



مقاله علمی - پژوهشی:

اثرات تنظیمی سیس و ترانس LncRNA در بیان افتراقی ژن‌ها طی آلودگی ویروس سیتی سمی خونریزی‌دهنده (Viral Hemorrhagic Septicemia) در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمود توکلی الموتی^۱، قدرت رحیمی میانجی^۱، اردشیر نجاتی جوارمی^۲، الهام یونسی^۳، ایوب فرهادی^{۱*}

*Ayoub_farhadi@ymail.com

۱- گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

ساری، ایران

۲- گروه مبارک اندیش، تهران، ایران

۳- موسسه ژنتیک و بیوتکنولوژی کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری،

ایران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱

چکیده

در این مطالعه با استفاده از فناوری RNA-seq اثر تنظیمی سیس و ترانس ژن‌های غیر کد شونده بلند (lncRNA) در بیان ژن‌ها در ماهیان آلوده به ویروس سیتی سمی هموراژیک خونریزی‌دهنده (VHS) مورد بررسی قرار گرفت. در پایان دوره آزمایشی (روز سی و پنجم)، RNA کل از بافت طحال (گروه تیمار شده با ویروس) و سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) و برای آماده‌سازی کتابخانه برای mRNA-seq، مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز RNA-seq، نشان داد که تعداد ۶۳ ژن lncRNA دارای بیان افتراقی بوده است که با ۹۲ ژن کد شونده به صوت سیس در محدوده ۲۰ هزار باز بالا دست و پایین دست ژن‌های مورد نظر ارتباط داشتند. از میان جفت ژن‌های کد شونده و lncRNA، آنهایی که همبستگی بیانی بیشتر از مثبت ۹۰ درصد و کمتر از منفی ۹۰ درصد داشتند به ترتیب به عنوان جفت ژن‌های با بیان هم‌راستا و غیر هم‌راستا مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژن‌های کد شونده BHLHE41، Interlukin10، RBP47، synaptopodin، gastrotropin، OX2 و SMC2 با ۸ و ۱۳ ژن lncRNA به ترتیب دارای ارتباط سیس و ترانس بودند. ژن‌های synaptopodin، gastrotropin، Interlukin10، SMC2، OX2 و دو ژن RBP47 و BHLHE41 به ترتیب در گروه تیمار ویروسی و گروه شاهد بیان بالاتری نشان دادند. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌ها نشان‌دهنده فعالیت ژن‌های سایتوکینی از جمله ژن اینترلوکین ۱۰ بود که در پاسخ‌های التهابی در سیستم ایمنی نقش مهمی دارد.

لغات کلیدی: ماهی قزل آلا رنگین کمان، ویروس VHS، RNAseq، lncRNA، سیس و ترانس

*نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نقش بسیار حیاتی در راستای امنیت غذایی و اقتصاد جهانی دارد. این ماهی از ماهیان سرد آبی خانواده Salmonidae و راسته آزاد ماهی شکلات Salmoniformes می‌باشد (FAO, 2020). در ایران، میزان تولید آبزیان (صید و آبی پروری) از ۴۲۴۵۰۰ تن در سال ۱۳۹۷ به ۱۲۶۸۷۱۹ تن در سال ۱۳۹۹ رسیده است که نشان‌دهنده رشد بالایی می‌باشد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۹۹-۱۳۹۳). در صنعت آبی‌پروری، عوامل بیماری‌زا از تهدیدهای جدی بر کارکرد اقتصادی این صنعت به حساب می‌آیند. به علاوه، شیوع بیماری میان جمعیت‌های ماهیان وحشی نیز یک نگرانی بسیار مهم به‌شمار به‌خصوص محیط‌های آبی به دلیل فعالیت‌های غیر مسئولانه انسانی و تغییرات آب و هوایی، باعث تأثیر بر سلامتی ماهیان می‌شوند. به منظور کاهش اثر بیماری‌ها بر جمعیت ماهیان، بالا بردن دانش و آگاهی بشر در ارتباط با درک مکانیسم‌های ایمنی دفاعی در ماهیان علیه عوامل بیماری‌زا ضروری است (Huang et al., 2015).

سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS)، یکی از بیماری‌های بسیار مسری است که عامل آن ویروسی از Rhabdoviridae و جنس *Novirhabdovirus* به نام ویروس VHSV است که ماده وراثتی آن از نوع RNA می‌باشد. این ویروس دارای چهار ژنوتیپ اصلی و سه سروتیپ است (Emmenegger et al., 2013). این بیماری ماهی قزل‌آلا پرورشی را در تمام سنین مبتلا می‌کند و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این ماهیان در سرتاسر دنیا است (He et al., 2014). به دلیل ماهیت عفونی و اثرات زیان بار اقتصادی آن، این بیماری در فهرست بیماری‌های اخطارکردنی سازمان جهانی بهداشت دام قرار گرفته است (OIE, 2016; Hafezieh et al., 2022).

در سلول‌های جانوری، بخش عمده‌ای از فراورده‌های RNA تولیدی، RNA غیر کدکننده پروتئین یا ncRNA هستند که ظاهراً هیچ پروتئینی را کد نمی‌کنند

و دارای نقش‌های مهم تنظیمی در سطوح مختلف از جمله رونویسی، ویرایش و بیان ژن دارند (Carninci et al., 2005). در سال‌های اخیر با ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید، همزمان با توسعه روش‌ها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مبتنی بر توالی‌یابی RNA، (RNA-seq) در تحقیقات بیولوژیک رواج بیشتری یافته است (Sudhagar et al., 2018). این فناوری با استفاده از فناوری‌های نوین توالی‌یابی، باعث شناسایی ترانسکریپت‌ها شده و به این طریق رفتار سلول را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. احمدی‌وند و همکاران (۲۰۱۶) میزان مرگ و میر ناشی از VHS در کشور را حدود ۷۰-۳۰ درصد گزارش کردند (Ahmadivand et al., 2016).

مطالعات مختلفی در رابطه با نقش LncRNA در رابطه با بیماری در ماهیان انجام شده است که می‌توان به پژوهش‌های Wang و همکاران (۲۰۱۷) و Marancik و همکاران (۲۰۱۵) اشاره کرد (Marancik et al., 2015; Wang et al., 2017). به طور کلی، نوع اثرگذاری LncRNA بر mRNA به دو شکل CIS (LncRNA بر ژن‌های نزدیک یا همسایه اثر بیشتری دارند (Gil and Ulitsky, 2020) و Trans (LncRNA بدون در نظر گرفتن فاصله از ژن مورد نظر بر ژن هدف اثر می‌گذارند (Ulitsky and Bartel, 2013) صورت می‌گیرد. LncRNA های سیس یک توالی RNA اولیه هستند که اغلب یک ساختار ثانویه متمایز دارند (برای مثال، عناصر غنی از AU (ARE)، جایگاه ورودی داخلی ریبوزوم (IRES) و به این شکل، سرنوشت و فعالیت خود RNA را از طریق تعامل با سایر مولکول‌های RNA، DNA یا پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA (RBPs) تنظیم می‌کند). هنگامی که در اینترون‌های پیش سازه RNA پیام‌رسان (pre-mRNA) و مناطق ترجمه نشده mRNA (UTRs) بالغ قرار داشته باشند، بر پردازش mRNA، پایداری mRNA، ترجمه، انتقال و فروپاشی آن اثر می‌گذارند. یکپارچگی ساختاری عناصر سیس و ترانس، قدرت و نتایج فیزیولوژیک برهمکنش‌های آنها را تعیین می‌کند و یک لایه اضافی از کنترل بیان ژن را ارائه

استخراج RNA و آماده سازی کتابخانه

جهت استخراج RNA از نمونه‌های بافت طحال (۱۰۰ میلی گرم) استفاده شد. سی نمونه بافت طحال تزریق شده با سرم فیزیولوژی ۶ صدم میلی لیتر (گروه شاهد) و سی نمونه بافت طحال تزریق شده با ویروس ۶ صدم میلی لیتر (گروه بیمار) جهت استخراج RNA کل انتخاب شدند. هر ده نمونه بافتی در قالب یک نمونه بافتی ادغام شدند و با پروتکل کیت تجاری ترایزول استخراج RNA انجام گرفت. کنترل کیفی نمونه‌های RNA استخراج شده در ژل آگارز یک درصد انجام شد. از شرکت چینی نوواژن در مجموع شش نمونه کتابخانه RNA-seq با استفاده از کیت آماده سازی نمونه TruSeq™ مطابق دستورالعمل شرکت ایلومینا تهیه شد. در ادامه نمونه‌ها به صورت دو انتهای قطعات (Paired end) با استفاده از پلت فرم illumina hiseq 2500 توالی‌یابی شدند

کنترل کیفی توالی‌ها

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی هر نمونه، ابتدا کنترل کیفیت خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار FastQC ورژن ۰.۱۱.۵ انجام شد. این آنالیز کیفیت میلیون‌ها خوانش را مورد بررسی قرار می‌دهد. در این مرحله، خوانش‌ها از نظر بازهای با اطمینان پایین، اریب در ترتیب نوکلئوتیدها، آدپتورها، محتوای GC، مضاعف شدگی‌ها و ... مورد بررسی قرار گرفتند.

همترازی و استخراج lncRNA

سپس هریک از کتابخانه‌های توالی‌یابی شده با استفاده از نرم افزار HISAT2 ورژن ۲.۲.۰ (Kim et al., 2019) روی ژنوم مرجع ماهی^۱ قزل‌آلای رنگین‌کمان از داده بانک NCBI هم‌تراز شدند. در ادامه جهت ارزیابی کمی و هویت‌یابی خوانش‌های هم‌تراز شده از نرم‌افزار Stringtie ورژن ۲.۱.۴ (Kovaka et al., 2019) استفاده شد. سپس از نرم افزار FEELnc ورژن ۰.۲ (Wucher et al., 2017) با تنظیمات پیش فرض جهت استخراج ژن‌های کد

می‌دهد (Perteau, 2012; Elcheva and Spiegelman, 2020). توانایی lncRNA برای تنظیم سطح بیان ژن‌های مجاور (CIS) ممکن است به رونوشت lncRNA بالغ مرتبط باشد یا آنها به lncRNA ها برای ایفاء نقش تنظیمی متکی نیستند (تاثیر ثانویه آنها). در lncRNA ها ترانس، ثابت شده است که پروتئین‌ها یا سایر مولکول‌های RNA برای تنظیم بیان ژن‌های هدف نقش ایفاء می‌کنند (Kopp and Mendell, 2018).

با توجه به رشد فزاینده دانش بشر از اهمیت lncRNA ها در مسیرهای بیولوژیک در موجودات مختلف و با توجه به اهمیت بیماری VHS در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، هدف از این پژوهش بررسی الگوی اثر سیس و ترانس lncRNA های حاصل از داده‌های RNA-seq بر بیان افتراقی ژن‌های کد شونده بوده است.

مواد و روش کار

چالش ویروسی و نمونه‌برداری

ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (نژاد تروتلاچ آمریکایی) به تعداد ۱۲۰ عدد با میانگین وزن گرم $38/3 \pm 8$ بعد از ۱۸ روز پرورش در تانک‌های استریل شده، گروه‌های تیمار ویروسی با غلظت $4/5 \times 10^4$ pfu/mL به‌ترتیب با دزهای ۰/۰۶ و ۰/۰۳ میلی‌لیتر (از مرکز ملی تشخیص، آزمایشگاه‌های مرجع و مطالعات کاربردی سازمان دامپزشکی کل کشور در اختیار این مطالعه قرار گرفته بود) و دو گروه دیگر هم با دزهای ۰/۰۶ و ۰/۰۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، تزریق داخل صفاقی شدند (Ghaderzadeh et al., 2021). تزریق به ماهیان هنگام بیهوشی آنها صورت گرفته (PI222) و بلافاصله بعد از تزریق ماهیان به داخل تانک بازیابی منتقل شدند. بافت‌های مفید برای ارزیابی تشخیصی این بیماری عبارتند از طحال، کلیه قدامی، قلب و مغز (MacLachlan and Dubovi, 2017). در پایان دوره آزمایش (پایان هفته پنجم)، RNA کل از بافت طحال استخراج و بعد از انجام کنترل کمی و کیفی در ادامه جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت (Ghaderzadeh et al., 2021).

¹ GCF_013265735.2_USDA_OmykA_1.1_genomic

انسان بسیار پایین می‌باشد، با توجه به اورتولوگ بودن فعالیت ژن‌ها در گونه از همان مشخصه‌ها برای ایجاد شبکه ژنی در انسان استفاده شد.

نتایج

در پژوهش حاضر تعداد ۶۳ ژن LncRNA (۴۴ ژن کاهش بیان و ۱۹ ژن افزایش بیان نسبت به تیمار کنترل و ۹۲ ژن کدشونده (۶۰ ژن کاهش بیان و ۳۲ ژن افزایش بیان) نسبت به گروه کنترل، دارای بیان افتراقی بودند. در جدول ۱ ژن‌های کد شونده دارای ارتباط سیس با LncRNA بیان شده ارائه شده است. در جدول ۲، جفت ژن‌های در موقعیت سیس که بیان آنها هم‌راستا (همبستگی مثبت) یا غیر هم‌راستا بودند (همبستگی منفی)، گزارش شده‌اند. بنابراین، ژن‌های کدشونده Interlukin10، BHLHE41،^۳ RBP47^۴، synaptopodin، gastrotropin و OX2 و SMC2 به عنوان ژن‌هایی شناسایی شده‌اند که دارای ارتباط سیس با LncRNA بوده‌اند (جدول ۱). شایان ذکر است، در پژوهش Afzali و همکاران (۲۰۲۱) در رابطه با نقش سیتوکین‌ها و کموکین‌های کبدی که در پاسخ به آلودگی ویروسی VHS در ماهی قزل آلا رنگین‌کمان انجام گرفته بود، بیان ژن‌های اینترلوکین ۱۰ و *TNFα* در تیمار ویروسی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت.

در جدول ۲ ژن‌های کد شونده‌ای که به صورت سیس با LncRNA‌ها دارای همبستگی منفی و مثبت هستند، ارائه شده است. بعضی ژن‌ها با چند LncRNA هم‌کنش داشتند که تکرار شدند. همچنین بیان هر ژن در شکل ۱ به صورت گراف نشان داده شد. در جدول ۲ از چپ به ترتیب ستون مربوط به ژن LncRNA، log2fc^۵ آن، نام ژن کد شونده و log2fc ژن کد شونده، جهت LncRNA نسبت به ژن کد شونده، نوع LncRNA، فاصله از ژن، زیر

شونده و غیر کد شونده استفاده شد. این نرم‌افزار همه مراحل فیلتراسیون LncRNA که شامل ترانسکریپت‌های با طول بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید و تعداد اگزون بیشتر از یک می‌باشد، مورد ارزیابی قرار داده و ترانسکریپت‌های coding و non-coding و نوع ارتباط بین آنها را مشخص کرده است.

آنالیز بیان ژن و شناسایی موقعیت های CIS و Trans در LncRNA

آنالیز بیان ژن‌ها با بسته آماری Deseq2 در نرم افزار R 4.1.2 صورت گرفت (Love et al., 2014). ژن‌های با FDR^۱ کوچکتر از ۰/۰۵ و Log2FC^۲ بزرگتر مساوی ۱ یا کوچکتر مساوی ۱- به عنوان ژن‌های با بیان افتراقی (DE) شناخته شدند (Kim et al., 2013; Anders et al., 2015). پس از شناسایی همه ژن‌ها با بیان افتراقی، ژن‌های کد شونده پروتئین و ژن‌های مرتبط با LncRNA‌ها از یکدیگر تفکیک شدند. براساس فاصله نوکلئوتیدی این دو گروه ژنی روی ژنوم مرجع، رابطه سیس و ترانس بر مبنای فواصل ۱۰ کیلو باز (در محدوده ۲۰ کیلو باز بالا دست و پایین‌دست ژن‌ها) در نظر گرفته شد. در ادامه تجزیه و تحلیل همبستگی بین دو گروه ژن‌های کد شونده و غیر کد شونده براساس میزان تغییر بیان به‌دست آمد. حداقل میزان همبستگی مثبت و منفی به‌ترتیب ۹۰ درصد در نظر گرفته شد.

آنالیز ژن آنتولوژی و شبکه ژنی

آنالیز آنتولوژی ژن و شبکه ژنی با نرم افزار String 11.5 صورت گرفت و حداقل مقدار FDR، ۵ درصد در نظر گرفته شد. از مشخصه‌های ژن‌هایی که به صورت سیس و ترانس با LncRNA‌ها دارای ارتباط بودند، جهت بررسی آنتولوژی ژن و ترسیم شبکه ژنی استفاده شد. از آنجایی‌که اطلاعات حاشیه نویسی ژنوم ماهی نسبت به

^۳ Basic helix-loop-helix family e41

^۴ RNA-binding protein 47

^۵ log2fc منفی به معنای کاهش بیان نسبت به تیمار کنترل و log2fc مثبت برعکس آن می‌باشد.

^۱ False Discovery Rate

^۲ کمیتی که مقدار تفاوت در شکل دو ماده اصلی و فرعی را نشان می‌دهد (Fold Change value)

گروه و محل lncRNA نسبت به ژن ارائه شده است. از آنجایی که ژنهای lncRNA در مطالعات قبلی کشف و حاشیه نویسی نشده بودند، نرم افزار Stringtie به آنها کد

پیش فرض MSTRG می‌دهد که هر کدام نشان‌دهنده مشخصه ژن یک lncRNA هستند.

جدول ۱: ژنهای کد شونده با رابطه تنظیمی CIS
Table 1: Coding genes with CIS regulatory action

نوع ژن کد شونده	عملکرد ژن
<i>OX2</i> یا <i>CD200</i> (<i>LOC118936384</i>)	این ژن گلیکوپروتئین غشایی نوع یک را که شامل دامنه‌های ایمونوگلوبولین خارج سلولی، دامنه‌ی غشایی و دامنه‌ی سیتوپلاسمی است را کد می‌کند. این ژن توسط سلول‌های متفاوتی مانند سلول‌های B، زیر مجموعه‌هایی از سلول‌های T، تیموسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال‌ها و نورون‌ها بیان می‌شوند. مطالعات انسانی نشان دهنده‌ی آن است که پروتئین کد شده‌ی این ژن نقش مهمی در سرکوب سیستم ایمنی و تنظیم فعالیت ضد توموری دارد (Moreaux et al., 2008).
<i>Interlukin10</i> (<i>IL10</i>)	اینترلوکین ۱۰ (<i>IL10</i>) یک سایتوکین پلی‌مورفیک با اثرات متنوع فنوتیپی است. در ابتدا به عنوان یکی از محصولات سلول‌های T Helper2 در نظر گرفته که از فعال شدن سلول‌های T Helper1 جلوگیری می‌کند، اما در حال حاضر به عنوان محصول تقریباً همه‌ی گونه‌های با سلول‌های فعال شامل سلول‌های B، سلول‌های ماست، گرانولوسیت (مانند نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، آئوزینوفیل‌ها)، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتی، و انواع زیر مجموعه‌های سلول T محسوب می‌شود (O'Garra et al., 2008).
<i>BHLHE41</i>	این ژن یک پروتئین پایه helix-loop-helix را کد می‌کند که در بافت‌های مختلف بیان می‌شود. پروتئین حاصله می‌تواند با ژن ARNTL (یکی از ژن‌های تنظیم کننده‌ی ریتم خواب) تعامل کند یا برای اتصال به مکان‌های E-box در پروموتور PER1 رقابت کرده و فعال سازی CLOCK/ARNTL را سرکوب کند. (Fujimoto et al., 2007).
<i>RBP47</i> (<i>LOC118948728</i>)	پروتئین‌های متصل شونده به RNA (<i>RBPs</i>) وظایف مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. <i>RBP</i> ها نقش کلیدی در فرآیندهای پسارونویسی در یوکاریوت‌ها، مانند تنظیم پیرایش، انتقال mRNA و mRNA modulation ترجمه و فروپاشی ایفا می‌کنند (Oliveira et al., 2017).
<i>Gastrotropin</i> (<i>LOC110504792</i>)	پروتئین‌های متصل شونده به اسید چرب (<i>FABPs</i>) متعلق به خانواده بزرگ چند ژنی پروتئین‌های پیوند دهنده به لیپید داخل سلولی (<i>iLBPs</i>) هستند. به اسیدهای صفراوی متصل می‌شود و در متابولیسم اسید صفراوی انتروپاتیک نقش دارد. (Schroeder et al., 2008).
<i>Synaptopodin</i> (<i>LOC110489230</i>)	<i>Synaptopodin</i> ، یک پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی، مرتبط با اسکلت سلولی اکتین چگالی پسا سیناپسی و خارهای دندریتیک، تصور می‌شود که در تعدیل شکل مبتنی بر اکتین و حرکت خارهای دندریتیک در طول تشکیل یا حذف تماس های سیناپسی نقش دارد (Roth et al., 2001).
<i>SMC2</i> (<i>LOC110516074</i>)	<i>SMC2</i> Structural maintenance of chromosomes2 (کمپلکس‌های کندانسنین را رمزگذاری می‌کند که برای جداسازی مناسب کروموزوم‌ها و حفظ ثبات کروموزومی مورد نیاز است) (Je et al., 2014).

lncRNAهای sense از همان رشته (نسبت به ژن کد شونده) و در همان جهت رونویسی می‌شوند. آنها می‌توانند چند اگزونیک و اینترونیک باشند. lncRNAهای آنتی‌سنس از رشته مخالف ژن‌های کدکننده پروتئین رونویسی می‌شوند که می‌توانند چند اگزونیک و اینترونیک باشند (Dhanoa et al., 2018).

در جدول ۳ ارتباط اثر ترانس lncRNA-mRNA بررسی شده است. ژن اینترلوکین ۱۰ و *Gastrotropin* در این پژوهش دارای بیان بالا در گروه تیمار شده با ویروس

بودند. بیان ژن اینترلوکین ۱۰ با ژنهای lncRNA *MSTRG.35245* و *MSTRG.35245* همسو نبود، اما با ژن *MSTRG.37474* lncRNA دارای ارتباط بیانی مثبت داشت. با توجه به جدول ۲ برای مثال، lncRNA

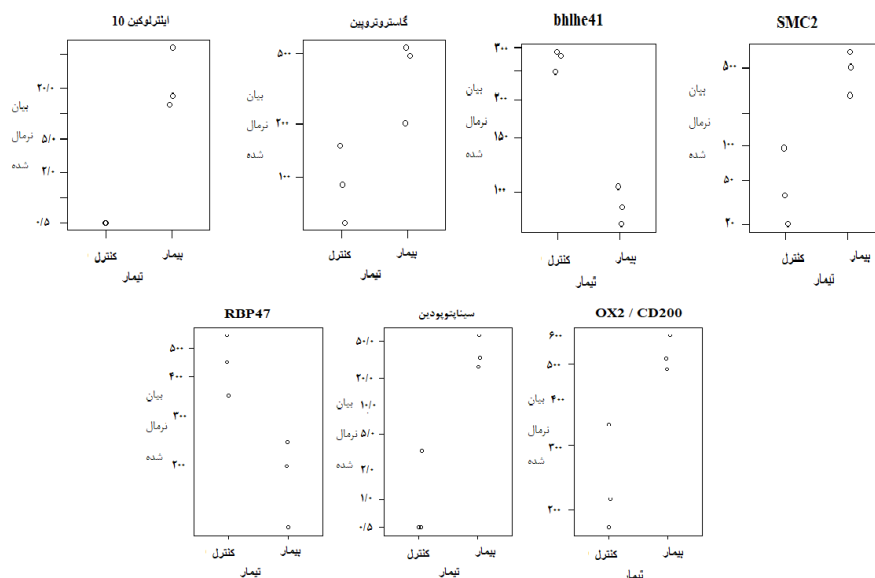
MSTRG.59500 در فاصله ۹ باز از ژن *bhlhe41* به صورت اینترژنیک و آنتی سنس (رشته مخالف) قرار دارد و بیانش با ژن *bhlhe41* همسوست (شکل های ۱ و ۲).

جدول ۲: جفت ژنهای mRNA – lncRNA با الگوی تنظیمی سیس و بیان هم راستا (پایین) و غیر هم راستا (بالا)
Table 2: Pairs of lncRNA-mRNA genes with positive cis-regulatory pattern (below) and negative expression action (top)

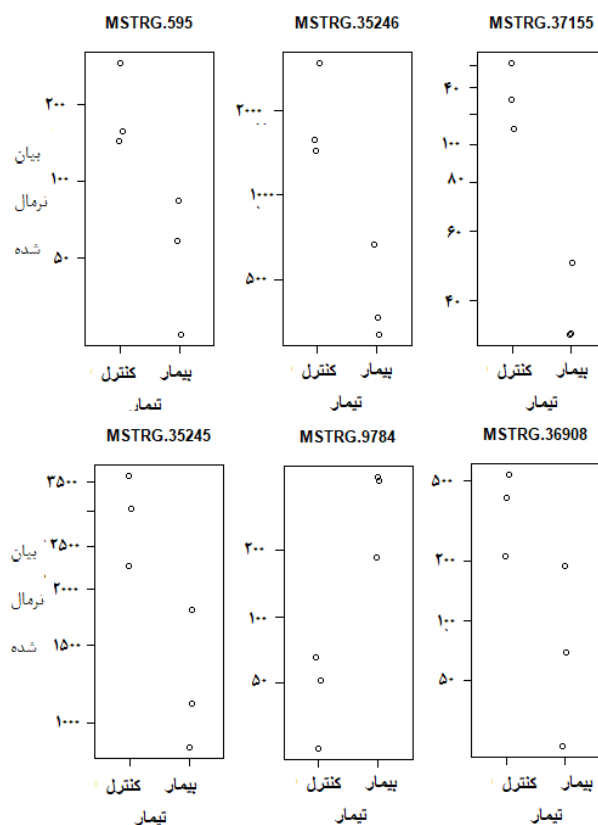
همبستگی	جایگاه	زیر مجموعه	فاصله	نوع	جهت	Log2fc	نام ژن	log2fc	lncRNA
-۰/۹۶	پایین دست	same strand	۲۸۴۸	اینترژنیک	سنس	-۳/۲	<i>SMC2</i>	+۲/۰	<i>MSTRG.36908</i>
-۰/۹۴	پایین دست	convergent	۱۹۳۲۵	اینترژنیک	آنتی سنس	-۲/۰	<i>gastrotropin</i>	+۲/۱	<i>MSTRG.35246</i>
-۰/۹۸	پایین دست	same strand	۷۸۲۱	اینترژنیک	سنس	-۲/۰	<i>gastrotropin</i>	+۱/۲	<i>MSTRG.35245</i>
-۰/۹۱	پایین دست	convergent	۱۳۵۸۵	اینترژنیک	آنتی سنس	-۱/۲	<i>OX2</i>	+۳/۵	<i>MSTRG.8586</i>
+۰/۹۶	پایین دست	same strand	۹۱	اینترژنیک	سنس	+۱/۳	<i>RBP47</i>	+۱/۸	<i>MSTRG.37155</i>
+۰/۹۹	پایین دست	same strand	۱۳۷۶	اینترژنیک	سنس	-۵/۲	<i>synaptopodin</i>	-۱/۴	<i>MSTRG.19779</i>
+۰/۹۷	پایین دست	convergent	۳۱	اینترژنیک	آنتی سنس	-۷/۲	<i>IL10</i>	-۱/۴	<i>MSTRG.9784</i>
+۰/۹۵	پایین دست	convergent	۹	اینترژنیک	آنتی سنس	+۱/۶	<i>bhlhe41</i>	+۱/۸	<i>MSTRG.59500</i>

جدول ۳: جفت ژنهای mRNA – lncRNA با الگوی تنظیمی ترانس و بیان هم راستا (سمت چپ) و غیر هم راستا (سمت راست)
Table 3: Pairs of lncRNA-mRNA genes with positive trans-regulatory pattern (left) and negative expression action (right)

ژن کد شونده	Log2fc	lncRNA	Log2fc	همبستگی	ژن کد شونده	Log2fc	lncRNA	Log2fc	همبستگی
<i>il10</i>	-۷/۲	<i>MSTRG.35245</i>	۱/۳	-۰/۹۷	<i>il10</i>	-۷/۲	<i>MSTRG.37474</i>	-۵/۴	+۰/۹۹
<i>il10</i>	-۷/۲	<i>MSTRG.35246</i>	۲/۱	-۰/۹۹	<i>Gastrotropin</i>	-۲/۰	<i>MSTRG.37474</i>	-۵/۴	+۰/۹۸
<i>bhlhe41</i>	۱/۶	<i>MSTRG.9784</i>	-۲/۹	-۰/۹۹	<i>Gastrotropin</i>	-۲/۰	<i>MSTRG.23217</i>	-۶/۰	+۰/۹۷
<i>bhlhe41</i>	۱/۶	<i>MSTRG.17050</i>	-۱/۶	-۰/۹۸	<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.11251</i>	۵/۲	+۰/۹۹
<i>Gastrotropin</i>	-۲/۰	<i>MSTRG.35246</i>	۲/۱	-۰/۹۷	<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.22382</i>	۷/۸	+۰/۹۹
<i>Gastrotropin</i>	-۲/۰	<i>MSTRG.35245</i>	۱/۳	-۰/۹۹	<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.33550</i>	۶/۱	+۰/۹۶
<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.9784</i>	-۲/۹	-۰/۹۳	<i>Gastrotropin</i>	-۲/۰	<i>MSTRG.23217</i>	-۶/۰	+۰/۹۵
<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.25175</i>	-۱/۲	-۰/۹۲	<i>Synaptopodin</i>	-۵/۲	<i>MSTRG.23217</i>	-۶/۰	+۰/۹۸
<i>RBP47</i>	۱/۳	<i>MSTRG.31383</i>	-۶/۳	-۰/۹۷	<i>Synaptopodin</i>	-۵/۲	<i>MSTRG.37474</i>	-۵/۴	+۰/۹۷



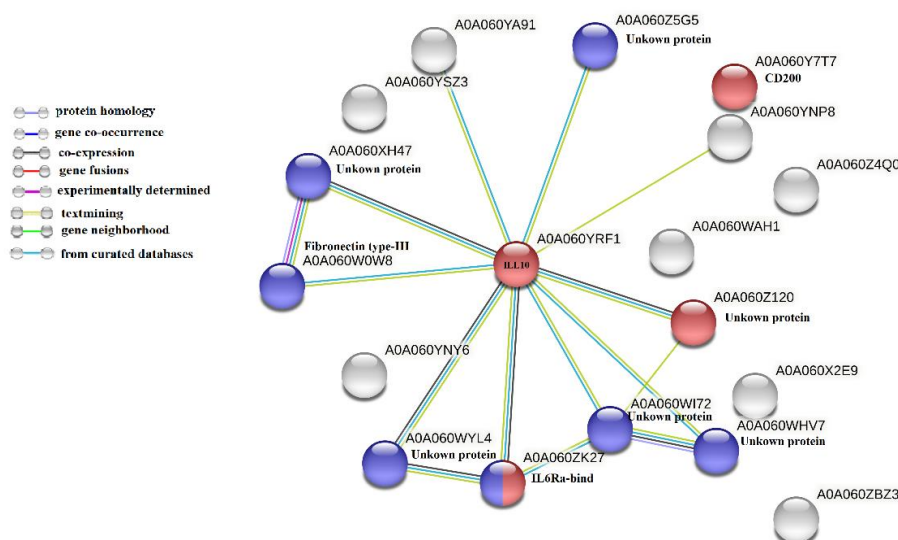
شکل ۱: بیان ژن‌های کد شونده در دو تیمار سالم (control) و بیمار (patient)
Figure 2: Expression of coding genes in both control and patient groups



شکل ۲: بیان تعدادی از ژن‌های lncRNA در دو تیمار سالم (control) و بیمار (patient)
Figure 2: Expression of lncRNA genes in both control and patient groups.

نقش Cytokine-cytokine receptor interaction داشت. ژن‌های آبی رنگ ($FDR=2/6 \times 10^{-14}$) و ژن‌های قرمز ($FDR=7/2 \times 10^{-4}$) در تنظیم بیان اینترلوکین ۶ و تنظیم بیان سایتوکین‌ها نقش دارند.

آنالیز GO نشان‌دهنده ارتباط مشترک بین همه ژن‌ها نبود، اما با افزایش تعداد ژن‌های درگیر (به منظور بررسی ارتباط احتمالی بین ژن‌ها) نقش ژن اینترلوکین ۱۰ به‌وضوح نشان داده شد (شکل ۳). این ژن در فرایند



شکل ۳: شبکه‌ی محصول ژن‌های کد شونده با استفاده از نرم افزار String11.5
Figure 3: Gene networking by coding genes proteins by String11.5 software

ایمونوگلوبولین‌ها، در سلول‌های B، زیر مجموعه‌ای از سلول‌های T و در طیفی از اختلالات لنفوپرولیفراتیو (تولید بیش از اندازه لنفوسیت‌ها) سلول B بیان می‌شود. در مطالعات انسانی از *CD200* به عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص انواع سرطان‌ها استفاده می‌شود (Dorfman and Shahsafaie, 2011).

ژن *SMC2* در حفظ ساختار کروموزومی دخیل است و تصور می‌شود که عدم کارکرد مناسب این ژن ناهنجاری‌های کروموزومی را به دنبال خواهد داشت. اگرچه در ارتباط با اثر این ژن با آلودگی‌های پاتولوژیک گزارش‌های چندانی وجود ندارد، اما از نقش آن در بیماری سرطان دستگاه گوارشی در انسان گزارش شده است (Je et al., 2014). *Rbm47* باعث افزایش تولید *IL-10* در سلول‌های B می‌شود. محققان دریافته‌اند که *Rbm47*، پایداری mRNA *IL-10* را افزایش می‌دهد. در رابطه با

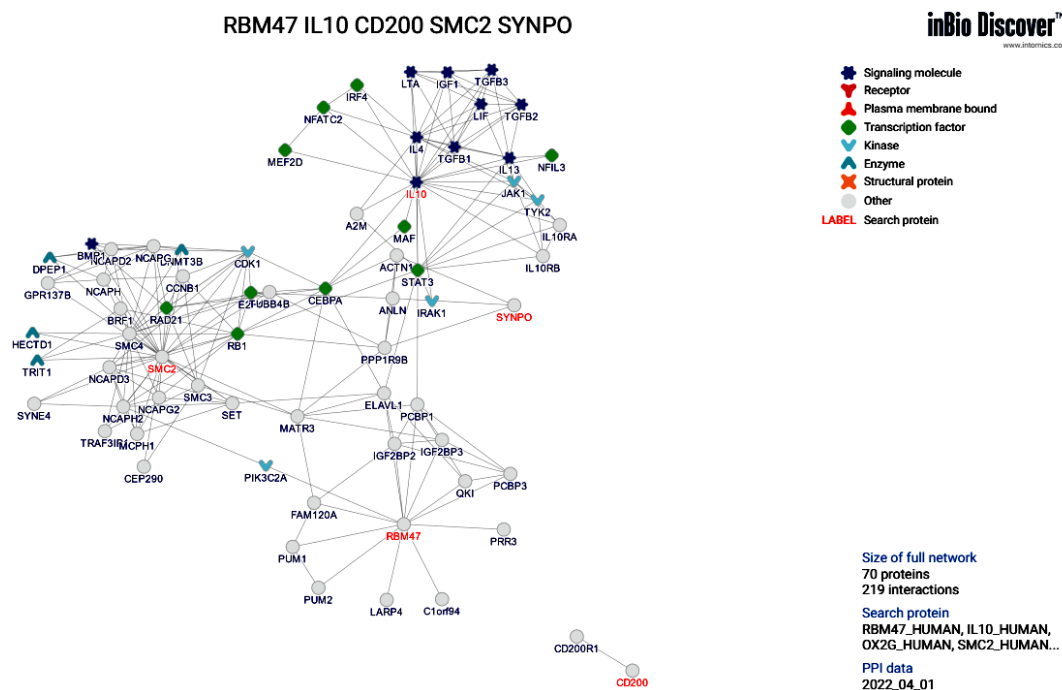
بحث

اینترلوکین ۶ (از جمله ژن‌های با بیان بالا نسبت به تیمار شاهد) و *FNDC4* (یک فاکتور ضد التهابی) (Bosma et al., 2016)، در این شبکه با اینترلوکین ۱۰ و سایر ژن‌هایی که احتمالاً مرتبط با سیستم ایمنی هستند، ارتباط زیادی دارند. یکی از دلایل پائین بودن تعداد ژن‌های شناسایی شده در آنالیز شبکه ژنی، فقدان اطلاعات کامل حاشیه‌نویسی در ارتباط با ژن‌های مورد بررسی در این گونه است (شکل ۳).

از دیگر ژن‌هایی که در پژوهش حاضر دارای بیان بالا در گروه تیمار با ویروس بودند، می‌توان به ژن‌های *OX2* یا *CD200*، سیناپتوپودین و گاستروتروپین اشاره نمود. ژن *CD200* یک گلیکوپروتئین غشای سلولی نوع ۱ از خانواده سوپرژن ایمونوگلوبولینی و مرتبط به پاسخ‌های ایمنی است. *CD200* یک گلیکوپروتئین غشایی از خانواده

و در نتیجه از آسیب به میزبان جلوگیری و به حفظ هموستاز بافت طبیعی بدن کمک می‌کند (Iyer and Cheng, 2012). با توجه به این که ژن‌های *bhlhe41*, *Smc2*, *Rbm47* و اینترلوکین ۱۰ در مطالعات قبلی در انسان با سیستم ایمنی دارای ارتباط بوده‌اند، اما وجود این ارتباط در ماهی تا به حال گزارش نشده است. لذا، برای بررسی وجود ارتباطات احتمالی به دلیل در دسترس بودن منابع حاشیه‌نویسی شده برای این ژن‌ها از آنجایی که این ژن‌ها اورتولوگ (کنش یکسان به دلیل جد مشترک گونه‌ها) هستند، از گزارش‌های مربوط به مطالعات انسانی به عنوان مرجع استفاده شد (شکل ۴).

ژن *bhlhe41* و ارتباط آن با سیستم ایمنی نشان داده شد که سلول‌های B-1a اولین خط دفاعی ذاتی در برابر پاتوژن‌ها هستند. در این تحقیق گزارش شده است که فاکتور رونویسی *Bhlhe41* در تمایز سلولی B-1a نقش دارد (Kreslavsky et al., 2017). تا کنون ارتباطی میان ژن‌های سیناپتوپودین و گاستروپودین با سیستم ایمنی گزارش نشده است. در مطالعه حاضر، بیان بالای ژن اینترلوکین ۱۰ در تیمار ویروسی، نشان‌دهنده درگیری سیستم ایمنی ماهی با ویروس بوده است. اینترلوکین ۱۰ (*IL-10*) یک سایتوکین با خواص ضد التهابی قوی است که نقشی محوری در محدود کردن پاسخ ایمنی میزبان به پاتوژن‌ها ایفاء می‌کند



شکل ۴: شبکه ژنی بین ژن‌های *RBM47*، اینترلوکین ۱۰، سیناپتوپودین و ژن *BHLHE41*
Figure 4: Gene networking between *BHLHE41*, *ILL10*, *Synaptopodin* and *RBM47*

کننده تومور به حساب می‌آید (Dyson, 2016)، به ژن *SMC2* مرتبط است. در این مطالعه ژن‌های سیناپتوپودین و گاستروتروپین نیز در ماهیان گروه تیمار شده با ویروس نسبت به گروه شاهد بیان بالاتری داشتند. اگر چه ژن سیناپتوپودین در این شبکه مشخص است، اما برای ژن

نتایج این بررسی نشان داد که ژن اینترلوکین ۱۰ با سیگنالینگ مولکول‌هایی نظیر *TGFB1*، *IGF1*، *TGFB2*، *IL4*، *IL13* مرتبط است که این امر حکایت از نقش تنظیمی سایتوکینی این جایگاه ژنی دارد. این ژن با فاکتورهای تنظیمی *CEBPA* و *RB1* که یک سرکوب

LncRNAهای مرتبط با پاسخ ایمنی، افتراق عضلانی و توسعه عصبی را نشان داد (Wang et al., 2016). با انجام مطالعات بیشتر به منظور بررسی وجود چند شکلی در ژنهای بیان شده در این پژوهش مانند اینترلوکین ۱۰ به عنوان یک مولکول سیگنال دهنده، اینترلوکین ۶ گیرنده آلفا (شبکه ژنی شکل ۳)، *FNDC4* یا LncRNA در موقعیت‌های سیس یا ترانس به عنوان جایگاه‌های تنظیم کننده بیان ژن‌ها در همان بافت به‌خصوص آنهایی که بر چند ژن اثر داشته‌اند، در مزارع آلوده به ویروس VHS (شرایط واقعی) یا عفونت‌های مشابه همانند بیمارهای ویروسی IPN و IHN می‌توان به شناسایی eQTLها دست یافت. در نتیجه، با ردیابی این دست از eQTLها می‌توان با توجه به نوع ژن در راستای انتخاب جمعیت‌های مقاوم‌تر یا در تشخیص بیماری‌ها در صنعت آبزیان بهره برد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین هلدینگ مبارک اندیش که منابع مالی این پروژه را از ابتدا تا انتها تامین نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

سالنامه آماری شیلات ایران، ۹۹-۱۳۹۴. سازمان شیلات ایران. دفتر برنامه و بودجه، گروه برنامه‌ریزی و آمار، ایران، تهران

Afzali, M., Rahimi Mianji, G. and Gholizadeh, M., 2021. TNF- α and interleukin 10 genes expression in rainbow trout in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Veterinary Researches Biological Products*, 4(34), 194-201. DOI: 10.22092/vj.2020.343080.1725

CD200 در این شبکه ارتباطی نشان داده نشده است. در ارتباط با بیان بالاتر ژن‌های *bhlhe41* و *Rbm47* در گروه شاهد نسبت به گروه تیمار شده با ویروس می‌توان به یکی از مهم‌ترین نقش‌های این ژن (تمایز سلولی)، اشاره کرد که می‌تواند به دلیل سرکوب شدن این ژن به‌وسیله LncRNAها در تیمار آلوده با ویروس باشد. از آنجایی که تنظیم ژن *Rbm47* به‌شدت به میکرو-محیط اطراف وابسته است، به‌شدت در شرایط استرس یا بیماری، میل ترکیبی آن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. به عبارتی، سرکوب این ژن یکی از علائم بیماری‌زایی به‌شمار می‌آید (Kelaini et al., 2021). همچنین ژن *SMC2* بیان بالاتری را در ماهیان آلوده نشان داد تا احتمالاً بتواند ساختار DNA سلولی را در برابر تنش بیش از پیش حفظ کند.

در تحقیق پانرو و همکاران (۲۰۱۶) LncRNAهای با بیان افتراقی در پاسخ به *F. psychrophilum* در بین سه لاین (مقاوم، کنترل و حساس) ماهی شناسایی شدند. مقایسه RNAهای غیر کد شونده در گروه تیمار باکتریایی در بین لاین‌های مختلف، تعداد ۵۵۶ LncRNA با بیان افتراقی را آشکار ساخت. در بین برخی از LncRNAها و ژن‌های کد شونده پروتئینی از جمله سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و سایر ترکیبات مولکولی درگیر در سیستم ایمنی، همبستگی مثبت و منفی وجود داشت (Paneru et al., 2016).

در تحقیق Wang و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شد که LncRNAهای اینترژنیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای ویژگی‌های متفاوتی در مقایسه با سایر گونه‌های پستانداران هستند. برای مثال، در مقایسه با ژن‌های کد شونده پروتئین، این توالی‌ها، کوتاه‌تر، از نظر تعداد آگزون کمتر و سطح بیان پایین‌تری دارند. همان‌طوری که ذکر شد، LncRNAها در ماهیان نسبت به پستانداران الگوی بیان منحصربه‌فرد بافتی دارند و معمولاً با ژن‌های کناری خود، هم‌بیانی نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل هم‌بیانی ژن‌ها با استفاده از مدل شبکه، وجود تعداد زیاد

- Ahmadiwand, S., Soltani, M. Mardani, K. Shokrpour, S., Rahmati-Holasoo, H., Mokhtari, A. and Hasanzadeh, R., 2016.** Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Tropica*, 156, 30-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.005>
- Anders, S., Pyl, P.T. and Huber, W., 2015.** HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166-169. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Bosma, M., Gerling, M., Pasto, J., Georgiadi, A., Graham, E., Shilkova, O., Iwata, Y., Almer, S., Söderman, J. and Toftgård, R., 2016.** FNDC4 acts as an anti-inflammatory factor on macrophages and improves colitis in mice. *Nature Communications*, 7(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1038%2Fncomms11314>
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B. and Wells, C.J.S., 2005.** The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559-1563. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1112014>
- Dhanoa, J.K., Sethi, R.S., Verma, R., Arora, J.S. and Mukhopadhyay, C.S., 2018.** Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *Journal of Animal Science*, 60(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0183-7>
- Dorfman, D.M. and Shahsafaei, A., 2011.** CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) is expressed by follicular T helper cells and in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 35(1), 76-83. DOI: <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e31820065c9>
- Dyson, N.J., 2016.** RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Development*, 30(13): 1492-1502. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.282145.116>
- Elcheva, I.A. and Spiegelman, V.S., 2020.** The role of cis-and trans-acting rna regulatory elements in leukemia. *Cancers*, 12(12), 3854. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12123854>
- Emmenegger, E.J., Moon, C.H., Hershberger, P.K. and Kurath, G., 2013.** Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotypes Ia, IVa, IVb, and IVc in five fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(2), 99-111. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao02671>
- FAO, 2020.** Sustainability in action. Rome. DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Fujimoto, K., Hamaguchi, H., Hashiba, T., Nakamura, T., Kawamoto, T., Sato, F., Noshiro, M., Bhawal, U.K., Suardita, K. and Kato, Y., 2007.** Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements. *International Journal of*

- Molecular Medicine*, 19(6), 925-932. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.19.6.925>
- Ghaderzadeh, M., Rahimi Mianji, G., Nejati Javaremi, A. and Shahbazian, N., 2021.** Effect of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) disease on the biometric parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Researches Biological Products*, 34(1), 111-123. DOI:<https://dx.doi.org/10.22092/vj.2020.128441.1652>
- Gil, N., and Ulitsky, I., 2020.** Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 21(2), 102-117. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0184-5>
- Hafezieh, M., Ghasemi, M., Kakoolaki, S. and Kazempour, R., 2022.** Evaluation of polyclonal IgG antibody in Response to injection of viral Hemorrhagic Septicemia killed virus (VHSv) of trout fish (*Oncorhynchus mykiss*) in rabbit (*Oractulagus cuniculus*) in order to produce rapid diagnostic kit. *Isfj*, 31(1), 69-80. DOI:10.22092/ISFJ.2022.127048
- He, M., Yan, X.C., Liang, Y., Sun, X.W. and Teng, C.B., 2014.** Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: divergence, selection and origin. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 77, 34-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.002>
- Huang, L., Li, G., Mo, Z., Xiao, P., Li, J. and Huang, J., 2015.** De novo assembly of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) spleen transcriptome to identify putative genes involved in immunity. *PLoS One*, 10(2), e0117642. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117642>
- Iyer, S.S. and Cheng, G., 2012.** Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1): 23-63. DOI:<https://doi.org/10.1615/critrevimmuno.1.v32.i1.30>
- Je, EM., Yoo, N.J. and Lee, S., 2014.** Mutational and expressional analysis of SMC 2 gene in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *Apmis*, 122(6), 499-504. DOI:<https://doi.org/10.1111/apm.12193>
- Kelaini, S., Chan, C., Cornelius, V.A. and Margariti, A., 2021.** RNA-binding proteins hold key roles in function, dysfunction, and disease. *Biology*, 10(5), DOI:<https://doi.org/10.3390/biology10050366>
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. and Salzberg, S.L., 2013.** TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), 1-13. DOI:<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C. and Salzberg, S.L., 2019.** Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature*

- Biotechnology*, 37(8), 907-915. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kopp, F., and Mendell, J., 2018.** Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell*, 172(3), 393-407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Kovaka, S., Zimin, A.V., Pertea, G.M., Razaghi, R., Salzberg, S.L. and Pertea, M., 2019.** Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biology*, 20(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1910-1>
- Kreslavsky, T., Vilagos, B., Hiromi, T., Poliakova, D.K., Schwickert, T.A., Wöhner, M., Jaritz, M., Weiss, S., Taneja, R. and Rossner, M.J., 2017.** Essential role for the transcription factor Bhlhe41 in regulating the development, self-renewal and BCR repertoire of B-1a cells. *Nature Immunology*, 18(4), 442-455. DOI: 10.1038/ni.3694.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S., 2014.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- MacLachlan, N. and Dubovi, E., 2017.** Fowlpox. *Fenner's Veterinary Virology Elsevier Academic Press, Amsterdam*: 157-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06921-6>
- Marancik, D., Gao, G. Paneru, B. Ma, H. Hernandez, A.G. Salem, M. Yao, J. Palti, Y. and Wiens, G.D., 2015.** Whole-body transcriptome of selectively bred, resistant-, control-, and susceptible-line rainbow trout following experimental challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Frontiers in Genetics*, 5, 453. DOI: <https://doi.org/10.3389%2Ffgene.2014.00453>
- Moreaux, J., Veyrune, J.L., Reme, T., DeVos, J. and Klein, B., 2008.** CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 366(1), 117-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.103>
- O'Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A. and Hawrylowicz, C., 2008.** Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews*, 223(1), 114-131. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00635.x>
- OIE, 2016.** Manual of diagnostic tests for aquatic animals, Chapter 2.3.10. Viral haemorrhagic septicaemia.
- Oliveira, C., Faoro, H., Alves, L.R. and Goldenberg, S., 2017.** RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Molecular Biology* 40, 22-30. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0258>
- Panru, B., Al-Tobasei, R., Palti, Y., Wiens, G.D. and Salem, M., 2016.** Differential

- expression of long non-coding. RNAs in three genetic lines of rainbow trout in response to infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Sci Rep*, 6, 36032. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep36032>
- Perte, M., 2012.** The human transcriptome: an unfinished story. *Genes*, 3(3), 344-360. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes3030344>
- Roth, S.U., Sommer, C., Mundel, P. and Kiessling, M., 2001.** Expression of synaptopodin, an actin-associated protein, in the rat hippocampus after limbic epilepsy. *Brain Pathology*, 11(2), 169-181. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00389.x>
- Schroeder, F., Petrescu, A.D., Huang, H., Atshaves, B.P., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Hostetler, H.A., Vespa, A., Landrock, D. and Landrock, K.K., 2008.** Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*, 43(1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3111-z>
- Sudhagar, A., Kumar, G. and El-Matbouli, M., 2018.** Transcriptome analysis based on RNA-Seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 245. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19010245>
- Ulitsky, I. and Bartel, D.P., 2013.** LincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26-46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>
- Wang, J., Koganti, P.P., Yao, J., Wei, S. and Cleveland, B., 2017.** Comprehensive analysis of lncRNAs and mRNAs in skeletal muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estradiol. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14. DOI: 10.1038/s41598-017-12136-6
- Wang J., Fu. L, Koganti, P.P. Wang, L. Hand, J.M. Ma, H. and Yao, J., 2016.** Identification and Functional Prediction of Large Intergenic Noncoding RNAs (lincRNAs) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol (NY)*. 18(2):2 71-82. DOI: 10.1007/s10126-016-9689-5.
- Wucher, V., Legeai, F., Hedan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A. and Lohi, H., 2017.** FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 45(8), e57-e57. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306>.

Regulatory effects of cis- and trans-LncRNAs on differential expression of genes following infection with viral hemorrhagic septicemia virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Tavakoli alamouti M.¹; Rahimi Mianji Gh.¹; Nejati Javaremi A.²; Younesi E.³; Farhadi A.^{1*}

*Ayoub_farhadi@ymail.com

1- Department of Animal Science Engineering, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran

2- Mobarak Andish group, Tehran

3- Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran

Abstract

In this study the cis and trans regulatory effect of long non-coding genes (lncRNA) on the expression of genes in fish infected by Viral hemorrhagic septicemia virus (VHS) was investigated using RNA-seq technology. At the end of experimental period (the thirty fifth day), total RNA was extracted from spleen tissue (group treated with virus) and physiological serum (control group) was used to prepare the library for RNA-seq. After library preparation, sequencing was carried out by Illumina High Seq 2500 platform. The results of RNA-seq analysis showed that 63 lncRNA genes had differential expression that were associated with 92 cis coding genes in the range of 20k up and downstream sites of the target genes. Among the pairs of coding and non-coding genes, those with both more than 90% and less than 90% expression correlations were considered as positive and negative co-expression genes, respectively. The coding genes such as Interlukin10, BHLHE41, RBP47, gastrotropin, synaptopodin, OX2, and SMC2 were associated with cis and trans with 8 and 13 lncRNA genes, respectively. Interlukin10, gastrotropin, synaptopodin, OX2, and SMC2 genes had higher expression in the virus-treated group. The two genes RBP47 and BHLHE41 were more expressed in the control group. Gene ontology analysis showed the activity of cytokine genes, including interleukin 10 gene, which plays an important role in inflammatory responses in the immune system.

Keywords: Rainbow trout fish, VHS virus, RNA-seq, lncRNA, Cis and trans

*Corresponding author