

Respon Tubuh Manusia terhadap Vaksin Influenza

1. Pendahuluan

Influenza merupakan penyakit saluran pernapasan yang disebakan oleh keluarga virus influenza. Kerentanan individu terhadap virus ini bervariasi, dipengaruhi secara kuat oleh faktor genetik inang, salah satunya ekspresi gen-gen yang terlibat dalam respon imun. Pada penelitian oleh Franco et al. (2013) dan Bucasas et.al (2011), dilakukan evaluasi respon imun pada lelaki dewasa terhadap vaksin influenza trivalen dengan pendekatan biologi sistem. Data *Genome-Wide Genotype* (data genomik) digabungkan dengan data respon transkripsional (data transkriptomik) dan humoral (data proteomik dan selular) secara berkala dalam 28 hari pasca vaksinasi. Informasi ini akan digunakan untuk memahami peristiwa molekuler setelah vaksin dan menjad prediktor respons tubuh terhadap vaksin influenza. Pada tugas ini, penulis mempelajari cara mengolah data transkriptomik dari penelitian tersebut dengan eksplorasi pada DEG (*Differentially Expressed Genes*) beserta prediksi respon humoral dengan menggunakan database KEGG dan GO.

2. Metode

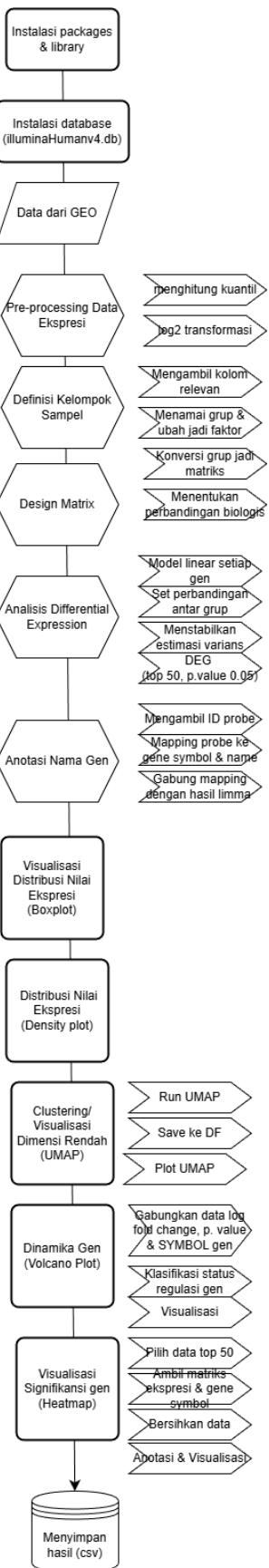
2. 1 Data Transkriptomik

Data yang digunakan dalam analisis ini adalah Series GSE48018, berupa hasil *profiling* ekspresi gen menggunakan *microarray* dari *Whole-blood RNA* yang diambil dari pembuluh darah periferal menggunakan tabung PaxGene. Platform yang digunakan adalah GPL6947 (Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip). Pada series ini tersedia 431 data dari 119 lelaki dewasa sehat berusia 19-41 tahun yang diambil pada hari ke 0 (baseline), hari ke-1, hari ke-3, dan hari ke-14. Data tersedia pada NCBI GEO pada pranala <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE48018>.

2. 2 Metode Eksplorasi DEG

2. 2. 1 Algoritma/ Flowchart Pengolahan Data Menggunakan R

Pada tugas ini, dilakukan pengolahan data menggunakan package Bioconductor pada R. Flowchart program pada R adalah sebagai berikut.



Gambar 1. Flowchart Analisis DEG Menggunakan R

2. 2. 2 Script R

Script R yang digunakan pada tugas ini dapat dilihat pada pranala <https://github.com/mutiahijahadah/omicslogictranscriptomic/blob/main/w3/Latihan%20W3.Rmd>.

2. 3 Analisis Respon Humoral Menggunakan KEGG dan GO

Analisis GO (Gene Ontology) dilakukan menggunakan *platform* Shiny GO (<https://bioinformatics.sdstate.edu/go/>), menyesuaikan dengan protokol GO yang terdapat pada GitHub Kelas OmicsLogic ([https://github.com/OmicsLite/BRSPTranscriptomics/blob/main/1.%20Acuan%20Tambahan/Step-by-Step%20Modul%201_Praktikum%20Bioinformatika%20Aplikasi%20Gene%20Ontology%20\(GO\)%20dan%20KEGG%20Pathway.PDF](https://github.com/OmicsLite/BRSPTranscriptomics/blob/main/1.%20Acuan%20Tambahan/Step-by-Step%20Modul%201_Praktikum%20Bioinformatika%20Aplikasi%20Gene%20Ontology%20(GO)%20dan%20KEGG%20Pathway.PDF)) yaitu menganalisis gen *upregulated* dan *downregulated* secara terpisah. Data yang penulis gunakan adalah dataframe dasar volcano plot (volcano_plot) dalam bentuk CSV, lalu nama-nama gen difilter berdasarkan “UP” (*upregulated*), “DOWN” (*downregulated*), dan “NO”. List nama gen di-*copy* lalu di paste pada kolom gen. Parameter yang digunakan adalah 0.05 FDR cutoff dan jumlah pathway yang ditampilkan adalah 20.

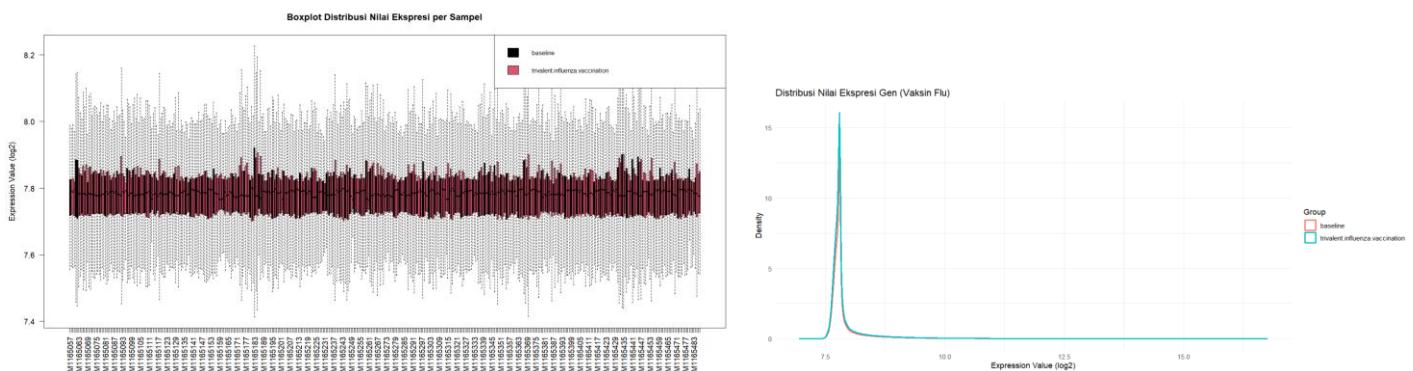
Analisis KEGG dilakukan menggunakan Shiny GO dan KEGG Mapper. Pada KEGG Mapper, file “Hasil GSE...” diunggah lalu pathway terdampak didata.

3. Hasil dan Interpretasi

3. 1. Dinamika Gen Pasca Vaksinasi

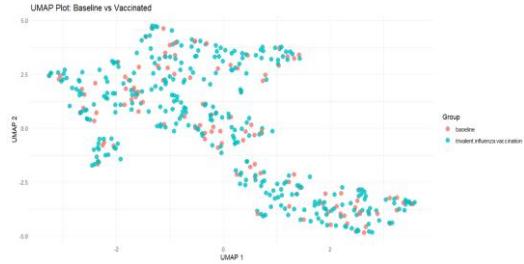
3.1.1 *Upregulation* dan *Downregulation*

Sebelum melakukan analisis dinamika menggunakan volcano plot, distribusi nilai ekspresi per sampel divisualisasikan menggunakan boxplot. Dapat dilihat pada **Gambar 2**, distribusi data per sampel terlihat hampir normal dan merata. Pada density plot di bawah, terlihat bahwa nilai ekspresi gen sebagian besar berada pada di antara log2 7.5 hingga 8.1-8.2.

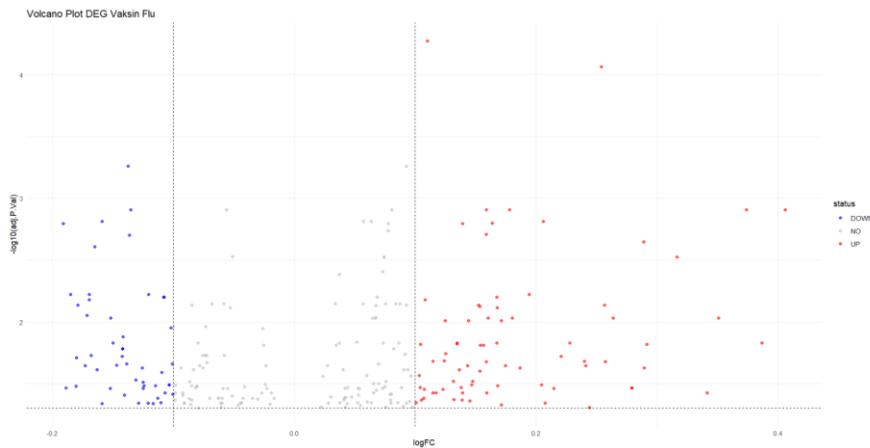


Gambar 2. Boxplot Nilai Distribusi Data per Sampel (kiri), Density Plot Sebaran Data Ekspresi (kanan)

Distribusi cluster ekspresi (**Gambar 3**) pada kelompok baseline dan perlakuan juga terlihat tidak jauh berbeda, masing-masing kelompok berada pada cluster yang sama. Setelah UMAP, analisis dilanjutkan dengan volcano plot.



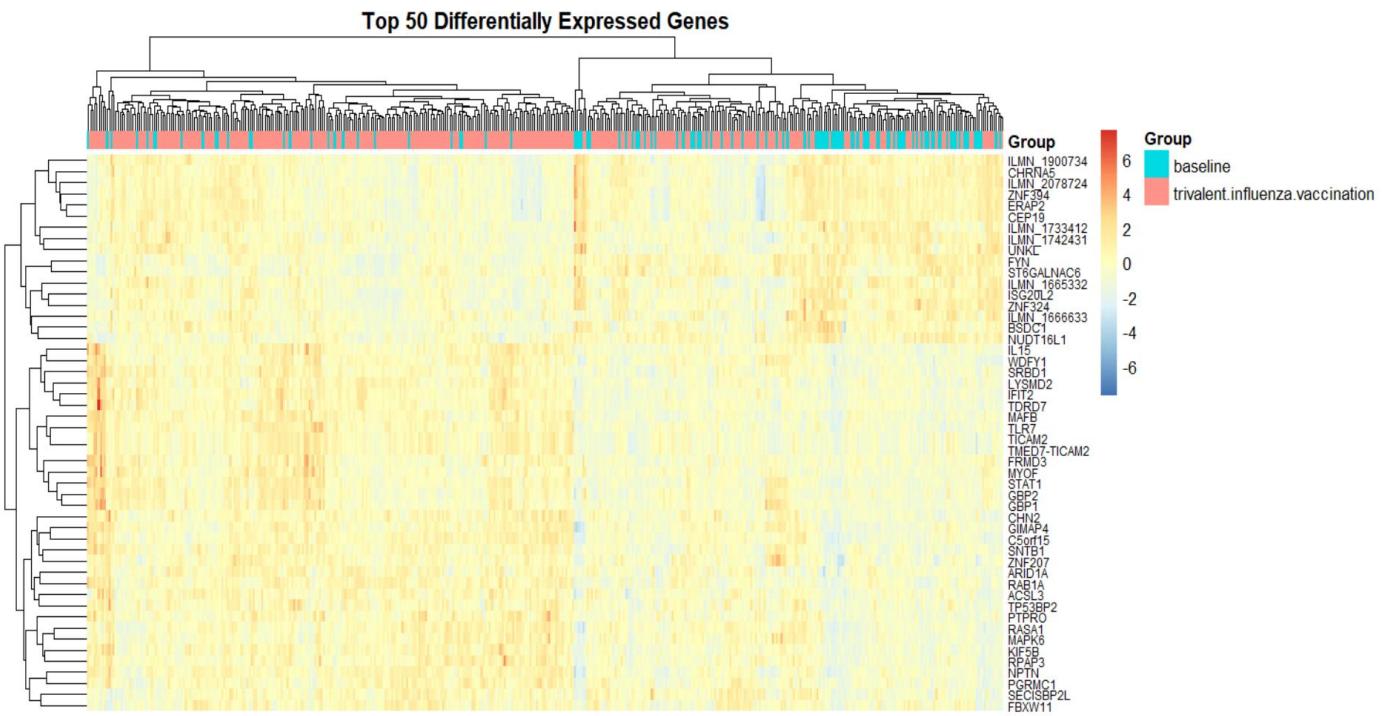
Gambar 3. UMAP Data Ekspresi Kelompok Baseline VS Tervaksinasi



Gambar 4. Volcano Plot DEG (250 Gen Teratas) Pasca Vaksinasi

Pada 250 gen teratas yang terdata pada volcano plot **Gambar 4**, terdapat 77 gen *upregulated*, 40 gen *downregulated*, dan 133 gen tidak mengalami perubahan ekspresi (Hasil detail: https://github.com/mutiahjihadah/omicslogictranscriptomic/blob/main/w3/volcano_data_2.csv). Contoh gen yang mengalami *upregulation* adalah PRDM1, ANKRD12, EFR3A, E2F3, dan OAS2. Sedangkan contoh gen yang mengalami *downregulation* adalah SEPTIN6, FAM53B, TBC1D10C, RFLNB, dan NLRP12. Signifikansi kelompok-kelompok gen tersebut akan dipelajari pada analisis GO dan KEGG.

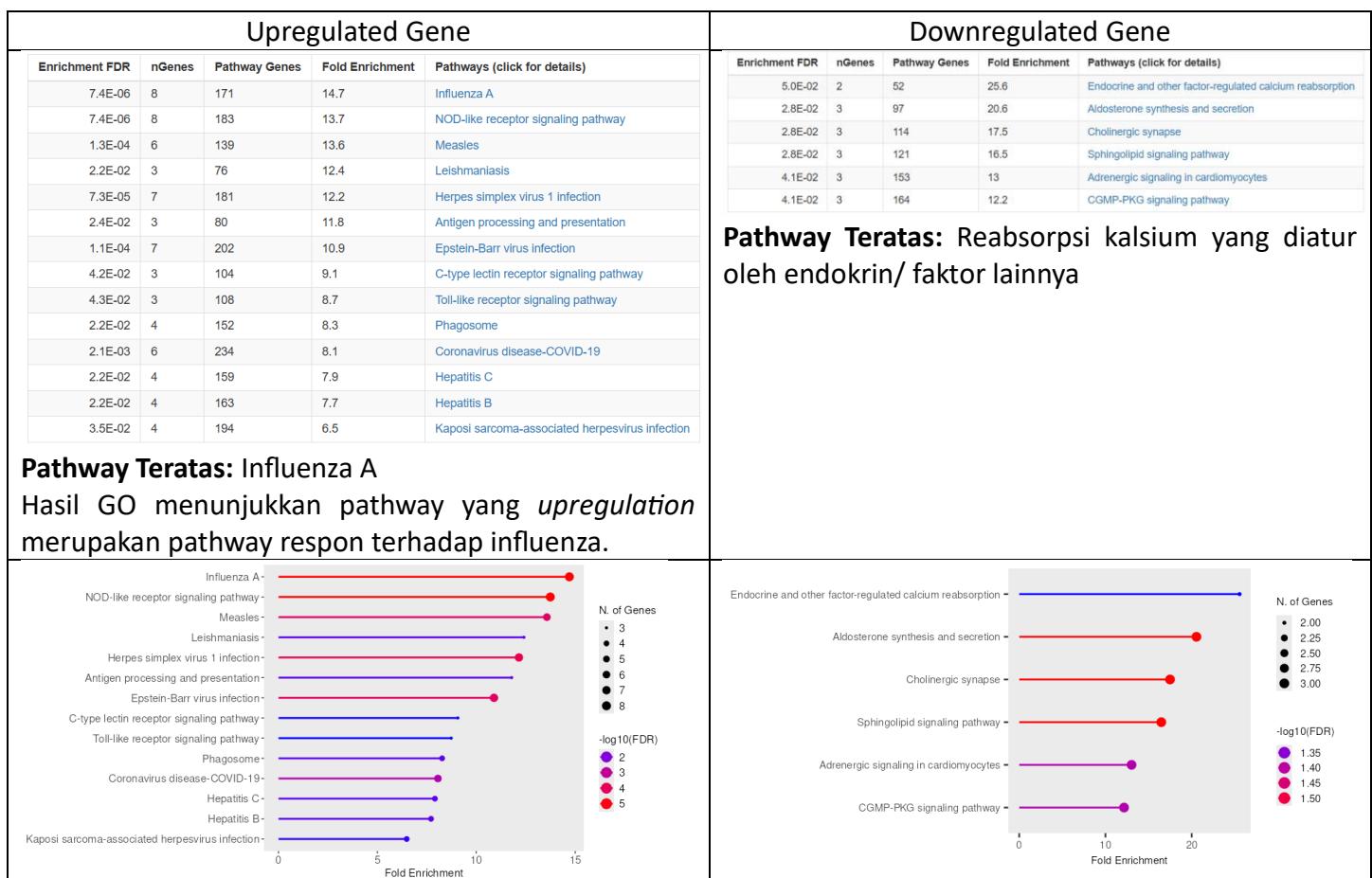
3.1.2 Heatmap dari 50 Differentially Expressed Genes (DEG) Pasca Vaksinasi



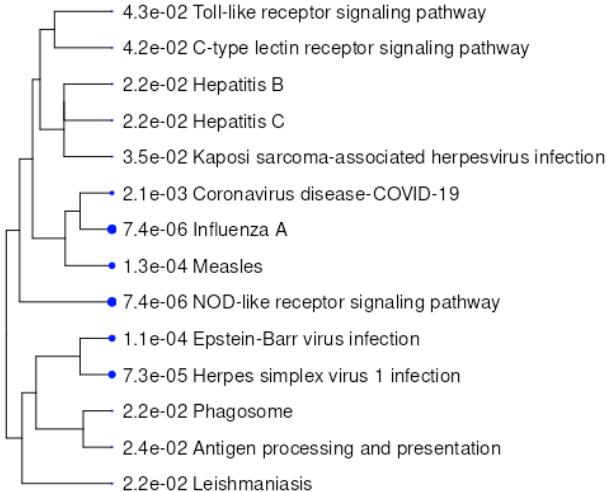
Gambar 5. Heatmap 50 DEG Teratas

Heatmap pada **Gambar 5** menunjukkan dinamika ekspresi 50 gen teratas pasca vaksinasi.

3. 2. Analisis Respon Humoral Menggunakan KEGG dan GO

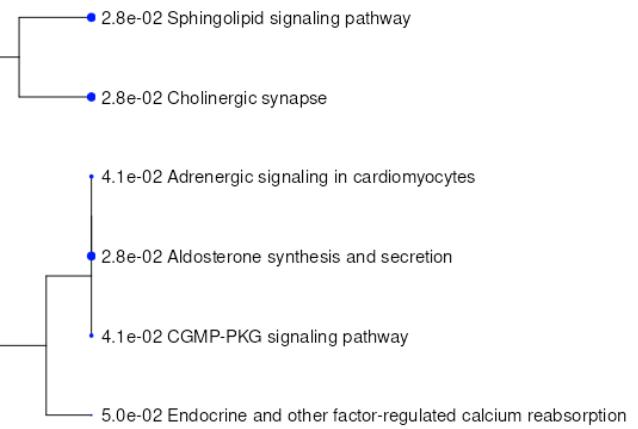


Lollipop Chart: Terdapat sekitar 8 gen dengan fold enrichment mencapai 5 pada pathway influenza A yang *upregulating*.

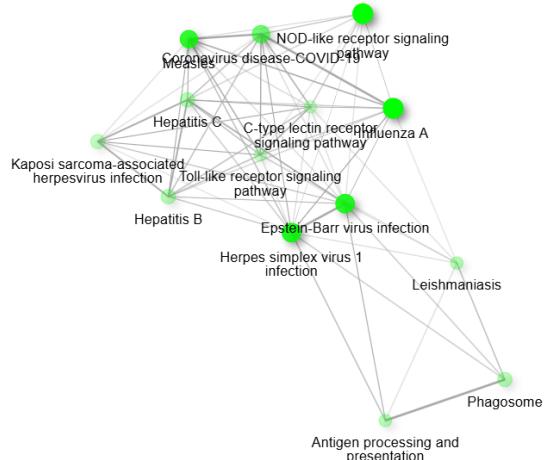


Tree. Pathway teratas merupakan pathway yang berkaitan dengan infeksi, terutama Influenza A dan NOD-like receptor signaling pathway. Terlihat bahwa pathway influenza A dan COVID-19 berkaitan cukup dekat.

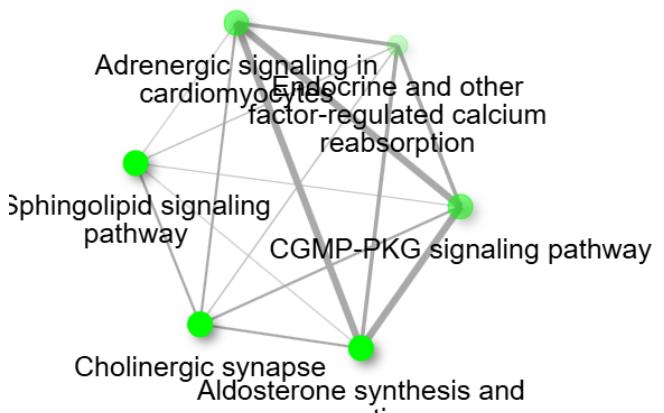
Lollipop Chart: Terdapat sekitar 2 gen pada pathway influenza A yang *downregulating*.



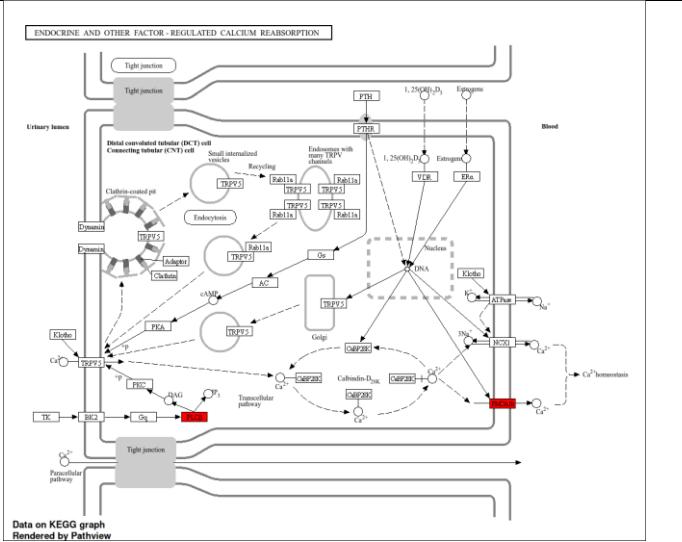
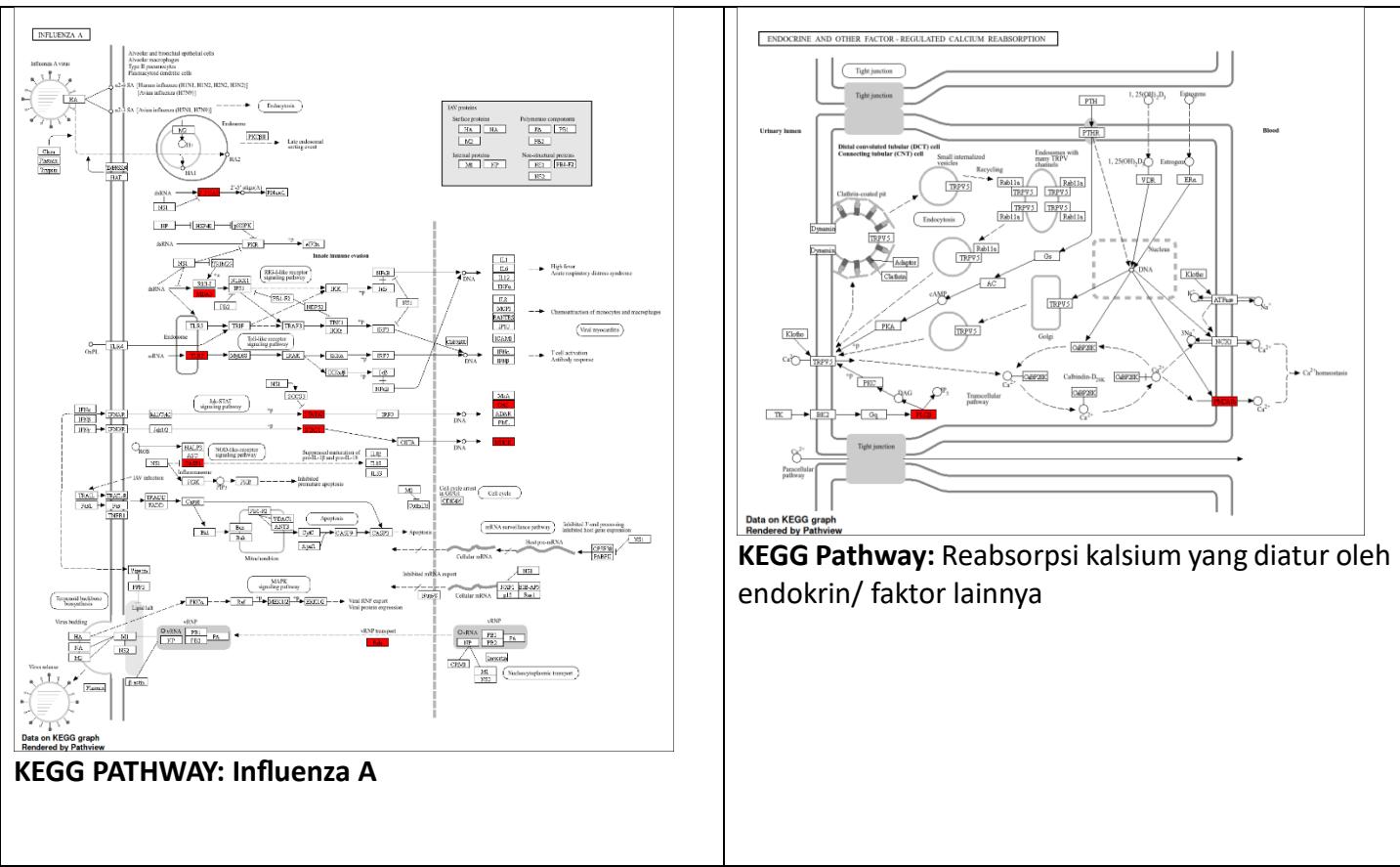
Tree. Pathway teratas berkaitan dengan regulasi kalsium dan pengaturan signaling sphingolipid dan sinaps kolinergik.



Network. Hubungan antar pathway terkait



Network. Hubungan antar pathway terkait



Berikut merupakan daftar dari pathway KEGG yang teridentifikasi dari 250 top DEG berdasarkan KEGG Mapper. Terlihat bahwa Terdapat pathway-pathway yang berkaitan dengan reaksi imun terhadap infeksi dan pathway metabolismik normal.

hsa01100 Metabolic pathways (8)

hsa:10 K00622 NAT2; N-acetyltransferase 2
 hsa:15 K00669 AANAT; aralkylamine N-acetyltransferase
 hsa:38 K00626 ACAT1; acetyl-CoA acetyltransferase 1
 hsa:53 K14410 ACP2; acid phosphatase 2, lysosomal
 hsa:54 K14379 ACPS; acid phosphatase 5, tartrate resistant
 hsa:549 K05607 AUH; AU RNA binding methylglutaconyl-CoA hydratase
 hsa:84444 K11427 DOT1L; DOT1 like histone lysine methyltransferase
 hsa:9 K00622 NAT1; N-acetyltransferase 1

hsa04550 Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (3)

hsa:207 K04456 AKT1; AKT serine/threonine kinase 1
 hsa:324 K02085 APC; APC regulator of Wnt signaling pathway
 hsa:90 K04675 ACVR1; activin A receptor type 1

hsa02010 ABC transporters (3)

hsa:19 K05641 ABCA1; ATP binding cassette subfamily A member 1
 hsa:20 K05642 ABCA2; ATP binding cassette subfamily A member 2
 hsa:22 K05662 ABCB7; ATP binding cassette subfamily B member 7

hsa04142 Lysosome (3)

hsa:20 K05642 ABCA2; ATP binding cassette subfamily A member 2
 hsa:53 K14410 ACP2; acid phosphatase 2, lysosomal
 hsa:54 K14379 ACPS; acid phosphatase 5, tartrate resistant

hsa05200 Pathways in cancer (2)

hsa:207 K04456 AKT1; AKT serine/threonine kinase 1
 hsa:324 K02085 APC; APC regulator of Wnt signaling pathway

hsa00740 Riboflavin metabolism (2)

hsa:53 K14410 ACP2; acid phosphatase 2, lysosomal
 hsa:54 K14379 ACPS; acid phosphatase 5, tartrate resistant

hsa05417 Lipid and atherosclerosis (2)

hsa:19 K05641 ABCA1; ATP binding cassette subfamily A member 1
 hsa:207 K04456 AKT1; AKT serine/threonine kinase 1

hsa05204 Chemical carcinogenesis - DNA adducts (2)

hsa:10 K00622 NAT2; N-acetyltransferase 2
 hsa:9 K00622 NAT1; N-acetyltransferase 1

4. Kesimpulan

Pasca vaksinasi, respon imun terhadap influenza A teraktivasi, menunjukkan bahwa vaksin secara ampuh memancing respon imun terhadap infeksi virus influenza.

Referensi:

Franco LM, Bucatas KL, Wells JM, Niño D et al. Integrative genomic analysis of the human immune response to influenza vaccination. *Elife* 2013 Jul 16;2:e00299. PMID: 23878721

Bucatas KL, Franco LM, Shaw CA, Bray MS et al. Early patterns of gene expression correlate with the humoral immune response to influenza vaccination in humans. *J Infect Dis* 2011 Apr 1;203(7):921-9. PMID: 21357945