

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

مهدی صادقی^{۱*}، سجاد صفری^۲

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

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

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳

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 در نظر 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 به دست آمده با یکدیگر ادغام شد. ژن‌هایی که بطور مشترک 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 به دست آمده، به منظور یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در بیماری انجام شد. در این مطالعه، ۷۳ ژن دارای الگوی بیانی یکسان در دو مجموعه داده یافت شد. با آنالیز شبکه به دست آمده، ۴ ژن *SNAP25*، *UNC13A*، *SYN2* و *AMPH* به‌عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر گزارش شد. نقش ژن‌های گزارش شده در فرآیندهای اندوسیتوز، رها سازی انتقال‌دهنده‌های عصبی و چرخه‌ی وزیکول سیناپسی، کارکرد صحیح حافظه را میسر می‌سازد و تغییرات بیانی و جهش در هر کدام 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 توسعه‌ی 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^۱ شایع‌ترین بیماری زوال عصبی می‌باشد. به‌طوریکه ۶۰ تا ۷۰ درصد علل زوال عصبی^۲ 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 ۶۵ 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 ۱۲۲ هزار 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 ۲۰۴۰ 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 سال‌های 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 ایمنولوژیکی 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].

در مراحل مختلف آلزایمر تغییرات ژنتیکی متفاوتی رخ می‌دهد. در مراحل اولیه، جهش‌هایی در ژن‌های کدکننده پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) و PSEN1 و PSEN2 رخ می‌دهد. در مراحل پایانی آلزایمر، فاکتورهای متفاوت ژنتیکی دخیل هستند که مهم‌ترین آنها آلل $\epsilon 4$ ژن *APOE* می‌باشد[۴]. یکی از شاخصه‌های اصلی آلزایمر تشکیل تجمعات پپتیدهای بتا آمیلوئیدی می‌باشد که در این فرایند ژن‌های *Sdha* و *Sod1*, *Cat*, *mt-Nd1*, *Bcl2*, *Sirt5*, *Sod2* دخالت دارند[۵]. در یکی از تحقیقات صورت گرفته در رابطه با آلزایمر، چهار ژن *CNR1* و *CCK*, *TAC1*, *CALB1* به‌عنوان ژن‌های دارای تغییر بیان در ناحیه هیپوکامپ معرفی شده‌اند[۶]. شاخصه مهم دیگر آلزایمر، تشکیل گره‌های نوروفیبریلاری (NFT) است که در اثر انباشت پروتئین‌های tau هایپر فسفریله‌شده ایجاد می‌شوند. بررسی‌های انجام‌شده در رابطه با اتوفازی 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*, و *GFAP*, *ITPR1*, *MAPT*, *PSEN1*, *SNCA*, *UBQLN1* و *UCHL1* در آلزایمر نقش ایفا می‌کنند[۷][۸].

تکنیک‌های توان بالا^۳ 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، روش‌های درمانی و تشخیصی مناسبی را شناسایی کرد. برای مدل‌سازی سیستم‌های پیچیده‌ای همانند، سیستم‌های زیستی با استفاده از چنین داده‌هایی می‌توان از روش‌های مبتنی بر شبکه استفاده کرد. شبکه‌های ژنی را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف و با تکیه بر داده‌های بیانی به‌دست آورد. این

³ High-throughput¹ Alzheimer² Neurodegeneration

شبکه‌ها، با ارائه‌ی ژن‌ها و روابط تنظیمی‌شان اطلاعات بسیار جامع و پر کاربردی 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 بر روی 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 بتا آمیلوئیدی به‌عنوان فرایندهای دخیل در آلزایمر گزارش شدند [۹]. در مطالعه دیگری با همین رویکرد، *CELFI* و *APP*، *PICALM*، *BIN1* به‌عنوان 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 صورت گرفته بر آلزایمر با تمرکز بر هیپوکامپ می‌توان به مطالعه‌ای اشاره کرد که در آن *RYBP*، *SERPINA5*، *FEM1B*، *SLC38A2* 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، *WDR82* و *HDGF*، *ACTB* به‌عنوان محوری‌ترین ژن‌های ناحیه هیپوکامپ در فرایند 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 معرفی شده 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

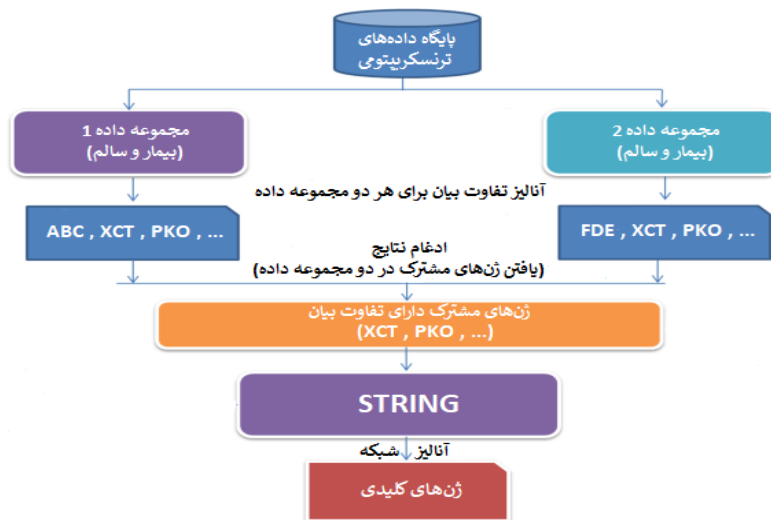
در این مطالعه از دو دیتاست با کدهای دسترسی GSE5281 و GSE48350 مربوط به بیماری آلزایمر از پایگاه داده GEO استفاده شد. این داده‌ها دارای نمونه‌های مربوط به افراد بیمار و سالم می‌باشند. پلتفرم مورد استفاده در این داده‌ها Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array می‌باشد.

از مجموعه داده GSE5281، مجموعاً 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، ۶۲ نمونه استفاده شد که ۱۹ نمونه مربوط به پروفایل بیانی ناحیه هیپوکامپ مغز افراد مبتلا به آلزایمر و ۴۳ نمونه سالم بودند [۱۳-۲۲]. به‌طور کلی، در این مطالعه ۸۵ نمونه بررسی شد.

پیش پردازش 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 ژن‌های 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 به دست آمده از مرحله قبل و شناسایی مسیرهای بیولوژیکی دخیل در این ژن‌ها، تحلیل Functional annotation با استفاده از وب سرور DAVID انجام شد (دفرنس 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 به دست آمده در مرحله پیش وارد پایگاه داده STRING شدند. این پایگاه داده

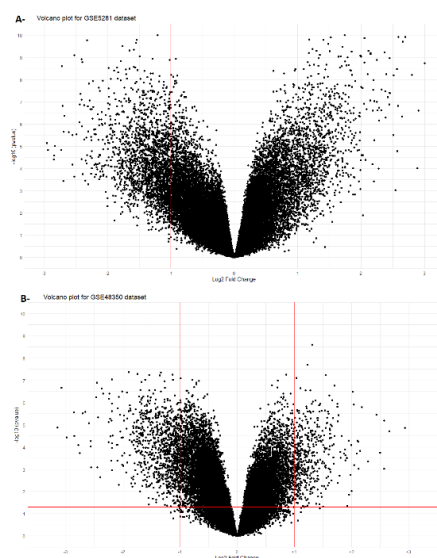
حاوی اطلاعات گسترده مبتنی بر نتایج آزمایشگاهی و تئوری و پیش‌بینی در باره میانکشی بین پروتئین‌ها/ژن‌ها می‌باشد که به شکل گسترده‌ای برای ساخت شبکه‌های ژنی و شبکه‌های میانکشی پروتئینی استفاده می‌شوند. پس از ساخت شبکه‌ها که تصویری از سطح ترنسکریپتومی فعال در ناحیه هیپوکامپ مغز بیماران مبتلا به آلزایمر را نشان می‌دهد، این شبکه با استفاده از پارامترهای مرکزی شبکه ارزیابی شد [۲۹-۳۱]. برای تجزیه و تحلیل شبکه به دست آمده، از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد [۳۲]. این نرم‌افزار امکان تحلیل شبکه و جمع‌آوری پارامترهای شبکه را با استفاده از ماژول Network Analyzer فراهم

می‌کند. در این مطالعه از دو پارامتر مرکزی شبکه شامل: درجه (DG) ۴ و مرکزیت بینابینی (BC) ۵ 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 می‌دهد. اینکه ژن‌هایی به لحاظ این دو پارامتر در شبکه ارزش بالایی داشته باشند، نشان‌دهنده اهمیت بالای تنظیم‌کنندگی آن ژن‌ها در شبکه می‌باشد که سطح ترنسکرپتوم فعال شبکه در ناحیه هیپوکامپ بیماران آلزایمری را نشان می‌دهد به‌طوری که احتمالاً آن ژن شروع‌کننده‌ی 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] [۳۴].

۳- نتایج

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

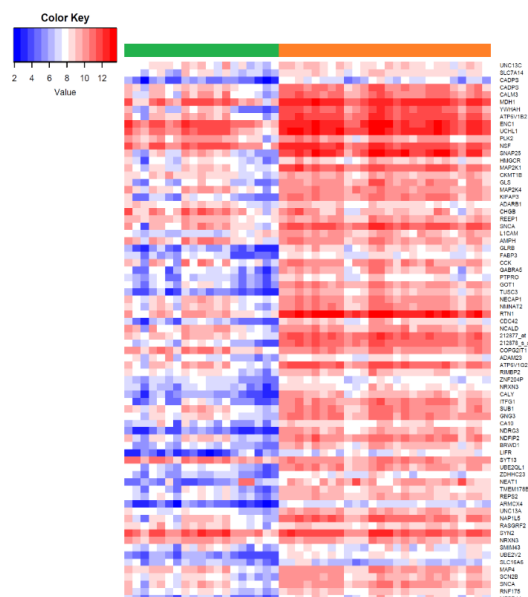


شکل ۲ نمودار volcano برای مجموعه داده GSE5281 (شکل A) و مجموعه داده GSE48350 (شکل B). محور افقی مقدار LFC و محور عمودی مقدار $-\log_{10}(p\text{-value})$ برای هر ژن را در مجموعه داده مورد بررسی نشان می‌دهد. خط افقی قرمز نشان‌دهنده حد آستانه تعیین شده برای p-value و برابر 0.05 است که در مقیاس $-\log_{10}$ معادل 1.3 می‌باشد. خط عمودی قرمز نیز نشان‌دهنده حد آستانه انتخاب شده برای LFC است (Absolute LFC = 1).

⁵ Betweenness centrality

⁴ Degree

تعداد کل ژن‌ها	تعداد ژن‌ها با کاهش بیان	تعداد ژن‌ها با افزایش بیان	
۱۰۱۹	۶۷۱	۳۴۸	GSE5281
۹۲۴	۶۶۲	۲۶۲	GSE48350
۷۴	۷۱	۲	بررسی کلی در دو دیتاست



شکل ۲ نمودار volcano را برای دو مجموعه داده مورد استفاده در مطالعه نشان می‌دهد. این نمودار نشان دهنده مقادیر LFC در برابر $-\log_{10}(p\text{-value})$ 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 بیشتر 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 هر دو دیتاست تفاوت بیان داشتند انتخاب شدند تا برای مطالعات بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. از ۷۴ 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 (شکل ۳). 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.

جدول ۲-۷۳ زن 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	-۱.۶۴۴۵۹	-۱.۳۵۳۲۷
	CADPS	-۱.۵۸۳۸۵	-۱.۷۱۵۰۹
	FABP3	-۲.۴۲۴۶۱	-۰.۷۶۴۰۹
	RTN1	-۱.۴۷۰۸۷	-۰.۶۹۴۵۸
	ADAM23	-۲.۲۱۱۲۲	-۰.۹۱۵۹۸
	CALY	-۱.۹۲۴۷۰	-۱.۰۶۸۶۸
	CALM3	-۲.۱۰۷۹۳	-۰.۷۱۵۳۳
	SMIM43	-۱.۶۶۱۳۷	-۱.۴۲۶۰۱
	SCN2B	-۲.۲۳۰۳۵	-۰.۹۹۶۰۹
	SLC7A14	-۱.۷۲۳۵۰	-۰.۹۱۲۵۸
	MAP2K4	-۱.۶۶۶۰۵	-۰.۷۰۹۵۴
	GNG3	-۱.۴۹۸۶۵	-۰.۹۹۶۳۰
	UBE2QL1	-۱.۷۸۳۲۵	-۰.۹۷۹۷۷
	GLS	-۱.۷۸۸۱۱	-۱.۰۵۳۳۸
	UNC13C	-۱.۷۰۲۱۷	-۰.۶۹۹۳۱
	KIFAP3	-۲.۰۱۶۶۴	-۰.۷۲۶۹۰
	MAP2K1	-۱.۴۳۱۷۴	-۰.۷۴۶۳۱
	TMEM178B	-۲.۱۷۱۲۰	-۰.۸۳۵۱۹
	MFSD4A	-۱.۶۸۷۹۶	-۱.۰۱۳۶۲
	NMNAT2	-۲.۰۰۹۲۷	-۱.۰۹۸۲۹
	SYT13	-۱.۵۲۳۸۱	-۱.۱۴۱۰۵
	MDH1	-۱.۷۵۶۲۱	-۰.۷۹۹۶۸
	HMGCR	-۱.۸۵۷۰۶	-۰.۶۸۴۸۲
	ZNF204P	-۱.۹۳۷۶۹	-۰.۷۴۲۲۲
	ENC1	-۱.۹۳۵۵۴	-۰.۸۶۴۷۲
	PLK2	-۱.۸۴۶۴۰	-۰.۹۶۷۲۵
	RIMBP2	-۱.۵۷۲۷۵	-۰.۹۶۲۵۷
	MAP4	-۲.۲۹۱۹۵	-۱.۳۱۷۶۴
	ZDHHC23	-۱.۶۰۵۸۳	-۰.۷۲۷۲۴
	SLC16A6	-۱.۴۸۹۶۰	-۰.۸۹۳۵۵
	UNC13A	-۱.۴۴۶۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
	REEP1	-۱.۴۳۸۸۸	-۰.۷۴۹۳۰
	CDC42	-۱.۸۹۰۳۸	-۱.۴۸۱۹۷
افزایش بیان	LIFR	۱.۹۶۳۰۹	۰.۷۰۸۹۹
	NEAT1	۲.۵۳۸۶۷	۰.۸۰۹۱۹

۳-۱ تفسیر ژن‌های مشترک شناسایی شده

در ناحیه هیپوکامپ برای آلزایمر

برای تجزیه و تحلیل ژن‌های به دست 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 در نظر گرفتن مقادیر $p < 0.05$

شناسایی و گزارش شدند. در اطلاعات به دست آمده از این پایگاه‌های داده، مسیرهای معرفی شده و دخیل در آلزایمر مانند "synaptic vesicle cycle"، "neurotransmitter secretion"، و "calcium-ion regulated exocytosis" قابل مشاهده بود. جزئیات بیشتر در جدول‌های ۳ و ۴ ارائه شده است.

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

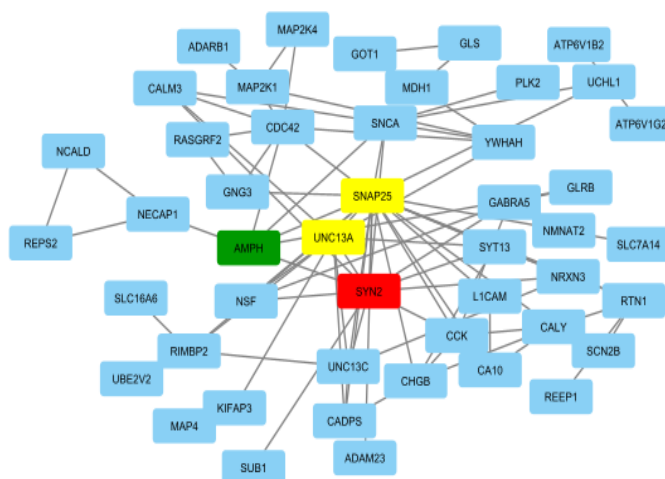
ژن‌ها	p-value	تعداد	عنوان مسیر
SNAP25, UNC13C, RIMBP2, GLRB, SCN2B, GLS, GABRA5, SNCA, AMPH, ADARB1, CADPS, UNC13A, SYN2	$2.35E-05$	۱۳	GO:0007268~Chemical synaptic transmission
CALY, SNAP25, UNC13C, SNCA, AMPH, CADPS, UNC13A, SYN2	$6.13E-05$	۸	GO:0099003~Vesicle-mediated transport in synapse
SNAP25, UNC13C, SNCA, AMPH, CADPS, UNC13A, SYN2	0.0006	۷	GO:0099504~Synaptic vesicle cycle
YWHAH, CALY, SNAP25, UNC13C, RIMBP2, LIFR, GLRB, SUB1, CCK, CDC42, MAP2K4, UNC13A, NRXN3, SYN2	0.0012	۱۴	GO:0007154~Cell communication
SNAP25, UNC13C, SNCA, UNC13A	0.0012	۴	GO:0016082~Synaptic vesicle priming
SYT13, UNC13C, CADPS, UNC13A, SYN2	0.0012	۵	GO:0017156~Calcium-ion regulated exocytosis
YWHAH, CALY, SNAP25, UNC13C, RIMBP2, RASGRF2, NCALD, CCK, CDC42, MAP2K4, UNC13, NRXN3, SYN2	0.0017	۱۳	GO:0023052~Signaling
SNAP25, UNC13C, GLRB, ATP6V1B2, SCN2B, UCHL1, CALM3	0.0017	۷	GO:0051234~Establishment of localization
SNAP25, UNC13C, SNCA, CADPS, UNC13A, SYN2	0.0022	۶	GO:0007269~Neurotransmitter secretion
SYT13, SLC7A14, YWHAH, CALY, SNAP25, UNC13C, GLRB, ATP6V1B2, SCN2B, PTPRO, UCHL1, CALM3	0.0022	۱۲	GO:0051179~Localization
SNAP25, UNC13C, SNCA, CADPS, UNC13A	0.0033	۵	GO:0016079~Synaptic vesicle exocytosis
SNAP25, UNC13C, RIMBP2, GLRB, SCN2B, CALM3, GLS, GABRA5, SNCA, AMPH, SYN2	0.0045	۱۱	GO:0007267~Cell-cell signaling
UNC13C, CADPS, UNC13A	0.0045	۳	GO:1990504~Dense core granule exocytosis
SYT13, SLC7A14, YWHAH, CALY, SNAP25, UNC13A, SYN2, NDFIP2	0.0055	۸	GO:0006810~Transport
SNAP25, UNC13C, UNC13A	0.0103	۳	GO:0016081~Synaptic vesicle docking
SYT13, YWHAH, SNAP25, GLRB, CALM3, SNCA, NECAP1, AMPH, REPS2, NSF, CDC42, REEP1	0.0103	۱۲	GO:0061024~Membrane organization
SNAP25, UNC13C, CALM3, SNCA, CADPS, UNC13A, SYN2	0.0107	۷	GO:0001505~Regulation of neurotransmitter levels
YWHAH, SNAP25, ADARB1, L1CAM, CCK, CDC42, CA10, UNC13A, NRXN3, ENC1	0.0127	۱۰	GO:0007399~Nervous system development
SNAP25, GLRB, PLK2, UCHL1, HMGCR, GLS, GABRA5, ADARB1, CCK, NRXN3	0.0146	۱۰	GO:0007610~Behavior
YWHAH, SNAP25, RTN1, PLK2, ADARB1, L1CAM, CCK, CDC42, UNC13A, NRXN3, ENC1	0.0266	۱۱	GO:0048699~Generation of neurons

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	۴	۰.۰۴۴۴	SNAP25,UNC13C,NSF,UNC13A

جدول ۴ مسیرهای بیولوژیکی شناسایی شده با KEGG و براساس ژنهای مشترک شناسایی شده برای آلزایمر

ژنها	p-value	تعداد	عنوان مسیر
NSF, UNC13C, SNAP25, UNC13A, ATP6V1G2, ATP6V1B2	7.7×10^{-6}	۶	hsa04721:Synaptic vesicle cycle
CDC42, MAP2K4, ATP6V1G2, ATP6V1B2	۰.۰۰۳۲۶۷	۴	hsa05120:Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection
NSF, GNG3, GABRA5, GLS	۰.۰۰۶۳۷۷	۴	hsa04727:GABAergic synapse
CDC42, MAP2K4, MAP2K1, CALM3	۰.۰۰۷۷۰۲	۴	hsa04912:GnRH signaling pathway
CDC42, GNG3, MAP2K1, RASGRF2, CALM3	۰.۰۱۷۷۹۴	۵	hsa04014:Ras signaling pathway

برای تفسیر بیشتر ژنهای مشترک به دست آمده، ژنها به پایگاه داده STRING وارد شدند تا با آنالیز شبکه‌ای به دست آمده، اطلاعات جامع‌تری در رابطه با خود ژنها و روابط تنظیمی میان آنها به دست آید. با وارد کردن ژنها در STRING، شبکه میانکشن ژنها با استفاده از گره‌ها و یال‌ها رسم شد. شبکه‌ای حاوی ۶۵ گره و ۸۸ یال به دست آمد. شبکه به دست آمده در شکل ۴ قابل مشاهده است.



شکل ۴ شبکه ژنی برای ژنهای مشترک به دست 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 هر دو پارامتر می‌باشند.

UNC13A ، SYN2 و AMPH به‌عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در فرایند آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ مغز یافت شدند. جزئیات بیشتر درمورد این چهار ژن در جدول ۵ آورده شده‌است.

با آنالیز شبکه به‌دست آمده، می‌توان به ژن‌های کلیدی دست یافت. برای این کار، آنالیز شبکه با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و با تکیه بر پارامترهای درجه و مرکزیت بینایی انجام شد. درنهایت با در نظر گرفتن سه مقدار بیشینه برای هر کدام از پارامترها، ۴ ژن SNAP25 ،

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

پارامتر	ژن	DG	BC	LFC-GSE5281	LFC-GSE48350
درجه	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸۴۶۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	SYN2	۱۲	۰.۱۱۳۲۴	-۱.۸۱۹۵۹	-۱.۲۵۵۴۳
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷۴۷	-۱.۴۴۶۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
مرکزیت بینایی	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸۴۶۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷۴۷	-۱.۴۴۶۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
	AMPH	۶	۰.۱۶۹۱۵	-۲.۱۸۸۴۵	-۱.۱۲۹۸۹

۴- بحث

بیماری آلزایمر از شایع‌ترین بیماری‌های زوال عصبی می‌باشد و تضعیف عملکردهای شناختی در افراد درگیر با این بیماری، نگرانی‌های زیادی را به‌وجود آورده است، که از دست‌دادن تدریجی حافظه از مهم‌ترین آن‌ها است. اگرچه، در آلزایمر بخش‌های مختلف مغز به مرور دست‌خوش تغییر می‌شوند، اما ناحیه هیپوکامپ به عنوان اولین بخش از مغز است که دچار تحلیل می‌شود. از این‌رو، ناحیه هیپوکامپ به‌عنوان محوری‌ترین ناحیه در آلزایمر، در مطالعه حاضر مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته‌است. یکی از بهترین و موثرترین روش‌های یافتن درمان و تشخیص مناسب برای یک بیماری، بررسی تغییرات بیان ژن‌ها با تکیه بر پروفایل بیان ژنی می‌باشد. تکنیک‌های توان بالا به‌عنوان ابزاری ارزشمند، این امکان را در اختیار قرار می‌دهند تا سطوح اطلاعاتی مختلف یعنی ژنوم، ترنسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم با جزئیات کامل مورد مطالعه قرار گیرد. سطح ترنسکریپتوم به‌دلیل اینکه حدوداً سطوح ژن‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد از اهمیت به‌سزایی

برخوردار است و برای مطالعه‌ی پروفایل بیان ژنی به‌کار می‌رود[۳۵].

در مطالعه حاضر دو مجموعه داده که مجموعاً شامل ۸۵ نمونه از ناحیه هیپوکامپ مغز بودند، برای یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر انتخاب شدند. با آنالیز تفاوت بیان و سپس استخراج ژن‌های مشترک از دو دیتاست، ۷۴ ژن دارای تفاوت بیان گزارش شد. از این تعداد ۷۱ ژن با کاهش بیان، ۲ ژن با افزایش بیان و یک ژن با الگوی بیانی متفاوت بودند (جدول‌های ۱ و ۲).

با در دست داشتن لیست ژن‌ها اطلاعات فراتری را می‌توان بدست آورد. با استفاده از پایگاه داده DAVID، مسیرهای دخیل در آلزایمر توسط پایگاه‌های داده GO و KEGG استخراج شدند. دیده شد که ژن‌های مشترک به‌دست آمده در مسیرهایی مانند “synaptic vesicle cycle”، “neurotransmitter secretion” و “calcium-ion regulated exocytosis” دخیل هستند. این مسیرها در مطالعات صورت‌گرفته بر آلزایمر، به‌عنوان مسیرهای مهم در روند این بیماری گزارش شده‌اند (جدول‌های ۳ و ۴)[۳۶-۳۸].

شبکه‌های میانکشی ژنی این امکان را فراهم آورده‌اند تا محققین به صورت بصری با استفاده از شبکه‌های ارائه شده، میانکشی 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 ژن‌ها را در اختیار قرار می‌دهد. تحلیل و ارزیابی شبکه ژنی به دست آمده برای ژن‌های شناسایی شده، با استفاده از پارامترهای اشاره شده، ۴ ژن SNAP25، UNC13A، SYN2 و AMPH را به عنوان ژن‌های کلیدی در این بررسی معرفی کرد که اکثر این ژن‌ها در مسیرهای انتقال عصبی بین نورون‌ها دخالت دارند (جدول ۴ و ۵).

ژن SYN2 کدکننده 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، و زیکول 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 (به عنوان یکی از مهمترین مسیرهای حافظه)، مسیرهای حافظه را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز آلزایمر می‌شود [۳۹-۴۱]. 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 [۴۲]. تحقیقات انجام شده نشان داده است الیگومریزاسیون پروتئین α Sin 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 می‌گذارد که ژن‌های تنظیم‌کننده برای سیناپسین‌ها می‌باشند [۴۳].

تحقیقات صورت گرفته نشان داده‌اند که iridoidهای گیاهی با افزایش بیان ژن SNAP25، موجب افزایش پروتئین‌های سیناپسی و بهبود روند درمانی در افراد در معرض آلزایمر می‌شوند [۴۴]. ژن AMPH کد کننده پروتئین Amphiphysin، با تاثیر در مسیرهایی که پروتئین tau در آن حضور دارد، در روند بیماری آلزایمر دخیل می‌باشد. همچنین، به دلیل حضور پروتئین Amphiphysin در سمت سیتوپلاسمی غشای نورون پس‌سیناپسی، کاهش بیان ژن AMPH موجب اختلال در فرایند اندوسیتوز وابسته به کلاترین انتقال دهنده‌های عصبی در نورون پس‌سیناپسی و در نتیجه افزایش احتمال بروز و پیشرفت آلزایمر می‌شود [۴۵][۴۶]. فعالیت نامناسب پروتئین UNC13A که توسط ژن UNC13A کد می‌شود، مانع اگزوسیتوز ناقل‌های عصبی میان نورون‌ها می‌شود. علاوه بر آن، موجب تغییر ساختار نورون‌های باقیمانده در شبکه عصبی نیز می‌شود. UNC13A ژن هدف مسیر پیام‌سان ثانویه DAG می‌باشد که باعث تنظیم متابولیسم ترشح APP می‌شود و در جلوگیری از تجمعات بتا آمیلوئیدی نقش دارد [۴۷][۴۸]. جهش‌های متفاوت در ژن UNC13A باعث تغییرات مختلفی در دومین‌های پروتئین UNC13A می‌شود که فرایند رهاسازی انتقال دهنده‌های عصبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به طور 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 [۴۹].

بنابراین، اطلاعات گردآوری شده نشان می‌دهد کاهش بیان ژن‌های کلیدی معرفی‌شده در این مطالعه و جهش در پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها، به‌طور مشخصی مسیرهای اساسی دخیل در فرایند حافظه را تحت تأثیر 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 ژن‌های 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. در نتیجه هرگونه اختلال در اتصال پروتئین‌های UNC13A و SNAP25 به یکدیگر موجب بروز آلزایمر می‌شود [۵۰][۵۱][۵۲]. ارتباط بین پروتئین SYN2 و رشته‌های اکترین موجب تجمع وزیکول‌های سیناپسی و کمک به رهاسازی آن‌ها می‌شود. در نتیجه 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 [۵۳].

۵- نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نگرش جدیدی در رابطه با ارتباطات ژن‌های دخیل در آلزایمر گزارش کرده است. به‌طوری‌که ژن‌های معرفی‌شده در این مطالعه، در فرایندهای مجزا اما مرتبط باهم نقش دارند. فرایندهای رهاسازی و آگزوسیتوز 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 می‌شوند. تغییر بیانی و جهش در ژن‌ها و تغییر در پروتئین‌های حاضر در هرکدام از این مسیرها، مسیرهای دیگر را تحت تأثیر قرار داده و موجب

عدم ارتباط صحیح میان نورون‌ها و بروز آلزایمر می‌شود. 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، ژن‌های کلیدی گزارش شده در این مطالعه، مارکرهای بالقوه جهت توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر به حساب می‌آیند.

۶- 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. Cieřlik *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. Velmesev, 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.*

- [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.
- 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.

- 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 C1C2B 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.
- [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

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

Mehdi Sadeghi^{1*}, Sajjad Safari²

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