

Gene regulation network fitting of genes involved in the pathophysiology of fatty liver in the mice by promoter mining

Zahra Eestanesti¹, Hadi Sarir², Homayon Farhangfar², Elham Behdani³

¹ **Corresponding author;** Animal Science Department, University of Birjand, Birjand, Iran

Tel: +9382137096 Email: estanesti.zahra@gmail.com

² Animal Science Department, University of Birjand, Birjand, Iran

³ Animal Science Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Ahvaz, Iran



Citation Eestanesti Z, Sarir H, Farhangfar H, Behdani E. [Gene regulation network fitting of genes involved in the pathophysiology of fatty liver in the mice by promoter mining]. *J Birjand Univ Med Sci.* 2019; 26(2): 118-27. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2019.26.2.103>

Received: December 23, 2018 **Accepted:** May 6, 2019

ABSTRACT

Background and Aim: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the major cause of chronic liver disease in developed countries. In this study, we identified the most important transcription factors and biological mechanisms affecting the incidence of fatty liver disease using the promoter region data mining.

Materials and Methods In this study, at first, the marker genes associated with this disease were detected and the pattern of transcription factors was examined by the Genomatix software. In the whole of genome, genes with a similar binding pattern for transcription factors in the promoter region were identified as potentially effective genes on the fatty liver. By using the Cytoscape software (3.6.0), the network of transcription factors and target genes was mapped. Finally, the most important biological pathways associated with genes derived from fatty liver were studied using the DAVID database.

Results: The protein network fitting showed Creb1, Jun and Max transcription factors and Sfp1, Ddit3 and Gsk3b genes play an important role in the development of this disease. Gene ontology analysis revealed that biological pathways including apoptosis, intracellular signals, and biosynthesis of aromatic compounds and signaling pathways of circadian rhythm, non-alcoholic fatty liver, and chemokine signals contributed to the occurrence of fatty liver disease.

Conclusion: Increasing the expression of transcription factors and genes produced can be one of the most factors affecting the onset of the disease, also, biological pathways including apoptosis, intracellular signals, and biosynthesis of aromatic compounds and signaling pathways of circadian rhythm, non-alcoholic fatty liver, and chemokine signals are important in fatty liver phenomenon.

Key Words: Promoter Analysis; Transcription Factors; Fatty Liver; Mice

برازش شبکه تنظیم ژنی ژن‌های مؤثر در پاتوفیزیولوژی کبد چرب موش به وسیله کاوش پروموتوری

زهرا استانستی^۱، هادی سریر^۲، همایون فرهنگ فر^۲، الهام بهدانی^۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، علت اصلی بیماری مزمن کبدی در کشورهای توسعه یافته است. در این مطالعه، به شناسایی مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی و سازوکارهای بیولوژیکی مؤثر بر بروز بیماری کبد چرب با استفاده از داده‌کاوی ناحیه پروموتوری، پرداخته شد.

روش تحقیق: در این مطالعه، ابتدا ژن‌های نشانگر مرتبط با این بیماری یافت شدند و الگوی اتصال فاکتورهای رونویسی با نرم‌افزار Genomatix بررسی گردید. در کل ژنوم، ژن‌هایی که الگوی اتصال مشابهی برای فاکتورهای رونویسی به ناحیه پروموتوری داشتند، به‌عنوان ژن‌های احتمالی مؤثر بر کبد چرب شناسایی شدند. با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (3.6.0)، شبکه برهمکنش فاکتورهای رونویسی و ژن‌های هدف ترسیم گردید. در نهایت مهم‌ترین مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با ژن‌های به‌دست آمده از کبد چرب، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی DAVID بررسی شد.

یافته‌ها: برازش شبکه برهمکنش پروتئینی نشان داد که فاکتورهای رونویسی *Creb1*، *Jun* و *Max* و ژن‌های *Gsk3b*، *Ddit3* و *Sfp1* در بروز این بیماری مهم‌ترین نقش را دارا هستند. آنالیز ژن آنتولوژی حاصل از مطالعه نیز نشان داد، مسیرهای بیولوژیکی شامل: آپاپتوز، سیگنال‌های درون‌سلولی و بیوسنتز ترکیبات آروماتیک و مسیرهای سیگنال‌دهی ریت‌های شبانه روزی، کبد چرب غیر الکلی و سیگنال‌های کموکاین، در بروز عارضه کبد چرب دخیل هستند.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان فاکتورهای رونویسی و ژن‌های به‌دست آمده می‌تواند یکی از عوامل مؤثر بر بروز این بیماری باشد؛ همچنین مسیرهای بیولوژیکی آپاپتوز، سیگنال‌های درون‌سلولی و بیوسنتز ترکیبات آروماتیک و مسیرهای سیگنال‌دهی ریت‌های شبانه‌روزی، کبد چرب غیر الکلی و سیگنال‌های کموکاین در عارضه کبد چرب مهم به‌شمار می‌آیند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز پروموتور؛ فاکتورهای رونویسی؛ کبد چرب؛ موش

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۸؛ ۲۶ (۲): ۱۱۸-۲۷.

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۶

^۱ نویسنده مسؤول؛ گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- بخش علوم دامی

تلفن: +۹۳۸۲۱۳۷۰۹۶ پست الکترونیکی: estanesti.zahra@gmail.com

^۲ گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

^۳ گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

مقدمه

بیماری می‌گردد (۵).

در حال حاضر، با توجه به این که بیماری کبد چرب غیر الکلی بسیار شایع و درمان آن محدود است، توجه زیادی بر شناسایی راهبردهای رژیم غذایی مناسب برای پیشگیری و درمان بیماری متمرکز شده است. چندعاملی بودن این عارضه سبب شده است تا ارائه راهکار قطعی برای درمان آن دشوار گردد. یکی از مهم‌ترین راهکارهای ارائه درمان برای این عارضه، شناسایی نشانگرهای احتمالی در مواجهه با این عارضه است. به کمک مطالعات مولکولی معمولاً شناسایی تعداد معدودی ژن و یا نشانگر امکان‌پذیر است؛ ولی با استفاده از بیوانفورماتیک و محاسبات آن، مطالعات ژنی در سطح وسیع‌تری انجام می‌گردد. با توجه به اهمیت این عارضه و شناسایی ساز و کار مولکولی مؤثر در پیدایش آن، در این مطالعه با استفاده از آنالیز پرموتور به بررسی مهم‌ترین ژن‌های مؤثر و کنترل‌کننده این عارضه و ساز و کار آنها پرداخته شده است.

روش تحقیق

جستجوی ژن‌های کاندید شناسایی شده در کبد چرب:
به‌منظور بررسی مهم‌ترین مولکول‌ها و سازوکارهای بیولوژیکی مؤثر بر بروز کبد چرب، با استفاده از کاوش پرموتور، ژن‌های نشانگر مرتبط با این بیماری در گونه موش (*mus musculus*) انتخاب گردید. این ژن‌ها از لینک اطلاعاتی Gene در پایگاه اطلاعاتی NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term> جستجو شدند. در این مرحله ۱۹ ژن به‌عنوان ژن‌های کلیدی درگیر در این عارضه انتخاب گردید (جدول ۱).

بررسی الگوی اتصال فاکتورهای رونویسی به ژن‌های نشانگر عارضه کبد چرب:

الگوی اتصال پرموتور ژن‌های به‌دست آمده از مرحله قبل (۲۵۰۰ نوکلئوتید قبل از ناحیه شروع رونویسی) با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی Genomatix به آدرس

کبد، یک عضو مرکزی برای کنترل متابولیک هومئوستاز کربوهیدرات، چربی و پروتئین است. اختلال در تنظیم عملکرد کبد می‌تواند منجر به اختلالات متابولیک شود (۱). بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD)^۱، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی است که با تجمع تری‌گلیسرید در هپاتوسیت‌ها مشخص می‌گردد. شیوع جهانی این بیماری حدود ۲۵ درصد است و دربرگیرنده انواعی از اختلالات کبدی شامل: استئاتوز تا استئاتوهپاتیت غیر الکلی (NASH)^۲، فیروز، سیروز و سرطان کبد است. میزان بروز آن با افزایش سطح چاقی، دیابت نوع دو و سندرم متابولیک افزایش می‌یابد. پیش‌بینی می‌شود کبد چرب غیر الکلی عامل اصلی سیروز و پیوند کبد در دهه آینده به‌شمار رود (۲). تجمع تری‌گلیسرید در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به‌عنوان نشانه‌ای از عدم تعادل بین دریافت چربی (جذب اسیدهای چرب و لیپوژنز مجدد) و حذف (اکسیداسیون اسیدهای چرب و خروج به‌عنوان اجزای ذرات VLDL^۳) ناشی از چند مکانیزم پاتوفیزیولوژیک در NASH بروز می‌کند (۳). افزایش شیوع چاقی در جامعه مدرن سبب تحریک و افزایش مقاومت به انسولین در بافت‌های محیطی می‌شود، و می‌تواند باعث ایجاد اختلالات متابولیکی شدید با تجمع چربی در کبد و در نتیجه پیشرفت بیماری کبد چرب غیر الکلی شود (۴). پیشرفت NAFLD نتیجه ترکیبی از عوامل ژنتیکی، محیطی و متابولیکی است. تجمع چربی در هپاتوسیت‌ها باعث تعدادی از وقایع سایتوتوکسیک شده که باعث التهاب کبد می‌شود. فرآیندهای پاتولوژیکی متعددی شامل: مقاومت به انسولین، کمبود لپتین، استرس اکسیداتیو، تجمع چربی و التهاب بافت کبدی، با عارضه کبد چرب همراه است. عوامل ژنتیکی و متابولیکی پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی نشان می‌دهد که بیان غیر طبیعی یا جهش ژن‌ها منجر به پیشرفت و توسعه این

¹ Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)

² Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)

³ Very-low-density lipoprotein (VLDL)

مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با عارضه کبد چرب، از آنالیز پرموتر استفاده شد. در مرحله اول نوزده ژن (جدول ۱) به‌عنوان ژن‌های نشانگر مرتبط با این بیماری از پایگاه اطلاعاتی NCBI انتخاب شدند.

جدول ۱- ژن‌های نشانگر عارضه کبد چرب در گونه موش

Ensemble ID	Gene Symbol	Entrez ID
ENSMUSG00000022812	Gsk3b	56637
ENSMUSG00000037936	Scarb1	20778
ENSMUSG00000037411	Serpine1	18787
ENSMUSG00000066551	Hmgb1	15289
ENSMUSG00000066551	Hmgb1	100862258
ENSMUSG00000020538	Srebfl	20787
ENSMUSG00000039005	Tlr4	21898
ENSMUSG00000004043	Stat5a	20850
ENSMUSG00000005952	Trpv1	193034
ENSMUSG00000021109	Hif1a	15251
ENSMUSG00000020063	Sirt1	93759
ENSMUSG00000024401	Tnf	21926
ENSMUSG00000037583	Nr0b2	23957
ENSMUSG00000026457	Adipor1	72674
ENSMUSG00000016194	Hsd11b1	15483
ENSMUSG00000020826	Nos2	18126
ENSMUSG00000030827	Fgf21	56636
ENSMUSG00000032487	Ptgs2	19225
ENSMUSG00000024140	Epas1	13819

مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی متصل در ناحیه پرموتوری ژن‌های کاندید جایگاه، با استفاده از Genomatix جستجو گردید. از فاکتورهای رونویسی که به‌صورت سه‌تایی یا بیشتر در پرموتر ژن‌های کاندید جایگاه اتصال داشتند، به‌عنوان مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی دخیل در عارضه کبد چرب استفاده شد؛ سپس تمامی پرموترهای ژن‌های ژنوم موش برای بررسی اتصال احتمالی فاکتورهای رونویسی مزبور، مورد بررسی قرار گرفت. الگوی اتصال فاکتورهای رونویسی مورد نظر در پرموتر ۶۵ ژن یافت شد. از این ژن‌ها می‌توان به‌عنوان نشانگرهای احتمالی مرتبط با کبد چرب یاد کرد (جدول ۲).

<https://www.genomatix.de/solutions/genomatix-software-suite.html> بررسی گردید. آن دسته از فاکتورهای رونویسی که به‌صورت سه‌تایی در پرموتر تمام ژن‌های کاندید در کبد چرب جستجو شدند، در مرحله بعد به‌کار رفت.

داده‌کاوی ژنوم برای شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با

عارضه کبد چرب:

الگوی اتصال فاکتورهای رونویسی سه‌تایی به‌دست آمده از مرحله قبل بر روی پرموتر کل ژن‌های موش، با استفاده از ModelInspector که قسمتی از نرم‌افزار Genomatix است، مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌هایی که این الگوهای سه‌تایی در پرموتر آنها وجود داشت، به‌عنوان ژن‌های احتمالی مؤثر بر کبد چرب در مرحله بعد مورد بررسی قرار گرفتند.

برازش شبکه برهمکنش پروتئینی مرتبط با عارضه کبد

چرب:

با استفاده از پایگاه داده STRING به آدرس <http://string-db.org> ارتباطات بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های هدف بررسی و تأیید شد. در نهایت شبکه برهمکنش فاکتورهای رونویسی و ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape(3.6.0) ترسیم گردید.

بررسی مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با عارضه کبد

چرب:

ژن آنتولوژی، با استفاده از ژن‌های به‌دست آمده از مرحله قبلی به کمک پایگاه اطلاعاتی DAVID به آدرس <http://david.ncifcrf.gov/tools.jsp> به‌منظور بررسی سازوکارهای احتمالی مرتبط با کبد چرب، صورت گرفت. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد Ir.bums.REC.1397.375 تصویب شده است.

یافته‌ها

در این مطالعه به‌منظور شناسایی نشانگر احتمالی و

با استفاده از پایگاه داده STRING، برهمکنش بین فاکتور رونویسی و ژن هدف آن بررسی و ۱۲۷ ارتباط تأیید شد (شکل ۱). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سه تنظیم‌کننده اصلی شامل: فاکتورهای رونویسی Jun، Creb1 و Max (گره‌های آبی که در تصویر بزرگتر از سایر ژن‌ها می‌باشند که اثر تنظیم‌کننده بیشتر را نشان می‌دهند) و ژن‌های Gsk3b، Ddit3 و Sfp1 نقش مهمی در ابتلا به عارضه کبد چرب دارند (شکل ۱). سه فاکتور رونویسی و ژن‌های مزبور در این مطالعه که معیار انتخاب آنها میزان ارتباط با سایر ژن‌های شبکه بوده است، با داشتن بالاترین برهمکنش به‌عنوان مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی و ژن‌ها

تعیین شدند. نتایج حاصل از مطالعه ژن آنتولوژی نشان داد که سه مسیر بیولوژیکی شامل: آپاپتوز، سیگنال‌های درون‌سلولی و بیوسنتز ترکیبات آروماتیک، در عارضه کبد چرب مهم به‌شمار می‌آیند. در جدول ۳، مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی، تعداد ژن درگیر در مسیر بیولوژیکی مربوطه، درصد ژن‌های مربوطه و سطح معنی‌داری مسیر بیولوژیکی آورده شده است. مهم‌ترین مسیرهای سیگنال‌دهی مؤثر بر کبد چرب بر اساس این آنالیز شامل: ریتم سرکادین، کبد چرب غیر الکلی و مسیرهای سیگنال‌دهی کموکاین هستند (جدول ۴).

جدول ۲- ژن‌های کاندید احتمالی حاصل‌شده از آنالیز پروموتر در رابطه با عارضه کبد چرب

Chromosome	Gene Symbol						
Chromosome 1	Npas2	Cul3	Gas5	Inhbb	Zc3h11a	Zbed6	Zbtb37
Chromosome 10	Ddit3	Ctdsp2	Btbd2	Mbd6	Ppp1r12a	791309	
Chromosome 11	Trim11	Srebfl	Csnk1d	Elp5	Pcgf2	Ctdnep1	Dnah17 1700125H20Rik
Chromosome 14	Spry2	102631887	Ppp3cb	Tsc22d1			
Chromosome 15	Adcy6						
Chromosome 16	Gsk3b	BC031361	Bbx	Ciita			
Chromosome 17	Epas1	Spats1	Bak1	100038605			
Chromosome 18	Arap3	Nr3c1	Tcf4				
Chromosome 19	Rasgrp2	Sorcs3					
Chromosome 3	Trim46	Slc25a24	Kend3	Krtcap2			
Chromosome 4	Lin28a	Esrp1	Co116a	Agrn			
Chromosome 5	Wsb2	UspL1	Hmgbl				
Chromosome 6	Zfp384	Hoxa13	Bhlh				
Chromosome 7	Fam57b	Kctd15	Igf2	Gsk3a	Erf	Maz	Numbl
Chromosome 9	Prss35	Pth 1r					
Chromosome X	Stag2	Bcap31	Abcd1				

جدول ۳- مسیرهای بیولوژیکی احتمالی مرتبط با عارضه کبد چرب

مسیر بیولوژیکی	تعداد ژن	درصد ژن	P-Value	P-Value تصحیح‌شده
فرآیند بیوسنتز ترکیبات آلی	۲۸	۴۵/۹	۷/۳۰E-۰۶	۳/۶۰E-۰۴
فرآیند بیوسنتز ترکیبات آروماتیک	۲۸	۴۵/۹	۴/۴۰E-۰۶	۲/۴۰E-۰۴
پاسخ به مواد آلی	۲۲	۳۶/۱	۴/۷۰E-۰۵	۱/۷۰E-۰۳
تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول	۱۰	۱۶/۴	۴/۴۰E-۰۵	۱/۶۰E-۰۳
تنظیم فرآیند آپاپتوز	۱۰	۱۶/۴	۴/۱۰E-۰۵	۱/۶۰E-۰۳
تنظیم مثبت فرآیند آپاپتوز	۵	۸/۲	۵/۸۰E-۰۵	۲/۱۰E-۰۳

جدول ۴- مسیرهای سیگنال‌دهی مؤثر بر بروز کبد چرب

P-Value	مسیرهای سیگنال‌دهی
۵/۱۰E-۰۳	ریت‌های شبانه‌روزی
۱/۷۰E-۰۳	بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD)
۳/۰۰E-۰۳	سیگنال‌های کموکاین

(۱۰).

بحث

فاکتور رونویسی Max^۳، یکی دیگر از فاکتورهای رونویسی مهمی است که بر اساس نتایج این مطالعه اثر مهمی بر کبد چرب دارد. Max جز فاکتورهای رونویسی است که رشد، تمایز و آپتوز را تنظیم می‌کند. در فعال شدن آپتوز، یک مجموعه پیچیده از رویدادها اول منجر به دفسفریلاسیون و سپس منجر به تخریب کامل فاکتور رونویسی Max می‌شود (۱۱).

مهم‌ترین ژن‌های مؤثر بر کبد چرب بر اساس شبکه ژن Gsk3b، Ddit3^۴ و Sfp1^۵ است. Gsk3b^۵، یک سرین-ترئونین کیناز است و نقش مهمی را در کنترل تمایز، مهاجرت و مرگ سلولی ایفا می‌کند (۱۲). Gsk-3 در همه سلول‌ها و بافت‌ها بیان می‌شود و مسیر میتوکندری را از طریق فسفریلاسیون تحریک می‌کند. نقش Gsk-3 در طول آپتوز مهم است. لیپوآپتوز را می‌توان با افزایش یا کاهش از استرس رتیکولوم آندوپلاسمی مهار کرد؛ علاوه بر این Gsk-3 قادر به فعال کردن JNK به طور مستقیم است و فعال شدن JNK از Gsk-3 موجب آسیب شدید کبدی می‌شود (۱۳).

ژن Ddit3، تنظیم‌کننده کلیدی پاسخ‌های استرسی است. افزایش بیان Ddit3 سبب توقف چرخه سلولی و در برخی از انواع آپتوز سلول می‌شود که نشانگر نقش مرکزی در این اثرات تنشی است. این ژن، پروتئین هسته‌ای در نظر گرفته می‌شود و همچنین به‌عنوان یک پروتئین سیتوپلاسمی، در سلول‌های لوکومی اریترئوئید و اپیتلیال توبول پروگزیمال کلیه نیز بیان می‌شود (۱۴). استرس رتیکولوم آندوپلاسمی،

بر اساس شبکه برهمکنش تنظیم ژنی، یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی مؤثر بر کبد چرب، Creb1 است. پروتئین Creb1، در همه سلول‌های بدن بیان می‌شود و فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک‌های سلولی افزایش می‌یابد (۶). Creb1 عامل فاکتور رونویسی است که سیگنال‌های پایین‌دست درگیر در چندین بیماری کبدی را تنظیم می‌کند؛ همچنین، می‌تواند یک واسطه مهم در پاسخ به یک رژیم غذایی حاوی چربی بالا باشد و سبب افزایش بروز استئاتوز کبدی شود (۷). مطالعات در موش‌های ترانسژنیک نشان داده که Creb1 برای بقای سلول‌ها ضروری است و از طرفی بیان بیش از اندازه آن باعث ایجاد آپتوز سلول‌ها می‌شود (۸).

فاکتور رونویسی دیگری که بر اساس شبکه به‌دست آمده در عارضه کبد چرب مهم است، ژن Jun بود. بیان c-Jun در سطوح پس از رونویسی تنظیم می‌شود، و بیان آن در بیماران کبد چرب غیر الکلی افزایش می‌یابد که با التهاب و به‌ویژه استئاتوز کبدی همراه است (۹). C-Jun-N-terminal-Kinase نقش مهمی در پاسخ‌های پاتوفیزیولوژیک کبدی دارد. این پاسخ‌ها که محدوده‌ای از مرگ سلول تا تکثیر سلولی و ایجاد سرطان و همچنین متابولیسم و بقا را در برمی‌گیرد، بستگی به زمینه و مدت‌زمان فعال‌سازی مسیر سیگنالی JNK دارد. اخیراً مولکول‌های کلیدی که حاوی پروتئین‌های ASK1^۱ و Sab^۲ هستند، در حلقه فعال‌سازی JNK شناسایی شده که در بروز بیماری‌های کبدی دخیل هستند. بنابراین تنظیم فعالیت JNK یک استراتژی مهم در پیشگیری و درمان بیماری‌های حاد یا مزمن کبدی است

³ MYC-associated factor X⁴ DNA damage induced transcript 3⁵ glycogen synthase kinase 3 beta¹ apoptosis signal-regulating kinase 1² SH3-domain binding protein 5 (Sab)

افزایش میزان مرگ و میر ناشی از سلول‌های بافت چربی می‌تواند مکانیسم مهمی در ایجاد مقاومت به انسولین و استئاتوز کبدی باشد (۱۹).

سیگنال‌های درون‌سلولی نیز از مسیرهایی است که در بروز این عارضه، مهم به شمار می‌رود. گیرنده‌های هسته‌ای، فاکتورهای رونویسی هستند که عملکرد نامناسب آنها با NAFLD مرتبط می‌باشد. یکی از این گیرنده‌ها LXR^۵ که تنظیم‌کننده کلیدی در کبد است، شامل ژن‌هایی است که در متابولیسم اسید چرب و کلسترول دخالت دارد. فعال شدن LXR سبب افزایش چاقی و استئاتوز می‌شود (۲۰).

بیوسنتز ترکیبات آروماتیک، یکی از مسیرهای مؤثر بر بروز این بیماری است. قرارگرفتن در معرض این ترکیبات منجر به تجمع چربی در کبد از طریق افزایش بیوسنتز اسیدهای چرب، اختلال عملکرد میتوکندری، تغییر گیرنده‌های هسته‌ای، مقاومت به انسولین و نقص در دفع لیپید می‌شود. این ترکیبات شیمیایی بر روی کبد تأثیر گذاشته و تماس با آنها باعث افزایش آنزیم‌های کبدی و ایجاد نکرز می‌گردد. حلال‌های آروماتیک، زود تبخیر شده و به دلیل داشتن ترکیبات هالوژن و نیتروژن‌دار، از سمیت بالایی برای سلول‌های کبدی برخوردار هستند (۲۱).

ریتم‌های شبانه‌روزی، کبد چرب غیر الکلی و سیگنال‌های کموکاین از مسیرهای سیگنال‌دهی مؤثر بر بروز این عارضه هستند. ریتم‌های شبانه‌روزی برای هماهنگی قسمت‌های مختلف فیزیولوژیکی با شرایط محیطی عمل می‌کنند. نیروی محرکه برای ریتم‌های شبانه‌روزی، ساعت مولکولی است، و در کبد نقش مهمی در تنظیم متابولیسم و هومئوستاز انرژی دارد. در یک آزمایش، ژن ساعت را در حیوانات جهش دادند و نشان داده شد که این حیوانات، نقص در متابولیسم گلوکز و چربی را نشان می‌دهند و مستعد به چاقی ناشی از رژیم غذایی و اختلال عملکرد متابولیک هستند (۲۲). موش‌هایی که ساعت مولکولی در آنها جهش یافته بود،

پروتئین‌های PERK و ATF6^۱ را در مسیر آپتوز فعال می‌کند. وقتی عملکرد رتیکولوم آندوپلاسمی دچار اختلال می‌شود، افزایش رونویسی Ddit3 به‌وسیله فعال شدن JNK و کاسپاز-۱۲، سبب آپتوز، دیابت نوع دو و بروز کبد چرب می‌شود (۱۵).

ژن Sfp1 همچنین PU.1 نیز نامیده می‌شود. PU.1 یکی از اعضای فاکتورهای رونویسی خانواده ETS^۲ و از ۲۷۲ اسید آمینه تشکیل شده است و به‌طور خاص در سلول‌های میلوئیدی و B بیان می‌شود (۱۶). در ماکروفاژها، PU.1 مناطق تنظیمی را در تعداد زیادی از ژن‌ها که در مسیرهای التهابی نقش دارند، اشغال کرده است و نشان می‌دهد که PU.1ها، تنظیم‌کننده مرکزی التهاب هستند. PU.1، پرموتور ژنی که IL-1b^۳ را فعال می‌کند، رمزگذاری می‌کند. این سایتوکاین، یک واسطه مرکزی در التهاب است. علاوه بر PU.1، IL-1b چندین ژن مهم دیگر در التهاب مانند: IL1R1^۴، اینترلوکین-۱۸ و فاکتور نکروز تومور را نیز فعال می‌کند؛ و فعال شدن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی توسط PU.1 منجر به بروز کبد چرب می‌گردد (۱۷).

یکی از مسیرهای بیولوژیکی مؤثر در بروز کبد چرب با استفاده از آنالیز ژن آنتولوژی، آپتوز است. آپتوز، یکی از ویژگی‌های برجسته بیماری‌های کبدی است. عوامل ایجادکننده مانند: الکل، اسیدهای صفراوی سمی، اسیدهای چرب، داروها و واکنش‌های ایمنی می‌توانند سبب مرگ سلولی آپتوز از طریق گیرنده‌های غشایی و استرس داخل سلولی شوند (۱۸). باید توجه داشت که افزایش آسیب در مرگ سلولی در کبد و همچنین بافت‌های محیطی به‌عنوان یک مکانیزم مهم در توسعه و پیشرفت بیماری کبد چرب غیر الکلی است. افزایش مرگ سلول‌های هیپاتوسیت توسط آپتوز معمولاً در بیماران مبتلا به NAFLD است؛ در حالی که

¹ Activating transcription factor 6

² E26 transformation-specific

³ Interleukin 1 beta

⁴ Interleukin 1 receptor-like 1

⁵ liver X receptor

و بیولوژیکی مؤثر بر بروز کبد چرب شناسایی شدند. برازش شبکه برهمکنش پروتئینی نشان داد که فاکتورهای رونویسی *Sfp1* و *Ddit3*، *Gsk3b*، *Max* و *Jun*، *Creb1* در بروز عارضه کبد چرب، مهم به‌شمار می‌روند. با استفاده از آنالیز ژن آنتولوژی حاصل از ژن‌های نشانگر احتمالی مرتبط با این عارضه، نشان داده شد که مسیرهای بیولوژیکی شامل: آپاپتوز، سیگنال‌های درون‌سلولی و بیوسنتز ترکیبات آروماتیک و مسیرهای سیگنال‌دهی ریتم‌های شبانه‌روزی، کبد چرب غیر الکلی و سیگنال‌های کموکاین، در بروز عارضه کبد چرب نقش دارند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و سایت کامپیوتر دانشگاه بیرجند در اجرای این مطالعه، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نشان دادند که به‌طور قابل توجهی محتوای تری‌گلیسرید آنها در کبد بالاتر است. تغییرات معمول در ژن ساعت، به‌طور مثبتی با NAFLD ارتباط دارد و در بروز بیماری‌های مزمن کبدی دخیل است (۲۳).

یکی از مهم‌ترین مسیرهای سیگنال‌دهی بر اساس آنالیز ژن آنتولوژی، کموکاین‌ها هستند. کموکاین‌ها، پروتئین‌های کوچک متصل‌شونده به هپارین هستند که به‌طور عمده باعث ایجاد رشد و فعال‌شدن التهاب می‌شوند. بیان چندین کموکاین و گیرنده آن در کبد بیماران چاق نشان داده شده است؛ بنابراین در فرآیندهای التهابی و پیشرفت NAFLD، بسیار مهم هستند (۲۴). کموکاین‌ها نقش کلیدی در توسعه التهاب کبدی ایفا می‌کنند. یکی از این کموکاین‌ها *CCL5* است؛ ارتباط این کموکاین با بروز NAFLD در انسان و موش نشان داده شده است. در واقع دو مطالعه نشان دادند که چاقی، بیان کبدی *CCL5* را در مدل‌های موش NASH و بیماران چاق افزایش می‌دهد (۲۵).

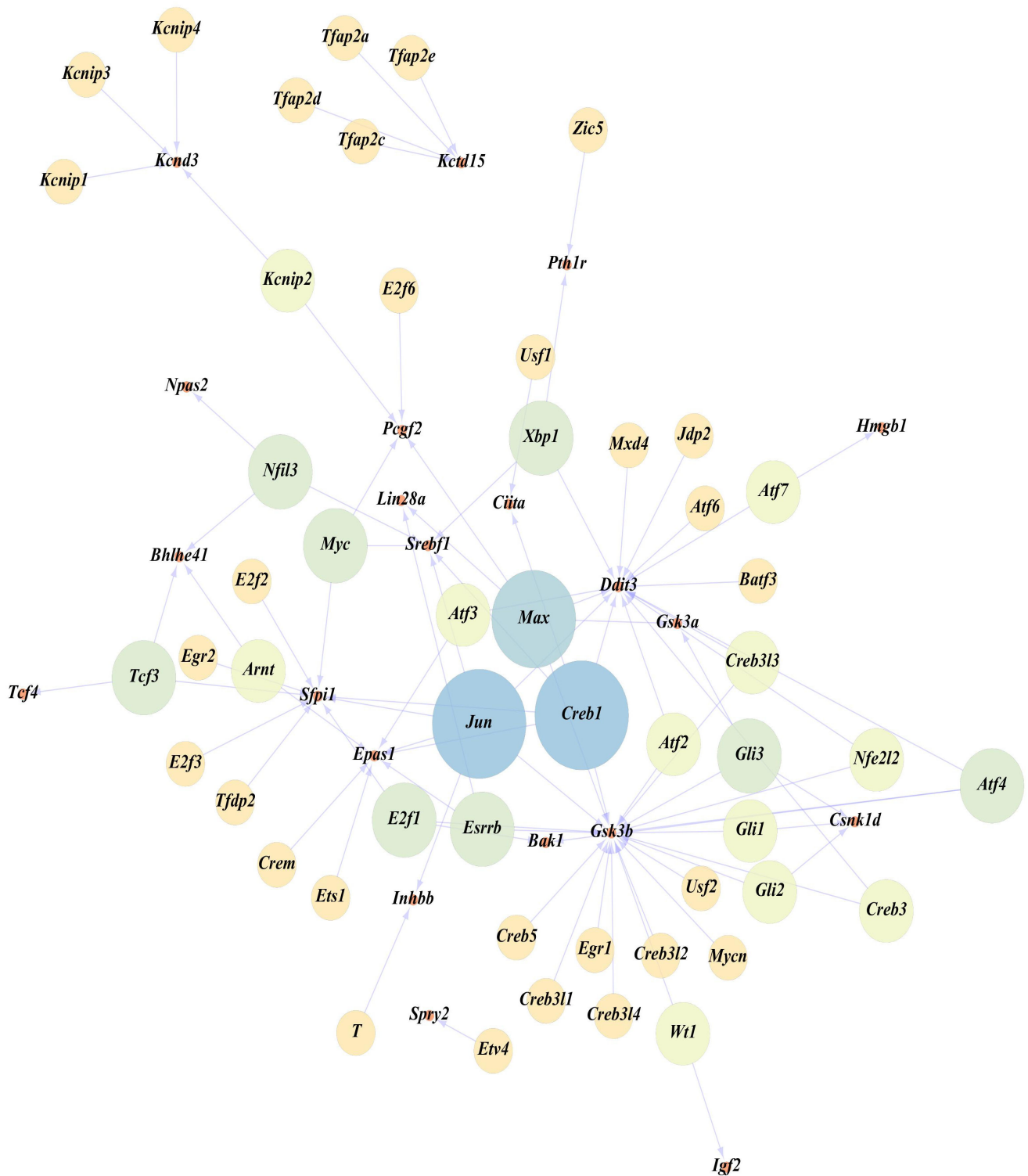
نتیجه‌گیری

در این مطالعه با استفاده از کاوش ناحیه پروموتری، مهم‌ترین ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی، مسیرهای سیگنال‌دهی

منابع:

- 1- Stojavljević S, Palčić MG, Jukić LV, Duvnjak LS, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J of Gastroenterol*. 2014; 20(48): 18070-91. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18070
- 2- Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)*. 2018; 18(3): 245–50. doi: 10.7861/clinmedicine.18-3-245.
- 3- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014; 7: 221-39. doi: 10.2147/CEG.S62831.
- 4- Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013; 19(3): 210-5. doi: 10.3350/cmh.2013.19.3.210.
- 5- Li L, Liu H, Hu X, Huang Y, Wang Y, He Y, et al. Identification of key genes in non-alcoholic fatty liver disease progression based on bioinformatics analysis. *Mol Med Rep*. 2018; 17(6): 7708-20. doi: 10.3892/mmr.2018.8852.
- 6- Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101(16): 5898-903. DOI: 10.1073/pnas.0307718101

- 7- Luo WJ, Cheng TY, Wong KI, Fang Wh, Liao KM, Hsieh Y, et al. Novel therapeutic drug identification and gene correlation for fatty liver disease using high-content screening: Proof of concept. *Eur J Pharm Sci*. 2018; 121: 106-17. doi: 10.1016/j.ejps.2018.05.018.
- 8- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004; 22(3): 326-30. DOI: 10.1038/nbt936
- 9- Dorn C, Engelmann JC, Saugspier M, Koch A, Hartmann A, Müller M, et al. Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest*. 2014; 94(4): 394-408. doi: 10.1038/labinvest.2014.3.
- 10- Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology*. 2018; 67(5): 2013-2024. doi: 10.1002/hep.29689.
- 11- Krippner-Heidenreich A, Talanian RV, Sekul R, Kraft R, Thole H, Ottleben H, et al. Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1. *Biochem J*. 2001; 358(Pt 3): 705-15. doi: 10.1042/0264-6021:3580705
- 12- Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005; 15(1): 28-32. DOI: 10.1038/sj.cr.7290260
- 13- Ibrahim SH, Akazawa Y, Cazanave SC, Bronk SF, Elmi NA, Werneburg NW, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition attenuates hepatocyte lipoapoptosis. *J hepatol*. 2011; 54(4): 765-72. doi: 10.1016/j.jhep.2010.09.039.
- 14- Jauhainen A, Thomsen C, Strömbom L, Grundevik P, Andersson C, Danielsson A, et al. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS one*. 2012; 7(4): 33208. doi: 10.1371/journal.pone.0033208.
- 15- Laybutt D, Preston A, Åkerfeldt M, Kench J, Busch A, Biankin A, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007; 50(4): 752-763. DOI: 10.1007/s00125-006-0590-z
- 16- Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, et al. Distinctive and indispensable roles of PU. 1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*. 2005; 106(5): 1590-600. DOI: 10.1182/blood-2005-03-0860
- 17- Turkistany SA, DeKoter RP. The transcription factor PU. 1 is a critical regulator of cellular communication in the immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011; 59(6): 431-40. doi: 10.1007/s00005-011-0147-9.
- 18- Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis*. 2014; 5(1): e996. doi: 10.1038/cddis.2013.499
- 19- Alkhouri N, Carter-Kent C, Feldstein AE. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 5(2): 201-12. doi: 10.1586/egh.11.6.
- 20- Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1859(9): 1083-99. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.03.002.
- 21- Organic solvents and related compounds. In: Lundberg I, Hogstedt Ch, Lidén C, Nise G. *Textbook of Clinical Occupational and Environmental Medicine*. 2nd ed. Elsevier; 2005. pp: 991-1009.
- 22- Kripke DF, Nievergelt CM, Joo E, Shekhtman T, Kelsoe JR. Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *J Circadian Rhythms*. 2009; 7: 2. doi: 10.1186/1740-3391-7-2.
- 23- Tong X, Yin L. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases. *Compr Physiol*. 2013; 3(2): 917-40. doi: 10.1002/cphy.c120017.
- 24- Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(8): 727-35. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.727.
- 25- Marra F, Tacke F. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology*. 2014; 147(3): 577-94. e1. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.043.



شکل ۱- شبکه برهمکنش فاکتورهای رونویسی و ژن‌های هدف آنها در ابتلا به کبد چرب. تغییر رنگ از قرمز به آبی () و اندازه بزرگتر گره‌ها نشان‌دهنده تنظیم‌کنندگی بیشتر آنهاست.