

Analysis of Gene Expression, Signaling Pathways, and Interaction Networks of Some Effective Genes in Patients with Asthma in Microarray Studies Using R Software

Saeed Pirmoradi

PhD in Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received April 19, 2021 ; Accepted January 15, 2022)

Abstract

Background and purpose: Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways caused by a combination of complex environmental and genetic interactions. There is an incomplete understanding of this mechanism which affect both severity of the disease and how it responds to treatment. Different gene expressions are reported in patients with asthma and healthy controls.

Materials and methods: In this study, a common list of different genes expressed (DEG) was identified using bioinformatics methods. Three studies from microarray data that met the study's inclusion criteria were selected. These studies included 268 samples, consisting of 167 patients and 101 healthy people. These studies were analyzed, and then a meta-analysis was performed.

Results: Common genes that led to significant decrease or increase in gene expressions were identified and their biological, molecular, and cellular pathways were examined. In general, it was found that this set of genes can be involved in asthma and some pathways affecting the function of disease.

Conclusion: According to current findings, examining the objectives of efficacy and functional analysis of new genes effective in asthma and their protein products, and also investigating the role of interactions in asthma could help in taking appropriate treatment strategies to control asthma complications and injuries.

Keywords: asthma, gene expression, R software, gene interaction network

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (207): 109-124 (Persian).

* Corresponding Author: Saeed Pirmoradi - Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
(E-mail: pirmoradi150@gmail.com)

آنالیز بررسی بیان ژن و مسیرهای سیگنالینگ و شبکه های برهمکنش برخی ژن های موثر در بیماران آسم در مطالعات حاصل از مایکروارای با کمک نرم افزار R

سعید پیرمرادی

چکیده

سابقه و هدف: آسم یک بیماری رایج التهابی مزمن مجاری هوایی است و در اثر ترکیبی از تعاملات پیچیده محیطی و ژنتیکی ایجاد می شود که درک ناقصی از آن ها داریم. این عوامل شدت بیماری آسم و نیز نحوه پاسخ آن به درمان را تحت تأثیر قرار می دهند. بیان متفاوت ژن در بیماران مبتلا به آسم در مقابل گروه شاهد در چندین مطالعه گزارش شده است.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر در صدد شناسایی لیست مشترکی از ژن های متفاوت بیان شده (DEG) با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی بود. سه مطالعه از داده های مایکروارای (microarray)، که معیارهای ورود به سیستم تعریف شده دارند، شناسایی شد. این مطالعات در مجموع 268 نمونه را شامل می شدند که در آن ها، 167 فرد بیمار و 101 فرد دیگر سالم بودند. این مطالعات تجزیه و تحلیل شدند و سپس یک متآنالیز بر روی آن ها انجام شد.

یافته ها: با شناسایی ژن های مشترک در مطالعات مختلف که دچار کاهش و یا افزایش بیان معنادار شده بودند، از آن ها در بررسی مسیرهای بیولوژیکی و مولکولی و سلولی استفاده شد که در کل، مشخص شد این مجموعه از ژن ها می تواند در آسم و برخی مسیرهای موثر در فرایند عملکردی این بیماری نقش داشته باشند.

استنتاج: براساس یافته های مطالعه حاضر، می توان با بررسی اهداف اثرگذاری و آنالیز عملکردی ژن های جدید موثر در بیماری آسم و محصولات پروتئینی آن ها و همچنین بررسی نقش در مسیرهای برهمکنشی بیماری آسم، راهکارهای درمانی مناسبی برای مهار عوارض و آسیب های بیماری آسم ارائه کرد.

واژه های کلیدی: آسم، بیان ژن، نرم افزار R، شبکه برهمکنش ژنی

مقدمه

ارثی و عوامل مربوط به توالی DNA و تغییر محیط زیست می باشد (3). در این بیماری افزایش انقباض پذیری عضله صاف اطراف راه های هوایی منجر به تنگی و علائم کلاسیک خس خس سینه می شود. این تنگ شدن به طور معمول چه با درمان یا بدون آن برگشت پذیر است (4). بسیاری از عوامل محیطی از

آسم یک بیماری رایج التهابی مزمن مجاری هوایی است و در اثر ترکیبی از تعاملات پیچیده محیطی و ژنتیکی ایجاد می شود که درک ناقصی از آن ها در اختیار داریم (1) و این عوامل شدت و نیز نحوه پاسخ بیماری به درمان را تحت تأثیر قرار می دهند (2). اعتقاد بر این است که افزایش میزان آسم، به علت تغییر اپی ژنتیک عوامل

E-mail: pirmoradi150@gmail.com

مؤلف مسئول: سعید پیرمرادی - اهواز: دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی

دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: 1400/1/29 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/4/15 تاریخ تصویب: 1400/10/25

جمله آلرژی‌زاهای، آلودگی هوا و دیگر مواد شیمیایی زیست‌محیطی با ایجاد و تشدید آسم همراه هستند (5). آسم با قرار گرفتن شخص در معرض آلرژی‌زاهای فضاهای داخلی ارتباط دارد (6)، که از جمله این آلرژی‌زاهای شایع فضاهای داخلی می‌توان کف، گرد و غبار، سوسک، شوره بدن حیوانات و کپک را نام برد (۸،۷). همچنین برخی از عفونت‌های تنفسی و ویروسی ناشی از برخی ویروس‌ها نظیر ویروس سنسیشیال تنفسی و راینوویروس ممکن است خطر ایجاد آسم را حتی در سنین پایین افزایش دهند (9). سابقه خانوادگی نیز یکی از عوامل خطر آفرین در آسم است زیرا ژن‌های مختلفی در آن دخیل هستند. تا پایان سال 2005، 25 ژن مربوط به آسم در شش جمعیت مجزا یا بیش تر شناسایی شد، از جمله این ژن‌ها IL4R، LTC4S، PINK5 S، CTLA-4، IL10، GSTM1 و ADAM33 می‌باشند. بسیاری از این ژن‌ها به سیستم ایمنی یا کاهش التهاب مربوط هستند (10، 11). سه‌گانه آگزمای آتوپیک، رینیت آلرژیک و آسم به عوامل آتوپیی موسوم می‌باشند. تأثیرگذارترین عامل خطر آفرین جهت ابتلا به آسم داشتن سابقه بیماری‌های آتوپیک است. آسم با آگزما یا تب یونجه و همچنین سندروم چرک اشتراوس (یک نوع بیماری خود ایمنی)، واسکولیت و انواع خاصی از کهیر ارتباط دارد (12، 13). در مطالعاتی دیگر مشخص شد که بین چاقی و خطر ابتلا به آسم به‌خاطر کاهش عملکرد تنفسی به‌علت تجمع چربی و این واقعیت که بافت چربی منجر به وضعیت مستعد ابتلا به التهاب می‌شود، همبستگی وجود دارد (14، 15). شواهد مختلف نیز نشان می‌دهد که بافت اپیتلیوم راه هوایی از طریق گیرنده‌های تشخیص الگو و سیتوکین‌های ترشح شده از اپیتلیوم مجاری هوایی نقش مهمی در شروع التهاب آلرژیک ایفا می‌کنند (16). نتایج حاصل از مطالعات ارتباط گسترده ژنوم (GWAS) حاکی از بیان برخی ژن‌ها توسط اپیتلیوم مجاری هوایی، مانند IL33 و TSLP است (17). آلرژن‌های حاوی پروتئین، یکپارچگی سد اپیتلیال را مختل می‌کنند و شواهدی از کاهش عملکرد سد‌های

اپیتلیالی در بیماران مبتلا به آسم نیز وجود دارد (18). مشخصه بارز آسم ترشح بیش از حد مخاط در اثر تغییر در عملکرد و فعالیت سلول‌های ترشحی در مجاری هوایی و غدد زیر مخاطی می‌باشد (19). مطالعات بر روی ترانسکریپتوم اپیتلیوم مجاری هوایی، تصویری از وضعیت این بافت را پس از شروع بیماری به ما می‌دهد به‌طوری که در یک مطالعه Woodruff و همکاران (20) برای اولین بار در مورد شناسایی 22 ژن که به طور متفاوتی بین موارد آسم و کنترل بیان شده است گزارشاتی ارائه کردند. این گروه بعداً نشان دادند که بیان سه ژن (SERPINB1 و CLCA1، POSTN) در سلول‌های Th2-high نسبت به زیر گروه Th2-Low در بیماران آسمی در پاسخ به کورتیکواستروئیدهای استنشاقی متفاوت بود (21). مطالعات دیگر همچنین نشان داده‌اند که تغییرات در بیان ژن‌ها بواسطه تغییر در متیلوم اپیتلیال (21، 22) صورت می‌گیرد و مجموعه‌های ژنی مجزایی با تشدید آسم در ارتباط هستند (23، 24). در مطالعاتی دیگر از ارتباط مسیرهای TGF- β -SMAD4 با بیماری آسم نامبرده شده است (25، 26). بر مبنای این سری مطالعات، به‌طور کلی مشخص شد که اپیتلیوم راه هوایی نه تنها ممکن است در گیر در پاتوژنز بیماری باشد، بلکه می‌تواند اطلاعاتی در مورد وضعیت بیماری (یعنی تشدید) و پاسخ درمانی ارائه دهد. در حالی که این مطالعات جدیدتر به درک ما در مورد پاسخ‌های اپیتلیال در آسم کمک کرده است، اما هنوز هیچ اجماعی وجود ندارد که ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با آن‌ها به چه میزان در آسم تحت تأثیر می‌گذارند. لذا هدف از مطالعه حاضر این است که با آنالیز مجموعه‌ای از داده‌های تغییرات بیان ژنی حاصل از چندین مطالعه مایکروارای (microarray studies)، متوجه شویم که کدام دسته از ژن‌ها در موارد مبتلا به آسم در مقایسه با گروه شاهد نقش‌های مهم تنظیمی دارند، تا آن‌ها را پس از شناسایی و جداسازی عملکرد، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار دهیم.

مواد و روش ها

در این مرحله پس از انتخاب فایل های خام دیتاهای مطالعات انجام شده، مایکروارای مناسب بیماری آسم از طریق دیتا بیس NCBI و بخش GEO، طبق الگوی طراحی شده در فلوچارت شماره 1 آنالیز شد و استخراج نتایج آنالیزها و تحلیل آنها انجام گرفت.

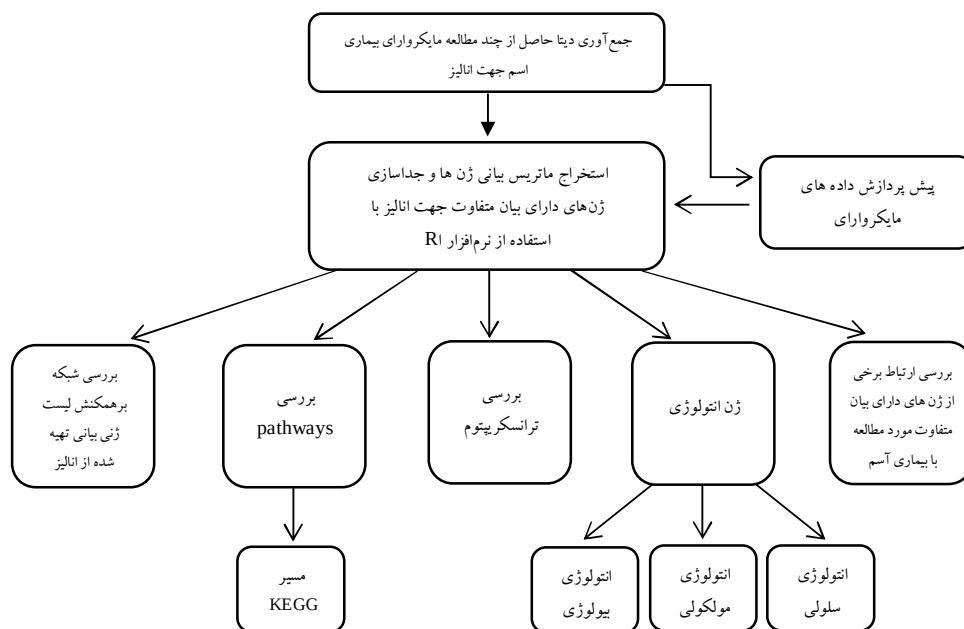
جمع آوری دیتا جهت فراتحلیل

با جستجو در پایگاه داده ncbi و از بخش Geo dataset با کلید واژه بیماری آسم در انسان به تعداد زیادی از داده های مایکروارای در مورد بررسی فرایند بیان داده های ژنی در این بیماری دسترسی حاصل شد. سپس با بررسی تعدادی از آنها، در انتها داده های خام سه مورد، که حاوی دیتاهای مورد نظر مطالعه حاضر بودند، دانلود و تهیه شد و دیتای مورد نظر و مناسب که از چپ افیمتریکس با پلتفرم GPL570 بود، انتخاب و برای فرایند متاآنالیز استفاده شد. در این مطالعه از نمونه های بیماران مبتلا به آسم همراه با نمونه های کنترل

فاقد بیماری، برای فرایند فراتحلیل استفاده شد و در مجموع 268 نمونه را شامل می شدند که 167 فرد بیمار و 101 فرد دیگر سالم بودند (25). در کل هدف از این مطالعه، بررسی پیشرفت های بیوتکنولوژی در پروفایل ژن در بیماری آسم، با تمرکز بر توسعه پلتفرمی تجربی و کشف ژن هایی در رابطه با طرح ها و نتایج مطالعات مختلف به منظور درک چگونگی بهره برداری از آنها در بهبود تشخیص و مدیریت بالینی بیماری آسم است.

پیش پردازش داده های مایکروارای

در این مرحله پس از تهیه داده های خام مربوط به مایکروارای های مورد بررسی به نام های GSE41861، GSE64913 و GSE41863 ابتدا به فرایند نرمالیزه شدن (26) آنها با نرم افزار R و با کمک پکیج هایی مانند Limma، GEOquery، ggplot2 و Biobase پرداخته شد و در ادامه پس از بررسی صحت نرمال بودن آنها ماتریس بیانی از ژن های آنها با استفاده از دستورات پکیج Limma تهیه شد (27، 28).



فلوچارت شماره 1: نمودار جریان کار روش

استخراج ماتریس بیانی ژن‌ها

در این مرحله از کار با استفاده از نرم‌افزار R و پکیج‌های Limma و GEOquery و Biobase ژن‌هایی با $\text{Adj.P} < 0/05$ و $-1.5 < \text{LogFC} < 1.5$ جداسازی شدند (۳۰، ۲۹). برای محاسبه بیان متفاوت هر ژن در مجموعه داده‌های ریزآرایه که در مطالعه حاضر است، از مدل خطی زیست‌سنجشگر (Limma) جهت تحلیل ریزآرایه استفاده گردید.

Limma از نظر قدرت آماری، میزان زمان اجرا و سهولت استفاده بهترین عملکرد را دارد (۳۲، ۳۱) و در مراحل بعد از ژن‌های دارای بیان متفاوت جدا شده جهت فرایندهای انتولوژی ژنی (ontologies Gene) و pathways ناشی از اثرات بیانی آن‌ها استفاده شد (31). در ادامه با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی از داده‌های بیانی ژنی یک نمودار venn plote ترسیم شد تا ازین طریق بتوان ژن‌های مشترک دارای بیان متفاوت که در نمونه‌ها پیاشار به‌طور قابل توجهی کم و زیاد شده مشخص گردند و با جداسازی آن‌ها از بقیه ژنوم جهت فرایند انتولوژی ژنی و بررسی pathway استفاده شوند (نمودار شماره 1).

بررسی ارتباط برخی از ژن‌های دارای بیان متفاوت مورد مطالعه با بیماری آسم

همچنین در ادامه بررسی‌ها در دیتابیس enrichr به‌طور مشخص ارتباط برخی از ژن‌های دارای بیان بالا جدا شده از چند مطالعه مایکروارای که بررسی شدند، ارتباط برخی

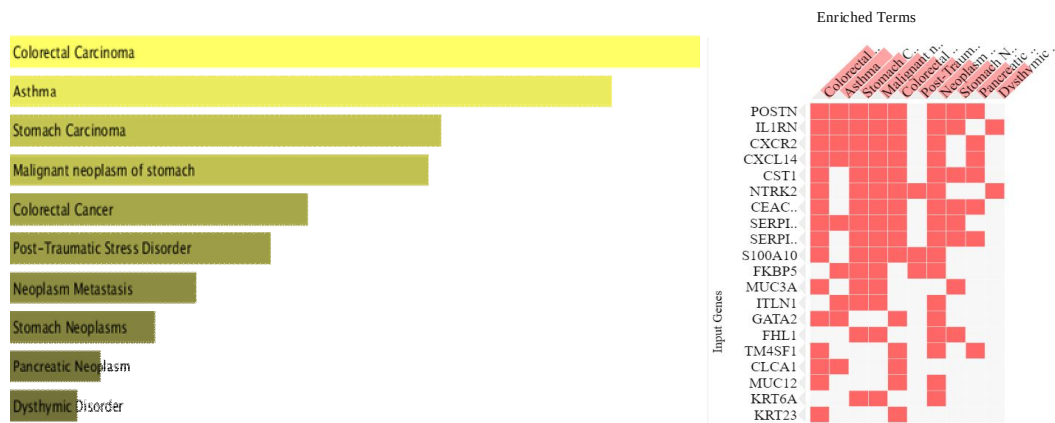
از این دسته ژن‌ها مانند (CXCR2، POSTN، IL1RN، MS4A2، ITLN1، FKBP5، SERPIN5B، CXCL14، GATA2، CALCA1) با بیماری آسم به‌طور قابل توجهی مشخص شد.

با مقایسه این گروه ژنی و ژن‌های مشترک که در مرحله قبل از دسته ژن‌های دارای افزایش یا کاهش متفاوت بیان به دست آمده بود (POSTN، CEACAM5، SERPIN5B، SCGB3A، GRP، CALCA1) چند ژن در بین هر دو گروه مشترک بودند (SERPIN5B، POSTN، CALCA1) که به نظر می‌رسد نقش مهمی در پاتوژنز آسم داشته باشند، بدین خاطر در ادامه بیش‌تر به بررسی آن‌ها می‌پردازیم تا متوجه شویم در چه مسیرهای سیگنالینگ درگیر و نتایج انتولوژی آن‌ها به چه صورت می‌باشد، تا شاید با شناخت بیش‌تر نحوه عملکرد آن‌ها بتوان فرایندهای درمانی مطلوب‌تری برای درمان آسم بر مبنای آن‌ها طراحی کرد (نمودار شماره 2).

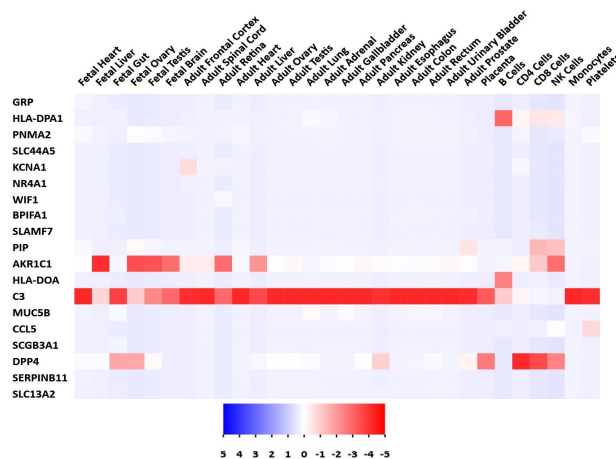
بررسی همبستگی ژن‌های دارای بیان متفاوت در همه بافت‌ها ژن‌های دارای بیان معنادار جدا شده دارای افزایش و کاهش بیان در موارد مورد مطالعه در دیگر بافت‌ها نیز بیان می‌شوند و بیان آن‌ها در هر بافتی بر دیگر بافت‌ها دارای اثر و ارتباط با هم می‌باشند که در نمودار هیت‌مپ زیر میزان همبستگی بیانی این دسته ژن‌های مشترک مورد بررسی ما، در بافت‌های مختلف از لحاظ میزان کورلیشن با همدیگر مشخص شده است (نمودار شماره 3).



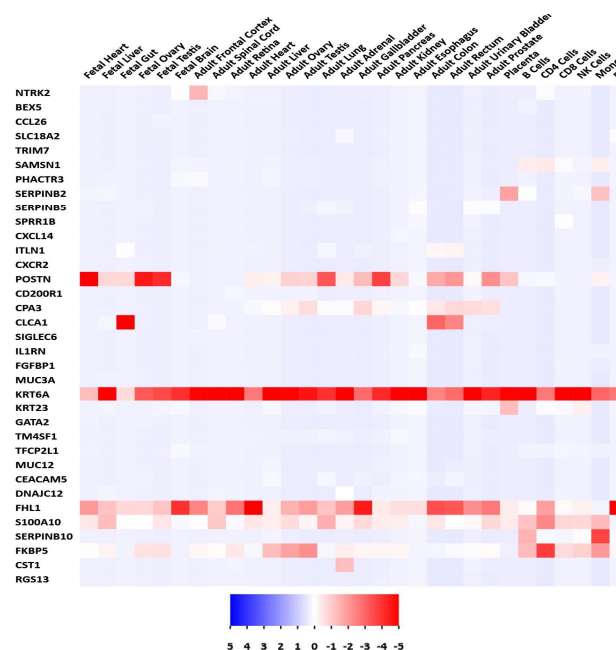
نمودار شماره 1: نمودار venn از سه مطالعه مایکروارای و پیدا کردن ژن‌های مشترک دارای بیان متفاوت بالا و پایین



نمودار شماره 2: بررسی همبستگی و ارتباط ژن‌های دارای بیان متفاوت با بیماری‌های مختلف توسط سرور Enrichr



الف: هیت مپ ژن‌های دارای افزایش بیان



ب: هیت مپ ژن‌های دارای کاهش بیان

نمودار شماره 3: نمودار هیت مپ ژن‌های موثر جداسازی شده در بیماران آسم و بررسی کورلیشن آن‌ها در بافت‌های مختلف با هم

تحلیل ژن *ontologies* و *pathways*

لیست ژن‌های مشترک بیانی جداسازی شده در مراحل قبلی فراتحلیل که با کمک نرم‌افزار R، دارای بیان متفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین همه نمونه‌های بیمار و کنترل و به صورت مشترک بودند و نیز ژن‌هایی که درگیری بیش‌تری در فرایند آسم داشتند را جدا کرده و با هم وارد پایگاه داده Enrichr جهت تحلیل‌های انتولوژی شدند و بعد از مقایسه با لیست‌های ژنی طبقه‌بندی شده در این پایگاه‌های داده به بررسی انتولوژی آن‌ها در سه مسیر اصلی انتولوژی بیولوژیکی، انتولوژی سلولی و انتولوژی مولکولی پرداخته شد، که علاوه بر این پایگاه داده از برخی نرم‌افزارها و پایگاه داده‌های دیگر در راستای فرایندهای انتولوژی نیز استفاده گردید. همچنین در همین پایگاه داده لیست ژنی تهیه شده از بیان معنی‌دار را در *pathways* های مختلف از جمله *KEGG pathways* که نسبت به بقیه مسیر معتبرتری است وارد کرده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته شد (33).

ژن انتولوژی

ژن‌هایی که پس از انجام فراتحلیل به صورت معنادار دارای تفاوت بیان متفاوت معنادار بودند را به صورت یک لیست ژنی وارد پایگاه داده Enrichr شد، تا با مقایسه بررسی انتولوژی آن‌ها با لیست ژن‌های طبقه‌بندی شده درون این پایگاه داده بتوان یک دید کامل‌تر از فرایند عملکردی آن‌ها بدست آورد (34). به طور کلی انتولوژی در بعد بیولوژیکی، سلولی و مولکولی ژن‌های دارای بیان متفاوتی را که از داده‌های خود به دست آمده است را مورد بررسی قرار می‌دهد (35).

فرایند ژن انتولوژی بیولوژیکی

با انجام فرایند انتولوژی و مشاهده نتایج حاصل از آن در بعد بیولوژیکی نتایج حاصل از بررسی لیست ژن‌های دارای بیان بالا و پایین متفاوت در این فراتحلیل بیانگر نقش بیولوژیکی ژن‌های دارای بیان بالا مشترک هر سه مطالعه با فرایندهای هم‌نوستانزیکی و انتقالات مزانشیمای اپیتلیالی و فرایندهای چسبندگی که با

کاده‌رین‌ها در ارتباطند، مرتبط بودند. هم‌چنین ژن‌های جدا شده دارای بیان پایین با فرایندهای سیگنال ترانسداکشن و متابولیسمی به خصوص مرتبط با انرژی و نیز در ارتباط با یکسری گیرنده‌ها هسته‌ای و لیگندهای پپتیدی نیز فرایندهای ایمونولوژیکی و ارتباطات سلولی اثرگذار می‌باشند که همگی آن‌ها هر کدام به در مسیرهایی خاص با عوارض بیماری آسم در ارتباط می‌باشند (نمودار شماره 4).

فرایند ژن انتولوژی سلولی

با انجام فرایند انتولوژی و مشاهده نتایج حاصل از آن در بعد سلولی نتایج حاصله بررسی لیست ژن‌های دارای بیان بالا و پایین متفاوت در فراتحلیل، بیانگر نقش سلولی ژن‌های دارای بیان بالا در ارتباط با فرایندهای مربوط به فرایندهای آگروزومی و فضاهای خارج سلولی می‌باشد و ژن‌های دارای بیان پایین نیز در مسیر بخش‌هایی مانند آگروزوم و هسته و سیتوپلاسم و لیزوزمی بیش‌تر درگیر می‌باشند و با درصد معنی‌داری بالاتری نسبت به بقیه فرایندها بودند (نمودار شماره 5).

فرایند ژن انتولوژی مولکولی

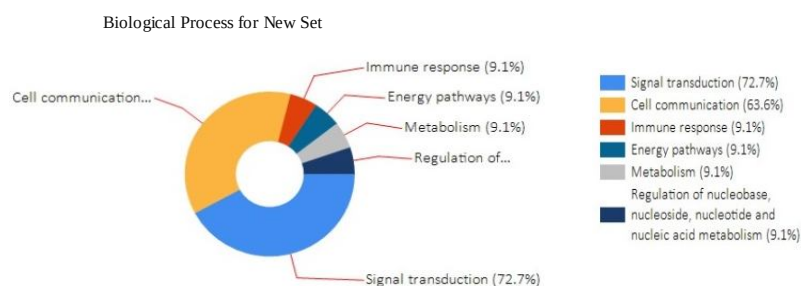
با انجام فرایند انتولوژی و مشاهده نتایج حاصل از آن در بعد مولکولی نتایج حاصله بررسی لیست ژن‌های دارای بیان متفاوت بالا و پایین در این فراتحلیل بیانگر نقش مولکولی برخی از ژن‌ها دارای بیان بالا در ارتباط با فرایندهای مربوط به فعالیت فرایندهای انتقالی پروتئینی و چسبندگی‌های سلولی می‌باشند و ژن‌های دارای بیان پایین بیش‌تر درگیر در فرایند عملکردی سایتوکاین‌ها و شیمیوکاین‌ها می‌باشند که دارای درصد معنی‌داری بالاتری نسبت به بقیه فرایندها بودند (نمودار شماره 6).

بررسی *pathways*

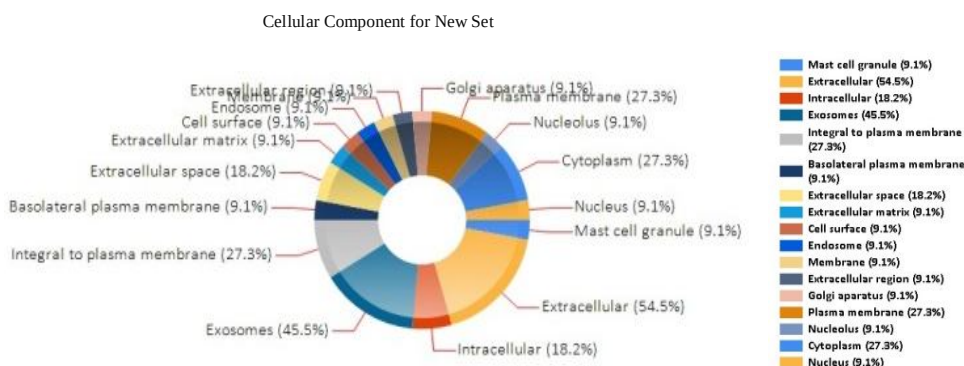
در *pathways*، مسیرهای سیگنالینگ مربوط به لیست ژنی مورد مطالعه ما با لیست‌های موجود در این پایگاه داده در مسیرهای *pathways* مختلف مورد

مربوط به مسیر سیگنالینگ فسفولیپاز D و همچنین برهمکنش‌های سایتوکاینی و مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ترکیبات شیمیایی و مسیرهای وابسته به عفونت هلیکوباکتر پیلوری و مسیرهای سیگنالینگ اسفنگوزینی و استروژنی می‌باشد که دارای درصد معنی‌داری بالاتری نسبت به بقیه بودند که تقریباً در راستای تایید همان مسیرهای انتولوژی قرار داشتند (جدول شماره 1).

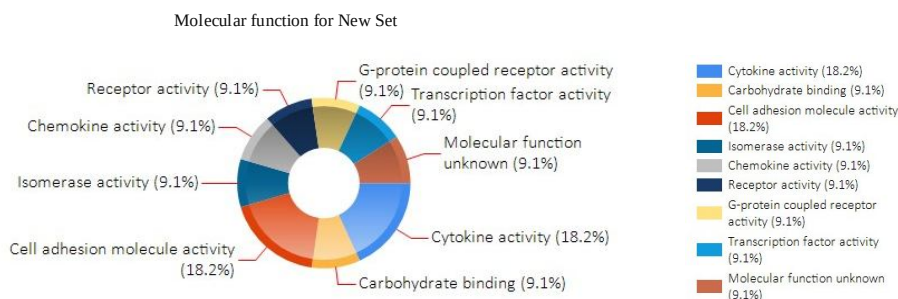
بررسی قرار می‌گیرد و مسیرهایی که دارای ارتباط معنی‌دار بالاتری هستند را برای ما تعیین می‌کنند. مسیر KEGG مهم‌ترین و معتبرترین مسیر pathways در بررسی داده‌های ژنی می‌باشد. با انجام بررسی فرایند pathways در مسیر KEGG و مشاهده نتایج حاصله بررسی لیست ژن‌های دارای بیان متفاوت در فراتحلیل بیانگر نقش برخی از آن‌ها در ارتباط با آسم و فرایندهای مربوط به فرایندهای



نمودار شماره 4: بررسی انتولوژی بیولوژیکی ژن‌های دارای بیان متفاوت و موثر در بیماری آسم مورد مطالعه



نمودار شماره 5: بررسی انتولوژی بیولوژیکی ژن‌های دارای بیان متفاوت و موثر در بیماری آسم مورد مطالعه



نمودار شماره 6: بررسی انتولوژی مولکولی ژن‌های دارای بیان متفاوت و موثر در بیماری آسم مورد مطالعه

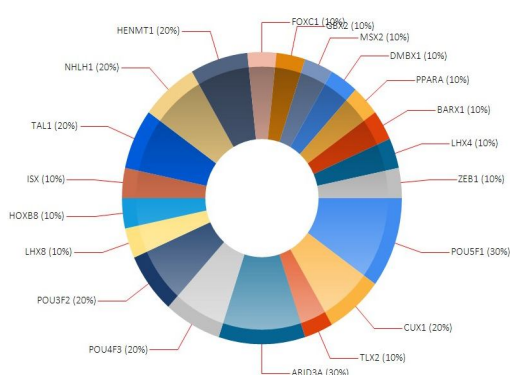
جدول شماره 1: بررسی عوامل موثر در مسیر (KEGG 2019 Human) از طریق ژنهای موثر در بیماری آسم

Index	Name	سطح معنی داری	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Asthma	0/01540	1/000	64/52	269/27
2	Phospholipase D signaling pathway	0/002354	0/3625	27/03	163/56
3	Cytokine-cytokine receptor interaction	0/0003495	0/1076	20/41	162/43
4	Chemokine signaling pathway	0/003842	0/3945	21/05	117/09
5	Fc epsilon RI signaling pathway	0/03349	1/000	29/41	99/90
6	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	0/03349	1/000	29/41	99/90
7	Sphingolipid signaling pathway	0/05794	1/000	16/81	47/87
8	Estrogen signaling pathway	0/06644	1/000	14/60	39/58
9	Human cytomegalovirus infection	0/1070	1/000	8/89	19/87
10	Endocytosis	0/1155	1/000	8/20	17/69

بررسی ترانسکریپتوم

نکته مهم دیگر در این کار تحقیقاتی این بود که بسیاری از ژنهای دارای بیان متفاوت مورد بررسی، فرایند عملکردی خود را به واسطه برهمکنش با یکسری ژن یا فاکتورهای مولکولی دیگر انجام می دهند که هر فاکتور خود می تواند در یک مسیر مولکولی یا زیستی در بدن اشخاص مورد مطالعه درگیر باشد. مهمترین فاکتور درگیر با ژنهای مشترک دارای بیان بالا POU2F1 است که در ارتباط با فعالیت ایمنوگلوبین ها به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می کند و مهم ترین فاکتورهای درگیر با ژنهای مشترک دارای بیان پایین ATF1، HOXB8 و ZEB1، ATF3، P1TX1، OTX1، PLAU می باشند. همچنین فاکتورهای NKX2-8، IRF7 و PAX6 نیز دارای ارتباط بالایی با ژنهای درگیر در بیماری آسم هستند (نمودار شماره 7).

Transcription factor for New Set



نمودار شماره 7: بررسی برهمکنش ژنهای دارای بیان متفاوت و موثر در بیماری آسم مورد مطالعه با ترانسکریپت فاکتورهای مختلف

بررسی شبکه برهمکنش لیست ژنی بیانی تهیه شده از فراتحلیل

در بررسی فرایند شبکه برهمکنش ژنهای مشترک در GSE های مورد مطالعه ژنهایی که دچار افزایش بیان شده اند (GRP, SCGB3A1) و ژنهایی که دچار کاهش بیان زیاده تری نسبت به بقیه شده اند (CALCA1، CEACAM5، POSTN و SERPIN5B) و نیز برخی ژنهای دارای بیان بالا و اثرات بسیار مهم و موثر در سیگنالینگ بیماری آسم مانند (POSTN، IL1RN، CXCR2، CXCL14، SERPIN، FKBP5، ITLN1، MS4A2 و GATA2) نسبت بقیه دارای برهمکنش بیش تری با دیگر ژن ها بودند که این احتمال مهم و موثر بودن این ژن ها را در فرایندهای سیگنالینگ و مسیرهای بیانی در ارتباط با دیگر ژن ها می دهد که نیاز به بررسی عملکرد بیش تر این ژن ها را می رساند. پس از آن که ژنهای مشترک دارای افزایش و کاهش بیان، بین دسته های ژنی در مطالعات مختلف مورد بررسی را جدا کردیم از آن ها جهت ترسیم شبکه و بررسی شبکه برهمکنش با ژنهای دیگر از دیتابیس های مختلف استفاده کردیم و شبکه ایاز این برهمکنش ها را ترسیم کردیم که در این شبکه هر کدام از ژنهای مورد مطالعه ما علاوه بر برهمکنش با همدیگر با یکسری ژنهای دیگر ارتباط برقرار کردند. بدین گونه که در بین ژنهای افزایش بیان یافته ژن GRP، GATA2، CXCR2، MS4A2، FKBP5 و CEACAM5 از همه مهم تر و نسبت به بقیه ارتباطات بیش تری برقرار کرده بود که از جمله آن ها با ژنهایی که در فرایند عملکردی هورمون

برای رشد جنین، خودنوسازی، نگهداری و عملکرد خون‌سازی، تشکیل سیستم لنفاتیکی و سایر سلول‌های بنیادی مهم سازنده بافت را تنظیم می‌کند (38). کاهش سطح سلولی GATA2 ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌های خون‌شناختی، ایمونولوژیکی، لنفاوی و یا سایر اختلالات خانوادگی را به دنبال دارد. GATA2 در تولید و تحریک اینترلوکین 1 بتا و CXCL2 که به طور غیرمستقیم برای شبیه سازی بیان GATA2 عمل می‌کنند نقش دارد و طی خودتنظیمی منفی، فاکتور رونویسی GATA2 باعث فعال شدن گیرنده همراه پروتئین G، GPR65 می‌شود این بیان ژن GATA2 را سرکوب می‌کند (39). ژن GATA2 انسان در سلول‌های مغز استخوان هماتولوژیکی در سلول‌های بنیادی و مراحل بعدی سلول‌های پیش سازنده رشد بیان شده است و افزایش و یا کاهش در تنظیم بیان این ژن تجدید در فرایند بقا و پیشرفت این سلول‌های نابالغ به سمت فرم‌های بالغ نهایی آن‌ها یعنی گلبول‌های قرمز، انواع خاصی از لنفوسیت‌ها (سلول‌های B، سلول‌های NK و سلول‌های T کمک‌کننده)، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، پلاکت‌ها، سلول‌های دندریتیک پلاسماستیتوئید، ماکروفاژها و ماست سل‌ها بسیار موثر می‌باشد که همگی در فرایندهای ایمونولوژیکی نقش بسزایی دارند (40-42). نقشش در سیستم لنفاوی و نیز ارتباط نزدیکی با فرایندهای ایمونولوژیکی و خونی را اثبات می‌کند که عملکردش هم راستا با نتایج انتولوژی و مسیرهای مرتبط با بیماری آسم می‌باشد. ژن دیگر پریوستین (POSTN)، یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی است که با انتقال اپیتلیال مزانشیمی در سرطان و تمایز مزانشیم در قلب همراه است (43). در بسیاری از سرطان‌ها، پریوستین از طریق اینترگرین‌ها مسیرهای سیگنالینگ Akt/PKB و واسطه FAK را در سلول‌های سرطانی فعال می‌کند. این منجر به افزایش بقای سلول، تهاجم، آنژیوژنز، متاستاز و انتقال اپیتلیال مزانشیمی می‌شود (44). این ژن در ترمیم بافت نیز به عنوان پاسخ به آسیب نقش اساسی دارد. تنظیم این ژن

در حین تغییرات سرنوشت سلولی امنجر به تاثیر بر تغییر ساختار ماتریکس خارج سلولی، بازسازی بافت و انتقال اپیتلیال مزانشیمی می‌شود که همه این موارد با بهبود بافت وتوسعه بیماری در ارتباط و پاسخ‌های مناسب و نامناسب را در مورد آسیب بافتی متعادل می‌کند (45). که این بیانگر ارتباط بالای این ژن با نتایج حاصل از مسیر KEGG مرتبط با بیماری آسم می‌باشد. ژن بعدی CXCL14 یک سایتوکاین کوچک متعلق به خانواده کموکاین CXC است. در بسیاری از بافت‌های طبیعی، که در آن منبع سلولی آن فیبروبلاست است در سطوح بالا بیان شده است. این کموکاین در مونوسیت‌ها می‌تواند در حضور یک واسطه التهابی به نام پروستاگلاندین E₂ (PGE₂) این سلول‌ها را فعال کند (46). به عنوان یک ماده شیمی درمانی قوی و فعال‌کننده سلول‌های دندریتیک عمل می‌کند و در انتقال این سلول‌ها و مهاجرت NK فعال شده نقش دارد (47) CXCL14 همچنین قادر به مهار آنژیوژنز (48) به دلیل توانایی در مسدود کردن کموکاسی سلول اندوتلیال است که همه این‌ها تاییدکننده نتایج انتولوژی و مسیر KEGG حاصل از بررسی‌های بیماری آسم می‌باشد (49، 50). Ms4a2 در پاسخ آلرژیک طی اتصال آلرژن به گیرنده IgE که در سطح ماست سل‌ها و بازوفیل‌ها یافت می‌شوند و در فعال شدن سلول و آزاد شدن واسطه‌های مسئول تظاهرات آلرژی نیز موثر است. اعضای این خانواده پروتئین الگوهای بی‌نظیری را در بین سلول‌های خونساز و بافت‌های غیرمابغ نشان می‌دهند. ژن Cxcr2 عضوی از خانواده گیرنده‌های حاوی پروتئین G است. این پروتئین یک گیرنده برای اینترلوکین 8 (IL8) است. این پروتئین با میل زیاد به IL8 متصل می‌شود و فرایند سیگنالینگ را از طریق یک سیستم پیام‌رسان دوم فعال شده با پروتئین G انجام می‌دهد (51). این گیرنده همچنین به لیگاند 1 کموکین (موتیف C-X-C) متصل می‌شود (CXCL1/MGSA) که با تحریک رشد ملانوما، مشخص گردید که یکی از مؤلفه‌های اصلی مورد نیاز برای رشد سلول‌های ملانوما وابسته به سرم

است. علاوه بر این، در ارتباط با کموکاین‌های CXCL2، CXCL3 و CXCL5 می‌باشد و همچنین اثرات آتروژنیک IL8 در سلول‌های اندوتلیال ریز عروقی روده توسط این گیرنده واسطه‌گری می‌شود که این نتایج بیانگر ارتباط آن با مسیرهای ایمونولوژیک در گیر در بیماری ایمونولوژیک مانند آسم می‌باشند (52). نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده به وضوح نشان می‌دهد که چندین مسیر به‌طور مداوم در آسم تنظیم می‌شوند، اگرچه نمی‌توانیم ارتباط کنیم که آیا این مسیرها به‌طور علی با پیشرفت بیماری یا پیامد بیماری مرتبط هستند یا خیر، اما ژن‌های مرتبط با التهاب و تولید موکوز و مخاط‌ها و بخش‌های اپیتلیالی و فاکتورها و عوامل ایمونولوژیکی مختلف به‌طور مداوم و به‌شدت در موارد آسم تنظیم مجدد شده‌اند. در تجزیه و تحلیل این مسیرها همچنین مشاهده شد که ژن‌های به‌دست آمده در سیگنالینگ GPR و Akt/PKB و mTor و TGF- β که در مسیر بیماری آسم فعال هستند در گیر می‌باشند. در مجموع، نتایج حاصل از این فرایندهای آنالیزی نشان دادند که این مسیرهای خاص به‌دست آمده مرتبط با ژن‌های دارای بیان متفاوت در ارتباط با سیستم ایمنی هستند (53). از آنجا که نتایج ما مبتنی بر مقایسه‌های مختلف است، نتیجه می‌گیریم که این مشترک بودن الگوهای بیان برای جمعیت‌های مطالعاتی قابل تعمیم است. در این مطالعه حدود 55 ژن دخیل توسط آنالیز در اپیتلیوم راه هوایی آسم را به‌دست آوردیم که دارای بیان متفاوت تری بودند که حدود نوزده عدد کاهش و بقیه افزایش بیان را از خود نشان داده بودند که البته احتیاط را باید در تفسیر این نتایج در نظر گرفت. با این حال، برای حدود هفت عدد از آن‌ها شواهد زیادی در مطالعات دیگر وجود داشت که نشان می‌داد آن‌ها در فرایند بیماری آسم از طریق فاکتورها و عوامل و مسیرهای مبتنی بر سیستم ایمنی بدن نقش ایفا می‌کنند و موثر هستند. همچنین مشخص شد که وضعیت آسم ممکن است با افزایش یا کاهش بیان ژن‌ها در اپیتلیوم مجاری هوایی و یا سلول‌های سفید خون جذب شده موجود در اپیتلیوم

مجاری هوایی بیماران آسمی شدید شود (54). با این حال مشخص نیست که آیا تفاوت بیان ژن در اپیتلیوم مجاری هوایی قبل و بعد از شروع بیماری ممکن است بر این رابطه تأثیر بگذارد یا خیر. بنابراین بررسی‌های مربوط به تغییرات بیانی در این سری از ژن‌ها می‌تواند به یک استدلال بیولوژیکی منسجم به نفع نقش این ژن در بیماری آسم کمک کند و این درحالی است که نتایج ما به روشنی نشان می‌دهد که تعداد قابل توجهی از ژن‌ها در آسم موثر هستند. در واقع برخی مطالعات تعداد نسبی را از این تغییرات بیان ژنی مشخص کردند و می‌توان گفت استفاده از داده‌های بیان ژن برای شناسایی زیرلایه‌های بیولوژیکی در زیرگروه‌های آسم (با اندوتایپ‌ها)، یک رویکرد امیدوارکننده است (55-57). البته این امر تا حدود زیادی به در دسترس بودن داده‌های مورد مطالعه وابسته است که می‌تواند برای ارزیابی ارتباط با بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد. پس به‌طور کلی می‌توان گفت شناسایی هزاران ژن به‌طور مداوم و بدون قاعده در مجاری هوایی آسم نشان‌دهنده یک نقطه شروع برای این تجزیه و تحلیل‌ها در آینده است که محققین با استفاده از بررسی برهمکنش‌های ژنی بین ژن‌هایی که تحت اثر بیماری آسم دچار تغییر بیان شده‌اند و دیگر ژن‌های مرتبط با آن‌ها همانند آن‌هایی که در این کار آنالیزی انجام شده، هم در بررسی ترانسکریپت‌ها و هم بررسی شبکه برهمکنش پروتئین/پروتئین بتوانند مسیرهای موثر جدیدی از بیماری‌هایی چون آسم را پیدا کنند تا با تنظیم و مهار آن‌ها شاید بتوانند شیوه‌های درمانی موثرتری و نوینی از درمان ارائه دهند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور کلی پس از انجام آنالیزهای مختلف در این کار مطالعاتی و به دست آوردن یک سری ژن‌های جدید دارای بیان متفاوت از مطالعات مختلف مایکروارای و بررسی روابط و اثرات بیانی آن‌ها در مسیرهای مختلف مشاهده شد که همگی آن‌ها به شیوه‌های مختلف و در مسیرهای گوناگون در فرایندهای ایمونولوژیکی که دارای ارتباط مستقیم و

سپاسگزاری

از آقای دکتر حامد اسمعیل لشگریان هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان بخاطر کمک و همکاری در این مقاله تشکر فراوان به عمل می آید.

غیرمستقیم با ناحیه تنفسی بود، درگیر بودند و این بیانگر نقش آن‌ها در شکل‌گیری مشکلات و عوارض تنفسی در بیماران آسمی می‌باشد. البته تعیین میزان اثرگذاری هر کدام از این ژن‌ها نیازمند مطالعات تخصصی‌تر و بالینی می‌باشد.

References

- Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J* 2007; 29(1): 179-184.
- Miller RL, Mei Ho S. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(6): 567-573.
- Dietert RR. Maternal and childhood asthma: risk factors, interactions, and ramifications. *Reprod Toxicol* 2011; 32(2): 198-204.
- Jindal SK. Textbook of pulmonary and critical care medicine. 2nd ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2017.
- Kelly FJ, Fussell JC. Air pollution and airway disease. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(8): 1059-1071.
- Ahluwalia SK, Matsui EC. The indoor environment and its effects on childhood asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11(2): 137-143.
- Arshad SH. Does exposure to indoor allergens contribute to the development of asthma and allergy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10(1): 49-55.
- Custovic A, Simpson A. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22(6): 393-401.
- PC Gøtzsche, Johansen HK, Schmidt LM, Burr ML. House dust mite control measures for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 18(4): CD001187.
- Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006; 7(2): 95-100.
- Elward GD, Kurtis S. Asthma. London: Manson Pub; 2010.
- Rapini RP, Bologna JL, Jorizzo JL. Dermatology. Louis: Mosby; 2007.
- Beuther DA. Recent insight into obesity and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(1): 64-70.
- Holguin F, Fitzpatrick A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol* 2010; 108(3): 754-759.
- Wood LG, Gibson PG. Dietary factors lead to innate immune activation in asthma. *Pharmacol Ther* 2009; 123(1): 37-53.
- Hammad H, Lambrecht BN. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity* 2015; 43(1): 29-40.
- Ortiz RA, Barnes KC. Genetics of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; 35(1): 19-44.
- Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 509-520.
- Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363(23): 2233-2247.
- Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial

- cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(40): 15858-15863.
21. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(5): 388-395.
 22. Yang IV, Pedersen BS, Liu AH, O'Connor GT, Pillai D, Kattan M, et al. The nasal methylome and childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139(5): 1478-1488.
 23. Yang IV, Richards AJ, Davidson E, Stevens AD, Kolakowski CA, Martin RJ, et al. The nasal methylome: a key to understanding allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 829-831.
 24. Guajardo JR, Schleifer KW, Daines MO, Ruddy RM, Aronow BJ, Wills-Karp M, et al. Altered gene expression profiles in nasal respiratory epithelium reflect stable versus acute childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(2): 243-251.
 25. Giovannini-Chami, Marcet LB, Moreilhon C, Chevalier B, Illie MI, Lebrigand K, et al. Distinct epithelial gene expression phenotypes in childhood respiratory allergy. *Eur Respir J* 2012; 39(2): 1197-1205.
 26. Sun C, Yuan Q, Wu D, Meng X, Wang, B. Identification of core genes and outcome in gastric cancer using bioinformatics analysis. *Oncotarget* 2017; 8(41): 70271-70280.
 27. Moradifard S, Hoseinbeyki M, Ganji S. M, Minucheir Z. Analysis of microRNA and gene expression profiles in Alzheimer's disease: a metaanalysis approach. *Sci Rep* 2018; 8(1): 20959-20960.
 28. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7): e47.
 29. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26(1): 139-140.
 30. Kolde R, Laur S, Adler P, Vilo J. Robust rank aggregation for gene list integration and meta-analysis. *Bioinformatics* 2012; 28(4): 573-580.
 31. Yang J, Han S, Huang W, Chen T, Liu Y, Pan S, et al. A meta -analysis of micro RNA expression in liver cancer. *PLoS One* 2014; 9(12): e114533.
 32. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: 2004.
 33. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7): e47.
 34. Jeanmougin M, de Reynies A, Marisa L, Paccard C, Nuel G, Guedj M. Should we abandon the t-Test in the analysis of gene expression microarray data: A comparison of variance modeling strategies. *PLoS One* 2010; 5(9): e123362010.
 35. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2011; 16(5): 284-287.
 36. Huangda DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4(1): 44-57.
 37. Lee ME, Temizer DH, Clifford JA, Quertermous T. Cloning of the GATA-binding protein that

- regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991; 266(24): 16188-16192.
38. Hirabayashi S, Wlodarski MW, Kozyra E, Niemeyer CM. Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms. *Int J Hematol* 2017; 106(2): 175-182.
 39. Wlodarski MW, Collin M, Horwitz MS. GATA2 deficiency and related myeloid neoplasms. *Semin Hematol* 2017; 54(2): 81-86.
 40. Katsumura KR, Bresnick EH. The GATA factor revolution in hematology. *Blood* 2017; 129(15): 2092-2102.
 41. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* 2014; 123(6): 809-821.
 42. Bigley V, Cytlak U, Collin M. Human dendritic cell immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 86: 50-61.
 43. Hoersch S, Andrade-Navarro MA. Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region. *BMC Evol Biol* 2010; 10(1): 30.
 44. Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch* 2011; 459(5): 465-475.
 45. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CT, Kudo A. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(7): 1279-1288.
 46. Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Nakshatri H, Christopherson K, Azam M, et al. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255(3): 703-706.
 47. Kurth I, Willimann K, Schaeferli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J Exp Med* 2001; 194(6): 855-861.
 48. Shurin GV, Ferris RL, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, et al. Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *J Immunol* 2005; 174(9): 5490-5498.
 49. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmi Z, Dahl R, Christopherson K, Hromas R. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol* 2006; 34(8): 1101-1105.
 50. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, et al. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res* 2004; 64(22): 8262-8270.
 51. Maekawa K, Imagawa N, Tanaka Y, Harada S. Determination of the sequence coding for the beta subunit of the human high-affinity IgE receptor. *FEBS Lett* 1992; 302(2): 161-165.
 52. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, et al. Assignment of the genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics* 1992; 14(3): 685-691.
 53. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol* 2011; 186(6): 3283-3288.

54. Zheng T, Zhu Z, Wang J, Homer RJ, Elias J A. IL-11: insight in asthma from overexpression transgenic modeling. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(4): 489-496.
55. Kabisch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritsch C, Weiland SK, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2): 269-274.
56. Tadin O, Friman ET, Naef F, Suter DM. Quantitative relationships between SMAD dynamics and target gene activation kinetics in single live cells. *Sci Rep* 2019; 9(1): 5372.
57. Wortley MA, Bonvini SJ. Transforming growth factor- β 1: a novel cause of resistance to bronchodilators in Asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 61(2): 134-135.