

Week 3- Differentially Expression Genes (DEGs) using R

Rhizna Juniarti

Transcriptome of human monocyte-derived macrophages infected with live-*Mycobacterium leprae*

Pendahuluan

Kusta merupakan penyakit infeksi kronis yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium leprae*. Sejauh ini, studi mengenai transkriptomik inang dalam kasus kusta lebih banyak difokuskan pada sel Schwann serta biopsi jaringan kulit. Meskipun makrofag merupakan tipe sel yang paling dominan terinfeksi pada lesi kusta, data transkriptomik berskala genomik yang menggunakan model makrofag manusia masih sangat terbatas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi perubahan transkriptional pada makrofag turunan monosit (*Monocyte-Derived Macrophages*/MDMs) manusia yang dipicu oleh infeksi *live-M. leprae* (strain Thai-53) selama 48 jam dengan *Multiplicity of Infection* (MOI) 10:1. Melalui dataset GSE162416 yang diakses dari platform Microarray Illumina, analisis ini difokuskan untuk menemukan gen yang terekspresi secara diferensial (*Significantly Differentially Expressed Genes/DEGs*) serta memahami keterkaitannya dengan fungsi biologis melalui *Gene Ontology* (GO) dan jalur metabolisme melalui *KEGG Pathway*.

Informasi dataset

ID Akses	GSE162416
Organism	Homo sapiens
Experiment type	Expression profiling by array
Contributor(s)	Leal-Calvo T, Martins BL, Bertoluci DF, Rosa PS, de Camargo RM, Germano GV, de Souza VN, Latini AC, Moraes MO
Citation(s)	Leal-Calvo T, Martins BL, Bertoluci DF, Rosa PS et al. Large-Scale Gene Expression Signatures Reveal a Microbicidal Pattern of Activation in <i>Mycobacterium leprae</i> -Infected Monocyte-Derived Macrophages with Low Multiplicity of Infection. <i>Front Immunol</i> , 2021;12:647832. PMID: 33936067
Platforms (1)	GPL10558 Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip

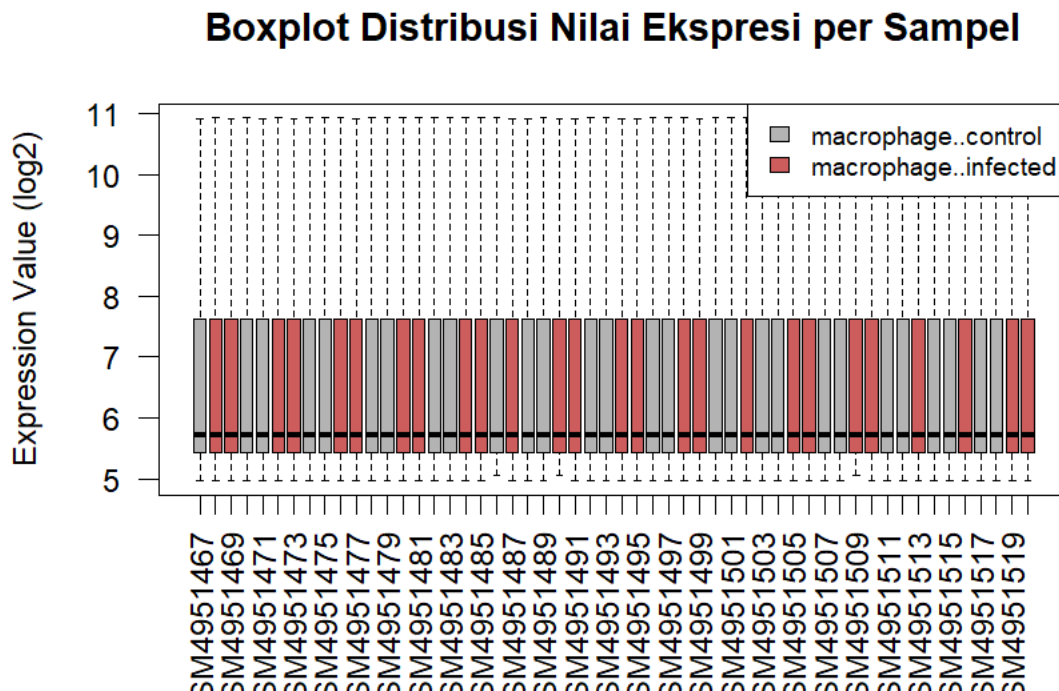
Metode dan Alur Kerja

Analisis data transkriptomik ini seluruhnya dijalankan menggunakan bahasa pemrograman R versi 4.5.2 dengan memanfaatkan ekosistem paket bioinformatika dari Bioconductor. Seluruh tahapan pengolahan data, mulai dari pengambilan data mentah hingga pengujian statistik, dilakukan secara otomatis menggunakan integrasi berbagai *library* khusus. Adapun alur pengerjaan analisis adalah sebagai berikut:



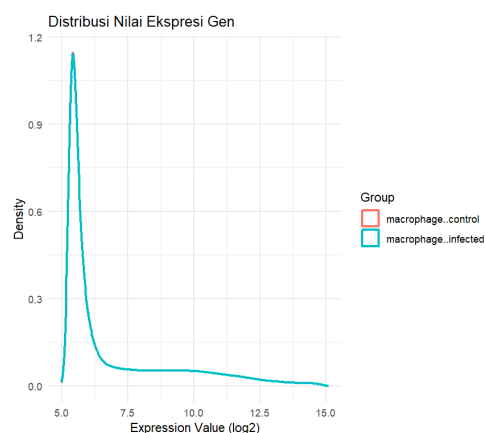
Hasil dan Interpretasi

Berdasarkan visualisasi boxplot, data kelompok kontrol (abu-abu) dan terinfeksi (merah) telah ternormalisasi dengan baik dan layak untuk dianalisis, terlihat dari garis median seluruh sampel yang sejajar pada level yang sama (Gambar 1).



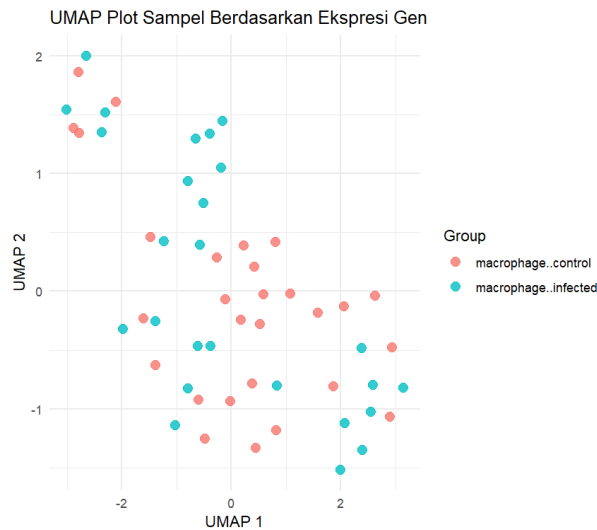
Gambar 1. Box Plot sampel Makrofag Normal dan Makrofag terinfeksi *M. leprae*.

Grafik density plot menunjukkan kurva distribusi nilai ekspresi yang saling berhimpit secara sempurna antara kelompok kontrol dan terinfeksi. Berdasarkan grafik *density plot*, mayoritas gen diekspresikan pada rentang nilai sekitar 5,5 (log2) dengan nilai puncak kepadatan mencapai 1,2. Kurva mengalami penurunan tajam setelah melewati angka 5 yang mengindikasikan bahwa jumlah gen dengan tingkat ekspresi menengah semakin sedikit. Hanya sebagian kecil gen yang menunjukkan ekspresi tinggi, terlihat dari tren grafik.



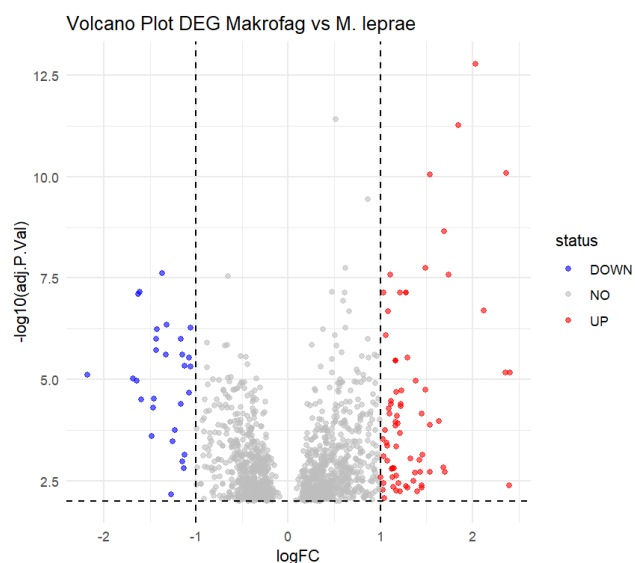
Gambar 2. Distribusi Nilai Ekspresi Gen Makrofag

Berdasarkan plot UMAP, terlihat bahwa sampel dari kelompok macrophage..control (merah) dan macrophage..infected (biru) cenderung tersebar secara acak dan saling beririsan (*overlapping*). Tidak ada klasterisasi yang jelas antar kelompok sampel, yang mengindikasikan bahwa profil ekspresi gen pada kedua kelompok memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi (Gambar 3.)



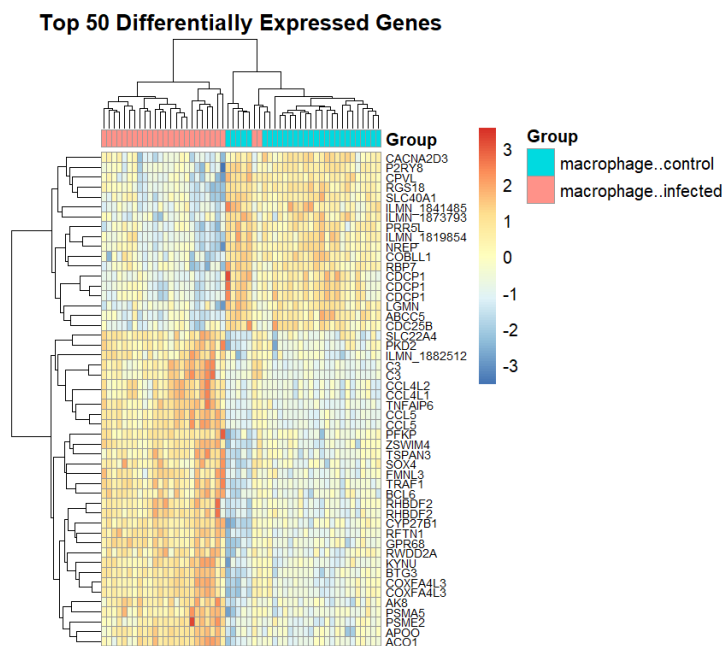
Gambar 3. Plot UMAP

Visualisasi *volcano plot* menunjukkan adanya 75 gen yang mengalami peningkatan ekspresi (*up-regulated*) dan 29 gen yang mengalami penurunan ekspresi (*down-regulated*) pada makrofag pasca infeksi *M. leprae*. Sebagian besar gen signifikan memiliki nilai $|\log FC| > 1$ dengan tingkat signifikansi statistik yang sangat tinggi, bahkan beberapa mencapai nilai $-\log_{10}(\text{adj.P.Val})$ di atas 12,5. Jumlah gen yang terekspresi secara diferensial (DEG) yang relatif sedikit (total 104 gen) mengindikasikan bahwa infeksi *M. leprae* tidak menyebabkan perubahan transkriptoma makrofag secara masif.

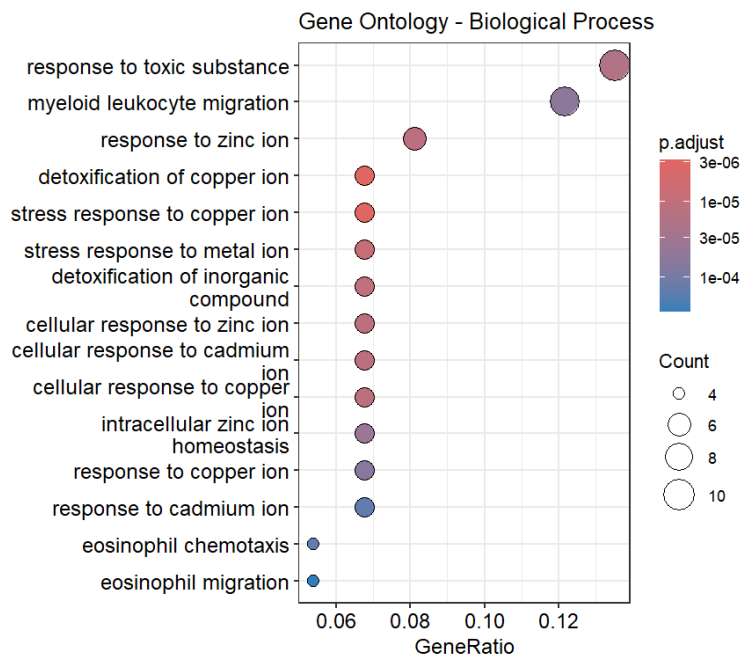


Gambar 4. Volcano Plot DEG Makrofag vs *M. leprae*

Berdasarkan *dendrogram* dan pola warna pada *heatmap*, profil ekspresi gen terbagi menjadi dua kluster utama yang membedakan kelompok kontrol dan terinfeksi. Kluster atas merupakan kelompok gen yang terganggu atau mengalami penurunan ekspresi akibat infeksi *M. leprae*. Hal ini terlihat dari warna yang cenderung biru (*coldspot*) dan tampak pada gen CACNA2D3, P2RY8, CPVL, RGS18, dan SLC40A1. Sebaliknya, kluster bawah menunjukkan gen yang aktif akibat infeksi bakteri. Gen teraktivasi ditandai dengan warna merah (*hotspot*) dan didominasi oleh mediator inflamasi dan kemokin seperti C3, CCL4L2, CCL4L1, TNFAIP6, CCL5, TRAF1, serta gen pemroses antigen PSME2 (Gambar 5.).

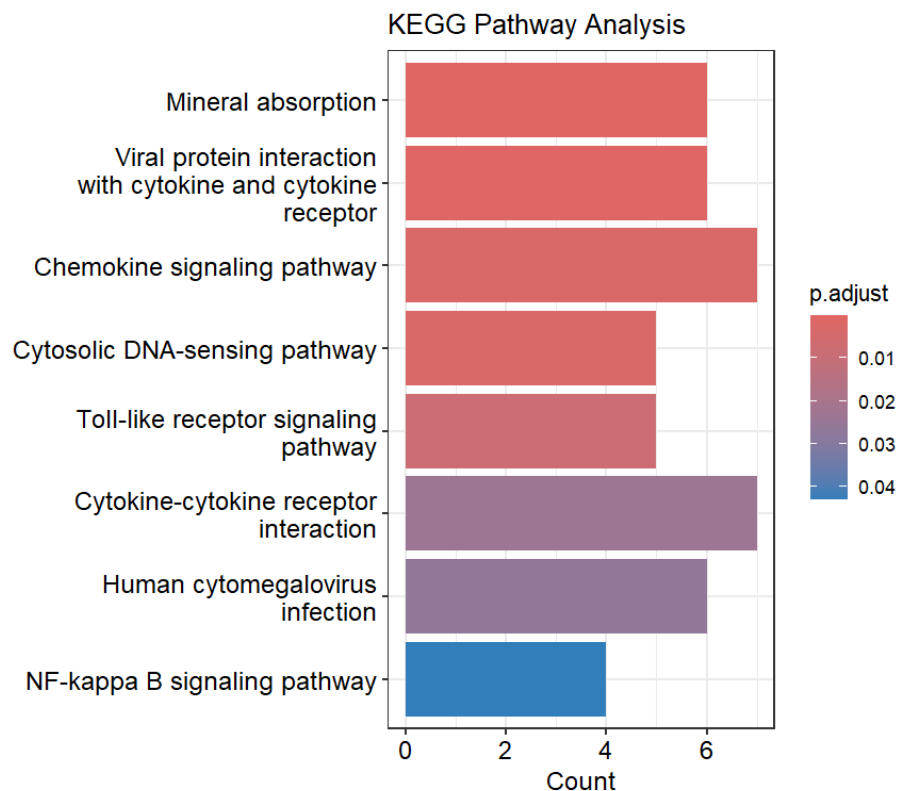


Gambar 5. Visualisas DEG menggunakan Heatmap Plot.



Gambar 6. Grafik Gene Ontology

Berdasarkan grafik *Gene Ontology-Biological Process*, ditemukan bahwa kelompok gen yang paling banyak terlibat adalah gen yang mengatur jalur respon terhadap substansi toksik dan migrasi leukosit. Berdasarkan nilai *P-adjust* mekanisme homeostasis dan respon terhadap ion logam merupakan jalur yang paling aktif dan signifikan. Aktivitas migrasi sel juga terdeteksi melalui jalur eosinophil chemotaxis dan eosinophil migration, meskipun dengan jumlah gen yang lebih sedikit (Gambar 6.).



Gambar 7. Grafik KEGG Pathway

Hasil analisis *KEGG Pathway* menunjukkan bahwa infeksi *M. leprae* memicu aktivasi pada beberapa jalur persinyalan utama. Jalur *Chemokine signaling pathway* dan *Cytokine-cytokine receptor interaction* merupakan jalur dengan keterlibatan gen terbanyak. Berdasarkan signifikansi statistik, *Mineral absorption* dan *Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor* muncul sebagai jalur utama yang paling berperan (ditandai dengan warna merah pekat/nilai *p.adjust* terendah). Selain itu, terdeteksi pula aktivasi pada jalur pertahanan seluler seperti *Toll-like receptor signaling pathway* dan *Cytosolic DNA-sensing pathway*, serta jalur *NF-kappa B signaling pathway* meskipun dengan tingkat signifikansi yang lebih rendah (warna biru) (Gambar 7.).

Pembahasan

Hasil analisis transkriptomik menunjukkan adanya sinkronisasi antara profil ekspresi gen (*heatmap*) dengan aktivasi jalur metabolisme pada makrofag pasca-infeksi *M. leprae*. Aktivasi signifikan jalur *mineral absorption* pada analisis KEGG dibuktikan dengan adanya penurunan ekspresi gen SLC40A1 (Ferroportin). Gen tersebut berfungsi dalam mengeluarkan besi. Besi merupakan nutrisi dari bakteri, adanya penurunan menyebabkan besi tertahan pada sel inang, membatasi akses nutrisi bakteri, membuat bakteri kelaparan dan tidak dapat membelah diri.

Sejalan dengan dominansi respons terhadap ion tembaga (*copper*) pada data GO yang melakukan detoksifikasi dan menciptakan respon substansi toksik. Makrofag secara aktif memobilisasi tembaga ke dalam fagosom untuk memicu stres oksidatif pada bakteri. Hal ini turut ditunjukkan oleh gen ABCC5 yg diturunkan. Gen ini berfungsi dalam transportasi logam. Penurunan aktivasi menyebabkan logam tembaga akan tertahan di dalam fagosom dan memaksimalkan eliminasi pathogen.

Jalur *Chemokine signaling pathway* merupakan jalur dengan signifikansi tertinggi pada data KEGG, yang secara langsung berhubungan dengan kluster gen "hotspot" pada heatmap. Pada grafik *Heatmap* gen CCL4, CCL4L1/2, CCL5, dan C3 memiliki warna lebih merah dibandingkan gen lainnya. Gen tersebut merupakan kemokin, yang berfungsi sebagai sinyal atau menginduksi kemotaksis. Adanya sinyal oleh gen kemokin memicu migrasi leukosit myeloid dari sirkulasi menuju lokasi infeksi. Mekanisme ini yang menyebabkan hasil visualisasi grafik GO turut menampilkan respon migrasi eosinofil kemotaksis eosinofil.