

انتقال دهنده پلی آمین ATP13A2 و کووید-۱۹: یک مطالعه مبتنی بر داده های ریز آرایه و تحلیل عملکرد

نویسندگان:

محسن علیپور^۱، اباذر روستازاده^{۲*}

۱- گروه بیوشیمی، گروه علوم و فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
 ۲- گروه بیوشیمی، گروه علوم و فناوری های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.3, Fall 2021

چکیده:

مقدمه: پاندمی کووید-۱۹ افراد زیادی را مبتلا کرده و موجب مرگ و میر بسیاری نیز شده است. هنوز سازوکار دقیق عمل ویروس عامل این بیماری در بدن مشخص نیست. هدف از مطالعه حاضر بررسی و تحلیل داده های ریز آرایه و همچنین یافتن سازوکارهای جدید عملکرد این ویروس در سلول های انسان بود.

روش کار: داده های ریز آرایه استخراج شده از NCBI توسط GEO2R و نرم افزار R مورد تحلیل قرار گرفتند. ژن هایی که افزایش و کاهش بیان داشتند استخراج و تحلیل عملکرد در مورد آن ها انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که در سطح لگاریتم پایه دو تغییر بیان بزرگتر از ۳ و کوچکتر از ۳- ترانس کریپتوم، ۳۱۹ و ۵۷۳ ژن افزایش بیان داشته اند که به ترتیب مربوط به گروه بیماران کووید خفیف و کووید شدید بود. همچنین ۱۵۶ و ۵۹۰ ژن کاهش بیان داشته اند که به ترتیب در گروه بیماران کووید خفیف و کووید شدید مشاهده شد. نتایج GO نشان داد که الگوی ژن های تفاوت بیان داشته در گروه بیماران کووید شدید با ژن ATP13A2 مرتبط است.

نتیجه گیری: ویروس کووید-۱۹ احتمالاً در تعامل با عواملی همچون ATP13A2 شرایط بقای خود را در داخل سلول تنظیم می کند.

واژگان کلیدی: کووید-۱۹، ریز آرایه، ATP13A2، تحلیل عملکرد

Pars J Med Sci 2021;19(3):14-19

مقدمه:

سیستمیک و سندروم بدی عملکرد چند ارگانی در نهایت منجر به مرگ می شود [۲-۴]. توانایی این ویروس برای آلوده کردن انواعی از سلول های مختلف از جمله سلول های ریوی، قلبی-عروقی، کبدی، معده ای - روده ای، سیستم عصبی مرکزی و سیستم ایمنی موجب تظاهرات بیماری چند ارگانی می شود که می تواند از شخصی به شخص دیگر متفاوت باشد [۵، ۶]. یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت در درمان ضد ویروسی کووید-۱۹، کمبود دانش در خصوص نحوه تعامل سلول های میزبان و

پاندمی کنونی بیماری ویروس کرونا ۲۰۱۹ (کووید-۱۹) که توسط SARS-CoV-2 ایجاد شده تا تاریخ ۲۰ آگوست ۲۰۲۱ تعداد ۲۰۹۸۷۶۶۱۳ نفر را مبتلا کرده است که ۴۴۰۰۲۸۴ مورد آن منجر به فوت شده است و تا همین تاریخ ۴۵۶۲۲۵۶۷۷۸ دوز واکسن نیز تزریق شده است [۱]. بیشتر مبتلایان به این بیماری، علائم خفیف تا متوسطی همچون تب، سرفه و تنگی نفس را بروز می دهند. بیماری در ۲۰ درصد از موارد به سرعت به فرم شدید پیشرفت کرده و با علائمی همچون سندروم دیسترس حاد تنفسی، هیپوکسمی شدید، آسیب حاد ریوی، سندروم پاسخ ایمنی

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه بیوشیمی، گروه علوم و فناوری های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.
 تلفن تماس: ۰۹۱۷۱۳۲۷۷۵۸
 پست الکترونیک: Roustazadeh@jums.ac.ir

دست آید. سپس با فیلتر کردن داده ها، تنها داده‌های مربوط به ریز آرایه انسانی لحاظ شدند. از بین داده‌های موجود GSE164805 که روی بیماران مبتلا به ویروس کرونا در دو گروه مبتلایان با نوع خفیف و شدید بیماری و در PMNC کار شده بود مورد بررسی قرار گرفت. تعداد افراد مورد مطالعه در هر گروه (ساله و دو نوع کووید ۱۹) ۵ نفر بود. داده های خام ریز آرایه استخراج و با استفاده از GEO2R و نرم افزار R نسخه 4.1.0 تحلیل شدند. ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی و سپس از Principal Component Analysis (PCA) برای بررسی ارتباط داده‌های ژنی و نمونه‌ها استفاده شد. ژن‌هایی که دارای بیان متفاوتی بودند (DEGs) استخراج و روی آن‌ها Gene ontology (GO) با استفاده از پایگاه DAVID 6.8 انجام شد. در این مطالعه P-Value تنظیم شده کوچک‌تر از ۰/۰۵ و یا کوچک تر از ۰/۰۱ به عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد. این مطالعه با کد اخلاق IR.JUMS.REC.1399.129 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم به ثبت رسید.

یافته‌ها:

نتایج تحلیل GEO2R و نرم افزار R نشان داد که توزیع داده‌ها نرمال است. از سوی دیگر، نتایج PCA نشان داد که نمونه‌ها در سه گروه سالم، گروه کووید خفیف و گروه کووید شدید به طور مناسبی از هم تفکیک شده‌اند (شکل ۱). همچنین PCA ژن‌ها حاکی از نبود تفاوت معنادار در اکثر آن‌ها بود. تحلیل ژن‌هایی که تفاوت معنادار داشتند نشان داد که در سطوح $\text{Log}_2 \text{FC} > 1$ و $\text{Log}_2 \text{FC} < -1$ بر اساس DEGs استخراج شده در بخش GO نتایج معنادار نیست. از این رو، فیلتر کردن داده‌ها تا سطح $\text{Log}_2 \text{FC} > 3$ و $\text{Log}_2 \text{FC} < -3$ ادامه پیدا کرد. بررسی نشان داد که در این سطح از تحلیل، ۳۱۹ و ۵۷۳ ژن افزایش بیان داشته‌اند که به ترتیب به گروه بیماران کووید خفیف و کووید شدید متعلق می‌باشند. همچنین ۱۵۶ و ۵۹۰ ژن کاهش بیان داشته به ترتیب در گروه بیماران کووید خفیف و کووید شدید مشاهده شد. نتایج GO نشان داد که DEGs در گروه بیماران کووید شدید با $\text{Log}_2 \text{FC} < -3$ با لیزوزوم مرتبط است. در این سطح، در مطالعه GO ژن ATP13A2 با نوع شدید کووید-۱۹ مرتبط تشخیص داده شد. مقدار P-Value ژن استخراج شده ATP13A2 در خصوص لیزوزوم برابر با $1.9E-3$ بود.

ویروس‌های بتا کرونا است. زمانی که پوشش ویروس با غشای پلاسمایی و یا غشای اندوزوم تلفیق می‌شود و RNA ویروس در سیتوزول آزاد می‌شود به پروتئین‌های ساختمانی و غیرساختمانی ترجمه می‌شود. سپس پروتئین‌های غیرساختمانی روی غشاهای مشتق شده از اندوپلاسمیک رتیکولوم تجمیع شده و RNA ویروسی را همانندسازی می‌کنند.

لیزوزم یک واکوئل لیتیک با مورفولوژی مستقل از چرخه سلولی است که در بیشتر سلول‌های حیوانات یافت می‌شود و حاوی هیدرولازهای مختلفی است. حداکثر فعالیت بیشتر این هیدرولازها در دامنه pH=5-6 است. حدود چهل نوع هیدرولاز مختلف در لیزوزوم‌ها شناسایی شده است. لیزوزوم‌ها مورفولوژی و عملکرد بسیار متنوعی دارند [۷].

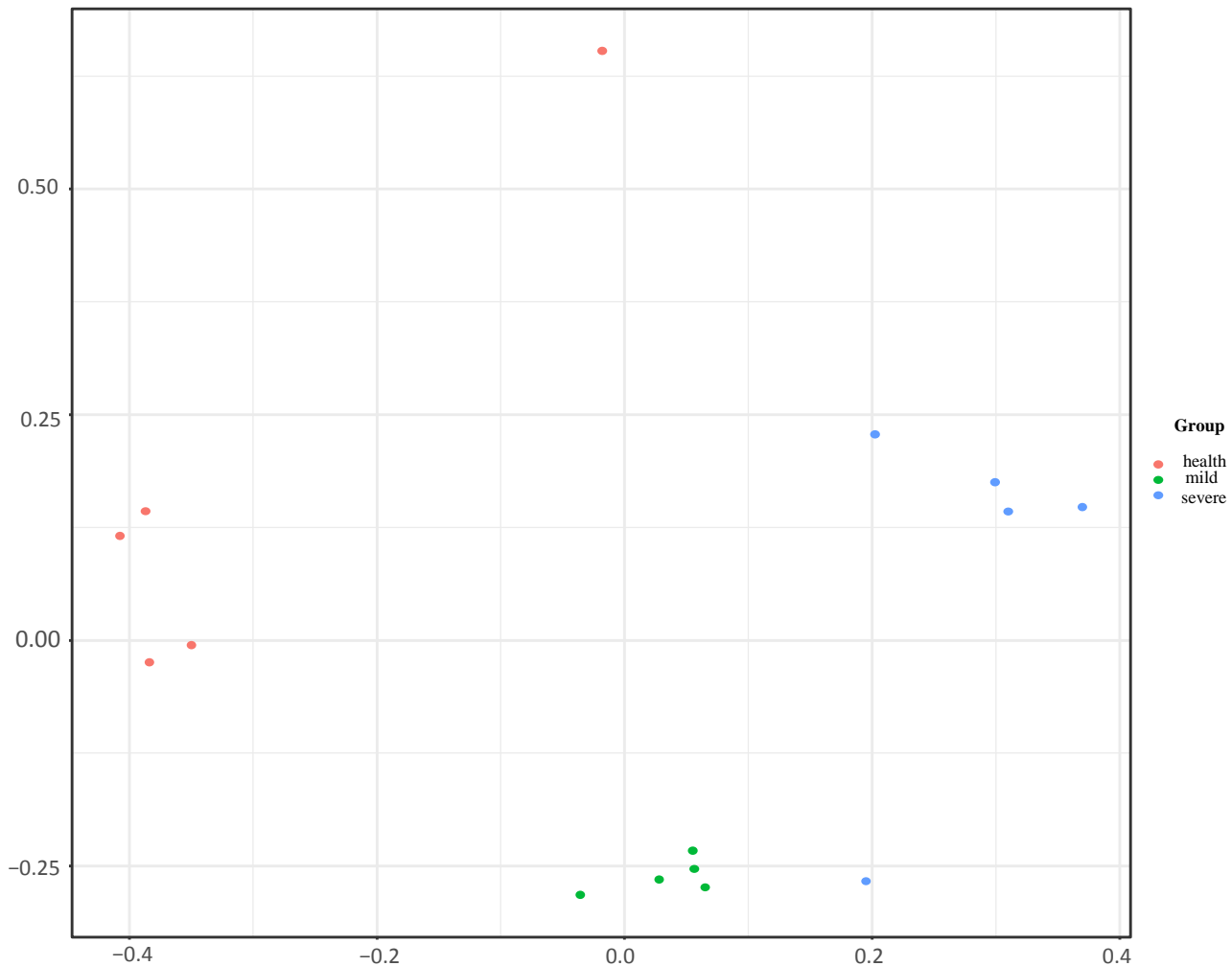
ویروس‌های پوشش دار برای خروج از سلول از مسیرهای ترشحی بیوسنتتیک معمولی استفاده می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد که ویروس‌های بتا کرونا از این مسیرها استفاده نمی‌کنند، بلکه در لیزوزوم‌ها جمع شده و از طریق یک سازوکار غیر معمول وابسته به Ar18b از طریق لیزوزوم‌ها از سلول خارج می‌شوند [۸، ۹].

ATP 13A2 یک انتقال‌دهنده پلی‌آمین است که در لیزوزوم به عنوان انتقال‌دهنده اسپرمین عمل می‌کند. این انتقال‌دهنده برداشت سلولی پلی‌آمین را تحریک کرده و از سمیت پلی‌آمین‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین در هموستاز کاتیون درون سلولی نقش داشته و در حفظ پیوستگی نورونی ایفای نقش می‌کند. علاوه بر این، در هموستاز روی درون سلولی نقش داشته و سلول را در برابر سمیت روی، منگنز و استرس میتوکندریایی محافظت می‌کند [۱۰، ۱۱].

داده‌های موجود در کتابخانه‌های ریز آرایه، گنجینه بسیار غنی هستند که می‌توانند زوایای پنهانی از نحوه تعامل ویروس کووید-۱۹ با میزبان خود را نشان دهند. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی کتابخانه‌های داده‌های ریز آرایه و تحلیل مجدد آن برای پی بردن به نکات جدید در خصوص ژن‌های با تفاوت بیان و عملکرد در کووید-۱۹ می‌باشد.

روش کار:

ابتدا Gene Expression Omnibus در پایگاه داده NCBI با کلمات کلیدی ویروس کرونا، کووید-۱۹ و SARS-CoV-2 مورد جستجو قرار گرفت تا تمام داده‌های موجود در خصوص این ویروس به



شکل ۱: گروه بندی نمونه ها

بحث:

ویروس ها خروج از سلول به طور مستقیم از طریق مسیرهای بیوسنتتیک معمولی و یا به واسطه جوانه زدن است [۱۲]. سوریش و همکاران نشان دادند که ویروس بتا کرونا ابتدا به داخل شبکه اندوپلاسمی جوانه زده، سپس به دستگاه گلژی انتقال یافته و پس از آن به لیزوزوم رفته و به کمک آن از سلول خارج می شود. با این وجود، جزئیات این نقل و انتقال بین ارگانل های داخل سلولی هنوز ناشناخته است [۸]. این پدیده از یک سو اهمیت لیزوزوم ها در سیستم تکثیر ویروس ها را نشان می دهد و از سویی این سوال را در ذهن تداعی می کند که چطور این ویروس قادر است در لیزوزوم که از لحاظ pH یک محیط اسیدی است باقی بماند و این ارگانل را در اختیار خود بگیرد. داده ها نشان داد در کرومای شدید DEGs هایی که به میزان هشت برابر شرایط طبیعی کاهش بیان داشته اند با ژن ATP13A2 از لحاظ عملکرد ارتباط دارند. ATP13A2 از ATPase های نوع P5B است که در مغز نیز میزان بیان بالایی دارد. مطالعات نشان می دهد که اختلال در این انتقال دهنده سبب اختلالات حرکتی

یکی از روش های معمول ارتقا دانش و آگاهی در خصوص ویروس کرونا و مسیرهای احتمالی تکثیر و یا ارگانل هایی که به وسیله این ویروس تحت تاثیر قرار می گیرند، استفاده از داده های کتابخانه ریز آرایه روی بیماران مبتلا به کرونا و سپس بررسی عملکرد ژن هایی با افزایش یا کاهش بیان است. در مطالعه حاضر از داده های کتابخانه GSE164805 به دلیل استفاده در دو نوع شدید و خفیف کووید-۱۹ استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ژن هایی که در بیماران با فرم شدید کووید-۱۹ بیش از هشت برابر در مقایسه با گروه کنترل کاهش بیان داشته، از لحاظ موقعیت سلولی با لیزوزوم در ارتباط هستند.

در سال ۱۹۷۰ مشخص شد که ویروس های کرونا در مراحل نهایی عفونت به طور سالم و دست نخورده در لیزوزوم یافت می شوند، اما اهمیت این موضوع تا امروز شناخته نشده بود. به تازگی مشخص شده است که ویروس های بتا کرونا برخلاف بقیه ویروس های RNA دار و دارای پوشش، در لیزوزوم تجمع یافته و به واسطه آن از سلول خارج می شوند، در حالی که در بقیه

احتمال می رود که کووید-۱۹ در تعامل با ATP13A2 بقای خود را در داخل سلول تنظیم می کند.

نتیجه گیری:

ویروس کووید-۱۹ احتمالاً در تعامل با عواملی چون ATP13A2 شرایط بقای خود را در داخل سلول تنظیم می کند. انجام مطالعات بیشتری به خصوص از طریق کشت سلولی و استفاده از پلی آمین ها لازم است تا مشخص شود که آیا کووید-۱۹ از پلی آمین ها به عنوان یک آنتی اکسیدان برای بقای خود استفاده می کند و یا این که ویروس مذکور از غلظت های بالا برای راه اندازی مسیر آپوپتوز بهره می گیرد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم حمایت شده است.

شده و همچنین با بیماری های نورودژنراتیو همچون سندرم Kufor-Rakeb مرتبط است [۱۳-۱۵]. سوالی که می تواند موضوع مطالعات آینده باشد این است که آیا ابتلا به بیماری کووید-۱۹ سبب آسیب های نورودژنراتیو می شود و در صورتی که افراد با اختلالات حرکتی به این ویروس آلوده شوند شرایط بیماری آن ها وخیم تر خواهد شد؟ ATP13A2 بیشترین تمایل را به اسپرمین دارد [۱۶]. پلی آمین ها (پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین) در فرآیندهای مختلفی در سلول همچون تکثیر سلول، تمایز، تعدیل فعالیت کانال های یونی و گیرنده ها و تنظیم رونویسی و ترجمه ژن نقش دارند [۱۷]. اسپرمین در شرایط فیزیولوژیک یک آنتی اکسیدان است و مطالعات نشان می دهد که انتقال آن به واسطه ATP13A2 با استرس اکسیداتیو در داخل میتوکندری مقابله می کند [۱۸]. اسپرمین در غلظت های بالا اثر سمی داشته که این اثر احتمالاً به دلیل تجمع در لیزوزوم و مرگ سلولی از طریق لیزوزوم است [۱۶]. از آن جایی که الگوی ژن های کاهش بیان داشته در بیماران مبتلا به نوع شدید کووید-۱۹ با ATP13A2 مرتبط است، از این رو

References:

- World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard 2021. Available from: www.covid19.who.int/?gclid=EAIAIQobChMI5ZO7r9rD8gIVkkiRBR3JBgAoEAAYASABEGIDj_D_BwE.
- Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(25):2451-60.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
- Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061-9.
- Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020;383(6):590-2.
- Ziegler CG, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*. 2020;181(5):1016-35. e19.
- Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat rev Mol cell biol*. 2009;10(9):623-35.
- Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*. 2020;183(6):1520-35. e14.
- Snijder EJ, Limpens R. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol*. 2020;18(6):e3000715.
- Audano M, Schneider A, Mitro N. Mitochondria, lysosomes, and dysfunction: their meaning in neurodegeneration. *J Neurochem*. 2018;147(3):291-309.
- Fleming SM, Santiago NA, Mullin EJ, Pamphile S, Karkare S, Lemkuhl A, et al. The effect of manganese exposure in Atp13a2-deficient mice. *Neurotoxicology*. 2018;64:256-66.
- Robinson M, Schor S, Barouch-Bentov R, Einav S. Viral journeys on the intracellular highways. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(20):3693-714.
- Spataro R, Kousi M, Farhan SM, Willer JR, Ross JP, Dion PA, et al. Mutations in ATP13A2 (PARK9) are associated with an amyotrophic lateral sclerosis-like phenotype, implicating this locus in further phenotypic expansion. *Hum genomics*. 2019;13(1):1-10.
- Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP, Krainc D. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α -synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J Neurosci*. 2012;32(12):4240-6.
- Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, et al. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett*. 2013;587(9):1316-25.
- van Veen S, Martin S, Van den Haute C, Benoy V, Lyons J, Vanhoutte R, et al. ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*. 2020;578(7795):419-24.

17. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(1):39-51.
18. Vrijnsen S, Besora-Casals L, van Veen S, Zielich J, Van den Haute C, Hamouda NN, et al. ATP13A2-mediated endo-lysosomal polyamine export counters mitochondrial oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(49):31198-207.

Polyamine transporter ATP13A2 and Covid-19: a microarray assay-based and functional analysis study

Mohsen Alipour¹, Abazar Roustazadeh^{2*}

Received: 2021.08.27

Revised: 2021.10.21

Accepted: 2021.12.01

1. Department of Biochemistry, Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

2. Department of Biochemistry, Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, Research Center for Non-Communicable Diseases, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.3, Fall 2021

Pars J Med Sci 2021;19(3):14-19

Abstract:

Introduction:

Unfortunately, a lot of people infected with and died due to covid-19. The exact mechanism of causative virus in human body is unknown. The aims of the study were to survey and analysis the microarray data and to perform functional analysis to unveil the new mechanisms of this virus in regarding to human cells.

Methods and Materials:

NCBI microarray extracted data were analyzed by GEO2R and R package. Up- and down-regulated genes were extracted and functional analysis was performed.

Results:

Results showed that in Log₂ expression greater than 3 and lesser than -3 of transcriptome, there were 319 and 573 up-regulated genes in mild and severe covid-19 patients, respectively. Also there were 156 and 590 down-regulated genes in mild and severe covid-19 patients, respectively. GO analysis showed that deferentially expressed gene pattern in severe covid-19 patients is related to ATP13A2.

Conclusion:

Covid-19 probably regulates its vitality in human cells through interplay with factors such as ATP13A2

Keywords: Covid-19, Microarray, ATP13A2, Functional Analysis

* Corresponding author Email: Roustazadeh@jums.ac.ir