



علمی پژوهشی

## نقش هیستون داستیلاز در تکثیر ویروس *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)* و پاسخ ایمنی سلول‌های *Spodoptera frugiperda (Sf9)*

مرضیه عطاریان فر، اعظم میکانی\* و محمد مهرآبادی\*

دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۹)

### چکیده

سازوکارهای اپی ژنتیک مانند تغییرات هیستون‌ها به خصوص استیلاسیون و داستیلاسیون، نقش مهمی در شکل‌گیری روابط متقابل میزبان-بیمارگر از طریق تنظیم بیان ژن‌ها برعهده دارند که توسط آنزیم‌های هیستون استیل ترانسفراز و هیستون داستیلاز کاتالیز می‌شود. از آنجاکه یکی از روش‌های کم‌خطر کنترل‌کننده حشرات آفت استفاده از بیمارگرها می‌باشد؛ بنابراین، مطالعه در زمینه شناخت نقش این سازوکارها در پاسخ به عوامل بیمارگر حشرات، نقش مهمی را در کنترل آفات ایفا می‌کند. بررسی‌های انجام شده نشان داد که مهارکننده‌های هیستون داستیلاز تکثیر ویروس‌های بیمارگر پستانداران را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند. بنابراین، در این مطالعه به بررسی نقش تریکواستاتین به‌عنوان مهارکننده هیستون داستیلاز در تکثیر ویروس AcMNPV و پاسخ ایمنی ضد ویروسی سلول‌های Sf9 پرداخته شد. به این منظور، سلول‌ها یک و سه ساعت پیش از آلودگی ویروسی یا به صورت هم‌زمان در معرض دو غلظت ۱ و ۰/۲۵ میکرومولار تریکواستاتین قرار گرفته و اثر تریکواستاتین بر تکثیر ویروس و بیان برخی از ژن‌های مهم ایمنی ضد ویروسی بررسی شد. نتایج نشان داد تکثیر ویروس تحت تاثیر استفاده از این ترکیب قرار نمی‌گیرد. همچنین، بیان ژن‌های اصلی مسیرهای ایمنی ضد ویروسی miRNA (Dicer1 و Ago1) و siRNA (Dicer2 و Ago2) پس از استفاده از غلظت‌های ۱ و ۰/۲۵ میکرومولار تریکواستاتین تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد نداشت. با توجه به نتایج، سازوکار اپی ژنتیکی داستیلاسیون هیستون‌ها تاثیری در تکثیر ویروس AcMNPV و سیستم ایمنی ضد ویروسی در سلول‌های Sf9 نداشت.

**واژه‌های کلیدی:** اپی ژنتیک، هیستون داستیلاز، تریکواستاتین، ایمنی ضد ویروسی

## مقدمه

کشاورزان هر ساله به وسیله آفت‌کش‌های شیمیایی سعی در کنترل آفات دارند، در حالی که استفاده از این ترکیبات علاوه بر هزینه بالا باعث بروز مشکلات زیست محیطی، تاثیر روی جانداران غیر هدف، کاهش تنوع زیستی و بروز گونه‌های مقاوم به این ترکیبات می‌شود. از این‌رو، استفاده از روش‌های جایگزین ضروری به نظر می‌رسد. در بین این روش‌ها، استفاده از دشمنان طبیعی آفات از جمله شکارگرها، پارازیتوئیدها و بیمارگرها از اهمیت بالایی برخوردار است. در این بین، باکتری‌ها و ویروس‌ها در کنترل بیولوژیک از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند (Sivapragasam *et al.*, 2001; Ehler, 2004). خانواده باکولوویروس‌ها ویروس‌های دورشته‌ای DNA دار هستند که دامنه میزبانی محدودی داشته و تنها بندپایان به‌خصوص راسته بالپولکداران را آلوده کرده و نقش مهمی در کنترل حشرات دارند (Szewczyk *et al.*, 2009).

سیستم ایمنی حشرات در پاسخ به عوامل بیمارگر فعال شده و به شکل‌های مختلف واکنش نشان می‌دهد. حشرات برخلاف مهره‌داران از ایمنی اکتسابی بی‌بهره هستند و تنها می‌توانند از ایمنی ذاتی که شامل دو سیستم ایمنی سلولی و هومورال است، استفاده کنند (Strand, 2008). سلول‌های خونی در سیستم ایمنی سلولی، به صورت مستقیم در واکنش دفاعی بدن شرکت می‌کنند. فاگوسیتوز<sup>۱</sup>، انکپسوله<sup>۲</sup> کردن و تشکیل گره، جزو پاسخ سیستم ایمنی سلولی در حشرات محسوب می‌شوند. در فرایند فاگوسیتوز، ذرات کوچک توسط سلول‌های خونی میزبان در بر گرفته شده و سپس، در کیسه‌های غشایی تشکیل شده هضم می‌شوند. زمانی که ذرات خارجی برای فاگوسیتوز شدن خیلی بزرگ باشند، عمل انکپسوله کردن توسط سلول‌های خونی میزبان صورت می‌گیرد. در انکپسوله کردن سلول‌های خونی پس از احاطه کردن مهاجم، از ملانیزه کردن به عنوان سازوکار اصلی برای از بین بردن مهاجم استفاده می‌کنند. تشکیل گره هر دو فرایند

فاگوسیتوز و انکپسوله کردن را با هم در بر می‌گیرد و در پاسخ به ذرات خارجی که برای فاگوسیتوز شدن بسیار زیاد هستند، صورت می‌گیرد. ملانیزه کردن گره نیز در این روش بسیار شبیه به انکپسوله کردن صورت می‌گیرد. پاسخ ایمنی هومورال در حشرات شامل سنتز پروتئین‌های ضد میکروبی در اجسام چربی، جریان‌های آنزیمی که انعقاد و ملانیزاسیون همولنف را تنظیم می‌کنند و تولید انواع اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) و نیتروژن واکنش‌پذیر (RNS) می‌باشد (Lavine and Strand, 2002). مجموعه‌ای از ژن‌ها از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ نقشی بالقوه در پاسخ ایمنی ذاتی دارند؛ مانند فاکتورهای رونویسی (NF- $\kappa$ B) در مسیرهای Toll و Imd. به محض اینکه عامل بیمارگر حشره را مورد هجوم قرار می‌دهد، سیستم ایمنی به وسیله پروتئین‌های شناسایی‌کننده الگوها (PRP) آن را شناسایی کرده و بسته به نوع بیمارگر به آن پاسخ می‌دهد؛ به طوری که در پاسخ به باکتری‌های گرم منفی از مسیر Imd و در پاسخ به باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها از مسیر Toll استفاده می‌کند. عامل ویروسی نیز می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر JACK STAT شود (Kimbrell and Beutler, 2001).

روابط متقابل میزبان (حشرات) و عامل بیماری‌زا ماهیتی پویا و در حال تغییر دارد. بررسی‌ها نشان داده است که بیان بسیاری از ژن‌های میزبان به‌واسطه حضور عامل بیمارگر به طور متفاوتی کاسته شده که بیماری‌زایی را کاهش داده و شانس زنده ماندن میزبان را افزایش می‌دهند. از طرفی، بسیاری از عوامل بیماری‌زا برای به حداکثر رساندن زنده‌مانی و تکثیر خود در میزبان، استراتژی‌هایی برای فرار یا سرکوب سیستم ایمنی میزبان ایجاد کرده‌اند؛ بنابراین، مجموعه‌ای پیچیده از ساز و کارهای تنظیم بیان ژن در این تعاملات قرار دارند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سازوکارهای اپی ژنتیک می‌توانند نقش مهمی در شکل‌گیری روابط متقابل

1. Baculoviridae

2. humoral

3. phagocytose

4. Encapsulation

درک سازوکارهای تنظیم هیستون د استیلازها در طی آلودگی ویروسی را برجسته می‌کند. پیش از این، نقش سازوکارهای اپی ژنتیک در پاسخ‌های ایمنی میزبان در برابر میکروارگانیزم‌های مختلف از جمله سنتز و القای پپتیدهای ضد میکروبی‌ها گزارش شده است (Hetmuller *et al.*, 2017; Baradaran *et al.*, 2019). با این حال، نقش تنظیم‌کننده سازوکارهای اپی ژنتیک در سیستم ایمنی ضد ویروسی ناشناخته مانده است. از آنجا که شناخت ویژگی‌های سیستم ایمنی حشرات می‌تواند در درک بهتر برهمکنش بین دفاع حشره و فعالیت ویروس‌های بیمارگر بسیار مؤثر باشد، در این مطالعه به بررسی نقش هیستون د استیلاز بر تکثیر ویروس AcMNPV، به عنوان عامل بیولوژیک در کنترل لاروهای بالولکداران (Bianchi *et al.*, 2000) و بیان ژن‌های مهم سیستم ایمنی در سلول‌های Sf9 پرداخته شد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ماده Trichostatin A (TSA) به عنوان مهارکننده هیستون د استیلاز از شرکت سیگما تهیه شد. کیت MTT از شرکت کالازیست خریداری و رده سلولی Sf9 از انستیتو پاستور تهیه شد.

### کشت سلولی

در این مطالعه، رده سلولی *Spodoptera Frugiperda* (SF9) از بانک سلولی پاستور تهیه شد و در محیط گریس<sup>۱</sup> (1×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (محصول کمپانی جیبکو<sup>۲</sup>) در ۲۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. برای انجام آزمایش‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند و پس از حصول اطمینان از عدم الودگی، مورد استفاده قرار گرفتند. ویروس AcMNPV حامل ژن GFP از دانشگاه والنسیا، اسپانیا تهیه شد.

میزبان-بیمارگر از طریق تنظیم بیان ژن‌ها داشته (Negri and Jablonka, 2016; Gegner *et al.*, 2019). اپی ژنتیک، مجموعه فرآیندهای برگشت‌پذیر است که باعث تغییر در بیان ژن‌ها، مستقل از تغییر در توالی نوکلئوتیدی-DNA می‌شود. مکانیسم‌های اپی ژنتیک با تغییر اجزای تشکیل‌دهنده کروماتین منجر به تغییر ساختار کروماتین می‌شوند که در نتیجه، الگوی بیان ژن را تغییر می‌دهند. مهم‌ترین سازوکارهای اپی ژنتیکی که تاکنون شناسایی شده‌اند، شامل پروتئین‌های تغییردهنده آرایش کروماتین، متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNA های غیرکدکننده می‌باشند. تغییرات هیستون‌ها به خصوص استیلاسیون و داستیلاسیون نقش کلیدی در تنظیمات اپی ژنتیکی بر عهده دارند. استیلاسیون کروماتین با باز شدن کروماتین و تسهیل دسترسی سازوکار رونویسی به پروموتور، فرآیند رونویسی را فعال می‌کند؛ در حالی که داستیلاسیون منجر به خاموشی ژن‌ها می‌شود. این فرآیندها توسط استیل ترانسفرازهای هیستون (HATs) و دی استیلازهای هیستونی (HDAC) کاتالیز می‌شود (De Nadal *et al.*, 2004). پیش از این، نقش سازوکارهای اپی ژنتیکی مانند siRNA و miRNA در روابط متقابل حشره (میزبان) و ویروس مورد مطالعه قرار گرفته است (Asgari, 2013; Mehrabadi *et al.*, 2018). اما نقش تاثیر تغییرات هیستون در روابط متقابل حشره - ویروس بررسی نشده است. ارتباط هیستون د استیلازها و تکثیر و بیماری‌زایی ویروس‌های انسانی مانند هیپاتیت، هرپس ویروس، HPV و HIV پیش از این مورد مطالعه قرار گرفته است (Herbein and Wendling, 2010). به نظر می‌رسد که ویروس‌ها طی تکامل مشترک با میزبان خود، مکانیزم‌های دقیق و تنظیم شده‌ای را برای هدف قرار دادن هیستون د استیلازها ایجاد کنند، تا فعالیت‌های این آنزیم را متناسب به نوع ویروس مهار یا فعال کنند (Guise *et al.*, 2013). این مشاهدات اهمیت

1. Hepatitis

2. Herpesvirus

3. Grace

4. Gibco

## آزمایش زنده‌مانی سلول

به منظور بررسی تاثیر استفاده از غلظت‌های مختلف تریکواستاتین<sup>۱</sup> بر زنده‌مانی سلول‌ها، از روش رنگ‌سنجی MTT (Methyl Tetrazolium) استفاده شد (Hřebačková *et al.*, 2009). در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی  $415 \times 10^3$  سلول پس از شمارش با دستگاه cytation5 (Bio Tek) در هر خانه‌ی پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد، به طوری که کانفلوئنتی<sup>۲</sup> سلول‌ها حدود ۷۰ درصد باشد. پس از ۲۴ ساعت، انکوباسیون غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۱، ۲ و ۵ میکرومولار از تریکواستاتین که در محیط کشت سلولی حل شده بود، اضافه شده و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. تیمار شاهد (تنها محیط کشت سلولی) نیز در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان‌های نام‌برده، به هر چاهک پلیت ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) به عنوان حلال به هر خانه اضافه و مخلوط شد. پس از آن، میزان جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر<sup>۳</sup> در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج رفرنس که برابر با ۶۹۰ نانومتر بود، خوانده شد (Shokrzhadeh *et al.*, 2012). هر کدام از آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. نتایج به دست آمده به صورت میزان زنده‌مانی سلولی گزارش شد که طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{جذب نوری شاهد} \times 100$$

## تیمار سلولی

به منظور بررسی تاثیر استفاده از TSA بر تکثیر ویروس AcMNPV، با استفاده از نتایج آزمایش زنده‌مانی سلول دو غلظت ۱ و ۰/۲۵ مولار در نظر گرفته شدند. پس از شمار سلول‌ها با دستگاه cytation5 (Bio Tek)،  $166 \times 10^4$  سلول در هر خانه‌ی پلیت کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای ریخته شد، به

طوری که کانفلوئنتی سلول‌ها حدود ۷۰ درصد باشد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس، هر یک از غلظت‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. در تیمار اول پس از گذشت یک ساعت، در تیمار دوم پس از گذشت ۵ ساعت و در تیمار سوم به محض اضافه کردن محلول تریکواستاتین، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از ویروس AcMNPV (MOI=5) تیمار شده و در انکوباتور در تاریکی و دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. هر ۲۴ ساعت یکبار تا ۷۲ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی در هر چاهک برداشته شده و برای بررسی تکثیر ویروس در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. هر کدام از تیمارها با سه تکرار انجام شد و گروه شاهد مثبت، سلول‌هایی بودند که تنها با ویروس تیمار شده بودند. از آنجا که ویروس AcMNPV استفاده شده در این مطالعه حامل ژن GFP بود، پس از گذشت ساعت‌های مورد نظر، از پلیت-ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت (Leica DMI 3000B) عکس برداری شد.

## استخراج DNA و qPCR

تکثیر DNA ویروسی در سلول‌های شاهد و آلوده به AcMNPV با استفاده از qPCR تعیین شد. برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی با ۱۰ میکرولیتر محلول Prepman (Applied Biosystems) مخلوط شد و سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از آن، به مدت ۲ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت، روئشین جدا شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد (Gasmi *et al.*, 2015). غلظت DNA اندازه‌گیری شد و برای هر qPCR، ۲۰ نانوگرم نمونه DNA استفاده شد. سپس، از پرایمر اختصاصی ژن DNA polymerase AcMNPV استفاده و با مقایسه مقادیر Ct به دست آمده در برابر منحنی استاندارد، غلظت ویروس مشخص شد.

1. Trichostatin A

2. Confluency

3. ELISA reader

## استخراج RNA و qPCR

به منظور بررسی بیان ژن‌های سیستم ایمنی، در هر کدام از مقاطع زمانی در هر یک از تیمارها، سلول‌های Sf9 از کف فلاسک جدا شدند و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت همراه با سلول در یخچال نگهداری شد. به منظور استخراج RNA از نمونه‌ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر تریزول به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰، رانشین جدا شده و با ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس، پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰، فاز روئین دور ریخته شد و رسوب تشکیل شده با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ شسته شده و رسوب باقی‌مانده در ۲۰ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز حل شده و در فریزر -۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. در نهایت، غلظت RNA توسط اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری شد. دو میکروگرم از RNA کل به عنوان الگو در حجم ۲۰ میکرولیتر برای سنتز cDNA استفاده شد. از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های Ago1، Dicer1، Ago2 و Dicer2 به منظور بررسی بیان ژن‌های نام‌برده به وسیله qPCR استفاده شد (جدول ۱). همچنین، ژن Rpl27 به عنوان ژن رفرنس در نظر گرفته شد.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه آماری داده‌ها از روش تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) توسط نرم‌افزار Graphpad prism 6 استفاده شد. طراحی نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 6 انجام شد.

## نتایج

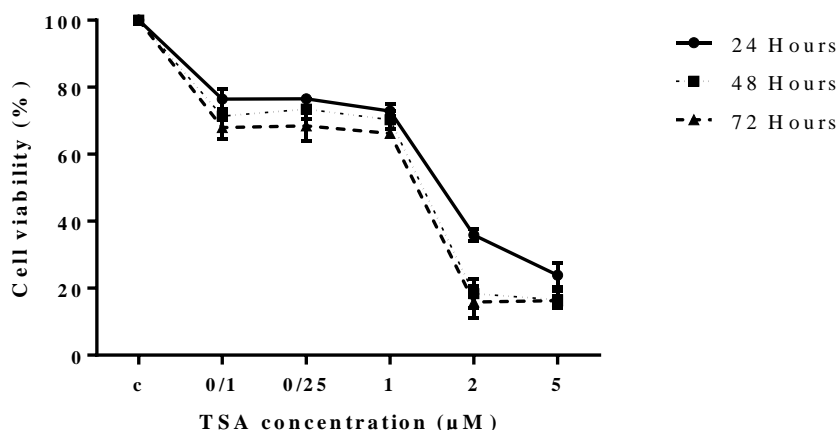
## تأثیر استفاده از تریکواستاتین بر زنده‌مانی سلول Sf9

درصد زنده‌مانی سلول با استفاده از کیت MTT به صورت وابسته به زمان و وابسته به دوز کاهش قابل توجه داشت. دو غلظت ۲ و ۵ میکرومولار پس از گذشت زمان منجر به کاهش شدید درصد زنده‌مانی شد (کمتر از ۵۰ درصد). درصد زنده‌مانی سه دوز ۱، ۰/۲۵ و ۰/۱ میکرومولار نیز با گذشت زمان نسبت به شاهد کاهش یافت، اما از آنجا که زنده‌مانی سلول‌ها پس از استفاده از دو غلظت ۱ و ۰/۲۵ میکرومولار، بیش از ۵۰ درصد بود و تأثیر مشابهی بر کاهش زنده‌مانی داشت، از این‌رو این دو غلظت به عنوان دوز تأثیر-گذار برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شدند (شکل ۱).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Primers used in this study

| Primer                | Fwd./Rev.    | Primer sequence                               | References                          |
|-----------------------|--------------|---|-------------------------------------|
| Sf_Ago2_qPCR          | Fwd.<br>Rev. | CCAAGCGATAAAAGGCACGG<br>AGACACGGATCGCATACACC  | Karamipour <i>et al.</i> (2018)     |
| Sf_Dcr2_qPCR          | Fwd.<br>Rev. | AAAAGTGTACGAGGCCGGAG<br>TGCTTGCTGCCTGGATAAG   | Karamipour <i>et al.</i> (2018)     |
| Sf_RPL27_qPCR         | Fwd.<br>Rev. | GAAGCCAGGTAAAGTGGTGCT<br>GTGTCCGTAGGGCTTGCTG  | Karamipour <i>et al.</i> (2018)     |
| Sf_Dcr1_qPCR          | Fwd.<br>Rev. | AGGAGGTTTCATGCGTTTCGT<br>TGTGGGTACCGTCTTCGTTG | This study                          |
| Sf_Ago1_qPCR          | Fwd.<br>Rev. | TTGATGTTTCTGCAACCGCC<br>TGCGAGTCTGTCAATGGCTT  | This study                          |
| AcMNPV_DNA polymerase | Fwd.<br>Rev. | GGGTCAGGCTCCTCTTTGC<br>TTACGCAGCCATCACAAACAC  | Pazmiño-Ibarra <i>et al.</i> (2019) |



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف TSA بر زنده‌مانی سلول Sf9 در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT  
Figure 1. Effect of different concentrations of TSA on Sf9 cell survival rate at 24, 48, and 72 hours using MTT method

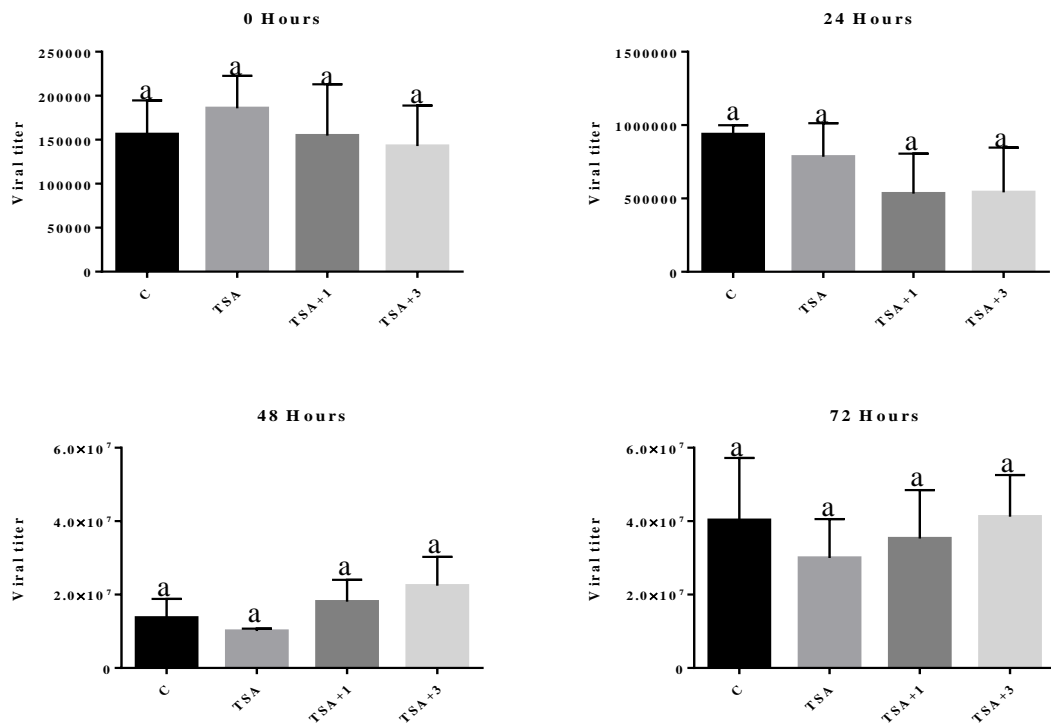
(شکل ۳) ( $P > 0.05$ ). تصاویر تهیه شده به وسیله میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که با افزایش غلظت، تغییر محسوسی در تعداد سلول‌های بیان‌کننده ژن GFP (GFP+) دیده نشد (شکل ۴).

#### تأثیر استفاده از تریکواستاتین بر ژن‌های سیستم ایمنی

نتایج نشان داد که بیان ژن‌های اصلی مسیر ایمنی ضد-ویروسی miRNA (Dicer1 و Ago1) و مسیر siRNA (Dicer2 و Ago2) در سلول‌های Sf9 پس از استفاده از غلظت ۱ و ۰/۲۵ میکرومولار تریکواستاتین نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ) (شکل ۵). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن‌های نام‌برده به وسیله آزمون توکی نشان داد که هر دو غلظت تریکواستاتین با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۵).

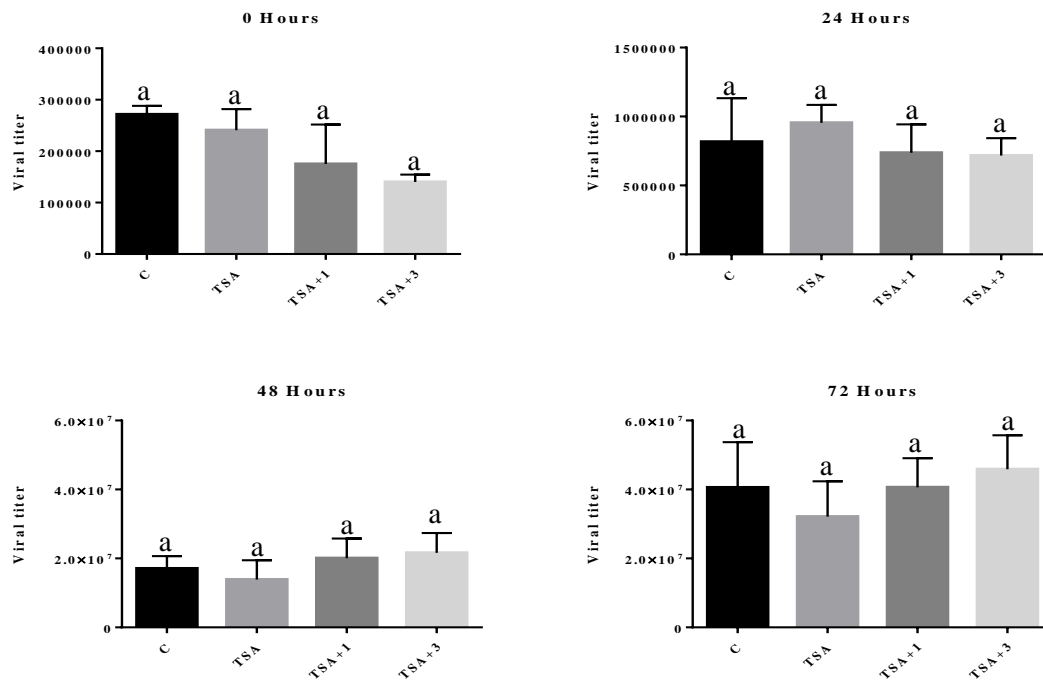
#### تأثیر استفاده از تریکواستاتین بر تکثیر ویروس AcMNPV

نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف تریکواستاتین تفاوت معنی‌داری در تکثیر ویروس AcMNPV در مقایسه با تیمار شاهد به وجود نیاورد. همچنین، تأثیر زمان استفاده از تریکواستاتین، پیش از آلوده-سازی سلول‌ها با ویروس تأثیر معنی‌داری بر تکثیر ویروس نشان نداد؛ به طوری که تکثیر ویروس در تیمارهایی که یک یا سه ساعت پیش از آلوده‌سازی با ویروس یا همزمان با آن در معرض غلظت ۰/۲۵ میکرومولار تریکواستاتین قرار گرفته بودند، در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ) (شکل ۲). همچنین، تفاوت معنی‌داری در میزان تکثیر ویروس در سلول‌هایی که یک یا سه ساعت پیش از آلوده‌سازی با ویروس یا همزمان با آن در معرض غلظت ۱ میکرومولار تریکواستاتین قرار گرفته بودند، مشاهده نشد.



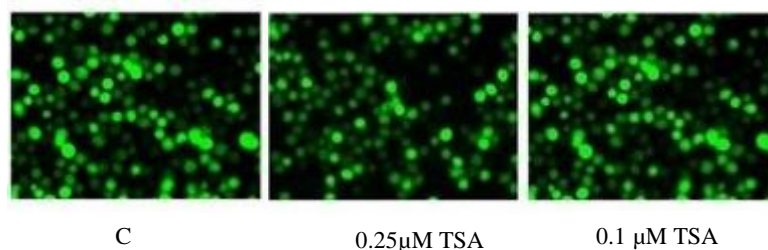
شکل ۲- تکثیر ویروس پس از قرار گرفتن سلول ها در معرض غلظت ۰/۲۵ میکرومولار از TSA. C: سلول هایی که تنها به وسیله AcMNPV آلوده شدند، TSA: سلول هایی که در معرض غلظت ۰/۲۵ میکرومولار تریکوآستاتین همزمان با ویروس قرار گرفتند، TSA+1: سلول هایی که در معرض غلظت ۰/۲۵ میکرومولار تریکوآستاتین یک ساعت پیش از آلودگی با ویروس قرار گرفتند، TSA+3: سلول هایی که در معرض غلظت ۰/۲۵ میکرومولار تریکوآستاتین سه ساعت پیش از آلودگی با ویروس قرار گرفتند. نتایج با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (one way- ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

Figure 2. Replication of the virus after exposure of cells to 0.25  $\mu$ M of TSA. C: Cells infected with ACMNPV, TSA: Cells exposed to 0.25  $\mu$ M trichostatin at the same time with the virus, TSA + 1: Cells exposed to 0.25  $\mu$ M Trichostatin one hour before virus infection, TSA + 3: Cells were exposed to 0.25  $\mu$ M Trichostatin three hours prior to virus infection. The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons.



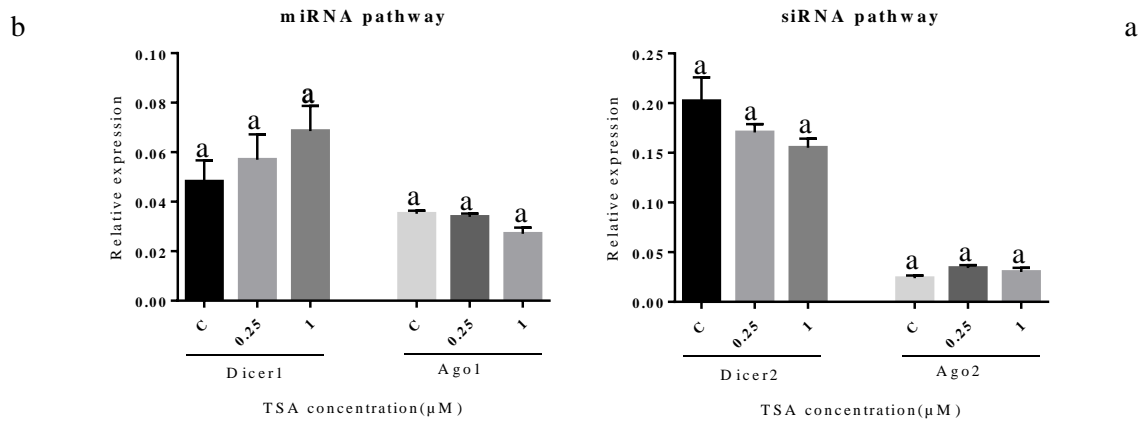
شکل ۳- تکثیر ویروس پس از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض غلظت ۱ میکرومولار TSA. C: سلول‌هایی که تنها به وسیله AcMNPV آلوده شدند، TSA: سلول‌هایی که در معرض غلظت ۱ میکرومولار TSA همزمان با ویروس قرار گرفتند، TSA+1: سلول‌هایی که در معرض غلظت ۱ میکرومولار TSA یک ساعت پیش از آلودگی با ویروس قرار گرفتند، TSA+3: سلول‌هایی که در معرض غلظت ۱ میکرومولار TSA سه ساعت پیش از آلودگی با ویروس قرار گرفتند. نتایج با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (one way- ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

Figure 3. Replication of the virus after exposure of cells to 1  $\mu$ M of TSA. C: Cells infected with ACMNPV, TSA: Cells exposed to 1  $\mu$ M trichostatin at the same time with the virus, TSA + 1: Cells exposed to 1  $\mu$ M Trichostatin one hour before virus infection, TSA + 3: cells were exposed to 1  $\mu$ M Trichostatin three hours prior to virus infection. The results were analyzed using one-way analysis of



شکل ۴- تصویر میکروسکوپی سلول‌های SF9 بیان‌کننده GFP  
Figure 4. Microscopic image of SF9 cells expressing GFP





شکل ۵- بیان ژن‌های سیستم ایمنی ضد ویروسی (a) siRNA و (b) miRNA پس از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض غلظت‌های ۱ و ۰/۲۵ میکرومولار تریکواستاتین. نتایج با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (one way-ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

Figure 5. Expression of the antiviral immune system genes siRNA (a) and miRNA (b) after exposure of cells to 1 and 0.25 μM of trichostatin. The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons.

## بحث

ترانسفرآزهای هیستون و دی استیلازهای هیستونی کاتالیز می‌شوند. مهار هیستون داستیلازها توسط مهارکننده‌های هیستون داستیلاز می‌تواند منجر به فعالیت بیشتر هیستون‌ها شود که به دنبال آن، فعال‌سازی رونویسی ژن‌های خاصی را افزایش دهد. در بررسی‌های انجام شده، انواع مختلفی از مهارکننده‌های هیستون داستیلاز<sup>۱</sup> از ساختارهای پیچیده با منشأ باکتریایی یا قارچی (تریکواستاتین) تا ساختارهای بسیار ساده مانند سدیم بوتیرات معرفی شده است (Dokmanovic and Marks, 2005).

در این مطالعه، به بررسی تاثیر تریکواستاتین بر تکثیر ویروس AcMNPV پرداخته شد. نتایج نشان داد که استفاده از این ترکیب نمی‌تواند تاثیری در تکثیر ویروس در سلول‌های Sf9 داشته باشد. این نتایج مطابق با نتایج پنگ و همکاران (Peng *et al.*, 2007) می‌باشد. این پژوهشگران نشان دادند که مهارکننده استیل بوتیرات بر تیتروسی ACMNPV در سلول‌های Sf9 تاثیر ندارد. همانطور که بررسی‌ها نشان داده است برخی مهارکننده‌های هیستون داستیلاز می‌توانند بیان ژن‌های خارجی که توسط وکتورهای

بررسی‌ها نشان داده‌اند که روابط متقابل میزبان و عوامل بیمارگر بسیار پویا هستند. پاسخ ایمنی میزبان به عوامل بیمارگر به وسیله فرآیندهای مختلف تنظیم می‌شود. از طرفی عوامل بیماری‌زا نیز به طور مداوم در حال تکامل راهکارهایی برای سرکوب یا فرار از پاسخ ایمنی میزبان هستند. سازوکارهای اپی ژنتیکی از جمله تغییرات هیستونی می‌تواند بیان ژن‌ها را تغییر دهد که به عنوان وسیله‌ی دفاعی توسط میزبان و بیمارگر مورد استفاده قرار گیرد (Baradaran *et al.*, 2019). ساختار کروماتین در شرایط گوناگون و در پاسخ به سیگنال‌هایی که دریافت می‌کند، متغیر است. از عوامل تغییردهنده کروماتین که در فرآیند تنظیم بیان ژن‌ها موثر است، می‌توان به تغییرات استیلاسیون دم هیستونی اشاره نمود (Kuo and Allis, 1998). استیلاسیون هیستون‌ها فرآیندی اپی ژنتیکی است که کروماتین را باز و رونویسی را فعال می‌کند؛ در حالی که داستیلاسیون هیستون‌ها توسط هیستون داستیلازها با ایجاد کروماتین متراکم، رونویسی ژن‌ها را سرکوب می‌کند که این فرآیندها به ترتیب توسط استیل

<sup>1</sup>. HDACis

کرده که نقش مهمی در تکثیر ویروس در سلول‌های آلوده دارند و می‌توانند این سلول‌ها را حتی در شرایط خارج از چرخه سلولی طبیعی مجبور به تکثیر DNA کنند. ژنوم AcMNPV همچنین چندین پروتئین اولیه را کد می‌کند که در سنتز DNA دخیل هستند، مانند DNA پلیمرز و هلیکاز (Ayres *et al.*, 1994). این پروتئین‌ها قادر به غلبه بر آنچه که در چرخه سلولی میزبان اتفاق می‌افتد، هستند؛ بنابراین، حتی در شرایطی که چرخه سلولی در مراحل G1 و S متوقف شده باشد، DNA باکولوویروس تکثیر می‌شود (Peng *et al.*, 2007).

همچنین، نتایج این پژوهش نشان داد که تریکواستاتین در تنظیم بیان ژن‌های سیستم ایمنی ضد ویروسی نقشی ایفا نمی‌کند. همانطور که پژوهش‌های نویسنزن و هورواث (Nusinzon and Horvath, 2006) نشان داده است، تریکواستاتین در تنظیم فاکتورهای رونویسی NF-κB در مسیرهای ایمنی ضد ویروسی نقشی ایفا نمی‌کند؛ در نتیجه، به نظر می‌رسد که سازوکارهای اپی‌ژنتیک تأثیری در تنظیم ژن‌های دخیل در مسیرهای miRNA و siRNA ندارند. نتیجه‌گیری کلی از داده‌های موجود حاکی از آن است که سازوکار اپی‌ژنتیکی د استیلاسیون هیستون‌ها تأثیری در تکثیر ویروس AcMNPV ندارد؛ همچنین، سیستم ایمنی ضد ویروسی در سلول‌های Sf9 تحت تأثیر این سازوکار قرار نمی‌گیرد.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، INSF (شماره گرنت: ۹۸۰۰۲۷۷۰) انجام شده است که به این جهت نگارندگان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

ویروسی مختلف از جمله آدنو ویروس<sup>۱</sup> و رترو ویروس<sup>۲</sup> به سلول‌های پستانداران منتقل می‌شوند را افزایش دهند (Gaetano *et al.*, 2000)، ولی از آنجا که نحوه تأثیر مهارکننده‌های مختلف متفاوت است، اثر متفاوتی نیز در پاسخ سلول دیده می‌شود. در مطالعه انجام شده پنگ و همکاران (Peng *et al.*, 2007) نشان داده شد که استفاده از استیل بوتیرات به عنوان مهارکننده هیستون د استیلاز می‌تواند انتقال ژن‌های بیرونی را به میزبان پستاندار به وسیله ویروس AcMNPV افزایش دهد؛ در صورتی که استفاده از تریکو استاتین تفاوت معنی‌داری در انتقال ژن‌های خارجی ندارد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد بیماری‌زایی ویروس AcMNPV مرتبط با چرخه سلولی بوده و چرخه سلولی را در فاز G2/M متوقف می‌کند (Bagga and Bouchard, 2014)؛ از این رو برخی مهارکننده‌های هیستون د استیلاز مانند استیل بوتیرات که در چرخه سلولی، تکثیر و تمایز سلولی منجر به اختلال می‌شوند، می‌توانند تکثیر این ویروس را تحت تأثیر خود درآوردند، درحالی که برخی دیگر مانند تریکواستاتین که تأثیری در سیکل سلولی ندارند، تأثیری در تکثیر این ویروس ندارند (Peng *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). از طرفی بیان شده است که توقف چرخه سلولی به وسیله برخی مهارکننده‌های هیستون د استیلاز مانند سدیم بوتیرات می‌تواند تکثیر ویروس‌های کوچک مانند پاپیلوماویروس<sup>۳</sup> و پلی‌ماویروس‌ها را تحت کنترل خود درآورد، اما تکثیر ویروس‌های بزرگتر تحت تأثیر این ترکیبات قرار نمی‌گیرند؛ در حالی که بررسی‌ها نشان داده است که برخی دیگر از مهارکننده‌ها در تکثیر باکولوویروس تغییری ایجاد نمی‌کنند، زیرا این خانواده از ویروس‌های DNA دار ژنوم بزرگی دارند که پروتئین‌های اولیه‌ای تولید

1. Adenovirus

2. Retrovirus

3. Papilloma Virus

4. Polyomavirus

## References

- Asgari, S.** 2013. MicroRNA functions in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43(4): 388-397.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. and Possee, R. D.** 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology** 202(2): 586-605.
- Baradaran, E., Moharrampour, S., Asgari, S. and Mehrabadi, M.** 2019. Induction of DNA methyltransferase genes in *Helicoverpa armigera* following injection of pathogenic bacteria modulates expression of antimicrobial peptides and affects bacterial proliferation. **Journal of Insect Physiology** 118: 103939.
- Bagga, S. and Bouchard, M. J.** 2014. Cell cycle regulation during viral infection. **Cell Cycle Control** 2:165-227.
- Bianchi, F. J., Snoeiijing, I., van der Werf, W., Mans, R. M., Smits, P. H. and Vlak, J. M.** 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 75(1): 28-35.
- De Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G. and Posas, F.** 2004. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes. **Nature** 427(6972): 370-374.
- Dokmanovic, M. and Marks, P. A.** 2005. Prospects: Histone deacetylase inhibitors. **Journal of Cellular Biochemistry** 96(2): 293-304.
- Ehler, L.E.** 2004. An evaluation of some natural enemies of *Spodoptera exigua* on sugarbeet in northern California. **BioControl** 49(2): 121-135.
- Gasmi, L., Boulain, H., Gauthier, J., Hua-Van, A., Musset, K., Jakubowska, A. K., Aury, J. M., Volkoff, A. N., Huguet, E., Herrero, S. and Drezén, J. M.** 2015. Recurrent domestication by Lepidoptera of genes from their parasites mediated by bracoviruses. **PLoS Genetics** 11(9): e1005470.
- Gaetano, C., Catalano, A., Palumbo, R., Illi, B., Orlando, G., Ventrizzo, G., Serino, F. and Capogrossi, M. C.** 2000. Transcriptionally active drugs improve adenovirus vector performance in vitro and in vivo. **Gene Therapy** 7(19): 1624-1630.
- Glatz, R., Schmidt, O. and Asgari, S.** 2003. Characterization of a novel protein with homology to C-type lectins expressed by the *Cotesia rubecula* bracovirus in larvae of the lepidopteran host, *Pieris rapae*. **Journal of Biological Chemistry** 278(22): 19743-19750.
- Gegner, J., Baudach, A., Mukherjee, K., Halitschke, R., Vogel, H. and Vilcinskis, A.** 2019. Epigenetic mechanisms are involved in sex-specific trans-generational immune priming in the lepidopteran model host *Manduca sexta*. **Frontiers in Physiology** 10: 137.
- Guise, A. J., Budayeva, H. G., Diner, B. A. and Cristea, I. M.** 2013. Histone deacetylases in herpesvirus replication and virus-stimulated host defense **Viruses** 5(7): 1607-1632.
- Heitmueller, M., Billion, A., Dobrindt, U., Vilcinskis, A. and Mukherjee, K.** 2017. Epigenetic mechanisms regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like *Escherichia coli* in the surrogate insect model *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity** 85(10): 00336-17.
- Herbein, G. and Wendling, D.** 2010. Histone deacetylases in viral infections. **Clinical Epigenetics** 1(1): 13-24.
- Hřebačková, J., Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Procházková, P., Smutný, S. and Stiborová, M.** 2009. Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells. **Interdisciplinary Toxicology** 2(3): 205.
- Ikeda, M. and Kobayashi, M.** 1999. Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Virology** 258(1): 176-188.
- Karamipour, N., Fathipour, Y., Talebi, A. A., Asgari, S. and Mehrabadi, M.** 2018. Small interfering RNA pathway contributes to antiviral immunity in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells following

- Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 101: 24-31.
- Kimbrell, D.A. and Beutler, B.** 2001. The evolution and genetics of innate immunity. **Nature Reviews Genetics** 2(4): 256-267.
- Mehrabadi, M., Hussain, M. and Asgari, S.** 2013. MicroRNAome of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection. **Journal of General Virology** 94(6): 1385-1397.
- Negri, I. and Jablonka, E.** 2016. Epigenetics as a deep intimate dialogue between host and symbionts. **Frontiers in Genetics** 7: 7.
- Nusinzon, I. and Horvath, C. M.** 2006. Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. **Molecular and Cellular Biology** 26(8): 3106-3113.
- Pazmiño-Ibarra, V., Mengual-Martí, A., Targovnik, A. M. and Herrero, S.** 2019. Improvement of baculovirus as protein expression vector and as biopesticide by CRISPR/Cas9 editing. **Biotechnology and Bioengineering** 116(11): 2823-2833.
- Sivapragasam, A. and Syed, A. R.** 2001. The genus *Spodoptera* with emphasis on the ecology and natural enemies of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hubner in Malaysia. **Malaysian Plant Protection Society Newsletter** 12: 6-7.
- Shokrzadeh, M., Ebrahimnejad, P., Omidi, M., Shadboorestan, A. and Zaalzar, Z.** 2012. Cytotoxicity evaluation of docetaxel nanoparticles by culturing HepG2 carcinoma cell lines. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences** 22(90): 2-10. (in Farsi)
- Strand, M. R.** 2008. The insect cellular immune response. **Insect Science** 15(1): 1-14.
- Szewczyk, B., Rabalski, L., Krol, E., Sihler, W. and de Souza, M. L.** 2009. Baculovirus biopesticides-safe alternative to chemical protection of plants. **Journal of Biopesticides** 2(2): 209-216.
- Wu, J., Zhou, Z., Hu, Y. and Dong, S.** 2012. Butyrate-induced GPR41 activation inhibits histone acetylation and cell growth. **Journal of Genetics and Genomics** 39(8): 375-384.



Research paper

## **The Role of the histone deacetylase in the replication of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and the immune response of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9)**

**M. Attarianfar, A. Mikani\* and M. Mehrabadi\***  
Faculty of agriculture, Tarbiat modares university, Tehran, Iran

(Received: July 31, 2021- Accepted: September 19, 2021)

---

### **Abstract**

Epigenetic mechanisms such as histone changes, especially acetylation and deacetylation, play an important role making host-pathogen interactions by regulating gene expression, which is catalyzed by the enzymes histone acetyltransferase and histone deacetylase. Since one of the safe pest control methods is the use of pathogens, investigating the role of these mechanisms in response to insect pathogens plays a vital role in controlling pests. Studies have shown that histone deacetylase inhibitors affect the replication of mammalian pathogenic viruses. Therefore, in this study, the role of trichostatin as a histone deacetylase inhibitor in *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) virus replication and antiviral immune response in Sf9 cells was investigated. For this purpose, the cells were exposed to two concentrations of trichostatin (1 and 0.25  $\mu$ M) one and three hours before or at the same time with viral infection and trichostatin effect on virus replication and some important immune system gene expression were investigated. The results showed that virus replication was not affected using this compound. Moreover, after using concentrations of 1 and 0.25  $\mu$ M trichostatin, the expression level of primary genes of antiviral immune pathways (Ago2 and Dicer2) miRNA and siRNA (Ago1 and Dicer1) did not show significant difference compare with control. In conclusion, the replication of ACMNPV virus and the antiviral immune system in Sf9 cells did not affect by the epigenetic mechanism of histone deacetylation.

**Key words:** Epigenetic, Histone deacetylase, Trichostatin, Antiviral immunity

---

\* Corresponding author: a.mikani@modares.ac.ir & m.mehrabadi@modares.ac.ir