تجزیه‌وتحلیل 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[٤]، بهرام محمد سلطانی[٥]

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

٤- دانشیار، گروه زیست‌شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

٥- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ٦٣١٤٦٣٤٥٦٧، تهران، ایران

geneticman2005@gmail.com

دریافت: ١٤٠١/٠٤/٢٦ پذیرش: ١٤٠١/٠٧/١٧

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 دسته‌ایی 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 محدودکردن 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 به‌دست آمده از سلول‌های مقاوم و حساس به سیس‌پلاتین برای جستجوی ceRNA های تنظیم‌کننده‌ی احتمالی مقاومت دارویی در سرطان تخمدان استفاده شد. براین این‌کار، رده سلولی تخمدانی حساس و مقاوم به سیس‌پلاتین به‌نام 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 تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیک سلول‌های مقاوم نسبت به حساس، ١٦ عدد mRNA، ١٠ عدد lncRNA و ١٤٩ عدد miRNA دچار بیش بیان و ٦٢٢ عدد mRNA، ٢٦٣ عدد lncRNA و ١٧٧ عدد miRNA دچار کاهش بیان بودند. این ژن‌ها در ٥٧ مسیر سلولی درگیر بودند و با ترسیم شبکه ceRNA تنظیمی، دو محور ZNRF3-AS1-miR-33-DUSP1 و ZNRF3-AS1-miR33-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 بدخیمی های 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 [٤، ٥]. جراحی همراه با درمان های بر پایه پلاتینیوم مثل سیس‌پلاتین و کربوپلاتین یکی از مهمترین درمان‌ها برای این بیماران می‌باشد [٦].

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 می شوند [۱۰، ۱۱]. مطالعات مختلفی نقش RNA های غیر کدکننده (ncRNAs [1]) را در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی و بیماری‌های انسانی، به‌ویژه در سرطان بررسی کرده است [۱۲و ۱۳]. پیشرفت های اخیر بر نقش حیاتی ژن های ncRNAs در ایجاد مقاومت دارویی در سرطان تخمدان تاکید دارد. تا به امروزمشخص شده است که ژن‌های کدکننده و غیر کدکننده زیادی در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین نقش دارند [۱٤-۱٦]. با این‌حال، 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 mRNAهای دارای بیان افتراقی DEGs[2]، و بررسی بیان افتراقی ژن های غیر کدکننده DELs[3] و بررسی بیان افتراقی ژن‌های کدکننده miRNA ها DEMs[4] در رده سلولیA2780 مقاوم و حساس به سیس‌پلاتین، داده‌های بیان ژن به شماره SRP-316044 ارائه شده توسط Sheera Adar (برای بررسی mRNA و lncRNA[5]) 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 آنلاین Galexy (Galexy.org) بر اساس بسته آماری Dseq2 نسخه ۱,٦,۳ در برنامه R تجزیه‌وتحلیل شد ($2 < \log2(FC)$ و $0.05>$ ($p<0.05$).

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 می کند. پایگاه داده Mircode ژن های هدف miRNA را بر اساس رونوشت های GENCODE پیش‌بینی می‌کند. TargetScan پایگاه داده‌ای است که می‌تواند اهداف miRNA را در پستانداران با تطبیق سایت‌های ۸ mer،

---

[1] competing endogenous RNA
[2] Differential Expression Genes
[3] Differential Expression lncRNAs
[4] Differential Expression microRNAs
[5] long non-coding RNA

۷ mer و ٦ mer حفاظت‌شـــده در ناحیه Seed در 3´UTR هر mRNA پیش‌بینی کند.

٢-٣ ساخت شبکه تنظیمی ceRNA

برای ساخت شبکه تنظیمی LncRNA-miRNA-mRNA مربوط به سـرطان تخمدان مقاوم به سـیس‌پلاتین، از نتایج پیش‌بینی ژن های هدف lncRNA و miRNA های تغییر بیان یافته ا ستفاده شد. در نهایت شبکه تنظیمی lncRNA، miRNA و mRNA توســـط نرم‌افزار Cytoscape 3.6.1 ترسیم شد [۲۱].

٢-٤ تجزیه‌وتحلیل عملکردی و مسیرهای سیگنالینگ

برای انجام آنالیز هســـتی‌شـــناســـی ژن در پایگاه Gene Onthology (GO) اجزای ســـلولی (CC)[1]، عملکرد مولکولی[2] و فرایندهای بیولوژیکی[3] بررســـی شـــد و برای تجزیه‌وتحلیل مســـیرهای درگیر از پایگاه داده KEGG[4] استفاده شد.

٢-٥ تجزیه‌وتحلیل داده‌های TCGA[5]

برای بررســی خصــوصــیت پیش‌آگهی دهنده RNA های تغییر بیان یافته در ترکیب با داده های بالینی، نمودار Kaplan-Meier با ا ستفاده از بسته آماری Survival نسخه ۱,٦,۳ در برنامه R ترسیم شد. مقادیر $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

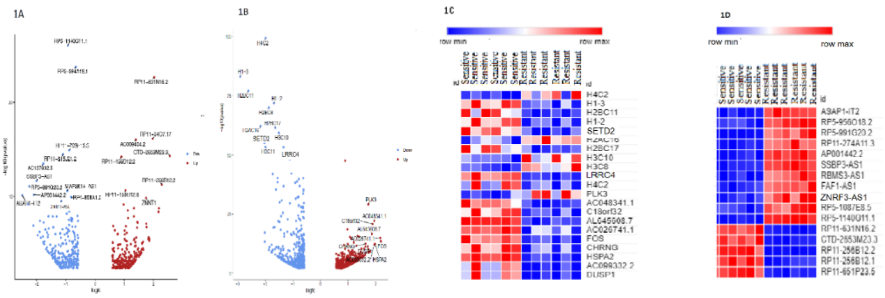
٢-٦ تجزیه‌وتحلیل شبکه هم بیانی

برای ارزیابی همبســتگی میان DEGs، DEMs و DELs از تحلیل ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. مقدار مطلق ضریب همبستگی پیر سون ≤ ۰,۵۸ انتخاب شد و شبکه هم‌بیانی با اســـتفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism ایجاد شد.

۳- نتایج

۳-۱ شناسایی DEGs، DEMs و DELs

در این مطالعه، ۱٤٥۳ عدد mRNA، ٤۹۷ عدد lncRNA و ۳۲۹ عدد miRNA با بیان متفاوت میان سـلول حســاس و مقاوم به سیس‌پلاتین شناسایی شدند (log Fc > 2 و ۰,٥> $p<0.05$). براین اســـاس ١٦ عـدد mRNA، ١٠ عـدد lncRNA و ١٤٩ عدد miRNA افزایش بیان داشـــتند. اما ٦٢٢ عـدد mRNA، ٢٦٣ عـدد lncRNA و ١٧٧ عـدد miRNA در سلول مقاوم نسبت به سلول حساس کاهش بیان معنی‌دار داشـــتند (شـــکل ۱- جدول ۱). این تغییرات بیانی در نمودار آتش‌فشانی (شکل ۱- 1A و 1B) و هیت مپ (شکل ۱- 1C و 1D) مشهود می‌باشد.



شکل ۱ 1A و 1B نمودار آتش‌فشانی مربوط به mRNA ها و lncRNA های دارای بیان متفاوت بین رده‌سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس‌پلاتین. 1C و 1D نمودار هیت مپ مربوط به mRNA ها و lncRNA های با بیان متفاوت بین رده‌سلولی A2780 حساس و مقاوم به سیس‌پلاتین.

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

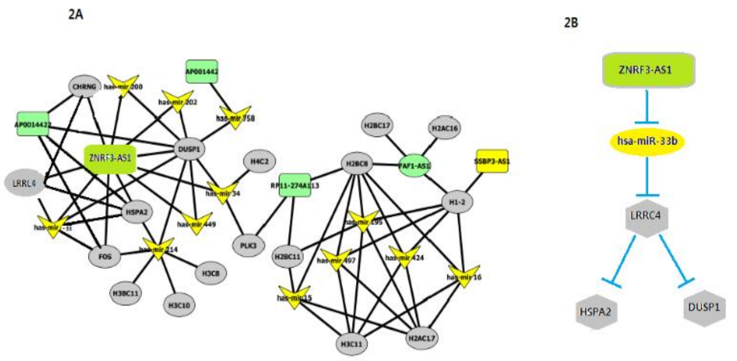
[1] Cellular components
[2] Molecular Functions
[3] Biological Processes

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

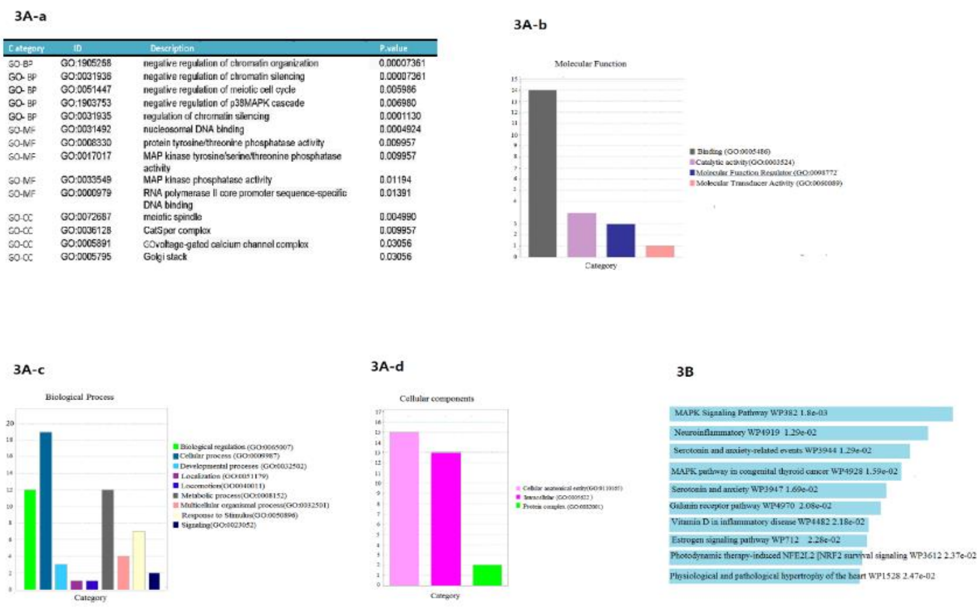
DEGs	***DELs***	***DEMs***	***Up/Down***
H3C8	AC137932.5	hsa-mir-873	Down
H3C11	RP11.28G8.1	hsa-mir-128-2	Down
H2AC12	RP11.428E7.2	hsa-mir-410	Down
ARID1B	INT99-AS1	hsa-mir-33b	Down
NACC2	ZNRF3-AS1	hsa-mir-181c	Down
H2AC4	PR11.484l8.1	hsa-mir-668	Down
H2AC20	AC133136.1	hsa-mir-411	Down
SETD2	AP001442.2	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
CHRNG	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

۳-۲ پیش‌بینی و ساخت شبکه تنظیمی lncRNA-miRNA-mRNA

ارتباطات میان miRNA و lncRNA و همچنین miRNA و mRNA توسط StarBase پیش‌بینی شد. همچنین، mRNA های هدف miRNA با استفاده از TargetScan و 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 اسپانج کردن miRNA و در نهایت تنظیم بیان ژن‌های هدف ایجاد شد (شکل ۲-2A و 2B).



شکل۲ 2A شبکه ceRNA متشکل از mRNA، lncRNA و miRNA در رده‌سلولی A2780 مقاوم به سیس‌پلاتین. 2B محور های احتمالی دخیل در مقاومت به سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان.



Category	ID	Description	P.value
GO-BP	GO:1905268	negative regulation of chromatin organization	0.00007361
GO-BP	GO:0031936	negative regulation of chromatin silencing	0.00007361
GO-BP	GO:0051447	negative regulation of meiotic cell cycle	0.005986
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:0008330	protein tyrosine/threonine phosphatase activity	0.009957
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	meiotic spindle	0.004990
GO-CC	GO:0036128	CatSper complex	0.009957
GO-CC	GO:0005891	GOvoltage-gated calcium channel complex	0.03056
GO-CC	GO:0005795	Golgi stack	0.03056

شکل ۳ A: تجزیه‌وتحلیل 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 سیگنالیگ دخیل در مقاومت به سیس‌پلاتین در رده‌سلولی

۳-۳ تجزیه‌وتحلیل عملکردی و مسیرهای سیگنالینگ

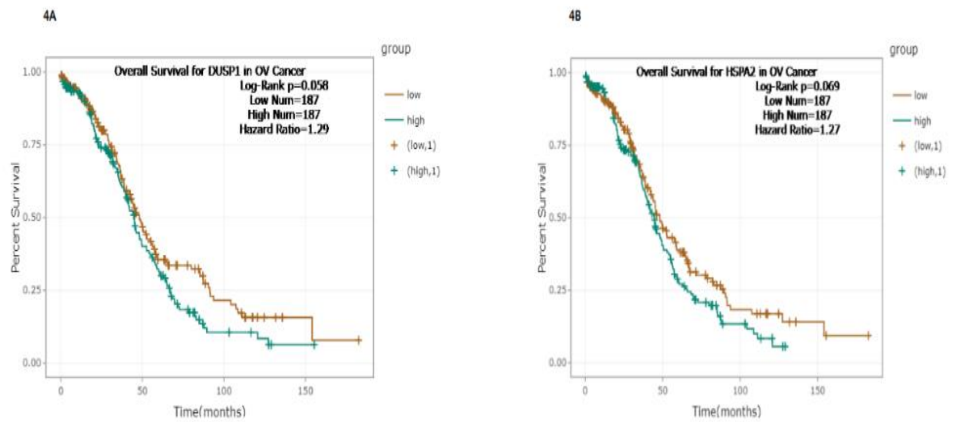
تجزیه‌وتحلیل داده‌های GO شـامل اجزای سـلولی (CC)، عملکرد بیولوژیکی (BF) و فرایند های مولکولی (MP) ، همچنین برر سی م سیر های سیگنالینگ در KEGG برای ارزیابی عملکرد DEGs انجام شد. بر این ا ساس ۱۲ عدد CC، ۲۰ عدد BP، ۲۰ عدد MF و ۵۷ مسـیر مرتبط با ژن‌های تغییر بیان یافته مشخص شد (p<0.05). با توجه به تجزیه‌وتحلیل نتایج ه ستی شنا سی ژن، بی شتر فرایندهای بیولوژیکی که در ایجاد مقاو مت به سـیس‌پلاتین نقش دارند، تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند سـازماندهی کروماتین و خاموش کردن کرو ماتین می باشـند. همچنین، مهمترین عملکرد های مولکولی در سـلول سـر طانی م قاوم به سیس‌پلاتین مربوط به آنزیم های سرین/ ترئونین/ تیروزین فسـفاتاز اسـت. علاوه بر این، تجزیه‌وتحلیل داده‌های KEGG نشان داد که مسیر سیگنالینگ MAPK موثرترین مسیر در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین می‌باشد (شکل 3A و 3B).

۳-٤ تجزیه‌وتحلیل داده‌های TCGA

داده‌های TCGA برای بررسـی ارتباط بین DELs، DEGs و DEMs و میزان بقا درنمونه های 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).

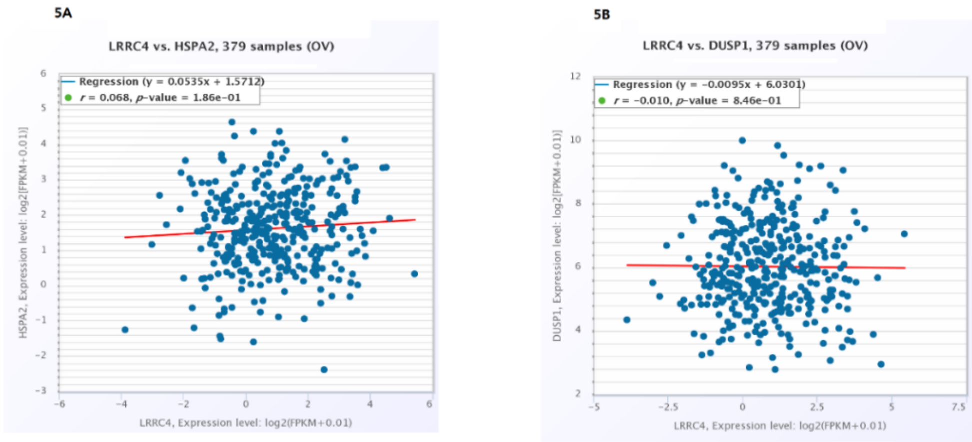
۳-٥ آنالیز و تحلیل شبکه هم بیانی

همبسـتگی میان سـطح بیان lncRNA ها و mRNA های جفت شـده با آنها در سـر طان تخمدان بر اسـاس تجزیه‌وتحلیل ضـریب همبسـتگی پیرسـون در پایگاه داده TCGA اندازه‌گیری شد. براین ا ساس همب ستگی میان ژن تنظیم‌گر LRRC4 با DUSP1 و HSPA2 اندازه‌گیری شد. نتایج همبستگی خطی مستقیم میان سطح بیان LRRC4 با DUSP و HSPA2 نشان داد (ضریب همب ستگی ≥۰،۳ و p<0.05) (شکل 5A و 5B).



شـکل ٤ منحنی Kaplan-Meier برای ژن‌های تغییر بیان یافته در شـبکه ceRNA بر اسـاس پایگاه داده TCGA**در** سـرطان 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 ٥ تجزیه‌وتحلیل همبستگی بین سطح بیان ژن‌های مختلف در رده سلولی A2780 مقاوم به سیس‌پلاتین سرطان تخمدان بر اساس پایگاه داده TCGA. همبستگی مستقیم بین سطح بیان LRRC4 با HSPA2 (5A) و DUSP1 (5B) دیده شد(ضریب همبستگی≤۰,۳ و $P<$ 0.05).

٤- بحث و نتیجه‌گیری

سیس‌پلاتین یکی از مهم‌ترین 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 اپی‌تلیال تخمدان کاهش می‌دهد. بنابراین، شناسایی بیومارکرهای جدید برای غلبه بر مقاومت دارویی به این داروی پرکاربرد و اساسی ضروری به‌نظر می‌رسد.

امروزه نقش تنظیمی RNA های غیرکدکننده 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 می‌توانند عملل مولکولی ایجاد مقاومت دارویی در سرطان‌ها را آشکار کند. شبکه رقابتی RNA درونزا (ceRNA) رابطه بین RNA غیر کدکننده و mRNA را نشان می‌دهد.

LncRNA ها به‌طور فراگیر در سراسر ژنوم بیان می‌شوند. نقش تنظیمی این ژن‌های غیر کدکننده در ایجاد مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی در سرطان‌های مختلف از طریق تنظیم بیان ژن های دخیل در پمپ های ایفلاکس، ترمیم DNA، آپوپتوز، EMT، ROS و غیره در مطالعات مختلف نشان داده شده است. به‌عنوان مثال، اندازه‌گیری سطح بیان (PVT1) در بیماران مبتلا به سرطان کولون از نقش موثراین lncRNA در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین حکایت دارد [۲۲]. همچنین، مطالعات اخیر نقش MALAT1 را در سرطان ریه مقاوم به سیس‌پلاتین نشان داده است. این lncRNA با تنظیم مثبت ژن‌های MRP1 و MDR1 از طریق فعالسازی STAT3، حساسیت به سیس‌پلاتین 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 آپوپتوز، اتوفاژی، هیپوکسی، سلول‌های بنیادی سرطانی، NF-kB و Notch1 باعث مقاومت به سیس‌پلاتین می‌شوند [٢٤]. این RNA های غیر کدکننده به ۳'-UTR ژن‌های هدف متصل شده و بیان mRNA را تنظیم می‌کنند [٢٥].

در شبکه ceRNA، lncRNA ها می‌توانند به‌عنوان اسپانجر microRNA عمل کنند و در عین حال در رقابت با

miRNA برای اتصال به ناحیه MRE باعث تنظیم عملکرد mRNA های هدف شوند[۲۶]. به‌عنوان مثال، lncRNA SNHG5 با اسپانج miR-212-3p باعث متاستاز سلول‌های استئوسارکوز وسرکوب مسیر سیگنالینگ miR-212-3p/SGK3 می شود [۲۷]. بنابراین، به‌نظر می‌رسد شبکه‌ای با محوریت mRNA و miRNA-lncRNA می‌تواند اهداف مولکولی را برای غلبه بر مقاومت شیمی‌درمانی پیش‌بینی کند. در این مطالعه، بر اساس فرضیه ceRNA، تعامل RNA غیر کدکننده و mRNA در مقاومت اکتسابی به سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان را بررسی شده است.

بر اساس توالی‌یابی RNA و تجزیه‌وتحلیل 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، ٦ عدد lncRNA و ۲۵ عدد mRNA در شبکه بزرگ ceRNA دخیل بودند. با استفاده از آنالیز مدت بقا و ضریب همبستگی در داده‌های 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 داده‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر و داده‌های بیوانفورماتیک موجود، پیش‌بینی شد که lncRNA ZNRF3-AS1 –که در شرایط مقاومت دچار کاهش بیان شده است، می‌تواند hsa-miR- 33 را اسپانج کند. در ادامه با تجزیه‌وتحلیل داده‌های CLIP seq پیش‌بینی شد که hsa-miR- 33 از طریق اتصال به 3´UTR در ژن LRRC4 می‌تواند بیان آن را تغییر دهد. گزارش‌ها نشان داده است که hsa-miR- 33 در سرطان استئوکارسینوما [۲۹]، سرطان کولورکتال[۳۰] سرطان ریه[۳۱] و گلیوبلاستوما [۳۲] نقش دارد.

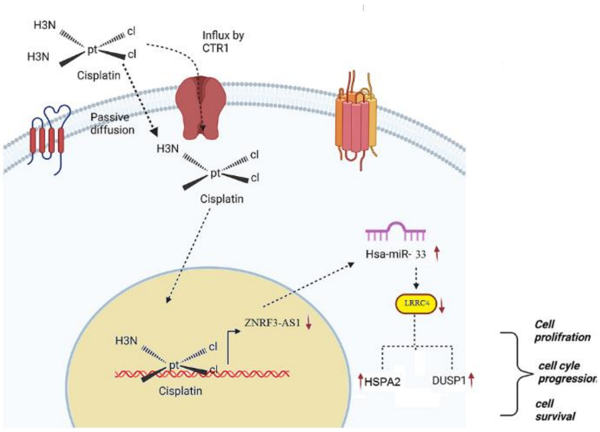
علاوه بر این، در پژوهش حاضر برای نشان دادن رابطه بین ZNRF3-AS1 و ژن های هدف با تجزیه‌وتحلیل DEGs، مشاهده شد که ژن LRRC4 در رده سلولی مقاوم به سیس‌پلاتین در مقایسه با رده سلولی حساس به سیس‌پلاتین به‌طور قابل‌توجهی کاهش بیان دارد. این ژن یک تومورساپرسور با نواحی تکراری غنی از لوسین می‌باشد. کاهش بیان این ژن سبب بروز متاستاز در سرطان تخمدان می‌شود. مطالعات نشان داده است که بیان این تومورساپرسور همبستگی معکوسی با بیان ژن *E.cadherin* در سرطان تخمدان دارد[۳۳]. همچنین، کاهش بیان این تومور ساپرسور در سرطان گلیوبلاستوما پیشرفته گزارش شده است. این ژن با مهار ژن‌های مسیر ERK/MAPK و PI3k/AKT چرخه سلولی را تنظیم و تکثیر سلولی را مهار می‌کند[۳٤].

در نهایت و با توجه به داده‌های موجود در پژوهش حاضر، دو محور احتمالی ceRNA دخیل در مقاومت دارویی به سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان پیشنهاد شد. این دو محور ZNRF3-AS1/miR-33a/LRRC4/DUSP1 و محور ZNRF3-AS1/miR-33a/LRRC4/HSPA2 می‌باشند.

مطالعات پیشین نقش دو ژن *DUSP1* و *HSPA2* را در القای مقاومت به داروهای شیمی درمانی از طریق مسیرهای سیگنالینگ ERK/MAPK و PI3K/AKT نشان داده است[۳۵، ۳٦]. آنالیز داده‌های TCGA نشان داد که بیان ژن‌های *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 سیس‌پلاتین بیانگر همبستگی منفی میان *DUSP1* و *HSPA2* با تومورساپرسور LRRC4 می‌باشد. با در نظر گرفتن مجموع یافته‌های ذکر شده به‌نظر می‌رسد نظریه مطرح شده در پژوهش حاضر در ارتباط با نقش محورهای پیشنهادی در القای مقاومت به سیس‌پلاتین صحیح می‌باشد.

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

طبق دانسته‌ها، این اولین گزارش در مورد تجزیه‌وتحلیل شبکه ceRNA شامل lncRNA، miRNA و mRNA در رده سلولی سرطان تخمدان مقاوم به سیس‌پلاتین 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. به‌نظر می‌رسد مطالعه در مورد شبکه ceRNA می‌تواند یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان‌های مقاوم به شیمی‌درمانی باشد.



شکل ٦ نقش ceRNA در القای مقاومت به سیس‌پلاتین در رده سلولی A2780 سرطان تخمدان. حضور سیس‌پلاتین 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 DUSP1 و HSPA2 افزایش می‌یابد. این دو ژن با فعال مسیر ERK/MAPK و PI3K/AKT می‌توانند سبب القای مقاومت به سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان شوند.

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 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*

[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 gavanmard 2, Mostafa Hosseini 3*, Shiva Irani 4 Bahram M. Soltani 5

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