد آسیب می‌بینند. در این چنین شرایطی سامانه‌های ترمیم به این آسیب‌ها رسیدگی می‌کنند. این نتایج به روشن‌تر شدن سازوکارهای مولکولی مؤثر در بیداری سامانه ایمنی و بروز پاسخ ایمنی و تقویت آن کمک می‌کند.

9. Spliceosome pathway
10 Alternative splicing
11. UTR
12. Mismatch repair pathway
13. Respiratory burst
14. Reactive oxygen

جدول ۱- خلاصه‌ای از اطلاعات مربوط به مکان‌یابی خوانش‌ها

شماره نمونه	تعداد کل خوانش‌ها	تعداد خوانش‌ها بعد از ویرایش	تعداد خوانش‌های مکان‌یابی شده	نرخ مکان‌یابی خوانش‌ها
1	24103370	24103370	23338971	0.968286634
2	22900561	22900561	21992753	0.9603587
3	23807742	23807742	22931078	0.963177356
4	25308344	25308344	24273312	0.959103132
5	24731241	24731241	23452333	0.948287755
6	27200717	27200717	26202148	0.963288872
7	27491775	27491775	26353597	0.958599327
8	24913542	22829655	21990261	0.963232296
9	22956789	20483388	19342770	0.944314974
10	21469397	20995717	19960324	0.950685514
11	8309401	6872247	6452818	0.938967706
12	10953380	9391280	8723524	0.928896168
13	17219415	16169366	15651669	0.967982851
14	22511541	22511541	21821480	0.969346346
15	21814888	21814888	21090216	0.966780852
16	21543158	21543158	20750481	0.963205162
17	21734946	21734946	21092985	0.970464109
18	25761039	25761039	24553642	0.953130889
19	28973074	28973074	27973617	0.965503937
20	29314377	29314377	28255507	0.963878816
21	26630192	26630192	25675796	0.96416113
22	24587605	23061128	21889843	0.949209553
23	24104306	24104306	22169388	0.919727289
24	26321704	26321704	24990787	0.949436518
25	24813826	24813826	23769343	0.957907217
26	27345930	27345930	26362193	0.964026201
27	27371688	27371688	26359731	0.963029061
28	21700024	19607103	18618413	0.949574907
29	21848794	18862139	17672265	0.936917335
30	25587368	25587368	24500803	0.957535101
31	24325238	24325238	23325238	0.958890433
32	18569808	18569808	17553822	0.945288287
33	19768291	19768291	18764148	0.94920436
34	18668849	18668849	17240587	0.923494909
35	20172805	20172805	19320570	0.957753272
36	20364927	20364927	19799575	0.972238938
37	22077884	22077884	21050159	0.953450023
38	22878153	22878153	21958011	0.959780757
39	16256030	16256030	14737395	0.906580204
40	21827470	21827470	20753210	0.950784035

0.947182271	21868280	23087721	23087721	41
0.939950071	19724903	20985054	20985054	42
0.934397386	20513991	21954247	21954247	43
0.939248084	21122227	22488443	22488443	44
0.931905567	19712468	21152860	21152860	45
0.916390714	21735623	23718729	23718729	46
0.92950504	23919391	25733471	25733471	47
0.933712706	20444861	21896308	21896308	48

جدول ۲- مسیرهای ژنی کاندید در فرآیند فعال‌سازی سامانه ایمنی

نام مسیر	ژن‌های درگیر در مسیر ژنی	عبارات بیولوژیکی مرتبط با مسیر ژنی	P-Value
bta03040:Spliceosome	ENSBTAG00000008136 ENSBTAG00000000409 ENSBTAG00000001553 ENSBTAG00000007606 ENSBTAG00000007234 ENSBTAG00000014766 ENSBTAG00000008072	catalytic step 2 spliceosome, Spliceosome, mRNA splicing, mRNA processing, mRNA splicing via spliceosome, mRNA transport	0.001552
bta03430:Mismatch repair	ENSBTAG00000002742 ENSBTAG00000001424 ENSBTAG00000010787 ENSBTAG00000013525 ENSBTAG00000014835 ENSBTAG00000000585 ENSBTAG00000012490	positive regulation of helicase activity, somatic hypermutation of immunoglobulin gene, soxidized purine DNA binding, damaged DNA binding, B cell differentiation	0.004218

بحث

این مطالعه بر روی داده‌های بیان ژن در شرایط تنش از شیرگیری انجام شد که اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک نشان دادند در این شرایط سامانه ایمنی فعال شده و قدرت نابودی پاتوژن توسط این سامانه افزایش یافته است (O'Loughlin و همکاران، 2011). نتایج این مطالعه نشان داده است در چنین شرایطی مسیر ژنی اسپلایسوزوم فعال می‌گردد. به عبارت دیگر این مسیر ژنی را می‌توان به عنوان یکی از مسیرهای ژنی مرتبط با تحریک و تقویت سیستم ایمنی بررسی کرد. با توجه به اینکه تنوع و انعطاف در عملکرد سامانه ایمنی اکتسابی جهت شناسایی پاتوژن ضروری می‌باشد، به نظر می‌رسد که سامانه ایمنی اکتسابی برای تنظیم بیان پروتیئن‌ها و عملکردش ناگزیر باید وابسته به اتصال جایگزین در رونوشت‌های اولیه باشد که با استفاده از مسیر اسپلاسوزوم میسر می‌شود. تعداد زیادی از ژن‌ها که اتصال جایگزین آنها در سامانه ایمنی مطرح می‌باشد، وابسته به خانواده‌ها و یا گروه‌های عملکردی و فعال در پاسخ ایمنی هستند که بیانگر تأثیر اتصال جایگزین در پاسخ ایمنی است. علاوه بر این مطالعاتی به بررسی سازوکارهایی می‌پردازد که اتصال جایگزین موجب تغییر پاسخ به تحریک آنتی‌ژن گردیده است (Ishitani and Geraghty, 1992).

در پژوهش‌های مختلف اثر اتصالات جایگزین با سلول‌های نوع T مورد بررسی قرار گرفته است (Rothrock و همکاران، 2003). اولین اتفاقی که بعد از شناسایی آنتی‌ژن توسط گیرنده‌های سلولی T انجام می‌گردد، فعال سازی پروتیئن داخل سلولی تایروزین کیناز[15] است. تعداد زیادی از این پروتیئن‌ها در سلول‌های نوع T اتصال جایگزین انجام می‌دهند (Cooke and Perlmutter, 1989). برخی از اتصالات جایگزین باعث به حرکت درآوردن کلسیم و برخی دیگر باعث تکثیر سلول‌های نوع T می‌شوند (Rothrock و همکاران، 2003؛ Davidson و همکاران، 1994). علاوه بر این اتصال جایگزین روی ژن‌های دخیل در تشکیل سیناپس ایمونولوژیکی، تحریک و مهاجرت سلول‌های T را تحت تأثیر قرار می‌دهد (King و همکاران، 1995). همچنین برقراری تعادل در سلول‌های نوع T و یا به عبارت دیگر جلوگیری از تکثیر بیش از حد و یا فعال‌سازی بیش از حد سلول‌های نوع T، توسط اتصال جایگزین کنترل می‌شود (Lynch and Weiss, 2000). در پژوهش دیگر نتیجه‌گیری شده است که اتصال جایگزین رونوشت‌های نابالغ سازوکار رایجی برای تغییر بیان پروتیئن‌ها در پاسخ به تحریکات خارج سلولی هستند (Stamm, 2002). به‌طوری‌که، تحریک‌های آنتی‌ژنی به عنوان محرک‌های خارج سلولی، باعث فرآیند اتصال جایگزین در ژن CD44 و CD45 شده که پروتیئن‌های تنظیمی سلول‌هایی از نوع T هستند. از این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که رونویسی و اتصال جایگزین به صورت مستقل در پاسخ سلول‌های نوع T به آنتی‌ژن شرکت می‌کنند. در نتیجه اتصال جایگزین نقش مهمی را پاسخ‌های ایمنی بازی می‌کند.

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ترشح سیتوکین‌ها ارتباط مستقیمی با اتصالات جایگزین دارد. ترشح سیتوکین‌ها و پاسخ به انواع سیتوکین‌ها نقش مهمی در توسعه، تکثیر و عملکرد سلول‌های نوع T دارد. تعداد زیادی از پژوهش‌ها بیانگر این موضوع هستند که تولید سیتوکین‌ها، بیان گیرنده‌های سیتوکینی، بیان و فعالیت مولکول‌هایی که باعث انتقال سیگنال می‌شوند و به‌طورکلی مسیر پیام‌دهی سیتوکین‌ها تحت تأثیر اتصالات جایگزین قرار می‌گیرد (Atamas, 1997). در پژوهشی که به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در شناسایی و از بین بردن باکتری‌ها انجام گردید، مشاهده شد که برخی ژن‌های مرتبط با فرآیند اتصال جایگزین از طریق اسپلایسوزوم بر حذف باکتری‌ها مؤثر هستند. به طوری که در نمونه‌هایی که جمعیت باکتریایی کمتر شده بود و حذف باکتری با موفقیت بیشتری انجام گرفته بود، بیان ژن‌های ذکر شده بالاتر گزارش شد. در این پژوهش از *Drosophila melanogaster* استفاده شده بود و باکتری مورد پژوهش نیز اشرشیا کلی بود (Felix و همکاران، 2013). بررسی‌ها نشان داده‌اند اتصالات جایگزین با تأثیر بر مولکول‌های چسبندگی، سامانه ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مولکول‌های چسبندگی داخل سلولی نوع اول[16]، گلیکوپروتینی می‌باشد که نقش مهمی در جابجایی لوکوسیت‌ها و فعال‌سازی لنفوسیت‌ها دارد. این مولکول‌ها نیز مانند تعداد زیاد از ژن‌ها مرتبط با سامانه ایمنی مانند ژن‌های مرتبط با گیرنده‌های سطحی سلول و مولکول‌های پیام‌آور داخل سلولی در طی پاسخ التهابی مورد اتصال جایگزین قرار می‌گیرد (Ergun و همکاران، 2013).

همچنین، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های دخیل در جنبه‌های متفاوت زیستی و عملکردهای مؤثر سامانه ایمنی، غنی از سیگنال‌های مرتبط با اتصال جایگزین می‌باشند (Martinez و همکاران، 2012). از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های مرتبط با مسیر پیام‌دهی سلول‌های T، مانند NF-Jb[17] و مسیر پیام‌دهی پروتیئن کیناز فعال کننده میتوژن[18]، تغییرات مرتبط با فاکتور رو[19] در مهاجرت لنفوسیتی و ژن‌های دخیل در تکثیر سلولی می‌باشد (Grigoryev و همکاران، 2009؛ Martinez و همکاران، 2012). یکی از بهترین مثال‌های اتصال جایگزین در پاسخ به فعال شدن سلول‌های T، تیروزین فسفاتاز غشایی CD45 می‌باشد. CD45، در سلول‌های خون‌ساز در مسیرهایی مانند مسیر پیام‌دهی

15. Tracellular protein tyrosine kinases (PTKs)
16. Intracellular adhesion molecule 1
17. Nuclear factor-jB (NF-Jb)
18. Mitogen-activated protein kinase signaling
19. Rho-mediated changes

مرتبط با گیرنده‌های آنتی‌ژنی[20] و مسیرهای پیام‌دهی مرتبط با سیتوکین‌ها و اینتگرین‌ها نقش دارد (Hermiston و همکاران، 2003). چندین ایزوفرم مرتبط با CD45 که در اثر اتصال جایگزین بدست آمده است، گزارش شده است (Lynch and Weiss, 2000). اتصال جایگزین CD45 در سلول‌های مشخصی، مراحل خاصی از تکامل سلولی و در پاسخ به مسیرهای پیام‌دهی مانند مسیر پیام‌دهی مرتبط با آنتی‌ژن رخ می‌دهد (Hermiston و همکاران، 2003). در سلول‌های T پیرامونی، سه اگزون ۴، ۵ و ۶ که دومین‌های خارج سلولی CD45 را کد می‌کند، در اثر اتصال جایگزین خارج شدن و تولید یک ایزوفرم کوچک را می‌کند (Hermiston و همکاران، 2003). ایجاد این ایزوفرم بازخورد منفی برای فعال شده سلول‌های نوع T می‌باشد و در راستای هموستازی این سلول‌ها به کار می‌رود (Dornan و همکاران، 2002). پژوهش‌ها نشان داده‌اند در موارد که با ایجاد چند شکلی تک نوکلئوتیدی و یا آلودگی به ویروس HIV، امکان ایجاد این اتصال جایگزین متوقف شود؛ هموستازی سلول‌های نوع T به هم می‌خورد (Lynch and Weiss, 2001).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که در طی پیام‌دهی اولیه گیرنده‌های سلولی T، کنترل اتصال جایگزین فاکتور رونویسی فاکتور محرک لنفوسیتی نوع اول در تنظیم رونویسی گیرنده‌های سلولی T نوع آلفا به منظور تولید کمپلکس فعال گیرنده‌های سلولی T بر سطح سلول مؤثر است (Mallory و همکاران، 2011).فاکتور محرک لنفوسیتی نوع اول[21] به طور گسترده در گروه‌های خاصی از لنفوسیت‌ها در بافت‌های ویژه‌ای بیان می‌شود (Arce و همکاران 2006). این فاکتور بیان زنجیره آلفای گیرنده آنتی‌ژنی سلول‌های T را از طریق اتصال به تقویت کننده، افزایش می‌دهد (Waterman و همکاران، 1991). بنابراین، مطابق با نتایج این مطالعه و پژوهش‌های ارائه شده فرآیند اتصال جایگزین نقش مهمی در فعال‌سازی و تنظیم سامانه ایمنی دارد. پس منطقی به نظر می‌رسد که با اعمال تنش از شیرگیری و فعال سازی سیستم ایمنی، ژن‌های مرتبط با مسیر اسپلایسوزوم فعال گردند تا ویژگی‌های مطلوب را برای یک سامانه ایمنی ایده‌آل از نظر تنظیم، کنترل و فعال‌سازی را مهیا کند.

مطابق با نتایج بدست آمده، مسیر ترمیم اتصالات نادرست یکی از مسیرهای ژنی مهمی می‌باشد، که به کمک آن میتوان چگونگی فعال شدن سامانه ایمنی را مورد بررسی قرار داد. در شرایط تنش ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها نرخ انفجار تنفسی را افزایش داده و از این طریق غلظت انواع اکسیژن‌های برانگیخته را افزایش داده و یک شرایط تنش اکسیداتیو را در بدن ایجاد می‌کند (Wernicki و همکاران، 2006). افزایش نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در لنفوسیت‌ها نشان دهنده وجود تنش اکسیداتیو در گوساله‌هایی می‌باشد که تنش از شیرگیری به آنها اعمال شده بود (Burke و همکاران، 2009؛ Hickey و همکاران، 2003). تعداد زیادی از ترکیبات سلولی، شامل لیپیدها، پروتیئن‌ها، و ژنوم میتوکندری و هسته توسط انواع اکسیژن‌های برانگیخته در معرض نابودی می‌باشند (Muller و همکاران، 2007). رادیکال‌های آزاد با الکترون‌های جفت نشده مانند آنیون سوپر اکسید، رادیکال هیدروکسید و پروکسید هیدروژن غیر رادیکالی از جمله این مولکول‌های برانگیخته می‌باشند. علاوه‌بر این، التهاب، عوامل خارجی مانند اشعه UV و تابش یونیزه کننده خود نیز سازه تولید کننده داخلی این سری از مولکول‌ها هستند (Halliwell and Gutteridge, 2015؛ Yang و همکاران، 2013). این مولکول‌ها به طور عمده در سلول‌های هوازی و در طی متابولیسم طبیعی سلول ایجاد می‌گردد (Dizdaroglu, 2012). تنش از شیرگیری نیز محرک تولید این مولکول‌ها است. زنجیره کربن–کربن در ساختار DNA، بازهای پورینی و پریمیدینی هدف این ترکیبات به خصوص هیدروکسید اکسیژن می‌باشد (Dizdaroglu, 2012). نتیجه این واکنش‌های کاهشی، تولید ضایعات و آسیب به ژنوم می‌باشد. حضور انواع اکسیژن‌های برانگیخته در سلول باعث القای تنش اکسیداتیو داخل سلولی می‌شود. سلول در برابر تنش اکسیداتیو سازوکارهای مختلفی را بکار می‌گیرد. از جمله این سازوکارها می‌توان به مسیر

[20]. Antigen receptor-mediated signaling
[21]. Lymphocyte enhancer factor 1 (LEF1)

ترمیم، مهار تکثیر سلولی (با وقفه گذرا در سیکل سلولی و یا بروز پیری در سلول) و یا مرگ سلولی اشاره کرد.

به منظور رفع آسیب‌های اکسیداتیو ژنوم که در شرایط مختلفی از جمله شرایط تنش ایجاد می‌شود، سازوکارهای ترمیمی مختلفی در سلول وجود دارد. ترمیم بواسطه خارج‌سازی بازها[22] و ترمیم بواسطه خارج‌سازی نوکلئوتیدها[23] از جمله این سازوکارها می‌باشد که قبل از فعال سازی پلیمراز و لیگاز برای تکمیل فضای خالی ایجاد شده، به منظور خارج‌سازی ضایعه از مولکول دئوکسی-ریبونوکلئیک اسید در سلول وجود دارد (Kim and Wilson, 2012). سازوکار ترمیم بواسطه خارج‌سازی بازها، ترمیم را به صورت نوکلئوتیدهای منفرد انجام می‌دهد، ولی سامانه ترمیم بواسطه خارج‌سازی نوکلئوتید، باعث خارج کردن ضایعات بزرگتر می‌شود (Dizdaroglu, 2012). با وجود اینکه این دو سامانه مدت‌ها می‌باشد که به عنوان مهمترین سامانه‌های مبارزه با آسیب‌های ناشی از انواع اکسیژن‌های برانگیخته در مولکول دئوکسی‌ریبونوکلیئک اسید شناسایی شده است، مسیر ترمیم اتصال نادرست[24] در پاسخ به آسیب‌های اکسیداتیو ژنوم نیز مطرح می‌باشد (Brierley and Martin, 2013؛ Macpherson و همکاران 2005). اولین نقش مسیر ترمیم اتصال نادرست، ترمیم اتصالات نادرست باز- باز و حلقه‌های تنظیمی می‌باشد، که در اثر حذف و اضافه به وجود می‌آید. کمپلکس پروتیئنی مهمی که در مسیر ترمیم اتصال نادرست وجود دارد خانواده‌های MutL و MutS می‌باشند که از پایین‌ترین سازواره‌ها تا یوکاریوت‌ها به شدت محافظت شده می‌باشد.

نتیجه تحقیقات نشان داده است که پاسخ‌های سلولی به علت آسیب ژنوم، سبب برانگیختن سامانه ایمنی می‌شود. از میان گیرنده‌های دخیل در شناسایی سلول‌های توموری، با شناسایی لیگاند گیرنده NKG2D مشخص شد که این لیگاندها که در سلول‌های توموری بیان شده و احتمالاً باعث بروز پاسخ ایمنی می-گردند (Bauer و همکاران، 1999؛ Diefenbach و همکاران، 2000؛ Moretta و همکاران، 2001). این لیگاند شامل دو خانواده گسترده پروتیئنی می‌باشند که خویشاوندی مشخصی با مولکول‌های کلاس اول کمپلکس عمده سازگاری بافتی دارند (Cosman و همکاران، 2001؛ Radosavljevic و همکاران، 2002). پژوهش‌های انجام شده نشان داده است تنش که باعث آسیب به ژنوم می‌شود، سبب بیان لیگاند گیرنده NKG2D نیز می‌گردد که نتیجه آن فعال شدن سامانه ایمنی می-باشد (Sancar و همکاران 2004).

در طی التهاب یک سری مواد در خون آزاد می‌شود که ترمیم ژنوم را تنظیم می‌کند. در این بین، دو اینترلوکین به نام‌های IL-12 و IL-23 که خاصیت ضد توموری دارند باعث تقویت ترمیم ژنوم می‌شود (Nastala و همکاران، 1994). پس واسطه‌های التهابی به صورت مستقیم فرآیند ترمیم ژنوم را تحت تأثیر می‌دهد و آن را تنظیم و تقویت می‌کند. مسیر فاکتور هسته‌ای κB[25] که به عنوان مهمترین تنظیم کننده در بیان پروتیئن‌های التهابی مطرح می‌باشد، یک واسط مهم در ترمیم مولکول دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به شمار می‌رود (Mabb و همکاران، 2006).

مسیر فاکتور هسته‌ایκB برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ به عنوان یک فاکتور هسته ای لازم برای رونویسی زنجیره سبک ایمونوگلوبین در سلول نوع B معرفی گردید (Huang and D'Andrea, 2006). این فاکتور در ابتدا به عنوان واسطه جهت تنظیم پاسخ ایمنی، مرگ و رشد سلولی و بیماری‌های التهابی مطرح بود (Sen and Baltimore, 1986). فاکتورهای رونویسی مرتبط با فاکتور هسته‌ایκB دارای توالی اسید آمینه‌ای بسیار محافظت شده می‌باشد. در یک سلول که مورد تحریک قرار نگرفته است، پروتیئن‌های خانواده فاکتور هسته‌ایκB به صورت همو دایمر یا هترو دایمر با پروتیئن‌های مهاری خانواده IκB به صورت غیر فعال در سیتوپلاسم حضور دارند (Karin, 2006). حدود ۲۰۰ سیگنال خارج از سلولی با جداکردن فاکتور هسته-ایκB از پروتیئن مهاری IκB باعث فعال شدن فاکتور هسته‌ای κB می‌شوند. از جمله سیگنال‌هایی که این عمل را انجام می‌دهد می‌توان به تولیدات و محصولات باکتریایی و ویروسی، تنش

[22]. Base excision repair (BER)

[23]. Nucleotide excision repair (NER)

[24]. Mismatch repair (MMR)

[25]. Nuclear factor kappa B

اکسیداتیو، سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۱ و فاکتور نکروز کننده تومور نوع آلفا اشاره کرد (Karin and Ben-Neriah, 2000). تجزیه κB باعث ورود فاکتور هسته‌ایκB به هسته و اتصال به ناحیه پروموتوری هزاران ژن و افزایش ترجمه و بیان این ژن‌ها می‌شود (Karin, 2006). از جمله این ژن‌ها می‌توان به سیتوکین‌ها (اینترلوکین ۱، ۲ و ۶)، فاکتور نکروز کننده تومور نوع آلفا، گیرنده‌های ایمنی (زنجیره سبک ایمونوگلوبولین، کلاس یک کمپلکس عمده سازگاری بافتی)، مولکول‌های چسبندگی سلولی اشاره کرد. شکست‌های زنجیره دو رشته‌ای ژنوم هسته یکی از مهمترین سیگنال‌های فعال شدن فاکتور هسته‌ایκBمی‌باشد (Mabb و همکاران، 2006).

نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج این پژوهش، ژن‌هایی که می‌توان سازوکار مولکولی فعال‌سازی سامانه ایمنی را در عملکرد آنها بررسی کرد، مربوط به مسیرهای ژنی اسپلایسوزوم و ترمیم اتصالات نادرست ژنوم می‌باشند. فعال شدن مسیر ژنی اسپلایسوزوم در لوکوسیت‌ها تحت شرایطی که اندازه‌گیری‌های فیزیولوژی مبین افزایش فعالیت سامانه ایمنی می‌باشد، می‌تواند این واقعیت را نشان دهد که این مسیر ژنی می‌تواند تأثیر به سزایی در ایجاد و تقویت یک پاسخ ایمنی مناسب و کارآمد داشته باشد. فعال شدن این مسیر ارتباط مستقیمی با فرآیند اتصالات جایگزین دارد و این فرآیند از چند طریق بر سامانه ایمنی مؤثر است. این فرآیند سبب ایجاد تنوع در پروتئین‌های تولیدی در لوکوسیت‌ها (ایمونوگلوبولین‌ها)، فعال سازی سلول‌های نوع T، فعال‌سازی سیتوکین‌ها، ترشح سیتوکین‌ها و پاسخ به این سیتوکین‌ها می‌شود.علاوه‌براین، نتایج نشان دادند مسیر ژنی ترمیم اتصالات نادرست ژنوم در شرایط فعال شدن سیستم ایمنی برانگیخته می‌گردد. این مسیر که در پاسخ به ایجاد ضایعات ژنومی تحت شرایط اکسیداتیو حاکم در سلول فعال می‌گردد سبب برانگیختن سامانه ایمنی می‌شود. ایجاد شرایط اکسیداتیو در سلول به علت افزایش فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در لنفوسیت‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر همزمان با فعال شدن سامانه ایمنی مسیر ژنی ترمیم اتصالات نادرست ژنوم فعال می‌شود که این مسیر ژنی همزمان افزایش پاسخ ایمنی را به همراه دارد. از مسیرهای ژنی شناسایی شده در این مطالعه و ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی و ریبونوکلئیک اسیدهای میکرو دخیل در این مسیرها می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی در جهت بهبود و تقویت سامانه ایمنی و پاسخ‌های بیولوژیکی مرتبط با آن بهره برد.

منابع

Atamas, S.P. (1997). Alternative splice variants of cytokines: making a list. *Life of Sciences.* 61(12): 1105-1112.

Bauer, S., Groh, V., Wu ,J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. *et al*. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 285(5428): 727-729.

Blanco, M., Casasús, I. and Palacio, J. (2009). Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. Journal of *Animal Science.* 3(01): 108-117.

Anders, S., Pyl, P.T. and Huber, W. (2014). HTSeq–a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. btu638.

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

Arce, L., Yokoyama, N. and Waterman, M. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*. 25(57): 7492-7504.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J. (1997). Cellular responses to interferon-γ. *Annual Review of Immunology.* 15(1): 749-795.

Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* btu170.

Brierley, D.J. and Martin, S.A. (2013). Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxidants and Redox Signaling.* 18(18): 2420-2428.

Burke, N.C., Scaglia, G., Boland, H.T. and Swecker, W.S. (2009). Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 127(3): 365-370.

Cole, S.W. (2008). Social regulation of leukocyte homeostasis: The role of glucocorticoid sensitivity. *Brain, Behavior and Immunity.* 22(7): 1049-1055.

Cooke, M. and Perlmutter, R. (1989). Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *The New Biologist.* 7(1): 66-74.

Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W. *et al*. (2001). ULBPs, novel MHC class I–related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 14(2): 123-133.

Davidson, D., Viallet, J. and Veillette, A. (1994). Unique catalytic properties dictate the enhanced function of p59fynT, the hemopoietic cell-specific isoform of the Fyn tyrosine protein kinase, in T cells. *Molecular and Cellular Biology.* 14(7): 4554-4564.

Dhabhar, F.S. (2009). A hassle a day may keep the pathogens away: the fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology.* 49(3): 215-236.

Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N. and Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunology.* 3(2): 119-126.

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters.* 327(1): 26-47.

Dornan, S., Sebestyen, Z., Gamble, J., Nagy, P., Bodnar, A., Alldridge, L. *et al*. (2002). Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *Journal of Biological Chemistry.* 277(3): 1912-1918.

Elenkov, I.J. and Chrousos, G.P. (1999). Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 10(9): 359-368.

Ergun, A., Doran, G., Costello, J.C., Paik, H.H., Collins, J.J., Mathis, D. *et al*. (2013). Differential splicing across immune system lineages. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, Ayla, Ergun, p. 14324.

Felix, T.M., Hughes, K.A., Stone, E.A., Drnevich, J.M. and Leips, J. (2012). Age-specific variation in immune response in Drosophila melanogaster has a genetic basis. *Genetics.* 191(3): 989-1002.

Gajewski, T.F. and Fitch, F.W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *The Journal of Immunology.* 140(12): 4245-4252.

Galyean, M., Perino, L. and Duff, G. (1999). Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *Journal of Animal Science.* 77(5): 1120-1134.

Grigoryev, Y.A., Kurian, S.M., Nakorchevskiy, A.A., Burke, J.P., Campbell, D., Head, S.R. *et al*.(2009). Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes. *Plos One.* 4(11): e7906.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA .pp: 670-675.

Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G. *et al*. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells .*Nature.* 391(6667): 591-594.

Hermiston, M.L., Xu, Z. and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology.* 21(1): 107-137.

Hickey, M.-C., Drennan, M. and Earley, B. (2003). The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *Journal of Animal Science.* 81(11): 2847-2855.

Huang, T.T. and D'Andrea, A.D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 7(5): 323-334.

Ishitani, A. and Geraghty, D.E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, Ishitani, p. 3947.

Karin, M. (2006). Nuclear factor-κB in cancer development and progression. *Nature.* 44(7): 431-436.

Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annual Review of Immunology.* 18(1): 621-663.

Kim, Y.-J. and M Wilson III, D. (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Current Molecular Pharmacology.* 5(1): 3-13.

King, P.D., Sandberg, E.T., Selvakumar, A., Fang, P., Beaudet, A.L. and Dupont, B. (1995). Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *The Journal of Immunology.* 154(11): 6080-6093.

Lynch, E.M., McGee, M., Doyle, S. and Earley, B. (2011). Effect of post-weaning management practices on physiological and immunological responses of weaned beef calves. *Irish Journal of Agricultural and Food Research.* 4: 161-174.

Lynch, K.W. and Weiss, A. (2000). A model system for activation-induced alternative splicing of CD4 ۵pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Molecular and cellular biology.* 20(1): 70-80.

Lynch, K.W. and Weiss, A. (2001). A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *Journal of Biological Chemistry.* 276(26): 24341-24347.

Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M. and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-κB activation in response to genotoxic stress. *Nature Cell Biology.* 8(9): 986-993.

Macpherson, P., Barone, F., Maga, G., Mazzei, F., Karran, P. and Bignami, M. (2005). 8-Oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutSα. *Nucleic Acids Research.* 33(16): 5094-5105.

Mallory, M.J., Jackson, J., Weber, B., Chi, A., Heyd, F. and Lynch, K.W. (2011). Signal- and development-dependent alternative splicing of LEF1 in T cells is controlled by CELF2. *Molecular and Cellular Biology.* 31(11): 2184-2195.

Martinez, N.M., Pan, Q., Cole, B.S., Yarosh, C.A., Babcock, G.A., Heyd, F. *et al*. (2012). Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. *RNA.* 18(5): 1029-1040.

Medzhitov, R. and Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91(3): 295-298.

Moore, M.J. and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back totranscription and ahead to translation. *Cell.* 136(4): 688-700.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C. *et al.* (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annual Review of Immunology.* 19(1): 197-223.

Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine.* 43(4): 477-503.

Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J. *et al.*(1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *The Journal of Immunology.* 153(4): 1697-1706.

O'Loughlin, A., Lynn, D.J., McGee, M., Doyle, S., McCabe, M. and Earley, B. (2012). Transcriptomic analysis of the stress response to weaning at housing in bovine leukocytes using RNA-seq technology. *BMC Genomics.* 13(1): 1.

O'Loughlin, A., McGee, M., Waters, S.M., Doyle, S. and Earley, B. (2011). Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. *BMC Veterinary Research.* 7(1): 1.

Radosavljevic, M., Cuillerier, B.t., Wilson, M.J., Clément, O., Wicker, S., Gilfillan, S. *et al*. (2002). A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24. *Genomics.* 79(1): 114-123.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26(1): 139-140.

Rothrock, C., Cannon, B., Hahm, B. and Lynch, K.W. (2003). A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45. *Molecular Cell.* 12(5): 1317-1324.

Sancar ,A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K. and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry.* 73(1): 39-85.

Saul, A.N., Oberyszyn, T.M., Daugherty, C., Kusewitt, D., Jones, S., Jewell, S. *et al*. (2005). Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 97(23): 1760-1767.

Sen, R. and Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. *Cell.* 47(6): 921-928.

Stamm, S. (2002). Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics.* 11(20): 2409-241.۶

Trapnell, C., Pachter, L. and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 25(9): 1105-1111.

Waterman, M.L., Fischer, W.H. and Jones, K.A. (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes and Development.* 5(4): 656-669.

Wernicki, A., Urban-Chmiel, R., Kankofer, M., Mikucki, P., Puchalski, A. and Tokarzewski, S. (2006). Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short-term transportation. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 157(1): 30.

Yang ,Y., Bazhin, A.V., Werner, J. and Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology.* 32(3): 249-270.