

אנליזה של מערכת החיסון ובקרתה בפרות חולבות קושרת בין רמת האנטיגן CD18 לשונות גנטית בגן FCGR2A, שמוסת רמות נוגדנים בדם



איל סרוסי, אנדרי שיראק
המכון לחקר בע"ח,



יניב לבון
התאחדות מגדלי בקר



אולג קריפוקס, שלמה בלום, גבריאלי לייטנר
המכון הווטרינרי ע"ש קמרון

מערכת החיסון הקדמה

□ ברפת, פרות נחשפות ברציפות לפתוגנים מסוכנים ומערכת חיסון מפותחת חיונית למזער את הסבירות לזיהום.

□ מחלקים את מערכת החיסון לשניים: מערכת החיסון המולדת ומערכת החיסון הנרכשת שמופעלת בנוגדנים.

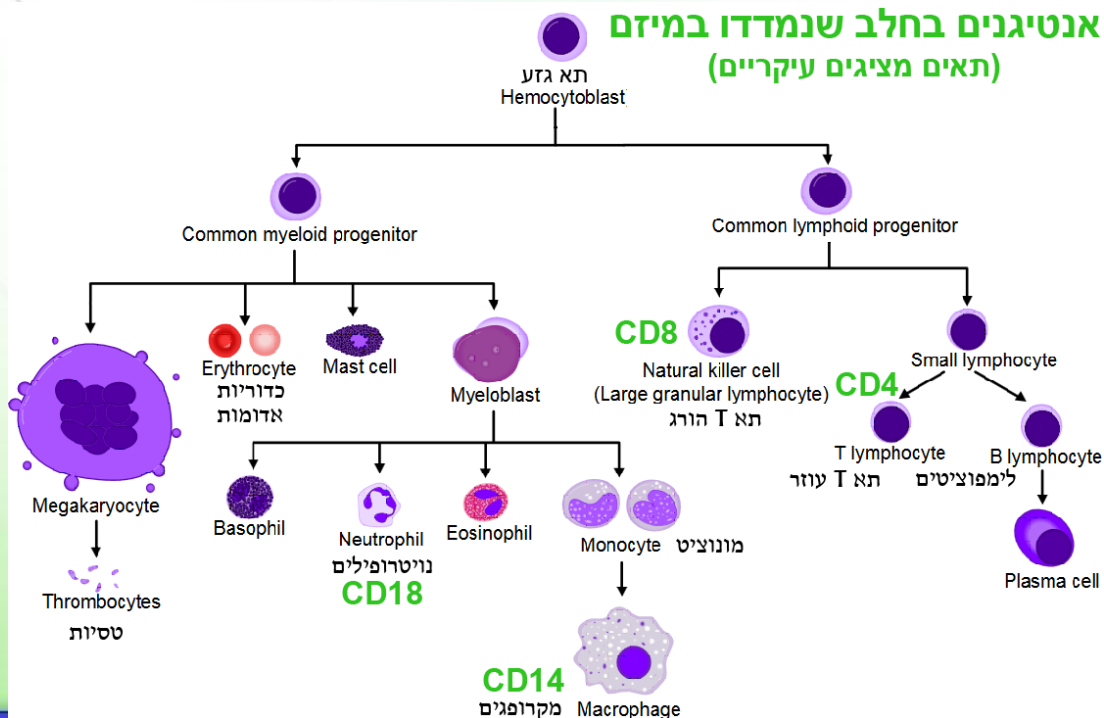
□ המולדת היא הקו הראשון של הגנה מפני פתוגנים, מכיוון שלנרכשת נדרשים מספר ימים לפתח תגובת נוגדנים, במיוחד לפתוגן חדש.

□ במסגרת מיזם של דר. לייטנר, תועד התפקוד האימונולוגי של 150 פרות ברפת וולקני, כולל מצב בריאותי בדגש על דלקת עטין, אנטיגנים בעטין (CD4, 8, 14, 18), סת"ס ורכיבי חלב.



מערכת החיסון המולדת מורכבת מכמה רכיבים:

- ❑ 1. חסמים פיסיים וכימיים לפתוגנים ע"י אפיתל, חומצת קיבה ואנזימי עיכול.
- ❑ 2. תאים הבולעים פתוגנים פולשים (למשל נוטרופילים)
- ❑ 3. קולטנים על פני תאים אלה המזהים ונקשרים לפתוגנים.
- ❑ 4. מולקולות איתות (למשל, כימוקינים, ציטוקינים) המעבירות מידע מאתרים של זיהום למטרת וויסות הביטוי של גנים חיסוניים.



בגנום היונק, מערכת החיסון היא המורכבת במערכות הגוף

□ בבנק הגנים, גנום האדם כולל כ-3300 רשומות (immun*) לעומת "הטוענת לכתר" מערכת העצבים עם כ-2100 רשומות (neur*).

□ כ-10% מהגנים שייכים למערכת החיסון!

□ עבודות שבדקו קשר בין שונות בגנום הפרה ומצב בריאותי, כנטייה לדלקת עטין, הובילו לתוצאות לא הדירות.

□ הסיבה: גודל המדגמים קטן יחסית למספר הנעלמים. צמצום המורכבות חיוני לקבלת תוצאות מובהקות.

□ עם מדגם קטן של 150 פרות, החלטנו לבחון רק רכיב חשוב ומסוים של מערכת החיסון המולדת, המייצג את אוכלוסיית הנויטרופילים (CD18).

So just because I don't have CD18 means that I can't hold on?



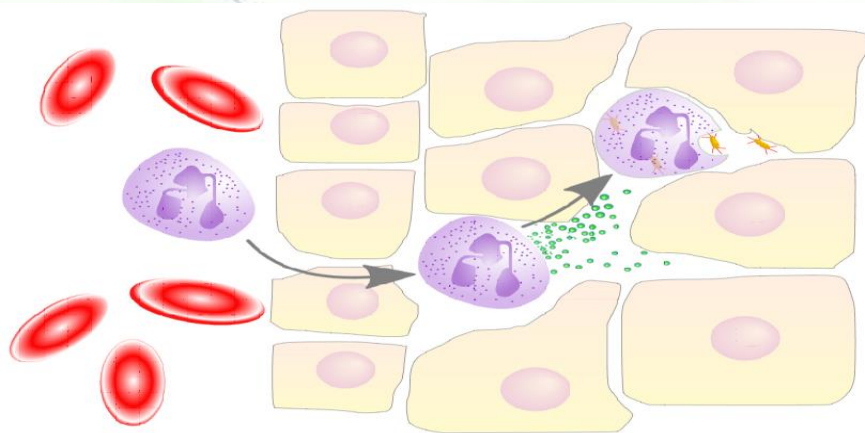
Leukocyte



Endothelial cell

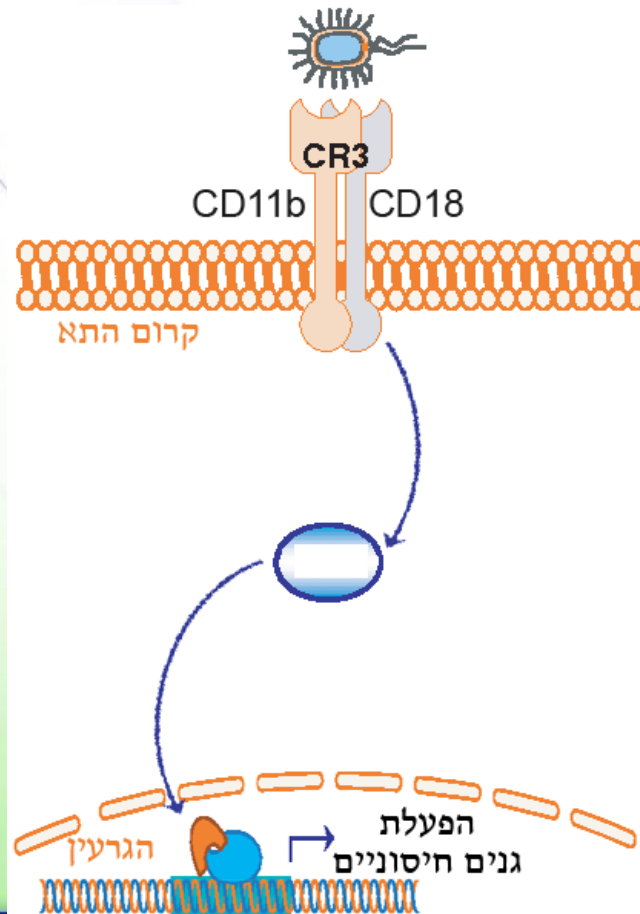
Leukocyte adhesion deficiency

- הנויטרופילים מהווים אחד משלושת סוגי הפאגוציטים במערכת החיסון, וכן אחד משלושת סוגי הגרנולוציטים.
- הנויטרופילים גדולים בכפי שניים מתאי דם אדומים וגרעין התא שלהם מורכב מכמה אונות בגדלים שונים (פולימורפונוקלאריים (PMNs)).
- אורך חייהם קצר יחסית - שעות או ימים ספורים.
- הנויטרופילים הם קבוצת התאים הגדולה ביותר מבין תאי הדם הלבנים, והם מהווים בין 40% ו-70% מסך כל תאי הדם הלבנים.



נויטרופיל פולימורפונוקלארי מפריש אנזימים פרוטאוליטיים, שממיסים חיבורים בין תאיים ונודד מכלי הדם למטריצה הבין-תאית, ועוטף חיידקים ואנטיגנים זרים באמצעות פגוציטוזיס.

- יחידה מרצפטור הטרן-דימרי ממשפחת האינטגרנים (ITGB2), שמתבטא על נויטרופילים ומקרופאגים ומזהה גליקוליפידים.
- חשוב להידבקות הנויטרופיל לתאי אפיתל וחדירה של המטריצה הבין-תאית ותנועה לאזור הדלקת.

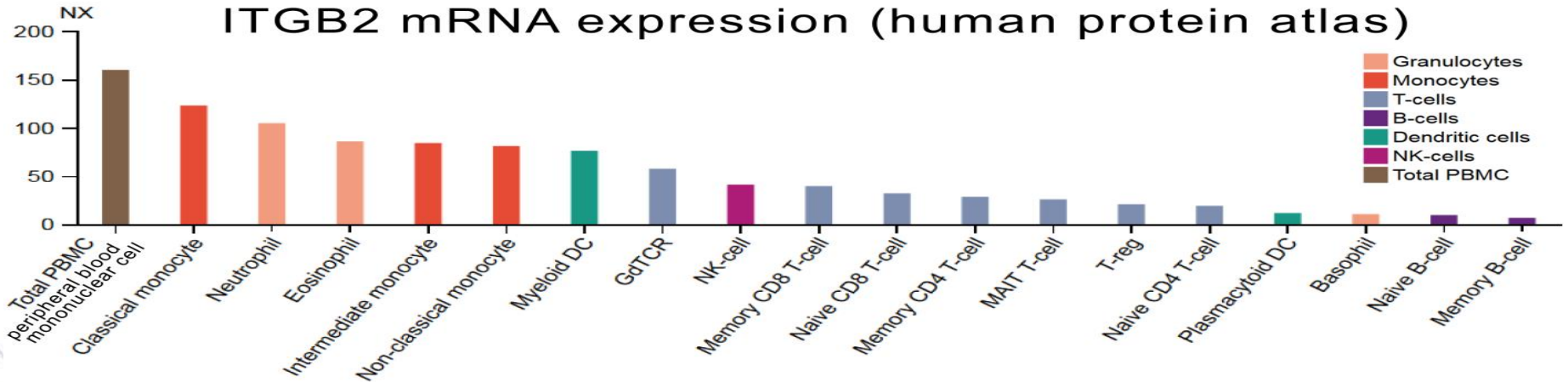


- חשוב גם לזיהוי ופאגוציטוזה של אנטיגנים גליקוליפידים זרים, כדוגמת LPS, הספציפי לפני השטח של חיידקים גרם-שליליים.
- בהתאם, קישור של CD18 עם CD11 יוצר אנטיגן תפקודי שמשותף בנדידה (LFA1) או יוצר קולטן מערכת המשלים (CR3) שמעורב בפאגוציטוזה.

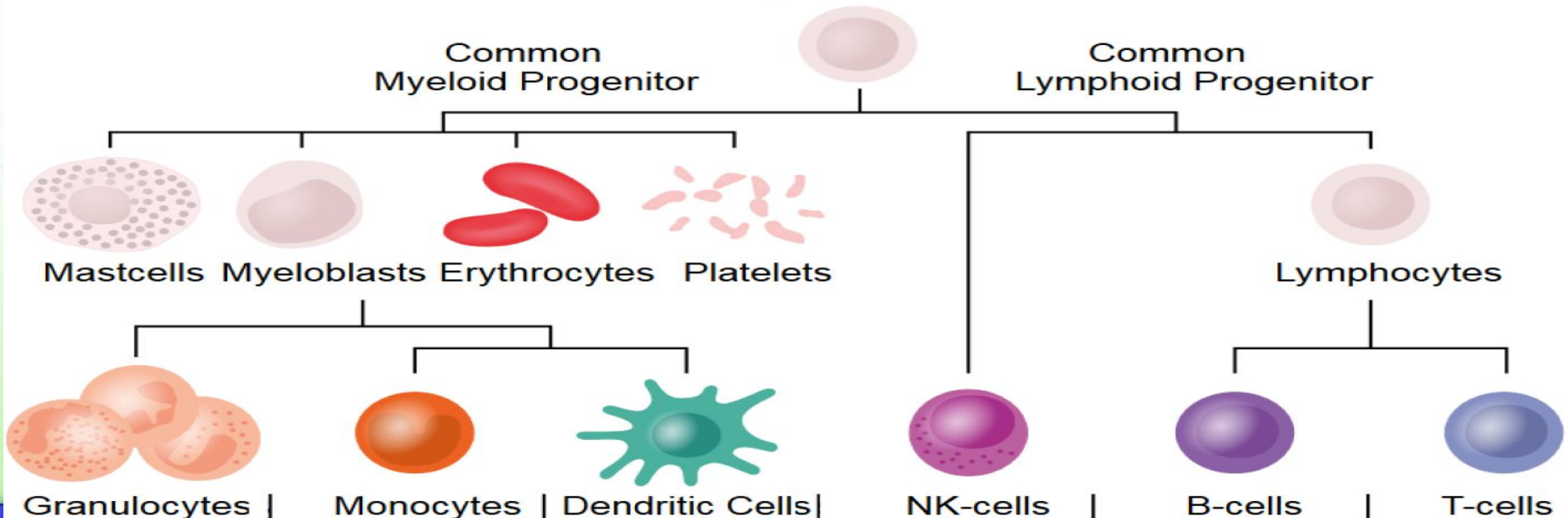
ביטוי CD18 - מייצג את אוכלוסיית הנויטרופילים

מדדנו מתאם גבוה ($R=0.93$) עם ספירת הפולימורפונוקלארים, בעזרת anti-bovine monoclonal granulocyte antibody (CH138A)

ITGB2 mRNA expression (human protein atlas)

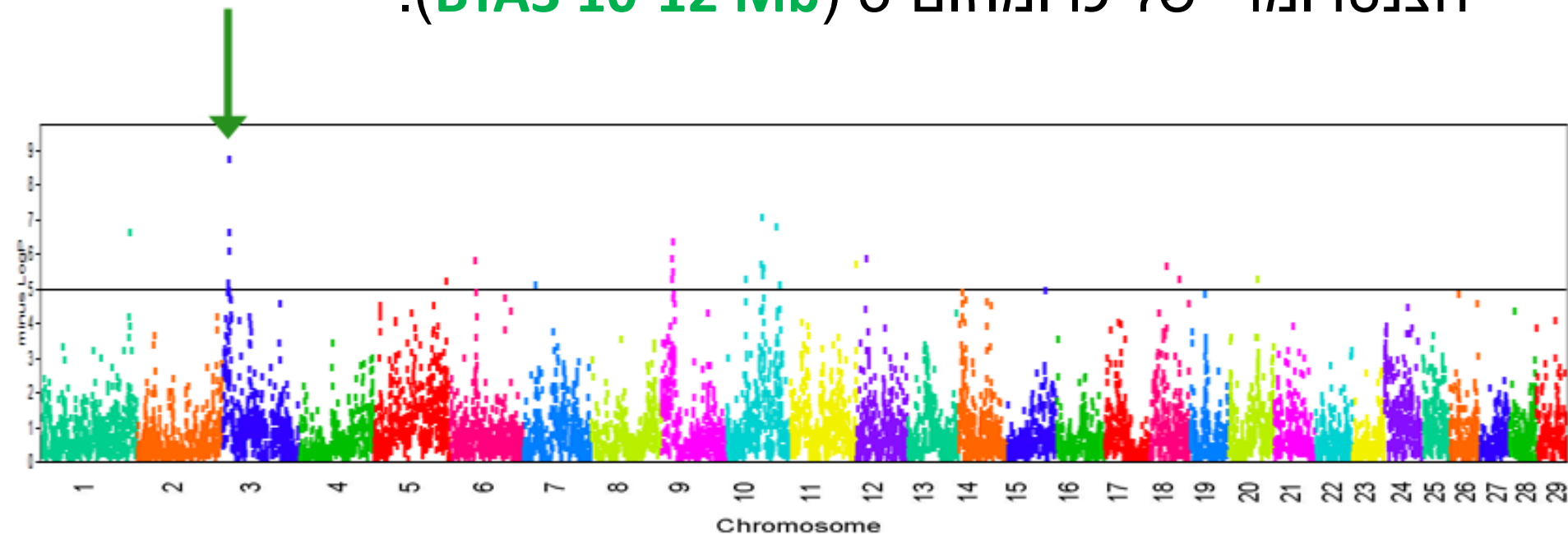


Hematopoietic Stem Cell



תוצאות- הקשר בין רמת ביטוי CD18 בעטין וגנום הפרה

- בוצע GWAS (Genome Wide Association Study) עם 216 פרות רפת וולקני בעלות שבב גנטי עם לפחות 14,000 סמני SNP, מתוכן ל- 150 נתוני CD18.
- מוצגת אנליזה (PLINK) במתווה של הפלוטיפים עם 15 סמנים.
- ההשפעה המובהקת ביותר ($p < 2.3 \cdot 10^{-9}$) אותרה באזור הצנטרומרי של כרומוזום 3 (BTA3 10-12 Mb).



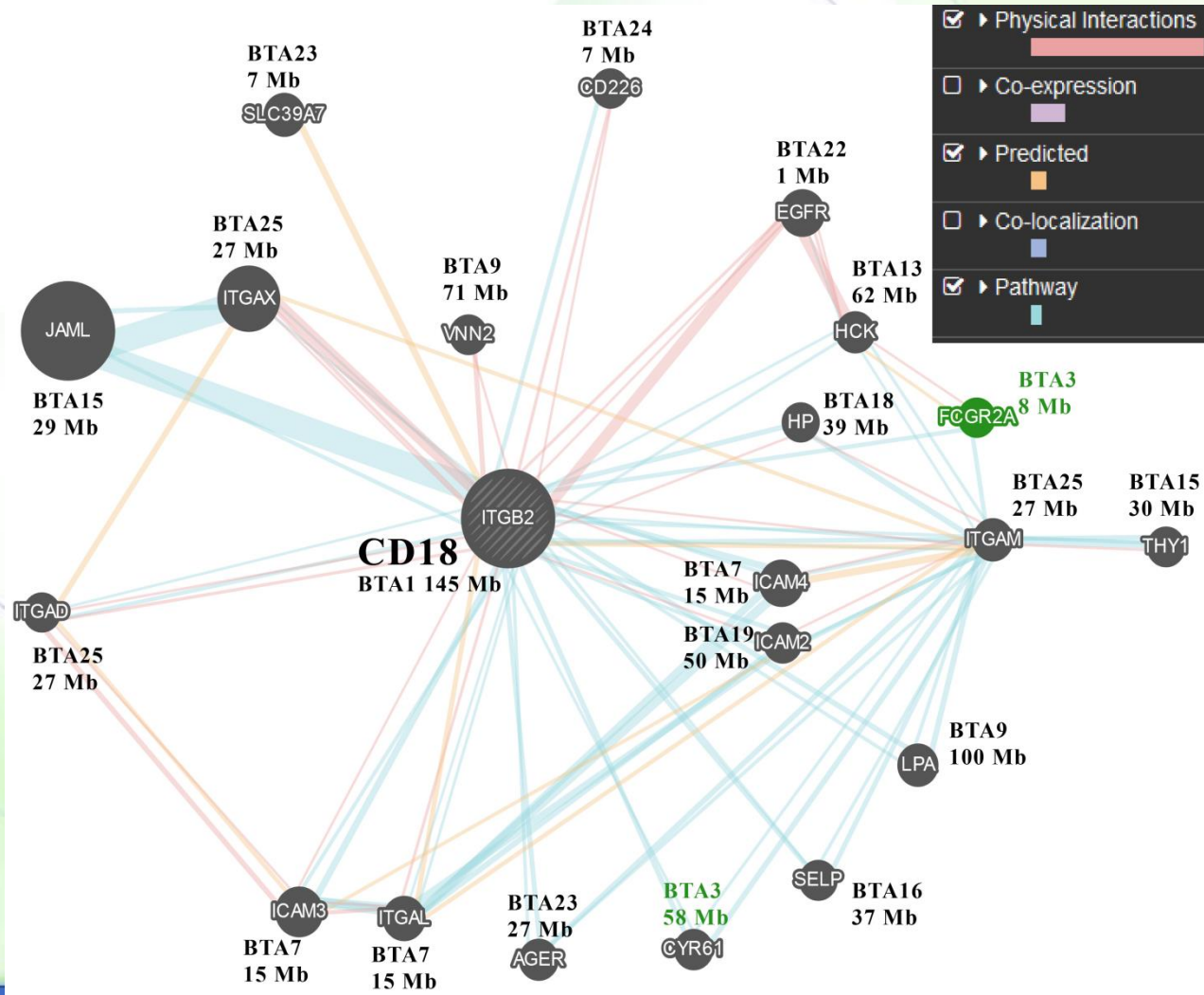
תוצאות- הפלוטיפ יחיד מגביר בצורה מובהקת ביטוי CD18

□ הפלוטיפ בתדירות 5%, שהשפעתו נותרה מובהקת ($p < 10^{-5}$) לאחר bootstrap עם 200,000 פרמוטציות ותיקון לריבוי השוואות.

#	HAPLOTYPE	F	BETA	STAT	P	EMP1	EMP2
1	GGTGAGAACGAAGGG	0.08	-2.650	0.46	0.499	0.504	1.00
2	AAAGGAGAAGGGAAG	0.07	-4.940	1.66	0.200	0.199	1.00
3	AGTGAGAAAAGAAGA	0.06	-5.120	1.17	0.281	0.282	1.00
4	GGTGGGGGAGGAAAG	0.05	26.400	36.00	2.54E-08	5.0E-06	1.0E-05
5	GGTGAGAGCAAGAAG	0.04	4.790	0.58	0.447	0.454	1.00
6	GGTGAGAAAGGAAGG	0.04	-1.350	0.08	0.780	0.781	1.00
7	GGTAAGAAAGAAAAG	0.03	-9.260	1.68	0.198	0.198	1.00
8	GGTGAGGGCGAGAAG	0.03	-0.853	0.03	0.871	0.872	1.00
9	GGTAGAAGAAAGAGG	0.03	11.200	2.06	0.154	0.150	0.98
10	AGTGAGAAAGGGAAG	0.03	-1.250	0.04	0.849	0.850	1.00
11	AAAAGAAGCGGAAGG	0.03	4.480	0.39	0.534	0.541	1.00
12	AGTAGGGGAAGAAAG	0.03	-5.110	0.34	0.559	0.572	1.00
13	AGTAGAAGCGGAAGG	0.03	-4.530	0.33	0.564	0.576	1.00
14	GGTGAAAAGGAAGG	0.03	7.950	0.63	0.429	0.449	1.00
15	GGTGAGAACAAGGGG	0.02	-7.110	1.33	0.251	0.253	1.00
16	AGTGGAAAAGAAAGG	0.02	12.900	3.83	0.053	0.049	0.70
17	GGTGAGAAAAGAAGA	0.02	-9.110	1.97	0.163	0.162	0.99
18	AGAGAAGACGAAAAG	0.02	-0.972	0.02	0.902	0.905	1.00
19	AGAGAAGACGAAGGG	0.01	-3.480	0.20	0.658	0.668	1.00
20	GAAAAGAACAAGGGG	0.01	-1.960	0.03	0.873	0.898	1.00
21	GGTGAGAGAAAGGAG	0.01	8.110	0.87	0.353	0.365	1.00
22	GGTAGAAAAGGAAAG	0.01	1.090	0.01	0.929	0.944	1.00
23	GGTGAGAACGAAAAG	0.01	-3.300	0.14	0.706	0.716	1.00
24	GGTGAGAAAGGAGGG	0.01	7.820	1.00	0.319	0.325	1.00

מועמדים להשפיע על CD18 ליד הצנטרומר של BTA3

□ אנליזת GeneMANIA של רשת הגנים שפועלים עם CD18 מצביעה על גן לקולטן FC (FCGR2A), חלק ממנגנון ויסות רמת הנוגדנים בגוף.



גן מועמד אטרקטיבי: FCGR2A

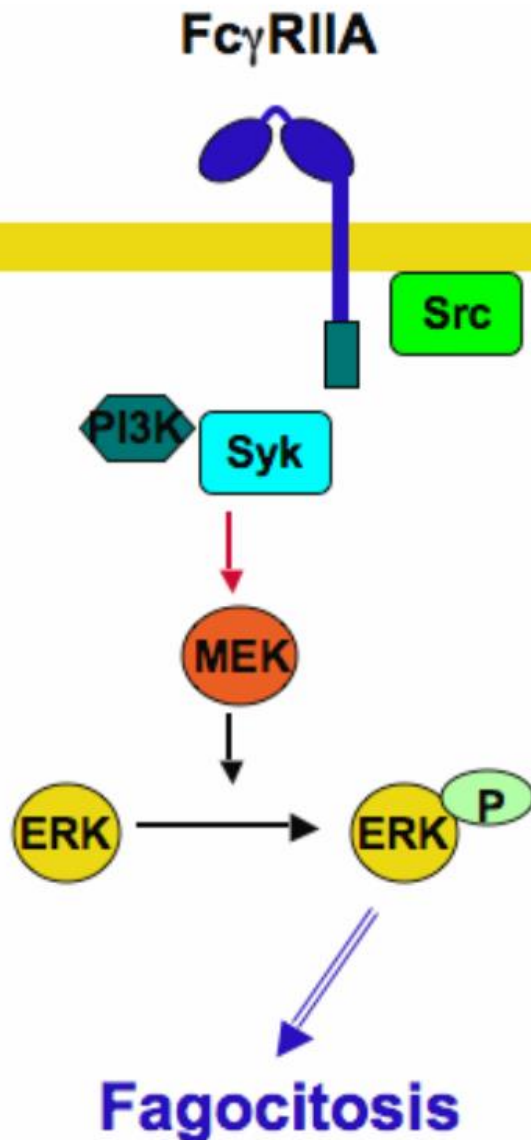


- ממוקם בקומפלקס של גנים דומים הכולל את B ו-C, שמוגדרים ביחד כאנטיגן CD32.
- CD32 הוא קולטן בעל זיקה חלשה לאזור שמור וקבוע של "רגל" הנוגדן, המכונה FC מהסוג המצוי על נוגדנים מסוג IgG.

גן מועמד אטרקטיבי: FCGR2A

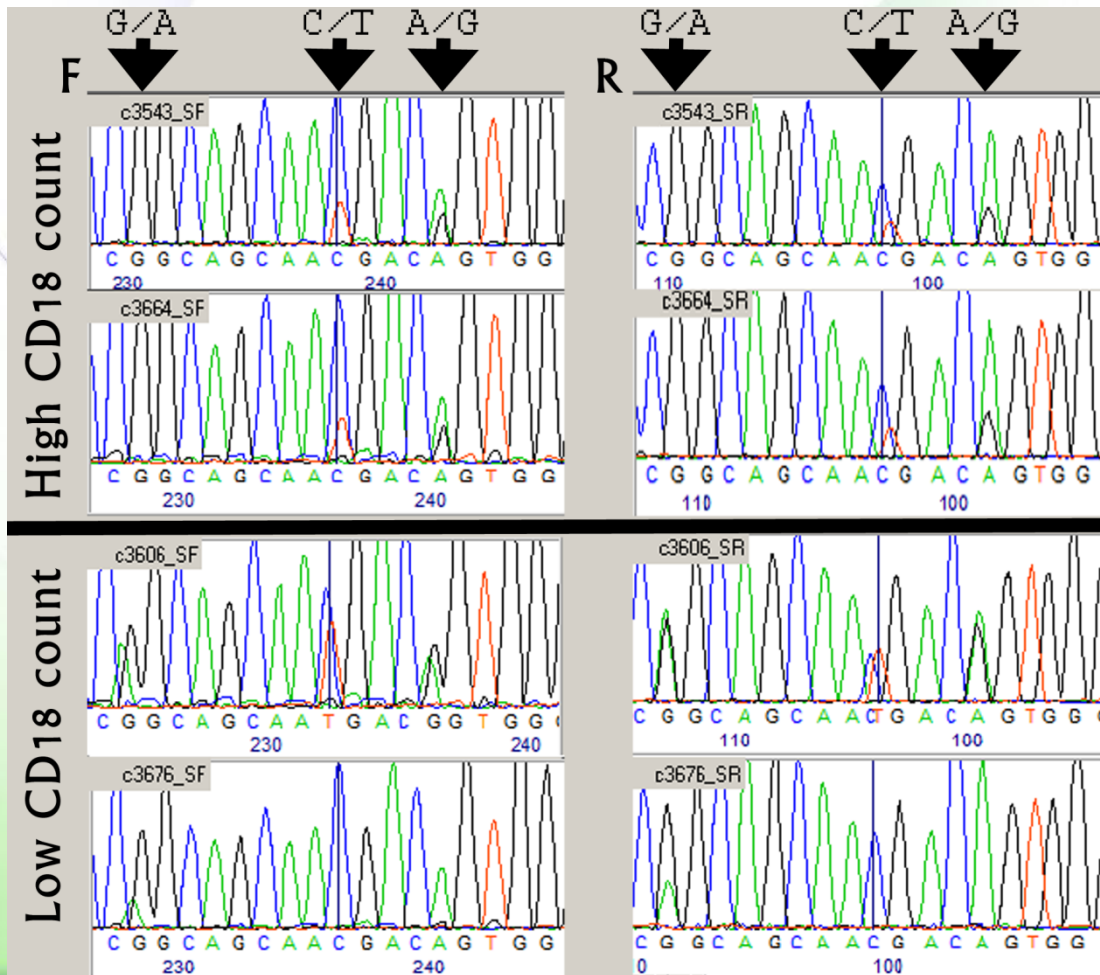
□ הקולטן נמצא על תאים פאגוציטים כמו מקרופאגים ונויטרופילים, והוא מעורב בתהליך של פאגוציטוזה וניקוי של קומפלקסים אימוניים, שנותרים לאחר פעולת מערכת החיסון.

□ CD32 הוא גורם חשוב בהעברת אות למיתון רמות הנוגדנים בדם ובקרתן. באדם, פעולת בקרה זאת נקשרה לשינויים במספר העתקים (CNV) של הגנים המקודדים לאנטיגן זה.



CNV של תת היחידות של אנטיגן CD32 בבקר

□ כרומטוגרמות רצף מהאזור המקודד ל-CD32 הראו שלפרות עם ספירת CD18 גבוהה יש יחס העתקים 1:2 בין פרלוגים B ו-A של האנטיגן, בעוד שאחרות היו מדפוסים של 1:1 או 0:1.



כרומטוגרמות רצף של האקסון השלישי של CD32 של פרות בעלות ספירה גבוהה או נמוכה של לויקוציטים המציגים CD18 בחלב. נאספו שערות מפרות בעלות רמה גבוהה (למעלה) ונמוכה (למטה) של ביטוי האנטיגן CD18, והדנ"א שמוצה מהן שמש להגברת PCR סימולטנית של אקסונים 3 של אנטיגן CD32. באיור מוצג מקטע המכיל שלושה אתרים (מסומנים בחיצים) אינפורמטיביים שלפי היחס בין הגבהים של הנוקלאוטידים בהם ניתן לאמוד את מספר ההעתקים היחסי של הגנים פרלוגיים שמקודדים לתצורות שונות של האנטיגן. בצד ימין (R) ושמאל (F), מוצגות כרומטוגרמות מריצוף של ארבע פרות, מתחלים אחורי וקידמי, בהתאמה. A, T, G מייצגים פרלוגים מקבוצה A; G, C, A את קבוצה B.

סיכום

- ❑ מחלות ברפת ובעיקר דלקת עטין גורמות נזקים כלכליים כבדים עקב ירידה בכמות ואיכות החלב המיוצר, הוצאת פרות, עליה בהוצאות לתרופות ווטרנריות והטלת קנסות עקב חומרים שארתיים שלהן בחלב ובבשר, ואבדן כספי עקב פסילת חלב חשוד.
- ❑ מבחינה גנומית מערכת החיסון היא המורכבת במערכות הגוף ולכן גנומיקה לא הובילה לתוצאות המצביעות בצורה הדירה על הגנים שמקודדים לשונות תורשתית שמעניקה עמידות למחלות.
- ❑ בהתבסס על השערת מחקר שגורסת שיש לפרק לגורמים את מערכת החיסון כדי להגיע לתוצאות מחקריות משמעותיות, בצענו מבחן לקשר בין שונות בגנום והצגת אנטיגן CD18, שחשוב לתפקוד תאים נויטרופילים.
- ❑ מוצע שלשונות במספר העתקים (CNV) שמקודדים לאנטיגן CD32 בגנום השפעה מובהקת על ביטוי CD18 ולכן היא גורם מפתח בבקרת המערכת האימונית בעטין, שאפשר ומשפיע על התמודדות הפרה החולבת עם דלקות עטין בישראל.