

hsa-miR-424 با هدف قرار دادن APC مسیر پیام‌رسانی Wnt را در سرطان کولورکتال فعال می‌کند

علی فصیحی^۱، حسین نعمتی^۱، فرنوش کبیری^۱، هدی هاشمی نسب^۱، بهرام محمد سلطانی^{۱*}
 ۱- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، شهر تهران، ایران
 soltanib@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۳۰

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۴

چکیده

فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt در سرطان کولورکتال به شدت افزایش پیدا می‌کند. به همین دلیل، پیدا کردن تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی جدید برای این مسیر یک استراتژی درمانی و تشخیصی سرطان کولورکتال محسوب می‌شود. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ما نشان داد که hsa-miR-424 (miR-424) می‌تواند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی احتمالی مسیر پیام‌رسانی Wnt با شدت بر همین اساس، ابتدا سطح بیان miR-424 در بافت‌های سرطان کولورکتال با جفت‌های طبیعی مقایسه و نتایج حاصل از RT-qPCR حاکی از افزایش بیان معنی‌دار miR-424 ($p < 0.01$) بود. سپس، آنالیزهای مولکولی با تکنیک‌های RT-qPCR و Top/Fop Flash نشان داد که بیش‌ترین بیان miR-424 منجر به افزایش فعالیت مسیر Wnt در رده سلولی SW480 می‌شود. علاوه بر این، از مولکول‌های کوچک IWP-2 و PNU-74654 برای مهار مسیر پیام‌رسانی Wnt استفاده و بیش‌ترین بیان miR-424 حاکی از این بود که miRNA می‌تواند تأثیر خود را در سطح تخریب کمپلکس β -کاتنین اعمال می‌کند که بدین منظور سنجش دوگانه‌ی لوسیفراز miR-424 با APC انجام و برهمکنش آنها تأیید شد. به‌طور کلی، نتایج ما miR-424 را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی مثبت مسیر پیام‌رسانی Wnt معرفی کرده و miRNA می‌تواند یک پیش‌آگهی احتمالی برای سرطان کولورکتال باشد.

کلید واژگان: مسیر پیام‌رسانی Wnt، سرطان کولورکتال، miR-424، سنجش دوگانه‌ی لوسیفراز

۱- مقدمه

سرطان کولورکتال یکی از بدخیمی‌های شایع بوده که تقریباً ۱۰ درصد از کل مرگ و میر ناشی از این بیماری را شامل می‌شود [۱، ۲]. تاکنون برای درمان آن از روش‌های متعددی مانند جراحی، شیمی در مانی رادیو تراپی، ایمونوتراپی، یا ترکیبی از روش‌ها را استفاده کرده‌اند [۳]. با وجود روش‌های درمانی متعدد، میزان مرگ و میر افراد مبتلا به سرطان کولورکتال بالا است [۲]. این مسئله لزوم مطالعه‌ی دقیق چگونگی ایجاد، پیشرفت و متاستاز آن را آشکار می‌کند، تا بدین طریق بتوان درمان‌های جدید و هدفمند مولکولی را پیشنهاد و طراحی کرد. همچنین، تشخیص‌های زود هنگام و پیش‌آگهی‌های مناسب برای مداخلات درمانی هدفمند در گرو کشف مکانیسم‌های مولکولی است.

با پیشرفت روش‌های توالی‌یابی نسل جدید، حجم وسیعی از داده‌های RNA-seq تولید شده که بیشتر آنها متعلق به رونوشت‌های غیر کدکننده (ncRNAs) می‌باشد [۴]. ncRNA ها بر اساس طول به دو دسته‌ی RNA های غیر کدکننده کوچک (miRNAs، piRNAs و غیره) و RNA های غیر کدکننده طویل (lncRNA) ها که طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند (طبقه بندی می‌شوند [۵]). در طی دو دهه‌ی اخیر، نقش ncRNA ها در ایجاد، پیشرفت و متاستاز سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولورکتال به اثبات رسیده است [۴]. miRNAs، ncRNA های با طول 19-23 نوکلئوتید بوده که در اکثر موارد برای ایفای نقش تنظیمی خود به 3'-UTR در mRNA های هدف متصل شده و بدین طریق منجر به تجزیه‌ی mRNA هدف یا توقف ترجمه می‌شوند [۶].

مطالعات متعددی برای درک اختلال مسیرهای پیام رسانی سلولی از جمله مسیر Wnt، در سرطان کولورکتال انجام شده است [۷] که این مسیر در فرآیندهای مختلف سرطان‌زایی مانند رشد، زنده‌مانی و تهاجم سلول‌های

سرطان کولورکتال نقش ایفا می‌کند [۷]. بنابراین، مشخص کردن کنترل کننده‌های مثبت و منفی این مسیر برای درمان و پیش‌آگهی این سرطان خیلی مهم است [۸]. یکی از تنظیم کننده‌های اصلی مسیر پیام رسانی مذکور، miRNA ها می‌باشند [۹]. miR-424 با هدف قرار دادن ژن‌های متعدد از جمله SCN4B [۱۰] و Smad-7 [۱۱] منجر به افزایش تکثیر سلول‌های سرطان می‌شود. همچنین، lncRNA FENDRR با اسپانچ miR-424 منجر به کاهش تکثیر سلول‌های مذکور می‌شود [۱۲]. علاوه بر این، سطح بیان آن در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های طبیعی افزایش بیان نشان می‌دهد [۱۰]. با این وجود، ارتباط miR-424 با مسیر پیام رسانی Wnt در سرطان کولورکتال هنوز مشخص نشده است. بنابراین، miR-424 بر اساس پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی به عنوان کاندید تنظیم کننده‌ی مسیر پیام‌رسانی Wnt در سرطان کولورکتال مشخص شد. در این مطالعه از RT-qPCR، سنجش لوسیفراز دوگانه، و سنجش Top/Flash برای تأیید اثر تنظیمی miRNA ی مذکور بر مسیر پیام‌رسانی Wnt استفاده شد که نتایج به‌دست آمده نشان دهنده‌ی کنترل مثبت مسیر مذکور توسط miR-424 است. بنابراین، miR-424 می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای پیش‌آگهی سرطان کولورکتال باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سایت‌های بیوانفورماتیکی

برای پیش‌بینی اهداف مولکولی hsa-miR-424 از ابزارهای آنالیز Diana، miRWalk، miRmap و miRmap و RNAhybrid با آدرس‌های زیر استفاده شد.

- * http://www.targetscaan.org/vert_72/
- * <http://zmf.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>
- * <http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php>
- * <http://mirmap.ezlab.org/app/>
- * <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>

۲-۲- ساخت سازه‌های نو ترکیب

یا شیمی درمانی نشده بوده‌اند، از بیمارستان شریعتی تهیه شد (جدول ۲). بافت‌ها توسط پاتولوژیست تشخیص داده و طبقه بندی شدند. همچنین، تمامی مطالعات مورد تایید کمیته‌های اخلاقی و علمی قرار گرفت.

۲-۴- کشت سلولی و ترانسفکشن

رده‌ی سلولی SW480 در محیطی H-DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۰٫۰۱ میلی مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در یک محفظه مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. همچنین، رده‌ی سلولی مذکور در محیطی بدون سرم جنین گاوی با استفاده از وکتورهای نو ترکیب مخلوط شده با لیپوفکتامین 2000 ترانسفکت شدند (طبق پروتکل شرکت سازنده). سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت برای تهیه RNA و پروتئین لیز شدند.

توالی 3'-UTR ژن‌های AXIN2، AXIN، APC و APC2 با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی هر یک از آنها تکثیر شد (جدول ۱). به ترتیب پرایمرهای رو به جلو و معکوس شامل جایگاه‌های تشخیص آنزیم‌های XhoI و NotI بودند. محصولات PCR به‌دست آمده از این ژن‌ها، مستقیماً در وکتور pSi-check2 کلون شدند. همچنین، پیش ساز miR-424 انسانی توسط پرایمرهای مخصوص تکثیر و در وکتور TA هم‌ساز سازی شد. سپس، پیش ساز مذکور در وکتور بیانی pEGFP-C1 ساب-هم‌ساز سازی شد. همچنین، برای کاهش بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW280، پیش ساز miR-424 به‌صورت معکوس در وکتور بیانی pEGFP-C1 هم‌ساز سازی شد. صحت توالی‌های هم‌ساز سازی شده با استفاده از توالی‌یابی تایید شد.

۲-۳- تهیه بافت‌های سرطان کولورکتال

بیت جفت بافت سرطان کولورکتال و بافت‌های مجاور غیر توموری آن‌ها که هیچ یک از بیماران قبلاً رادیوتراپی

جدول ۱ پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Primer name	Forward (5' to 3')	Reverse
<i>U48</i>	TGACCCCAGGTAACCTCTGAGTGTGT	
<i>hsa-miR-424-5p</i>	CCCAGCAGCAATTCATGTT	
Anchored Oligo-dT	GCGTCGACTAGTACAACCTCAAGGTTCTTCCA GTCACGACG(T)18V	
Universal-outer		GCGTCGACTAGTACAACCTCAAG
Universal-inner		AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG
<i>β-catenin</i>	AGAACAGAGCCAATGGCTTG	CCTGGCCATATCCACCAGAG
<i>C-myc- real time</i>	CTCCTACGTTGCGGTCACAC	CGGGTCGCAGATGAAACTCT
<i>GAPDH</i>	GCCACATCGCTCAGACAC	GGCAACAATATCCACTTTACCAG
<i>APC2-3'-UTR</i>	GGGCGAAGCCTGTAATCACTGC	GAGTCGGACAGCTGACGGTG
<i>Axin1-3'-UTR</i>	AAGGTGGACTGATAGGCTGGT	AGAAGACACACCACAGCCAGG
<i>APC-3'-UTR</i>	TGGAACCCAAAGTCCTAAGC	CTGGGAAAACAACAGAAGTAG
<i>APC- real time</i>	TATTACGGAATGTGTCCAGCTTG	CCACATGCATTACTGACTATTGTC
<i>APC2- real time</i>	TCCCAGCTCCCTGCCTCTGT	AGCCAGCCAGACCCAAAGTTCT
<i>Axin1- real time</i>	ATGCAGGAGAGCGTGCAGGTC	TGACGATGGATCGCCGTCCTC

جدول ۲ اطلاعات پاتولوژیکی نمونه‌های استفاده شده در این پژوهش

گرید	توموری/نرمال	سن	جنسیت
III/IV	جفت	۶۵	زن
III/IV	جفت	۶۹	زن
III/IV	جفت	۶۲	مرد
III/IV	جفت	۶۰	مرد
III/IV	جفت	۵۵	مرد
I/II	جفت	۳۵	مرد
III/IV	جفت	۴۵	مرد
III/IV	جفت	۷۸	زن
III/IV	جفت	۴۲	مرد
III/IV	جفت	۸۱	زن
III/IV	جفت	۵۰	مرد
III/IV	جفت	۲۰	زن
III/IV	جفت	۷۳	مرد
I/II	جفت	۶۷	مرد
III/IV	جفت	۷۱	زن
III/IV	جفت	۶۰	زن
III/IV	جفت	۳۶	مرد
III/IV	جفت	۷۰	زن
III/IV	جفت	۲۷	زن
III/IV	جفت	۵۸	زن

۲-۵- سنجش دوگانه لوسیفراز

سلول‌های SW480 در پلیت ۴۸ چاهکی کشت و یک شبانه روز بعد با ۲۰۰ نانوگرم از وکتور حاوی psi-CHECK-2 و ۴۰۰ نانوگرم با وکتور حاوی pre-miRNA ها ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سیگنال‌های لوسیفرازهای فایرفلای و رنیلای با استفاده از کیت سنجش گزار شگر دوگانه لوسیفراز اندازه‌گیری شد (Promega).

۲-۶- سنجش نور TOP/FOP

سلول‌های SW480 برای سنجش فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt در چاهک‌های ۴۸ تایی کشت داده شدند. سلول‌ها بعد از یک شبانه روز با استفاده از وکتورهای حاوی نوع

وحشی و جهش یافته گزار شگر LUC (Addgene, Inc., Cambridge MA) علاوه بر این، pre-miR-424 و anti-miR-424 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ترانسفکت شدند. سلول‌های ترانسفکت شده پس از ۴۸ ساعت جمع‌آوری شده و اندازه‌گیری فعالیت نسبی لوسیفراز طبق پروتکل (promega) انجام شد.

۲-۷- تهیه RNA و RT-qPCR

از معرف تریزول (Invitrogen) برای استخراج RNA تام از رده‌های سلولی و بافت‌ها استفاده شد. cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA ی تام در ۱۰ ماکرولیتر حجم نهایی با پرایمر هگزامر تصادفی، ۱۰ میلی‌مولار dNTP و ۲ میکرومولار oligo-dt/Anchor-oligo-dt سنتز شد. سپس،

(جدول ۳) که miR-424 دارای بیش از دو جایگاه تشخیص (MRE) بر روی ژن‌های هدف مسیر پیام‌رسانی Wnt (توالی 3'-UTR ژن‌های APC، APC2، AXIN2، GSK3B و TCF7) است. علاوه بر این، با استفاده از نرم‌افزار RNAhybrid برهمکنش miR-424 با اهداف مذکور بررسی و نتایج به‌دست آمده نشان داد که انرژی آزاد اتصال APC و miR-424 بطور معنی‌داری -24.4 kcal/mol است (شکل ۱). به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده از این بخش حاکی از کنترل مثبت احتمالی مسیر پیام‌رسانی Wnt توسط miR-424 است.

۲-۳- پروفایل بیانی miR-424 در بافت‌های سرطانی

کولورکتال، جفت بافت‌های سالم و رده‌های سلولی سطح بیان miR-424 در ۲۰ جفت بافت سرطان کولورکتال و بافت طبیعی با استفاده از RT-qPCR بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان miR-424 به‌طور قابل توجهی ($p < 0.01$) در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی افزایش یافته است (شکل 1A). همچنین، سطح بیان ژن‌های هدف فرضی miR-424 در نمونه‌های بافتی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که سطح بیان WNT3a در بافت‌های توموری نسبت به طبیعی افزایش معنی‌داری دارد، در حالی که ژن سرکوبگر تومور APC کاهش غیر قابل توجهی در سطح بیان داشت (شکل 2A).

برای تجزیه و تحلیل کمی بیان miRNA ی بالغ و ژن‌های مورد نظر از RT-qPCR با استفاده از پرایمرهای خاص طراحی شده بر اساس توالی‌های گزارش شده در پایگاه داده miRBase و NCBI استفاده شد. RT-qPCR با استفاده از EVA Green Master Mix با دستگاه ABI7500 (Applied Biosystems, Warrington, UK) انجام و تمامی داده‌ها با کنترل‌های داخلی GAPDH و U48 نرمال سازی شدند.

۲-۸- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21.0 انجام شد. همه آزمایش‌های مورد نظر به صورت سه تکرار مستقل بیولوژیکی انجام و برای ارزیابی معنی‌داری آماری از آزمون t برای دو گروه یا آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون LSD برای سه گروه یا بیشتر استفاده شد. نتایج به‌دست آمده $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

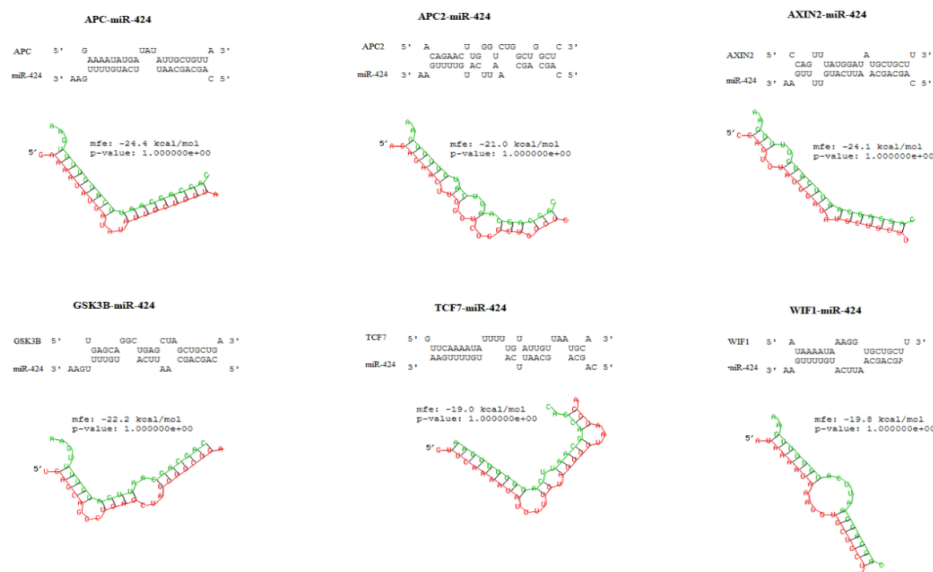
۳-۱- پیش‌بینی اهداف ژنی miR-424 با استفاده از

الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی

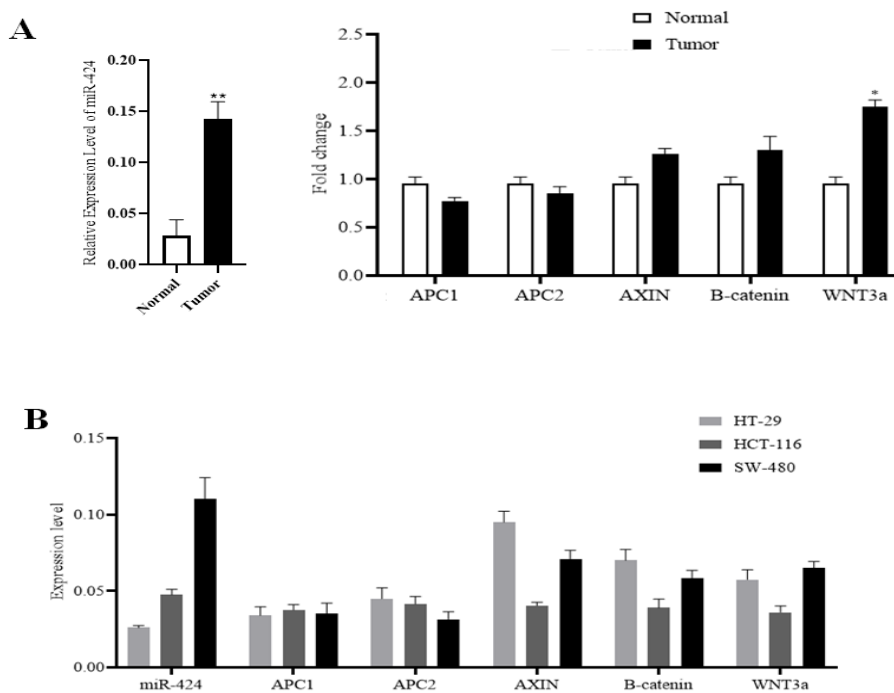
الگوریتم‌های متعدد بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی اهداف ژنی miR-424 در مسیر پیام‌رسانی Wnt به کار برده شد. نتایج به‌دست آمده از نرم‌افزار Targetcan نشان داد

جدول ۳ تعداد جایگاه‌های شناخت miR-424 (MREs) بر روی 3'-UTR ژن‌های هدف

miRNA	Target genes	Number of predicted MREs			Number of conserved MREs
		Diana microT	Mirmap	Mirwalk	Targetscan
hsa-miR-424	APC	7	3	7	2
	APC2	4	3	6	1
	AXIN2	2	2	8	2
	GSK3B	5	0	5	1
	TCF7	2	1	4	1
	WIF1	1	1	7	1



شکل ۱ برهمکنش miR-424 با اهداف پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار RNAhybrid. نتایج به‌دست آمده نشان داد miR-424 با APC به‌طور معنی‌داری برهمکنش کرده و انرژی آزاد این برهمکنش -24.4 kcal/mol است.



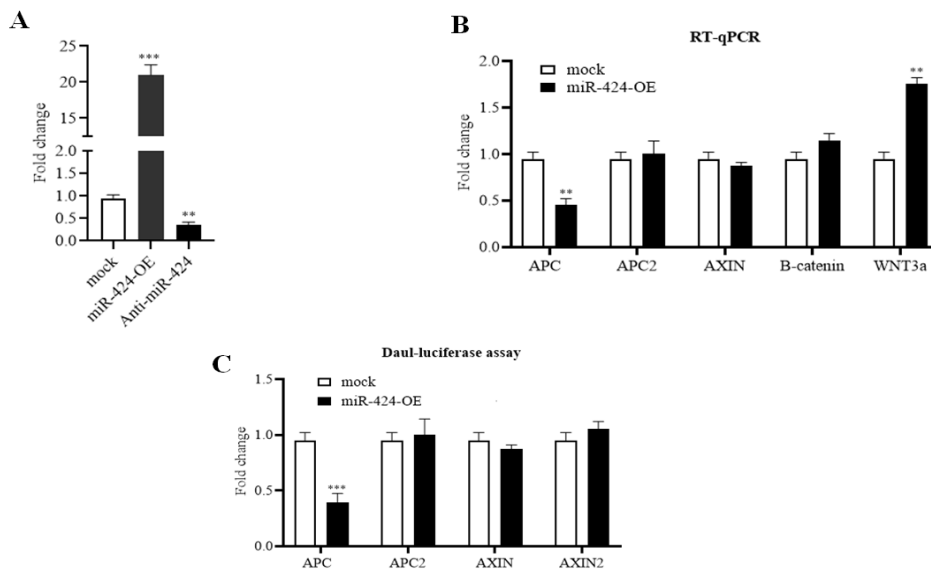
شکل ۲ سطح بیان نسبی miR-424 و اهداف پیش‌بینی شده آن در بافت‌های سرطان کولورکتال و رده‌های سلولی مشتق از آن: (A) نتایج RT-qPCR نشان داد که miR-424 در سرطان کولورکتال نسبت به بافت‌های نرمال تنظیم مثبتی دارد. همچنین، داده‌ها حاکی از کاهش غیر معنی‌دار رونوشت APC (هدف پیش‌بینی شده miR-424) در بافت‌های سرطان کولورکتال است. (B) پروفایل بیانی miR-424 و ژن‌های هدف آن در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال. نتایج به‌دست آمده حاکی از افزایش سطح بیان miR-424 در رده‌های با گریدهای بالا است.

همچنین، سطح بیان ژن‌های هدف احتمالی آنها نیز در رده‌های سلولی HTC116، HT29 و SW480 با استفاده از RT-qPCR بررسی شد. سطح بیان miR-424 در سلول‌های HT29 (به‌عنوان یک رده سلولی با درجه پایین) در مقایسه با سلول‌های SW480 و HCT116 (به‌عنوان رده‌های سلولی با درجه بالا) کاهش بود (شکل 2B). در کل، نتایج به‌دست آمده از این بخش حاکی از افزایش بیان miR-424 در بافت‌های سرطانی کولورکتال نسبت به بافت‌های طبیعی بوده و بیان آن در رده‌های سلولی مهاجمی مشتق از سرطان مذکور افزایش معنی‌داری دارد.

۳-۳- تاثیر بیش‌بیان miR-424 بر روی اهداف ژنی و برهمکنش مستقیم آن با APC

برای بررسی اثرات مولکولی miR-424 در رده‌های سلولی مشتق از کولورکتال، بیش/کاهش بیان آن در رده‌های سلولی

نتایج به‌دست آمده نشان داد که miR-424 در رده‌ی سلولی SW480 منجر به کاهش پیش‌بینی شده‌ی miR-424 در رده سلولی بیش‌بیان شده با موفقیت انجام شده است (شکل 3A). سپس، بیان اهداف تغییرات بیان miR-424 در رده سلولی بیش‌بیان شده با RT-qPCR کمی‌سازی شد. نتایج نشان داد که بیش‌بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW480 منجر به کاهش معنی‌دار APC ($p < 0.01$) می‌شود، در حالی که بیان Wnt3a افزایش بیان نشان داد ($p < 0.01$) (شکل 3B). برای بررسی برهمکنش مستقیم miR-424 با اهداف ژنی آن از سنجش دوگانه لوسیفراز استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که miR-424 با APC برهمکنش دارد (شکل 3C). به‌طور کلی، نتایج این بخش نشان داد که miR-424 با APC برهمکنش داشته و می‌تواند بدین ترتیب بر روی فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt تاثیر مثبت داشته باشد.



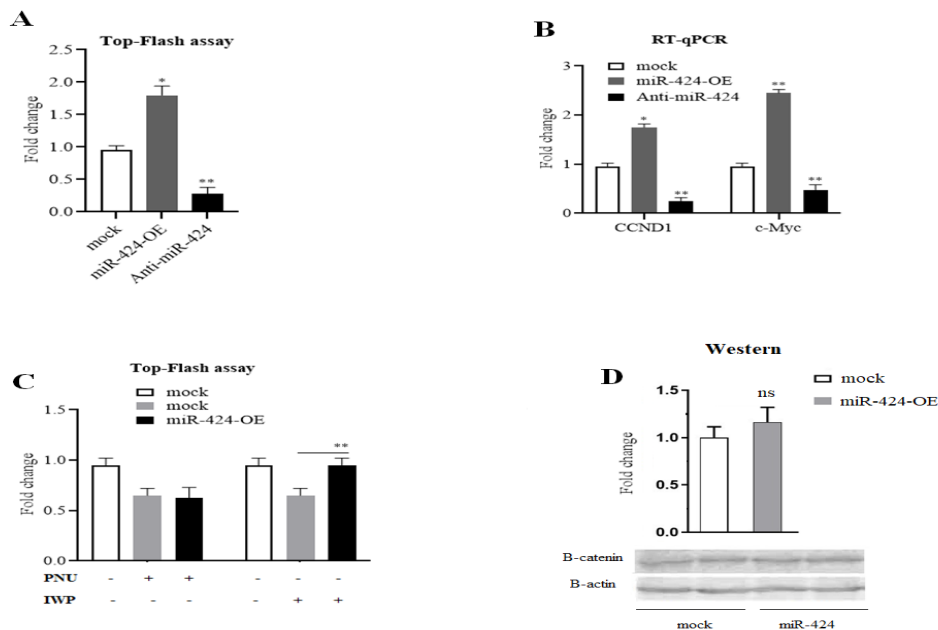
شکل ۳ تاثیر بیش‌بیان miR-424 بر روی اهداف پیش‌بینی شده و سنجش دوگانه‌ی لوسیفراز: (A) تغییرات بیان miR-424 در رده سلولی SW480. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیش/کاهش بیان miR-424 در رده سلولی مذکور با موفقیت انجام شده است. (B) بیش‌بیان miR-424 منجر به کاهش بیان معنی‌دار APC ($p < 0.01$) شده است، در حالی که اهداف دیگر، تغییرات بیانی معنی‌داری نشان ندادند. (C) سنجش دوگانه لوسیفراز miR-424 و ژن‌های هدف آن. نتایج به‌دست آمده حاکی از این است که miR-424 با توالی 3'-UTR ژن APC برهمکنش مستقیم دارد.

۳-۴- تاثیر تغییرات بیانی miR-424 بر روی فعالیت

مسیر پیام‌رسانی Wnt

سازه‌های بیش/کاهش بیان miR-424 در سلول‌های SW480 برای انجام سنجش Top/Fopflash و بررسی تأثیر miR-424 بر فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt، استفاده شدند. نتایج بیانگر تاثیر مثبت بیش بیان miR-424 بر مسیر پیام‌رسانی Wnt بود ($p < 0.05$) (شکل 4A)، در حالی که کاهش بیان آن منجر به کاهش فعالیت مسیر مذکور شد ($p < 0.01$) (شکل 3A). علاوه بر این، از مولکول‌های کوچک PNU-74654 و IWP-2 برای مهار مسیر Wnt استفاده شد و نتایج سنجش Top/Fopflash نشان داد که بیش بیان miR-424 منجر به جبران معنی‌دار ($p < 0.01$) اثرات مهاري IWP شد (شکل 4B). سپس، برای تکمیل

نتایج به دست آمده از سنجش Top/Fopflash، بیان ژن‌های پایین دست مسیر پیام‌رسانی Wnt با RT-qPCR کمی‌سازی شد. بیش بیان miR-424 منجر به افزایش بیان معنی‌دار ژن‌های CCND1 ($p < 0.05$) و c-Myc ($p < 0.01$) شد، در حالی که کاهش بیان miR-424 باعث کاهش معنی‌دار ژن‌های مذکور گردید ($p < 0.01$) (شکل 4C). علاوه بر این، میزان بیان پروتئین β -کاتین در سطح پروتئین و با تکنیک وسترن بلات بررسی و نتایج به دست آمده حاکی از افزایش جزئی پروتئین مذکور به دنبال بیش بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW480 بود (شکل 4D). به طور کلی، نتایج به دست آمده از این بخش نشان دهنده‌ی تاثیر مثبت miR-424 بر مسیر پیام‌رسانی Wnt است.



شکل ۴ تاثیر تغییرات بیش بیان miR-424 بر فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt. (A) نتایج سنجش نوری Top/Fop نشان داد که بیش بیان miR-424 با افزایش فعالیت مسیر Wnt و کاهش بیان آن منجر به تضعیف فعالیت مسیر مذکور می‌شود. (B) نتایج سنجش نور Top/Fop نشان داد که بیش بیان miR-424 نمی‌تواند اثرات مهاري مولکول کوچک PNU-74654 را برطرف کند. در حالی که، بیش بیان miR-424 می‌تواند اثر مهاري IWP-2 را برطرف کرده و منجر به القای قابل توجهی از فعالیت Wnt شده است ($p < 0.01$). (C) تغییرات بیان miR-424 و تاثیر آن بر ژن‌های پایین دست مسیر Wnt. بیش بیان miR-424 منجر به افزایش معنی‌دار CCND1 و c-Myc شده است، در حالی که کاهش بیان آن نتایج معکوس نشان داد. (D) مقدار پروتئین β -کاتین با بیش بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW480 افزایش جزئی از خود نشان داد.

۴- بحث

مسیر پیام‌رسانی Wnt نقش مهمی در بقاء، تکثیر و پیشرفت بدخیمی‌های متعدد از جمله سرطان کولورکتال دارد که در مراحل اولیه سرطان مذکور بیش از حد فعال می‌شود [۱۳]. در بیش از ۹۰ درصد موارد سرطان کولورکتال، ژن‌های سرکوبگر تومور مسیر Wnt دچار اختلال در بیان یا جهش شده که منجر به فعالیت بیش از حد مسیر Wnt می‌شود [۱۴]. miRNA ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن بعد از رونوسی شناخته شده و اختلال در بیان آنها می‌تواند منجر به سرطان کولورکتال شود [۱۵]. ما قبلاً در مورد فعالیت بیش از حد مسیر Wnt توسط MiR-ex1 و miR-135 را از طریق هدف‌گیری APC2 را گزارش کرده بودیم [۱۶، ۱۷]. علاوه بر این، hsa-miR-34، hsa-miR-200a و has-miR-320 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پایین این مسیر گزارش شده‌اند [۱۸-۲۱]. در این مطالعه، به بررسی نقش تنظیمی miR-424 در مسیر Wnt پرداخته شد که برای این منظور، توالی‌های 3'-UTR ژن‌های سرکوب‌کننده تومور APC، APC2، AXIN، AXIN2، GSK3B و TCF7 به‌عنوان اهداف احتمالی miR-424 در نظر گرفته و برهمکنش آنها با یکدیگر و با استفاده از نرم‌افزارهای متعدد بیوانفورماتیکی بررسی شد. معیارهای انتخاب ژن‌های هدف، تعداد MRE در هر ژن و سطح حفاظت شدگی MRE های پیش‌بینی شده بود [۲۲]. در نهایت، ژن‌های مذکوری که دارای امتیازات لازم بوده‌اند، برای تأییدات تجربی انتخاب شدند.

مطالعات نشان داده که miR-424 در متاستاز و تکثیر سلول‌های کولورکتال [۱۰]، و سرطان معده نقش ایفا می‌کند [۲۳]. علاوه بر این، miR-424 به پیشرفت سرطان دهانه رحم ناشی از HPV [۲۴]، رشد تومور به دنبال درمان با دوکسوروبیسین [۲۵] و به پیشرفت سرطان ریه از طریق تنظیم ژن سرکوبگر تومور *tnfaip1* منجر می‌شود [۲۶]. با این وجود، ارتباط miR-424 با مسیر پیام‌رسانی

Wnt در سرطان کولورکتال هنوز مشخص نشده است. بنابراین، پرو فایل بیانی miR-424 در حدود ۲۰ جفت بافت سرطانی کولورکتال و بافت طبیعی بررسی و از نتایج RT-qPCR نتیجه گرفته شد که سطح بیان miR-424 در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی افزایش قابل توجهی می‌یابد. در حالی‌که، سطح رونوشت ژن‌های هدف فرضی miR-424 بین بافت‌های توموری و طبیعی تغییرات معنی‌داری نشان نداد که احتمالاً به دلیل تأثیر miRNA ی مذکور در سطح ترجمه است. با این وجود، بین miR-424 و WNT3a، همبستگی مثبت بیان هم در نمونه‌های بافت سرطان کولورکتال و هم در رده‌های سلولی قابل استنباط بود که این می‌تواند بدلیل عملکرد انکوژنی ژن‌های مذکور در سرطان کولورکتال باشد.

با فعال شدن مسیر پیام‌رسانی Wnt، ژن‌های پایین دستی دچار تغییرات بیان می‌شوند که از آن جمله می‌توان به c-Myc و CCND1 اشاره کرد [۲۷]. ژن‌های مذکور در پیشبرد چرخه سلولی نقش داشته و در سرطان کولورکتال افزایش بیان نشان می‌دهند. با بیش‌بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW480، مشاهده شد که فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt بیشتر شده و بدنبال آن بیان c-Myc و CCND1 افزایش می‌یابد. در حالی‌که، کاهش بیان miR-424 منجر به کاهش فعالیت مسیر Wnt شد.

مولکول کوچک PNU-74654 برهمکنش β -کاتین و TCF را از بین برده و فعالیت کمپلکس مربوطه را کاهش می‌دهد [۲۸]. به‌طور مشابه، مولکول کوچک IWP-2 با متصل شدن به آنزیم Porcupine از اضافه شدن اسید چرب پالمیتوئیل به پروتئین Wnt ممانعت کرده و در نهایت مسیر پیام‌رسانی Wnt را قفل می‌کند [۲۸]. بیش‌بیان miR-424 در رده‌ی سلولی SW480 به مهار PNU-74654 غلبه نکرد، در حالی‌که بیش‌بیان آن بر مهار IWP-2 غلبه کرده و فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt را افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد که miR-424 اثر خود را از طریق

of colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2020. 11(5): p. 918.

[12] Cheng, C., et al., *FENDRR sponges miR-424-5p to inhibit cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer*. *Technology in cancer research & treatment*, 2020. 19: p. 1533033820980102.

[13] Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2013. 13(1): p. 11-26.

[14] Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/ β -catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. 149(6): p. 1192-1205.

[15] Mohammadi, A., B. Mansoori, and B. Baradaran, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016. 84: p. 705-713.

[16] Najafi, H., et al., *Alternative splicing of the OCC-1 gene generates three splice variants and a novel exonic microRNA, which regulate the Wnt signaling pathway*. *RNA*, 2017. 23(1): p. 70-85.

[17] Xu, X.M., et al., *Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer*. *Oncology letters*, 2012. 4(2): p. 339-345.

[18] Hsieh, I.-S., et al., *MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. *Carcinogenesis*, 2013. 34(3): p. 530-538.

[19] Kim, N.H., et al., *p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling*. *Science signaling*, 2011. 4(197): p. ra71-ra71.

[20] Kim, N.H., et al., *p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells*. *Cell cycle*, 2013. 12(10): p. 1578-1587.

[21] Su, J., et al., *MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin*. *International journal of oncology*, 2012. 40(4): p. 1162-1170.

[22] Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. *cell*, 2005. 120(1): p. 15-20.

[23] Wei, S., et al., *miR-424-5p promotes proliferation of gastric cancer by targeting Smad3 through TGF- β signaling pathway*. *Oncotarget*, 2016. 7(46): p. 75185.

[24] Xu, J., et al., *CUL2 overexpression driven by CUL2/E2F1/miR-424 regulatory loop promotes HPV16 E7 induced cervical carcinogenesis*. *Oncotarget*, 2016. 7(21): p. 31520.

[25] Zhang, D., et al., *Hypoxia-induced miR-424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis*. *Cell death & disease*, 2014. 5(6): p. e1301-e1301.

هدف قرار دادن برخی از اجزایی که در بالادست β -کاتنین و پایین دست گیرنده‌ها در مسیر Wnt قرار دارند، اعمال می‌کند. نتایج این سنجش با داده‌های RT-qPCR و dual-luciferase همخوانی دارد.

۵- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، در این مطالعه نشان داده شد که miR-424 به‌عنوان یک onco-miRNA عمل کرده و منجر به افزایش فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق هدف قرار دادن APC می‌شود. پس miRNA مذکور می‌تواند به‌عنوان یک پیش‌آگهی یا هدفی برای درمان سرطان کولورکتال باشد.

۶- منابع

[1] De Klerk, C., et al., *Socioeconomic and ethnic inequities within organised colorectal cancer screening programmes worldwide*. *Gut*, 2018. 67(4): p. 679-687.

[2] Arnold, M., et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. *Gut*, 2017. 66(4): p. 683-691.

[3] Meyerhardt, J.A. and R.J. Mayer, *Systemic therapy for colorectal cancer*. *New England journal of medicine*, 2005. 352(5): p. 476-487.

[4] Jiang, M.-C., et al., *Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities*. *American journal of cancer research*, 2019. 9(7): p. 1354.

[5] Hombach, S. and M. Kretz, *Non-coding RNAs: classification, biology and functioning*. *Non-coding RNAs in colorectal cancer*, 2016: p. 3-17.

[6] Cai, Y., et al., *A brief review on the mechanisms of miRNA regulation*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2009. 7(4): p. 147-154.

[7] Schatoff, E.M., B.I. Leach, and L.E. Dow, *Wnt signaling and colorectal cancer*. *Current colorectal cancer reports*, 2017. 13(2): p. 101-110.

[8] Jung, Y.-S. and J.-I. Park, *Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β -catenin and the destruction complex*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020. 52(2): p. 183-191.

[9] 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.

[10] Dai, W., et al., *miR-424-5p promotes the proliferation and metastasis of colorectal cancer by directly targeting SCN4B*. *Pathology-Research and Practice*, 2020. 216(1): p. 152731.

[11] Li, N., *CircTBL1XR1/miR-424 axis regulates Smad7 to promote the proliferation and metastasis*

tumours (CNS PNET). British journal of cancer, 2009. 100(8): p. 1292-1302.

[28] Voronkov, A. and S. Krauss, *Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors*. Current pharmaceutical design, 2013. 19(4): p. 634-664.

[26] Zhang, M., et al., *MiR-424 promotes non-small cell lung cancer progression and metastasis through regulating the tumor suppressor gene TNFAIP1*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. 42(1): p. 211-221.

[27] Rogers, H., et al., *An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal*

Hsa-miR-424 by targeting *APC* increases Wnt signaling activates in colorectal cancer

Ali Fasihi¹, Hossein Nemati¹, Farnoush Kabiri¹, Hoda Hasheminasab¹, Bahram M. Soltani^{1*}

1. Molecular Genetics Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

soltanib@modares.ac.ir

Receipt: 2022/04/26

Accepted: 2022/11/15

Abstract

The activity of Wnt signaling pathway is increased in colorectal cancer. For this reason, finding new positive and negative regulators for this pathway is a treatment and diagnostic strategy of colorectal cancer. Our bioinformatics analysis indicated that hsa-miR-424 (miR-424) could be a possible regulator of the Wnt signaling pathway. Accordingly, the expression level of miR-424 in colorectal cancer tissues was elevated compared with normal pairs and the results of RT-qPCR showed a significant increase in miR-424 expression ($p < 0.01$). Then, molecular analyzes using Top/Fop Flash and RT-qPCR techniques indicated that miR-424 overexpression leads to increased Wnt pathway activity in the SW480 cell line. In addition, the small molecules IWP-2 and PNU-74654 were used to inhibit the Wnt signaling pathway, and the miR-424 overexpression suggested that exert its effect on the level of β -catenin complex degradation. Then, dual-luciferase assay validated the interaction between miR-424 and *APC*. Overall, our results suggest miR-424 is a positive regulator of the Wnt signaling pathway, and it could be a possible prognosis for colorectal cancer.

Keywords: Wnt signaling pathway, colorectal cancer, miR-424, Dual-luciferase assay