

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

مهدیه درویش خضری^۱

محسن طهرانی^{۳و۲}

حسین قلعه نویی^{۳و۴}

سعید تقی لو^۵

امیر کهریزی^۱

حسین عسگریان عمران^۶

ابوالقاسم عجمی^{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 می یابند. در نهایت سلول T با کاهش توانایی تکثیر، سلول کشی و نیز تولید سایتوکاین 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 $T-CD8^+$ ، 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 ($FDR P < 0.05$).

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 ایمونولوژی، 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 ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. استاد، گروه ایمونولوژی، 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 فوتایپ 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 (۸،۷،۱)، 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 آلکیل‌کننده)، پرتودرمانی، ایمونوتراپی (مانند تجویز آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD20 یا CD52، مهارکننده BCL2 و مهارکننده‌های سیگنال‌دهی BCR) می‌باشد (۹،۷). 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). به علاوه، 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). به عنوان مثال، پژوهش‌های گسترده‌ای درخصوص 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) به‌طوری‌که ۱۸ ژن دارای بیان بالاتر و ۲۴ ژن دارای بیان پایین‌تر بودند. این تغییر $\log_2$ fold change (محور x) را در برابر $-\log_{10} P\text{-value}$ (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 $KDM6B$ ، $ENTPD1$ ، $SLAMF6$ ، $ARID2$ و $IL2RA$ به‌صورت معنی‌داری افزایش بیان داشتند، درحالی‌که ژن‌های $HAVCR2$ ، $LAG3$ ، $EOMES$ ، $STAT5$ ، $CD69$ ، $ITGAEID2$ ، $STAT3$ و $FOXO1$ 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 $BTLA$ و $B3GAT1$ ، $EMTPD1$ ، $ARID2$ و $B3GAT1$ افزایش معنی‌داری در بیماران CLL نسبت به افراد سالم داشته است، حال آن‌که ژن‌های $CD27$ ، $ATOX1$ ، $IL10$ ، $EOMES$ ، $EID2$ ، $CD68$ 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):

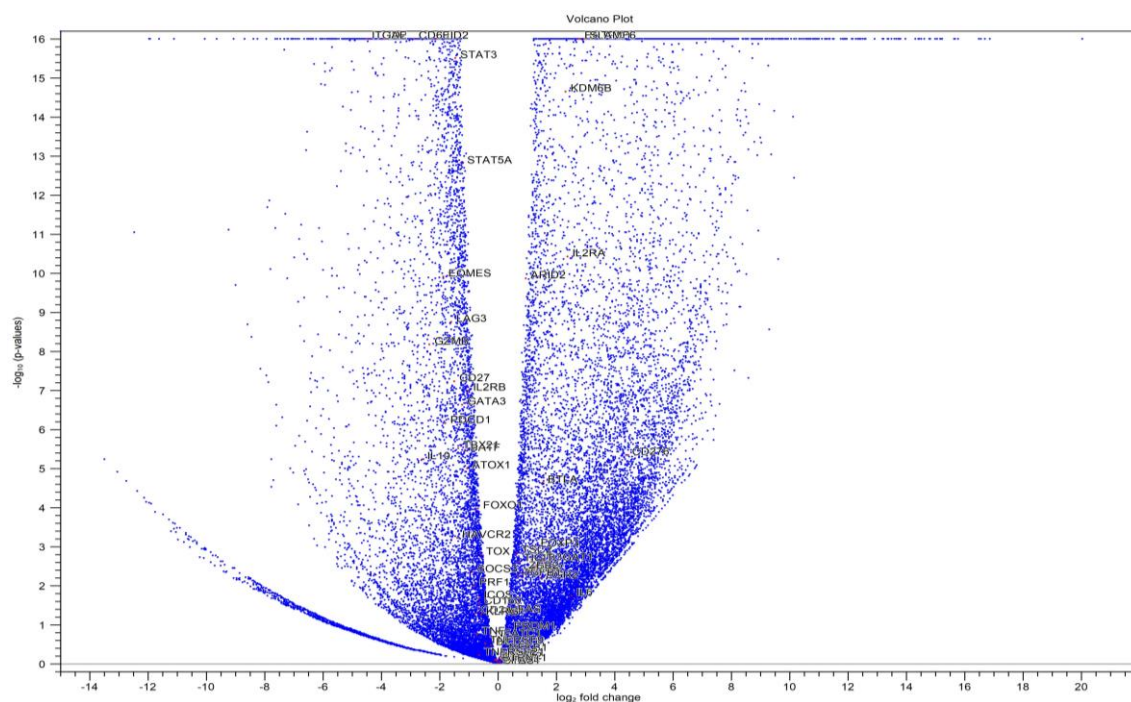
داده‌ها با توالی رفرانس ژنوم، mRNA و CDS انسان سرهم شدند و سپس مورد بررسی کنترل کیفیت قرار گرفتند.

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.

نام ژن	کروموزم	Log ₂ fold change	Fold change	سطح معنی داری	FDR P-value
ITGAE	۱۷	-۴/۴۹۴۹۷۹۱۵۵	-۲۲/۵۴۸۰۶۲۷	۹/۹۹۵۸۷E-۹۱	۱/۹۹E-۸۸
ID2	۲	-۳/۹۲۳۶۰۹۳۵۱	-۱۵/۱۷۴۸۳۹۴۸	۴/۸۱۳۷۱E-۸۳	۷/۴۵E-۸۱
SLAMF6	۱	۲/۹۶۰۷۳۰۲۸	۷/۷۸۵۱۷۹۳۷۴	۱/۰۳۸۲۵E-۳۴	۲/۸۶E-۳۳
CD69	۱۲	-۲/۹۰۴۰۰۳۳۸۹	-۷/۴۸۵۰۰۵۵۶۷	۲/۱۴۰۶۴E-۲۷	۴/۱۲E-۲۶
EID2	۱۹	-۲/۰۵۵۰۷۰۷۶۱	-۴/۱۵۵۶۴۰۲۳۲	۱/۳۸۷۷E-۲۳	۲/۲۲E-۲۲
ENTPD1	۱۰	۲/۷۹۴۹۱۲۸۳۲	۶/۹۳۹۸۹۰۱۷۷	۷/۶۹۴۱۶E-۲۲	۱/۱۵E-۲۰
STAT3	۱۷	-۱/۴۴۴۸۷۱۹۳۶	-۲/۷۲۲۳۸۵۵۶۴	۲/۷۰۹۰۸E-۱۷	۳/۰۹E-۱۶
KDM6B	۱۷	۲/۳۱۶۴۴۴۶۴۲	۴/۹۸۰۹۹۷۴۵	۲/۰۷۰۸۸E-۱۶	۲/۲۴E-۱۵
STAT5A	۱۷	-۱/۲۲۱۰۲۴۶۸	-۲/۳۳۱۱۲۲۲۷۵	۱/۶۷۷۱E-۱۴	۱/۶E-۱۳
IL2RA	۱۰	۲/۳۹۵۱۷۰۷۲	۵/۲۷۶۲۶۵۱۶۸	۴/۸۸۲۴۵E-۱۲	۳/۸۲E-۱۱
EOMES	۳	-۱/۸۶۷۴۰۰۱۸	-۳/۲۶۸۷۴۴۶۲۵	۱/۶۵۹۱۶E-۱۱	۱/۲۷E-۱۰
ARID2	۱۲	۰/۹۵۸۲۹۲۹۱۳	۱/۹۴۳۰۰۹۴۴۴	۱/۷۹۲۹۲E-۱۱	۱/۳۶E-۱۰
LAG3	۱۲	-۱/۵۸۶۷۱۷۹۲	-۳/۰۰۹۸۰۸۶۹۵	۲/۵۹۸۱۹E-۱۰	۱/۷۸E-۰۹
GZMB	۱۴	-۲/۳۴۳۶۲۱۷۸	-۵/۰۷۵۶۸۱۷۳	۱/۰۴۰۹E-۰۹	۶/۷۱E-۰۹
CD27	۱۲	-۱/۴۸۱۷۷۱۴۵۲	-۲/۷۹۲۹۱۴۵۸۳	۱/۰۰۵۵E-۰۸	۵/۹E-۰۸
IL2RB	۲۲	-۱/۰۰۶۴۷۹۲۷۱	-۲/۰۰۹۰۰۲۳۷۶	۱/۸۴۲۸۴E-۰۸	۱/۰۴E-۰۷
GATA3	۱۰	-۱/۲۰۲۳۵۹۵۳	-۲/۳۰۱۱۵۳۰۶۹	۴/۳۶۶۲۳E-۰۸	۲/۳۷E-۰۷
PDCD1	۲	-۱/۸۰۳۳۱۳۱۵۱	-۳/۴۹۰۲۰۸۳۲۵	۱/۳۸۶۱E-۰۷	۶/۸۸E-۰۷
TBX21	۱۷	-۱/۳۷۰۱۰۱۲۹	-۲/۵۸۴۸۷۱۳۶	۶/۵۳۸۱E-۰۷	۳/۰۷E-۰۶
BATF	۱۴	-۱/۱۲۰۳۰۶۷۸۳	-۲/۱۷۳۹۳۱۵۵۴	۱/۶۹۸۵۴E-۰۷	۳/۵۹E-۰۶
CD276	۱۵	۴/۴۵۵۵۰۴۱۰۹	۲۱/۹۴۰۱۸۹۹۲	۹/۷۱۱۵E-۰۷	۴/۴۸E-۰۶
IL10	۱	-۲/۵۹۷۰۵۹۹۶۶	-۶/۰۰۵۰۵۲۳۷۶	۱/۲۶۸۳E-۰۶	۵/۷۶E-۰۶
ATOX1	۵	-۱/۰۴۵۱۱۳۶۶۶	-۲/۰۰۶۳۵۲۸۹۳۲	۲/۸۸۰۶E-۰۶	۱E-۰۵
BTLA	۳	۱/۵۳۷۹۶۲۵۸۶	۲/۹۰۳۸۴۱۵۲	۵/۷۱E-۰۶	۲/۳۶E-۰۵۳
FOXO1	۱۳	-۰/۶۸۰۳۰۰۸۰۱	-۱/۶۰۲۴۷۳۸۳۵	۲/۸۲۳۸۶E-۰۵	۰/۰۰۰۱۰۵
HAVCR2	۵	-۱/۳۸۳۹۶۰۵۵۴	-۲/۶۰۹۸۳۸۵۲۷	۰/۰۰۰۱۸۷۹۵۸	۰/۰۰۰۶۰۸
FOXP3	X	۱/۲۹۰۷۷۲۵۳	۲/۴۴۶۵۷۷۷۱	۰/۰۰۰۳۳۳۹۰۲	۰/۰۰۰۱۰۰۴
TSC2	۱۶	۰/۶۵۶۴۸۰۵۷۹	۱/۵۷۶۲۳۲۷۴۷	۰/۰۰۰۴۹۵۳۷	۰/۰۰۰۱۴۸
TOX	۸	-۰/۵۵۵۵۵۵۵۲۵۳	-۱/۴۶۹۱۷۴۴۳۴	۰/۰۰۰۵۴۳۱۴	۰/۰۰۰۱۶۱۷
B3GAT1	۱۱	۱/۵۵۷۹۸۴۵۶۴	۲/۹۴۴۴۲۲۲۲	۰/۰۰۰۸۱۲۲۲۹	۰/۰۰۰۲۳۱۹
TIGIT	۳	۰/۷۸۶۴۳۵۹۴	۱/۶۵۷۰۸۰۳۹	۰/۰۰۰۹۳۵۹۴۴	۰/۰۰۰۲۳۸
ZEB2	۲	۰/۹۰۳۸۵۷۱۴	۱/۸۷۱۰۶۱۷۰۸	۰/۰۰۰۱۳۵۴۳۷	۰/۰۰۰۳۶۹۸
MID2	X	۱/۰۸۶۶۱۳۶۲۷	۲/۱۲۳۷۴۵۲۹	۰/۰۰۰۱۶۷۰۰۷۹	۰/۰۰۰۴۴۷۲
SOCS3	۱۷	-۰/۸۸۰۵۴۵۱۵	-۱/۸۴۱۵۹۳۳۲۲	۰/۰۰۰۱۶۹۲۴۴۹	۰/۰۰۰۴۵۲۶
IRF4	۶	۰/۸۶۲۸۱۱۴۷۲	۱/۸۱۸۵۷۸۴۱	۰/۰۰۰۱۸۵۶۴۲۹	۰/۰۰۰۴۹۴۳
TGFB1	۱۹	۰/۷۰۳۰۵۷۸۳	۱/۶۳۷۵۵۷۱۲	۰/۰۰۰۲۱۴۴۴۹۷	۰/۰۰۰۵۶۱۲
EGR2	۱۰	۱/۴۸۷۳۰۰۹۰۶	۲/۸۰۳۶۳۹۵۹۹	۰/۰۰۰۲۵۰۹۳۶۷	۰/۰۰۰۶۴۶۹
PRF1	۱۰	-۰/۸۱۲۹۴۰۵۱۷	-۱/۷۵۶۷۸۵۰۲	۰/۰۰۰۴۰۰۸۳۹۷	۰/۰۰۰۹۸۷۳
IL6	۷	۲/۵۴۱۲۸۶۶۶۶	۵/۸۲۱۰۷۹۲۷۷	۰/۰۰۰۷۸۵۰۲۸۹	۰/۰۰۰۱۸۰۱۴
ICOS	۲	-۰/۶۳۳۷۸۹۰۴۳	-۱/۵۵۲۷۱۰۶۹	۰/۰۰۰۹۴۴۷۱۴۲	۰/۰۰۰۲۱۳۱۲
CD160	۱	-۰/۶۳۹۶۵۰۰۳۲	-۱/۵۵۷۹۵۱۱۸۷	۰/۰۰۰۱۳۶۹۳۸۱	۰/۰۰۰۲۹۹۲۴
FAS	۱۰	۰/۵۱۱۱۸۶۶۸	۱/۴۵۲۲۲۰۲۱	۰/۰۰۰۲۳۹۷۳۸۲	۰/۰۰۰۴۸۶۲۶
CD244	۱	-۰/۷۴۹۰۸۲۴۰۱	-۱/۶۸۰۷۲۳۴۹۸	۰/۰۰۰۲۵۵۹۳۰۷۷	۰/۰۰۰۵۱۵۹۳
KLRG1	۱۲	-۰/۵۸۲۰۶۰۵۰۱	-۱/۴۹۶۹۸۵۷۶۳	۰/۰۰۰۲۹۸۱۷۶۲	۰/۰۰۰۵۸۰۲۷
PRDM1	۶	۰/۳۹۹۵۰۷۰۶۳	۱/۳۱۹۰۵۷۱۴۱	۰/۰۰۰۷۵۷۹۷۳۵۱	۰/۰۰۰۱۳۱۴۲۱
TNF	۶	-۰/۷۰۸۵۱۹۷۶۵	-۱/۶۳۴۱۲۶۶۰۹	۰/۰۰۰۷۴۴۳۷۶۰	۰/۰۰۰۱۷۸۷۵۹
NFATC1	۱۸	-۰/۲۶۹۱۴۴۴۵۱	-۱/۲۰۵۰۹۲۹۷	۰/۰۰۰۲۴۸۷۱۶۴۷	۰/۰۰۰۲۰۲۷۱۸
TNFRSF9	۱	-۰/۴۴۴۴۷۵۲۰۴	-۱/۴۶۲۷۰۶۸۱۷	۰/۰۰۰۴۴۵۵۵۷۵	۰/۰۰۰۳۰۸۶۷۴
BCL2L11	۲	-۰/۲۲۲۹۱۱۴۰۴	-۱/۱۶۷۰۸۶۲۹۹	۰/۰۰۰۲۲۷۵۲۱۰۲۷	۰/۰۰۰۳۳۸۳
NFKB1	۴	۰/۲۱۶۶۷۵۶۶۹	۱/۱۶۲۰۵۲۸۳۸	۰/۰۰۰۳۷۳۵۸۷۹۶۲	۰/۰۰۰۴۸۵۴۶۶
TNFRSF21	۶	-۰/۶۲۸۸۹۳۷۱۱	-۱/۵۴۶۳۷۸۷۴۳	۰/۰۰۰۴۹۷۰۴۷۵۱۱	۰/۰۰۰۶۰۱۷۷۳
NT5E	۶	۰/۱۶۰۵۵۳۹۶۳	۱/۱۱۷۷۱۶۲۳۴	۰/۰۰۰۶۳۹۱۷۸۰۸۶	۰/۰۰۰۷۱۸۳۶۳
CD28	۲	۰/۰۰۷۶۲۳۹۵۸۷	۱/۰۰۵۴۲۶۶۴۹	۰/۰۰۰۴۶۶۴۴۷	۰/۰۰۰۷۵۱۶۹۷
JARID2	۶	-۰/۰۰۵۰۹۰۷۰۷۶	-۱/۰۰۳۵۹۱۰۳۸	۰/۰۰۰۴۶۷۱۸۰۷	۰/۰۰۰۷۸۴۳۸۴
CD274	۹	-۰/۰۷۸۱۸۲۷۶۸	-۱/۰۰۵۵۶۸۷۴۴۹	۰/۰۰۰۷۸۷۲۷۴۸۵	۰/۰۰۰۸۲۴۱۱۹
PTPN11	۱۲	-۰/۰۳۳۱۸۴۶	-۱/۰۰۲۳۴۸۳۹۴	۰/۰۰۰۸۱۸۲۲۲۷۸	۰/۰۰۰۸۵۱۶۲۴
NID2	۱۴	۰/۰۰۶۸۱۳۷۸۲۵	۱/۰۰۴۸۳۶۲۶۲۴	۰/۰۰۰۸۶۲۶۷۳۸۴۶	۰/۰۰۰۸۸۸۷۱۶
PFAS	۱۷	۰/۰۰۰۸۰۹۵۱۲۷	۱/۰۰۰۵۶۲۸۸۶	۰/۰۰۰۹۷۴۰۱۷۷۴۷	۰/۰۰۰۹۷۹۸۴۱
CTLA4	۲	۰/۰۰۰۳۱۸۰۹۶۳	۱/۰۰۰۲۲۰۷۳۰۸	۰/۰۰۰۹۹۰۱۶۱۷۱۱	۰/۰۰۰۹۹۲۲۶۹

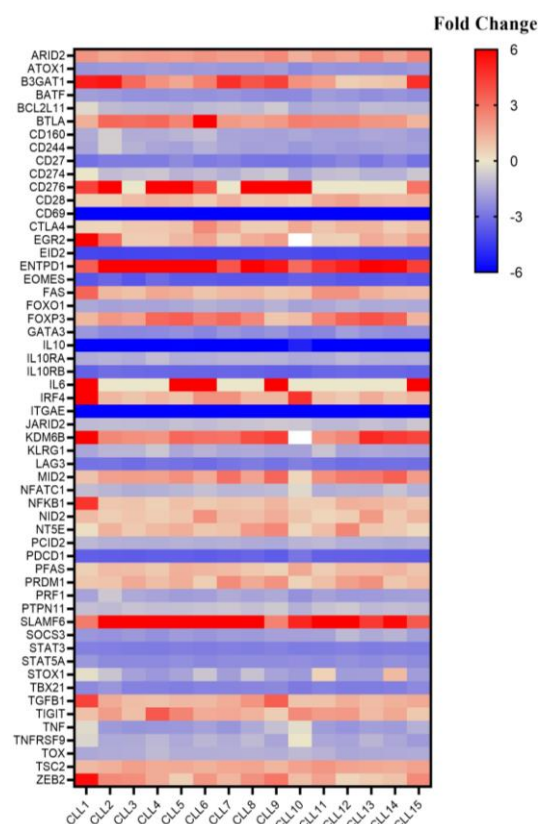


نمودار شماره ۱: نمودار آتشفشانی انتخابی ژن‌ها براساس مقایسه دو گروه بیمار و سالم. همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد، ژن‌های SLAMF6، ENTDP1، KDM6B، IL2RA، ARID2 به صورت معنادار افزایش بیان داشتند، درحالی‌که ژن‌های HAVCR2، ITGAEID2، STAT5، CD69، EOMES، LAG3، EID2، FOXO1، TOX، GZMB، STAT3 کاهش بیان معناداری 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، ENTDP1، B3GAT1 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، درحالی 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 LAG 3 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

1. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2018; 391(10129): 1524-1537. PMID: 29477250.
2. Quinten E, Sepúlveda-Yáñez JH, Koning MT, Eken JA, Pfeifer D, Nteah 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.
3. 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.
4. 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.
5. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16(11): 684-701.
6. Cronin KA, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program of the National Cancer Institute. *Cancer* 2014; 120: 3755-3757.
7. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries [Internet]: National Cancer Institute (US); 2022. PMID: 26389470.
8. 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.
9. 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.
10. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22(8): 1856-1864. PMID: 27084739.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Taghiloo S, Allahmoradi E, Tehrani M,

- Hosseini-Nataj H, Shekariz 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, Shekariz 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.