زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

شناسایی ژن‌ها و فرایندهای کلیدی آلزایمر با تحلیل مبتنی بر شبکه‌ی ترنسکریپتوم هیپوکامپ

مهدی صادقی[1*]، سجاد صفری[2]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی‌ومولکولی، پردیس علوم، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲-کارشناس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی‌ومولکولی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

*سمنان، صندوق پستی ۱۹۱۱۱-۳۵۱۳۱، سمنان، ایران
mehdisadeghi@semnan.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

چکیده

بیماری آلزایمر، شایع‌ترین بیماری زوال عصبی می‌باشد و اختلال در حافظه، بارزترین ویژگی آن است. ناحیه هیپوکامپ مغز، اولین ناحیه‌ای است که در آلزایمر دچار تغییرات می‌شود. ابزارهای زیست‌شناسی سامانه‌ها از جمله تکنیک‌های توان بالا ما را قادر می‌سازند تا ژن‌های برجسته‌ی دخیل در آغاز و پیشرفت بیماری را جستجو کنیم که می‌توانند به‌عنوان نامزدهای جدید تشخیصی و درمانی بیماری‌های پیچیده مانند آلزایمر درنظر گرفته شوند. در مجموع ۸۵ نمونه‌ی به‌دست آمده از ناحیه هیپوکامپ مغز افراد سالم و مبتلا به آلزایمر از دو مجموعه داده انتخاب شد. آنالیز تفاوت بیان به صورت جداگانه برای هر دو مجموعه داده انجام و نتایج به‌د ست آمده با یکدیگر ادغام شد. ژن‌هایی که بطور م شترک در دو مجموعه داده الگوی بیانی یکسان داشتند، جهت ساخت یک شبکه ژنی با استفاده از پایگاه داده STRING، مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز شبکه به‌دست آمده، به‌منظور یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در بیماری انجام شد. در این مطالعه، ۷۳ ژن دارای الگوی بیانی یک سان در دو مجموعه داده یافت شد. با آنالیز شبکه به‌دست آمده، ٤ ژن *SNAP25*، *UNC13A*، *SYN2* و *AMPH* به‌عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر گزارش شد. نقش ژن‌های گزارش شده در فرآیندهای اندو سیتوز، رها سازی انتقال‌دهنده‌های عصبی و چرخه‌ی وزیکول سیناپسی، کارکرد صحیح حافظه را میسر می‌سازد و تغییرات بیانی و جهش در هرکدام از این ژن‌ها، مسیرهای دیگر را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز آلزایمر می‌شود. بنابراین، ژن‌های کلیدی معرفی شده در این مطالعه، می‌توانند به‌عنوان مارکرهای بالقوه جهت تو سعه‌ی روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

کلید واژگان: آلزایمر، تکنیک‌های توان بالا، پروفایل بیان ژن، شبکه ژنی، آنالیز ترنسکریپتوم

۱-مقدمه

بیماری آلزایمر[1] شایع‌ترین بیماری زوال عصبی می‌باشد. به‌طوریکه ٦٠ تا ٧٠ درصد علل زوال عصبی[2] را شامل می‌شود. پیامدهای آلزایمر بر افراد و جامعه موجب افزایش نگرانی‌ها در رابطه با این بیماری شده‌است. تحقیقات انجام‌شده اخیر در آمریکا نشان می‌دهد در حال حاضر ۵٫۸ میلیون فرد بالای ٦٥ سال آلزایمر دارند و این عدد تا نیمه قرن ۲۱ به ۱۳/۸ میلیون خواهد رسید. در سال ۲۰۱۸ تعداد مرگ ثبت‌شده در اثر آلزایمر حدود ۱۲۲هزار نفر ثبت شده که نشان می‌دهد آلزایمر ششمین عامل مرگ در آمریکا می‌باشد. با بالا رفتن میانگین سن جمعیت‌ها، تخمین زده می‌شود شمار افراد مبتلا به آلزایمر در سال ۲۰٤۰ به بیش از ۸۱ میلیون نفر خواهد رسید[۱].

در آلزایمر تعداد و ارتباطات نورون‌های ناحیه هیپوکامپ و قشر مغز کاهش می‌یابد و به تدریج سایر نواحی مغز را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. هیپوکامپ اولین ناحیه‌ای می‌باشد که دچار تغییرات می‌شود[۲]. مطالعات انجام‌شده در سال های اخیر موجب پیشرفت‌های زیادی در شناسایی علل این بیماری و روش‌های تشخیصی و درمانی شده‌است. تمامی روش‌های درمانی حال حاضر موجود برای آلزایمر تنها در میزان بروز علائم این بیماری موثر می‌باشند. اگرچه مطالعات صورت گرفته در تشخیص روش‌های پیشگیری و کاهش روند پیشرفت این بیماری بسیار موثر بوده، اما هم‌چنان راهکار درمانی کاملی ارائه نشده‌است. آلزایمر تنها به زوال اعصاب محدود نمی‌شود و به میزان بسیار زیادی با مکانیسم‌های ایمونولوژیکی در مغز مرتبط است. برای مثال پروتئین‌های انباشته شده و با تاب‌خوردگی اشتباه به گیرنده‌های شناسایی موجود در سطح میکروگلیاها و آستروگلیاها می‌چسبند و موجب بروز پاسخ ایمنی و ترشح واسطه‌های التهابی می‌شوند که درنهایت منجر به پیشرفت بیماری می‌شود[۳].

درمراحل مختلف آلزایمر تغییرات ژنتیکی متفاوتی رخ می‌دهد. در مراحل اولیه، جهش‌هایی در ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین پیش‌ساز آمیلوییید(APP) و PSEN1 و PSEN2 رخ می‌دهد. در مراحل پایانی آلزایمر، فاکتورهای متفاوت ژنتیکی دخیل هستند که مهمترین آنها الل *ε4* ژن *APOE* می‌باشد[٤]. یکی از شاخصه‌های اصلی آلزایمر تشکیل تجمعات پپتیدهای بتاآمیلوییدی می‌باشد که در این فرایند ژن‌های *Sod1, Cat, mt-Nd1, Bcl2, Sirt5, Sod2* و *Sdha* دخالت دارند[٥]. در یکی از تحقیقات صورت‌گرفته در رابطه با آلزایمر، چهار ژن *CCK, TAC1, CALB1* و *CNR1* به‌عنوان ژن های دارای تغییر بیان در ناحیه هیپوکامپ معرفی شده‌اند[٦]. شاخصه مهم دیگر آلزایمر، تشکیل گره‌های نوروفیبریلاری(NFT) است که در اثر انباشت پروتئین‌های tau هایپرفسفریله‌شده ایجاد می‌شوند. بررسی‌های انجام‌شده در رابطه با اتوفاژی به‌عنوان عامل مساعد در تشکیل این تجمعات، نشان داده است که مسیر PI3K-AKT-mTOR به‌عنوان مسیری کلیدی و ژن‌های *ATG7, BCL2, BECN1, CDK5, CLU, CTSD, FOXO1, GFAP, ITPR1, MAPT, PSEN1, SNCA, UBQLN1* و *UCHL1* در آلزایمر نقش ایفا می‌کنند[٧][٨].

تکنیک‌های توان بالا[3] مانند microarray و RNA-Seq این امکان را فراهم کرده‌اند که با بررسی پروفایل بیان ژن بتوان تغییرات بیانی تمامی ژن‌های یک ارگانیسم را به‌صورت همزمان ارزیابی کرد. این ابزارها این امکان را فراهم ساخته است تا با بررسی ژن‌ها و بیان آنها و مسیرهای درگیر در یک بیماری یا فنوتیپ خاص، روش های درمانی و تشخیصی مناسبی را شناسایی کرد. برای مدل‌سازی سیستم های پیچیده‌ای همانند، سیستم‌های زیستی با استفاده از چنین داده هایی می‌توان از روش های مبتنی بر شبکه استفاده کرد. شبکه‌های ژنی را می‌توان با استفاده از روش های مختلف و با تکیه بر داده‌های بیانی به‌دست آورد. این

[1] Alzheimer
[2] Neurodegeneration
[3] High-throughput

شبکه‌ها، با ارائه‌ی ژن‌ها و روابط تنظیمی‌شان اطلاعات بسیار جامع و پرکاربردی را در اختیار محققین قرار می‌دهد. تاکنون مطالعات بسیاری درخصوص آلزایمر با تکیه بر تکنیک‌های توان بالا و با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ مغز انجام شده‌است. از این دست مطالعات می‌توان به مطالعه ترنسکریپتومی برروی ناحیه هیپوکامپ مغز با استفاده از تکنیک RNA-Seq اشاره کرد که در نتیجه‌ی آن *TAC1* و *SERPINE1* به‌عنوان ژن‌های کلیدی و اختلال در ارتباطات میان نورون‌ها، عروق مغزی و پاکسازی تجمعات بتاآمیلوئیدی به‌عنوان فرایندهای دخیل در آلزایمر گزارش شدند[۹]. در مطالعه دیگری با همین رویکرد، *BIN1*، *PICALM*، *APP* و *CELF1* به عنوان ژن‌های کلیدی در آلزایمر با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ معرفی شدند که در مسیرهای مشخصه‌ی آلزایمر مانند مسیر پیام رسانی انتقال‌دهنده‌های عصبی، انتقال سیناپسی و تخریب نورونی حضور دارند[۱۰]. از دیگر مطالعات ترنسکریپتومی صورت‌گرفته بر آلزایمر با تمرکز بر هیپوکامپ می‌توان به مطالعه‌ای اشاره کرد که در آن *SERPINA5*، *RYBP*، *SLC38A2*، *FEM1B* و *PYDC1* به‌عنوان ژن‌های کلیدی معرفی شدند و بیان شده‌است که تغییرات بیانی این ژن‌ها در مسیرهای تشکیل گره‌های عصبی-فیبریلاری و از بین رفتن سلول‌های عصبی نقش دارند[۱۱]. همچنین، در مطالعه‌ی دیگری، *ACTB*، *HDGF* و *WDR82* به‌عنوان محوری‌ترین ژن‌های ناحیه هیپوکامپ در فرآیند آلزایمر معرفی شدند که نقش تغییرات بیانی آنها در تخریب سیناپسی و پیشرفت آلزایمر گزارش شده‌است[۱۲].

بنابراین، مطالعات ترنسکریپتومی با در اختیار گذاشتن پروفایل بیان ژنی و بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در ناحیه هیپوکامپ، در شناخت ما نسبت به ژن‌های دخیل در آلزایمر و شناسایی مسیرهای منجر به این بیماری کمک شایانی کرده‌است. هم‌چنین به‌دلیل پیچیدگی بیماری آلزایمر و نیز گستردگی ژنوم موجودات، این قبیل مطالعات و اطلاعات استخراج شده از آنها، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشند.

به همین منظور در مطالعه حاضر، مقادیر بیان ژنی ناحیه هیپوکامپ مغز بیماران آلزایمری با افراد سالم با استفاده از تحلیل مبتنی بر شبکه داده‌های ترنسکریپتوم بررسی شده است. بر همین اساس دو دیتاست حاوی پروفایل بیان ژنی، مربوط به بیماری آلزایمر از پایگاه داده GEO استفاده شد. با استفاده از داده‌های این دیتاست‌ها، ژن‌ها و مسیرهای ژنی دخیل در آلزایمر و بطور خاص ناحیه هیپوکامپ مغز شناسایی شدند. سپس، برای شناسایی ژن‌های کلیدی، شبکه ژنی برای این ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده STRING رسم شد. ژن‌های کلیدی معرفی‌شده در نتیجه‌ی آنالیز شبکه، به جهت داشتن نقش محوری در ساز و کارهای درون سلولی، می‌توانند در ارائه و توسعه‌ی روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

۲-روش‌ها

در این مطالعه از دو دیتاست با کدهای دسترسی GSE5281 و GSE48350 مربوط به بیماری آلزایمر از پایگاه داده GEO استفاده شد. این داده‌ها دارای نمونه‌های مربوط به افراد بیمار و سالم می‌باشند. پلتفرم مورد استفاده در این داده‌ها Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array می‌باشد.

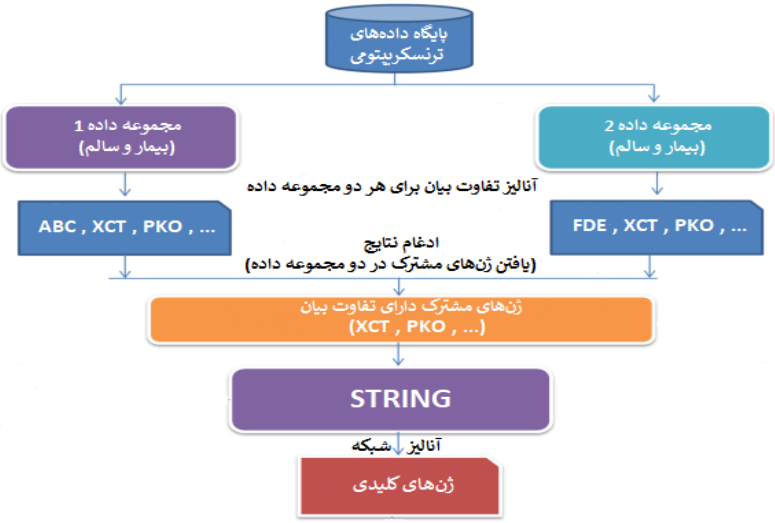
از مجموعه داده GSE5281، مجموعا ۲۳ نمونه استفاده شد که از این تعداد ۱۰ نمونه مربوط به پروفایل بیانی ناحیه هیپوکامپ مغز افراد مبتلا به آلزایمر و ۱۳ نمونه مربوط به افراد سالم بودند. همچنین، از مجموعه داده GSE48350، ٦٢ نمونه استفاده شد که ۱۹ نمونه مربوط به پروفایل بیانی ناحیه هیپوکامپ مغز افراد مبتلا به آلزایمر و ٤٣ نمونه سالم بودند[۱۳-۲۲]. به‌طور کلی، در این مطالعه ۸۵ نمونه بررسی شد.

پیش‌پردازش و نرمالیزاسیون داده‌ها با استفاده از روش RMA در پکیج Oligo در محیط R انجام شد[۲۳].

برای شناسایی ژن‌های دارای تفاوت بیان از پکیج limma در محیط R استفاده شد. به این منظور از آزمون آماری t-test استفاده شد. برای شناسایی ژن‌های با تفاوت بیان، از p-value برابر ۰/۰۵ و قدر مطلق LFC (Log2 Fold Change) برابر ۱ استفاده شد. همچنین، برای افزایش صحت در تحلیل t-test نیز از روش BH استفاده شد.

نمودار volcano برای نمایش ژن های دارای تفاوت بیان در هر مجموعه داده با توجه به حد آستانه‌های تعریف شده برای LFC و p-value رسم شد. در مرحله بعد، ژن‌هایی که به طور مشترک در هر دو مجموعه داده دارای تفاوت بیان بودند انتخاب شدند و وارد مراحل بعدی تحلیل و ارزیابی شدند. برای مشاهده الگوی بیانی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان میان دو گروه نمونه‌ای نمودار heatmap نیز رسم شد.(شکل ۱) [۲۴]

شکل ۱ روش شناسی تحلیل داده‌های ترنسکریپتومی



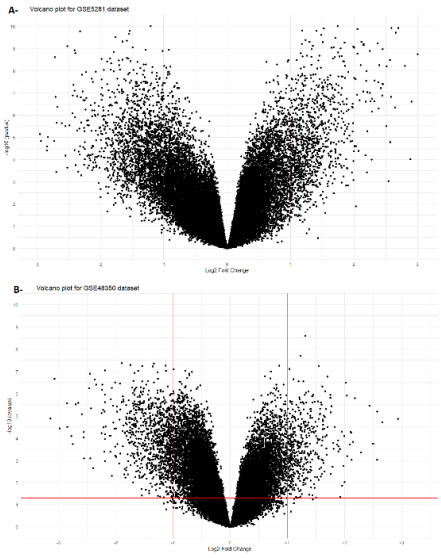
برای تحلیل لیست ژن به‌دست‌آمده از مرحله قبل و شناسایی مسیرهای بیولوژیکی دخیل در این ژن‌ها، تحلیل Functional annotation با استفاده از وب سرور DAVID انجام شد (رفرنس DAVID). برای این منظور از پایگاه‌های داده GO و KEGG استفاده شد برای شناسایی مسیرهای بیولوژیکی نیز، از آزمون آماری Hypergeometry با سطح معنی داری p-value کوچکتر از ۰,۰۵ استفاده شد [۲۵-۲۸].

برای ساخت شبکه‌های ژنی دخیل در فنوتیپ مورد بررسی، ژن‌های دارای تفاوت بیان به‌دست‌آمده در مرحله پیش وارد پایگاه داده STRING شدند. این پایگاه داده حاوی اطلاعات گسترده مبتنی بر نتایج آزمایشگاهی و تئوری و پیش‌بینی درباره میانکنش بین پروتئین ها/ژن ها می‌باشد که به شکل گسترده‌ای برای ساخت شبکه‌های ژنی و شبکه‌های میانکنش پروتئینی استفاده می‌شوند. پس از ساخت شبکه‌ها که تصویری از سطح ترنسکریپتومی فعال در ناحیه هیپوکامپ مغز بیماران مبتلا به آلزایمر را نشان می‌دهد، این شبکه با استفاده از پارامترهای مرکزی شبکه ارزیابی شد[۲۹-۳۱]. برای تجزیه‌وتحلیل شبکه به‌دست آمده، از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد[۳۲]. این نرم‌افزار امکان تحلیل شبکه و جمع آوری پارامترهای شبکه را با استفاده از ماژول Network Analyzer فراهم

می‌کند. در این مطالعه از دو پارامتر مرکزی شبکه شامل: درجه(DG)[4] و مرکزیت بینابینی(BC)[5] برای هر کدام از گره‌های شبکه (که متناظر ژن‌ها در شبکه می‌باشند) استفاده شد. درجه، تعداد اتصالات یک ژن با سایر ژن‌ها در شبکه را نشان می‌دهد. مرکزیت بینابینی نیز، نشان‌دهنده این است که یک ژن چه میزان موجب اتصال دو بخش مختلف شبکه که بهم ارتباط ندارند، می‌شود. در واقع پتانسیل یک گره در شبکه برای ایفای نقش پل را نشان می دهد. اینکه ژن هایی به لحاظ این دو پارامتر در شبکه ارزش بالایی داشته باشند، نشان دهنده اهمیت بالای تنظیم کنندگی آن ژن‌ها در شبکه می‌باشد که سطح ترنسکریپتوم فعال شبکه در ناحیه هیپوکامپ بیماران آلزایمری را نشان می‌دهد به‌طوری که احتمالا آن ژن شروع کننده‌ی یک آبشار و مسیر رویدادهای مبتنی بر ژن است که نقش برجسته‌ای در شروع و ادامه بیماری دارد. در نرم‌افزار Cytoscape با استفاده از ماژول Network Analyzer، دو پارامتر نام برده شده برای هر گره(ژن) استخراج شد. سپس، با بررسی این مقادیر برای تمام گره‌ها، سه مقدار ژنی که در هر کدام از پارامترها مقدار بیشینه داشتند به عنوان ژن‌های کلیدی در این مطالعه معرفی شدند[۳۳][۳٤].

۳-نتایج

آنالیز تفاوت بیان برای هر دیتاست با آزمون t-test انجام شد. درنتیجه تعداد ژن‌های دارای تفاوت بیان برای هر دیتاست گزارش شدند.



شکل۲ نمودار volcano برای مجموعه داده GSE5281 (شکلA) و مجموعه داده GSE48350 (شکلB). محور افقی مقدار LFC و محور عمودی مقدار (log10(p-value– برای هر ژن را در مجموعه داده مورد بررسی نشان می‌دهد. خط افقی قرمز نشان دهنده حد آستانه تعیین شده برای p-value و برابر 0.05 است که در مقیاس log10– معادل 1.3 می‌باشد. خط عمودی قرمز نیز نشان دهنده حد آستانه انتخاب شده برای LFC است (Absolute LFC = 1).

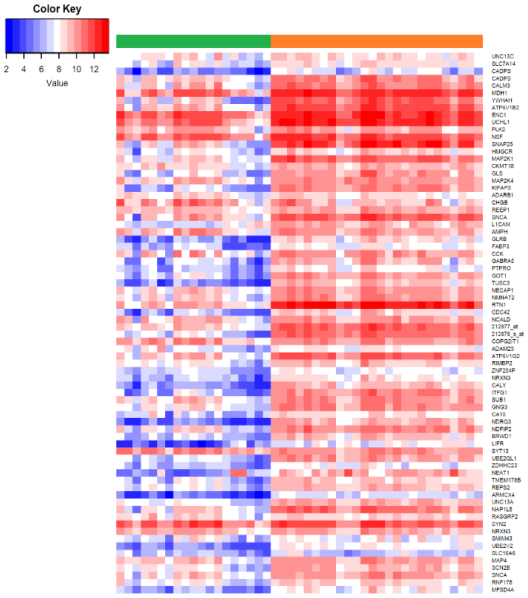
[4] Degree

[5] Betweenness centrality

جدول ۱ تعداد ژن‌ها باافزایش و کاهش بیان، براساس فیلترهای اعمال‌شده

	تعداد ژن‌ها با افزایش بیان	تعداد ژن‌ها با کاهش بیان	تعداد کل ژن‌ها
GSE5281	۳٤۸	٦۷۱	۱۰۱۹
GSE48350	۲٦۲	٦٦۲	۹۲٤
بررسی کلی در دو دیتاست	۲	۷۱	۷٤

شکل۲ نمودار volcano را برای دو مجموعه داده مورد استفاده در مطالعه نشان می‌دهد. این نمودار نشان دهنده مقادیر LFC در برابر –log10(p-value) برای تمام ژن‌ها در مجموعه داده مورد بررسی می‌باشد. خطوط افقی و عمودی رسم شده در نمودار نشان دهنده حد آستانه‌های مورد استفاده برای LFC و p-value می‌باشد که پیشتر به آن اشاره شده است. نقاط موجود در گوشه بالا سمت راست هر نمودار نشان دهنده ژن‌های دارای افزایش بیان و مجموعه نقاط موجود در گوشه بالا سمت چپ نشان دهنده ژن‌های دارای کاهش بیان می‌باشد. تعداد ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان و همچنین، تعداد ژن‌های دارای تفاوت بیان هر دیتاست در جدول ۱ قابل مشاهده است. در ادامه ژن‌هایی که به‌طور مشترک در هردو دیتاست تفاوت بیان داشتند انتخاب شدند تا برای مطالعات بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. از ۷٤ ژن با تفاوت بیان در هر دو مجموعه داده، ۷۱ ژن در هر دو مجموعه کاهش بیان و ۲ ژن در هر دو مجموعه افزایش بیان داشتند و بیان تنها یک ژن (L1CAM) در دو دیتاست متفاوت بود؛ به‌طوری که در GSE5281، افزایش بیان و در GSE48350، کاهش بیان داشت (شکل۳). ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان که برای انجام بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند و همچنین چگونگی تغییر بیان آنها در هر مجموعه داده، در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل۳ نمودار heatmap برای ژن‌های مشترک شناسایی شده در دو مجموعه داده مورد بررسی. الگوی بیانی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان در دو مجموعه داده. سطرها نشان دهنده ژن ها و ستون‌ها نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند (رنگ سبز بیماران آلزایمری و رنگ نارنجی نمونه‌های سالم). رنگ قرمز نشان دهنده افزایش بیان و رنگ آبی نشان دهنده کاهش بیان می‌باشد. چگالی رنگی که متناسب با میزان افزایش و کاهش بیان است در Color Key نمودار نشان داده شده است.

جدول ۲ ۷۳ ژن با تغییرات بیان ژنی مشترک در دو دیتاست مورد مطالعه برای آلزایمر

نحوه تغییر بیان ژن	ژن‌ها	GSE5281	GSE48350
کاهش بیان	NSF	-۱.۶۹۳۲۲	-۱.۰۴۶۷۱
	ATP6V1G2	-۱.۵۹۲۵۲	-۰.۹۶۴۳۵
	CHGB	-۲.۲۵۷۰۵	-۱.۵۶۰۲۴
	REPS2	-۱.۶۴۰۲۰	-۰.۶۹۹۲۰
	BRWD1	-۱.۷۴۸۰۵	-۰.۷۷۵۱۵
	NDRG3	-۱.۸۳۶۵۲	-۰.۷۰۳۳۷
	UCHL1	-۲.۱۹۶۰۸	-۰.۹۴۷۸۵
	YWHAH	-۳.۵۱۷۸۴	-۱.۰۲۰۶۰
	ADARB1	-۱.۷۳۷۴۲	-۰.۶۷۰۱۰
	GABRA5	-۱.۶۶۷۳۴	-۱.۰۹۵۸۶
	NECAP1	-۱.۵۶۱۱۱	-۰.۸۲۴۴۲
	PTPRO	-۱.۵۰۸۶۶	-۰.۸۸۰۱۴
	GOT1	-۲.۲۶۸۲۹	-۰.۹۱۸۶۹
	AMPH	-۲.۱۸۸۴۵	-۱.۱۲۹۸۹
	KLC1	-۱.۶۰۵۷۰	-۰.۸۵۵۰۳
	KNS2	-۲.۶۷۵۹۳	-۰.۶۸۳۳۹
	TUSC3	-۱.۴۳۸۶۹	-۰.۶۸۳۰۸
	RNF175	-۱.۸۱۴۱۱	-۰.۷۶۳۱۳
	NAP1L5	-۱.۸۷۳۳۱	-۱.۱۴۱۵۶
	GLRB	-۱.۷۵۸۵۳	-۰.۹۲۰۲۹
	ATP6V1B2	-۲.۰۸۰۴۷	-۰.۷۷۶۴۰
	UBE2V2	-۱.۶۶۱۲۲	-۰.۷۱۴۵۰
	SUB1	-۱.۸۱۰۸۵	-۰.۷۵۴۱۶
	ITFG1	-۲.۲۰۲۶۴	-۰.۶۷۰۰۵
	NRXN3	-۱.۷۸۵۱۴	-۰.۸۵۶۲۸
	NRXN3	-۱.۵۶۴۲۸	-۰.۹۶۷۷۲
	SNCA	-۱.۵۶۴۲۵	-۰.۷۱۴۹۹
	SNCA	-۱.۷۹۲۹۰	-۰.۶۷۰۵۵
	COPG2IT1	-۱.۸۴۰۹۱	-۰.۹۴۰۷۶
	SNAP25	-۲.۸۴۶۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	CA10	-۱.۶۲۰۵۰	-۰.۸۸۴۱۹
	RASGRF2	-۱.۶۹۳۷۸	-۰.۸۳۸۰۲
	SYN2	-۱.۸۱۹۵۹	-۱.۲۵۵۴۳
	CCK	-۱.۷۶۳۱۰	-۱.۰۰۹۱۷
	CKMT1B	-۱.۷۰۷۳۴	-۱.۰۰۱۴۵
	NDFIP2	-۱.۸۹۹۴۷	-۰.۶۹۰۶۶
	ARMCX4	-۱.۵۰۱۸۲	-۰.۷۶۴۲۱
	NCALD	-۱.۸۷۸۸۰	-۱.۱۲۱۴۳

	CADPS	-۱.٦٤٤٥٩	-۱.۳٥۳۲۷
	CADPS	-۱.٥۸۳۸٥	-۱.۷۱٥۰۹
	FABP3	-۲.٤۲٤٦۱	-۰.۷٦٤۰۹
	RTN1	-۱.٤۷۰۸۷	-۰.٦۹٤٥۸
	ADAM23	-۲.۲۱۱۲۲	-۰.۹۱٥۹۸
	CALY	-۱.۹۲٤۷۰	-۱.۰٦۸٦۸
	CALM3	-۲.۱۰۷۹۳	-۰.۷۱٥۳۳
	SMIM43	-۱.٦٦۱۳۷	-۱.٤۲٦۰۱
	SCN2B	-۲.۲۳۰۳٥	-۰.۹۹٦۰۹
	SLC7A14	-۱.۷۲۳٥۰	-۰.۹۱۲٥۸
	MAP2K4	-۱.٦٦٦۰٥	-۰.۷۰۹٥٤
	GNG3	-۱.٤۹۸٦٥	-۰.۹۹٦۳۰
	UBE2QL1	-۱.۷۸۳۲٥	-۰.۹۷۹۷۷
	GLS	-۱.۷۸۸۱۱	-۱.۰٥۳۳۸
	UNC13C	-۱.۷۰۲۱۷	-۰.٦۹۹۳۱
	KIFAP3	-۲.۰۱٦٦٤	-۰.۷۲٦۹۰
	MAP2K1	-۱.٤۳۱۷٤	-۰.۷٤٦۳۱
	TMEM178B	-۲.۱۷۱۲۰	-۰.۸۳٥۱۹
	MFSD4A	-۱.٦۸۷۹٦	-۱.۰۱۳٦۲
	NMNAT2	-۲.۰۰۹۲۷	-۱.۰۹۸۲۹
	SYT13	-۱.٥۲۳۸۱	-۱.۱٤۱۰٥
	MDH1	-۱.۷٥٦۲۱	-۰.۷۹۹٦۸
	HMGCR	-۱.۸٥۷۰٦	-۰.٦۸٤۸۲
	ZNF204P	-۱.۹۳۷٦۹	-۰.۷٤۲۲۲
	ENC1	-۱.۹۳٥٥٤	-۰.۸٦٤۷۲
	PLK2	-۱.۸٤٦٤۰	-۰.۹٦۷۲٥
	RIMBP2	-۱.٥۷۲۷٥	-۰.۹٦۲٥۷
	MAP4	-۲.۲۹۱۹٥	-۱.۳۱۷٦٤
	ZDHHC23	-۱.٦۰٥۸۳	-۰.۷۲۷۲٤
	SLC16A6	-۱.٤۸۹٦۰	-۰.۸۹۳٥٥
	UNC13A	-۱.٤٤٦٥۲	-۰.۷۲۹۳٥
	REEP1	-۱.٤۳۸۸۸	-۰.۷٤۹۳۰
	CDC42	-۱.۸۹۰۳۸	-۱.٤۸۱۹۷
افزایش بیان	LIFR	۱.۹٦۳۰۹	۰.۷۰۸۹۹
	NEAT1	۲.٥۳۸٦۷	۰.۸۰۹۱۹

۳-۱ تفسیر ژن‌های مشترک شناسایی‌شده در ناحیه هیپوکامپ برای آلزایمر

برای تجزیه‌وتحلیل ژن‌های به‌دست آمده، ژن‌ها وارد نرم افزار برخط DAVID شدند. مسیرهای دخیل در آلزایمر با استفاده از پایگاه‌های داده GO و KEGG و با تکیه بر تست هایپرژئومتری و با درنظر گرفتن مقادیر $p<0.05$، شنا سایی و گزارش شدند. در اطلاعات به‌د ست آمده از این پایگاه‌های داده، مسیرهای معرفی‌شده و دخیل در آلزایمر مانند "synaptic vesicle cycle"، "neurotransmitter secretion"، و "calcium-ion regulated exocytosis" قابل مشاهده بود. جزئیات بیشتر در جدول‌های ۳ و ٤ ارائه شده است.

جدول ۳ مسیرهای بیولوژیکی شناسایی‌شده توسط GO و براساس ژن‌های مشترک شناسایی‌شده برای آلزایمر

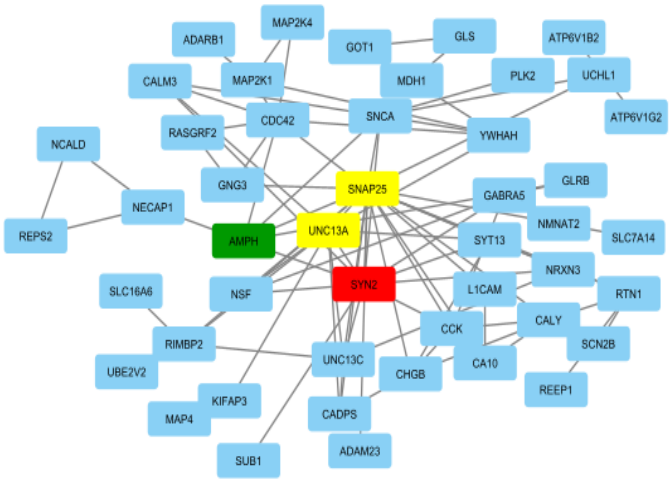
عنوان مسیر	تعداد	p-value	ژن‌ها
GO:0007268~Chemical synaptic transmission	۱۳	۲.۳۵E-۰۵	SNAP25, UNC13C, RIMBP2, GLRB,SCN2B,GLS,GABRA5,SNCA,AMPH, ADARB1,CADPS,UNC13A,SYN2
GO:0099003~Vesicle-mediated transport in synapse	۸	٦.۱۳E-۰۵	CALY,SNAP25,UNC13C,SNCA,AMPH,CADPS, UNC13A,SYN2
GO:0099504~Synaptic vesicle cycle	۷	۰.۰۰۰٦	SNAP25,UNC13C,SNCA,AMPH,CADPS,UNC13A ,SYN2
GO:0007154~Cell communication	١٤	۰.۰۰۱۲	YWHAH,CALY,SNAP25,UNC13C,RIMBP2,LIFR, GLRB,SUB1,CCK,CDC42,MAP2K4,UNC13A, NRXN3,SYN2
GO:0016082~Synaptic vesicle priming	٤	۰.۰۰۱۲	SNAP25,UNC13C,SNCA,UNC13A
GO:0017156~Calcium-ion regulated exocytosis	٥	۰.۰۰۱۲	SYT13,UNC13C,CADPS,UNC13A,SYN2
GO:0023052~Signaling	۱۳	۰.۰۰۱۷	YWHAH,CALY,SNAP25,UNC13C,RIMBP2, RASGRF2,NCALD,CCK,CDC42,MAP2K4,UNC13 , NRXN3,SYN2
GO:0051234~Establishment of localization	۷	۰.۰۰۱۷	SNAP25,UNC13C,GLRB,ATP6V1B2,SCN2B, UCHL1,CALM3
GO:0007269~Neurotransmitter secretion	٦	۰.۰۰۲۲	SNAP25,UNC13C,SNCA,CADPS,UNC13A,SYN2
GO:0051179~Localization	۱۲	۰.۰۰۲۲	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25,UNC1 3C,GLRB,ATP6V1B2,SCN2B,PTPRO,UCHL1,CA LM3
GO:0016079~Synaptic vesicle exocytosis	٥	۰.۰۰۳۳	SNAP25,UNC13C,SNCA,CADPS,UNC13A
GO:0007267~Cell-cell signaling	۱۱	۰.۰۰٤٥	SNAP25,UNC13C,RIMBP2,GLRB,SCN2B,CALM3 ,GLS,GABRA5,SNCA,AMPH,SYN2
GO:1990504~Dense core granule exocytosis	۳	۰.۰۰٤٥	UNC13C,CADPS,UNC13A
GO:0006810~Transport	۸	۰.۰۰٥٥	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25,UNC1 3A,SYN2,NDFIP2
GO:0016081~Synaptic vesicle docking	۳	۰.۰۱۰۳	SNAP25,UNC13C,UNC13A
GO:0061024~Membrane organization	۱۲	۰.۰۱۰۳	SYT13,YWHAH,SNAP25,GLRB,CALM3,SNCA, NECAP1,AMPH,REPS2,NSF,CDC42,REEP1
GO:0001505~Regulation of neurotransmitter levels	۷	۰.۰۱۰۷	SNAP25,UNC13C,CALM3,SNCA,CADPS, UNC13A,SYN2
GO:0007399~Nervous system development	۱۰	۰.۰۱۲۷	YWHAH,SNAP25,ADARB1,L1CAM,CCK,CDC42, CA10,UNC13A,NRXN3,ENC1
GO:0007610~Behavior	۱۰	۰.۰۱٤٦	SNAP25,GLRB,PLK2,UCHL1,HMGCR,GLS, GABRA5,ADARB1,CCK,NRXN3
GO:0048699~Generation of neurons	۱۱	۰.۰۲٦٦	YWHAH,SNAP25,RTN1,PLK2,ADARB1,L1CAM, CCK,CDC42,UNC13A,NRXN3,ENC1

GO:0009987~Cellular process	۱۰	۰.۰۳۴۱	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25,UNC13C,TUSC3,UBE2V2,UNC13A,NDFIP2
GO:0051049~Regulation of transport	۱۲	۰.۰۳۴۲	HMGCR,CALM3,MAP2K1,SNCA,FABP3,CADPS,CCK,NSF,CDC42,UNC13A,REEP1,NDFIP2
GO:0050890~Cognition	۷	۰.۰۴۳	SNAP25,PLK2,HMGCR,GABRA5,CCK,TUSC3,NRXN3
GO:0048278~Vesicle docking	٤	۰.۰٤٤٤	SNAP25,UNC13C,NSF,UNC13A

جدول ٤ مسیرهای بیولوژیکی شناسایی‌شده با KEGG و براساس ژن‌های مشترک شناسایی‌شده برای آلزایمر

عنوان مسیر	تعداد	p-value	ژن‌ها
hsa04721:Synaptic vesicle cycle	٦	۷.۷٦E-۰٦	NSF, UNC13C, SNAP25, UNC13A, ATP6V1G2, ATP6V1B2
hsa05120:Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	٤	۰.۰۰۳۲٦۷	CDC42, MAP2K4, ATP6V1G2, ATP6V1B2
hsa04727:GABAergic synapse	٤	۰.۰۰٦۳۷۷	NSF, GNG3, GABRA5, GLS
hsa04912:GnRH signaling pathway	٤	۰.۰۰۷۷۰۲	CDC42, MAP2K4, MAP2K1, CALM3
hsa04014:Ras signaling pathway	٥	۰.۰۱۷۷۹٤	CDC42, GNG3, MAP2K1, RASGRF2, CALM3

برای تفسیر بیشتر ژن‌های مشترک به‌دست آمده، ژن‌ها به پایگاه داده STRING وارد شدند تا با آنالیز شبکه‌ی به‌دست آمده، اطلاعات جامع‌تری در رابطه با خود ژن‌ها و روابط تنظیمی میان آن‌ها به‌دست آید. با وارد کردن ژن‌ها در STRING، شبکه میانکنش ژن‌ها با استفاده از گره‌ها و یال‌ها رسم شد. شبکه‌ای حاوی ٦٥ گره و ۸۸ یال به‌دست آمد. شبکه به‌دست آمده در شکل ٤ قابل مشاهده است.



شکل ٤ شبکه ژنی برای ژن‌های مشترک به‌دست آمده از دو دیتاست آلزایمر. گره قرمز ژن کلیدی براساس پارامتر درجه (DG) ، گره سبز ژن کلیدی براساس پارامتر مرکزیت بینابینی (BC) و گره‌های زرد نشان‌دهنده ژن‌های کلیدی براساس هردو پارامتر می‌باشند.

با آنالیز شـــبکه به‌دســـت آمده، می‌توان به ژن‌های کلیدی دســـت یافت. برای این کار، آنالیز شـــبکه با اســـتفاده از نرم‌افزار Cytpscape و با تکیه بر پارامتر های در جه و مرکزیت بینابینی انجام شـــد. درنهایت با درنظرگرفتن ســـه مقدار بیشـــینه برای هرکدام از پارامترها، ٤ ژن SNAP25 ، UNC13A ، SYN2 و AMPH به‌عنوان ژن های کلیدی دخیل در فرایند آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ مغز یافت شـــدند. جزئیات بیشـــتر درمورد این چهار ژن در جدول ۵ آورده شده‌است.

جدول ۵ ژن‌های کلیدی براساس دو پارامتر درجه (DG) و مرکزیت بینابینی (BC)، و بیان هر ژن در دو دیتاست

پارامتر	ژن	DG	BC	LFC-GSE5281	LFC-GSE48350
درجه	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸٤٦۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	SYN2	۱۲	۰.۱۱۳۲٤	-۱.۸۱۹۵۹	-۱.۲۵۵٤۳
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷٤۷	-۱.٤٤٦۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
مرکزیت بینابینی	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸٤٦۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷٤۷	-۱.٤٤٦۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
	AMPH	٦	۰.۱٦۹۱۵	-۲.۱۸۸٤۵	-۱.۱۲۹۸۹

٤- بحث

بیماری آلزایمر از شـــایع‌ترین بیماری‌های زوال عصـــبی می‌باشد و تضعیف عملکردهای شناختی در افراد درگیر با این بیماری، نگرانی‌های زیادی را به‌وجود آورده است، که از دســـت‌دادن تدریجی حافظه از مهم‌ترین آن‌ها اســـت. اگرچه، در آلزایمر بخش‌های مختلف مغز به مرور دســـت خوش تغییر می‌شـــوند، اما ناحیه هیپوکامپ به عنوان اولین بخش از مغز اســـت که دچار تحلیل می‌شـــود. از این‌رو، ناحیه هیپوکامپ به‌عنوان محوری‌ترین ناحیه در آلزایمر، در مطالعه حاضر مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته‌است.

یکی از بهترین و موثرترین روش‌هـای یـافتن درمـان و تشخیص مناسب برای یک بیماری، بررسی تغییرات بیان ژن‌ها با تکیه بر پروفایل بیان ژنی می‌باشـــد. تکنیک‌های توان بالا به‌عنوان ابزاری ارزشـــمند، این امکان را در اختیار قرار می‌دهند تا ســـطوح اطلاعاتی مختلف یعنی ژنوم، ترنســـکریپتوم، پروتئوم و متابولوم با جزئیات کامل مورد مطالعه قرار گیرد. ســـطح ترنســـکریپتوم به‌دلیل اینکه حدواسط ژن‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد از اهمیت به سزایی برخوردار اســـت و برای مطالعه‌ی پروفایل بیان ژنی به‌کار می‌رود[۳۵].

در مطالعه حاضـر دو مجموعه داده که مجموعا شـامل ۸۵ نمونه از ناحیه هیپوکامپ مغز بودند، برای یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر انتخاب شـــدند. با آنالیز تفاوت بیان و سپس استخراج ژن‌های مشترک از دو دیتاست، ۷٤ ژن دارای تفاوت بیان گزارش شـد. از این تعداد ۷۱ ژن با کاهش بیان، ۲ ژن با افزایش بیان و یک ژن با الگوی بیانی متفاوت بودند (جدول‌های ۱و۲).

با دردست‌داشتن لیست ژن‌ها اطلاعات فراتری را می‌توان بدست آورد. با استفاده از پایگاه داده DAVID، مسیرهای دخیل در آلزایمر توســـط پایگاه‌های داده GO و KEGG استخراج شدند. دیده شد که ژن‌های مشترک به‌دست آمده در مســـیرهـایی مـانـند "synaptic vesicle cycle" ، "neurotransmitter secretion" و "calcium-ion regulated exocytosis" دخیل هســـتند. این مســـیرها در مطالعات صورت‌گرفته بر آلزایمر، به‌عنوان مسیرهای مهم در روند این بیماری گزارش شـــده‌اند (جدول‌های ۳ و ٤)[۳٦-۳۸].

شبکه‌های میانکنش ژنی این امکان را فراهم آورده‌اند تا محققین به‌صورت بصری با استفاده از شبکه‌های ارائه شده، میانکنش بین محصول ژن‌ها و روابط تنظیمی میان آن‌ها در فنوتیپ مورد بررسی را ارزیابی کرده و ژن‌های محوری را شناسایی کنند. پایگاه داده STRING اطلاعات جامعی از جمله، ویژگی‌های هر ژن و چگونگی ارتباطات تنظیمی میان ژن ها را در اختیار قرار می‌دهد. تحلیل و ارزیابی شبکه ژنی به‌دست آمده برای ژن‌های شناسایی شده، با استفاده از پارامترهای اشاره شده، ٤ ژن SNAP25 ، UNC13A ، SYN2 و AMPH را به‌عنوان ژن‌های کلیدی در این بررسی معرفی کرد که اکثر این ژن‌ها در مسیرهای انتقال عصبی بین نورون‌ها دخالت دارند (جدول ٤ و ٥).

ژن SYN2 کدکننده‌ی پروتئین SYN2 یا synapsin-2 می‌باشد که از پروتئین‌های پیش‌سیناپسی است. ژن SNAP25 پروتئین SNAP25 را کد می‌کند که جزئی از کمپلکس SNARE می‌باشد. این کمپلکس با حضور در انتهای آکسونی نورون پیش‌سیناپسی، وزیکول حاوی انتقال دهنده‌های عصبی را به غشای پلاسمایی نورون پیش‌سیناپسی متصل می‌کند و در اگزوسیتوز انتقال دهنده‌های عصبی از نورون پیش‌سیناپسی به فضای سیناپسی نقش دارد. از آنجا که اگزوسیتوز ناقل‌های عصبی و انتقال پیام‌های عصبی از نورون‌های پیش‌سیناپسی به پس‌سیناپسی شرط لازم برای عملکرد درست مغز می‌باشد، اختلال در پروتئین‌های پیش‌سیناپسی از جمله SYN2 و SNAP25 موجب کندشدن و نابودی انتقال پیام عصبی می‌شود. کاهش بیان ژن SNAP25 با ایجاد تغییرات در مسیر انتقال وابسته به گلوتامات انتقال دهنده‌های عصبی (به‌عنوان یکی از مهمترین مسیرهای حافظه)، مسیرهای حافظه را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز آلزایمر می شود[۳۹-٤۱]. همچنین، گزارش شده است که جهش در ژن SNAP25 سبب تغییر ساختار پروتئین آن و در نتیجه تغییر ساختار و تضعیف عملکرد کمپلکس SNARE و در نتیجه بروز آلزایمر می‌شود[٤۲]. تحقیقات انجام‌شده نشان داده‌است الیگومریزاسیون پروتئین αSin در مغز سبب کاهش بیان ژن SYN2 و بروز اختلالات در فرایند حافظه می‌شود. در نتیجه کاهش بیان ژن SYN2 سبب کاهش تعداد پروتئین مربوطه می‌شود و پیام‌رسانی عصبی را مختل می‌کند و بر ژن‌های CREB و Nurr1 نیز اثر می گذارد که ژن های تنظیم‌کننده برای سیناپسین ها می‌باشند[٤۳].

تحقیقات صورت‌گرفته نشان داده‌اند که iridoidهای گیاهی با افزایش بیان ژن SNAP25، موجب افزایش پروتئین‌های سیناپسی و بهبود روند درمانی در افراد در معرض آلزایمر می‌شوند[٤٤]. ژن AMPH کدکننده پروتئین Amphiphysin، با تاثیر در مسیرهایی که پروتئین tau در آن حضور دارد، در روند بیماری آلزایمر دخیل می‌باشد. همچنین، به‌دلیل حضور پروتئین Amphiphysin در سمت سیتوپلاسمی غشای نورون پس‌سیناپسی، کاهش بیان ژن AMPH موجب اختلال در فرآیند اندوسیتوز وابسته به کلاترین انتقال‌دهنده‌های عصبی در نورون پس سیناپسی و در نتیجه افزایش احتمال بروز و پیشرفت آلزایمر می‌شود[٤٥][٤٦]. فعالیت نامناسب پروتئین UNC13A که توسط ژن UNC13A کد می‌شود، مانع اگزوسیتوز ناقل‌های عصبی میان نورون‌ها می شود. علاوه بر آن، موجب تغییر ساختار نورون‌های باقیمانده در شبکه عصبی نیز می شود. UNC13A ژن هدف مسیر پیام‌رسان ثانویه DAG می‌باشد که باعث تنظیم متابولیسم ترشح APP می‌شود و در جلوگیری از تجمعات بتاآمیلوئیدی نقش دارد[٤۷][٤۸]. جهش‌های متفاوت در ژن UNC13A باعث تغییرات مختلفی در دومین‌های پروتئین UNC13A می‌شود که فرایند رهاسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به‌طور مثال جهش در نقاط K603E و R769E پروتئین UNC13A موجب تغییر در اتصالات مستقل از کلسیم می‌شود که منجر به ساز و

کارهای منتهی به آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ مغز می‌شود[٤٩].

بنابراین، اطلاعات گردآوری شده نشان می‌دهد کاهش بیان ژن های کلیدی معرفی‌شده در این مطالعه و جهش در پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها، به‌طور مشخصی مسیرهای اساسی دخیل در فرایند حافظه را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به بروز آلزایمر می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه در راستای یافته‌های مطالعات پیشین در زمینه‌ی آلزایمر می‌باشد و ژن‌های کلیدی حاصل، در تحقیقات متعددی به‌عنوان ژن های دخیل در آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ گزارش شده‌اند. پروتئین UNC13A با اتصال به پروتئین SNAP25 از دومین MUN خود، در تشکیل کمپلکس SNARE نقش بسیار مهمی دارد. درنتیجه هرگونه اختلال در اتصال پروتئین‌های UNC13A و SNAP25 به یکدیگر موجب بروز آلزایمر می شود[٥٠][٥١][52]. ارتباط بین پروتئین SYN2 و رشته‌های اکتین موجب تجمع وزیکول‌های سیناپسی و کمک به رهاسازی آن‌ها می‌شود. درنتیجه ضعف در عملکرد این پروتئین یا کاهش بیان ژن کدکننده‌ی آن، سبب ضعف در پیام‌رسانی بین نورون‌ها و اختلالات شناختی و حافظه در آلزایمر می‌شود[53].

٥- نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نگرش جدیدی در رابطه با ارتباطات ژن‌های دخیل در آلزایمر گزارش کرده است. به طوری‌که ژن‌های معرفی‌شده در این مطالعه، در فرایندهای مجزا اما مرتبط باهم نقش دارند. فرایندهای رهاسازی و اگزوسیتوز انتقال‌دهنده‌های عصبی، چرخه‌ی وزیکول سیناپسی و اندوسیتوز فرایندهای مجزا از یکدیگر می‌باشند، اما ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند و از مسیرهای اساسی در کارکرد حافظه محسوب می شوند. تغییر بیانی و جهش در ژن‌ها و تغییر در پروتئین‌های حاضر در هرکدام از این مسیرها، مسیرهای دیگر را تحت تاثیر قرار داده و موجب عدم ارتباط صحیح میان نورون‌ها و بروز آلزایمر می شود. بنابراین، مطالعه حاضر ارتباط تنگاتنگ میان مسیرهای دخیل در آلزایمر را آشکار ساخته و نگرشی جامع در رابطه با فرایندهای موثر در این بیماری ارائه داده است. اگرچه تا به امروز درمانی قطعی برای آلزایمر ارائه نشده‌است، به‌کاربردن این نگرش می‌تواند در تحقیقات آلزایمر مورد توجه بسیار قرار گیرد. بنابراین، ژن های کلیدی گزارش شده در این مطالعه، مارکرهای بالقوه جهت توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر به حساب می‌آیند.

٦- منابع

[1] "2020 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimers. Dement.*, vol. 16, no. 3, pp. 391–460, Mar. 2020.

[2] Y. Wei, "Comparative transcriptome analysis of the hippocampus from sleep-deprived and Alzheimer's disease mice," *Genet. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 2, 2020.

[3] M. T. Heneka *et al.*, "Neuroinflammation in Alzheimer's disease," *Lancet. Neurol.*, vol. 14, no. 4, pp. 388–405, Apr. 2015.

[4] M. Nikolac Perkovic and N. Pivac, "Genetic Markers of Alzheimer's Disease," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1192, pp. 27–52, 2019.

[5] M. Cieślik *et al.*, "Alterations of Transcription of Genes Coding Anti-oxidative and Mitochondria-Related Proteins in Amyloid β Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease," *Mol. Neurobiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 1374–1388, Mar. 2020.

[6] Y.-J. Liu *et al.*, "Identification of hub genes associated with cognition in the hippocampus of Alzheimer's Disease," *Bioengineered*, vol. 12, no. 2, pp. 9598–9609, Dec. 2021.

[7] D. Heras-Sandoval, J. M. Pérez-Rojas, J. Hernández-Damián, and J. Pedraza-Chaverri, "The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 12, pp. 2694–2701, Dec. 2014.

[8] M. S. Uddin *et al.*, "Autophagy and Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 10, no. JAN, Jan. 2018.

[9] M. Magistri, D. Velmeshev, M. Makhmutova, and M. A. Faghihi, "Transcriptomics Profiling of Alzheimer's Disease Reveal Neurovascular Defects, Altered Amyloid-β Homeostasis, and Deregulated Expression of Long Noncoding RNAs," *J.*

Alzheimers. Dis., vol. 48, no. 3, pp. 647–665, Oct. 2015.
[10] J. G. J. van Rooij *et al.*, "Hippocampal transcriptome profiling combined with protein-protein interaction analysis elucidates Alzheimer's disease pathways and genes," *Neurobiol. Aging*, vol. 74, pp. 225–233, Feb. 2019.
[11] A. M. Crist *et al.*, "Transcriptomic analysis to identify genes associated with selective hippocampal vulnerability in Alzheimer's disease," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021.
[12] W. Hu, X. Lin, and K. Chen, "Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease," *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 6679–6687, Sep. 2015.
[13] W. S. Liang *et al.*, "Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 11, pp. 4441–4446, Mar. 2008.
[14] B. Readhead *et al.*, "Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus," *Neuron*, vol. 99, no. 1, pp. 64-82.e7, Jul. 2018.
[15] W. S. Liang *et al.*, "Altered neuronal gene expression in brain regions differentially affected by Alzheimer's disease: a reference data set," *Physiol. Genomics*, vol. 33, no. 2, pp. 240–256, Apr. 2008.
[16] N. C. Berchtold *et al.*, "Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 40, pp. 15605–15610, Oct. 2008.
[17] N. C. Berchtold, P. D. Coleman, D. H. Cribbs, J. Rogers, D. L. Gillen, and C. W. Cotman, "Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 34, no. 6, pp. 1653–1661, Jun. 2013.
[18] D. H. Cribbs *et al.*, "Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, Jul. 2012.
[19] G. Astarita *et al.*, "Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, pp. 1–8, 2010.
[20] L. J. Blair *et al.*, "Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4158–4169, Oct. 2013.
[21] M. Goedert, D. S. Eisenberg, and R. A. Crowther, "Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 40, pp. 189–210, Jul. 2017.
[22] M. Sárvári *et al.*, "Menopause leads to elevated expression of macrophage-associated genes in the aging frontal cortex: rat and human studies identify strikingly similar changes," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, Dec. 2012.
[23] S. R. Piccolo, Y. Sun, J. D. Campbell, M. E. Lenburg, A. H. Bild, and W. E. Johnson, "A single-sample microarray normalization method to facilitate personalized-medicine workflows," *Genomics*, vol. 100, no. 6, pp. 337–344, Dec. 2012.
[24] B. Neupane, D. Richer, A. J. Bonner, T. Kibret, and J. Beyene, "Network meta-analysis using R: A review of currently available automated packages," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, 2014.
[25] G. Alterovitz, M. Xiang, M. Mohan, and M. F. Ramoni, "GO PaD: the Gene Ontology Partition Database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Database issue, Jan. 2007.
[26] M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe, "KEGG as a reference resource for gene and protein annotation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D457–D462, 2016.
[27] M. Kanehisa and S. Goto, "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 27–30, Jan. 2000.
[28] D. W. Huang *et al.*, "DAVID Bioinformatics Resources: Expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL.2, 2007.
[29] C. von Mering, M. Huynen, D. Jaeggi, S. Schmidt, P. Bork, and B. Snel, "STRING: a database of predicted functional associations between proteins," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 258–261, Jan. 2003.
[30] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D605–D612, Jan. 2021.
[31] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. Database issue, pp. D362–D368, Jan. 2017.
[32] S. Killcoyne, G. W. Carter, J. Smith, and J. Boyle, "Cytoscape: a community-based framework for network modeling," *Methods Mol. Biol.*, vol. 563, pp. 219–239, 2009.
[33] P. Shannon *et al.*, "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.," *Genome Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 2498–2504, Nov. 2003.
[34] N. T. Doncheva, J. H. Morris, J. Gorodkin, and L. J. Jensen, "Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data," *J. Proteome Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 623–632, 2019.

[35] J. A. Reuter, D. V. Spacek, and M. P. Snyder, "High-throughput sequencing technologies," *Mol. Cell*, vol. 58, no. 4, pp. 586–597, May 2015.
[36] S. V. Ovsepian, V. B. O'Leary, L. Zaborszky, V. Ntziachristos, and J. O. Dolly, "Synaptic vesicle cycle and amyloid β: Biting the hand that feeds," *Alzheimers. Dement.*, vol. 14, no. 4, pp. 502–513, Apr. 2018.
[37] C. Peña-Bautista *et al.*, "Early neurotransmission impairment in non-invasive Alzheimer Disease detection," *Sci. Reports 2020 101*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Oct. 2020.
[38] Y. Wang, Y. Shi, and H. Wei, "Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease: A Target for New Drug Development," *J. Alzheimer's Dis. Park.*, vol. 7, no. 5, 2017.
[39] L. Nie *et al.*, "Ginsenoside Rg1 Ameliorates Behavioral Abnormalities and Modulates the Hippocampal Proteomic Change in Triple Transgenic Mice of Alzheimer's Disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, Oct. 2017.
[40] S. Hilfiker, V. A. Pieribone, A. J. Czernik, H. T. Kao, G. J. Augustine, and P. Greengard, "Synapsins as regulators of neurotransmitter release," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 354, no. 1381, pp. 269–279, Feb. 1999.
[41] Q. Hou *et al.*, "SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, no. 6, pp. 1593–1603, Sep. 2004.
[42] S. Karmakar, L. G. Sharma, A. Roy, A. Patel, and L. M. Pandey, "Neuronal SNARE complex: A protein folding system with intricate protein-protein interactions, and its common neuropathological hallmark, SNAP25," *Neurochem. Int.*, vol. 122, pp. 196–207, Jan. 2019.
[43] M. E. Larson *et al.*, "Selective lowering of synapsins induced by oligomeric α-synuclein exacerbates memory deficits," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 23, pp. E4648–E4657, Jun. 2017.
[44] B. Dinda, M. Dinda, G. Kulsi, A. Chakraborty, and S. Dinda, "Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 169, pp. 185–199, May 2019.
[45] J. Chapuis *et al.*, "Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 11, pp. 1225–1234, Nov. 2013.
[46] P. Wigge and H. T. McMahon, "The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse," *Trends Neurosci.*, vol. 21, no. 8, pp. 339–344, Aug. 1998.
[47] F. P. Diekstra *et al.*, "C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis," *Ann. Neurol.*, vol. 76, no. 1, pp. 120–133, 2014.
[48] S. Rossner *et al.*, "Munc13-1-mediated vesicle priming contributes to secretory amyloid precursor protein processing," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 27841–27844, Jul. 2004.
[49] M. Camacho *et al.*, "Control of neurotransmitter release by two distinct membrane-binding faces of the Munc13-1 C 1 C 2 B region," *Elife*, vol. 10, Nov. 2021.
[50] R. V. Kalyana Sundaram *et al.*, "Munc13 binds and recruits SNAP25 to chaperone SNARE complex assembly," *FEBS Lett.*, vol. 595, no. 3, pp. 297–309, Feb. 2021.
[51] A. Margiotta, "Role of SNAREs in Neurodegenerative Diseases," *Cells*, vol. 10, no. 5, May 2021.
[52] V. Quarato *et al.*, "Transcriptional Profiling of Hippocampus Identifies Network Alterations in Alzheimer’s Disease," *Applied Sciences* , vol. 12, no. 10. 2022.
[53] K. Bonnycastle, E. C. Davenport, and M. A. Cousin, "Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle," *J. Neurochem.*, vol. 157, no. 2, pp. 179–207, Apr. 2021.

Exploring signature genes and pathways in Alzheimer's disease by network based analysis of Hippocampus transcriptome data

Mehdi Sadeghi[1*], Sajjad Safari[2]

1. Assistant professor at Department of Cell & Molecular Biology, Semnan University, Semnan, Iran.
2. BSc of Cell and Molecular Biology, Department of Cell & Molecular Biology, Semnan University, Semnan, Iran

mehdisadeghi@semnan.ac.ir

Receipt: 2022/02/22 Accepted: 2022/06/29

Abstract

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease and the memory impairment is the main prominent symptom of this disease. The hippocampus of the brain is the first region that undergoes changes in Alzheimer's. Systems biology tools, such as high-throughput techniques, enable us to explore signature genes involved in disease initiation and advancement, which can be considered as new therapeutic and diagnostic candidates in complex diseases like Alzheimer's. A total of 85 samples obtained from the hippocampus of the brain of healthy individuals and individuals with Alzheimer's were selected from two datasets. Differential expression analysis was performed independently for both datasets and the results were integrated. Genes with the same expression pattern in the two datasets were used to construct a gene-gene network using the STRING database. The obtained network analysis was performed to detect key genes associated with the disease. In this study, 73 genes with the same expression pattern were found in the two datasets. The obtained network analysis led to the identification of *SNAP25*, *UNC13A*, *SYN2* and *AMPH* as key genes connected with Alzheimer's disease. The role of the reported key genes in endocytosis, neurotransmitters release and synaptic vesicle cycle facilitate proper functioning of memory. Expressional changes and mutations in each of these genes effect other pathways and lead to Alzheimer's. Thus, the key genes reported in this study, can be considered as potential markers in developing diagnostic and therapeutic methods for Alzheimer's.

Keywords: Alzheimer's disease; High-throughput techniques; Gene expression profile; Gene-gene network; Transcriptome analysis