piRNAهای دارای افتراق بیان در سلول‌های سرطان سینه

مریم عابدی[1]، مجید صادقی‌زاده[2*]

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲-استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران
sadeghma@modares.ac.ir
دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

چکیده

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان زنان می‌باشد که علی‌رغم پیشرفت‌های علمی زیاد همچنان علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان محسوب می‌شود. برای حل این معضل جهانی به مطالعات مولکولی عمیق‌تری در حوزه سرطان سینه نیاز است. امروزه، نقش piRNAها به‌عنوان تنظیم کننده بیان ژن‌ها در سرطآنهای مختلف مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. در این مطالعه هدف ما شناسایی piRNAهای مهم درگیر در سرطان سینه و ژن‌های هدف آنها می‌باشد. برای این منظور، داده‌های RNA small seq خام مربوط به نمونه‌های بافت سرطان سینه و بافت نرمال سینه از پایگاه داده GEO انتخاب و استخراج شد و از پلتفرم Galaxy برای آنالیز بیوانفورماتیکی آنها استفاده شد. بیان افتراقی ۳۷۲ عدد piRNA بر اساس $Log2\ FC \geq 2$، $p \leq 0.05$ به‌دست آمد که ۱۹۱ عدد افزایش بیان و ۱۸۱ عدد کاهش بیان معنی‌دار را نشان دادند. بیشترین افزایش مربوط به hsa-piR-33125 می‌باشد که هدف آن GATAD2A است و در پروسه‌های سرطان‌زایی از قبیل توسعه عروق خونی، آپوپتوز، تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی و ... نقش دارد. بیشترین کاهش مربوط به hsa-piR-33073 با Log2 FC= -4.20 می‌باشد. پیدا کردن لیستی از piRNAهای مهم که افتراق بیان معنی‌دار در سرطان سینه نسبت به بافت نرمال دارند و همچنین مشخص کردن افزایش و یا کاهش بیان آنها در بافت سرطانی و تشخیص ژن‌های هدف و بررسی نقش آنها در مسیرهای بیولوژیکی دخیل در توسعه و پیشرفت سرطان، می‌تواند آغازگر مطالعاتی باشد که در نهایت منجر به پیشرفت در پژوهش‌های سرطان سینه و روش‌های درمانی شود.

کلید واژگان: سرطان سینه، piRNA، بیان افتراقی، small RNA seq، مطالعات مولکولی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

۱-مقدمه

سرطان سینه یک مشکل عمده بهداشت عمومی است که زنان را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد. این سرطان، شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان، در سطح جهان محسوب می‌شود [۱]. سرطان سینه در سراسر جهان با نرخ‌های متفاوتی رخ می‌دهد و کشورهای غربی نسبت به کشورهای شرقی نرخ بروز بیشتری دارند. با این‌حال، شیوع سرطان سینه در کشورهای با درآمد کم و متوسط به دلیل تغییر سبک زندگی، افزایش طول عمر و اتخاذ شیوه های غذایی غربی به سرعت رو به افزایش است [۱].

مطالعه‌ی RNA های برهمکنش کننده با PIWI (piRNAs) در سرطان سینه به‌دلیل نقش بالقوه آنها به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی و همچنین پتانسیل آنها به‌عنوان اهداف درمانی برای درمان سرطان بسیار مهم است.piRNA ها دسته‌ای از RNA های کوچک غیر کدکننده هستند که در فرایندهای بیولوژیکی مختلف از جمله تنظیم ژن، خاموش کردن اپی‌ژنتیکی و خاموش کردن ترانسپوزون‌ها نقش دارند [۲]. در زمینه سرطان نشان داده شده است که piRNA هانقش مهمی در توسعه و پیشرفت بیماری دارند [۳]. مطالعات piRNAها در زمینه‌ی سرطان سینه نشان داده است که این مولکول‌ها با جنبه‌های مختلف سرطان سینه از جمله تکثیر سلول‌های تومور، آپوپتوز، تهاجم و متاستاز مرتبط هستند. از نظر تکثیر سلولی تومور، piRNA ها در تنظیم پیشرفت چرخه سلولی و تقسیم سلولی نقش دارند. به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که piR-651 تکثیر سلولی و مهاجرت را در سلول‌های سرطان سینه تقویت می‌کند [٤]. از سوی دیگر، piR-17458 تکثیر سلولی را در سلول‌های سرطان سینه مهار می‌کند و عامل القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد [٥].

پتانسیلpiRNA ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص و پیش‌آگهی سرطان سینه قابل توجه است. به‌عنوان مثال، اخیراً در یک مطالعه گزارش شده است که piR-651 در سرم‌های انسانی و بافت‌های سرطانی جامد، مانند سرطان سینه، معده و ریه بیش از حد بیان می‌شود و می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی به‌کار رود [٦]. علاوه بر این، piRNAها دارای پتانسیل درمانی در سرطان سینه نیز می‌باشند. به‌عنوان مثال، piRNA-36712 به‌عنوان یک سرکوب کننده تومور در سرطان سینه شناسایی شده است که سطوح پایین آن با نتایج ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان سینه مرتبط است. این piRNA با یک شبه ژن SEPW1 تعامل می‌کند و منجر به سرکوب بیان SEPW1 می‌شود که به نوبه خود بر بیان ژن‌های دخیل در تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، piRNA-36,712 می‌تواند اثرات برخی از عوامل شیمی‌درمانی را در درمان سرطان سینه افزایش دهد [۷]. بنابراین، با توجه به این واقعیت که piRNAها در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی مختلف مرتبط با سرطان، از جمله تنظیم بیان ژن، سیگنال‌دهی سلول به سلول، مرگ و بقای سلول، تکثیر، مهاجرت، تهاجم، متاستاز و چرخه سلولی نقش دارند، اهمیت مطالعه آنها در زمینه سرطان روز به روز افزایش می‌یابد.

در این مطالعه، به مقایسه بیانpiRNA های بافت سرطان سینه و بافت نرمال سینه پرداختیم تا به لیستی از piRNA های مهم دخیل در سرطان سینه که در بافت سرطانی نسبت به بافت نرمال تفاوت بیان معنی‌داری را نشان می دهند دست یابیم. به‌طور خلاصه، مطالعه piRNAها در سرطان سینه به‌دلیل پتانسیل آنها به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی و همچنین، به‌عنوان اهدافی بالقوه برای درمان بسیار مهم است. با این حال، مطالعات بیشتری برای درک کامل نقش piRNAها

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

در سرطان سینه و کشف پتانسیل آنها به‌عنوان ابزارهای تشخیصی و درمانی مورد نیاز است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ جستجو در مطالعات بیان ژن و انتخاب مجموعه داده

در این مطالعه، برای شناسایی piRNAهای دارای بیان افتراقی در سرطان سینه از داده‌های high-throughput استفاده شد. برای این هدف، بر اساس معیارهای خود، جستجو در بین مطالعات بیان ژن در پایگاه داده NCBI-GEO انجام شد. معیارهای انتخاب مطالعه دو موارد بود. معیار اول، مطالعه باید شامل نمونه از انسان مبتلا به سرطان سینه و انسان سالم باشد و معیار دوم، نوع مجموعه داده، پروفایل بیان piRNA، با توالی‌یابی high-throughput باشد.

با جستجو در پایگاه داده GEO، مطالعه‌ای که دارای داده‌های high-throughput در مورد piRNA در سرطان سینه باشد یافت نشد. بنابراین، تصمیم گرفته شد از مطالعاتی که حاوی داده‌های small RNA seq باشند استفاده شود. داده‌های توالی‌یابی small RNA شامل تمام انواع small RNA از جمله piRNA نیز می‌شود. بر اساس این معیارهای مذکور، نهایتاً مطالعات اندکی یافت شد که بیان RNA کوچک را در افراد سالم و بیماران سرطان سینه ارزیابی کند. برای انتخاب نهایی از بین آنها، کیفیت داده‌ها ارزیابی شد تا مطالعه‌ای با بالاترین کیفیت داده‌ها برای ادامه مطالعه انتخاب شود. برای ارزیابی کیفیت داده‌ها و انتخاب مطالعه‌ای با بالاترین کیفیت از نرم‌افزار FastQC استفاده شد.

۲-۲ معیارهای FastQC برای کنترل کیفیت داده‌ها

۱- Per-base sequence quality: این شاخص میانگین کیفیت هر پایه را در دنباله اندازه‌گیری می‌کند. نمره کیفیت بالاتر نشان می‌دهد که پایه به احتمال زیاد دقیق است.

۲- Per-base N content: این شاخص درصد بازهای ناشناخته (N) را در توالی اندازه‌گیری می‌کند. درصد بالاتری از N می‌تواند نشان دهنده کیفیت توالی ضعیف باشد.

۳- Sequence duplication levels: این شاخص تعداد توالی‌های یکسان در مجموعه داده را اندازه‌گیری می‌کند. سطح بالای تکرار می‌تواند نشان دهد که داده‌ها کاملاً تصادفی نیستند.

٤- Adapter content: این شاخص درصد توالی‌هایی را اندازه‌گیری می‌کند که شامل دنباله‌های آداپتور هستند (مانند آداپتورهای Illumina). درصد بالایی دنباله‌های آداپتور می‌تواند نشان دهد که داده‌ها به درستی از آداپتور پاک نشده‌اند.

۵- Overrepresented sequences: این شاخص توالی هایی را شناسایی می‌کند که به تعداد زیاد وجود دارند، که می‌تواند نشان دهنده آلودگی یا کیفیت پایین توالی باشد.

٦- Sequence length distribution: این شاخص توزیع طول توالی در مجموعه داده را اندازه‌گیری می‌کند. توزیع اریب، می‌تواند نشان دهد که برخی از توالی‌ها کوتاه یا ناقص هستند.

۷- GC content: این شاخص درصد بازهای GC را در توالی اندازه‌گیری می‌کند. محتوای GC بالا می تواند نشان دهنده کیفیت توالی ضعیف باشد.

۲-۳ آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها

برای آنالیز داده‌ها، از پایگاه داده آنلاین Galaxyuse استفاده شد که یک پلتفرم باز و مبتنی بر وب برای تحقیقات زیست پزشکی با داده‌های دارای حجم بالا می‌باشد. به همین منظور، مجموعه داده‌های مطالعات انتخاب شده به Galaxyuse وارد شدند و کنترل کیفیت اولیه داده‌ها توسط نرم‌افزار FastQC انجام شد. مطالعات دارای داده‌های RNA-Seq با کیفیت ضعیف از مطالعه‌ی ما

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

حذف شدند. در نهایت، مجموعه داده های مطالعه‌ی GSE117452 که دارای با کیفیت‌ترین داده های Small RNA seq از نمونه‌های بافت سرطان سینه و بافت نرمال سینه بود، برای ادامه‌ی مطالعه و آنالیز انتخاب شد.

در ابتدا، داده‌ها در گلکسی وارد شدند و سازماندهی و گروه‌بندی داده‌ها انجام شد. در ادامه برای آنالیز بیوانفورماتیکی مراحل زیر بر روی داده های خام انجام شد: 1- کیفیت خوانش‌های RNA-Seq با استفاده از نرم افزار FastQC بررسی شد. 2- نرم‌افزار trimgalore برای برش آداپتور و حذف سوگیری‌های ناخواسته از داده‌های RNA-Seq استفاده شد. 3- بار دیگر کنترل کیفیت بر روی خروجی‌های trimgalore با استفاده از نرم‌افزار FastQC انجام شد. 4- از نرم‌افزار HISAT2 برای تراز کردن خوانش های RNASeq (فایل fastq) بر روی ژنوم مرجع انسانی (نسخه hg38) استفاده شد (فرمت فایل خروجی BAM می‌باشد). ٥- فایل annotation (فرمت GTF) برای piRNA ها از پایگاه داده piRNA (piRNAdb) دریافت شد و به Galaxyuse وارد شد. ٦- برای شمارش خوانش های تراز شده از نرم‌افزار htseq-count استفاده شد. ۷- در نهایت شمارش‌ها توسط نرم‌افزار DESeq2 نرمال‌سازی و تجزیه‌وتحلیل انجام شد.

۲-٤ تجزیه‌وتحلیل نتایج

در این بخش سطوح بیانی piRNA ها بین بافت سرطانی و بافت طبیعی مقایسه و مشخص شد. استانداردهای ما برای ارزیابی تغییرات بیان piRNA ها $\text{Log2 FC} \geq 2$ و $p \leq 0.05$ بود. در نهایت با آنالیز بیوانفورماتیکی، لیستی از piRNAها با تغییرات بیانی کاهشی یا افزایشی در بافت سرطان سینه نسبت به بافت طبیعی سینه به‌دست آمد و همچنین با استفاده از piRNAdb، هدف های آنها در صورت مشخص بودن استخراج شد.

۳- نتایج

۳-۱ انتخاب مطالعه

با جستجو در GEO بر اساس معیارهای ما به چند مطالعه دست یافتیم که تعدادی از آنها به‌دلیل کمبود تعداد نمونه‌ها و برخی دیگر به‌دلیل ضعیف بودن نتایج بررسی کیفیت خوانش آنها کنار گذاشته شدند. با جستجوی بیشتر در نهایت به مطالعه‌ی GSE117452 دست یافتیم که با معیارهای اولیه ما مطابقت داشت و از لحاظ تعداد نمونه‌های نرمال و سرطانی و نیز کیفیت خوانش‌ها مورد قبول بود. داده‌های این مطالعه در سال ۲۰۱۹ در مقاله‌ای با عنوان تفاوت بیان microRNA در سرطان سینه بین زنان آفریقایی و اروپایی منتشر شده است که به بررسی پروفایل بیانی microRNA در بافت سرطان سینه نسبت به بافت نرمال می‌پردازد. این مطالعه شامل ٦٨ نمونه است که ۵۸ نمونه از بافت سرطان سینه و ۱۰ نمونه از بافت نرمال سینه می‌باشد.

۳-۲ پردازش داده‌ها

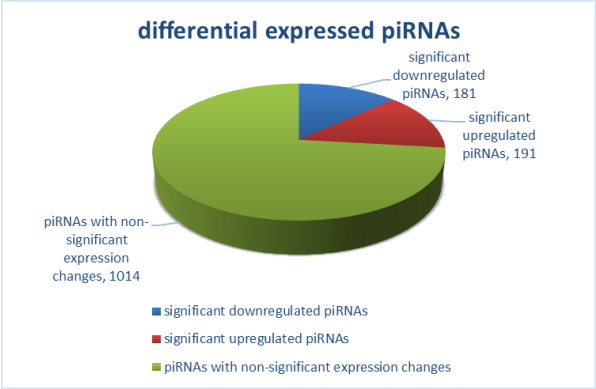
داده‌های خام این مطالعه شامل توالی‌یابی RNA های کوچک است که برای ادامه‌ی مطالعه از پایگاه داده GEO استخراج شد. ابتدا داده‌ها با فرمت fastq در پلتفرم Galaxy وارد و سازماندهی شدند. سپس، کیفیت آنها با استفاده از FastQC بررسی شد. تمام پارامترهای FastQC از لحاظ بررسی کیفیت داده‌ها مناسب بود؛ اما داده‌ها دارای آداپتور Illumina Universal بودند که در مرحله‌ی بعد با استفاده از نرم‌افزار trimgalore بریده شد و حذف شد. این نرم‌افزار خوانش‌هایی را که پس از برش آداپتور کیفیت خود را از دست بدهند یا طول آنها بیش از اندازه کوتاه شود را حذف می‌کند. پس از برش، بار دیگر کیفیت داده‌ها با FastQC بررسی شد. به‌طور متوسط توزیع داده‌ها از لحاظ طول توالی بین ۵۰-20 نوکلئوتید بود. سپس، این داده‌ها بر روی ژنوم hg38 انسان با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 تراز شد. خروجی به فرمت BAM می‌باشد. فایل GTF برای piRNA از پایگاه داده piRNAdb گرفته شد و در مرحله بعد با استفاده از این فایل خوانش‌های

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

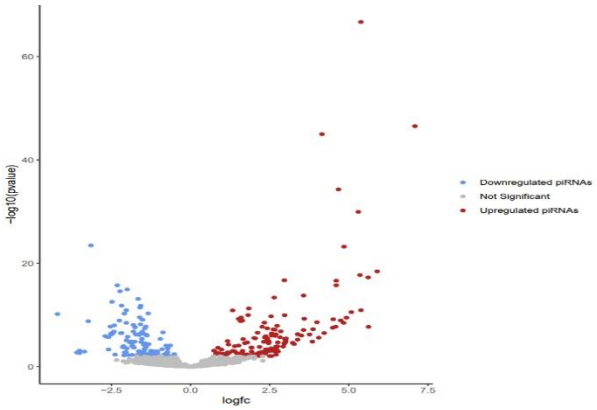
تراز شده که به صورت فایل BAM بود با ا ستفاده از نرم افزار htseq-count شمارش شد.

۳-۳ آنالیز بیان piRNAها و یافتن piRNAهای دارای بیان افتراقی در سرطان سینه

در مرحله آخر، برای پیدا کردن piRNAهای دارای بیان افتراقی در سرطان سینه نسبت به کنترل نرمال از نرم‌افزار DEseq2 استفاده شد. DEseq2 به ما نتایجی ارائه داد که ۱۳۸٦ عدد piRNA با بیان افتراقی معرفی کرد. در مرحله بعد، piRNA ها بر اساس معیار آماری ($p< 0.05$) فیلتر شد و ۳۷۲ عدد piRNA با بیان افتراقی معنی‌دار به‌دست آمد. بر اساس Log2 FC، ۱۹۱ عدد piRNA دارای افزایش بیان معنی‌دار و ۱۸۱ عدد piRNA دارای کاهش بیان معنی‌دار در سرطان سینه نسبت به کنترل نرمال بود (شکل ۱). نمودار آتشفشانی تفکیک piRNAهای دارای افتراق بیان (افزایش یا کاهش یافته) را به خوبی نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۱ بیان افتراقی piRNA ها در بافت سرطان سینه در مقایسه با بافت نرمال. piRNA هایی که دارای Log2 FC مثبت هستند، بیان افزایشی را نشان می‌دهند و piRNAها با Log2 FC منفی بیان کاهش را نشان می‌دهند. همه آنها دارای $p \leq 0.05$ هستند.



شکل ۲ تفکیک piRNAهای دارای افزایش و کاهش بیان بر اساس p.value و Log2 FC، حد آستانه برای p.value و Log2 FC به‌ترتیب ۰٫۰۵ و ۰ در نظر گرفته شده است.

از بین ۱۹۱ عدد piRNA دارای افزایش بیان در سرطان سینه، بر اساس معیار Log FC≥2، ۹۷ عدد piRNA به دست آمد که بیان آنها در سرطان سینه تقریبا ۱٤-٤ برابر بیشتر بود. بالاترین میزان افزایش بیان مربوط به hsa-piR-33125 بود، با Log2 FC= 7.09، که نشان دهنده افزایش تقریبا ۱٤ برابری این piRNA در سلول‌های سرطان سینه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

نسبت به سلول‌های سالم سینه است. بر اساس پایگاه داده piRNAdb، این مولکول GATAD2A را در سه جایگاه مورد هدف قرار می‌دهد.

بر اساس انتولوژی ژن ممکن است بر پروسه های بیولوژیکی توسعه عروق خونی، رشد جنین در رحم، تشکیل چین‌های عصبی، تنظیم در سطح رونویسی، برقراری اتصال اکسون، تکوین اندام بدن جنینی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و... تأثیرگذار باشد.

لیستی از این piRNA ها که در دیتا بیس piRNAdb برای آنها هدف معرفی شده است در جدول ۱ آورده شده است

بر اساس نتایج آنالیز، تعداد ۱۸۱ piRNA دارای کاهش بیان معنی‌دار ($p < 0.05$) در بافت سرطان سینه بودند. بیشترین کاهش بیان مربوط به hsa-piR-33073 با Log2 FC= -4.20 می‌باشد که بیان آن تقریباً ۸ برابر در بافت سرطان سینه نسبت به بافت نرمال کاهش یافته است و در piRNAdb هدفی برای آن مشخص نشده است. لیستی از piRNAهای دارای Log2 FC ≤-2 که بیان آنها به‌صورت معنی‌دار در سرطان سینه کاهش یافته و هدف‌های آنها در piRNAdb معرفی شده است در جدول ۲ آورده شده است.

PiRNA	Log2 FC	هدف	piRNA	Log2 FC	هدف
hsa-piR-33125	٧,٠٩	GATAD2A	hsa-piR-32933	٢,٦٩	MAST2,SLC39A12
hsa-piR-32997	٥,٣٠	miR183	hsa-piR-9198	٢,٦٦	TTN
hsa-piR-33199	٤,٩٢	FAM104A	hsa-piR-33042	٢,٦٦	ZHX1
hsa-piR-33198	٤,٨٥	DHX33	hsa-piR-32836	٢,٦٤	ZNF3
hsa-piR-33093	٤,٦٠	TRPC2	hsa-piR-32872	٢,٤٧	miR452,COL5A2
hsa-piR-33134	٤,٦٠	IKZF3,PACRGL	hsa-piR-30274	٢,٤٦	GPR155,ZNF683
hsa-piR-33154	٤,٥٠	APOB	hsa-piR-1727	٢,٣٧	C2orf15,HIST2H2BF
hsa-piR-11119	٤,١٥	SPACA6P-AS	hsa-piR-20895	٢,٣٧	HIST1H2BJ
hsa-piR-32368	٣,٨٦	FLJ30901	hsa-piR-12582	٢,٣١	CTSB
hsa-piR-28104	٣,٧٥	HES7	hsa-piR-32847	7٢,٢	CRAT
hsa-piR-28400	٣,٥٩	NEFL	hsa-piR-27306	٢,٢٤	LINC00317
hsa-piR-32889	٣,٥٠	SIKE1	hsa-piR-24154	٢,٢٣	GABRA4
hsa-piR-11120	٢,٩٧	SPACA6P-AS	hsa-piR-33046	٢,١٧	EED,RNY3,QRFPR
hsa-piR-32888	٢,٧٤	ZCWPW2	hsa-piR-32938	٢,١١	LINC00317
hsa-piR-33011	٢,٧٠	PWRN2	hsa-piR-11015	٢,٠٠	DNAJC27,TUBB1, LINC01976

جدول ۱ piRNAهای دارای افزایش بیان معنی‌دار در سرطان سینه و هدف‌های بالقوه آنها

(همه piRNA ها دارای log2 FC ≥ 2 و $p \leq 0.05$ می‌باشند).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

piRNA	Log FC	هدف	piRNA	Log FC	هدف
hsa-piR-7957	-3.51	KIDINS220	hsa-piR-7708	-2.41	CLN3
hsa-piR-12330	-3.35	MBL2	hsa-piR-24828	-2.22	HSD17B12
hsa-piR-30374	-2.69	KLRD1,TMEM241,CALU	hsa-piR-32723	-2.20	XAF1
hsa-piR-8622	-2.58	HOOK3	hsa-piR-22273	-2.17	KANTR
hsa-piR-2086	-2.51	SETDB2,ZNF480,PITPNM2	hsa-piR-33018	-2.17	SYNRG
hsa-piR-13499	-2.50	XIST	hsa-piR-28847	-2.11	DMTF1,RAB3B
hsa-piR-29994	-2.45	KANTR	hsa-piR-11439	-2.09	ARL5A
hsa-piR-1510	-2.42	CFLAR	hsa-piR-19013	-2.08	ATXN3,IKZF3, WNT7B

جدول ۲ piRNAهای دارای بیان کاهش‌یافته در سرطان سینه نسبت به کنترل نرمال و هدف‌های بالقوه آنها (تمام piRNAها دارای $\text{Log2 FC} \leq -2$ و $p \leq 0.05$ می‌باشند).

٤- بحث و نتیجه‌گیری

تجزیه‌وتحلیل بیان افتراقی نقش مهمی در زمینه های مختلف تحقیقات زیست پزشکی به ویژه در مطالعات رونویسی ایفا می‌کند. از روش‌هایی مانند توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) و میکرواری برای شناسایی ژن‌های دارای افتراق بیان استفاده می شود. تجزیه‌وتحلیل بیان افتراقی می تواند نقش مهمی در درک رویدادهای مولکولی درگیر در پروسه‌های مختلف از قبیل رشد [۹]، پاسخ به درمان بیماری‌ها [۱۰] و همچنین بیماری‌زایی ایفا کند.

با مقایسه نمودارهای بیان ژن در انواع مختلف سلول یا مراحل رشد، پژوهشگران می‌توانند شبکه‌های پیچیده تنظیم‌کننده ژنی را کشف کنند که رشد جنینی، تشکیل اندام و پاتوژنز بیماری را هماهنگ می‌کنند. به‌عنوان مثال، نجفی در مطالعه‌ای ابتدا، از داده‌های توالی RNA BrainSpan برای به‌دست آوردن ژن‌های دارای افتراق بیان بین دو مرحله از رشد استفاده کرد و سپس، فرایندهای بیولوژیکی مربوطه و مسیرهای پیام‌رسانی را با تجزیه‌و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن استنتاج کرد [۹]. این نوع آنالیز در مورد سرطان نیز می‌تواند نقایص مولکولی خاص بیماری را تشخیص دهد و اهداف بالقوه‌ای را برای مطالعات بیشتر در زمینه راهبردهای درمانی شخصی و پیش‌بینی پیش‌آگهی در سرطآنهای مختلف ارائه کند.

امروزه piRNA ها به‌دلیل نقش مهم و مؤثر آنها در انواع سرطآنها و بیماری‌ها مورد توجه تحقیقات مولکولی قرار دارند و مطالعات در این زمینه روز به روز در حال افزایش است. در ابتدا به‌دلیل اینکه این مولکول‌ها برای اولین بار در سلول‌های رده زایا شناسایی شده بودند، دانشمندان به دنبال کشف نقش آنها در این نوع سلول‌ها بودند. اما با مطالعات بیشتر، مشخص شد piRNA ها علاوه بر سلول‌های رده زایا، در سلول‌های سوماتیک نیز بیان می شوند. بنابراین، دانشمندان در صدد کشف اهمیت و نقش بیشتر و متنوع‌تری برای این مولکول‌ها برآمدند.

امروزه، نقش برخی از piRNA ها در انواع مختلف سرطآنها و بیماری‌ها ثابت شده است. به‌عنوان مثال، نقش

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

مهار کننده تومور در سرطان معده برای piR-823 به صورت *in vivo* و *in vitro* ثابت شده است [۱۱]. نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که بیان piR-001773 و piR-017184 در سلول‌های سرطان پروستات افزایش می‌یابد و این piRNAها به صورت پس از ترجمه با هدف قرار دادن پروتوکادهرین ۹ (PCDH9)، که به‌عنوان مهار کننده تومور عمل می‌کند، بیان آن را کاهش داده و نقش انکوژنی در سرطان پروستات ایفا می‌کنند [۱۲].

علاوه بر این، piRNAها در سایر بیماری‌ها نیز نقش دارند. مطالعه‌ای با توالی‌یابی RNAهای کوچک نشان داد که ٥٦٤ عدد piRNA با بیماری‌های مغزی انسان و ٤٥١ عدد piRNA با بیماری آلزایمر مرتبط است [۱۳]. نقش piRNAهای مختلف در بیماری‌هایی همچون پارکینسون، رتینیت پیگمنتوزا، ناباروری مردان و... نیز مشخص شده است [١٤]. همچنین، ثابت شده است که می‌توان از piRNA ها به‌عنوان بیومارکر نیز استفاده کرد. نتایج یک مطالعه بر روی piRNAهای سرم خون بیماران مبتلا به سرطان کولون نشان داد که در مجموع، ۳۱ عدد piRNA به‌طور قابل‌توجهی در سرم بیماران سرطانی در مقایسه با افراد سالم بیان متفاوت دارند و بر اساس سطوح piR-5937 و piR-28876، تمایز بین بیماران سرطانی و افراد سالم با حساسیت و ویژگی بالا امکان‌پذیر بود [۱٥].

یک پژوهش بر روی piRNAهای مشتق شده از اگزوزوم های سرم خونی که دارای بیان افتراقی در کارسینومای سلول کبدی نسبت به سلول‌های نرمال هستند، ٥ عدد piRNA با پتانسیل بیومارکر بودن را برای این بیماری را معرفی کرده است [١٦].

با توجه به آشکار شدن روزافزون نقش و اهمیت piRNA ها در بیماری‌ها و سرطانهای مختلف، هدف ما از این مطالعه پیدا کردن piRNAهای مهم و مؤثر در سرطان سینه بود. برای این هدف، آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌های خام و در دسترس عموم توالی‌یابی RNAهای کوچک (small RNAseq) از بافت سرطان سینه و بافت نرمال سینه انجام شد و بیان افتراقی piRNAها به‌دست آمد و هدف بالقوه آنها با استفاده از پایگاه داده piRNAdb مشخص شد. معیار ما برای انتخاب piRNAهای مهم داشتن $\text{Log FC}\geq 2$ و $p \leq 0.05$ بود. بنابراین، از بین ۳۷۲ عدد piRNA دارای بیان افتراقی معنی‌دار، به ٤٦ عدد piRNA دارای $\text{Log F}\geq 2$ و هدف مشخص رسیدیم که ۳۰ عدد دارای افزایش بیان و ١٦ عدد دارای کاهش بیان می‌باشند. پژوهش‌ها نشان داده است که piRNAها می‌توانند در قالب انکوژن یا مهارکننده تومور عمل کنند. بنابراین، piRNAهایی که در سرطان سینه افزایش بیان نشان می‌دهند، می‌توانند پتانسیل انکوژنی و آنهایی که کاهش بیان نشان می‌دهند پتانسیل مهارکننده توموری داشته باشند و با بررسی عملکردی هر کدام از آنها، می‌توان به اهمیت و نقش دقیق‌تر آنها پی برد. همچنین، با توجه به هدف های آنها، می‌توان به نقش احتمالی آنها در پروسه‌های بیولوژیکی و مسیرهای پیام رسانی احتمالی پی برد. به‌عنوان مثال، نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی برای hsa-piR-24828 با $\text{Log2 FC} = -2.22$ حدود ٤ برابر کاهش بیان در سرطان سینه را نشان می‌دهد و هدف این piRNA، HSD17B12 معرفی شده است. در یک مطالعه ناگاساکی و همکاران نشان دادند که کاهش بیان HSD17B12 توسط RNA های کوچک منجر به مهار رشد قابل‌توجهی در سلول‌های سرطان سینه SKBR3 می‌شود [۱۷]. با ترکیب نتایج این مطالعه و یافته های ما، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این small RNA تنظیم‌گر می‌تواند hsa-piR-24828 باشد و از آنجایی‌که این piRNA در شرایط سرطان کاهش بیان دارد، بنابراین، HSD17B12 می‌تواند افزایش بیان پیدا کرده و باعث رشد و پیشرفت تومور شود.

تنظیم‌کننده آپوپتوز مشابه CASP8 و FADD (CFLAR) یک تنظیم‌کننده کلیدی ضد آپوپتوز است که در برابر آپوپتوز با واسطه Fas و TRAIL مقاومت می‌کند. علاوه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

بر عملکرد ضـــد آپوپتوز، CFLAR همچنین یک واســـطه مهم برای رشد تومور است و سطح بالای بیان CFLAR با تومور تهاجمی‌تر ارتباط دارد [۱۸]. بر ا ساس نتایج مطالعه ما، CFLAR به‌عنوان هدف برای hsa-piR-1510 معرفی شـــده اســـت و این piRNA حدود ۵ برابر کاهش بیان در بافت سرطان سینه نسبت به نرمال نشان می‌دهد. بنابراین، انتظار می‌رود که هدف آن افزایش بیان نشـــان د هد و موجب ر شد و پی شرفت سرطان شود. م شابه این نتیجه گیری ها را می‌توان برای اغ لب piRNA هاو هدف های بالقوه معرفی شده برای آنها انجام داد و این خود می‌تواند دریچه‌ای رو به مطالعات بیشـتر و دقیق‌تر در این زمینه باز کند و با مشـــخص شـــدن عملکرد هر کدام یک از این piRNA ها و نقش دقیق آنها در سرطان سینه در مداخلات تشخیصی و درمانی این بیماری کمک کننده باشد.

تشـکر و قدردانی: نویسـندگان مراتب تشـکر و قدردانی ویژه خود را از معاونت پژوهشـی دانشـگاه تربیت مدرس تهران ابراز می‌کنند.

۵- منابع

[1] ME JF, Siegel RL, Isabelle Soerjomataram M, Ahmedin Jemal D. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2024.

[2] Amelimojarad M, Amelimojarad M, Wang J, Pourmahdian A. miR-382۵-p promotes breast cancer invasion via the regulation of PTEN. 2023.

[3] Zhou J, Xie H, Liu J, Huang R, Xiang Y, Tian D, Bian E. PIWI-interacting RNAs: critical roles and therapeutic targets in cancer. Cancer Letters. 2023:216189.

[4] Zhang H, Li Y. Potential roles of PIWI-interacting RNAs in breast cancer, a new therapeutic strategy. Pathology-Research and Practice. 2024:155318.

[5] Limanówka P, Ochman B, Świętochowska E. PiRNA Obtained through Liquid Biopsy as a Possible Cancer Biomarker. Diagnostics. 2023 May 29;13(11):1895.

[6] El Aamri M, Zayani R, Baachaoui S, Mohammadi H, Amine A, Raouafi N. A Double–Amplified Fluorometric Genosensor for Sensitive Detection of PiRNA–651 as a Novel Biomarker of Cancer. Available at SSRN 4511716.

[7] Tan L, Mai D, Zhang B, Jiang X, Zhang J, Bai R, et al. PIWI-interacting RNA-36712 restrains breast cancer progression and chemoresistance by interaction with SEPW1 pseudogene SEPW1P RNA. Molecular cancer. 2019;18:1-15.

[8] Gong Z, Wang J, Wang D, Buas MF, Ren X, Freudenheim JL, et al. Differences in microRNA expression in breast cancer between women of African and European ancestry. Carcinogenesis. 2019 Mar 12;40(1):61-69.

[9] Najafi H, Naseri M, Zahiri J, Totonchi M, Sadeghizadeh M. Identification of the molecular events involved in the development of prefrontal cortex through the analysis of RNA-seq data from BrainSpan. ASN neuro. 2019;11:1759091419854627.

[10] Najafi H, Totonchi M, Sadeghizadeh M. Predicted Cellular and Molecular Actions of Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder: An In Silico Study. CNS drugs. 2020;34:521 33.

[11] Cheng J, Deng H, Xiao B, Zhou H, Zhou F, Shen Z, Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. Cancer letters. 2012 Feb. 1;315(1):12-7.2012.

[12] Zhang L, Meng X, Li D, Han X. piR-001773 and piR-017184 promote prostate cancer progression by interacting with PCDH9. Cellular Signalling. 2020;76:109780.

[13] Roy J, Sarkar A, Parida S, Ghosh Z, Mallick B. Small RNA sequencing revealed dysregulated piRNAs in Alzheimer's disease and their probable role in pathogenesis. Molecular BioSystems. 2017 Feb 28;13(3):565-576.

[14] Wu X, Pan Y, Fang Y, Zhang J, Xie M, Yang F, et al. The biogenesis and functions of piRNAs in human diseases. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2020;21:108-20.

[15] Vychytilova-Faltejskova P, Stitkovcova K, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, et al. Circulating PIWI-interacting RNAs piR-5937 and piR−28876 are promising diagnostic biomarkers of colon cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

2018;27(9):1019-28.

[16] Rui T, Wang K, Xiang A, Guo J, Tang N, Jin X, et al. Serum exosome-derived piRNAs could Be promising biomarkers for HCC diagnosis. International Journal of Nanomedicine. 2023:1989-2001.

[17] Tsachaki M, Strauss P, Dunkel A, Navrátilová H, Mladenovic N, Odermatt A. Impact of 17β-HSD12, the 3-ketoacyl-CoA reductase of long-chain fatty acid synthesis, on breast cancer cell proliferation and migration. Cellular and Molecular Life Sciences. 2020;77:1153-75.

[18] Li H, Li L, Qiu X, Zhang J, Hua Z. The interaction of CFLAR with p130Cas promotes cell migration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2023, 1870 (2):119390.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

Differentially expressed piRNAs in breast cancer cells

Maryam Abedi[1], Majid Sadeghizadeh[1*]

1- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University

sadeghma@modares.ac.ir

Receipt: 2024/06/08 Accepted: 2024/08/27

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women, and despite many scientific advances, it remains the leading cause of cancer-related death in women. To solve this global problem, deeper molecular studies in the field of breast cancer are needed. Nowadays, the role of piRNAs in various cancers is of great interest. In this study, we aim to identify important piRNAs involved in breast cancer. For this purpose, raw small RNA seq data related to cancerous and normal breast tissue samples were selected and extracted from the GEO database, and the Galaxy platform was used for their bioinformatic analysis.

The differential expression of 372 piRNAs was obtained based on Log2 FC ≥ 2, $p \leq 0.05$, of which 191 showed increased expression and 181 showed decreased expression. The highest increase is related to hsa-piR-33125, whose target is GATAD2A and plays a role in carcinogenesis processes such as blood vessel development, apoptosis, regulation of gene expression at the transcriptional level, etc. The largest decrease is related to hsa-piR-33073 with Log2 FC= -4.20. To find a list of important piRNAs that have a significant difference in expression in breast cancer compared to normal tissue, as well as to determine the increase or decrease of their expression in cancer tissue and to identify the target genes and investigate their role in the biological pathways involved in the development and progression of cancer. This can be the beginning of studies that will ultimately lead to advances in breast cancer research and treatment methods.

Keywords: breast cancer, piRNA, differential expression, small RNA seq, molecular studies

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]