

Investigating the Signaling Pathways Involved in Fighting Opportunistic Virus Infection with Helper T Lymphocyte Cells

Hassanzadeh Parisa¹, Mohammadi Mahnaz^{2*}, Taheri Saba²

• Received: 12 May 2023

• Accepted: 10 Dec 2023

Introduction: People with weakened immune system are more prone to opportunistic infections (OIs). Finding the association of these viruses and the transmission pathways associated with these viruses, such as EBV and CMV, play a significant role in investigating their association with helper T lymphocytes. In this study, bioinformatics analysis was used to examine and candidate genes in pathways associated with opportunistic viruses with helper T lymphocytes.

Method: In this study, by referring to the GEO database, a suitable database was selected for analysis. This dataset included gene expression profiles in EBV and CMV virus infections. Gene clusters were classified into high and low expression. Rich databases such as Enrichr, STRING, and NetworkAnalyst were used to evaluate the data more accurately. Finally, the candidate genes were isolated and their protein binding was measured.

Results: 964 high-expression genes and 837 low-expression genes are involved in the progression of opportunistic viral infections with lymphocytes. Cell cycle pathways, oxidative stress, RNA synthesis and TGFB were significantly observed.

Conclusion: The present study showed that important proteins and genes played a major role in enhancing the inflammation of opportunistic viruses such as Epstein-Barr and Cytomegalovirus, among which CDK2, CCNB1, GSK3B, SRC, and SMAD3 showed a more prominent role in this pathway.

Keywords: Epstein Barr Virus, Gene Expression Profile, Bioinformatics Analysis, Cytomegalovirus, Opportunistic Viruses

• **Citation:** Hassanzadeh P, Mohammadi M, Taheri S. Investigating the Signaling Pathways Involved in Fighting Opportunistic Virus Infection with Helper T Lymphocyte Cells. *Journal of Health and Biomedical Informatics* 2023; 10(3): 201-13. [In Persian] doi: 10.34172/jhbmi.2023.26

1. MSc. in Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Islamshahr Branch of Islamic Azad University, Islamshahr, Tehran, Iran

2. Ph.D. in Biology, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Islamshahr Branch of Islamic Azad University, Islamshahr, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Mahnaz Mohammadi

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Next to the Governorate of Islamic Azad University, Sayad Shirazi St., Namaz Square, Islamshahr, Tehran

• **Tel:** 02156358105

• **Email:** m-mohamadi@iiu.ac.ir

© 2023 The Author(s); Published by Kerman University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cite

بررسی مسیرهای سیگنالی دخیل در تقابل عفونت ویروس‌های فرصت طلب با سلول‌های لنفوسیت T کمکی

پریسا حسن‌زاده^۱، مهناز محمدی^{۲*}، صبا طاهری^۲

• پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۹

• دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۲

مقدمه: افرادی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند سریع‌تر به عفونت‌های فرصت‌طلب (OIs) مبتلا می‌شوند. یافتن ارتباط ویروس‌ها و مسیرهای سیگنالی مرتبط با عفونت‌های این ویروس‌ها مثل اپشتین بار ویروس (EBV) و سایتو مگالو ویروس (CMV) نقش قابل ملاحظه‌ای در بررسی ارتباط آن‌ها با سلول‌های لنفوسیت T کمکی دارند. در این مطالعه با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک به بررسی و کاندید نمودن ژن‌های موجود در مسیرهای وابسته به عفونت ویروس‌های فرصت طلب با سلول‌های لنفوسیت T کمکی پرداخته شد.

روش: در این مطالعه با مراجعه به پایگاه داده GEO دیتاست مناسب برای آنالیز انتخاب گردید. این دیتاست شامل پروفایل بیان ژنی در عفونت ویروس‌های EBV و CMV بود. کلاسترهای ژنی با بیان بالا و پایین دسته‌بندی شدند. برای ارزیابی دقیق‌تر داده از پایگاه‌های داده غنی همچون Enrichr، STRING و Networkanalyst استفاده شد. در نهایت ژن‌های کاندید شده جدا و ارتباط پروتئینی آن‌ها نیز سنجیده شد.

نتایج: ۹۶۴ ژن با بیان بالا و ۸۳۷ ژن با بیان پایین در مسیرهای پیشرفت عفونت ویروسی‌های فرصت طلب با لنفوسیت‌ها نقش دارند. مسیرهای چرخه سلولی، استرس اکسیداتیو، سنتز RNA و TGFB به صورت بارزی مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌ها و ژن‌های مهمی در تقویت التهاب ویروس‌های فرصت‌طلب همچون اپشتین بار و سایتو مگالو ویروس نقش عمده‌ای داشته که از میان آن‌ها SRC، GSK3B، CCNB1، CDK2 و SMAD3 نقش بارزتری را نشان دادند.

کلیدواژه‌ها: اپشتین بار ویروس، پروفایل بیان ژن، آنالیز بیوانفورماتیک، سایتو مگالو ویروس، ویروس‌های فرصت طلب

• **ارجاع:** حسن‌زاده پریسا، محمدی مهناز، طاهری صبا. بررسی مسیرهای سیگنالی دخیل در تقابل عفونت ویروس‌های فرصت طلب با سلول‌های لنفوسیت T کمکی. مجله

انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۰(۳): ۲۰۱-۲۱۳. doi: 10.34172/jhbmi.2023.26

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، تهران، ایران
۲. دکتری زیست‌شناسی، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: مهناز محمدی

آدرس: تهران، اسلامشهر، میدان نماز، خیابان صیاد شیرازی، جنب فرمانداری دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

• Email: m-mohamadi@iiu.ac.ir

• شماره تماس: ۰۲۱۵۶۳۵۸۱۰۵

مقدمه

عفونت فرصت‌طلب عفونتی است که توسط عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها یا ویروس‌ها) ایجاد می‌شود، که از فرصتی که به طور معمول در دسترس نیست، استفاده می‌کنند [۱]. این فرصت‌ها می‌توانند از منابع مختلفی مانند سیستم ایمنی ضعیف، همان‌طور که در سندرم نقص ایمنی اکتسابی یا هنگام درمان با داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، مانند درمان سرطان رخ می‌دهد [۲]، یا یک میکروبیوم تغییر یافته (مانند اختلال در میکروبیوتای روده)، یا موانع پوششی شکسته شده (مانند ترومای نافذ) رخ دهد. بسیاری از این پاتوژن‌ها در میزبان سالمی که سیستم ایمنی ضعیفی دارد، بیماری ایجاد نمی‌کنند و در برخی موارد می‌توانند تا زمانی که تعادل سیستم ایمنی مختل نشود، به عنوان عامل مشترک عمل کنند [۳،۴]. عفونت‌های فرصت‌طلب را نیز می‌توان به پاتوژن‌هایی نسبت داد که باعث ایجاد بیماری خفیف در افراد سالم می‌شوند، اما زمانی که فرصت استفاده از میزبانی با نقص ایمنی داده می‌شوند، منجر به بیماری‌های جدی‌تر می‌شوند. از مهم‌ترین انواع این عفونت‌های ویروسی می‌توان به ویروس پولیومای انسانی (JC virus)، ویروس هرپس، سایتومگالو ویروس و اپشتین بار ویروس اشاره کرد. زمانی که عفونت توسط این ویروس‌ها شکل می‌گیرد [۵]، سیستم ایمنی باید به طور جدی با آن مقابله کرده که می‌تواند باعث خستگی سلول‌های لنفوسیت T کمکی در این درگیری شود [۶-۸]. به همین دلیل یافتن مسیرهای مهم سلولی و حتی پروتئین‌های مهمی که در این رویداد در سلول‌های لنفوسیت T کمکی دچار تغییر می‌شوند، می‌توانند به ما کمک کنند تا راهکارهای بهتری را برای تقویت سلول‌های لنفوسیت T کمکی اتخاذ شود. در طول عفونت اولیه، اپشتین بار ویروس (EBV= Epstein-Barr virus) از طریق اتصال gp350/220 به CD21 و gH/gL/gp42 به مولکول‌های HLA کلاس II روی سطح سلول به سلول‌های B متصل می‌شود. اتصال دو پروتئین ویروسی به گیرنده‌های آن اجازه ورود EBV به سلول‌های B را می‌دهد و پس از آن یک عفونت مادام‌العمر ایجاد می‌کند [۹]. به دنبال عفونت اولیه، EBV به طور پنهان در سلول‌های B حافظه در سطح ویروسی پایین (~۱ در ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول B) باقی می‌ماند [۱۰]، بنابراین حتی افراد سالم نیز می‌توانند بارهای قابل اندازه‌گیری EBV را در خون محیطی خود حمل کنند. علاوه بر سلول‌های B، EBV می‌تواند سلول‌های T یا کشنده طبیعی (Natural killer)

NK را آلوده کند، اگرچه مکانیسم دقیقی که توسط آن EBV سلول‌های T یا NK را آلوده می‌کند، ناشناخته است [۱۱]. EBV در هسته این لنفوسیت‌ها به شکل اپیزومی وجود دارد و به طور پنهان سلول را بدون تولید ویروس آلوده می‌کند. در بدخیمی‌های لنفوئیدی مرتبط با EBV، سلول‌های لنفوم آلوده به EBV وارد گردش خون می‌شوند و می‌توانند در خون محیطی شناسایی شوند [۱۲]. با این حال، جریان ورودی آن‌ها به خون محیطی به الگوهای بیان مولکول‌های چسبندگی خارج سلولی بستگی دارد و در بین انواع لنفوم متفاوت است (شکل ۱). به عنوان مثال، در اختلالات لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder)، سلول‌های آلوده به EBV در بافت‌های لنفاوی تکثیر شده و به خون محیطی منتقل می‌شوند؛ بنابراین بیشتر DNA ویروسی در خون محیطی مرتبط با سلول است. با این حال، در لنفوم هوچکین (Hodgkin's lymphoma) HL بیشتر سلول‌های لنفوم آلوده به EBV در بافت‌ها باقی می‌مانند و EBV-DNA اپیزومی مشتق شده از سلول‌های آپوپتوتیک یا نکروزه به خون محیطی می‌رود. در نتیجه، EBV-DNA موجود در خون در HL تا حد زیادی بدون سلول است؛ بنابراین EBV-DNA بدون سلول می‌تواند بار تومور بیمار و آسیب سلولی ناشی از التهاب یا ایمنی را نشان دهد؛ بنابراین بدون سلول می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی برای ارزیابی شدت بیماری یا پیش‌آگهی بیماران استفاده شود [۱۳]. این را می‌توان به اشکال مختلف EBV-DNA که در خون محیطی وجود دارد و آسیب‌شناسی‌های مختلف ناشی از حالت‌های مختلف بیماری EBV نسبت داد. در یک دهه گذشته استفاده از دانش بیوانفورماتیک کمک شایانی به یافتن انواع بیومارکرها از سطح ژنوم تا پروتئوم را در انواع مختلف بیماری‌ها و به خصوص بیماری‌های عفونی به همراه داشته است [۱۴،۱۵]. این امر موجب شده که در این مطالعه با استفاده از آنالیزهای پیوسته و یکپارچه بیوانفورماتیک به بررسی پروفایل بیان ژن سلول‌های لنفوسیت T کمکی با ویروس‌های فرصت‌طلب پرداخته و مسیرها و پروتئین‌های اختصاصی در این سلول‌ها جداسازی و مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

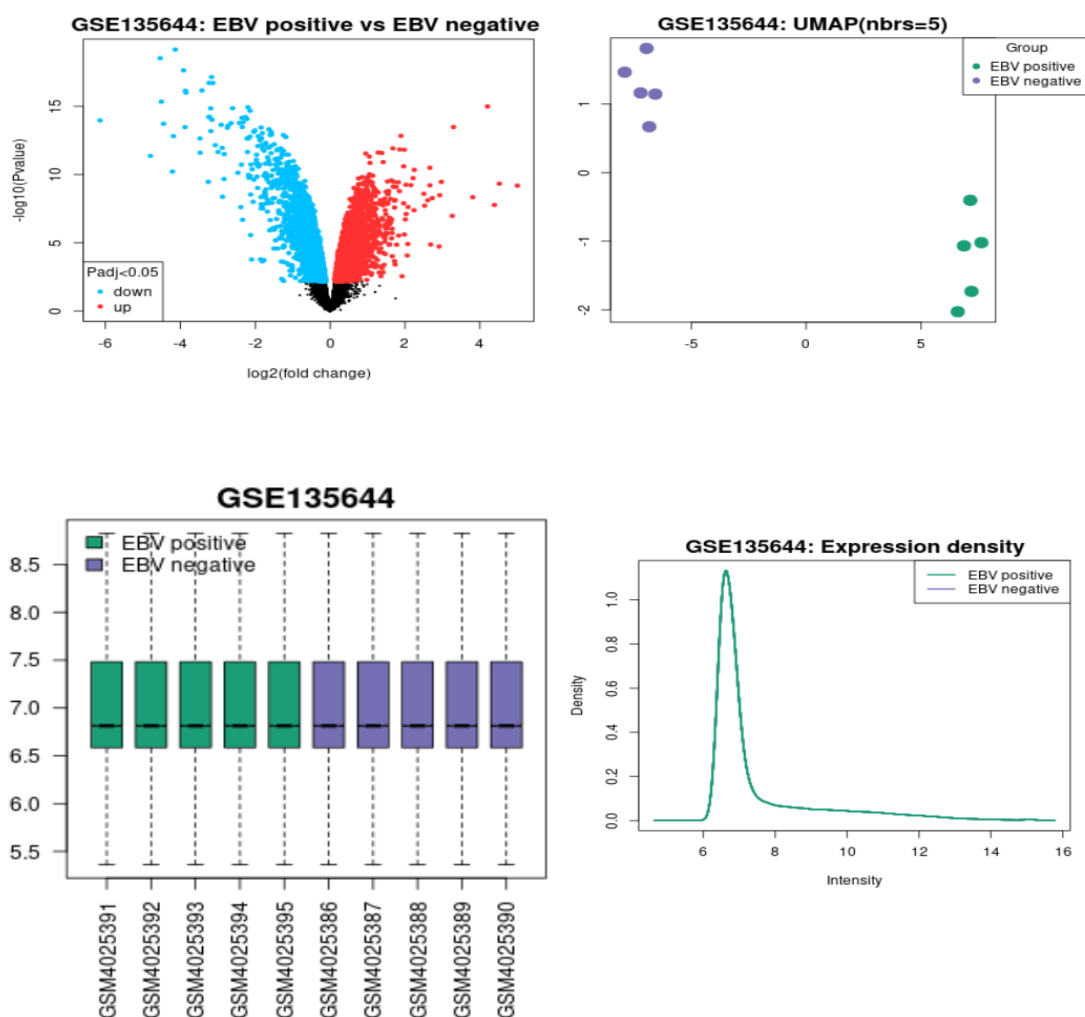
روش

دیتاست پروفایل بیان ژن ویروس سینسیتیال تنفسی در کودکان

آماده‌سازی داده‌های پروفایل بیان ژن برای انجام آنالیزهای تکمیلی

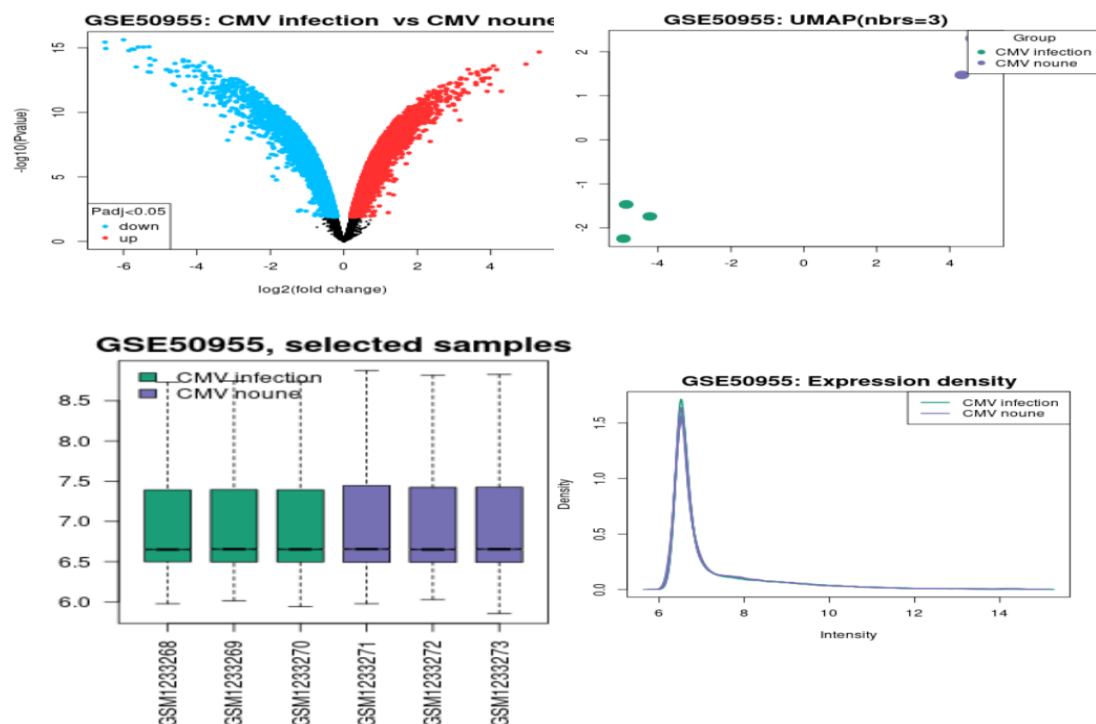
دیتاست‌ها به کمک آنالیز GEO2R جداسازی شد، سپس ژن‌های با $\log FC > 1$, $\log FC < -1$, $p\text{-value} < 0.05$ جدا شد و پس از آن ژن‌های با بیان بالا و پایین را دسته‌بندی شد. در نهایت داده‌ها را در فایل اکسل ذخیره نموده و برای سایر آنالیزها آماده شد.

در این مطالعه، مجموعه داده‌ها (دیتاست) GSE50955 و GSE134255 از پایگاه داده GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. این دیتاست دارای شش نمونه خون بود که شامل دو گروه با عنوان بیماران که عفونت EBV و CMV به همراه گروه کنترل بود (شکل ۱ و ۲). پلتفرم استفاده شده در این دیتاست Illumina HumanHT-12 GPL10558 V4.0 expression bead chip بود (شکل ۳ و ۴).



شکل ۱: اطلاعات کلی از پروفایل بیان ژن دیتاست GSE50955 که مرتبط با عفونت ویروس EBV بستری شده در بیمارستان

تصویر A نمودار ولکانو افتراق بیان ژن‌ها را بین این دو گروه نشان داده است. در تصویر B نمودار تراکم بیان ژن‌ها نشان می‌دهد برای آنالیز گزینه مناسبی هستند. تصویر C بار پلات از میزان تعداد ژن‌های معنی دار بوده و نمودار در ارتباط با شاخص T STATIC است. نمودار جعبه‌ای نمونه‌های هر گروه را نیز نشان می‌دهد. تصویر D میزان تراکم افتراق بیان ژن‌ها را در هر گروه نشان داده است.



شکل ۲: اطلاعات کلی از پروفایل بیان ژن دیتاست GSE134255 که مرتبط با عفونت ویروس CMV

تصویر A نمودار ولکانو افتراق بیان ژن‌ها را بین این دو گروه، در تصویر B نمودار تراکم بیان ژن‌ها نشان می‌دهد برای آنالیز گزینه مناسبی هستند. تصویر C بار پلات از میزان تعداد ژن‌های معنی‌دار بوده و نمودار در ارتباط با شاخص T STATIC است. تصویر D میزان تراکم افتراق بیان ژن‌ها را در هر گروه نشان داده است.

بیان و کمترین بیان را داشتند نیز به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در این قسمت نیز برای انتخاب بهترین Ontology ژن‌ها $p\text{-value} < 0.05$ بررسی گردید.

بررسی ارتباط بین پروتئین‌ها

ژن‌های انتخاب شده از مسیرهای سیگنالی و (gene STRINGS db.org) در پایگاه داده (https://string-cytoescape) آپلود شده و شبکه ارتباط بین پروتئین‌ها به دست آمد. برای نمایش بهتر داده‌ها از نرم افزار نسخه ۳.۷.۱ استفاده شد.

آنالیزهای آماری

داده‌های بیوانفورماتیک در این مطالعه بر اساس روش‌های قید شده و به صورت پیوسته و یکپارچه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مقادیر به دست آمده که $P\text{-Value} < 0.05$ به عنوان داده‌های معنی‌دار انتخاب شد.

نتایج

ژن‌های چرخه سلولی، تنظیم بیان ژن، کارسینوژنز و TGFB افتراق بیان بارزتری در عفونت ویروس‌های فرصت

بررسی مسیرهای سیگنالی

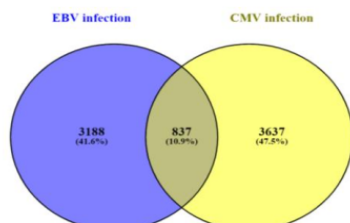
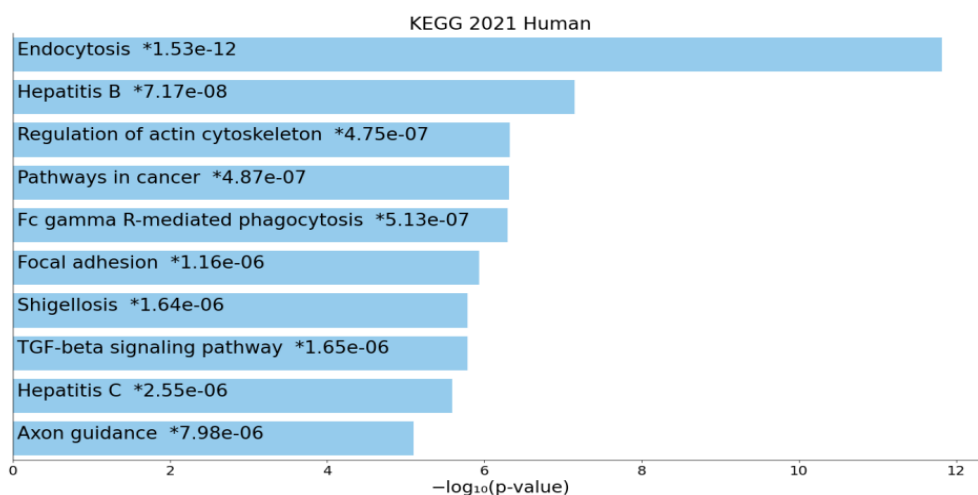
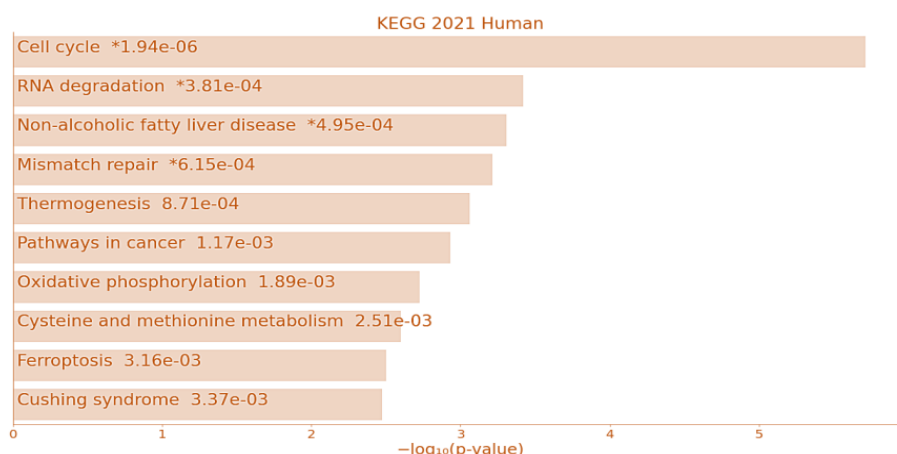
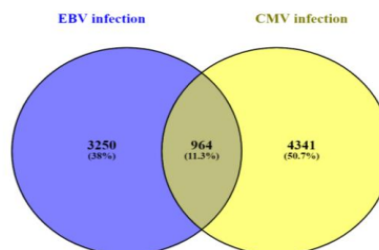
از دیتاست‌ها ژن‌هایی که دارای افتراق بیان بودند به صورت جداگانه با پایگاه داده Enrichr (https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) آنالیز نموده و به کمک KEGG مسیرهای سیگنالی مرتبط و ژن‌های دخیل در هر کدام انتخاب شد. لازم به ذکر است که $p\text{-value} < 0.05$ را برای مطالعه مسیرهای سیگنالی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ماهیت ژن‌ها

در این قسمت، از مسیرهای سیگنالی منتخب و مرتبط با عفونت‌های ویروس فرصت طلب‌ها آن‌ها را جدا نموده و به کمک پایگاه داده Enrichr و panther (http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.) دو بخش، فرآیندهای زیستی (Biological processes) و عملکردهای مولکولی (BP= molecular functions) و MF= مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه سنجش ژن‌های با بیان بالا به دلیل انتخاب بیومارکر مناسب به خصوص در اجزای سلولی بیشتر حائز اهمیت بود. در قدم بعدی ده ژنی که بیشترین

طلب نشان دادند.

اشتراک بین دیتاست‌ها نشان داد که ۹۶۴ ژن با بیان بالا و ۸۳۷ ژن با بیان پایین می‌توانند در مسیرهای عفونت ویروس‌های فرصت طلب نقش داشته باشند. مسیرهای چرخه



شکل ۳: ارزیابی مسیرهای سیگنالی A برای ژن‌های با بیان بالا و B برای ژن‌های با بیان پایین

جدول ۱: ده ژن اول بیشترین افتراق بیان را در عفونت ویروس EBV

Genes	LogFC	p-value
Upregulated genes		
<i>KRTHB1</i>	۴/۹۹۹۰۶۰	۶/۵ E-۱۰
<i>LMO2</i>	۴/۵۱۷۹۷۳۷	۴/۵ E-۱۰
<i>LEMD1</i>	۴/۳۷۸۱۳۷۸۲	۱/۷۱ E-۰۸
<i>DHRS2</i>	۴/۲۰۲۵۰۷۶	۱/۰۲ E-۱۵
<i>FPRL2</i>	۳/۸۰۹۰۶۲	۴/۶۲ E-۰۹
<i>ESM1</i>	۳/۳۹۵۶۴۰۵۸	۳/۳۱ E-۱۴
<i>NMUR2</i>	۳/۲۶۱۲۵۲۱۴	۱/۰۷ E-۰۷
<i>FGF20</i>	۲/۹۶۸۶۴۵۵۶	۳/۴۹ E-۱۰
<i>MYH13</i>	۲/۹۲۶۴۳۵۸۲	۳/۳۲ E-۰۹
<i>FOSB</i>	۲/۹۰۸۴۳۷۶	۱/۸۸ E-۰۵
Downregulated genes		
<i>APOA2</i>	-۶/۱۴۳۱۶۴۶۸	۱/۴۸ E-۱۴
<i>OLR1</i>	-۴/۷۹۸۱۸۹۸۶	۴/۳۴ E-۱۲
<i>PHF11</i>	-۴/۵۳۹۱۵۹۷۴	۲/۹۹ E-۱۹
<i>LOC284422</i>	-۴/۵۰۵۳۳۵۰۶	۴/۵۵ E-۱۶
<i>VTN</i>	-۴/۴۴۷۸۷۹۰۸	۱/۹۱ E-۱۴
<i>CTSE</i>	-۴/۲۰۹۹۷۸۸	۶/۰۷ E-۱۱
<i>PAGE4</i>	-۴/۱۸۵۹۲۴۲	۱/۵۳ E-۱۳
<i>REG4</i>	-۴/۱۳۶۱۶۳۵۴	۷/۰۰ E-۲۰
<i>C12orf59</i>	-۳/۹۱۴۲۷۷۶۴	۲/۳۲ E-۱۸
<i>PRSS35</i>	-۳/۸۷۳۵۲۶۹۶	۳/۳۶ E-۱۴

جدول ۲: ده ژن اول بیشترین افتراق بیان را در عفونت ویروس CMV

Genes	LogFC	
Upregulated genes		
<i>EPCAM</i>	۵/۳۲	۲/۱۲ E-۱۵
<i>EPCAM</i>	۴/۹۶	۱/۸۳ E-۱۴
<i>SNAR-A1</i>	۴/۲۹	۲/۳۶ E-۱۲
<i>TCEAL2</i>	۴/۱۶	۴/۹۸ E-۱۴
<i>FAM71E1</i>	۴/۰۷	۲/۵۳ E-۱۴
<i>BEX2</i>	۳/۹۸	۶/۹۲ E-۱۳
<i>TMSB15A</i>	۳/۹۶	۴/۲۷ E-۱۴
<i>SEMA4D</i>	۳/۹۵	۲/۱۶ E-۱۳
<i>HIST2H2AA3</i>	۳/۹	۴/۴۱ E-۱۴
<i>APOE</i>	۳/۹	۲/۳۸ E-۱۲
Downregulated genes		
<i>THBS1</i>	-۶/۵	۳/۶۸ E-۱۶
<i>TAGLN</i>	-۶/۴۸	۱/۱۳ E-۱۵
<i>ACTG2</i>	-۶	۲/۳۹ E-۱۶
<i>CEMIP</i>	-۵/۸۵	۱/۶۶ E-۱۵
<i>IGFBP5</i>	-۵/۷۷	۱/۲۵ E-۱۵
<i>IGFBP5</i>	-۵/۷۲	۱/۳۲ E-۱۵
<i>TAGLN</i>	-۵/۶۵	۱/۰۵ E-۱۴
<i>IGFBP3</i>	-۵/۶	۸/۸۱ E-۱۶
<i>DKK1</i>	-۵/۴۵	۸/۷۱ E-۱۶
<i>SERPINE1</i>	-۵/۳۳	۸/۳۸ E-۱۴

آنالیز Gene Ontology

در این قسمت ژن‌های با بیان بالا و پایین در دو بخش فرآیندهای سلولی و عملکردهای مولکولی ارزیابی شد. در

فرایندهای زیستی و فعالیت NADH dehydrogenase و فعالیت ATP در عملکردهای مولکولی شرکت داشتند.

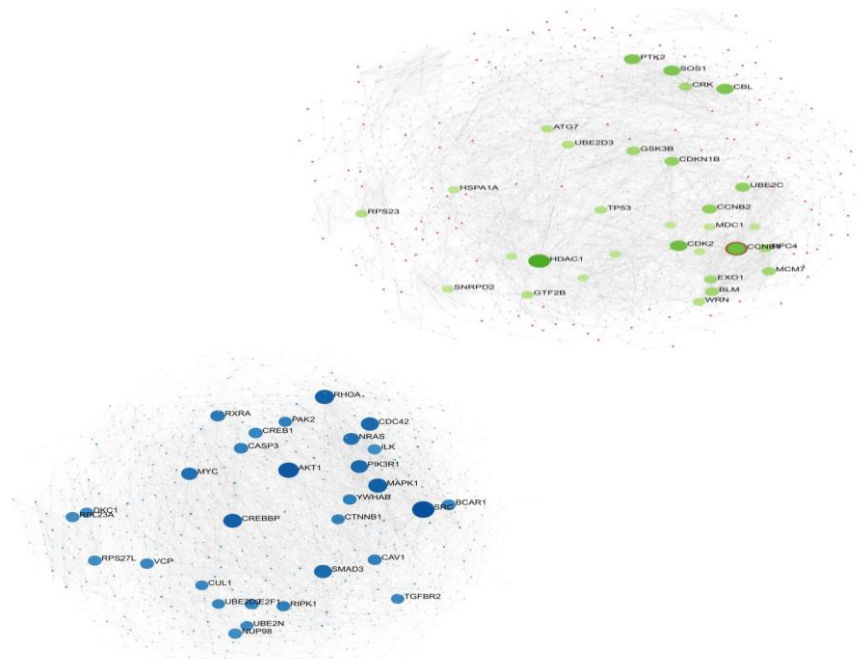
آنالیز شبکه پروتئینی

در این مرحله ژن‌های با بیان بالا و پایین که در مسیرهای مهم شرکت داشتند، بررسی شد. بر این اساس در شبکه پروتئینی با بیان بالا ۱۴۷ گره و ۷۱۰ لبه و برای شبکه پروتئینی با بیان پایین ۱۳۸ گره و ۳۱۰ لبه تشکیل شد که ارتباط بین پروتئین‌ها در مسیرهای عفونت ویروس‌های فرصت‌طلب مشخص شده‌اند (جدول‌های ۱، ۲ و ۳ و شکل ۴).

بخش فرایندهای زیستی مسیرهای چرخه سلولی، پردازش فرایندهای سلولی، خود تنظیمی مثبت در مسیرهای متابولیسمی، تنظیم فرایندهای بیوسنتزی و انتقالات درون سلولی، همچنین در عملکردهای مولکولی فسفات‌ها، اتصالات فریزلد، اتصالات اینتگرین‌ها، فاکتور رشد رگ‌های اندوتلیالی ۲ و فعالیت سایتوکاین‌ها وجود داشتند. همین بررسی به طور مشابه برای ژن‌های با بیان پایین نیز صورت گرفت که مسیرهای تنظیم متابولیسم فسفر، تنظیم تحرک سلولی، پاسخ به استرس‌های سلولی، پاسخ به مولکول‌های آلی، سازماندهی اندامک‌های سلولی و اصلاح ساختار ماکرومولکول‌ها در

جدول ۳: بیشترین ارتباطات پروتئین‌های با بیان بالا و پایین در شبکه

Proteins	Degree	Betweenness
Downregulated proteins		
SRC	۱۶۵	۱۳۵۰۷۲/۲۲
AKT1	۱۲۹	۱۳۱۱۰۹/۶۹
RHOA	۱۰۵	۶۰۱۶۵/۷۵
MAPK1	۱۰۳	۴۷۴۸۵/۲۸
CREBBP	۹۹	۷۲۳۹۹/۲۹
CDC42	۸۸	۳۳۰۱۸/۰۷
SMAD3	۸۶	۵۱۶۱۸/۳۶
PIK3R1	۷۸	۲۹۲۱۵/۱۹
MYC	۷۰	۴۲۷۶۹/۴۵
NRAS	۶۴	۲۳۸۲۶/۲۲
Proteins	Degree	Betweenness
Upregulated proteins		
HDAC1	۱۱۰	۱۲۰۳۳۱/۳۸
CCNB1	۷۰	۳۳۶۷۴۱/۶۲
CDK2	۶۳	۳۹۵۸۲/۵۱
CBL	۶۱	۵۳۸۰۸/۴۷
SOS1	۵۸	۴۴۸۲۷/۴۶
PTK2	۵۶	۵۱۱۲۲/۷۱
UBE2C	۴۶	۱۹۷۲۴/۵۹
CCNB2	۴۶	۹۳۶۶/۵۸
CDKN1B	۴۴	۳۲۸۷۹/۶۸
GSK3B	۴۲	۴۷۸۵۴/۴۴



شکل ۴: شبکه پروتئینی بین ژن‌های با بیان بالا و پایین در عفونت ویروس‌های فرصت‌طلب

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت فرصت‌طلب عفونتی است که توسط عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها یا ویروس‌ها) ایجاد می‌شود که از فرصتی که به طور معمول در دسترس نیست، استفاده می‌کنند. این فرصت‌ها می‌توانند از منابع مختلفی مانند سیستم ایمنی ضعیف همان‌طور که در سندرم نقص ایمنی اکتسابی یا هنگام درمان با داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، مانند درمان سرطان رخ می‌دهد [۱۶]. (یک میکروبیوم تغییر یافته (مانند اختلال در میکروبیوتای روده)، یا موانع پوششی شکسته شده (مانند ترومای نافذ). بسیاری از این پاتوژن‌ها در میزبان سالمی که سیستم ایمنی ضعیفی دارد، بیماری ایجاد نمی‌کنند و در برخی موارد می‌توانند تا زمانی که تعادل سیستم ایمنی مختل نشود، به عنوان عامل مشترک عمل کنند [۱۷، ۱۸]. عفونت‌های فرصت‌طلب را نیز می‌توان به پاتوژن‌هایی نسبت داد که باعث بیماری خفیف در افراد سالم می‌شوند، اما زمانی که فرصت استفاده از میزبانی با نقص ایمنی داده می‌شوند، منجر به بیماری‌های جدی‌تر می‌شوند [۱۹]. در این مطالعه دو ویروس بسیار مهم از این دسته عفونت‌های ویروسی (اپشتین بار و سائیتومگالو ویروس) انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه به کمک دانش بیوانفورماتیک، پروفایل بیان ژن در این دو ویروس ارزیابی شد تا بتوان مسیرهای سیگنالی مهمی که این ویروس‌ها را بسیار خطرناک کرده و سیستم ایمنی را تضعیف می‌کنند شناسایی کرده و ژن‌های دخیل در آن‌ها ارزیابی و ماهیت این ژن‌ها و پروتئین‌های آن‌ها نیز بررسی شد که نتایج جالبی نیز حاصل شد. تمایز پیشرفته سلول‌های T اختصاصی سائیتو مگالو ویروس (CMV = Cytomegalovirus) نیز با عدم بیان گیرنده‌های تحریک‌کننده CD27 و CD28 مشخص می‌شود، که در غیر این صورت به طور اساسی در سلول‌های T ساده بیان می‌شوند. این برخلاف سایر سلول‌های CD8 T ویژه ویروس است. به عنوان مثال، سلول‌های T اختصاصی ویروس هپاتیت C و EBV اغلب بیان CD27 و CD28 را نشان می‌دهند و سلول‌های CD8 T اختصاصی HIV، با وجود از دست دادن پیشرفته CD28، همچنان CD27 را بیان می‌کنند [۲۰]. اگرچه ممکن است این نیز بستگی داشته باشد. در مورد وضعیت بیماری [۲۱] عفونت‌های حاد HCMV اغلب در گیرندگان پیوند CMV منفی که اندام CMV مثبت دریافت می‌کنند رخ می‌دهد. در این افراد، پاسخ سلول‌های T اختصاصی CMV عمدتاً شامل سلول‌های T حافظه -CD28+CD27

CMV+CD45RA-CD45RO اندکی پس از اوج عفونت CMV است [۲۲]. با گذشت زمان، بیان CD27 از بین می‌رود و CD45RA دوباره در اکثر سلول‌ها بیان می‌شود [۲۳، ۲۴]. از دست دادن تدریجی CD27 نیز در مدل‌های موش مشاهده می‌شود و احتمالاً ناشی از تحریک مزمن آنتی‌ژنی است [۲۵]. در مدل‌های موش، نقش عملکردی CD27 و CD28 در عفونت CMV مورد مطالعه قرار گرفته است و نشان می‌دهد که تحریک CD28 به ویژه در طول عفونت اولیه برای افزایش گسترش سلول‌های T خاص CMV مهم است در حالی که به نظر می‌رسد CD27 و لیگاند آن CD70 نقش فعال‌کننده‌ای را در طول عفونت ایفا می‌کنند. هر دو مرحله اولیه و نهفته عفونت [۲۶-۲۹]، گیرنده تحریکی OX40 پس از فعال شدن به طور گذرا تنظیم می‌شود و در مرحله نهفته مهم است [۳۰]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ۱ (PD-1)، آنتی‌ژن لنفوسیت T سیتوتوکسیک ۴ (CTLA-4)، دامنه ایمونوگلوبولین سلولی T و پروتئین دامنه موسین ۳ (TIM-3)، ژن فعال‌کننده لنفوسیت ۳ (LAG-3) و CD160 هستند. گیرنده‌های بازدارنده مرتبط با فنوتیپ خستگی سلول‌های PD-1 T؛ به وفور در سلول‌های T خاص ویروس کوریومننژیت لنفوسیتی مزمن Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV=) در مدل‌های موش [۳۱] شناسایی شد و بعداً در تعدادی از عفونت‌های ویروسی مزمن از جمله HIV روی سلول‌های T تنظیم مثبت شد [۳۲، ۳۳]، ویروس هپاتیت B (HBV) [۳۴] یا HCV [۳۵] علاوه بر این، PD-1 و سایر مولکول‌های بازدارنده به وفور بر روی سلول‌های T در ریزمحیط تومور یافت می‌شوند و این جنبه مبنایی را برای تقویت سلول‌های T خسته با مسدود کردن این مولکول‌های بازدارنده تشکیل می‌دهد [۳۶]. در واقع، همان‌طور که توسط انواع LCMV که باعث ایجاد عفونت حاد یا مزمن می‌شوند، نشان داده شده است، القای فنوتیپ خسته توسط تحریک آنتی‌ژنی مزمن قوی ایجاد می‌شود [۳۷] و به دلیل فقدان کمک سلول CD4 T افزایش می‌یابد [۳۸]. در طول فاز نهفته، سلول‌های T اختصاصی CMV در گردش، سطوح نسبتاً پایینی از گیرنده‌های بازدارنده را بیان می‌کنند. بیان PD-1 در سلول‌های T اختصاصی CMV در مقایسه با سلول‌های T ویژه ویروس مزمن در برابر HIV، HBV و سلول‌های T اختصاصی EBV کمتر است. به همین ترتیب، TIM-3، CD160 و 2B4 نیز در سطوح پایین‌تری در سلول‌های T اختصاصی CMV در مقایسه با

سلول‌های T اختصاصی HIV بیان می‌شوند. با این وجود، تغییرات بین فردی بیان PD-1 و B4۲ مشاهده شده برای سلول‌های T اختصاصی CMV می‌تواند قابل توجه باشد. این ناهمگونی بیان PD-1 می‌تواند منعکس کننده فنوتیپ‌های تمایز متفاوت سلول‌های T حافظه ویژه ویروس باشد و این ممکن است مستقل از ظرفیت آن‌ها برای کنترل ویروس‌ها باشد. در واقع، بیان PD-1 با ظرفیت عملکردی (به عنوان مثال، ترشح سیتوکین‌ها و دگرانولاسیون) مرتبط نیست. علاوه بر این، داده‌ها نشان داد که سلول‌های CD8 T می‌توانند زمانی که فعال می‌شوند PD-1 را بیشتر تنظیم کنند [۳۸-۴۲]. در مجموع این نشان می‌دهد که PD-1، بیان شده در سلول‌های T خاص CMV، مستقل از فرسودگی سلول T است. کاربرد تمایز درمانی با هدف قرار دادن پلاستیسیته سلولی برای درمان بدخیمی‌های جامد با تأخیر مواجه شده است. کارسینوم نازوفارنکس (NPC=Cancer of the Nasopharynx) یک سرطان متمایز با تمایز ضعیف و شیوع بالای عفونت ویروس اپشتین بار (EBV) است. بیان پروتئین نهفته EBV LMP1 از طریق مهار رونویسی CEBPA باعث ایجاد وضعیت تمایززدایی و ساقه مانند با انعطاف‌پذیری بالا می‌شود. از نظر مکانیکی، LMP1 STAT5A را تنظیم می‌کند و HDAC1/2 را به محل CEBPA جذب می‌کند تا استیلایسیون هیستون آن را کاهش دهد. مهار HDAC بیان CEBPA را بازسازی کرد، تمایز زدایی سلولی و وضعیت ساقه مانند را در مدل‌های پیوند زنگرافت موش معکوس کرد. این یافته‌ها بینشی جدید مبتنی بر اپی ژنتیک مکانیکی را در مورد پلاستیسیته سلولی ناشی از ویروس ارائه می‌کند و یک مفهوم امیدوارکننده از درمان تمایز در تومور جامد با استفاده از مهارکننده‌های HDAC برای هدف قرار دادن پلاستیسیته سلولی پیشنهاد می‌کند [۲۶]. AL-saffar نشان دادند، تعداد کل (۱۲۰) بافت پستان فیکس شده با فرمالین و پارافین، میانگین سنی بیماران مبتلا به کارسینوم پستان ($41/75 \pm 8/763$ سال) از میانگین سنی گروه تومورهای خوش خیم ($39/47 \pm 7/825$ سال) و میانگین سنی زنان در گروه کنترل سالم ($37/33 \pm 7/556$ سال) بیشتر بود. درجه تمایز ضعیف سرطان پستان ($42/5$ BC) ($40/17\%$) را تشکیل می‌داد در حالی که افراد با درجه تمایز متوسط و خوب (30) ($40/12$ I) و ($27/5$) ($11/11$) را تشکیل می‌دادند [۴۳]. به ترتیب DNA HCMV در $37/5$ درصد (۱۵/۴۰) بافت‌ها از سرطان پستان و DNA HCMV در

بافت‌های تومورهای خوش‌خیم پستان در $17/5$ درصد ($7/40$) شناسایی شد. هیچ واکنش HCMV مثبت - ISH در بافت‌های سالم تخمدان گروه کنترل مشاهده نشد. واکنش مثبت P110-IHC در $42/5$ درصد (۱۷ مورد از ۴۰ مورد) تومور بدخیم پستان مشاهده شد. در حالی که در تومور خوش خیم پستان در $47/5$ درصد بیان شد. هیچ سیگنالی در بافت‌های گروه کنترل گزارش نشد. واکنش‌های مثبت CDK2-IHC در $47/5$ درصد ($19/40$) موارد سرطان پستان آشکار شد. در حالی که در تومور خوش‌خیم پستان نتایج مثبت 50% ($40/20$) بیان پروتئین CDK2- بود. هیچ سیگنالی در بافت‌های گروه کنترل گزارش نشد. واکنش مثبت P15-IHC در 45% ($40/18$) تومورهای بدخیم پستان و 35% ($40/14$) تومورهای خوش خیم تخمدان مشاهده شد. هیچ سیگنالی در بافت‌های گروه کنترل گزارش نشد [۴۴]. سیتومگالوویروس انسانی (HCMV) یک ویروس هرپس انسانی بیماری‌زا است که با علائم جدی و بالقوه تهدید کننده حیات در میزبان ضعیف یا دارای سیستم ایمنی همراه است. محدودیت‌هایی که گزینه‌های درمان ضد ویروسی در حال حاضر در دسترس هستند، شامل پانل باریکی از اهداف قابل دسترس، القای مقاومت دارویی ویروسی و همچنین عوارض جانبی شدید ناشی از دوز دارویی است. استراتژی‌های بهبود یافته هدف‌گیری دارو برای حل این مسائل، تمرکز تحقیقات این پژوهش است. به طور خاص، مهارکننده‌های کیناز دارویی (PKIs)، که با به سمت کینازهای میزبان هدایت می‌شوند یا به سمت پروتئین کیناز pUL97 ویروسی هدایت می‌شوند، برای غلبه بر این محدودیت‌ها در نظر گرفته شده‌اند. اخیراً، شناسایی ترکیبی هم افزایی از دو PKI را گزارش کردند که به میزبان کیناز ۷ وابسته به سیکلین (CDK7) و ارتولوگ CDK ویروسی pUL97 هدایت می‌شوند. در این مطالعه، این یافته‌ها با نتایج اثبات شد: هم افزایی دارویی واقعی توسط کلاس‌های شیمیایی مختلف از جفت‌های PKI به pUL97 و CDK7 نشان داده شد. هیچ تقویت احتمالی سمیت سلولی توسط این ترکیبات دارویی مشاهده نشد. کاهش در سطوح دوز دارو برای ترکیب‌های هم افزایی بر اساس کمی و در مقایسه با تک‌درمان‌ها تعریف شد. مقادیر پروتئین‌های هدف CDK7 و pUL97 بیان شده در سلول‌های آلوده به HCMV با تصویربرداری کانفوکال ارزیابی شد، که نشان دهنده تعدیل قوی سطوح CDK7 در نتیجه درمان دارویی هم افزایی است. اهمیت عملکردی این کینازهای هدف، هر دو اتصال به سیکلین H، با ارزیابی تکثیر HCMV

در این مسیر نشان دادند. البته که مطالعات مولکولی بیشتری برای اثبات دقیق تر مسیرهای ویروسی مورد نیاز است.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد. این تحقیق، برگرفته از پایان نامه‌ای می‌باشد، که تمام منشور اخلاقی در آن رعایت و در دانشگاه آزاد واحد اسلامشهر تهران انجام گرفته است. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، اعلام می‌نماییم.

References

1. Menotti L, Avitabile E, Gatta V, Malatesta P, Petrovic B, Campadelli-Fiume G. HSV as a platform for the generation of retargeted, armed, and reporter-expressing oncolytic viruses. *Viruses* 2018;10(7):352. <https://doi.org/10.3390/v10070352>
2. Tomer E, Cohen EM, Drayman N, Afriat A, Weitzman MD, Zaritsky A, et al. Coalescing replication compartments provide the opportunity for recombination between coinfecting herpesviruses. *The FASEB Journal* 2019;33(8):9388. doi: 10.1096/fj.201900032R
3. Moss P. From immunosenescence to immune modulation: a re-appraisal of the role of cytomegalovirus as major regulator of human immune function. *Medical Microbiology and Immunology* 2019;208(3-4):271-80. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00612-x>
4. Nikolich-Zugich J, Čicin-Šain L, Collins-McMillen D, Jackson S, Oxenius A, Sinclair J, et al. Advances in cytomegalovirus (CMV) biology and its relationship to health, diseases, and aging. *GeroScience* 2020;42:495-504. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00170-8>
5. Weissberg D, Mubiru F, Kambugu A, Fehr J, Kiragga A, von Braun A, et al. Ten years of antiretroviral therapy: incidences, patterns and risk factors of opportunistic infections in an urban Ugandan cohort. *PloS one* 2018;13(11):e0206796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206796>
6. Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40(Supplement 3):S131-235. <https://doi.org/10.1086/427906>
7. Solomon FB, Angore BN, Koyra HC, Tufa EG, Berheto TM, Admasu M. Spectrum of opportunistic infections and associated factors among people living

تحت حذف ژنومی ویروسی ORF-UL97 یا حذف سیکلین سلولی نشان داده شد. ترکیب‌های جدیدی از هم افزایی دارویی خاص HCMV برای درمان‌های هدایت‌شده صرفاً میزبان با استفاده از PKIs در برابر CDK2، CDK7، CDK8 و/یا CDK9 نشان داده شد و یک ترکیب سه‌گانه PKI پشتیبانی بیشتری از رویکرد هم افزایی ارائه کرد [۴۵]. مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌ها و ژن‌های مهمی در تقویت التهاب ویروس‌های فرصت طلب همچون اپستین بار و سائتومگالو ویروس نقش عمده‌ای داشته که از میان آن‌ها CDK2، SMAD3 و CCNB1، GSK3B، SRC نقش بارزتری را

- with HIV/AIDS in the era of highly active anti-retroviral treatment in Dawro Zone hospital: a retrospective study. *BMC Research Notes* 2018;11(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3707-9>
8. Nalini V, Segu R, Deepa PR, Khetan V, Vasudevan M, Krishnakumar S. Molecular insights on post-chemotherapy retinoblastoma by microarray gene expression analysis. *Bioinformatics and Biology Insights* 2013;7:BBI-S12494. <https://doi.org/10.4137/BBI.S12494>
 9. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology* 2010;20(4):202-13. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
 10. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *The J Immunol* 2004 15;173(12):7481-9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7481>
 11. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005;202(5):673-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882>
 12. Sissons JP, Wills MR. How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: now and in future. *Medical Microbiology and Immunology* 2015;204:307-16. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0415-0>
 13. Holtappels R, Pahl-Seibert MF, Thomas D, Reddehase MJ. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62Llo memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *Journal of Virology* 2000;74(24):11495-503. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11495-11503.2000>

14. Venkatesan N, Deepa PR, Vasudevan M, Khetan V, Reddy AM, Krishnakumar S. Integrated analysis of dysregulated miRNA-gene expression in HMGA2-silenced retinoblastoma cells. *Bioinformatics and Biology Insights* 2014;8:BBI-S16958.
15. Pichler S, Gu W, Hartl D, Gasparoni G, Leidinger P, Keller A, et al. The miRNome of Alzheimer's disease: consistent downregulation of the miR-132/212 cluster. *Neurobiology of Aging* 2017;50:167-e1. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.019>
16. Justiz Vaillant AA, Qurie A. Immunodeficiency. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
17. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2016;6:98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00098>
18. Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2014;27(3):419-40. doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00092-13>
19. Caballero MT, Polack FP. Respiratory syncytial virus is an "opportunistic" killer. *Pediatric Pulmonology* 2018;53(5):664-7. <https://doi.org/10.1002/ppul.23963>
20. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8(4):379-85. <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>
21. van Baarle D, Kostense S, van Oers MH, Hamann D, Miedema F. Failing immune control as a result of impaired CD8⁺ T-cell maturation: CD27 might provide a clue. *Trends in Immunology* 2002;23(12):586-91. doi: [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)002326-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)002326-8)
22. Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJ, Carmichael AJ. Identification of naive or antigen-experienced human CD8⁺ T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 2002;168(11):5455-64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5455>
23. Van Leeuwen EM, Koning JJ, Remmerswaal E, Van Baarle D, Van Lier RA, Ten Berge IJ. Differential usage of cellular niches by cytomegalovirus versus EBV-and influenza virus-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2006;177(8):4998-5005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.4998>
24. Pipeling MR, West EE, Osborne CM, Whitlock AB, Dropulic LK, Willett MH, et al. Differential CMV-specific CD8⁺ effector T cell responses in the lung allograft predominate over the blood during human primary infection. *J Immunol* 2008;181(1):546-56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.546>
25. Welten SP, Redeker A, Franken KL, Benedict CA, Yagita H, Wensveen FM, et al. CD27-CD70 costimulation controls T cell immunity during acute and persistent cytomegalovirus infection. *Journal of Virology*. 2013;87(12):6851-65. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.03305-12>
26. Arens R, Loewendorf A, Her MJ, Schneider-Ohrum K, Shellam GR, Janssen E, et al. B7-mediated costimulation of CD4⁺ T cells constrains cytomegalovirus persistence. *Journal of Virology* 2011;85(1):390-6. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.01839-10>
27. Arens R, Loewendorf A, Redeker A, Sierro S, Boon L, Klenerman P, et al. Differential B7-CD28 costimulatory requirements for stable and inflationary mouse cytomegalovirus-specific memory CD8⁺ T cell populations. *J Immunol* 2011;186(7):3874-81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003231>
28. Welten SP, Melief CJ, Arens R. The distinct role of T cell costimulation in antiviral immunity. *Current Opinion in Virology* 2013;3(4):475-82. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.012>
29. Welten SP, Redeker A, Franken KL, Oduro JD, Ossendorp F, Čičin-Šain L, et al. The viral context instructs the redundancy of costimulatory pathways in driving CD8⁺ T cell expansion. *Elife* 2015;4:e07486.
30. Humphreys IR, Loewendorf A, De Trez C, Schneider K, Benedict CA, Munks MW, et al. OX40 costimulation promotes persistence of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T Cells: A CD4-dependent mechanism. *J Immunol* 2007;179(4):2195-202. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2195>
31. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8⁺ T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439(7077):682-7. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
32. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* 2006;12(10):1198-202. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0846PPPP>
33. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;443(7109):350-4. <https://doi.org/10.1038/nature05115>
34. He XH, Jia QT, Li FY, Saltis M, Liu Y, Xu LH, et al. CD8⁺ T cells specific for both persistent and non-persistent viruses display distinct differentiation phenotypes but have similar level of PD-1 expression in healthy Chinese individuals. *Clinical Immunology* 2008;126(2):222-34. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.08.021>
35. Sekyere SO, Suneetha PV, Kraft AR, Zhang S, Dietz J, Sarrazin C, et al. A heterogeneous hierarchy of co-regulatory receptors regulates exhaustion of HCV-specific CD8⁺ T cells in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2015;62(1):31-40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.008>
36. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 2015;27(4):450-61. doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.001

37. Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* 2007;204(4):941-9. <https://doi.org/10.1084/jem.20061937>
38. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of Virology* 1994;68(12):8056-63. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.12.8056-8063.1994>
39. Hertoghs KM, Moerland PD, van Stijn A, Remmerswaal EB, Yong SL, van de Berg PJ, et al. Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120(11):4077-90.
40. Sauce D, Almeida JR, Larsen M, Haro L, Autran B, Freeman GJ, Appay V. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *Aids* 2007;21(15):2005-13. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282ee548
41. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006;203(10):2281-92. <https://doi.org/10.1084/jem.20061496>
42. Buggert M, Tauriainen J, Yamamoto T, Frederiksen J, Ivarsson MA, Michaëlsson J, et al. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathogens* 2014;10(7):e1004251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004251>
43. AL-saffar AK. Association of Molecular Localization of Human Cytomegalovirus (HCMV) and P110, CDK2 & P15 Genes Expression Products in Tissues from Iraqi Female Patients with Breast Tumors. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 2021;25(6):15369-85.
44. Xie J, Wang Z, Fan W, Liu Y, Liu F, Wan X, et al. Targeting cancer cell plasticity by HDAC inhibition to reverse EBV-induced dedifferentiation in nasopharyngeal carcinoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021;6(1):333. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00702-4>
45. Tang J, Wang F, Cheng G, Si S, Sun X, Han J, et al. Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating CDK2 mRNA stability. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018;37(1):1-2. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0706-6>