

تعیین ژن های کلیدی و مسیرهای پیام رسانی سلولی دخیل در بیماری زایی و ایجاد انواع تهاجمی بیماری لوسمی لنفوم بالغین مشتق از سلول های T (ATLL)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴

چکیده

محمد معین فرقانی رامندی^۱،
سید حمیدرضا مژگانی^{۲*}

۱- دانشجوی رشته پزشکی، کمیته تحقیقات
دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۲- استادیار، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی
شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی
البرز، کرج، ایران

زمینه و هدف: لوسمی/لنفوم بالغین مشتق از سلول های T (ATLL) سرطانی با پیش آگهی بسیار ضعیف می باشد. ATLL به چهار زیر گروه حاد، مزمن، لنفوم و خاموش با پیش آگهی های بسیار متفاوت تقسیم می شود. در مطالعه حاضر سعی کردیم با استفاده از داده های بیان ژنی و روش های زیست داده ورزی به شناخت بهتر بیماری زایی ATLL و تفاوت های موجود بین زیر گروه های آن بپردازیم.

مواد و روش ها: ژن های با بیان تغییر یافته در بین انواع مختلف ATLL مشخص شدند. با هدف تعیین ژن های کلیدی، شبکه ارتباطات پروتئینی میان ژن های حاصله ساخته شد. پس از غربال ژن های کلیدی بر اساس شاخص های مرکزیت شبکه ای، مسیرهای پیام رسانی سلولی مرتبط با آنها مشخص شدند.

یافته ها: در مقایسه نوع حاد با انواع مزمن و خاموش، مسیرهای پیام رسانی سلولی دخیل در تنظیم عملکرد دستگاه ایمنی بیان متفاوتی دارند. در مقایسه نوع حاد و مزمن با افراد سالم، ژن های مرتبط با بدخیمی درگیر هستند. در مقایسه نوع خاموش با افراد سالم، مسیرهای مربوط به عفونت ها مختل شده اند. در مقایسه ثانویه نیز مشخص گردید ژن های مربوط به تکثیر سلولی و بدخیمی ها در فرم حاد بیان بالاتر و ژن های مرتبط با دستگاه ایمنی در این بیماران بیان کمتری نسبت به باقی افراد داشته اند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد دستکاری های ویروس جهت فرار از دستگاه ایمنی و همچنین تقویت تکثیر سلول های آلوده نقش تعیین کننده ای در بروز نوع تهاجمی بیماری داشته باشد. بررسی های بیشتر می تواند موجب ابداع روش های نوین تشخیصی، تعیین پیش آگهی و حتی هدف های ژن درمانی گردد.

کلمات کلیدی: لوسمی/لنفوم بالغین مشتق از سلول های T، ویروس انسانی لنفوتروپیک سلول T، بیوانفورماتیک، ATLL، HTLV-1

نویسنده مسئول: سید حمیدرضا مژگانی
استادیار، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی
و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی البرز،
کرج، ایران
تلفن: +۹۸ ۰۹۱۲۶۶۱۸۷۴۳
ایمیل: hamidrezamozhgani@gmail.com

مقدمه

لوسمی/لنفوم بالغین مشتق از سلول‌های T (ATLL) سرطانی با پیش‌آگهی بسیار ضعیف می‌باشد که باعث درگیری سلول‌های T محیطی می‌گردد.^{۱،۲} مشخص شده است که عفونت با ویروس انسانی لنفوتروپیک سلول T نوع یک (HTLV-1) علت بروز این بدخیمی می‌باشد. ATLL تظاهرات بالینی متنوعی دارد، با این وجود پوست شایع‌ترین عضو است که تحت تاثیر این بیماری قرار می‌گیرد ATLL.^۳ با توجه به علائم بالینی و پیش‌آگهی به چهار زیر گروه قابل طبقه‌بندی می‌باشد. این زیر گروه‌ها عبارتند از حاد، مزمن، لنفوم و خاموش. بیماران مبتلا به دو زیر گروه حاد و لنفوم و همچنین افراد مبتلا به نوع مزمن فاکتورهای پیش‌آگهی ضعیفی از خود نشان می‌دهند، میانه بقایی کمتر از یک سال دارند. این در حالی است که سایر افراد زیر گروه مزمن و بیماران مبتلا به نوع خاموش، حتی بدون احتیاج به شیمی درمانی قابل پیگیری هستند.^۴ نوع smoldering یا خاموش، موجب درگیری تنها حدود پنج درصد از لنفوسیت‌های خون می‌گردد و قادر به ایجاد اختلال قابل ملاحظه‌ای در مقدار گلبول‌های سفید خون نمی‌باشد. در این بیماران تظاهرات رایج ATLL مانند درگیری دستگاه اعصاب مرکزی، افزایش کلسیم خون، درگیری گره‌های لنفاوی و درگیری کبد و طحال نیز دیده نمی‌شود. تنها تظاهرات دیده شده در برخی از بیماران مبتلا به نوع خاموش، ضایعات پوستی و ریوی هستند. در نوع مزمن بیماری، گلبول‌های سفید خون افزایش یافته و Lactate dehydrogenase (LDH) دوبرابر نرمال نیز مشاهده می‌گردد، با اینحال در این بیماران نیز افزایش کلسیم خون و علائمی مبنی بر درگیری سایر اعضا وجود ندارد. در برخی از بیماران درگیری گره‌های لنفاوی، درگیری کبد و طحال، ضایعات پوستی و ریوی مشاهده شده است. ویژگی بارز نوع لنفومی درگیری گره‌های لنفاوی می‌باشد اما در این بیماران لنفوسیتوز مشاهده نمی‌گردد. هر تظاهر دیگری که در قالب سایر زیرگروه‌ها قرار نگیرد، به عنوان نوع حاد تلقی می‌شود. نوع حاد شامل تظاهرات رایج لوسمی بوده که ممکن است با درگیری گره‌های لنفاوی یا درگیری احشایی نیز همراه باشد.^۵ با وجود تمام تلاش‌ها متاسفانه ATLL نسبت به روش‌های شیمی درمانی موجود مقاوم است.^{۶،۷} به نظر می‌رسد پیش‌آگهی ضعیف ATLL در نتیجه دانش ناکافی از علل، عوامل خطر عوامل ژنتیکی و پاتوژنز این بیماری می‌باشد. با توجه به شکاف قابل توجهی که در پیش‌آگهی زیر گروه‌های مختلف این بیماری وجود دارد، شناخت تفاوت‌های پاتوژنز این

زیر گروه‌ها با یکدیگر می‌تواند ما را در کشف علل بروز انواع مهاجم و همچنین تلاش برای اقدامات درمانی و پیشگیرانه یاری دهد. با توجه به سهولت در نمونه‌گیری و ارزیابی‌های ژنتیکی بر روی نمونه‌های حاصله، در مقایسه با سایر سرطان‌ها، بدخیمی‌های خونی از برتری‌های قابل توجهی در زمینه استفاده از ارزیابی‌های ژنتیکی با اهداف تشخیصی، تعیین پیش‌آگهی، طبقه‌بندی و تعیین روش درمانی برخوردار هستند. بر این اساس در حال حاضر یکی از پایه‌های اصلی ارزیابی بالینی تقریباً تمامی انواع بدخیمی‌های خون، آزمایشات ژنتیکی هستند.^۸ یکی از این آزمایشات، روش میکروآرای می‌باشد. میکروآرای محققان را قادر ساخته تا به طور همزمان بیان هزاران ژن را در حداقل زمان ممکن اندازه‌گیری نمایند. این روش در سالهای اخیر موجب تولید حجم انبوهی از داده‌های بیان ژنی شده است. با این حال افزایش سرسام آور حجم داده‌های بدست آمده فرایند درک و تفسیر اطلاعات را بسیار مشکل نموده است. جهت رفع مشکل کار با داده‌های بزرگ (Big Data) مربوط به بیان ژن‌ها روش‌های متعدد بیوانفورماتیکی ایجاد گردیده‌اند.

در این مطالعه با استفاده از داده‌های بیان ژنی که بصورت برخط از پایگاه اطلاعاتی Gene Expression Omnibus یا به اختصار GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) دریافت می‌گردد، به شناسایی ژن‌های با بیان تغییر یافته در میان زیر گروه‌های مختلف بیماری می‌پردازیم. سپس براساس ویژگی‌های شبکه‌ای به تعیین ژن‌های با اهمیت بالا و در نهایت مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تحت تاثیر آنها اقدام می‌کنیم. همچنین به منظور تعیین ژن‌های دخیل در بروز انواع مهاجم، ارزیابی مقایسه‌ای بین بیماران مبتلا به نوع حاد و بیماران مبتلا به نوع خاموش و مزمن انجام خواهیم داد.

نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به شناخت بهتر ژن‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی کلیدی در بیماری‌زایی ATLL و همچنین مشخص شدن تفاوت‌های موجود در انواع مختلف این بیماری منجر شود. شناخت ژن‌های جدید می‌تواند در تعیین زیست‌نشانه‌هایی جهت تشخیص زود هنگام و تعیین پیش‌آگهی و همچنین به عنوان هدف‌های ژن درمانی کمک‌کننده باشد.

مواد و روش‌ها

دریافت و ارزیابی اطلاعات

سری داده‌های GSE33615 (بر اساس GPL4133) از پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) دریافت شد. نمونه‌های این سری داده، Ribonucleic acid (RNA) کامل جدا شده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌باشند. نمونه‌ها شامل ۷۵ نفر مشتمل بر ۲۰ بیمار مبتلا به نوع مزمن، ۲۶ بیمار با نوع حاد، ۴ مورد نوع خاموش و ۲۱ فرد سالم به عنوان گروه کنترل می‌باشد. با استفاده از تکنیک میکروآرای جهت هر کدام از نمونه‌ها بیان ۴۵۰۱۵ ژن اندازه‌گیری شده است. پیش از انجام ارزیابی‌های اصلی لازم است داده‌ها از موارد تکراری، ناقص، حذف شده و پرت پاک‌سازی گردند و سپس تحت نرمال‌سازی قرار گیرند که این اقدامات با استفاده از زبان برنامه نویسی R انجام گرفته است. داده‌ها ابتدا توسط تغییر لگاریتمی دچار تحت نرمال‌سازی قرار گرفتند و با توجه به دست نیافتن به نتیجه مطلوب، مجدداً با استفاده از روش نرمال‌سازی چارکی از طریق دستور "normalize.quantiles" از بسته (پکیج) "preprocessCore" نرمال شدند. پس از نرمال‌سازی داده‌ها، با استفاده از پکیج "limma"، ژن‌های با بیان تغییر یافته بین بیماران مبتلا به نوع مزمن در مقایسه با نوع حاد (گروه ۱)، نوع مزمن در مقایسه با نوع خاموش (گروه ۲)، نوع مزمن در مقایسه با افراد سالم (گروه ۳)، نوع حاد در مقایسه با نوع خاموش (گروه ۴)، نوع حاد در مقایسه با افراد سالم (گروه ۵) و نوع خاموش در مقایسه با افراد سالم (گروه ۶) شناسایی شدند. آستانه قدر مطلق log fold change یا همان لگاریتم میزان تفاوت بیان ژن‌ها، عدد ۵/۱ و مقدار عدد P نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

به علاوه، در هر گروه مقایسه‌ای صد ژن اول با کمترین واریانس بیانی بصورت نقشه گرمایی (heatmap) با استفاده از زبان برنامه نویسی R و بسته "pheatmap" ترسیم شدند.

ساخت شبکه ارتباطات پروتئینی و تعیین مسیرهای پیام‌رسانی سلولی متأثر از ژن‌های کلیدی

به منظور ایجاد شبکه ارتباطات پروتئینی ژن‌های با بیان تغییر یافته هر گروه، لیست ژن‌ها در نرم افزار برخط پایگاه اطلاعاتی "STRING" (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) در آدرس <http://string-db.org/> بارگذاری شد. پس از دریافت، نتایج حاصله به منظور تعیین ژن‌های کلیدی (hub genes) در نرم افزار "Cytoscape"

ورژن ۹/۳ تحت ارزیابی از نظر شاخص‌های شبکه‌ای مانند درجه (degree)، معیار بینابینی (betweenness) و معیار نزدیکی (closeness) قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، ژن‌های واجد بیشترین مقدار از شاخص‌های مرکزیت به عنوان زیر-شبکه غربال شدند.

در مرحله بعد با هدف تعیین مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با ژن‌های حاضر در زیر-شبکه‌ها از پایگاه اطلاعاتی "enrichr" (https://maayanlab.cloud/Enrichr) استفاده شد. به این منظور، در زبان برنامه نویسی R و با استفاده از بسته "enrichR" و دستور مربوطه با همین نام، ژن‌های نهایی تحت تحلیل غنی‌سازی "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) و هستی‌شناسی ژن یا gene ontology (GO) قرار گرفتند.

همچنین به منظور به نمایش در آوردن زیر-شبکه‌های حاصل و ارتباطات موجود در آنها از نرم افزار "Gephi" ورژن 0.9.2 استفاده گردید.

ارزیابی مقایسه‌ای ژن‌های با بیان تغییر یافته در زیر گروه‌های مختلف بیماری

به منظور تعیین دقیق‌تر تفاوت‌های موجود در نمایه بیان ژنی زیر گروه‌های مختلف بیماری A-TLL، ژن‌های با بیان تغییر یافته در زیر-شبکه‌های نهایی به ۱۲ گروه شامل ژن‌های با بیان افزایش یافته و ژن‌های با بیان کاهش یافته در هر یک از شش گروه مقایسه‌ای تقسیم شدند. سپس با استفاده از نرم افزار برخط موجود در آدرس (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) اشتراکات و هم پوشانی‌های موجود میان هر یک از این دسته‌های ژنی مشخص شدند. در مرحله بعد با توجه به نتیجه حاصله، ژن‌ها به دو گروه کلی شامل ژن‌هایی که در بیماران نوع حاد بیان کلی پایین‌تری نسبت به بیماران نوع مزمن و خاموش و ژن‌هایی که بیان کلی بالاتری دارند (مانند افزایش بیان در مقایسه مستقیم، افزایش بیان نوع حاد همراه با کاهش بیان نوع مزمن و خاموش نسبت به افراد سالم، تنها افزایش بیان در نوع حاد، تنها افزایش بیان در نوع خاموش یا مزمن و سایر حالات ممکن که نشان دهنده افزایش بیشتر بیان در نوع حاد می‌باشد) دارند تقسیم‌بندی شده و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مربوط به هر یک نیز مشخص شدند.

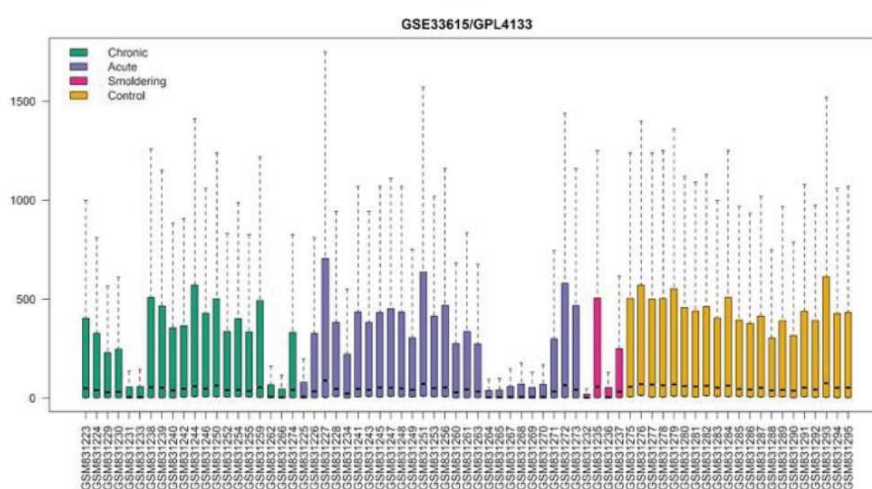
یافته‌ها

دریافت اطلاعات و تعیین ژن‌های با بیان تغییر یافته

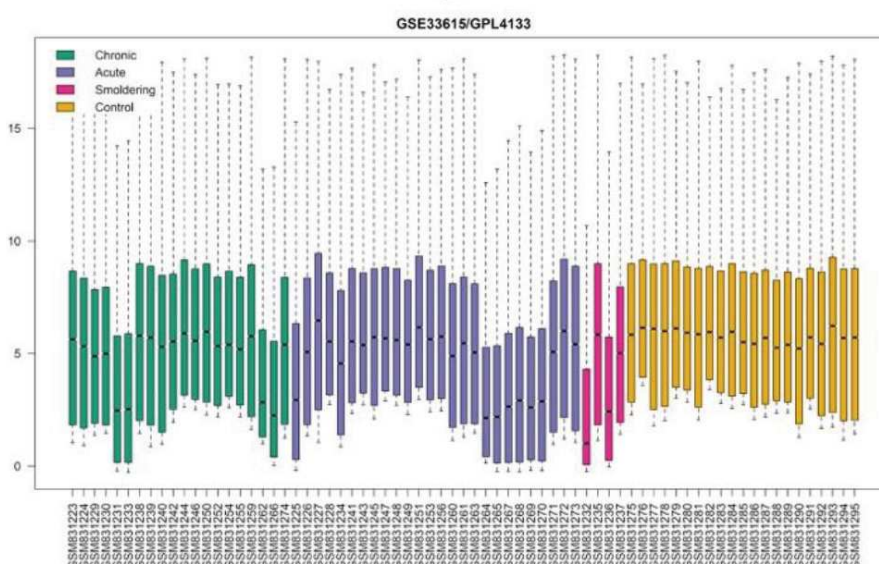
پس از پاکسازی داده‌ها از داده‌های پرت، ناقص و تکراری تعداد ژن‌ها از ۴۵۰۱۵ به ۱۹۲۸۹ ژن کاهش یافت. شکل ۱ نمودار جعبه‌ای نمونه‌ها قبل و بعد از نرمال‌سازی را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است نرمال‌سازی ابتدایی توسط تغییر لگاریتمی موجب شد نمودارها تا حدی یکنواخت گردند اما پس از نرمال‌سازی چارکی نمودار جعبه‌ای

بطور کامل یکنواخت گردیده است. تعداد ژن‌های با بیان تغییر یافته در هر کدام از گروه‌های مقایسه‌ای یک تا شش به ترتیب برابر با ۳۶۹، ۹۴۸، ۱۹۶۸، ۱۱۰۰، ۱۲۵۴ و ۱۷۳۳ مورد بوده است. شکل ۲ نمودار آتشفشانی (volcano plot) که نمایانگر لگاریتم مقادیر تغییر بیان ژن‌ها در مقایسه با لگاریتم عدد P آنها می‌باشد را برای هر کدام از گروه‌های مقایسه‌ای به نمایش گذاشته است. شکل ۳ نشان دهنده نقشه گرمایی صد ژن اول با کمترین واریانس بیانی در شش گروه مقایسه‌ای می‌باشد. رنگ قرمز نماینده بیان بالاتر و رنگ سبز نماینده بیان پایین‌تر است.

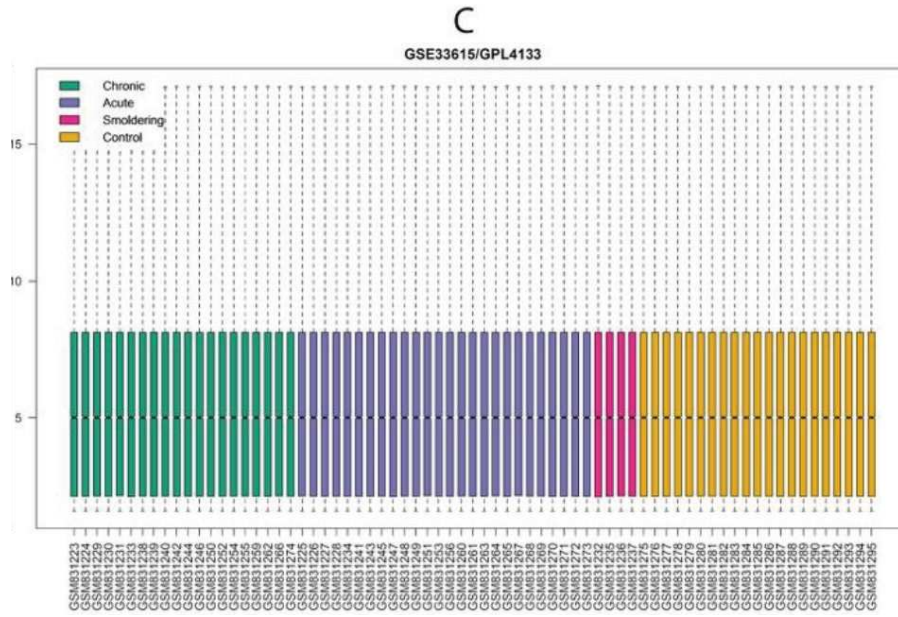
A



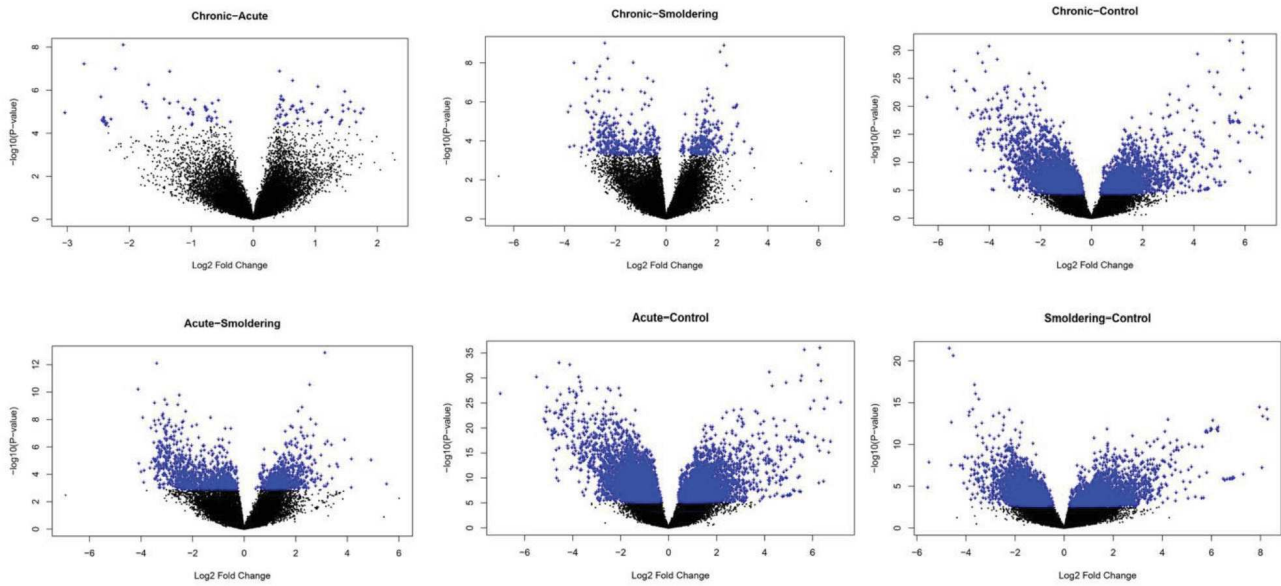
B



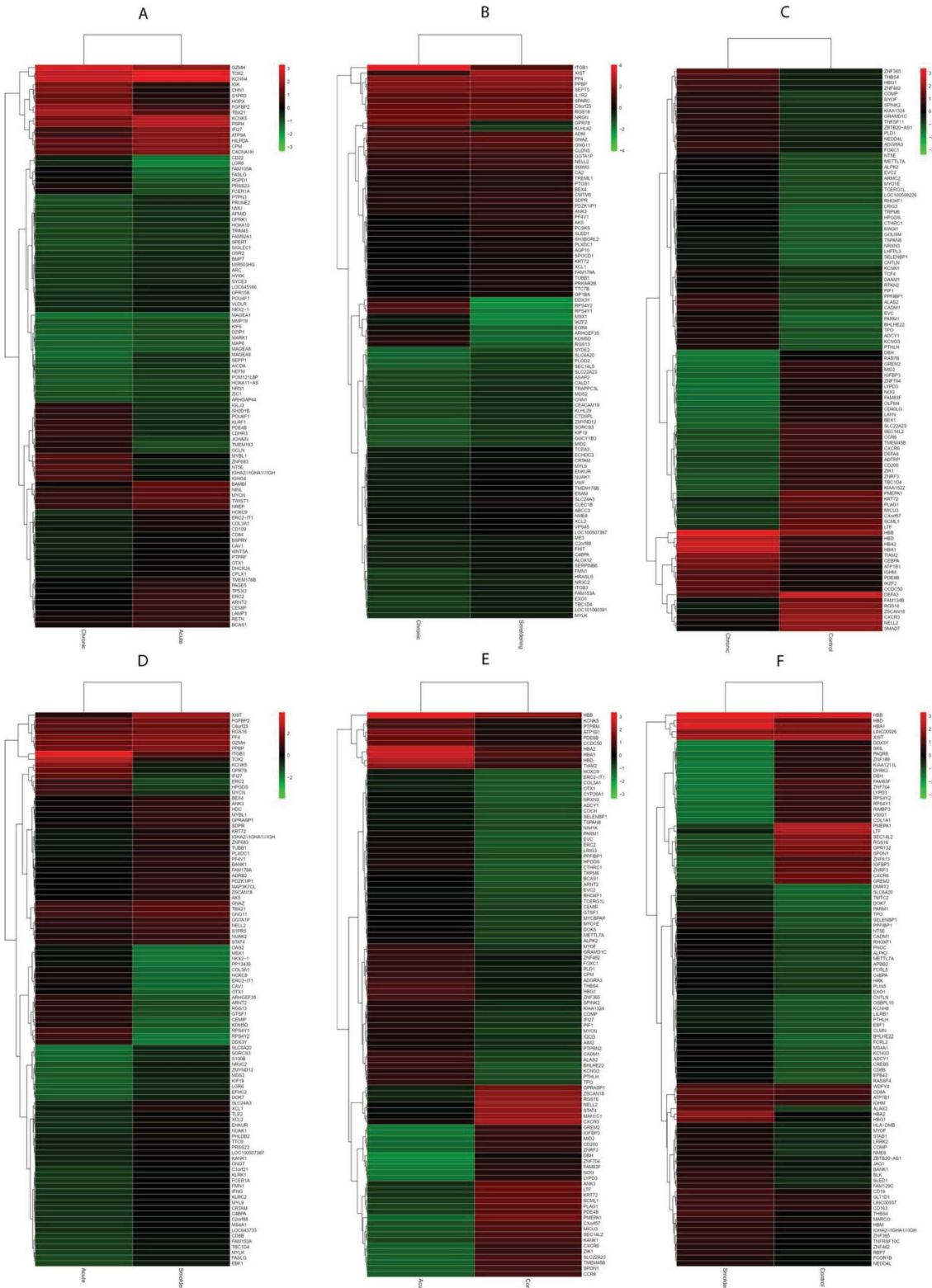
شکل ۱- نمودار جعبه‌ای نمونه‌ها قبل و بعد از انجام نرمال‌سازی. (A) نمودار جعبه‌ای قبل از نرمال‌سازی، (B) نمودار جعبه‌ای پس از نرمال‌سازی با استفاده از روش تغییر لگاریتمی و (C) نمودار جعبه‌ای داده‌ها پس از اجرای نرمال‌سازی چارکی.



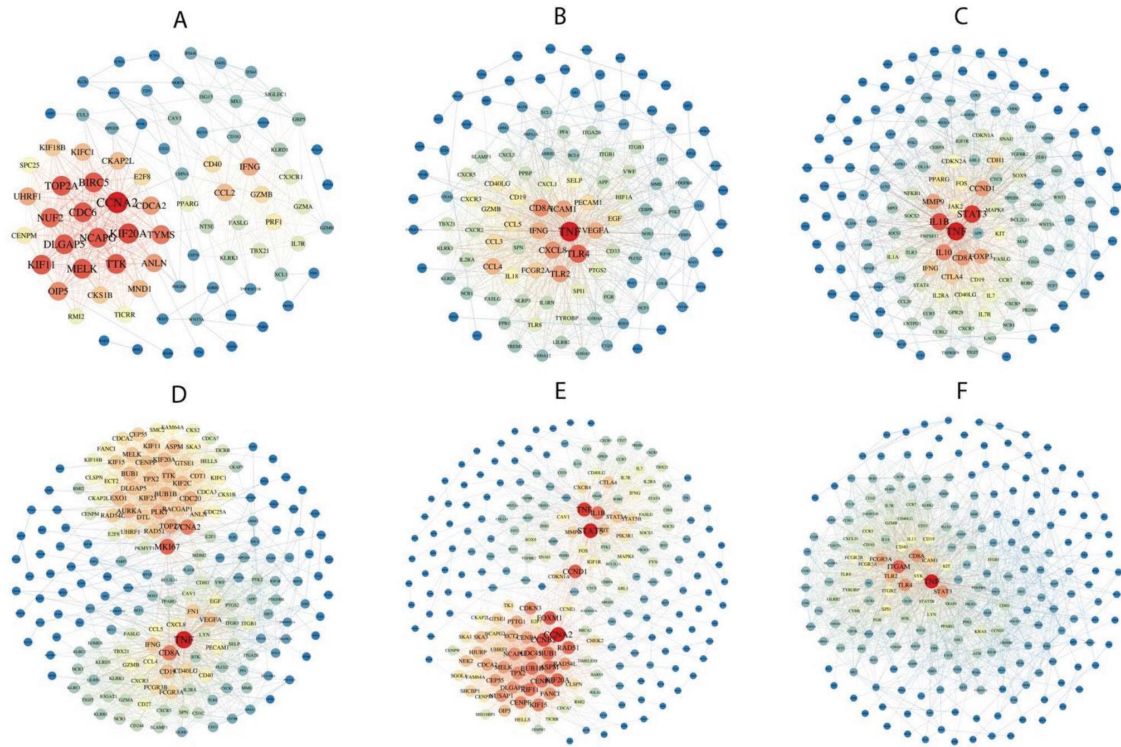
شکل ۱- C) نمودار جعبه‌ای داده‌ها پس از اجرای نرمال‌سازی چارکی.



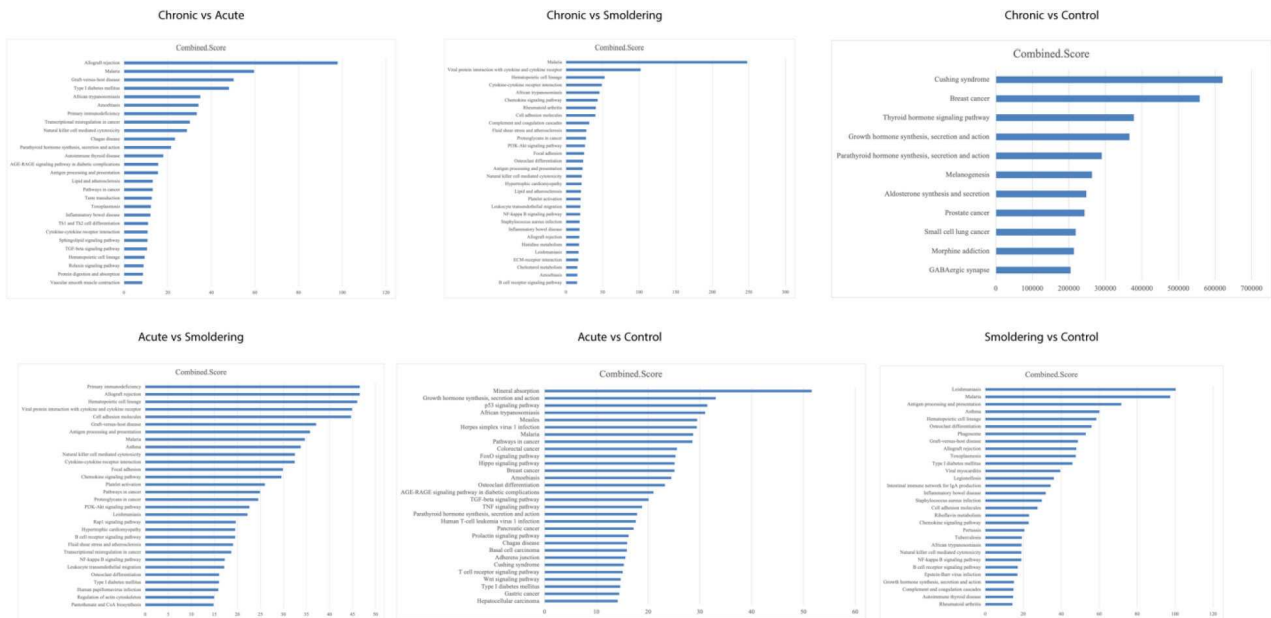
شکل ۲- نمودار آتشفشانی ژن‌های شش گروه مقایسه‌ای. نمایانگر لگاریتم میزان تغییر بیان ژن‌ها در مقایسه با P-value آن می‌باشد.



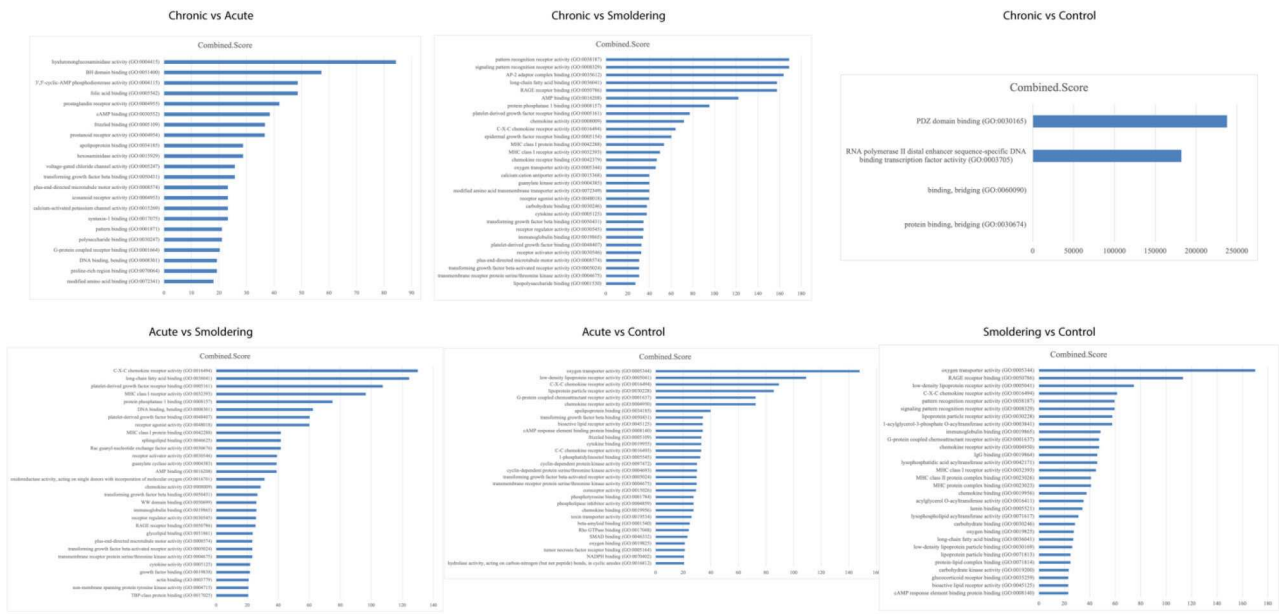
شکل ۳- نقشه گرمایی ۱۰۰ ژن اول با کمترین واریانس بیانی در میان (A) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با نوع حاد، (B) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با نوع خاموش، (C) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با افراد سالم، (D) مبتلایان نوع حاد در مقایسه با نوع خاموش، (E) مبتلایان نوع حاد در مقایسه با افراد سالم و (F) مبتلایان نوع خاموش در مقایسه با افراد سالم



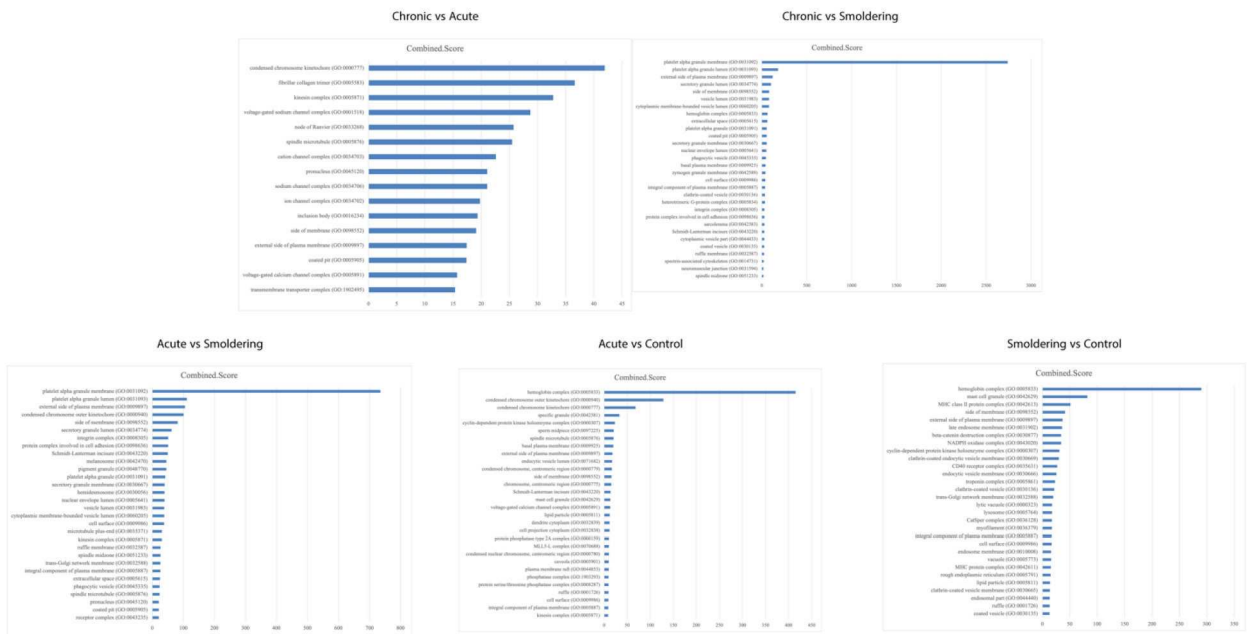
شکل ۴- شبکه ارتباطات پروتئینی مربوط به ژن‌های با بیان تغییر یافته در میان (A) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با نوع حاد، (B) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با نوع حاد، (C) مبتلایان نوع مزمن در مقایسه با افراد سالم و (D) مبتلایان نوع حاد در مقایسه با نوع خاموش، (E) مبتلایان نوع حاد در مقایسه با افراد سالم و (F) مبتلایان نوع خاموش در مقایسه با افراد سالم



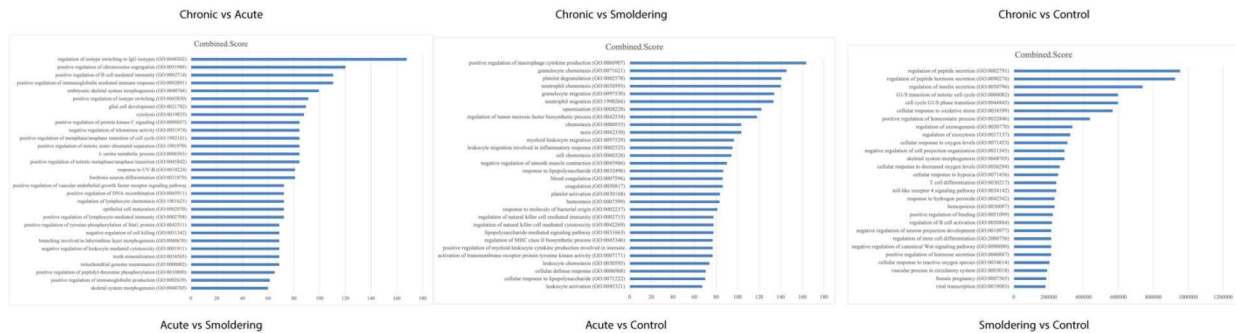
شکل ۵- مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با ژن‌ها بر اساس نتایج KEGG 2021 Human



شکل ۶- مسیرهای پیام رسانی سلولی مرتبط با ژن‌ها بر اساس نتایج GO Molecular Function 2015



شکل ۷- مسیرهای پیام رسانی سلولی مرتبط با ژن‌ها بر اساس نتایج GO Cellular Component 2015



شکل ۸- مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با ژن‌ها بر اساس نتایج GO Biological Process 2015.

synthesis, secretion and action, Aldosterone synthesis and secretion, Prostate cancer, Small cell lung cancer myeloid leukaemia, در مقایسه بیماران نوع حاد و خاموش مسیرهای Allograft rejection, Primary immunodeficiency, Hematopoietic cell lineage, Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor, Cell adhesion molecules, Graft-versus-host disease, Natural killer Cytokine-cytokine receptor و cell mediated cytotoxicity interaction درگیر هستند. در مقایسه بیماران نوع حاد و افراد کنترل نیز مسیرهای مربوط به بروز بدخیمی تحت تاثیر قرار گرفته‌اند مانند p۵۳ signalling pathway, Pathways in cancer, Colorectal cancer, FoxO signalling pathway, Breast cancer, TGF-beta signalling pathway و TNF signalling pathway. در مقایسه بین افراد مبتلا به نوع خاموش و افراد سالم تعداد زیادی از مسیرهای مربوط به عفونت‌های مختلف مانند Leishmaniasis, Malaria, Antigen processing and presentation, Phagosome

مقایسه تغییرات بیان ژنی در نوع‌ها مهاجم و کمتر بدخیم

پس از تعیین زیر- شبکه‌های مربوط به هر یک از گروه‌های مقایسه ای، ژن‌های حاضر در هر زیر- شبکه به تفکیک افزایش یا کاهش بیان جهت ارزیابی اشتراکات بوسیله از نمودار ون مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به تعداد بالای حالات مورد مقایسه، نمودار ون قابل رسم نبوده و نتایج در فایل ضمیمه شماره ۱ آورده شده است. با استفاده از دسته بندی‌های موجود در جدول حاصله ژن‌های با بیان افزایش یافته در نوع حاد در مقایسه با نوع مزمن و نوع خاموش و همچنین ژن‌های با بیان

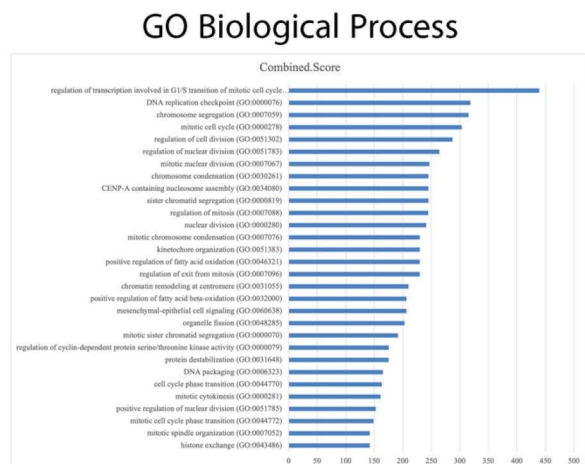
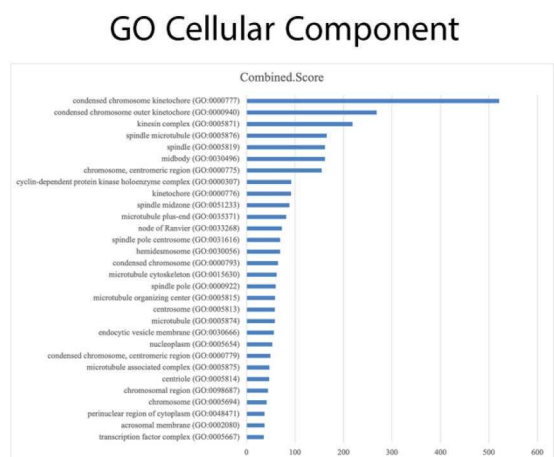
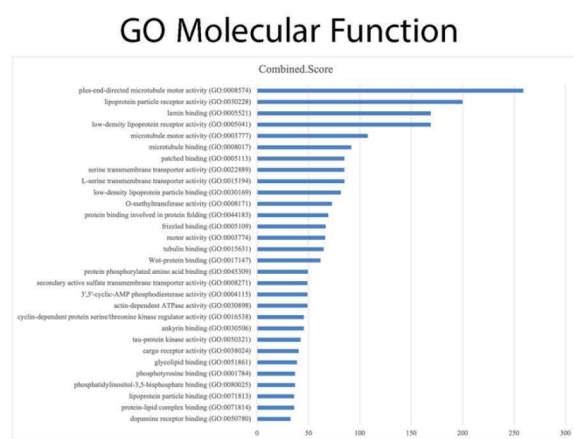
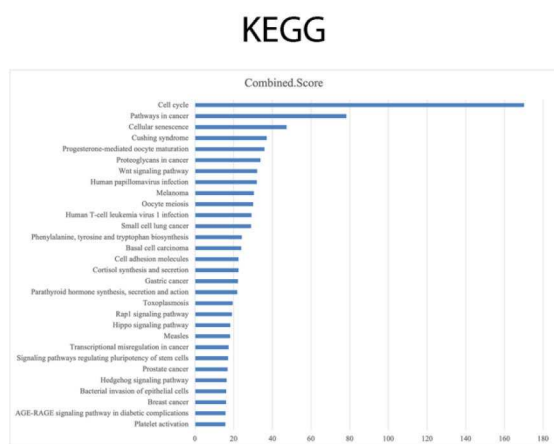
ایجاد شبکه ارتباطی پروتئینی، تعیین ژن‌های کلیدی در هر گروه و مسیرهای سلولی مرتبط با آنها

زیر- شبکه‌های حاصل از ارزیابی شبکه‌ای ژن‌های با بیان تغییر یافته در شکل ۴ ترسیم شده‌اند. در شبکه حاصل سایز و رنگ گره‌ها بر اساس میزان درجه آنها در شبکه تعیین شده است (رنگ قرمز و اندازه بزرگ نشان دهنده بیشتر بودن تعداد ارتباطات یک ژن با سایرین است). تعداد ژن‌های حاضر در زیر- شبکه هر یک از شش گروه مقایسه‌ای به ترتیب برابر با ۳۱۵، ۲۵۰، ۲۴۱، ۱۷۵، ۱۰۸ و ۲۹۲ مورد بوده است.

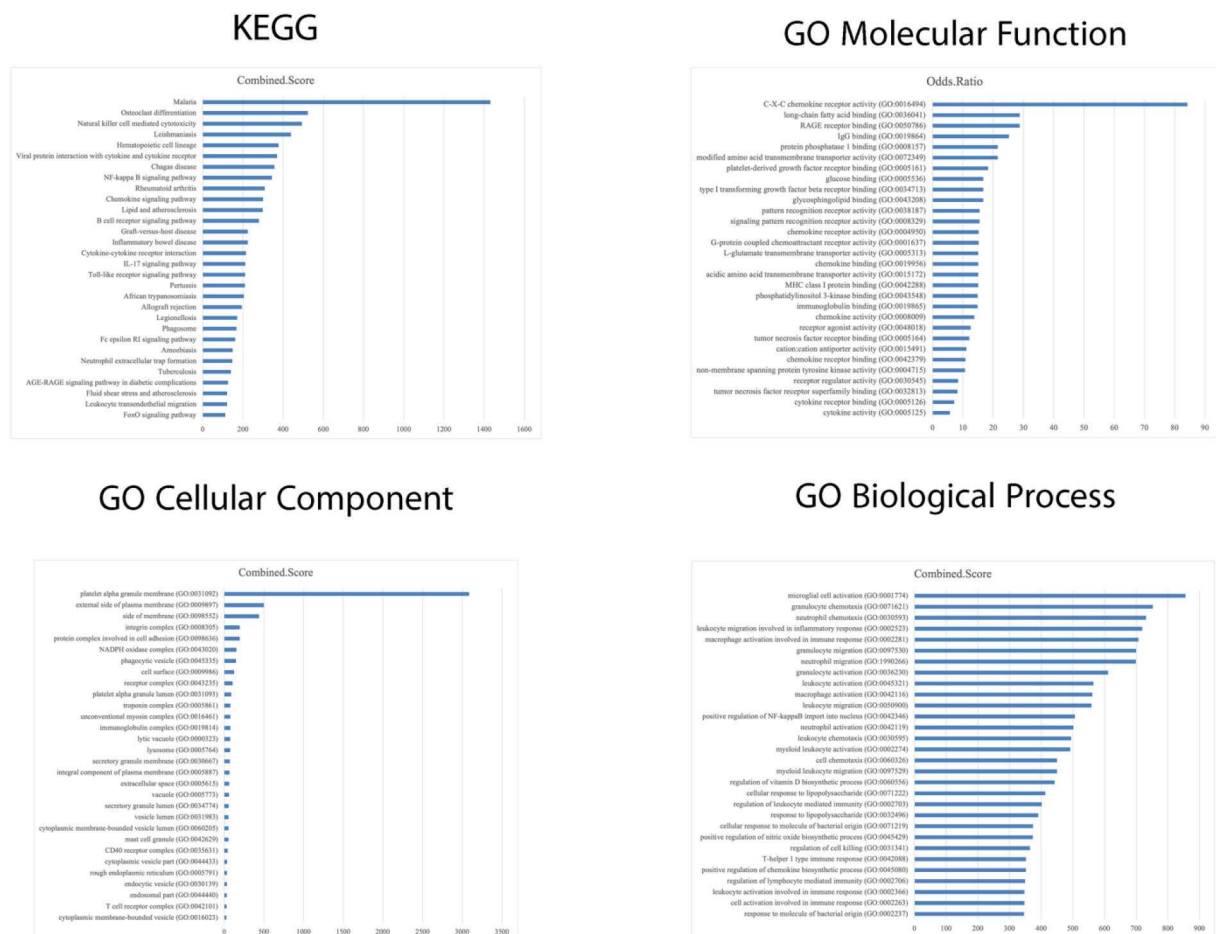
در شکل‌های ۸-۵ مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با ژن‌های هر گروه، به ترتیب بر اساس نتایج KEGG 2021 Human, GO Molecular Function 2015, GO Cellular Component 2015 و GO Biological Process 2015 به نمایش درآمده‌اند. ژن‌های با بیان تغییر یافته در مقایسه بیماران مزمن با حاد اغلب با مسیرهای سلولی مرتبط با اختلالات دستگاه ایمنی مانند Allograft rejection, Graft-versus-host disease Type I diabetes mellitus مرتبط بودند. در مقایسه بیماران مزمن با بیماران خاموش مسیرهای مربوط به ایمنی در مقابل عفونت و ویروس‌ها مانند Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor, Hematopoietic cell lineage, Cytokine-cytokine receptor interaction و Chemokine signaling pathway مشخص شدند. در مقایسه بیماران مزمن و افراد سالم مسیرهای سلولی اصلی را می‌توان به دو گروه مسیرهای مربوط به ساخت و ترشح هورمون‌ها و مسیرهای مربوط به بدخیمی‌ها تقسیم‌بندی نمود مانند Cushing syndrome, Breast cancer, Thyroid hormone signalling pathway, Growth hormone synthesis, secretion and action, Parathyroid hormone

نسبت به سایرین داشتند با مسیرهای مربوط به بدخیمی‌ها ارتباط داشتند و از نظر هستی‌شناسی نیز با عملکردهای دخیل در تکثیر سلولی مرتبط بودند (شکل ۹). ژن‌هایی که در بیماران نوع حاد بیان کمتری داشتند هم از نظر مسیرهای سلولی و هم از نظر هستی‌شناسی، با عملکردهای دستگاه ایمنی مرتبط می‌باشند (شکل ۱۰).

کاهش یافته در بین دو گروه تعیین گردیدند. در نهایت ۳۶۸ ژن با بیان افزایش یافته در بیماران مبتلا به نوع حاد و ۳۹۴ ژن با بیان کاهش یافته مشخص شدند. در مرحله نهایی ژن‌های هر گروه تحت enrichment قرار گرفتند. براساس نتایج حاصله ژن‌هایی که در بیماران نوع حاد افزایش بیان بیشتری



شکل ۹- مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با ژن‌های با بیان افزایش یافته در بیماران مبتلا به نوع حاد ATLL در مقایسه با انواع مزمن و خاموش.



شکل ۱۰- مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با ژن‌های با بیان کاهش یافته در بیماران مبتلا به نوع حاد ATLL در مقایسه با انواع مزمن و خاموش.

بحث

در این مطالعه نمایه بیان ژنی بیماران مبتلا به سه زیر گروه ATLL شامل نوع حاد، مزمن و خاموش با افراد سالم و همچنین یکدیگر مقایسه گردیدند و ژن‌ها با بیان تغییر یافته و از میان آنها ژن‌های کلیدی مسیرهای مرتبط با آنها تعیین شدند.

با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد ژن‌هایی که در مقایسه بین نوع حاد با انواع مزمن و خاموش تغییر بیان داشته‌اند، ارتباطات قابل ملاحظه‌ای با مسیرهای پیام‌رسانی سلولی دخیل در تنظیم عملکرد دستگاه ایمنی و اختلالات مربوط به آن دارند. ژن‌های با بیان تغییر یافته کلیدی در مقایسه بیماران مبتلا به نوع حاد و مزمن با افراد سالم، عمدتاً در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط با بدخیمی شرکت دارند در صورتی که ژن‌های با بیان تغییر یافته بیماران نوع خاموش در مقایسه با افراد سالم، بیشتر در

مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به عفونت‌ها ایفای نقش می‌کنند. همچنین ارزیابی مقایسه‌ای انجام شده بین نوع حاد با انواع مزمن و خاموش، نشان دهنده این مطلب است که ژن‌های دخیل در مسیرهای مرتبط با بروز سرطان و ژن‌های مرتبط با فرایندهای تکثیر سلولی در بیماران مبتلا به نوع حاد بیشتر بیان شده‌اند و ژن‌های مرتبط با دستگاه ایمنی و دفاع علیه میکروارگانیسم (ریزسازواره)ها علی‌الخصوص ویروس‌ها در بیماران نوع حاد کمتر بیان شده‌اند.

در سلول‌های سرطانی بیماران ATLL اختلالات متعددی شناسایی شده‌اند که منجر به فرار از دستگاه ایمنی می‌گردد. از این میان می‌توان به تغییرات ساختاری ژن PD-L1 ناشی از حذف، وارونگی، تکرار و جا به جایی اشاره نمود. جهش‌های ژنتیک ژن FAS و همچنین حذف و جهش‌های CD58 که در بروز پاسخ‌های ایمنی ناشی از سلول‌های T

در مقایسه انجام شده بر روی تغییرات ژنتیکی بیماران مبتلا به دو نوع حاد و مزمن، حذف ژن CDKN2A که در توقف چرخه سلولی نقش دارد، به عنوان یکی از تفاوت‌های کلیدی این دو نوع شناخته شده است. به علاوه دیده شده که در صورت بیان مجدد این ژن، رشد سلول‌های سرطانی نیز متوقف می‌گردد.^{۱۶}

Y Kogure و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ انتشار یافته طی ارزیابی تمام ژن‌های ۱۵۰ بیمار مبتلا به ATLL موفق به کشف تغییراتی در ژن REL شدند که منجر به افزایش فعالیت تکثیری سلول‌ها می‌گردد.^{۱۷} در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۴ توسط Chaib-Mezrag و همکاران، مشاهده شد که پروتئین Tax و ویروس HTLV-1 قادر است باعث بروز اختلال در فرآیند طبیعی تکثیر DNA شود.^{۱۸} در سال ۲۰۱۶ بر اساس این نتایج مشاهده شد به دنبال مهار کردن ژن سندروم وارنر یا *werner syndrome (WRN)*، که نقش بسزایی در تکثیر سلولی و ترمیم DNA دارد، می‌توان باعث بروز مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول‌های آلوده به ویروس HTLV-1 با ویژگی‌های ATLL شد.^{۱۹}

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان دهنده تفاوت‌های ژنتیکی در بیماران مبتلا به انواع مختلف بیماری ATLL می‌باشد. این نتایج می‌تواند باعث کسب شناخت بهتری از فرایندهای اساسی‌ای شود که موجب ایجاد انواع تهاجمی بیماری می‌گردند. ژن‌های حاضر در مسیرهای سلولی کلیدی یافت شده می‌توانند به عنوان مارکرهای بیولوژیک جهت تشخیص زود هنگام بیماری، تعیین پیش‌آگهی بیماران و همچنین اهداف ژن درمانی استفاده گردند. جهت بررسی بیشتر این فرضیه‌ها لازم است مطالعات آزمایشگاهی بر روی مسیرهای پیام‌رسانی پیشنهاد شده، ژن‌های دخیل در آنها و پروتئین‌های حاصله صورت پذیرد.

و کشنده طبیعی نقش دارند نیز به ترتیب در ۱۱ و ۱۹ درصد سلول‌های سرطانی دیده شده‌اند. به علاوه متیلاسیون بیش از اندازه و قطع بیان ژن‌های پروتئین‌های مجموعه سازگاری بافتی اصلی یا *major histocompatibility (MHC)* کلاس ۱ بصورت رایجی در بیماران دیده شده است. که در نتیجه منجر شده تا حدود ۹۰٪ از بیماران دچار اختلالات مرتبط با ارائه آنتی ژن‌ها از طریق MHC باشند.^۹

K Tsukasaki و همکاران، در سال ۲۰۰۴ طی مطالعه‌ای با هدف تعیین تغییراتی که منجر به تبدیل نوع مزمن بیماری ATLL به نوع حاد آن می‌شود موفق به یافتن ۲۰۳ ژن با بیان افزایش یافته و ۹۱ ژن با بیان کاهش یافته در بیماران مبتلا به نوع حاد در مقایسه با بیماران مبتلا به نوع مزمن شدند. ژن‌های با بیان بیشتر در بیماران نوع حاد با عملکردهای مختلفی مانند تکثیر *Deoxyribonucleic acid (DNA)*، تنظیم سرعت رشد، آنزیم‌های ریپوزومی و میتوکندریال ارتباط داشتند در حالی که ژن‌های با بیان کاهش یافته بیشتر با مولکول‌های ایمنی مرتبط با MHC و فسفاتاز مرتبط بودند.^{۱۱} MHCها خانواده‌ای از پروتئین‌های سطحی سلولی هستند که در ایمنی اختصاصی نقش بسزایی دارند. کلاس یک این پروتئین‌ها شامل آنتی ژن‌های لوکوسیت انسانی یا *A- (HLA) human leukocyte antigen*، B- و C- و بتا ۲ میکروگلوبولین ($\beta 2M$) می‌شود که پاسخ‌های ایمنی مرتبط با سلول‌های *T CD8+* را تنظیم می‌نمایند.^{۱۲} حذف این پروتئین‌ها در بدخیمی‌های مختلفی دیده شده چرا که منجر به فرار از دستگاه ایمنی می‌شود.^{۱۳، ۱۴} Kataoka et al در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که ۵۴٪ از بیماران ATLL دچار اختلالاتی در مجموعه MHC I هستند که نشان دهنده نقش فرار از دستگاه ایمنی به واسطه حذف این مولکول‌ها در بیماری زایی ATLL می‌باشد.^{۱۵}

References

- Ishitsuka K, Tamura K. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *The Lancet Oncology*. 2014;15(11):e517-e526.
- Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, et al. Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription. *Microbes Infect*. Apr 2009;11(4):500-8. doi:10.1016/j.micinf.2009.02.003
- Setoyama M, Katahira Y, Kanzaki T. Clinicopathologic analysis of 124 cases of adult T-cell leukemia/lymphoma with cutaneous manifestations: the smouldering type with skin manifestations has a poorer prognosis than previously thought. *The Journal of dermatology*. 1999;26(12):785-790.
- Sakihama S, Karube K. Genetic Alterations in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Novel Discoveries with Clinical and Biological Significance. *Cancers (Basel)*. May 12 2022;14(10)doi:10.3390/cancers14102394
- Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol*. Nov 1991;79(3):428-37. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb08051.x
- Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, et al. Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Oncol*. May 10 2012;30(14):1635-40. doi:10.1200/JCO.2011.38.2101
- Marçais A, Suarez F, Sibon D, Frenzel L, Hermine O, Bazarbachi A. Therapeutic options for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Current oncology reports*. 2013;15(5):457-464.
- Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. Jul 27 2017;130(4):410-423. doi:10.1182/blood-2017-02-734541
- Kogure Y, Kataoka K. Genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. Sep 2017;108(9):1719-1725. doi:10.1111/cas.13303
- Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. Jun 16 2016;534(7607):402-6. doi:10.1038/nature18294
- Tsukasaki K, Tanosaki S, DeVos S, et al. Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia/lymphoma by using oligonucleotide microarrays. *Int J Cancer*. May 10 2004;109(6):875-81. doi:10.1002/ijc.20028
- Takeuchi M, Miyoshi H, Ohshima K. Tumor microenvironment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2021;61(4):202-209. doi:10.3960/jslrt.21007
- Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest*. Jun 15 1998;101(12):2720-9. doi:10.1172/JCI498
- Momburg F, Moller P, Moldenhauer G, Hammerling GJ. Loss of HLA-A,B,C in colorectal carcinoma is related to the degree of de-differentiation. *J Immunogenet*. Apr-Jun 1986;13(2-3):195-9. doi:10.1111/j.1744-313x.1986.tb01101.x
- Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*. Nov 2015;47(11):1304-15. doi:10.1038/ng.3415
- Ohshima K. Molecular Pathology of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Oncology*. 2015;89 Suppl 1:7-15. doi:10.1159/000431058
- Kogure Y, Kameda T, Koya J, et al. Whole-genome landscape of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. Feb 17 2022;139(7):967-982. doi:10.1182/blood.2021013568
- Chaib-Mezrag H, Lemacon D, Fontaine H, et al. Tax impairs DNA replication forks and increases DNA breaks in specific oncogenic genome regions. *Mol Cancer*. Sep 4 2014;13:205. doi:10.1186/1476-4598-13-205

19. Moles R, Bai XT, Chaib-Mezrag H, Nicot C. WRN-targeted therapy using inhibitors NSC 19630 and NSC 617145 induce apoptosis in HTLV-1-transformed adult T-cell leukemia cells. *J Hematol Oncol.* Nov 9 2016;9(1):121. doi:10.1186/s13045-016-0352-4

Determining the key genes and cellular signaling pathways involved in the pathogenesis and development of aggressive types of adult leukemia/lymphoma derived from T (ATLL) cells

Received: 24 Jun 2023; Accepted: 28 Aug. 2023

Mohammad-Moien Forghani-Ramandi¹,
Sayed-Hamidreza Mozhgani²

1- Student Research Committee, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
2- Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Abstract

Background: Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is a cancer with a very poor prognosis. ATLL has four subgroups, acute, chronic, lymphoma, and smoldering, with very different prognoses. In this study, we tried to better understand the pathogenesis of ATLL and the differences between its subgroups by using gene expression data and bioinformatics methods.

Methods: Genes with altered expression were identified among different types of ATLL. In order to determine the key genes, the network of protein interactions between the resulting genes was constructed. After screening the hub genes based on the network centrality indices, the cell signaling pathways related to them were identified.

Results: Comparing the acute type with the chronic and silent types, the cell signaling pathways involved in regulating the function of the immune system are expressed differently. In comparison of acute and chronic type with healthy people, genes related to malignancy are involved. In comparing the silenced type with healthy individuals, the pathways related to infections are disrupted. In the secondary comparison, it was found that the genes related to cell proliferation and malignancy in the acute form were expressed more and the genes related to the immune system were less expressed in these patients than in the rest of the population.

Conclusion: It seems that manipulations by the virus resulting in immune escape and also in increased proliferation of infected cells have a decisive role in the occurrence of the aggressive type of the disease. Further investigations can lead to the development of new diagnostic methods, determining prognosis and even the detection of targets for gene therapy.

Keywords: Adult T-cell leukemia/lymphoma, Human T-cell lymphotropic virus type 1, bioinformatics, ATLL, HTLV-1

Corresponding author:
Sayed-Hamidreza Mozhgani
Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
Phone: +98-912-6618743
Email: hamidrezamozhgani@gmail.com