

Prediction of Seven Candidate Transcription Factors in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Using System Biology Approaches

Elham Siavashi¹, Ghasem Jamali², Fatemeh Salarian², Ali Salari^{3*}

¹Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Borujerd Branch, Islamic
Azad University, Borujerd,
Iran.

²Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Payame Noor University,
Qom, Iran.

³Young Researchers & Elite
Club, Borujerd Branch,
Islamic Azad University,
Borujerd, Iran.

*Corresponding Author:
Ali Salari, Young
Researchers & Elite Club,
Borujerd Branch, Islamic
Azad University, Borujerd,
Iran.

Email:
asalari1365@gmail.com

Received: 22 Jun, 2016

Accepted: 17 Jan, 2018

Abstract

Background and Objectives: Acute lymphoblastic leukemia is caused by damage to self DNA leading to uncontrolled cellular growth. The aim of this study was to find out a new appropriate diagnostic and therapeutic methods using differential gene expression and protein analyzes in different methods of the biology system.

Methods: Microarray library *GSE20011* was downloaded from *GEO* database and analyzed using *GEO2R* software. In this study, two groups of control (with benign Hodgkin lymphoma) and treatment (with acute lymphoblastic leukemia of B cells), were compared with each other. In BALL cancer, 338 genes were up-regulated and 252 genes were down-regulated, that analyzes of protein kinases, transcription factors, gene function, protein-protein interaction, and finally, drawing differential genes protein network, were performed by KEA, ChEA, DAVID, Gene2Network, and yEd databases, respectively.

Results: In this study, for the first time, seven transcription factors *LYL1*, *SPI1*, *TET1*, *POU3F2*, *LMO2*, *CUX1*, and *ELF1*, were reported as the candidate for diagnosis and treatment for BALL. Also, the importance of the role of membrane in BALL cells with the function of 97 up-regulated genes increased from the total 338 genes in cell membranes, showed the importance of membrane protection; and 97 genes were identified in cell resistance function for BALL cells, which can be interpreted as high resistance of BALL cells to molecular-based therapeutic approaches.

Conclusion: The results of this study can help to better understand the cellular resistance mechanism of BALL to treatment and provided seven candidate proteins for diagnosis and possibly treatment.

Keywords: Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell; Leukemia, Lymphoid- analysis; Transcription factors analysis; Systems biology.

پیش بینی هفت فاکتور رونویسی کاندید در لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول های B با استفاده از روش های سیستم بیولوژی

الهام سیاوشی^۱، قاسم جمالی^۲، فاطمه سالاریان^۲، علی سالاری^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد B (BALL)، با آسیب به DNA خود باعث ایجاد سلول هایی با قابلیت رشد غیر قابل کنترل می شود. هدف از این مطالعه یافتن روش های نوین مناسب تشخیصی و درمانی با استفاده از بیان افتراقی ژن ها و آنالیزهای پروتئینی در روش های مختلف سیستم بیولوژی بود.

روش بررسی: کتابخانه میکرواری *GSE20011* توسط دیتابیس *GEO* استخراج و با نرم افزار *GEO2R* آنالیز شد. در این مطالعه دو گروه کنترل (دچار سرطان لنفوم هوچکین خوش خیم) و تیمار (مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول های B) با هم مقایسه شدند. در سرطان BALL، ۳۳۸ ژن، افزایش بیان و ۲۵۲ ژن، کاهش بیان داشتند که بررسی های پروتئین کینازی و فاکتورهای رونویسی، عملکرد ژن ها، واکنش های مابین پروتئینی و در نهایت، رسم شبکه پروتئینی ژن های افتراقی به ترتیب به وسیله پایگاه های داده ای *ChEA*، *KEA*، *DAVID*، *Gene2Network* و *Ed* انجام و رسم گردید.

یافته ها: در این مطالعه برای اولین بار، هفت فاکتور رونویسی

CUX1، *LMO2*، *POU3F2*، *TET1*، *SP11*، *LYL1*، *ELF1* برای BALL به عنوان کاندید تشخیص و درمان گزارش شدند. همچنین اهمیت نقش غشا در سلول های BALL با عملکرد ۹۷ ژن افزایش بیان یافته از کل ۳۳۸ ژن در غشاهای سلولی، اهمیت بالای حفظ غشا را نشان داد و ۹۷ ژن در عملکرد مقاومت سلولی برای سلول های BALL شناسایی شدند که می تواند تفسیرکننده مقاومت بالای سلولی های BALL به روش های درمانی از نگاه مولکولی فرض گردد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه، می تواند به فهم بهتر مکانیسم مقاومت سلولی BALL در برابر درمان، ارائه هفت پروتئین کاندید تشخیص و احتمالاً درمان کمک کند.

کلید واژه ها: لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول های بی؛ لوسمی لنفوی-آنالیز؛ آنالیز فاکتورهای رونویسی؛ زیست شناسی سامانه ای.

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، قم، ایران.

^۳باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

علی سالاری، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
asalari1365@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Siavashi E, Jamali GH, Salarian F, Salari A. Prediction of seven candidate transcription factors in B-Cell Acute lymphoblastic leukemia using system biology approaches. Qom Univ Med Sci J 2018;12(1):1-14. [Full Text in Persian]

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد

(B-Acute Lymphoblastic Leukemia, BALL) در آمریکا با نرخ ۲۶٪، بیشترین آمار سرطان کودکان (سنین ۱۴-۰ سال) را در سال ۲۰۱۴ به خود اختصاص داد (۲،۱). همچنین ۷۵٪ سرطان‌های خون در کودکان، لوسمی لنفوبلاستیک حاد گزارش شده که در نتیجه، سرطان خون شایع کودکان به حساب می‌آید (۳). با وجود پیشرفت‌های انجام گرفته در درمان، ۲۰٪ از مبتلایان با عود بیماری مواجه می‌شوند و عود مهم‌ترین علت شکست پروسه‌های درمانی گزارش شده است (۴). شیوع عود ALL از بروز اولیه AML، تومور ویلمز، بیماری هودچکین و رابدومایوسارکوما بیشتر گزارش شده است (۳،۵،۶). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد ALL عود کرده به‌عنوان پنجمین سرطان متداول در کودکان می‌باشد (۳،۷). اگرچه ویژگی‌های بالینی، از قبیل: سن، شمارش لوکوسیت‌ها در زمان تشخیص و مشخصه‌های بیولوژیک سلول‌های لوسمیک (تعداد کروموزومی و جابه‌جایی‌های کروموزومی)، پیش‌آگاهی‌های مفیدی جهت انتخاب درمان مناسب هستند؛ اما بسیاری از بیماران دارای این ویژگی‌ها نبوده و به‌عکس آنچه انتظار می‌رود در برابر درمان مقاومت نشان می‌دهند (۳،۴)، از این‌رو شناخت بیشتر مکانیسم‌های مولکولی سرطان BALL، به فهم بهتر روند بیماری در افراد، همچنین به یافتن راه‌حل‌های جدید مانند کاندیدهای پروتئینی نوین جهت تشخیص و احتمالاً درمان بیماری کمک می‌کند. به‌همین جهت روش‌های بررسی از ژن‌های افتراقی، یکی از راه‌های مناسب بیماری تلقی شد و مبنای بررسی بعدی قرار گرفت. مقایسه پروفایل‌های ژنی به‌میزان فاصله‌ای که با یکدیگر خواهند داشت، از نظر محاسباتی، خطای بیشتری نسبت به دو گروه نزدیک به هم دارند؛ از این‌رو و به‌دلیل کاهش میزان خطا (Noise) در آنالیز، نمونه بدخیم با نمونه خوش‌خیم مقایسه گردید. Kochert و همکاران نیز مطالعه‌ای به‌روش مشابهی آنالیز میکروآرای بر روی نمونه‌های لنفوم انجام دادند (۸). در مطالعه حاضر یکی از نمونه‌های لنفوم خوش‌خیم (Classic Hodgkin Lymphoma, CHL) به‌عنوان کنترل و نمونه بدخیم لنفوم (B-Acute Lymphoblastic Leukemia, BALL) به‌عنوان تیمار در نظر گرفته شد.

در مطالعه حاضر سعی گردید تا با استفاده از روش‌های سیستم بیولوژی، فهم بهتری نسبت به مکانیسم‌های BALL حاصل شود، همچنین پروتئین‌های کلیدی که نقش مهمی در مکانیسم‌های سرطان ایفا می‌کنند، شناسایی و به‌عنوان کاندید تشخیص و احیاناً درمانی گزارش شدند.

روش بررسی

در این مطالعه داده‌های میکروآرای (با شناسه GSE20011) از پایگاه NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) بانک داده‌های GEO (Gene expression Omnibus) استخراج شد، سپس دو گروه CHL (کنترل) و BALL (تیمار) جهت استخراج ژن‌های با بیان افتراقی، با یکدیگر مقایسه شدند. در این مقایسه، تعداد نمونه‌های کتابخانه‌های میکروآرای برای CHL، ۱۰ عدد و BALL، ۱ عدد در نظر گرفته شد. مقایسه با نرم‌افزار GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r) انجام گرفت (۹). آنالیز عملکردی ژن‌های افتراقی به‌وسیله پایگاه‌های DAVID (www.david.abcc.ncifcrf.gov) و GO Molecular Function و GO Cellular Component (www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) به ترتیب صورت گرفت، همچنین توسط پایگاه BioCarta تکرار گردید (۱۲-۱۰). ژن‌های افتراقی به‌وسیله پایگاه Enrichr (www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) آنالیز بیماری شدند و بیماری‌هایی که ژن‌های مورد مطالعه در آنها نقش داشت، گزارش گردید (۱۰). ژن‌های افتراقی توسط بانک داده‌ای ChEA مورد بررسی فاکتورهای رونویسی قرار گرفتند (۱۳)، سپس ۱۰ فاکتور رونویسی برتر به‌دست‌آمده از بانک داده‌ای ChEA، به‌وسیله نرم‌افزار Genes2 Networks جهت شناسایی پروتئین‌هایی که با آنها دارای واکنش (Protein-protein interaction) بودند، بررسی و تحت عنوان پروتئین‌های حدواسط شناسایی شدند. همچنین پروتئین‌های حدواسط شناسایی شده جهت یافتن پروتئین کینازهای دارای واکنش با آنها، به‌وسیله پایگاه داده‌ای KEA (Kinase Expression Analysis) بررسی شدند که ۱۰ پروتئین کیناز دارای بیشترین ارتباط شناسایی بودند. در ادامه، مجموع ۱۰ فاکتور رونویسی برتر و پروتئین‌های حدواسط شناسایی شده و ۱۰ پروتئین کیناز برتر، به‌وسیله نرم‌افزار yEd نسخه ۳ شبکه پروتئینی آنها ترسیم گردید (۱۳، ۱۴).

یافته‌ها

نتایج بررسی داده‌های میکروآری، ۳۳۸ ژن افزایش بیان‌یافته و ۲۵۲ ژن کاهش بیان‌یافته را در نمونه BALL نسبت به CHL نشان داد. همچنین بیشترین میزان افزایش بیان برای DNA DNTT (Nucleotidylexotransferase) و بیشترین میزان کاهش بیان برای CCND2 (Cyclin D2) مشاهده گردید. نتایج بررسی مکان فعالیت ژن‌های افزایش بیان‌یافته در Intracellular و Brush border گزارش شد (جدول مکمل ۳)؛ درحالی‌که مکان فعالیت ژن‌های کاهش بیان‌یافته در قسمت‌های Membrane raft و Costamere دیده شد (جدول مکمل ۴). بررسی عملکردی ژن‌های افزایش بیان‌یافته در عملکردهای B Cell Receptor Signaling Pathway و Primary Immunodeficiency، بیشترین فعالیت را از خود نشان داد، به‌خصوص ژن‌هایی که در نقص ایمنی نقش ایفا می‌کنند و

با توجه به اینکه بیماری BALL یکی از انواع بیماری‌های نقص ایمنی است ژن‌های فعال در Primary Immunodeficiency می‌توانند مورد توجه بیشتر قرار گیرند. بالا بودن تعداد ژن‌های افزایش بیان‌یافته (۹۷ عدد ژن از ۳۳۸ ژن) که در غشا نقش ایفا می‌کنند، نشان از اهمیت عملکرد و حفظ غشا در سلول‌های سرطانی BALL است که می‌تواند یکی از دلایل مقاومت این نوع سلول‌ها در برابر داروها و درمان‌های سرطان باشد (جدول شماره ۱). درحالی‌که بررسی عملکردی ژن‌های کاهش بیان‌یافته، در عملکردهای Cytokine Receptor Activity، Cytokine binding و Cytokine-cytokine Receptor Interaction گزارش شد. عملکردهای مربوط به سایتوکاین‌ها، نشان‌دهنده عملکرد ژن‌ها در فرآیندهای مرگ سلولی و از بین بردن سلول توسط سایتوکاین‌ها بود که به‌وسیله سرطان BALL، بیان این دسته از ژن‌ها کاهش می‌یابد.

جدول شماره ۱: دسته‌بندی عملکردی ژن‌های افزایش بیان‌یافته

عملکردها	pvalue	تعداد ژن‌ها
مسیر سیگنالینگ ریسپتور سلول‌های B	1.3E-8	۱۱
نقص سیستم ایمنی اولیه	1.3E-7	۸
غشای پلاسمایی	3.3E-6	۷۶
قسمت غشای پلاسمایی	5.3E-5	۴۹
غشای سلولی	4.3E-4	۴۵
غشاء	2.3E-3	۹۷
تمایز لوکوسیت‌ها	7.8E-5	۱۰
تمایز لنفوسیت‌ها	8.3E-5	۹
فعال‌سازی لنفوسیت‌ها	1.9E-5	۱۳
فعال‌سازی لوکوسیت‌ها	2.8E-5	۱۴

در سرطان (BALL) می‌باشد.

پیش‌بینی عملکرد مولکولی ژن‌های افزایش بیان‌یافته را در عملکردهای Phosphatidylinositol 3-kinase binding و RNA Polymerase II distal Enhancer Sequence-Specific DNA Binding Transcription Factor Activity، نشان داد که به ترتیب بیشترین امتیازها را داشتند (جدول مکمل شماره ۱)؛ همچنین برای ژن‌های کاهش بیان‌یافته، بیشترین امتیاز برای عملکردهای RNA Polymerase II Regulatory Region DNA Binding و Cytokine Receptor Activity و Virus Receptor Activity

عملکرد ژن‌های افزایش بیان‌یافته به ترتیب در جدول شماره ۱ قرار گرفته است. جدول فوق، نشان‌دهنده ۱۰ عملکرد برتر از نظر معیار معنی‌داری ($p \leq 0.05$) می‌باشد. ستون اول، نوع عملکرد را نشان می‌دهد؛ ستون دوم تعداد ژن‌های دخیل در عملکرد و ستون سوم، معیار معنی‌داری را گزارش می‌کند. بهترین عملکرد به نقش در مسیر سیگنالینگ ریسپتور سلول‌های B و نقص ایمنی اولیه به‌ترتیب می‌باشد. همچنین عملکردی که بیشترین ژن را به خود اختصاص داده در غشا است. عملکرد این ژن‌ها در تمایز لنفوسیت‌ها، لوکوسیت‌ها و در فعالگرهای لنفوسیتی و لوکوسیتی نیز گزارش شده که نشان‌دهنده افزایش عملکردهای دفاعی بدن

بیماری‌های نقص ایمنی دسته‌بندی می‌شود. در لوکمیا نیز شباهت BALL به بیماری‌های لوکمیایی نشان داده شد. اما بررسی‌ها بر روی ژن‌های کاهش بیان‌یافته، نقش آن‌ها در بیماری‌هایی همچون Fibrosis, Osteoporosis, Spastic_paraplegia دیده شد (جدول شماره ۲).

گزارش شد (جدول مکمل شماره ۲). براساس نتایج نقش ژن‌های افتراقی در بیماری‌ها، ژن‌های افزایش بیان‌یافته به ترتیب در بیماری‌های Myocardial_Infarction, Immunodeficiency, Leukemia بیشتر گزارش شده است. همچنین در بیماری‌های نقص ایمنی نیز نقش فعالی داشتند که BALL نیز خود در دسته

جدول شماره ۲: ایفای نقش ژن‌های افتراقی در دیگر بیماری‌ها

بیماری‌های ژن‌های کاهش بیان‌یافته	بیماری‌های ژن‌های افزایش بیان‌یافته
فلج اسپاستیک ارثی	نقص سیستم ایمنی
پوکی استخوان	سکته قلبی
فیروز	سرطان خون (لوسمی)
ناهنجاری	میگرن
سرطان تیروئید	نقص ضرابان بطن راست
ناشنوایی	لنفوم
اختلال در گلیکوزیلاسیون	عقب‌افتادگی ذهنی
مالاریا	ناشنوایی
دیستروفی عضلانی	دیابت
بیماری انباشت گلیکوژن	آسم

WT1, POU3F2, LMO2, ERG, CUX1, LYL1, SPI1, ELF1, TET1, KDM5B

در میان ژن‌های افزایش بیان‌یافته، دیده شد که با فعال‌سازی، مجموعاً ۱۷۹ ژن از ۳۳۸ ژن افزایش بیان‌یافته، پتانسیل راه‌اندازی سلول به سمت BALL را نشان داده‌اند که دارای اهمیت مطالعاتی نیز می‌باشد (جدول شماره ۳). از ۲۳۹ فاکتور رونویسی استخراج‌شده از ژن‌های کاهش بیان‌یافته، تنها ۴ فاکتور رونویسی *STAT1, JUN, GATA3, VDR* در ژن‌های کاهش بیان‌یافته، مسئول فعال‌سازی ۴۱ ژن از ژن‌های کاهش بیان‌یافته بودند که این نیز به نوبه خود می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

جدول شماره ۳: فاکتورهای رونویسی ژن‌های افزایش بیان‌یافته

فاکتور رونویسی	هدف‌های ژنی	LogFC
KDM5B	۴۷	4.483952
WT1	۳۵	5.169946
CUX1	۳۵	2.854558
LMO2	۳۲	4.386032
POU3F2	۳۰	2.028974
ERG	۲۱	2.778742
TET1	۲۱	2.985366
SPI1	۱۷	2.319835
LYL1	۱۵	3.466519
ELF1	۱۳	3.018426

بررسی نقش ژن‌های افتراقی در بیماری‌های دیگر در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. ستون اول در جدول، نشان‌دهنده نام بیماری‌های است که نقش آن‌ها در ژن‌های افزایش بیان‌یافته گزارش شده و ستون دوم معرف بیماری‌هایی است که عملکرد ژن‌های کاهش بیان‌یافته در آن‌ها مشاهده شده است. همچنین نقش ژن‌های افزایش بیان‌یافته در بیماری نقص ایمنی مشخص است؛ درحالی‌که ژن‌های کاهش بیان‌یافته در بیماری فلج اسپاستیک ارثی دارای نقش می‌باشند.

بررسی نواحی بالادستی و پرموتوری ژن‌های افتراقی، باعث یافتن فاکتورهای رونویسی که بیشترین پیوند را با این نواحی داشته‌اند، گردید. برای ژن‌های افزایش بیان‌یافته، ۲۳۴ فاکتور رونویسی و برای ژن‌های کاهش بیان‌یافته، ۲۳۹ فاکتور رونویسی یافت شد که ۱۰ فاکتور برتر رونویسی هرکدام گزارش شدند (جدول مکمل شماره ۱ و ۵). بیشترین امتیاز از بین فاکتورهای رونویسی یافت‌شده از ژن‌های افزایش بیان‌یافته به *MTF2, SUZ12* و *JARID2* تعلق داشت؛ درحالی‌که بیشترین امتیاز برای فاکتورهای رونویسی یافت‌شده از ژن‌های کاهش بیان‌یافته مربوط به فاکتورهای *STAT4, SOX2* و *VDR* بود. فاکتورهای رونویسی

بررسی پروتئین‌کینازها از پروتئین‌های حدواسط صورت گرفت. بدین صورت برای ژن‌های افزایش بیان‌یافته، ۱۷۳ پروتئین‌کیناز شناسایی شد. کینازهای *LYN*، *SRC* و *SYK* به ترتیب با 18.07، 10.74، 10.63 بیشترین امتیازها (*Combined score*) را از خود نشان دادند (جدول شماره ۴). سپس پروتئین‌کینازهای اختصاصی (کینازهایی که در دسته افزایش بیان‌یافته وجود داشتند و در دسته کاهش بیان‌یافته گزارش نشدند). ژن‌های افزایش بیان‌یافته بررسی شد که از بین ۱۷۳ کیناز، تنها ۶۵ پروتئین‌کیناز اختصاصی یافت شد و از بین آنها تنها ۳ پروتئین کیناز *PTK2B*، *CSK* و *PIK3CA* معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود (جدول مکمل شماره ۸).

فاکتورهای رونویسی استخراج‌شده از پروموتورها و نواحی بالادستی ژن‌های افزایش بیان‌یافته گزارش شد. ستون اول، نشان‌دهنده نام فاکتور رونویسی است؛ ستون دوم، نشان‌دهنده تعداد فعال‌سازی هر فاکتور به صورت جداگانه بر روی ژن‌های افزایش بیان‌یافته و ستون سوم نیز میزان افزایش بیان هر کدام در سرطان BALL نسبت به نمونه کنترل می‌باشد. بهترین امتیاز از نظر تعداد فعال‌سازی به KDM5B با ۴۷ فعال‌سازی از ۳۳۷ ژن فعال‌شده در لوسمی لنفوبلاستیک حاد به سلول‌های B تعلق گرفت. پروتئین‌های حدواسط از ۱۰ فاکتور رونویسی برتر به دست آمده از ژن‌های افتراقی گزارش شد که مجموعاً برای شبکه افزایش بیان‌یافته، ۷۰ پروتئین حدواسط و برای شبکه کاهش بیان‌یافته، ۱۰۶ پروتئین حدواسط شناسایی گردید.

جدول شماره ۴: پروتئین‌کینازهای ژن‌های افزایش بیان یافته

پروتئین کینازها	pvalue	Adjusted pvalue	Z-score	Combined Score
LYN	9.078E-07	0.000157049	-2.06382	18.07689863
SRC	0.0001248	0.00719694	-2.178399	10.74843728
SYK	5.803E-05	0.005019447	-2.009161	10.63737217
FYN	0.0001778	0.007691208	-2.103737	10.2403109
LCK	0.0005083	0.014654599	-1.98463	8.381092505
CSK	0.0003403	0.011775458	-1.780302	7.907635865
INSR	0.0011322	0.027339482	-1.958946	7.051077633
IGF1R	0.0015803	0.027339482	-1.765697	6.355490907
ABL1	0.002342	0.036832861	-1.753408	5.788639234
BTK	0.0013117	0.027339482	-1.595428	5.742619314

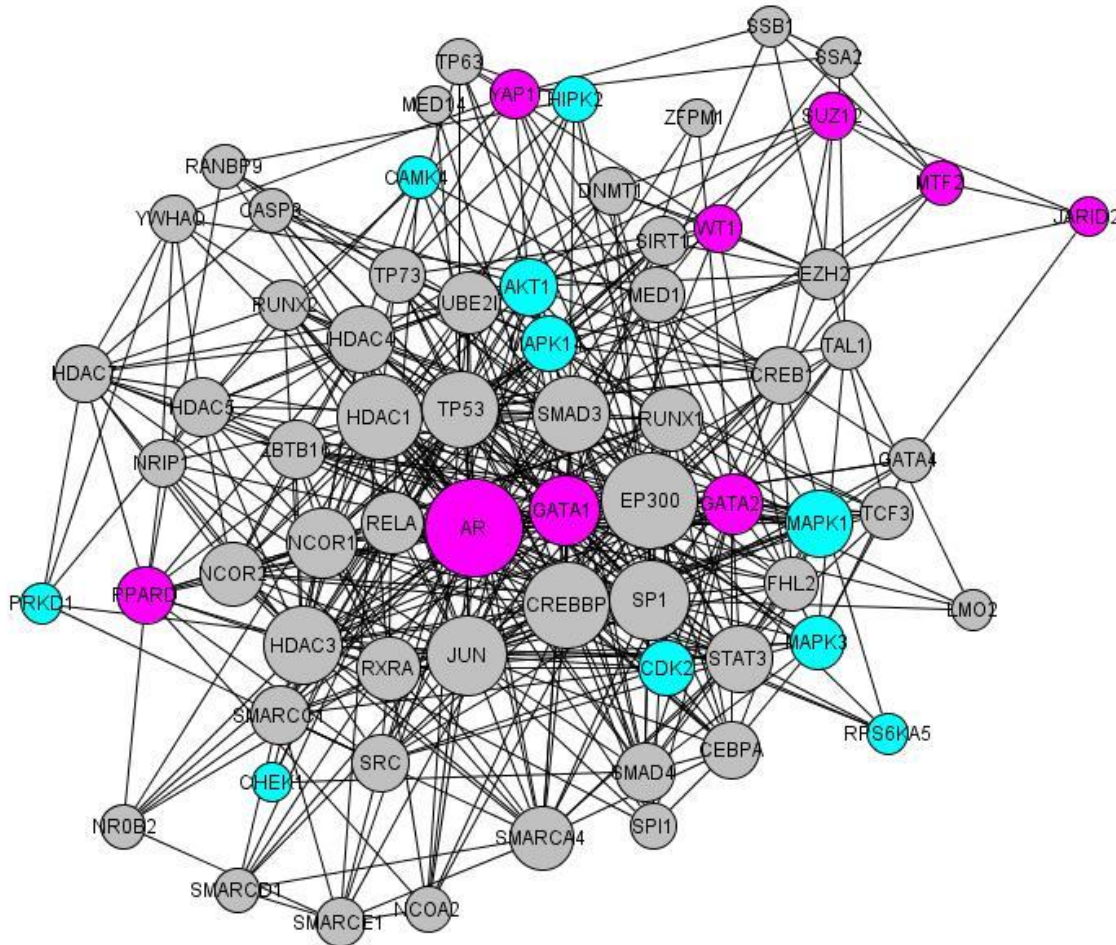
بررسی پروتئین‌کینازها از روی پروتئین‌های حدواسط ژن‌های افزایش بیان‌یافته انجام شد. ستون اول، نشان‌دهنده اسم پروتئین‌کیناز است؛ ستون دوم، نشان‌دهنده امتیاز pvalue بوده که معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$)؛ ستون سوم، امتیاز Adjusted p-value است؛ ستون چهارم نشان‌دهنده z-score بوده که به هر مقدار منفی‌تر باشد معنی‌دارتر است و در نهایت ستون پنجم، از سه ستون قبل خود

بررسی پروتئین‌کینازها از روی پروتئین‌های حدواسط ژن‌های افزایش بیان‌یافته انجام شد. ستون اول، نشان‌دهنده اسم پروتئین‌کیناز است؛ ستون دوم، نشان‌دهنده امتیاز pvalue بوده که معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$)؛ ستون سوم، امتیاز Adjusted p-value است؛ ستون چهارم نشان‌دهنده z-score بوده که به هر مقدار منفی‌تر باشد معنی‌دارتر است و در نهایت ستون پنجم، از سه ستون قبل خود

شبکه پروتئینی هر دسته از ژن‌های افتراقی، از تلفیق داده‌های به دست آمده از ۱۰ فاکتور رونویسی به همراه پروتئین‌های حدواسط و ۱۰ پروتئین کیناز در صورت داشتن ارتباط بین

همچنین برای شبکه پروتئینی ژن‌های کاهش‌یافته نیز ۱۰ فاکتور رونویسی برتر (جدول مکمل شماره ۵) و از ۱۰۶ پروتئین حدواسط شناخته‌شده، ۹۲ پروتئین دارای ارتباط با شبکه شناسایی شدند که به همراه ۱۰ پروتئین کیناز برتر (جدول مکمل شماره ۹) شبکه پروتئینی ژن‌های کاهش‌یافته ترسیم شد (شکل شماره ۲).

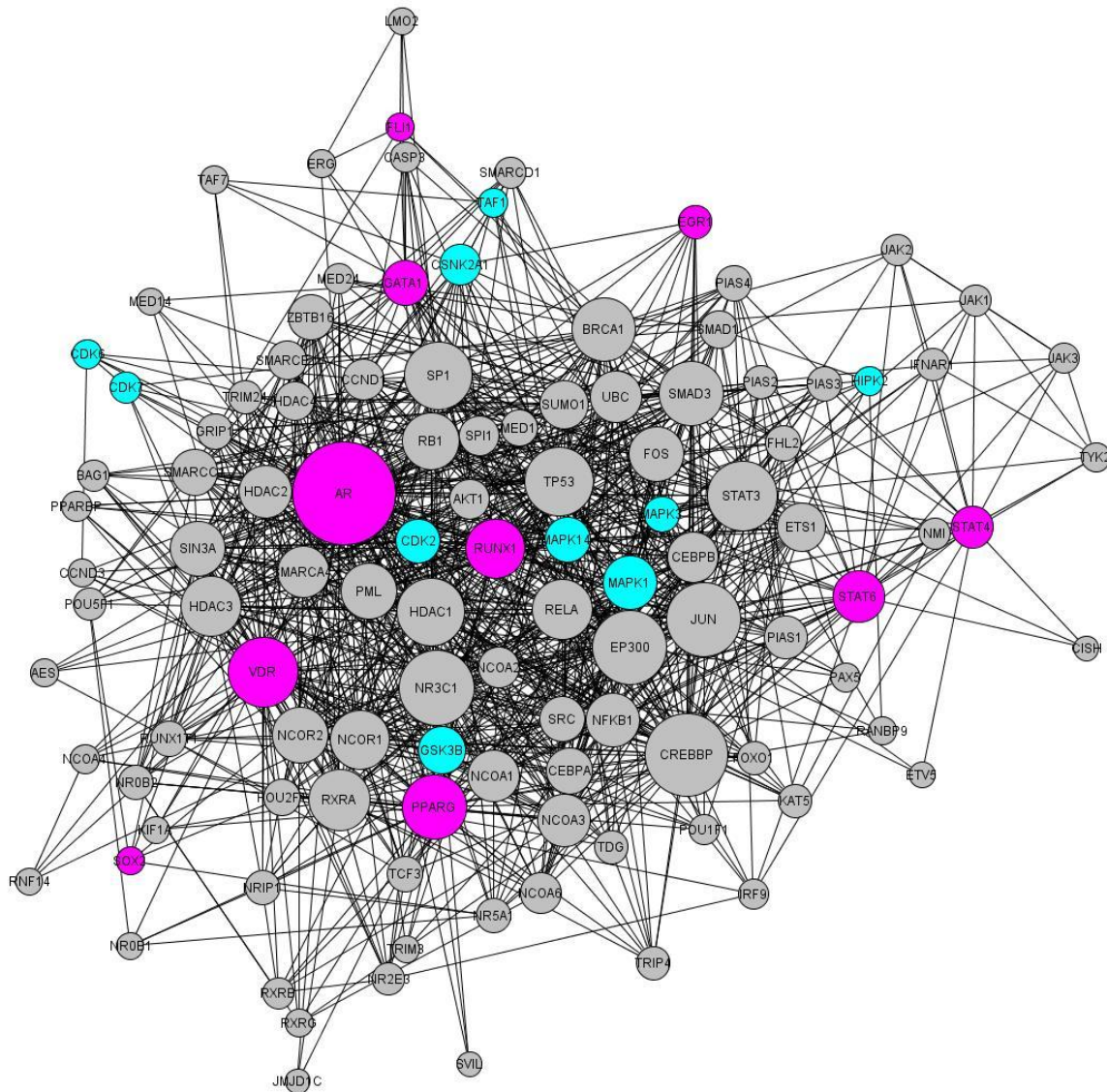
پروتئین‌ها کشیده شده است که برای شبکه افزایش‌یافته، ۱۰ فاکتور رونویسی برتر (جدول مکمل شماره ۱۱) و ۷۰ پروتئین حدواسط و ۱۰ پروتئین کیناز برتر (جدول شماره ۴) استفاده شد و تنها ۴۹ پروتئین حدواسط از ۷۰ پروتئین شناخته‌شده دارای ارتباط شبکه‌ای با دیگر پروتئین‌ها بودند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: شبکه پروتئینی ژن‌های افزایش‌یافته در لوسمی لنفوبلاستیک سلول‌های B.

بیشترین ارتباط به فاکتور رونویسی AR (Androgen Receptor) با ۳۹ ارتباط مستقیم گزارش شد. حجم دایره‌ها مربوط به میزان ارتباط با شبکه است و هرچه حجم کمتر باشد، ارتباط کمتر بوده و هرچه حجم بیشتر باشد ارتباط بیشتر است. مهم‌ترین پروتئین شبکه، یک فاکتور رونویسی AR با ۳۰ ارتباط مستقیم و ۴۰ ارتباط غیرمستقیم و در مجموع با ۷۰ ارتباط بین پروتئینی شناخته شد (شکل شماره ۲).

شبکه پروتئینی ژن‌های افزایش‌یافته با ۶۹ پروتئین و ۴۷۷ ارتباط به دست آمد که فاکتورهای رونویسی با رنگ بنفش، کینازها با رنگ سبز و پروتئین‌های حدواسط با رنگ خاکستری روشن ترسیم شده‌اند. این شبکه شامل ۶۹ پروتئین بوده که سهم فاکتورهای رونویسی و کینازها هر کدام ۱۰ عدد می‌باشد. یافته‌های این مطالعه، ۴۹ عدد پروتئین حدواسط را نشان داد که در حدواسط کینازها و فاکتورهای رونویسی قرار داشتند.



شکل شماره ۲: شبکه پروتئینی ژن‌های کاهش بیان یافته در لوسمی لنفوبلاستیک سلول‌های B.

فاکتور رونویسی AR در مرکز شبکه می‌باشد. حجم دایره‌ها مربوط به میزان ارتباط با شبکه بوده و هرچه حجم کمتر باشد، ارتباط کمتر است و هرچه حجم بیشتر باشد، ارتباط بیشتر است.

بحث

لوسمی لنفوبلاستیک حاد B، بیماری است که به دلیل افزایش تولید بی‌رویه سلول‌های B نابالغ در خون بروز می‌کند؛ به تعبیر دیگر، افزایش تعداد سلول‌های غیرعملکردی B در خون باعث ایجاد بیماری BALL می‌شود (۲، ۱). شیوع BALL بیشتر در کودکان دیده شده که بیشترین سن درگیر، ۵-۲ سال است.

شبکه پروتئینی ژن‌های کاهش بیان یافته نمونه تیمار با ۱۱۲ پروتئین و ۱۰۳۳ ارتباط پروتئینی کشیده شد که فاکتورهای رونویسی با رنگ بنفش، کینازها با رنگ سبز و پروتئین‌های حدواسط با رنگ خاکستری روشن کشیده شده‌اند. این شبکه شامل: ۱۱۲ پروتئین است که سهم فاکتورهای رونویسی و کینازها هر کدام ۱۰ عدد می‌باشد. در این مطالعه ۹۲ عدد پروتئین حدواسط گزارش شد. بیشترین ارتباط فاکتور رونویسی با ۳۰ ارتباط مستقیم و ۴۰ ارتباط غیرمستقیم و اثر مستقیم بر روی ۱۳ پروتئین و اثر غیرمستقیم بر روی ۲۹ پروتئین حدواسط بود. همچنین بر روی ۲ پروتئین کیناز اثر مستقیم، بر ۴ پروتئین کیناز، ۱ فاکتور رونویسی و ۸ پروتئین حدواسط، تأثیر غیرمستقیم داشت.

در یک مطالعه دیگر، جهش در *EZH2* به تنهایی یکی از دلایل اصلی ایجاد لوکمیا حاد بوده است (۲۰)، همچنین در این مطالعه، یکی از چند فاکتور رونویسی اصلی فعال‌ساز ژن‌های افزایش بیان‌یافته گزارش شد. از دیگر فاکتورهای مهم آنالیز فاکتورهای رونویسی می‌توان به *MTF2* و *JARID2* اشاره کرد (جدول مکمل شماره ۱۱). در مطالعه حاضر، ۱۰ فاکتور رونویسی جدول شماره ۳ به‌طور مجموع با فعال‌سازی ۱۷۹ ژن از ۳۳۸ ژن افزایش بیان‌یافته دارای پتانسیل بالایی در بردن سلول به سمت BALL بودند؛ به‌همین جهت ۱۰ فاکتور رونویسی را می‌توان به‌عنوان کاندیدهای هدف‌های درمانی و تشخیصی BALL معرفی کرد. *KDM5B* با تأثیرگذاری بر ۴۷ ژن افزایش بیان‌یافته، همچنین تأثیر بر ۵ فاکتور از ۱۰ فاکتور جدول شماره ۳، بیشترین تأثیرگذاری را داشت که در مطالعه Grossmann به‌خوبی نشان داده شده و *KDM5B* یکی از ژن‌های افزایش بیان‌یافته در لوکمیا حاد سلول‌های T به‌عنوان فاکتور رونویسی می‌باشد (۲۰). در مطالعه Tao افزایش بیان *KDM5B* با عملکرد هیستون دمتیلازی تأیید گردید (۲۱)، ولی در مطالعه حاضر نقش *KDM5B* به‌عنوان فاکتور رونویسی با تأثیرگذاری بر روی ۴۷ ژن و نقش هم‌بیانی *KDM5B* با ژن‌های افزایش بیان‌یافته در BALL برای اولین بار گزارش شد (جدول شماره ۳). اهمیت *WT1* (Wilms' tumor gene 1) در سلول‌های T لوکمیا حاد لنفوبلاستیک، همچنین BALL جهت تشخیص اختصاصی بیماری در سال ۱۹۸۳ توسط Vodinelich گزارش شد (۲۲). در مطالعه حاضر نیز *WT1* به‌عنوان دومین فاکتور رونویسی مهم در BALL با اثرگذاری بر روی ۳۵ ژن افزایش بیان‌یافته و تأثیرگذاری بر سه فاکتور رونویسی از ۱۰ فاکتور مورد مطالعه، رتبه دوم را در جدول شماره ۳ به خود اختصاص داد که نشان از صحت آنالیزهای انجام‌شده در مطالعه حاضر دارد. در این مطالعه پروتئین‌های کاندید آن از جمله *WT1* به‌وسیله داده‌های آزمایشگاهی توسط Vodinelich در سال ۱۹۸۳ نیز گزارش شد (۲۲) (جدول شماره ۳). همچنین اهمیت *ICUX1* (Cut-like Homeobox) (۳) تعمیرهای ناشی از اکسیداسیون DNA گزارش شده است (۲۳).

۸۰٪ کودکان مبتلا به BALL به‌طور کامل درمان می‌شوند که این نسبت برای بزرگسالان به ۴۰٪ نیز می‌رسد (۱۶، ۱۵). ۲۰٪ مبتلایان پس از سپری کردن دوره درمان دچار عود بیماری می‌شوند که غالب این افراد از دنیا می‌روند (۴). شیمی‌درمانی، درمان رایج BALL است (۱۷)، که به دلیل مقاومت بدن به‌خصوص پس از عود بیماری، درمان دچار مشکل می‌شود؛ از این‌رو نیاز به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی سرطان بیش از پیش بوده و یافتن پروتئین‌های کلیدی در مرحله بعد جهت هدف‌های تشخیصی و درمانی دارای اهمیت به‌سزایی است.

در مطالعه حاضر ژن‌های افتراقی جهت بررسی عملکردی آنالیز شدند که نتایج بررسی ژن‌های افزایش بیان‌یافته در عملکرد phosphatidylinositol 3-kinase binding دیده شد (جدول مکمل شماره ۱).

افزایش این عملکرد باعث جهش در *p110a* می‌شود که جهش در *p110a* عامل بسیاری از سرطان‌ها بوده و یک نمونه آن در تومورهای مغزی (سرطان گلیوبلاستوما) گزارش شده است (۱۸)، درحالی‌که در مطالعه حاضر عملکرد ژن‌های کاهش بیان‌یافته در DNA binding RNA polymerase II regulatory region نشان داده شده است که با اتصال به مناطقی از DNA باعث کنترل RNA pol II و تنظیم رونویسی می‌شود (جدول مکمل شماره ۲). ژن‌های کاهش بیان‌یافته با مهار ژن‌هایی که در کنترل و تنظیم رونویسی نقش دارند باعث مهار فرآیند رونویسی شده، ولی فرآیندهای همانندسازی و تکثیر با افزایش بیان ژن‌هایی که عملکردشان در فسفات‌کردن کینازی نقش دارد، فعال شده که عملکرد آن‌ها در مهاجرت، رشد، تکثیر و تغییر شکل سلول می‌باشد. در همه فازهای مختلف سلولی، این عملکرد نقش مهمی ایفا می‌کند و همه از رفتارهای سلول‌های سرطانی گزارش شده است. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی آنالیز پروموتورهای ژن‌های افزایش بیان‌یافته (به جهت یافتن فاکتورهای رونویسی) نشان می‌دهد بیشترین امتیاز در فاکتور رونویسی *SUZ12* بوده که در لوسمی لنفوبلاستیک حاد و سلول‌های T نقش تغییردهنده هیستون‌ها را به عهده دارند و از ژن‌های مهم ALL تلقی می‌شوند (۱۹). در مطالعه حاضر یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی، ژن‌های افزایش بیان‌یافته بود.

ELF-1 نزدیک ۶ برابر افزایش بیان یافته در BALL و با ۱۳ فعال‌سازی بر روی ژن‌های افزایش بیان یافته، برای اولین بار به‌عنوان فاکتور رونویسی در BALL مشاهده گردید (جدول شماره ۳).

آنالیزهای کینازی بر روی پروتئین‌های حدواسط انجام گرفت و برای ژن‌های افزایش بیان یافته، ۱۷۳ پروتئین کیناز شناسایی شد و ده تای برتر که مهم‌ترین آن *LYN* بود گزارش گردید (جدول شماره ۴). در این دسته کینازهایی که به‌صورت اختصاصی با پروتئین‌های حدواسط ژن‌های افزایش بیان یافته واکنش و ارتباط دارند نیز بررسی گردید و از بین ۱۷۳ کیناز، ۶۵ کیناز یافت شد که در گروه کینازهای کاهش بیان یافته وجود نداشتند. مهم‌ترین کیناز *LYN* بود که یکی از تیروزین کینازهای خانواده *Src* می‌باشد و در سلول‌های هماتوپوئیتیک (Hematopoietic Cells) سلول‌های خون‌ساز مغز استخوان، سلول‌های تولیدکننده لنفوسیت‌های B (۲۸)، بافت‌های عصبی (۲۹)، کلیه‌ها و بافت‌های چربی، بیان بالایی دارد (۳۰). *LYN* به‌عنوان آنزیم کلیدی فعال‌سازی در سلول هماتوپوئیتیک فعالیت می‌کند و با گیرنده‌های سطح سلول، از قبیل گیرنده آنتی‌ژن سلول B ارتباط دارد (۳۱)، که نشان‌دهنده اهمیت این کیناز در فعال‌سازی سلول‌های هماتوپوئیتیک بوده و نتیجه فعال‌سازی آن‌ها نیز تولید هرچه بیشتر سلول‌های B و افزایش آن‌ها در بدن فرد می‌باشد. در نتیجه با مهار *LYN* می‌توان فعال‌سازی سلول‌های هماتوپوئیتیک را کاهش داد و به‌همین دلیل می‌توان مارکر تشخیصی *LYN* را در نظر گرفت. همچنین *LYN* یک مهارگر تکثیر میلوئیدها است که از عملکرد آن در مهار سرطان AML (Acute Myeloid Leukemia) استفاده می‌شود، اما مهم‌ترین عملکرد *LYN* (در سرطان‌های مربوط به سلول‌های B) که آن را خیلی خاص می‌کند این است که کیناز *LYN* در سلول‌های B نقش تنظیم‌گر فعال‌سازی یا مهارسازی سیگنالینگ سلول B را به عهده دارد (۳۲-۳۴) و اهمیت درمانی کیناز *LYN* را نیز بسیار بالا می‌برد. در مطالعه حاضر، مهم‌ترین کیناز اختصاصی دسته ژن‌های افزایش بیان یافته، کیناز *CSK* گزارش شد (جدول مکمل شماره ۸). *CSK* نیز مانند *LYN* یکی از اعضای تیروزین کیناز *Src* بوده و مهم‌ترین عملکرد آن در رشد سلولی، تمایز، مهاجرت و پاسخ ایمنی است که به‌صورت فسفریله کردن انتهای C (کربوکسیلی) دم پروتئین‌های *Src* باعث

در مطالعه حاضر *CUX1* به‌عنوان سومین فاکتور رونویسی مهم که در فعال‌سازی ۳۵ ژن افزایش بیان یافته فعالیت دارد، برای اولین بار به‌عنوان فاکتور رونویسی مهم در BALL گزارش شد (جدول شماره ۳). Ferrando (سال ۲۰۰۲) ژن‌های *LYL1* و *LMO2* را به‌عنوان ژن‌های افتراقی افزایش بیان یافته در ALL سلول‌های T عنوان کرد (۲۴)، سپس در سال ۲۰۰۴ توانست *LMO2* را به‌عنوان فاکتور رونویسی مهم در ALL سلول‌های T گزارش کند (۲۵)، درحالی‌که در مطالعه حاضر *LMO2* به‌عنوان چهارمین فاکتور رونویسی مهم در ژن‌های افزایش بیان یافته که نسبت بیانش نزدیک به ۸ برابر حالت کنترل می‌باشد، مشاهده گردید و *ALL* سلول‌های B که بر روی ۳۲ ژن افزایش بیان یافته اثر القایی داشت برای اولین بار به‌عنوان چهارمین فاکتور مهم در BALL گزارش شد (جدول شماره ۳). همچنین در این مطالعه، ژن *LYL1* (در سلول‌های T لنفوبلاستیک لوکمیای حاد) برای اولین بار به‌عنوان فاکتور رونویسی مهمی که ۶ برابر افزایش بیان یافته داشت نشان داده شد (جدول شماره ۳) و تأثیرگذاری بر روی ۱۵ ژن افزایش بیان یافته دیگر نیز یکی دیگر از اثرات *LYL1* در مسیر BALL بود. در مطالعه حاضر برای نخستین بار، فاکتور رونویسی *POU3F2* به‌عنوان فاکتور رونویسی در ژن‌های افزایش بیان یافته BALL مشاهده گردید که با ۳۰ فعال‌سازی بر روی ژن‌های افزایش بیان یافته می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای رونویسی مهم جهت هدف‌های تشخیصی و دارویی معرفی گردد (جدول شماره ۳). Lorschach در مطالعه خود، *TET1* را به‌عنوان پروتئین تأثیرگذار در بازآرایی پروتئین *MLL* در سرطان (Acute Myeloid Lymphoblastic) AML گزارش کرد (۲۶). در مطالعه حاضر نیز *TET1* با تأثیرگذاری بر روی ۲۱ ژن افزایش بیان یافته و ۴ برابر افزایش بیان نسبت به نمونه کنترل در BALL به‌عنوان فاکتور رونویسی مهم در سرطان لنفوبلاستیک لوکمیای حاد سلول‌های B گزارش شد (جدول شماره ۳) و فاکتور رونویسی *SPI1* نیز که نزدیک به ۴ برابر افزایش بیان در BALL دارد، با ۱۷ فعال‌سازی ژن‌های افزایش بیان یافته برای اولین بار به‌عنوان فاکتور رونویسی در BALL مشاهده گردید (جدول شماره ۳).

Fukushima افزایش بیان افتراقی *ELF-1* را در AML گزارش کرد (۲۷)، درحالی‌که در مطالعه حاضر، فاکتور رونویسی

نکته مهم مشترک بودن پروتئین اصلی هر دو شبکه در هر دو دسته ژن‌های کاهش بیان یافته و افزایش بیان یافته، نشان‌دهنده این مطلب است که پروتئین AR نمی‌تواند عامل خوبی برای درمان باشد؛ چون در هر دو دسته، حضور اصلی و فعال دارد، اما شبکه پروتئین کشیده شده می‌تواند در جهت شناخت بیشتر عوامل دخیل در لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول‌های B جهت درمان بهتر و سریع‌تر مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اهمیت غشا در سلول‌های BALL به سبب ۹۷ ژن از مجموع ۳۳۸ ژن افزایش بیان یافته، در عملکردهای غشاهای سلولی بسیار بالا بوده که این خود می‌تواند از نظر مولکولی، توضیحی برای مقاومت بالای سلول‌های BALL نسبت به پروسه‌های درمانی باشد. یکی از اهداف مهم درمان‌ها، هدف قرار دادن غشاهای سلولی است که با توجه به حجم بالای فعالیت ژن‌های افزایش بیان یافته در سلول‌های BALL؛ تعمیر، ساخت و حفظ غشاهای سلولی در نتیجه مقاومت این نوع از سلول‌ها در برابر حمله‌های غشایی نظیر داروهایی که غشای سلول را هدف قرار می‌دهند خواهند داشت و دارای اهمیت به‌سزایی است. همچنین در مطالعه حاضر بررسی پروتئین‌های مختلف ۷ فاکتور رونویسی

برای *CUX1, LMO2, POU3F2, TET1, SPI1, LYL1, ELF1* اولین بار به‌عنوان کاندیدهای تشخیصی و احیاناً درمانی در BALL گزارش شدند که نقش کلیدی در مسیر BALL ایفا می‌کنند. در ادامه، ضروری است کاندیدهای ارائه شده به‌وسیله تکنیک Real-Time PCR تأیید گردند و برای هدف قرار دادن آن‌ها پیش‌بینی دارویی نیز توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر به‌طور کامل تحت حمایت مالی شرکت زیست سامانه نسل جدید [Systems Biology of Next Generation Company (SBNGC)] با کد مالی (SBNGC13961126) بوده است.

سرکوب فعالیت این پروتئین‌ها می‌شود (۳۵-۳۸)، همچنین فسفریله کردن گیرنده‌های BCR و TCR سلول باعث مهار مسیر سیگنالینگ می‌گردد (۳۹، ۴۰).

در بررسی بر روی پروتئین‌های حدواسط، از ژن‌های کاهش بیان یافته، ۱۷۰ پروتئین کیناز مرتبط مشاهده گردید که از این تعداد، ۶۲ عدد از کینازها، اختصاصی ژن‌های دسته کاهش بیان یافته پیش‌بینی شدند و از بین ۶۲ عدد کیناز (Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit Beta) IKKBK

بهترین امتیاز را گرفت که نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ *NF-kappa-B* ایفا می‌کند و این مسیر در آسیب‌های وارد شده به DNA، التهاب سایتوکاین‌ها، تولید باکتری‌ها و ویروس‌ها فعال شده و با فعال کردن صدها ژن باعث پاسخ ایمنی، کنترل رشد و محافظت در مقابل آپوپتوز می‌شود (۴۱، ۴۲). در مطالعه حاضر به جهت شناخت بیشتر مسیر دقیق و ارتباط همه مؤلفه‌های پروتئینی دخیل در لوسمی لنفوبلاستیک حاد B، شبکه‌ای از پروتئین‌های مهم پیش‌بینی شده ترسیم شد. شبکه پروتئینی می‌تواند ارتباط بین سه مرحله مسیر سیگنالینگ پروتئینی را تفسیر کند، همچنین باعث افزایش بیان ژن‌های افزایش یافته در BALL شود که مهم‌ترین پروتئین شبکه با ۳۹ ارتباط مستقیم به فاکتور رونویسی AR و در رتبه بعدی به پروتئین EP300 با ۳۸ ارتباط مستقیم که یک پروتئین حد واسط است اتصال دارد. EP300 پروتئینی است که در استیلشن هیستون‌های ۱ و ۲، در لنفوم‌های سلول‌های B و در ALL سلول‌های T قرار دارد (۱۹)، همچنین در سرطان‌های سینه و روده نیز نقش به‌سزایی ایفا می‌کند (۴۳). از دیگر پروتئین‌های مهم درون شبکه می‌توان به CREBBP اشاره کرد که با ۱۶ ارتباط مستقیم و ۱۳ ارتباط غیرمستقیم، نقش مهمی در شبکه دارد. این پروتئین دارای نقش فعال‌گری در سرطان ALL با عملکرد در تغییرات هیستونی و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی در روند رونویسی می‌باشد (۴۴).

References:

1. Heron M. Deaths: leading causes for 2010. *Natl Vital Stat Rep* 2013;62(6):1-96.
2. Muschen M. Rationale for targeting the pre-B-cell receptor signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125(24):3688-93.
3. Anedi M, Rahgozar S, Moafi AR, Ghaedi K, Moshtaghian SJ, Entezar-e-Ghaem MS, et al. Evaluation of the expression profile of MDR1 gene and assessment of its prognostic value in childhood ALL. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2014;10(4):326-34. [Full Text in Persian]
4. Lugthart S, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Holleman A, Cheng C, et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2005;7(4):375-86.
5. Szczepanek J, Styczynski J, Haus O, Tretyn A, Wysocki M. Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011;59(1):61-8.
6. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol* 2005;131(5):579-87.
7. Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, Min DJ, Lee H, Potter JW, et al. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group study. *Blood* 2006;108(2):711-7.
8. Kochert K, Ullrich K, Kreher S, Aster JC, Kitagawa M, Johrens K, et al. High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene* 2011;30(15):1831-40.
9. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D991-5.
10. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*. 2013;14:128.
11. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44-57.
12. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37(1):1-13.
13. Chen EY, Xu H, Gordonov S, Lim MP, Perkins MH, Ma'ayan A. Expression2 Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. *Bioinformatics* 2012;28(1):105-11.
14. Berger SI, Posner JM, Ma'ayan A. Genes2Networks: Connecting lists of gene symbols using mammalian protein interactions databases. *Nat Protoc* 2009;4(1):44-57.
15. Seiter KFS-AC, Talavera F, Sacher RA, Besa EC. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Res* 2014.
16. Weinblatt ME, Sakamoto KM, Windle ML, Cripe TP, Arceci RJ, ed. Pediatric Acute Myelocytic Leukemia. Medscape Reference. WebMD 2014.
17. Mukherjee S, Hoye S, Audio T. The emperor of all maladies: A biography of cancer. New York: Tantor Audio; 2010.
18. Bleeker FE, Lamba S, Zanon C, Molenaar RJ, Hulsebos TJ, Troost D, et al. Mutational profiling of kinases in glioblastoma. *BMC Cancer* 2014;14:718.
19. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012;481(7380):157-63.

20. Grossmann V, Bacher U, Kohlmann A, Artusi V, Klein HU, Dugas M, et al. EZH2 mutations and their association with PICALM-MLLT10 positive acute leukaemia. *Br J Haematol* 2012;157(3):387-90.
21. Tao YF, Pang L, Du XJ, Sun LC, Hu SY, Lu J, et al. Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci* 2013;14(2):3376-94.
22. Vodinelich L, Tax W, Bai Y, Pegram S, Capel P, Greaves MF. A monoclonal antibody (WT1) for detecting leukemias of T-cell precursors (T-ALL). *Blood* 1983;62(5):1108-13.
23. Ramdzan ZM, Vadnais C, Pal R, Vandal G, Cadieux C, Leduy L, et al. RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage. *PLoS biology* 2014;12(3):e1001807.
24. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* 2002;1(1):75-87.
25. Ferrando AA, Herblot S, Palomero T, Hansen M, Hoang T, Fox EA, et al. Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103(5):1909-11.
26. Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 2003;17(3):637-41.
27. Fukushima T, Miyazaki Y, Tsushima H, Tsutsumi C, Taguchi J, Yoshida S, et al. The level of MEF but not ELF-1 correlates with FAB subtype of acute myeloid leukemia and is low in good prognosis cases. *Leuk Res* 2003;27(5):387-92.
28. Yamanashi Y, Mori S, Yoshida M, Kishimoto T, Inoue K, Yamamoto T, et al. Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(17):6538-42.
29. Umemori H, Wanaka A, Kato H, Takeuchi M, Tohyama M, Yamamoto T. Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;16(3-4):303-10.
30. Yamada E, Pessin JE, Kurland IJ, Schwartz GJ, Bastie CC. Fyn-dependent regulation of energy expenditure and body weight is mediated by tyrosine phosphorylation of LKB1. *Cell Metab* 2010;11(2):113-24.
31. Yamamoto T, Yamanashi Y, Toyoshima K. Association of Src-family kinase Lyn with B-cell antigen receptor. *Immunol Rev* 1993;132:187-206.
32. Lowell CA. Src-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 2004;41(6-7):631-43.
33. Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, et al. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappa B activation during B cell development. *Nat Immunol* 2003;4(3):274-9.
34. Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. Lyn tyrosine kinase: Accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005;22(1):9-18.
35. Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 1991;351(6321):69-72.
36. Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, et al. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* 1993;73(6):1125-35.
37. Chong YP, Chan AS, Chan KC, Williamson NA, Lerner EC, Smithgall TE, et al. C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK), a unique inhibitor inactivating multiple active conformations of Src family tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. *J Biol Chem* 2006;281(44):32988-99.

38. Chong YP, Mulhern TD, Cheng HC. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* 2005;23(3):233-44.
39. Bergman M, Mustelin T, Oetken C, Partanen J, Flint NA, Amrein KE, et al. The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J* 1992;11(8):2919-24.
40. Sun G, Budde RJ. Expression, purification, and initial characterization of human Yes protein tyrosine kinase from a bacterial expression system. *Arch Biochem Biophys* 1997;345(1):135-42.
41. Salmeron A, Janzen J, Soneji Y, Bump N, Kamens J, Allen H, et al. Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J Biol Chem* 2001;276(25):22215-22.
42. Clark K, Peggie M, Plater L, Sorcek RJ, Young ER, Madwed JB, et al. Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem J* 2011;434(1):93-104.
43. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, et al. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* 2000;24(3):300-3.
44. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011;471(7337):235-9.