

A Study of Differential Transcriptome Expression in CD8+ T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia

Mahdieh Darvish-Khezri¹,
 Mohsen Tehrani^{2,3},
 Hossein Ghalehnoei^{4,3},
 Saeid Taghiloo⁵,
 Amir Kahrizi¹,
 Hossein-Asgarian-Orman⁶,
 Abolghasem Ajami^{6,3},
 Reza Valadan^{2,3}

¹ MSc Student in Medical Immunology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
² Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
³ Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
⁴ Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
⁵ Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
⁶ Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 2, 2024; Accepted November 1, 2024)

Abstract

Background and purpose: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disorder characterized by the clonal and malignant proliferation of mature B-cells within the peripheral blood, bone marrow, and secondary lymphoid tissues. In chronic infections and cancers, T-cells become exhausted due to continuous antigen exposure. This uncontrolled tumor cell growth creates an environment that lacks sufficient oxygen, nutrients, and physical space for normal cells, referred to as the tumor microenvironment. The tumor microenvironment employs multiple mechanisms to suppress the immune system, affecting metabolic pathways in both T-cells and tumor cells. Consequently, inhibitory receptors on T-cells and their ligands on tumor cells are upregulated, leading to reduced proliferation, cytotoxicity, and production of effector cytokines, such as interferon-gamma, by T-cells. T-cell exhaustion presents a therapeutic challenge in treating many malignancies, including CLL. In CLL, T-cell exhaustion is observed through the simultaneous upregulation of inhibitory receptors. Given that current therapies for CLL are often associated with side effects, resistance, and relapse, studying transcript changes may assist in designing more effective treatment strategies. This study investigates the transcriptome profile of CD8⁺ T-cells in CLL patients compared to healthy individuals using bioinformatics platforms.

Materials and methods: The keywords used in this study were CLL, CD8, and human. Raw data were initially searched in the SRA database using these keywords. Left and right reads were merged using CLC Genomics Workbench version 21. Following quality control of the data, sequences were assembled using human genome reference data, mRNA sequences, and coding sequences (CDS). Gene expression related to CD8⁺ T-cell exhaustion was then compared between CLL patients and healthy individuals. The analysis results were presented in heatmap and volcano plot formats.

Results: In this study, genes involved in CD8⁺ T-cell exhaustion and differential expression were identified by comparing 11 CLL patients with 11 healthy individuals. The expression levels of 59 selected genes were displayed in volcano plot and heatmap formats. Expression changes in 42 genes were statistically significant (FDR P<0.05), with 18 genes showing increased expression and 24 showing decreased expression in CLL patients compared to healthy controls.

Conclusion: The study found differences in the expression levels of genes involved in CD8⁺ T-cell exhaustion between CLL patients and healthy individuals. Molecules encoded by genes upregulated in CLL may serve as potential targets for developing new therapies. By creating monoclonal antibodies and small molecules to inhibit these targets, it may be possible to counteract T-cell exhaustion, representing a promising advance in the treatment of this phenomenon.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemias; T Cell Exhaustion; CD8-Positive T-Lymphocyte; Transcriptome Analyses; Bioinformatics

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (238): 48-56 (Persian).

Corresponding Author: Reza Valadan - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
 (E-mail: valadan.reza@gmail.com)

مطالعه بیان افتراقی ترانسکریپوم سلول های T-CD8⁺ در لوسمی لنفوسیتی مزمن

مهديه درويش خضري^۱

محسن طهراني^{۳و۲}

حسين قلعه نويي^{۳و۴}

سعید تقی لو^۵

امير كهريزي^۱

حسين عسگرين عمران^۶

ابوالقاسم عجمي^{۳و۶}

رضا ولدان^{۳و۲}

چکیده

سابقه و هدف: لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic Lymphocytic Leukemia: CLL) یک اختلال لنفوپرولیفراتیو است که با گسترش کلونال و بدخیم لنفوسیت های B با فنوتایپ بالغ در خون محیطی، مغز استخوان و بافت های لنفاوی ثانویه مشخص می شود. لنفوسیت های T به دلیل در معرض قرار گرفتن مداوم با آنتی ژن در برابر سرطان ها و عفونت های مزمن، دچار فرسودگی (Exhaustion) می شوند. در واقع رشد بیش از حد سلول های توموری منجر به ایجاد فضایی با کمبود اکسیژن، مواد غذایی و حتی فضای فیزیکی برای سلول های نرمال می شود که به این فضا ریز محیط تومور گفته می شود. در ادامه، ریز محیط تومور برای سرکوب سیستم ایمنی از روش های مختلفی بهره می گیرد که در نتیجه آن مسیرهای متابولیک چه در سلول T و چه در سلول توموری دستخوش تغییر می شوند، در نتیجه گیرنده های مهاری در سطح سلول T و هم زمان لیگاند آن ها در سطح سلول توموری افزایش بیان می یابند. در نهایت سلول T با کاهش توانایی تکثیر، سلول کشی و نیز تولید سایتو کاین های اجرایی مانند اینترفرون گاما همراه است. فرسودگی سلول های T یکی از چالش های درمان بسیاری از بدخیمی ها از جمله CLL است. در CLL پدیده فرسودگی سلول های T به واسطه افزایش بیان همزمان گیرنده های مهاری مشاهده شده است. با توجه به این که روش های درمانی موجود برای بیماران CLL با عوارض جانبی، مقاومت به درمان و عود بیماری همراه هستند، بررسی تغییرات رونوشت می تواند در طراحی استراتژی های درمانی مؤثرتر کمک کننده باشد. در مطالعه حاضر به بررسی پروفایل بیان ژن های رونوشت (Transcriptome) سلول های TCD8⁺، در بیماران مبتلا به CLL در مقایسه با افراد سالم با استفاده از سامانه های بیوانفورماتیکی پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در ابتدا داده های خام با استفاده از این کلمات کلیدی در پایگاه SRA جستجو شدند. در ادامه، توسط نرم افزار CLC Genomics workbench version 21، خوانش های چپ و راست با یکدیگر یکی شدند. بعد از کنترل کیفی داده ها، با توالی رفرنس ژنوم، توالی های mRNA و CDs انسان سرهم (assemble) شدند. سپس بیان ژن های مؤثر در فرسودگی سلول های T-CD8⁺ بین دو گروه بیماران CLL و افراد سالم مورد مقایسه قرار گرفت و در نهایت، خروجی آنالیز به وسیله فرمت های نقشه حرارتی (Heat map) و نمودار آتشفشانی نمایش داده شد.

یافته ها: در این مطالعه، شناسایی ژن های دخیل در فرسودگی T-CD8⁺ و بیان افتراقی براساس مقایسه در دو گروه CLL شامل ۱۱ بیمار و گروه سالم شامل ۱۱ فرد انجام شد. نتایج مربوط به بیان ۵۹ ژن انتخابی در قالب نمودار آتشفشانی و نقشه حرارتی ارائه شد. نتایج نشان داد که بیان ۴۲ ژن تغییرات معنی دار داشتند که در بیماران CLL، ۱۸ ژن بیان بالاتر و ۲۴ ژن بیان پایین تری نسبت به افراد سالم داشتند (FDR P<۰/۰۵).

استنتاج: سطوح بیان ژن های مؤثر در فرسودگی سلول های T-CD8⁺ بین دو گروه بیماران CLL و افراد سالم متفاوت بوده است. مولکول هایی که ژن آن ها دارای افزایش بیان در CLL بوده اند، اهداف بالقوه ای برای طراحی روش های درمانی جدید پیشنهاد می شود. در واقع با طراحی و تولید آنتی بادی های مونوکلونال و نیز ریزمولکول هایی که قابلیت مهار این مولکول ها را داشته باشند، می توان این مولکول ها و مسیرهای پیام رسانی وابسته به آن ها را مهار نمود که خود گامی در جهت غلبه بر پدیده فرسودگی سلول های T می باشد.

واژه های کلیدی: لوسمی لنفوسیتی مزمن، فرسودگی سلول T، سلول T-CD8⁺، آنالیز رونوشت، بیوانفورماتیک

E-mail: valadan.reza@gmail.com

مؤلف مسئول: رضا ولدان - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبراعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۸/۱۲

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic Lymphocytic Leukemia: CLL) یک اختلال لنفوپرولیفراتیو است که با گسترش کلونال و بدخیم لنفوسیت‌های B با فوتوتایپ بالغ در خون محیطی، مغز استخوان و بافت‌های لنفاوی ثانویه مشخص می‌شود. این بیماری شایع‌ترین لوسمی در کشورهای توسعه یافته است، به طوری که در سال ۲۰۲۳ در ایالات متحده آمریکا حدود ۲۰۳۸۰ مورد جدید شامل ۶۶۱۰ زن و ۱۲۱۳۰ مرد و هم‌چنین ۴۴۹۰ مورد مرگ و میر گزارش شده است (۱-۴). این بیماری بیش‌تر در افراد مسن با میانگین سنی ۷۰ سال دیده می‌شود، و شیوع آن در مردان دو برابر زنان است (۴-۶). بیماری CLL شروع آرام و بسیار کندی دارد و بسیاری از افراد در ابتدا هیچ علامتی ندارند که با پیشرفت بیماری علائم نمایان می‌شود (۱، ۷، ۸)، بنابراین نیاز است که تا زمان پیشرفت بیماری نظارت شوند (۱). به کار بردن روش‌های درمانی مناسب برای هر یک از این بیماران به مواردی مانند شمارش گلبول قرمز، گلبول سفید، پلاکت، وضعیت غدد لنفاوی، کبد، طحال، سن بیمار، بیماری‌های زمینه‌ای در زمان تشخیص و غیره بستگی دارد (۷). اقدامات درمانی مختلفی برای بیماران مبتلا به CLL وجود دارد که شامل شیمی‌درمانی (آنالوگ‌های پورین و عوامل آلکیله‌کننده)، پرتودرمانی، ایمونوتراپی (مانند تجویز آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD20 یا CD52، مهارکننده BCL2 و مهارکننده‌های سیگنال‌دهی BCR) می‌باشد (۷، ۹). روش‌های درمانی ذکر شده عوارض جانبی قابل توجهی را به همراه دارند و نیز مقاومت به درمان و عود بیماری در افراد نیز مشاهده شده است (۹).

در جریان عفونت‌های مزمن و سرطان‌ها سیستم ایمنی به دلیل در معرض قرار گرفتن مداوم با آنتی‌ژن، دچار فرسودگی (Exhaustion) می‌شود (۱۰). این فرآیند با کاهش تکثیر، تولید سایتوکاین و سلول‌کشی (Cytotoxicity) سلول‌های T همراه است. در این راستا بیان گیرنده‌های مهارتی سیستم ایمنی در سطح سلول‌های

T و لیگاند آن‌ها در سطح سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. یکی از بهترین راه‌کارها برای مقابله با این پدیده و برگرداندن فعالیت سلول‌کشی سلول‌های T هدف قرار دادن مسیرهای پیام‌رسانی مهارتی این گیرنده‌هاست (۱۱). در CLL نیز فرسودگی سلول‌های T به واسطه افزایش بیان همزمان گیرنده‌های مهارتی شامل PD-1، CTLA-4، TIM3 و LAG3 گزارش شده است (۱۲) و نشان داده شده است که افزایش بیان گیرنده‌های مهارتی در سلول‌های T-CD8⁺ در بیماران مبتلا به CLL منجر به کاهش تشکیل سیناپس، ظرفیت تکثیر و سلول‌کشی می‌شود (۱۳). هم‌چنین افزایش بیان PD-L1 که لیگاند PD-1 می‌باشد در سلول‌های بدخیم CLL مشاهده شده است (۱۴). به‌علاوه، در بیماری CLL، افزایش هم‌زمان بیان گیرنده‌های PD-1 و TIM-3 بر روی لنفوسیت‌های T و بیان لیگاند‌های آن‌ها بر روی سلول‌های B بدخیم دیده شده است (۱۵، ۱۶) اما در مورد اثرات رویکردهای درمانی بر پایه مهار این گیرنده‌ها در بیماران CLL یافته‌های ناسازگار گزارش شده است و نیازمند بررسی‌های بیش‌تر است (۱۲).

تجزیه و تحلیل رونوشت (Transcriptome) ژنومی دید گسترده‌ای از تغییر بیولوژی سلول‌های طبیعی در تبدیل و پیشرفت به سمت سلول‌های سرطانی ارائه می‌دهد (۱۷). با توجه به این که مطالعات ژنومی مختلفی برای بررسی تغییرات رونوشت در CLL انجام شده است می‌توان آن را به عنوان روش جدیدی برای نشانگرهای بالقوه و اهداف درمانی در نظر گرفت (۱۸). به‌عنوان مثال، پژوهش‌های گسترده‌ای در خصوص تغییرات پروفایل بیان ژن لنفوسیت‌های T-CD4⁺ و T-CD8⁺ در خون محیطی بیماران CLL در مقایسه با افراد سالم، با استفاده از روش میکروآرای (Microarray) انجام شده است (۱۹، ۲۰). نتایج این بررسی‌ها می‌تواند در آینده منجر به طراحی استراتژی‌های درمانی جدیدی با هدف افزایش فعالیت ضد توموری سلول‌های T-CD8⁺ در بیماران مبتلا به CLL گردد. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی پروفایل

یافته‌ها

شناسایی ژن‌های دخیل در فرسودگی سلول‌های $T-CD8^+$ در این مطالعه شناسایی ژن‌ها و بیان افتراقی آن‌ها براساس مقایسه در دو گروه شامل ۱۱ بیمار مبتلا به CLL و ۱۱ فرد سالم انجام شد. نمودار آتشفشانی (Volcano plot) ارائه شده (نمودار شماره ۱) بیان متفاوت ژن‌های مرتبط با فرسودگی سلول‌های T را به تصویر می‌کشد. در میان تمامی ژن‌های موجود، ۵۹ ژن مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۱) که ۴۲ ژن دخیل در فرسودگی تفاوت بیان معنی‌داری ($FDR P < 0.05$) بین بیماران CLL و افراد سالم نشان دادند (نمودار شماره ۱) به طوری که ۱۸ ژن دارای بیان بالاتر و ۲۴ ژن دارای بیان پایین‌تر بودند. این تغییر \log_2 fold change (محور x) را در برابر $-\log_{10} P$ -value (محور y) برای هر ژن را نشان می‌دهد و امکان شناسایی میزان بیان ژن‌ها را فراهم می‌کند. همان‌طور که در نمودار آتشفشانی دیده می‌شود، ژن‌های *SLAMF6*، *ENTPD1*، *KDM6B*، *IL2RA*، *D276* و *ARID2* به صورت معنی‌داری افزایش بیان داشتند، در حالی که ژن‌های *HAVCR2*، *ITGAEID2*، *STAT5*، *EOMES*، *LAG3*، *EID2*، *GZMB*، *TOX*، *FOXO1* و *STAT3* کاهش بیان معنی‌داری داشتند.

بررسی بیان افتراقی ژن‌ها:

نقشه حرارتی (Heat map) یک نمودار کیفی است که میزان بیان ژن مرتبط با فرسودگی سلول T را ارائه می‌دهد. تنظیم مثبت ژن‌های خاص و کاهش سایر ژن‌ها نقش بالقوه آن‌ها را در این فرآیند برجسته می‌کند. همان‌طور که در نقشه حرارتی مشاهده می‌شود، میزان بیان ژن‌های *ARID2*، *EMTPD1*، *B3GAT1* و *BTLA* افزایش معنی‌داری در بیماران CLL نسبت به افراد سالم داشته است، حال آن‌که ژن‌های *CD27*، *ATOX1*، *EID2*، *EOMES*، *IL10* و *ITGAE* کاهش معنی‌داری را نشان داده‌اند (نمودار شماره ۲).

بیان رونوشت (Transcriptome) سلول‌های $T-CD8^+$ ، بیماران مبتلا به CLL در مقایسه با افراد سالم با استفاده از سامانه‌های بیوانفورماتیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جستجو داده‌ها:

در ابتدا داده‌های مورد نظر پس از کسب کد اخلاق در پژوهش (IR.MAZUMS.REC.1402.673)، با استفاده از کلمات کلیدی CLL و $CD8^+$ از سایت NCBI در پایگاه SRA جستجو شدند. داده‌های مرتبط مورد بررسی قرار گرفتند و سپس داده‌های خام توسط نرم‌افزار CLC Genomics workbench version 21 دانلود شد و خوانش‌های چپ و راست با یکدیگر یکی شدند.

کنترل کیفی داده‌ها:

داده‌ها از نظر معیارهای کنترل کیفی شامل موارد زیر بوده که مورد ارزیابی قرار گرفتند: Per base sequence quality, Per tile sequence quality, Per sequence quality scores, Per base sequence content, Per sequence GC content, Per base N content, Sequence Length Distribution, Sequence Duplication Levels, Overrepresented sequences, Adapter Content

سرهم کردن داده‌ها (assembling):

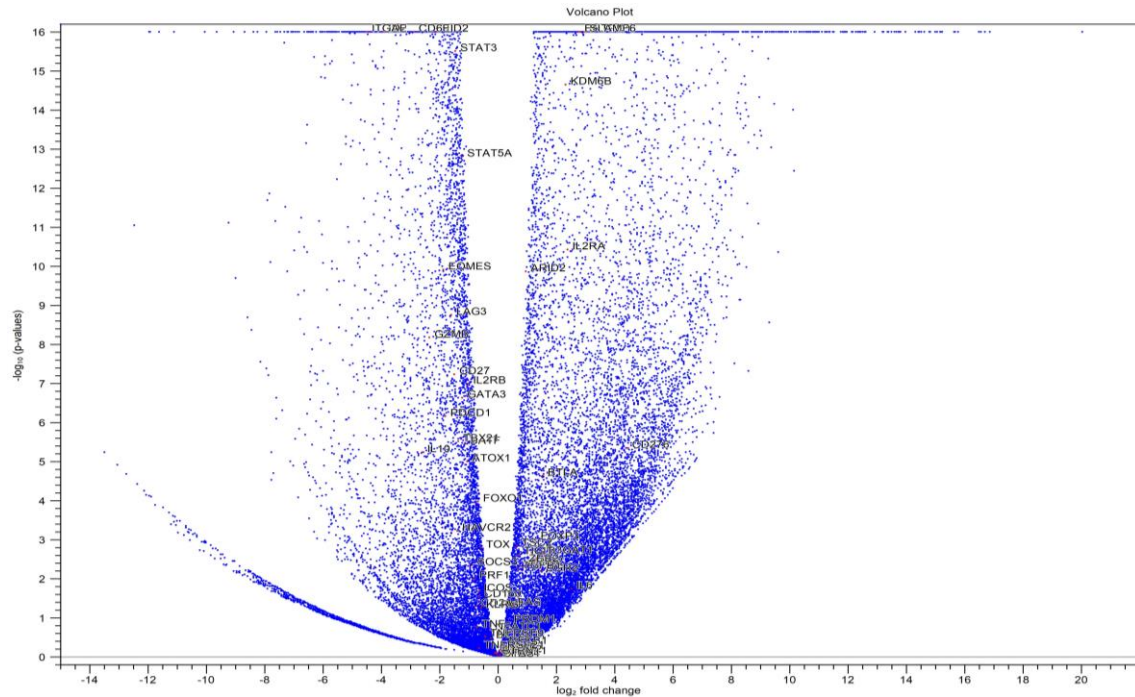
داده‌ها با توالی رفرانس ژنوم، mRNA و CDS انسان سرهم شدند و سپس مورد بررسی کنترل کیفیت قرار گرفتند.

بررسی پایگاه داده ژن‌های ضروری (Database of Essential Genes: DEG):

داده‌های سرهم شده در گروه بیمار و سالم از نظر بیان ژن‌هایی که در فرسودگی سلول‌های $T-CD8^+$ مورد بررسی قرار گرفت، و سپس خروجی آن در قالب نمودار آتشفشانی و نمودار حرارتی نمایش داده شد.

جدول شماره ۱: فهرست تغییرات بیان ژن‌های انتخاب شده براساس Fold change و FDR P-value

FDR P-value	سطح معنی داری	Fold change	Log ₂ fold change	کروموزوم	نام ژن
۱/۹۹E-۸۸	۹/۹۹۵۸۷E-۹۱	-۲۲/۵۴۸۰۰۶۲۷	-۴/۴۹۴۹۷۹۱۵۵	۱۷	ITGAE
۷/۴۵E-۸۱	۴/۸۱۳۷۱E-۸۳	-۱۵/۱۷۴۸۳۹۶۸	-۳/۹۲۳۶۰۹۳۵۱	۲	ID2
۲/۸۶E-۳۳	۱/۰۳۲۵E-۳۴	۷/۷۸۵۱۷۹۳۷۴	۲/۹۶۰۷۳۰۲۸	۱	SLAMF6
۴/۱۲E-۲۶	۲/۱۴۰۶۴E-۲۷	-۷/۴۸۵۰۰۵۵۶۷	-۲/۹۰۴۰۰۳۳۸۹	۱۲	CD69
۲/۲۲E-۲۲	۱/۸۸۷۷E-۲۳	-۴/۱۵۵۶۴۰۲۳۲	-۲/۰۵۵۰۷۰۷۶۱	۱۹	EID2
۱/۱۵E-۲۰	۷/۶۹۴۱۶E-۲۲	۶/۹۳۹۸۹۰۱۷۷	۲/۷۹۹۱۲۸۳۲	۱۰	ENTPD1
۳/۰۹E-۱۶	۲/۰۰۹۰۸E-۱۷	-۲/۷۲۲۳۸۶۵۶۴	-۱/۴۴۸۷۱۹۳۶	۱۷	STAT3
۲/۲۴E-۱۵	۲/۰۰۸۸E-۱۶	۴/۹۸۰۹۹۳۴۵	۲/۳۱۶۳۴۴۶۲	۱۷	KDM6B
۱/۶E-۱۳	۱/۶۷۱E-۱۴	-۲/۳۳۱۱۲۲۲۷۵	-۱/۲۲۱۰۲۶۸۰	۱۷	STAT5A
۳/۸۲E-۱۱	۴/۸۲۴۵E-۱۲	۵/۲۷۶۶۵۱۶۸	۲/۳۹۹۵۱۷۰۷۲	۱۰	IL2RA
۱/۲۷E-۱۰	۱/۶۵۹۱۶E-۱۱	-۳/۶۸۷۴۶۶۵	-۱/۸۶۷۰۰۱۸	۳	EOMES
۱/۳۶E-۱۰	۱/۷۹۲۹E-۱۱	۱/۹۴۳۰۰۹۴۴۴	۰/۹۵۸۲۹۲۹۱۳	۱۲	ARID2
۱/۷۸E-۰۹	۲/۵۹۸۱۹E-۱۰	-۳/۰۰۹۸۰۸۶۹۵	-۱/۵۸۹۶۷۱۷۹۲	۱۲	LAG3
۶/۷۱E-۰۹	۱/۰۴۰۹E-۰۹	-۵/۰۷۵۷۶۸۱۷۳	-۲/۳۴۳۶۱۷۸	۱۴	GZMB
۵/۹E-۰۸	۱/۰۰۵۵E-۰۸	-۲/۷۹۲۹۱۴۵۸۳	-۱/۴۸۱۷۷۱۴۵۲	۱۲	CD27
۱/۰۴E-۰۷	۱/۸۴۲۸E-۰۸	-۲/۰۰۹۰۰۲۳۷۶	-۱/۰۰۶۶۹۲۷۱	۲۲	IL2RB
۲/۳۷E-۰۷	۴/۳۶۶۳E-۰۸	-۲/۳۰۱۱۵۳۰۶۹	-۱/۲۰۲۳۵۶۹۵۳	۱۰	GATA3
۶/۸۸E-۰۷	۱/۳۳۸۱E-۰۷	-۳/۴۹۰۲۰۸۳۲۵	-۱/۸۰۳۳۱۳۱۵۱	۲	PDCD1
۳/۰۷E-۰۶	۶/۵۳۳۸E-۰۷	-۲/۵۸۶۸۷۱۳۶	-۱/۳۷۰۱۰۱۲۹	۱۷	TBX21
۳/۵۸E-۰۶	۱/۶۹۸۵۴E-۰۷	-۲/۱۷۳۳۳۱۵۴	-۱/۱۲۰۳۰۶۷۸۳	۱۴	BATF
۴/۴۸E-۰۶	۹/۷۱۱۵E-۰۷	۲/۱۹۴۰۱۸۹۹۲	۴/۴۵۵۵۰۴۱۰۹	۱۵	CD276
۵/۷۶E-۰۶	۱/۲۶۸۳E-۰۶	-۶/۰۵۰۵۲۳۴۷۶	-۲/۵۹۷۰۵۹۹۶۶	۱	IL10
۱E-۰۵	۲/۸۸۰۶E-۰۶	-۲/۰۶۳۵۲۸۹۳۲	-۱/۰۴۵۱۱۳۶۶۶	۵	ATOX1
۲/۳۶E-۰۵۳	۵/۷۱E-۰۶	۲/۹۰۳۸۴۱۵۲	۱/۵۳۹۶۲۵۸۶	۳	BTLA
۰/۰۰۰۱۰۵	۲/۸۲۳۸E-۰۵	-۱/۶۰۲۴۷۳۸۳۵	-۱/۶۸۰۳۰۰۸۰۱	۱۳	FOXO1
۰/۰۰۰۶۰۸	۰/۰۰۰۱۸۷۹۵۸	-۲/۶۰۹۸۳۵۳۷	-۱/۳۸۳۶۰۵۵۴	۵	HAVCR2
۰/۰۰۰۱۰۰۴	۰/۰۰۰۳۳۳۰۲	۲/۴۴۶۵۳۷۷۷۱	۱/۲۹۰۷۷۴۵۳	X	FOXP3
۰/۰۰۰۱۴۸	۰/۰۰۰۴۹۵۳۷	۱/۵۷۶۲۳۲۷۴۷	۰/۶۵۶۶۸۰۵۷۹	۱۶	TSC2
۰/۰۰۰۱۶۱۷	۰/۰۰۰۵۴۵۳۱۴	-۱/۴۶۹۱۷۴۴۳	-۱/۵۵۵۵۵۵۵۵۳	۸	TOX
۰/۰۰۰۲۳۱۹	۰/۰۰۰۸۱۲۲۲۹	۲/۹۴۴۴۲۲۲۲	۱/۵۵۹۸۴۵۶۶	۱۱	B3GAT1
۰/۰۰۰۲۳۸	۰/۰۰۰۹۳۵۹۴۴	۱/۶۵۷۰۸۰۳۹	۰/۷۲۸۶۳۵۹۴	۳	TIGIT
۰/۰۰۰۳۶۹۸	۰/۰۰۰۱۳۶۴۳۷	۱/۸۷۱۰۶۱۷۰۸	۰/۹۰۳۸۵۷۱۴	۲	ZEB2
۰/۰۰۰۴۴۷۲	۰/۰۰۰۱۶۷۰۰۷۹	۲/۱۲۳۷۹۵۲۹	۱/۰۸۶۶۱۳۶۲۷	X	MID2
۰/۰۰۰۴۵۲۶	۰/۰۰۰۱۶۹۲۴۹	-۱/۸۴۱۵۹۳۳۲۲	-۱/۸۸۰۹۵۴۵۱۵	۱۷	SOCS3
۰/۰۰۰۴۹۴۳	۰/۰۰۰۱۸۶۵۴۹	۱/۸۱۸۵۷۸۴۱	۰/۸۶۲۸۱۱۷۲۲	۶	IRF4
۰/۰۰۰۵۶۱۲	۰/۰۰۰۲۱۴۴۹۴۷	۱/۶۲۳۷۵۷۷۱۲	۰/۷۰۳۰۵۷۸۹۳	۱۹	TGFB1
۰/۰۰۰۶۶۶۹	۰/۰۰۰۲۵۰۹۳۶۷	۲/۸۰۳۶۳۹۵۹۹	۱/۴۸۷۳۰۰۹۰۶	۱۰	EGR2
۰/۰۰۰۹۸۷۳	۰/۰۰۰۴۰۰۸۳۹۷	-۱/۷۵۶۷۸۵۰۲	-۱/۸۱۲۹۴۰۵۱۷	۱۰	PRF1
۰/۰۰۱۸۰۱۴	۰/۰۰۰۷۸۵۰۲۸۹	۵/۸۲۱۰۷۹۲۷۷	۲/۵۴۱۲۸۶۶۶۶	۷	IL6
۰/۰۰۲۱۳۱۲	۰/۰۰۰۹۴۴۷۱۴۲	-۱/۵۵۲۷۱۰۶۹	-۱/۶۳۳۷۸۹۰۴۳	۲	ICOS
۰/۰۰۲۹۹۲۴	۰/۰۰۰۱۳۶۹۳۸۱	-۱/۵۵۷۹۵۱۱۸۷	-۱/۶۳۹۶۵۰۰۳۲	۱	CD160
۰/۰۰۴۸۶۲۶	۰/۰۰۰۲۳۹۷۳۸۲	۱/۴۵۲۲۲۰۲۱	۰/۵۱۱۸۶۶۸	۱۰	FAS
۰/۰۰۵۱۵۹۳	۰/۰۰۰۲۵۵۹۳۰۷۷	-۱/۶۸۰۷۲۳۴۹۸	-۱/۷۴۹۰۸۲۴۰۱	۱	CD244
۰/۰۰۵۸۰۲۷	۰/۰۰۰۲۹۲۸۱۷۶۲	-۱/۴۹۶۹۸۵۷۶۳	-۱/۵۸۲۰۶۰۵۰۱	۱۲	KLRG1
۰/۰۰۱۳۱۴۲۱	۰/۰۰۰۷۵۹۷۳۵۱	۱/۳۱۹۰۵۷۱۴۱	۰/۳۹۹۵۰۷۰۶۳	۶	PRDM1
۰/۰۰۱۷۸۷۵۹	۰/۰۰۰۷۴۴۳۷۸۲	-۱/۶۳۴۱۲۶۶۰۹	-۱/۷۰۸۵۱۹۷۶۵	۶	TNF
۰/۰۰۲۰۲۷۱۸	۰/۰۰۰۲۴۸۷۱۶۴۷	-۱/۲۰۵۰۹۲۹۷	-۱/۲۶۹۱۴۴۴۵۱	۱۸	NFATC1
۰/۰۰۳۰۸۶۷۴	۰/۰۰۰۴۴۵۵۵۷۵	-۱/۴۶۲۷۰۶۸۱۷	-۱/۴۴۶۶۵۲۰۴	۱	TNFRSF9
۰/۰۰۳۳۸۳	۰/۰۰۰۲۲۷۵۲۱۰۲۷	-۱/۱۶۷۰۸۶۴۲۹	-۱/۲۲۲۹۱۱۴۰۴	۲	BCL2L11
۰/۰۰۴۸۶۵۴۶	۰/۰۰۰۳۳۵۸۷۹۶۲	۱/۱۶۲۰۵۲۸۳۸	۰/۲۱۶۶۷۵۶۶۹	۴	NFKB1
۰/۰۰۶۰۱۷۷۳	۰/۰۰۰۴۹۷۰۴۷۵۱۱	-۱/۵۶۶۳۷۸۷۴۳	-۱/۶۲۸۸۹۳۷۱۱	۶	TNFRSF21
۰/۰۰۷۱۸۳۶۳	۰/۰۰۰۶۳۹۱۷۸۰۸۶	۱/۱۱۷۷۱۶۲۳۴	۰/۱۶۰۵۵۳۹۶۳	۶	NT5E
۰/۰۰۷۵۱۶۹۷	۰/۰۰۰۴۶۴۴۷	۱/۰۰۵۴۶۶۶۴۹	۰/۰۰۷۶۳۳۹۵۸۷	۲	CD28
۰/۰۰۷۸۴۳۸۴	۰/۰۰۰۷۴۰۶۷۱۸۰۷	-۱/۰۰۳۵۹۱۶۰۳۸	-۱/۰۰۵۰۹۰۷۰۷۶	۶	JARID2
۰/۰۰۸۲۴۱۱۹	۰/۰۰۰۸۷۸۷۲۴۸۵	-۱/۰۰۵۵۶۸۷۴۴۹	-۱/۰۰۷۸۱۸۲۷۶۸	۹	CD274
۰/۰۰۸۵۱۶۲۴	۰/۰۰۰۸۱۸۷۹۲۲۷۸	-۱/۰۰۳۲۴۸۳۹۴	-۱/۰۰۳۳۱۸۸۶۶	۱۲	PTPN11
۰/۰۰۸۸۷۱۶	۰/۰۰۰۸۶۲۶۳۸۴۶	۱/۰۰۴۸۳۶۶۲۴	۰/۰۰۶۸۱۳۷۸۲۵	۱۴	NID2
۰/۰۰۹۷۹۸۴۱	۰/۰۰۰۹۷۴۰۱۷۷۴۷	۱/۰۰۵۶۲۶۸۸۶	۰/۰۰۸۰۹۵۱۲۷	۱۷	PFAS
۰/۰۰۹۹۲۲۶۹	۰/۰۰۰۹۹۰۱۶۱۷۱۱	۱/۰۰۰۲۲۰۷۳۰۸	۰/۰۰۳۱۸۰۹۶۳	۲	CTLA4

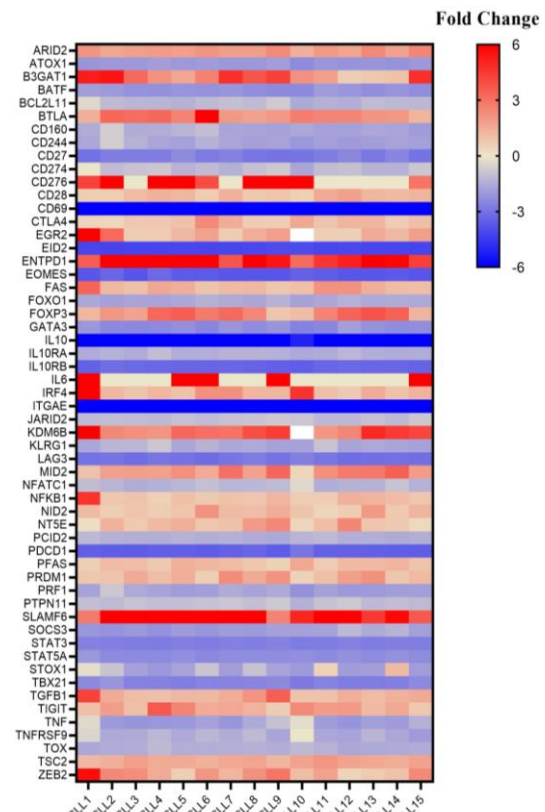


نمودار شماره ۱: نمودار آتشفشانی انتخابی ژن‌ها براساس مقایسه دو گروه بیمار و سالم. همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد، ژن‌های SLAMF6، ITGAEID2، HAVCR2، ARID2 و IL2RA، D276، KDM6BC، ENTPD1 به صورت معنادار افزایش بیان داشتند، درحالی‌که ژن‌های STAT3، FOXO1، TOX، GZMB، EID2، LAG3، EOMES، STAT5، CD69 کاهش بیان معناداری داشتند.

ژن و هر ستون نشان‌دهنده یک نمونه است. همچنین شدت رنگ سطح بیان ژن را نشان می‌دهد، رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان و رنگ آبی نشان‌دهنده کاهش بیان ژن است. در این نقشه حرارتی، میزان بیان ژن‌های ARID2، B3GAT1، ENTPD1 و BTLA افزایش معنی‌داری در بیماران CLL نسبت به افراد سالم داشته است، حال آن‌که ژن‌های ATOX1، CD27، CD68، EID2، EOMES، IL10 و ITGAE کاهش معنی‌داری را نشان داده‌اند.

بحث

بیماری CLL به عنوان یک اختلال لنفوپرولیفراتیو است که علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته در تشخیص و درمان، جنبه‌های ژنتیکی و سبب‌شناسی آن به منظور دستیابی به روش‌های درمانی مؤثرتر، هنوز کاملاً مشخص نشده است (۲۱). یکی از چالش‌های درمان این بیماران، فرسودگی سلول‌های T است. در واقع در جریان سرطان‌ها و عفونت‌های مزمن، سیستم ایمنی بدن و به ویژه سلول‌های T به دلیل در معرض قرار گرفتن مداوم با آنتی‌ژن، دچار فرسودگی می‌شود (۱۲). ارزیابی



نمودار شماره ۲: نقشه حرارتی ارائه شده میزان بیان ژن‌های مرتبط با فرسودگی سلول T در بیماران CLL. هر ردیف نشان‌دهنده یک

ژن‌ها و سایر مولکول‌های دخیلی در فرسودگی سلول‌های T در یافتن اهداف درمانی جدید برای سرطان‌ها کمک‌کننده خواهد بود. در این مطالعه، داده‌های خام بیان ژن از پایگاه داده SRA استخراج شد و ژن‌هایی که در فرسودگی سلول‌های T-CD8⁺ نقش دارند شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه نتایج آنالیز به صورت نمودار آتشفشانی و نقشه حرارتی گزارش شد. ژن‌های متعددی از جمله PDCD1 که ژن مربوط به گیرنده مهاری PD-1 است و همچنین ژن گیرنده مهاری LAG3 کاهش بیان، اما ژن گیرنده‌های مهاری TIGIT و BTLA افزایش بیان داشتند. در همین راستا، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱، توسط حاجی اصغر شرباف و همکاران انجام شد، با استفاده از فلوسایتومتری به بررسی بیان هم‌زمان PD-1/TIGIT و PD-1/LAG-3 در سلول‌های T-CD8⁺ بیماران CLL پرداختند. درصد سلول‌های T-CD8⁺PD-1⁺TIGIT⁺ در بیماران CLL به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه شاهد سالم، ولی درصد سلول‌های T-CD8⁺PD-1⁺LAG-3⁺ در بیماران CLL به‌طور معناداری پایین‌تر از گروه شاهد سالم بود (۲۲). هم‌چنین در مطالعه M'Hidi و همکارانش در سال ۲۰۰۹، با استفاده از ترکیبی از روش‌های ایمونوهیستوشیمی و فلوسایتومتری افزایش بیان BTLA در بیماران CLL را گزارش کردند که این نتیجه هم‌راستا با نتیجه پژوهش حاضر می‌باشد (۲۳)، در حالی که مطالعه Song و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که بیان BTLA در سرطان کولورکتال (CRC) در مقایسه با بافت طبیعی مربوطه کم‌تر بود و ارتباط نزدیکی با سلول‌های T-CD8⁺، سلول‌های Tfh، سلول‌های B و سلول‌های NK در CRC دارد. هم‌چنین بیان پایین BTLA با بقای کلی پایین در کوهورت‌های اطلس ژنوم سرطان (TCGA) و کوهورت‌های بیان ژن Omnibus مرتبط بود (۲۴). هم‌چنین Liu و همکارانش در سال ۲۰۲۰ که به بررسی سطوح بیان CTLA4 و PD-1 به‌عنوان

عوامل مهمی در تومورزایی و ایمنی تومور، در ۳۳ سرطان مختلف با استفاده از اطلس ژنوم سرطان (TCGA) و مجموعه داده‌های دایره‌المعارف رده سلولی سرطان پرداخته بودند، سطوح بیان متفاوتی از PD-1 و CTLA4 در بین رده‌های سلولی سرطانی مشاهده کردند، در حالی که در مطالعه حال حاضر تغییری در بیان CTLA4 مشاهده نشد (۲۵). از جمله ژن‌های مؤثر در فرسودگی TIGIT است که در این مطالعه، افزایش بیان به صورت معنادار مشاهده گردید. در همین راستا در سال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای که توسط Kong و همکاران انجام شد، نشان داده شد که سلول‌های T-CD8⁺ بیماران AML که دارای افزایش بیان TIGIT هستند، پدیده فرسودگی سلول‌های T را نشان می‌دهند. ذکر شده که بین بیان PD-1 و LAG3 و TIGIT وابستگی وجود دارد (۲۶).

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده مسیرهای متابولیکی و بیولوژیکی دخیل در فرآیند فرسودگی سلول‌های T-CD8⁺ در مراحل مختلف بیماری CLL بررسی گردد. با توجه به نتایج این مطالعه و این که داروهای مختلفی از جمله آنتی‌بادی‌های مهارکننده گیرنده‌های مهاری مانند PD-1 و LAG3 به‌منظور تقویت پاسخ‌های لنفوسیت‌های T بسیار مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از اقدامات درمانی مختلف به سلامت کلی بیمار، مرحله CLL و سطح مارکرهای مهاری و ژن‌های کلیدی سیستم ایمنی بیمار بستگی دارد. در پایان می‌توان نتیجه گرفت که در این مطالعه سطوح بیان ژن‌های مؤثر در فرسودگی T-CD8⁺ متفاوت بوده است. این نتایج می‌تواند در آینده در یافتن اهداف درمانی در بیماری CLL مفید باشند.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1402.673 انجام گردیده است.

References

- Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2018; 391(10129): 1524-1537. PMID: 29477250.
- Quinten E, Sepúlveda-Yáñez JH, Koning MT, Eken JA, Pfeifer D, Nteleah V, et al. Autonomous B-cell receptor signaling and genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia-phenotype monoclonal B lymphocytosis in siblings of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2024; 109(3): 824. PMID: 37439337.
- Robak T, Puła A, Braun M, Robak E. Extramedullary and extranodal manifestations in chronic lymphocytic leukemia—an update. *Ann Hematol* 2024; 103(9): 3369-3383. PMID: 39052034.
- Duchesneau ED, McNeill AM, Schary W, Pate V, Lund JL. Prognosis of older adults with chronic lymphocytic leukemia: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare cohort study. *J Geriatr Oncol* 2023; 14(8): 101602. PMID: 37696241.
- Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16(11): 684-701.
- Cronin KA, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program of the National Cancer Institute. *Cancer* 2014; 120: 3755-3757.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries [Internet]: National Cancer Institute (US); 2022. PMID: 26389470.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111(12): 5446-5456. PMID: 18216293.
- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 16096. PMID: 28102226.
- Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22(8): 1856-1864. PMID: 27084739.
- Mognol GP, Spreafico R, Wong V, Scott-Browne JP, Togher S, Hoffmann A, et al. Exhaustion-associated regulatory regions in CD8(+) tumor-infiltrating T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(13): E2776-E2785. PMID: 28283662.
- Ntsethe A, Dlodla PV, Nyambuya TM, Ngcobo SR, Nkambule BB. The impact of immune checkpoint inhibitors in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): A protocol for a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* 2020; 99(28): e21167. PMID: 32664154.
- Peters FS, Strefford JC, Eldering E, Kater AP. T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia from an epigenetic perspective. *Haematologica* 2021; 106(5): 1234-1243. PMID: 33691381.
- Böttcher M, Bruns H, Völkl S, Lu J, Chartomatsidou E, Papakonstantinou N, et al. Control of PD-L1 expression in CLL-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *J Immunother Cancer* 2021; 9(4): e001889. PMID: 33931470.
- Taghiloo S, Allahmoradi E, Tehrani M,

- Hosseini-Nataj H, Shekarriz R, Janbabaei G, et al. Frequency and functional characterization of exhausted CD 8+T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2017; 98(6): 622-631. PMID: 28306177.
16. Taghiloo S, Allahmoradi E, Ebadi R, Tehrani M, Hosseini-Khah Z, Janbabaei G, et al. Upregulation of Galectin-9 and PD-L1 immune checkpoints molecules in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(8): 2269. PMID: 28843266.
17. Ferreira PG, Jares P, Rico D, Gómez-López G, Martínez-Trillos A, Villamor N, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res* 2014; 24(2): 212-226. PMID: 24265505.
18. Zhu Y, Gan X, Qin R, Lin Z. Identification of Six Diagnostic Biomarkers for Chronic Lymphocytic Leukemia Based on Machine Learning Algorithms. *J Oncol* 2022; 2022: 3652107. PMID: 36467501.
19. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1797-1805. PMID: 15965501.
20. Gorgun G, Ramsay AG, Holderried TA, Zahrieh D, Le Dieu R, Liu F, et al. E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(15): 6250-6255. PMID: 19332800.
21. Kobayashi BI, Dias LB, Achermann VC. Chronic Lymphoid Leukemia: a systematic review of its epidemiological, etiological and genetic aspects. *Brazilian Journal of Health Review* 2023; 6(5): 23045-23050.
22. Hajiasghar-Sharbat R, Asgarian-Omran H, Valadan R, Hossein-Nattaj H, Shekarriz R, Zaboli E, et al. CD8+ T-cells Co-expressing PD-1 and TIGIT are highly frequent in chronic lymphocytic leukemia. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2021; 20(6): 751-763.
23. M'Hidi H, Thibult M-L, Chetaille B, Rey F, Bouadallah R, Nicollas R, et al. High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(4): 589-596. PMID: 19762537.
24. Song J, Wu L. Friend or foe: prognostic and immunotherapy roles of BTLA in colorectal cancer. *Front Mol Biosci* 2020; 7: 148. PMID: 32793631.
25. Liu J-N, Kong X-S, Huang T, Wang R, Li W, Chen Q-F. Clinical implications of aberrant PD-1 and CTLA4 expression for cancer immunity and prognosis: a pan-cancer study. *Front Immunol* 2020; 11: 2048. PMID: 33072070.
26. Kong Y, Zhu L, Schell TD, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with CD8+ T-cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12): 3057-3066. PMID: 26763253.