

تجزیه و تحلیل شبکه mRNA ها و RNA های غیر کدکننده مرتبط در سرطان تخمدان و نقش بالقوه آن ها در فنوتیپ مقاومت به داروی سیس پلاتین

زینب کربلایی پازکی^۱، امیررضا جوانمرد^۲، سید مصطفی حسینی^{۳*}، شیوا ایرانی^۴، بهرام محمد سلطانی^۵
 ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 ۲- دانش آموخته دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
 ۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 ۵- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 *صندوق پستی ۶۳۱۴۶۳۴۵۶۷، تهران، ایران
 geneticman2005@gmail.com
 پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۷ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۶

چکیده

مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی همواره مانعی در درمان قطعی سرطان‌ها بوده است. بنابراین، کشف وقایع مولکولی منجر به مقاومت دارویی، روش‌های درمانی را ارتقاء می‌دهد. lncRNAs دسته‌ای از مولکول‌های تنظیم‌کننده وقایع درون سلولی و از جمله مسیرهای سرطان‌زایی و مقاومت دارویی هستند. به‌طور مثال، شبکه رقابتی ncRNA های درون‌زا (ceRNA) با اتصال به miRNA ها و محدود کردن اثر تنظیمی آنها، بیان mRNA ی ژن‌های هدف را تنظیم می‌کنند. تاکنون مطالعات محدودی در مورد نقش ceRNA در ایجاد مقاومت دارویی در سرطان تخمدان گزارش شده است. در این مطالعه، اطلاعات توالی‌یابی حجیم RNAseq به دست آمده از سلول‌های مقاوم و حساس به سیس‌پلاتین برای جستجوی ceRNA های تنظیم‌کننده‌ی احتمالی مقاومت دارویی در سرطان تخمدان استفاده شد. براین‌این کار، رده سلولی تخمدانی حساس و مقاوم به سیس‌پلاتین به نام A2780 انتخاب، و داده‌های SRA تهیه شده به روش RNAseq غربالگری شد. طی این روند، lncRNA ها، microRNA ها و mRNA های دارای تغییرات بیانی تفکیک و طبقه بندی شدند. در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک سلول‌های مقاوم نسبت به حساس، ۱۶ عدد mRNA، ۱۰ عدد lncRNA و ۱۴۹ عدد miRNA دچار بیش بیان و ۶۲۲ عدد mRNA، ۲۶۳ عدد lncRNA و ۱۷۷ عدد miRNA دچار کاهش بیان بودند. این ژن‌ها در ۵۷ مسیر سلولی درگیر بودند و با ترسیم شبکه ceRNA تنظیمی، دو محور ZNRF3-AS1-miR-33-DUSP1 و ZNRF3-AS1-miR-33-DUSP1-miR-33-HSPA2 به‌عنوان شبکه‌های ceRNA بالقوه درگیر در سرطان تخمدان مقاوم به سیس‌پلاتین پیش‌بینی شدند. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که این ژن‌های تنظیم‌گر به‌عنوان اهداف جدیدی در درمان سرطان تخمدان مقاوم به داروی سیس‌پلاتین در نظر گرفته شوند.

کلید واژگان: مقاومت دارویی، سیس‌پلاتین، سرطان تخمدان، شبکه رقابتی RNA

۱-مقدمه

در میان بدخیمی‌های زنان، کارسینوم تخمدان بالاترین میزان مرگ‌ومیر را دارد و مقاومت به داروهای شیمی درمانی در این سرطان بسیار شایع است. [۱] ۷۲٪ از این بیماران در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند [۲، ۳]. بنابراین، میانگین بقای ۵ سال تنها در ۳۰٪ از این بیماران دیده می‌شود [۴، ۵]. جراحی همراه با درمان‌های بر پایه پلاتینیوم مثل سیس‌پلاتین و کربوپلاتین یکی از مهمترین درمان‌ها برای این بیماران می‌باشد [۶].

سیس‌پلاتین یکی از داروهای نسل اول شیمی درمانی است که با شکستن دو رشته DNA، در نهایت باعث آپوپتوز و مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود [۷]. اگرچه حدود ۷۵ درصد از بیماران در ابتدا به درمان با داروهای شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین پاسخ می‌دهند، اما در ۹۰ درصد موارد مقاومت دارویی باعث شکست درمان و مرگ بیماران می‌شود [۸، ۹].

جهش‌های سوماتیک، اختلال در تنظیم ژن‌های ناقل دارو، اختلال در روند آپوپتوز سلولی و تنظیم چرخه سلولی، مسیرهای رایجی هستند که منجر به مقاومت دارویی می‌شوند [۱۰، ۱۱]. مطالعات مختلفی نقش RNA های غیر کدکننده (ncRNAs^۱) را در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی و بیماری‌های انسانی، به‌ویژه در سرطان بررسی کرده است [۱۲ و ۱۳]. پیشرفت‌های اخیر بر نقش حیاتی ژن‌های ncRNAs در ایجاد مقاومت دارویی در سرطان تخمدان تاکید دارد. تا به امروز مشخص شده است که ژن‌های کدکننده و غیر کدکننده زیادی در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین نقش دارند [۱۴-۱۶]. با این حال، تقریباً هیچ روش مشخصی برای غلبه بر مقاومت دارویی وجود ندارد. بنابراین، لازم است جزئیات مسیرهای مولکولی منجر به مقاومت دارویی، به‌طور کامل بررسی شوند. این روش به

شناسایی اهداف جدید بالقوه برای درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان تخمدان کمک می‌کند.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ بررسی بیان افتراقی انواع RNA ها در داده‌های

SRA

برای بررسی بیان mRNA های دارای بیان افتراقی^۲ DEGs، و بررسی بیان افتراقی ژن‌های غیر کدکننده^۳ DELs و بررسی بیان افتراقی ژن‌های کدکننده miRNA ها^۴ DEMs در رده سلولی A2780 مقاوم و حساس به سیس‌پلاتین، داده‌های بیان ژن به شماره SRP-316044 ارائه شده توسط Sheera Adar (برای بررسی mRNA و lncRNA^۵) همچنین داده‌های بیان ژن به شماره SRP-302457 ارائه شده توسط Marcus Ernst Peter (برای بررسی miRNA) با کلمات کلیدی "سرطان تخمدان" و "مقاومت به سیس‌پلاتین" در پایگاه داده SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) انتخاب شد.

داده‌های بیانی با استفاده از پردازشگر آنالین Galaxy (Galaxy.org) بر اساس بسته آماری Dseq2 نسخه ۱،۶،۳ در برنامه R تجزیه و تحلیل شد ($\log_2(FC) > 2$ و $p < 0.05$).

۲-۲ پیش‌بینی شبکه بر همکنش تنظیمی بر اساس

lncRNA, miRNA, mRNA

برای بررسی رابطه بین lncRNA، mRNA و miRNA، از پایگاه‌های داده StarBase [18]، microcode [19] و TargetScan [20] به‌عنوان پردازشگر داده استفاده شد. StarBase رابطه بین ncRNA-miRNA و miRNA-mRNA را بر اساس داده‌های CLIP seq، پیش‌بینی می‌کند. پایگاه داده Mircode ژن‌های هدف miRNA را بر اساس رونوشت‌های GENCODE پیش‌بینی می‌کند. TargetScan پایگاه داده‌ای است که می‌تواند اهداف miRNA را در پستانداران با تطبیق سایت‌های ۸ mer

^۴ Differential Expression microRNAs

^۵ long non-coding RNA

^۱ competing endogenous RNA

^۲ Differential Expression Genes

^۳ Differential Expression lncRNAs

۱,۶,۳ در برنامه R ترسیم شد. مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

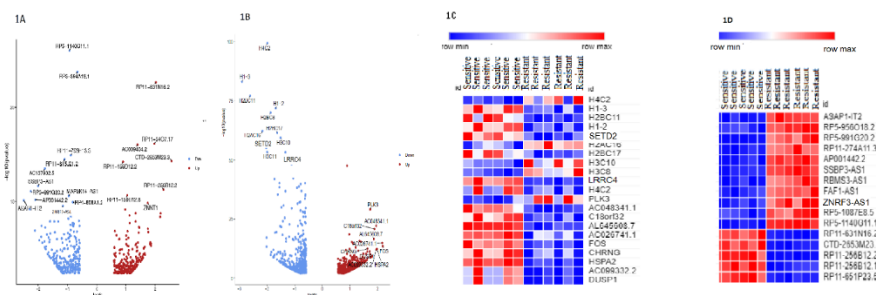
۲-۶ تجزیه و تحلیل شبکه هم بیانی

برای ارزیابی همبستگی میان DEGs، DEMs و DELs از تحلیل ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. مقدار مطلق ضریب همبستگی پیرسون ≤ 0.58 انتخاب شد و شبکه هم بیانی با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism ایجاد شد.

۳- نتایج

۱-۳ شناسایی DEGs، DEMs و DELs

در این مطالعه، ۱۴۵۳ عدد mRNA، ۴۹۷ عدد lncRNA و ۳۲۹ عدد miRNA با بیان متفاوت میان سلول حساس و مقاوم به سیس پلاتین شناسایی شدند ($\log Fc > 2$ ، $p < 0.05$). براین اساس ۱۶ عدد mRNA، ۱۰ عدد lncRNA و ۱۴۹ عدد miRNA افزایش بیان داشتند. اما ۶۲۲ عدد mRNA، ۲۶۳ عدد lncRNA و ۱۷۷ عدد miRNA در سلول مقاوم نسبت به سلول حساس کاهش بیان معنی دار داشتند (شکل ۱- جدول ۱). این تغییرات بیانی در نمودار آتش فشانی (شکل ۱- 1A و 1B) و هیت مپ (شکل ۱- 1C و 1D) مشهود می باشد.



شکل ۱ 1A و 1B نمودار آتش فشانی مربوط به mRNA ها و lncRNA های دارای بیان متفاوت بین رده سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس پلاتین. 1C و 1D نمودار هیت مپ مربوط به mRNA ها و lncRNA های با بیان متفاوت بین رده سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس پلاتین.

۷ mer و ۶ mer حفاظت شده در ناحیه Seed در 3'UTR هر mRNA پیش بینی کند.

۲-۳ ساخت شبکه تنظیمی ceRNA

برای ساخت شبکه تنظیمی lncRNA-miRNA-mRNA مربوط به سرطان تخمدان مقاوم به سیس پلاتین، از نتایج پیش بینی ژن های هدف lncRNA و miRNA های تغییر بیان یافته استفاده شد. در نهایت شبکه تنظیمی lncRNA، miRNA و mRNA توسط نرم افزار Cytoscape 3.6.1 ترسیم شد [۲۱].

۲-۴ تجزیه و تحلیل عملکردی و مسیرهای سیگنالینگ

برای انجام آنالیز هستی شناسی ژن در پایگاه Gene Ontology (GO) اجزای سلولی (CC)^۱، عملکرد مولکولی^۲ و فرایندهای بیولوژیکی^۳ بررسی شد و برای تجزیه و تحلیل مسیرهای درگیر از پایگاه داده KEGG^۴ استفاده شد.

۲-۵ تجزیه و تحلیل داده های TCGA^۵

برای بررسی خصوصیت پیش آگهی دهنده RNA های تغییر بیان یافته در ترکیب با داده های بالینی، نمودار Kaplan-Meier با استفاده از بسته آماری Survival نسخه

⁴ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
⁵ The Cancer Genome Atlas

¹ Cellular components
² Molecular Functions
³ Biological Processes

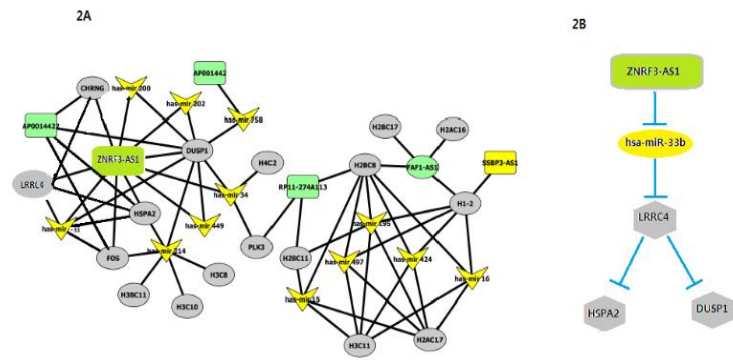
جدول ۱ mRNA، lncRNA و miRNA با بیان متفاوت بین رده سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس پلاتین. ۱۰ ژن اول با بیشترین تغییرات بیانی بین سلول حساس و مقاوم نشان داده شده است.

<i>DEGs</i>	<i>DEs</i>	<i>DEMs</i>	<i>Up/Down</i>
H3C8	AC137932.5	hsa-mir-873	Down
H3C11	RP11.28G8.1	hsa-mir-128-2	Down
H2AC12	RP11.428E7.2	hsa-mir-410	Down
ARID1B	INT99-AS1	hsa-mir-33b	Down
NACC2	ZNRF3-AS1	hsa-mir-181c	Down
H2AC4	PR11.484I8.1	hsa-mir-668	Down
H2AC20	AC133136.1	hsa-mir-411	Down
SETD2	AP001442.2	hsa-mir-889	Down
ZNF407	CTC486P18.1	hsa-mir-412	Down
LRRC4	RP13-820C6.2	SNORD121B	Down
PLK3	RP11-631N16.2	hsa-mir-33b	Up
AC048341.1	RP11-54O7.17	hsa-mir-1246	Up
C18orf32	CTD-2653M23.3	hsa-mir-4521	Up
AL645608.7	RP11-256B12.2	hsa-mir-1-2	Up
AC026741.1	ZNNT1	U75	Up
FOS	RP11-256B12.1	hsa-mir-629	Up
CHRNA2	RP11-651P23.5	HBII-82	Up
HSPA2	PYCARD-AS1	U64	Up
AC099332.2	CTD-3247F14.2	HBI-115	Up
DUSP1	RP11-314N13.9	U4530	Up
H3C8	RP11-113H14.3	U66	Up

تجزیه و تحلیل شبکه ... کربلایی پزشکی و همکاران

۲-۳ پیش‌بینی و ساخت شبکه تنظیمی lncRNA-miRNA
ارتباطات میان miRNA و lncRNA و همچنین miRNA و mRNA توسط StarBase پیش‌بینی شد. همچنین، mRNA های هدف miRNA با استفاده از TargetScan

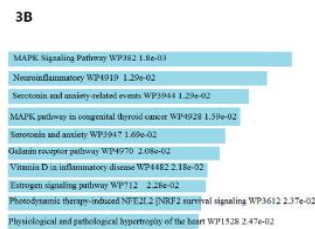
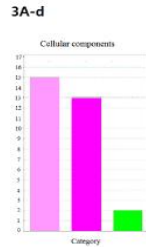
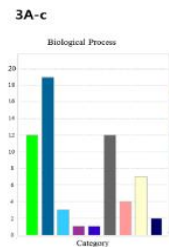
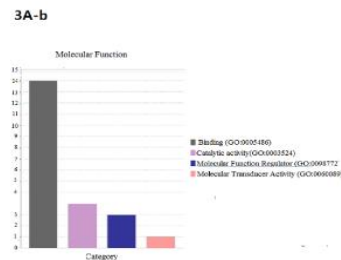
Mircode پیش‌بینی شدند. شبکه تنظیمی ceRNA بر اساس رقابت lncRNA و miRNA برای اتصال به ناحیه MRE در ژن‌های هدف و همچنین توانایی lncRNA در اسپانچ کردن miRNA و در نهایت تنظیم بیان ژن‌های هدف ایجاد شد (شکل 2A-2 و 2B).



شکل 2A شبکه ceRNA متشکل از mRNA، lncRNA و miRNA در رده سلولی A2780 مقاوم به سیس‌پلاتین. 2B محورهای احتمالی دخیل در مقاومت به سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان.

3A-a

Category	ID	Description	P-value
GO-BP	GO:1905758	negative regulation of chromatin organization	0.0007361
GO-BP	GO:2021526	negative regulation of chromatin silencing	0.0007261
GO-BP	GO:2051447	negative regulation of mitotic cell cycle	0.005866
GO-BP	GO:1903753	negative regulation of p38MAPK cascade	0.006980
GO-BP	GO:0031935	regulation of chromatin silencing	0.0001130
GO-MF	GO:0031492	nucleosomal DNA binding	0.0004924
GO-MF	GO:0006530	protein tyrosine/threonine phosphatase activity	0.006957
GO-MF	GO:0017017	MAP kinase tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	0.009957
GO-MF	GO:0033549	MAP kinase phosphatase activity	0.01194
GO-MF	GO:0000979	RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding	0.01391
GO-CC	GO:0072687	mitotic spindle	0.004990
GO-CC	GO:0036128	CatSper complex	0.009957
GO-CC	GO:0006591	Ca ^v 2-type-gated calcium channel complex	0.03056
GO-CC	GO:0005795	Golgi stack	0.03056



شکل 3A: تجزیه و تحلیل عملکردی و مسیرهای سیگنالینگ دخیل در مقاومت به سیس‌پلاتین. 3A-a: آنالیز داده‌های آنتولوژی. 3A-b: تحلیل عملکردهای مولکولی ژن‌های دخیل در ceRNA. 3A-c: تحلیل پروسه‌های زیستی ژن‌های دخیل در ceRNA. 3A-d: تحلیل اجزای مولکولی ژن‌های دخیل در ceRNA. B: آنالیز داده‌های KEGG مسیرهای سیگنالینگ دخیل در مقاومت به سیس‌پلاتین در رده سلولی

۳-۳ تجزیه و تحلیل عملکردی و مسیرهای سیگنالینگ

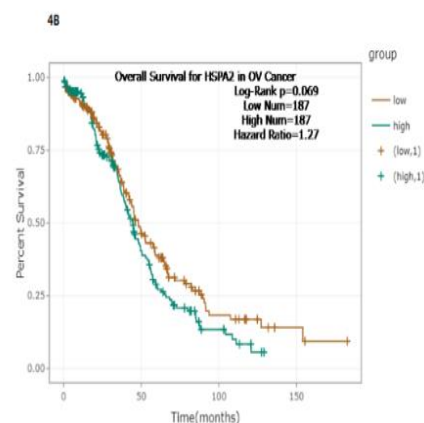
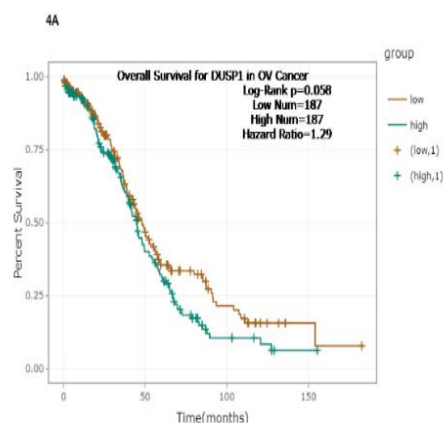
تجزیه و تحلیل داده‌های GO شامل اجزای سلولی (CC)، عملکرد بیولوژیکی (BF) و فرایندهای مولکولی (MP)، همچنین بررسی مسیرهای سیگنالینگ در KEGG برای ارزیابی عملکرد DEGs انجام شد. بر این اساس ۱۲ عدد CC، ۲۰ عدد BP، ۲۰ عدد MF و ۵۷ مسیر مرتبط با ژن‌های تغییر بیان یافته مشخص شد ($p < 0.05$). با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج هستی‌شناسی ژن، بیشتر فرایندهای بیولوژیکی که در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین نقش دارند، تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند سازماندهی کروماتین و خاموش کردن کروماتین می‌باشند. همچنین، مهمترین عملکردهای مولکولی در سلول سرطانی مقاوم به سیس‌پلاتین مربوط به آنزیم‌های سرین/ترئونین/تیروزین فسفاتاز است. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل داده‌های KEGG نشان داد که مسیر سیگنالینگ MAPK موثرترین مسیر در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین می‌باشد (شکل 3A و 3B).

۴-۴ تجزیه و تحلیل داده‌های TCGA

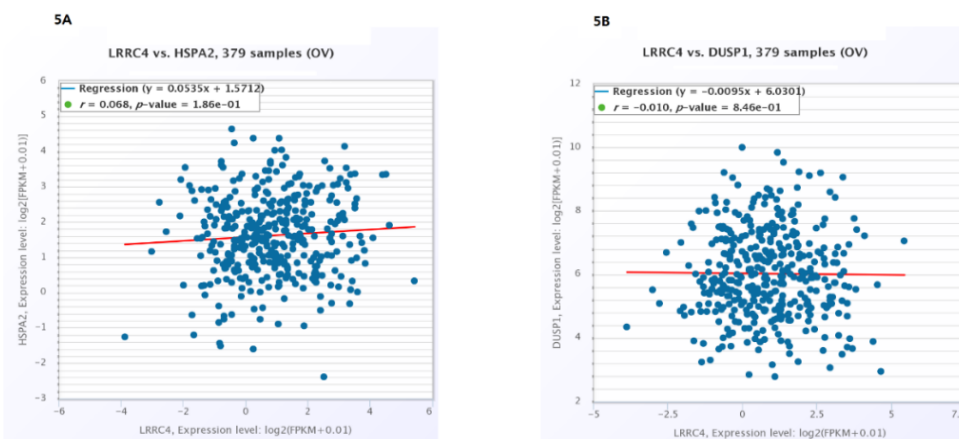
داده‌های TCGA برای بررسی ارتباط بین DEGs، DELs و DEMs و میزان بقا در نمونه‌های بالینی سرطان تخمدان استفاده شد. نتایج ارتباط منفی دو ژن DUSP1 و HSPA2 (که در سلول مقاوم نسبت به سلول حساس افزایش بیان داشتند) با مدت زمان بقا در بیماران را نشان داد ($p < 0.05$) (شکل 4A و 4B).

۵-۳ آنالیز و تحلیل شبکه هم‌بیانی

همبستگی میان سطح بیان lncRNA ها و mRNA های جفت شده با آنها در سرطان تخمدان بر اساس تجزیه و تحلیل ضریب همبستگی پیرسون در پایگاه داده TCGA اندازه‌گیری شد. بر این اساس همبستگی میان ژن تنظیم‌گر LRRC4 با DUSP1 و HSPA2 اندازه‌گیری شد. نتایج همبستگی خطی مستقیم میان سطح بیان LRRC4 با DUSP1 و HSPA2 نشان داد (ضریب همبستگی ≤ 0.3 و $p < 0.05$) (شکل 5A و 5B).



شکل ۴ منحنی Kaplan-Meier برای ژن‌های تغییر بیان یافته در شبکه ceRNA بر اساس پایگاه داده TCGA در سرطان تخمدان، برای شناسایی ویژگی‌های پیش‌آگهی دهنده lncRNA ها، miRNA ها و mRNA های پیش‌بینی شده در شبکه ceRNA. *مدت بقا با بیان ژن HSPA2 (4A) و ژن DUSP1 (4B) رابطه معکوس دارد.



شکل ۵ تجزیه و تحلیل همبستگی بین سطح بیان ژن‌های مختلف در رده سلولی A2780 مقاوم به سیس پلاتین سرطان تخمدان بر اساس پایگاه داده TCGA. همبستگی مستقیم بین سطح بیان LRRC4 با HSPA2 (5A) و DUSP1 (5B) دیده شد (ضریب همبستگی ≤ 0.3 و $P < 0.05$).

۴- بحث و نتیجه گیری

DNA، آپتوز، EMT، ROS و غیره در مطالعات مختلف نشان داده شده است. به عنوان مثال، اندازه گیری سطح بیان (PVT1) در بیماران مبتلا به سرطان کولون از نقش موثر این lncRNA در ایجاد مقاومت به سیس پلاتین حکایت دارد [۲۲]. همچنین، مطالعات اخیر نقش MALAT1 را در سرطان ریه مقاوم به سیس پلاتین نشان داده است. این lncRNA با تنظیم مثبت ژن‌های MRP1 و MDR1 از طریق فعال سازی STAT3، حساسیت به سیس پلاتین را در شرایط *in vitro* و *in vivo* کاهش می دهد [۲۲].

علاوه بر lncRNA، شواهد متعددی نقش microRNA ها را در ایجاد مقاومت دارویی در انواع سرطان نشان داده است. microRNA ها با اثر بر روی مولکول‌ها یا ژن‌های مرتبط با آپتوز، اتوفاژی، هیپوکسی، سلول‌های بنیادی سرطانی، NF-kB و Notch1 باعث مقاومت به سیس پلاتین می شوند [۲۴]. این RNA های غیر کدکننده به ۳-UTR ژن‌های هدف متصل شده و بیان mRNA را تنظیم می کنند [۲۵].

در شبکه ceRNA، lncRNA ها می توانند به عنوان اسپانجر microRNA عمل کنند و در عین حال در رقابت با

سیس پلاتین یکی از مهم ترین داروهای نسل اول شیمی درمانی در بسیاری از سرطان‌ها است. با وجود اثرات قابل توجه آن در درمان سرطان، مقاومت اکتسابی نسبت به این دارو میزان بقای بیمار را در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان اپی تلیال تخمدان کاهش می دهد. بنابراین، شناسایی بیومارکرهای جدید برای غلبه بر مقاومت دارویی به این داروی پر کاربرد و اساسی ضروری به نظر می رسد. امروزه نقش تنظیمی RNA های غیر کدکننده بر روی ژن‌های متعدد و بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ درگیر در ایجاد مقاومت دارویی بیش از پیش آشکار شده است. بررسی اثرات متقابل RNA های غیر کدکننده و RNA های کدکننده می تواند عامل مولکولی ایجاد مقاومت دارویی در سرطان‌ها را آشکار کند. شبکه رقابتی RNA درونزا (ceRNA) رابطه بین RNA غیر کدکننده و mRNA را نشان می دهد.

lncRNA ها به طور فراگیر در سراسر ژنوم بیان می شوند. نقش تنظیمی این ژن‌های غیر کدکننده در ایجاد مقاومت به داروهای شیمی درمانی در سرطان‌های مختلف از طریق تنظیم بیان ژن‌های دخیل در پمپ‌های ایفلاکس، ترمیم

به سیس پلاتین در مقایسه با رده سلولی حساس به سیس پلاتین به طور قابل توجهی کاهش بیان دارد. این ژن یک تومورسایپرسور با نواحی تکراری غنی از لوسین می باشد. کاهش بیان این ژن سبب بروز متاستاز در سرطان تخمدان می شود. مطالعات نشان داده است که بیان این تومورسایپرسور همبستگی معکوسی با بیان ژن *E.cadherin* در سرطان تخمدان دارد [۳۳]. همچنین، کاهش بیان این تومورسایپرسور در سرطان گلیوبلاستوما پیشرفته گزارش شده است. این ژن با مهار ژن های مسیر *PI3k/AKT* و *ERK/MAPK* چرخه سلولی را تنظیم و تکثیر سلولی را مهار می کند [۳۴].

در نهایت و با توجه به داده های موجود در پژوهش حاضر، دو محور احتمالی *ceRNA* دخیل در مقاومت دارویی به سیس پلاتین در سرطان تخمدان پیشنهاد شد. این دو محور *ZNRF3-AS1/miR-33a/LRRC4/DUSP1* و *ZNRF3-AS1/miR-33a/LRRC4/HSPA2* می باشند.

مطالعات پیشین نقش دو ژن *DUSP1* و *HSPA2* را در القای مقاومت به دارو های شیمی در مانی از طریق مسیرهای سیگنالینگ *ERK/MAPK* و *PI3K/AKT* نشان داده است [۳۵، ۳۶]. آنالیز داده های TCGA نشان داد که بیان ژن های *DUSP1* و *HSPA2* با میزان بقا در افراد مبتلا ارتباط مثبت دارد ($p < 0.05$). آنالیز پیرسون-رگرسیون در رده سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس پلاتین بیانگر همبستگی منفی میان *DUSP1* و *HSPA2* با تومورسایپرسور *LRRC4* می باشد. با در نظر گرفتن مجموع یافته های ذکر شده به نظر می رسد نظریه مطرح شده در پژوهش حاضر در ارتباط با نقش محورهای پیشنهادی در القای مقاومت به سیس پلاتین صحیح می باشد.

لازم به تاکید است که مکانیسم مقاومت به سیس پلاتین بسیار پیچیده است و هر یک از محورهای معرفی شده در این مطالعه می توانند به تنهایی یا با همراهی دیگر مسیرها در القای مقاومت به سیس پلاتین نقش داشته باشند.

miRNA برای اتصال به ناحیه MRE باعث تنظیم عملکرد *mRNA* های هدف شوند [۲۶]. به عنوان مثال، *SNHG5* با اسپانچ *miR-212-3p* باعث متاستاز سلول های استئوسارکوز و سرکوب مسیر سیگنالینگ *miR-212-3p/SGK3* می شود [۲۷]. بنابراین، به نظر می رسد شبکه ای با محوریت *mRNA* و *miRNA-lncRNA* می تواند اهداف مولکولی را برای غلبه بر مقاومت شیمی درمانی پیش بینی کند. در این مطالعه، بر اساس فرضیه *ceRNA*، تعامل *RNA* غیر کدکننده و *mRNA* در مقاومت اکتسابی به سیس پلاتین در سرطان تخمدان را بررسی شده است.

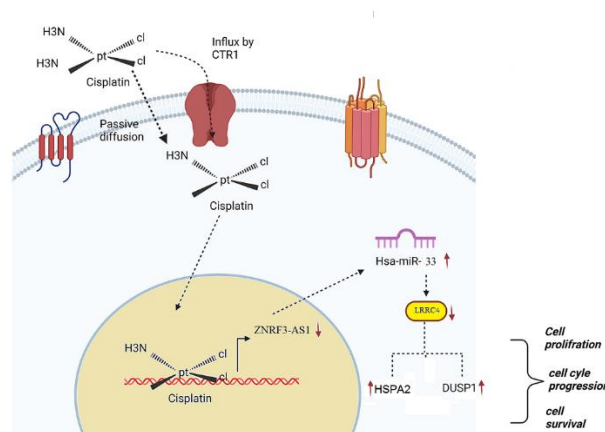
بر اساس توالی یابی *RNA* و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، یک شبکه *ceRNA* ساخته شد. در این شبکه *miRNA* ها پل ارتباطی میان *mRNA* و *lncRNA* ها در نظر گرفته شدند [۲۸]. در این پژوهش ۵۷ ژن از جمله ۲۶ عدد *miRNA*، ۶ عدد *lncRNA* و ۲۵ عدد *mRNA* در شبکه بزرگ *ceRNA* دخیل بودند. با استفاده از آنالیز مدت بقا و ضریب همبستگی در داده های TCGA، ارتباط معناداری ($p < 0.05$) میان دو ژن *DUSP1* و *HSPA2* با مدت زمان بقا در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان دیده شد.

با واکاوی داده های به دست آمده در پژوهش حاضر و داده های بیوانفورماتیک موجود، پیش بینی شد که *lncRNA ZNRF3-AS1* - که در شرایط مقاومت دچار کاهش بیان شده است، می تواند *hsa-miR-33* را اسپانچ کند. در ادامه با تجزیه و تحلیل داده های *CLIP seq* پیش بینی شد که *hsa-miR-33* از طریق اتصال به *3'UTR* در ژن *LRRC4* می تواند بیان آن را تغییر دهد. گزارش ها نشان داده است که *hsa-miR-33* در سرطان اوستئوکارسینوما [۲۹]، سرطان کولورکتال [۳۰] سرطان ریه [۳۱] و گلیوبلاستوما [۳۲] نقش دارد.

علاوه بر این، در پژوهش حاضر برای نشان دادن رابطه بین *ZNRF3-AS1* و ژن های هدف با تجزیه و تحلیل *DEGs*، مشاهده شد که ژن *LRRC4* در رده سلولی مقاوم

طبق دانسته‌ها، این اولین گزارش در مورد تجزیه و تحلیل شبکه ceRNA شامل miRNA، lncRNA و mRNA در رده سلولی سرطان تخمدان مقاوم به سیس پلاتین بر اساس داده‌های SRA می‌باشد. انجام آزمایشاتی که نشان دهنده مکانیزم‌های مولکولی دقیق و نقش عملکردی ژن‌های هدف باشند، همچنین تست‌هایی که موید ارتباط

microRNA های پیش‌بینی شده با ژن‌های هدف باشند از جمله تست لو سیفراز دوگانه یا روش‌های ر سوبی RNA (RNA Pull down Assay) از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. به نظر می‌رسد مطالعه در مورد شبکه ceRNA می‌تواند یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان‌های مقاوم به شیمی‌درمانی باشد.



شکل ۶ نقش ceRNA در القای مقاومت به سیس پلاتین در رده سلولی A2780 سرطان تخمدان. حضور سیس پلاتین در سلول، سطح بیان lncRNA ZNRF3-AS1 را کاهش می‌دهد. در نتیجه تعداد has-miR-33b آزاد در سلول سرطانی افزایش می‌یابد. این microRNA سطح بیان LRRC4 را به‌عنوان یک ژن تنظیم‌گر کاهش می‌دهد. بنابراین، سطح بیان HSPA2 و DUSP1 افزایش می‌یابد. این دو ژن با فعال مسیر PI3K/AKT و ERK/MAPK می‌توانند سبب القای مقاومت به سیس پلاتین در سرطان تخمدان شوند.

National Cancer Institute, 2003. 95(17): p. 1320-1329.

[7] Andrews, P. and S. Howell, *Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance*. Cancer cells (Cold Spring Harbor, NY: 1989), 1990. 2(2): p. 35-43.

[8] Miller, K.D., et al., *Cancer statistics for hispanics/latinos, 2018*. CA: a cancer journal for clinicians, 2018. 68(6): p. 425-445.

[9] Boloker, G., C. Wang, and J. Zhang, *Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States (2018)*. Journal of thoracic disease, 2018. 10(3): p. 1158.

[10] Rotow, J. and T.G. Bivona, *Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC*. Nature Reviews Cancer, 2017. 17(11): p. 637-658.

[11] Cree, I.A. and P. Charlton, *Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance*. BMC cancer, 2017. 17(1): p. 1-8.

[12] Valkov, E., et al., *Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated*

۵- منابع

[1] Soerjomataram, I., et al., *Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions*. The Lancet, 2012. 380(9856): p. 1840-1850.

[2] Berkenblit, A., et al., *A phase II trial of weekly docetaxel in patients with platinum-resistant epithelial ovarian, primary peritoneal serous cancer, or fallopian tube cancer*. Gynecologic oncology, 2004. 95(3): p. 624-631.

[3] Prat, J., *New insights into ovarian cancer pathology*. Annals of oncology, 2012. 23: p. x111-x117.

[4] Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA: a cancer journal for clinicians, 2008. 58(2): p. 71-96.

[5] Bast, R.C., B. Hennessy, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nature Reviews Cancer, 2009. 9(6): p. 415-428.

[6] Du Bois, A., et al., *A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer*. Journal of the

- [26] Kong, X., et al., *Analysis of lncRNA, miRNA and mRNA-associated ceRNA networks and identification of potential drug targets for drug-resistant non-small cell lung cancer*. Journal of Cancer, 2020. 11(11): p. 3357.
- [27] Ju, C., et al., *LncRNA SNHG5 promotes the progression of osteosarcoma by sponging the miR-212-3p/SGK3 axis*. Cancer cell international, 2018. 18(1): p. 1-13.
- [28] Guo, L., et al., *Construction and Analysis of a ceRNA Network Reveals Potential Prognostic Markers in Colorectal Cancer*. Frontiers in Genetics, 2020. 11: p. 418.
- [29] Chen, H.-Y., et al., *miR-103/107 prolong Wnt/ β -catenin signaling and colorectal cancer stemness by targeting Axin2*. Scientific reports, 2019. 9(1): p. 1-13.
- [30] Yu, Q., et al., *MiR-103/107 induces tumorigenicity in bladder cancer cell by suppressing PTEN*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. 22(24): p. 8616-8623.
- [31] Amaar, Y.G. and M.E. Reeves, *RASSF1C regulates miR-33a and EMT marker gene expression in lung cancer cells*. Oncotarget, 2019. 10(2): p. 123.
- [32] Chen, R., et al., *Histone methyltransferase SETD2: a potential tumor suppressor in solid cancers*. Journal of Cancer, 2020. 11(11): p. 3349.
- [33] Lee, S., J. Rauch, and W. Kolch, *Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity*. International journal of molecular sciences, 2020. 21(3): p. 1102.
- [34] Liu, R., et al., *PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers*. Cell death & disease, 2020. 11(9): p. 1-12.
- [35] Teng, F., et al., *DUSP1 induces apatinib resistance by activating the MAPK pathway in gastric cancer*. Oncology reports, 2018. 40(3): p. 1203-1222.
- [36] Tice, D.A., I. Soloviev, and P. Polakis, *Activation of the Wnt pathway interferes with serum response element-driven transcription of immediate early genes*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(8): p. 6118-6123.
- [37] Giulino-Roth, L., et al., *Inhibition of Hsp90 suppresses PI3K/AKT/mTOR signaling and has antitumor activity in Burkitt lymphoma*. Molecular cancer therapeutics, 2017. 16(9): p. 1779-1790.
- conformation. Nature structural & molecular biology, 2016. 23(6): p. 574-579.
- [13] Li, G., et al., *The Non-Coding RNAs Inducing Drug Resistance in Ovarian Cancer: A New Perspective for Understanding Drug Resistance*. Frontiers in Oncology, 2021. 11.
- [14] Tay, Y., J. Rinn, and P.P. Pandolfi, *The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition*. Nature, 2014. 505(7483): p. 344-352.
- [15] Lin, M., et al., *S100A7 regulates ovarian cancer cell metastasis and chemoresistance through MAPK signaling and is targeted by miR-330-5p*. DNA and cell biology, 2018. 37(5): p. 491-500.
- [16] Xu, K., et al., *How powerful are graph neural networks?* arXiv preprint arXiv:1810.00826, 2018.
- [17] Chen, B.-Q., et al., *Supercritical fluid-assisted fabrication of indocyanine green-encapsulated silk fibroin nanoparticles for dual-triggered cancer therapy*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018. 4(10): p. 3487-3497.
- [18] Li, J.-H., et al., *starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data*. Nucleic acids research, 2014. 42(D1): p. D92-D97.
- [19] Jeggari, A., D.S. Marks, and E. Larsson, *miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome*. Bioinformatics, 2012. 28(15): p. 2062-2063.
- [20] Betel, D., et al., *The microRNA.org resource: targets and expression*. Nucleic acids research, 2008. 36(suppl_1): p. D149-D153.
- [21] Shannon, P., et al., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome research, 2003. 13(11): p. 2498-2504.
- [22] Zhang, X.-w., et al., *Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. 462(3): p. 227-232.
- [23] Hu, G., *Personalized neural embeddings for collaborative filtering with text*. arXiv preprint arXiv:1903.07860, 2019.
- [24] Wang, S., et al., *The role of microRNA in cisplatin resistance or sensitivity*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020. 24(9): p. 885-897.
- [25] Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. cell, 2004. 116(2): p. 281-297.

Analysis of Non_coding RNA and mRNA-associated ovarian cancer and their potential involvement in cisplatin-resistance phenotype

Zeinab K. Pazoki¹, AmirReza gavanmard², Mostafa Hosseini^{3*}, Shiva Irani⁴ Bahram M. Soltani⁵

1. Ph.D student .Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Ph.D student. Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor. Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Associate Professor. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5. Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email

Receipt: 2022/07/17

Accepted: 2022/10/09

Abstract

Drug resistance has always posed a challenge to effectively treating cancer. Discovering the molecular mechanisms behind drug resistance can improve treatment strategies. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play a role in regulating cellular processes, including those related to cancer and drug resistance. Few studies have explored the role of competing endogenous RNAs (ceRNAs) in mediating drug resistance in ovarian cancer. This study utilized RNA sequencing data from cisplatin-resistant and sensitive ovarian cancer cell lines to identify ceRNAs involved in drug resistance. We Found 16 mRNAs, 10 lncRNAs, and 149 microRNAs were found to be overexpressed, while 622 mRNAs, 263 lncRNAs, and 177 microRNAs were downregulated in cisplatin-resistant cells compared to sensitive cells. These genes were related to 57 cellular pathways, and two potential ceRNA networks were identified - ZNRF3-AS1-miR-33-DUSP1 and ZNRF3-AS1-miR33-HSPA2. These findings suggest that targeting these regulatory genes could be a promising approach for treating cisplatin-resistant ovarian cancer.

Keywords: drug resistance, cisplatin, ovarian cancer, competitive endogenous RNA network