

Bioinformatic Evaluations for Locating the microRNA Suppressing PI3K/AKT Pathway and Analysis in Prostate Cancer Cell Lines

Seyed Hamid Aghaee-Bakhtiari¹, Ehsan Arefian^{2,3}, Masoud Soleimani⁴, Siamak Mirab Samiee⁵, Farshid Noorbakhsh⁶, Reza Mahdian^{7*}, Pezhman Fard-Esfahani^{8**}

- 1- PhD Candidate, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
- 3- Researcher, Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 5- Assistant Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
- 6- Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 7- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 8- Assistant Professor, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: mahdian@pasteur.ac.ir

** Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: fard-esfahani@pasteur.ac.ir

Received: 25/Jun/2014, Accepted: 05/Nov/2014

Abstract

Objective: Prostate cancer is the fifth most common cancer. In 2012, it was the second leading cause of cancer death for men worldwide. The PI3K/AKT pathway plays an essential role in pathogenesis of prostate cancer; the key role of this pathway in cancer progression makes it an attractive target for prostate cancer therapy. MicroRNAs (miRNAs) that regulate gene expression have a special ability to simultaneously control multiple genes and pathways which make them candidates for therapeutics. This study aims to determine miRNAs which target the PI3K/AKT pathway and evaluate them in prostate cancer cell lines.

Methods: In order to determine an effective miRNA for the PI3K/AKT pathway, we assessed six genes from this pathway which have been proposed as drug targets in ten different prediction algorithms. Next, the candidate miRNAs were analyzed in expression profile and pathway analysis databases. Expression of candidate miRNAs in control and prostate cancer cell lines were subsequently evaluated.

Results: According to bioinformatics, the miR-29 family could target the most genes from this list. Other bioinformatic estimates confirmed these results. The miR-29 family showed significant downregulation in prostate cancer cell lines LNCAP, PC3 and DU-145 compared to control samples.

Conclusion: These results propose the possibility of using the miR-29 family to inhibit the PI3K/AKT pathway in prostate cancer.

Keywords: Prostate Cancer, PI3K/AKT Pathway, Bioinformatics Prediction, miR-29 Family

بررسی بیوانفورماتیکی به منظور یافتن میکرو RNA مهار کننده مسیر PI3K/AKT و ارزیابی در رده‌های سلولی سرطان پروستات

سید حمید آقایی بختیاری^۱، احسان عارفیان^{۲،۳}، مسعود سلیمانی^۴، سیامک میراب سمیعی^۵، فرشید نوربخش^۶، رضا مهدیان^۷، پژمان فرد اصفهانی^{۸*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- پژوهشگر، گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات فناوری بن یخته، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استادیار، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۶- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۷- استادیار، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۸- استادیار، بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی

Email: mahdian@pasteur.ac.ir

** آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی

Email: fard-esfahani@pasteur.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۸/۱۴

دریافت مقاله: ۹۳/۰۴/۰۴

چکیده

هدف: سرطان پروستات دومین سرطان شایع و پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان مردان در سال ۲۰۱۲ در جهان است. مسیر PI3K/AKT نقش اساسی در بیماری‌زایی سرطان پروستات دارد و به دلیل نقش کلیدی این مسیر در پیشروی سرطان آن را به هدف جذابی برای استراتژی‌های جدید درمانی تبدیل می‌کند. یکی از روندهای تنظیمی ژن‌ها، میکرو RNAها است که توانایی ویژه‌ای برای کنترل چندین ژن و مسیر به‌طور هم‌زمان، آن‌ها را کاندید قابل توجهی برای اهداف درمانی می‌کند. این مطالعه با هدف به دست آوردن میکرو RNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT با روش‌های بیوانفورماتیکی و بررسی نتایج حاصل در سلول‌های رده پروستات انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای پیدا کردن میکرو RNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT، شش ژن این مسیر که به‌عنوان هدف‌های دارویی مطرح هستند را در ده الگوریتم متفاوت پیش‌بینی بررسی شد. سپس به‌صورت بیوانفورماتیکی میکرو RNA حاصل از نظر میزان بیان در بافت پروستات سالم و رده‌های سلولی سرطان پروستات و همچنین از لحاظ هدف‌گیری در نرم‌افزارهای تجزیه و تحلیل چرخه ارزیابی شد. به‌صورت عملی بیان میکرو RNAهای کاندید در نمونه کنترل و رده‌های سلولی سرطان پروستات ارزیابی شد.

نتایج: خانواده miR-29 بیشترین شناسایی را از مجموعه ۶ ژنی داشتند و سایر بررسی‌های بیوانفورماتیک نیز مؤید نتیجه حاصل بودند. بررسی‌ها نشان دهنده کاهش بیان معنی‌دار خانواده miR-29 در رده‌های سلولی سرطان پروستات LNCAP، PC3 و DU-145 نسبت به نمونه کنترل سالم است.

نتیجه‌گیری: نتایج مبتنی بر تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک و بررسی بیان خانواده miR-29، نشان دهنده امکان استفاده از خانواده miR-29 برای مهار مسیر PI3K/AKT در سرطان پروستات است.

کلیدواژگان: سرطان پروستات، مسیر PI3K/AKT، پیش‌بینی بیوانفورماتیکی، خانواده miR-29

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۱-۱۲

مقدمه

سرطان پروستات نوعی بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم از بافت پروستات نشأت می‌گیرد و به‌طور نامنظم و فزاینده‌ای تکثیر و منجر به افزایش حجم در هر یک از اجزای سلولی غده پروستات می‌شود. سرطان پروستات در حال حاضر دومین سرطان شایع و پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان در مردان در سراسر جهان با تخمین ۱,۱۱۱,۶۸۹ موارد تازه تشخیص داده شده و ۳۰۷,۴۷۱ مرگ و میر جدید در سال ۲۰۱۲ است [۱]. با توجه به تغییرات جهانی در رشد و پیر شدن جمعیت، پیش‌بینی بروز سرطان پروستات به ۱,۷۰۰,۰۰۰ مورد جدید و ۴۹۹,۰۰۰ مرگ و میر در سال ۲۰۳۰ است. همچنین سرطان پروستات در رتبه دوم از سرطان‌هایی است که به مرگ مردان در ایالات متحده می‌انجامد [۲].

سرطان پروستات از آن‌جایی که شیوع بالایی در میان مردان دارد و میزان مرگ و میر ناشی از آن نیز بسیار بالا است در کانون توجه برای یافتن روش‌های درمانی نوین است [۳]. مطالعات ژنتیکی و آزمایشگاهی متعدد نشان داده است که مسیر PI3K/AKT نقش اساسی در بیماری‌زایی سرطان پروستات دارد. به دلیل نقش اصلی این مسیر در پیشروی سرطان، مطالعات مختلفی برای مهار این چرخه صورت گرفته و راه‌کارهای متفاوتی به کار گرفته شده تا داروهای جدید برای مهار انتقال پیام مسیر PI3K/AKT حاصل شود [۴، ۵]. PI3K از خانواده لیپید کینازها است که گروه 3'OH فسفاتیدیل اینوزیتول (Phosphatidylinositol) را فسفریله می‌کند. PI3K دارای زیر واحدهای آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) است که زیر واحد آلفا (PIK3CA) نقش بسیار مهم‌تری در انتقال پیام در سرطان دارد و مطالعات مختلفی روی آن صورت گرفته است. فعال شدن PI3K، یک آنبشار انتقال پیام را فعال کرده که سبب رشد، بقا و متابولیسم سلول‌های سرطانی می‌شود. فعال شدن مسیر PI3K/AKT در سرطان‌ها از دو طریق فعال‌سازی به وسیله گیرنده تیروزین کیناز و جهش‌های پیکری در اجزای خاص چرخه پیام‌دهی است. این جهش‌ها منجر به افزایش

بررسی به منظور یافتن میکروRNA مهار کننده مسیر PI3K/AKT

عملکرد در انتقال پیام و در نهایت سرطانی شدن می‌شود [۶، ۷]. به‌صورت کلی نقش کلیدی مسیر PI3K/AKT در پیشروی سرطان آن را به هدف جذابی برای استراتژی‌های جدید درمانی تبدیل می‌کند و روندهای متعددی به کار گرفته شده تا داروهای جدید برای مهار انتقال پیام مسیر PI3K/AKT حاصل شود که بسیاری از آن‌ها در مراحل متفاوت کارآزمایی بالینی است [۸، ۹]. یکی از اصلی‌ترین روش‌های تنظیم فرآیندهای ژنتیکی از طریق مکانیسم‌های مرتبط با میکروRNA (microRNA: miRNA) است. میکروRNAها مولکول‌های RNA کوچک (۲۲ نوکلئوتیدی) و تک رشته‌ای است که طی مکانیسم‌هایی از فرم pri-miRNA به pre-miRNA و در نهایت به میکروRNA تبدیل می‌شود. میکروRNA مکمل mRNA یک ژن کد کننده پروتئین است و می‌تواند از بیان یک ژن و تولید پروتئین مربوطه جلوگیری کند. تخمین زده شده که این مولکول‌ها تنظیم بیان یک سوم تمامی ژن‌ها را بر عهده دارد [۱۰، ۱۱]. یک نوع میکروRNA می‌تواند بیان صدها پروتئین را تنظیم نماید. از این رو تحقیقات فراوانی در مورد نقش این مولکول‌ها در بیماری‌های مختلف به‌خصوص سرطان صورت گرفته است [۱۲]. سرطان پروستات نیز از این امر مستثنا نبوده و دانشمندان به نقش چند میکروRNA در روند آسیب‌شناسی این بیماری پی برده‌اند [۱۳، ۱۴]. هم‌اکنون شرکت‌های متعددی پروژه‌های عظیمی در راستای استفاده از میکروRNAها به‌عنوان درمان در سرطان پروستات و ریه پیش گرفته‌اند [۱۵]. تحقیقات در این زمینه هنوز در آغاز کار قرار دارد و این موضوع در بخش درمان این بیماری بیشتر به چشم می‌خورد. گام اول در استفاده از میکروRNAها، پیدا کردن میکروRNA مناسب برای مهار مجموعه ژنی یا مسیر مورد نظر است. روندهای محاسباتی بیوانفورماتیکی ابزارهای مناسبی برای پیش‌بینی بهترین میکروRNA است که ژن‌های مورد نظر یا مسیر پیام‌دهی را هدف‌یابی می‌کند. مبنای عملکرد این الگوریتم‌ها بر اساس تشابه توالی میکروRNA و 3'UTR ژن‌های مورد نظر است و هر الگوریتم به ازای هر mRNA یا میکروRNA تعداد

زیادی برهمکنش را پیش‌بینی می‌کند. الگوریتم‌های متفاوتی برای پیش‌بینی هدف‌یابی میکرو RNA ایجاد شده که معروف‌ترین آن‌ها Targetscan، miRanda و PICTAR5 است [۱۶]. یکی از معضلات این الگوریتم‌ها تعداد زیاد نتایج مثبت کاذب است که پیدا کردن هدف‌یابی‌های درست را دچار مشکل می‌سازد. روندهای متفاوتی برای حل این مشکل به‌کار می‌رود که یکی از این راه‌حل‌ها تجزیه و تحلیل با چندین الگوریتم مختلف و به‌دست آوردن اشتراک‌های در نتایج حاصل است. میکرو RNA که از این روش به‌دست می‌آید به خاطر این‌که توسط چند الگوریتم مختلف ارزیابی شده و به نتیجه واحدی منجر شده است احتمال عملکرد بهینه بیشتری دارد [۱۷].

در این بررسی سعی شد تا میکرو RNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT با روش‌های بیوانفورماتیکی به‌دست آید که به نظر می‌رسد بیان این میکرو RNA در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم کمتر باشد. در صورت تأیید در مراحل بعدی، این میکرو RNA می‌تواند به‌عنوان کاندیدای درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های بیوانفورماتیکی هدف‌یابی ژن‌ها

در مرحله اول ژن‌های کلیدی مسیر PI3K/AKT بررسی شد و در نهایت شش ژن کلیدی در نظر گرفته شد که در مطالعات قبلی اهمیت آن‌ها نشان داده شده بود. بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای یافتن میکرو RNA‌های مؤثر بر این ژن‌ها صورت گرفت که شامل AKT2، PDK1، PDK1، RPS6KB2 و PIK3CA، RICTOR است. یکی از روندهای معمول بررسی میکرو RNA‌های دخیل در تنظیم ژن‌ها، استفاده از اطلاعات الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکرو RNA در انتهای 3'UTR ژن‌ها است که در این مطالعه الگوریتم‌ها عبارت از miRanda، DIANA-mT، miRWalk، miRDB، mirtarget2، PITA، RNAHybrid

PICTAR5، RNA22 و Targetscan است [۱۶]. ژن مورد نظر در هر یک از این ده سایت ارزیابی می‌شود و در نهایت میکرو RNA‌هایی برای بررسی‌های بعدی انتخاب می‌شود که در الگوریتم‌های بیشتری به‌عنوان هدف ژن مربوط معرفی شده باشد. با در نظر گرفتن مراحل ذکر شده یک میکرو RNA که دارای خصوصیات بهتری است انتخاب و مراحل بعدی کار را روی این میکرو RNA بررسی می‌شود.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیان میکرو RNA‌های کاندید

در این مرحله بیان میکرو RNA‌های کاندید در رده‌های سلولی سرطان پروستات LNCAP، PC3 و DU-145 نسبت به بافت پروستات سالم بررسی شد. این اطلاعات با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی بیان میکرو RNA‌ها که از نتایج آرایه به‌دست آمده‌است، حاصل می‌شود و مطالعه حاضر با استفاده از بانک اطلاعاتی miniRNA است [۱۸].

بررسی بیوانفورماتیکی چرخه PI3K/AKT

در گام بعدی میکرو RNA‌های کاندید از لحاظ هدف‌گیری در نرم‌افزارهای تجزیه و تحلیل چرخه ارزیابی شد. این نرم‌افزارها با استفاده از الگوریتم‌های پیش‌بینی یا نتایج تجربی قابلیت نشان دادن ژن‌هایی از چرخه PI3K/AKT که تحت تأثیر میکرو RNA‌های کاندید قرار می‌گیرد را به‌صورت گرافیکی دارد. برای این مرحله از مطالعه از نرم‌افزار DIANA-microT-CDS و نتایج تجربی miRPath v.2.0 استفاده شد و تک تک میکرو RNA‌ها هم با DIANA-TarBase v6.0 بررسی و نتایج حاصل روی چرخه PI3K/AKT نمایش داده شد [۱۹].

کشت رده‌های سلولی سرطان پروستات

رده‌های سلولی سرطان پروستات شامل LNCAP، PC3 و

بررسی به منظور یافتن میکروRNA مهار کننده مسیر PI3K/AKT

دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده می شود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود. در مرحله بعد جداسازی محلول رویی فاز آبی و انتقال آن به میکروتیوب جدید صورت گرفته و دو برابر حجم فاز آبی به آن اتانول ۱۰۰ درصد اضافه می شود. سپس به آرامی میکروتیوب را مخلوط کرده و برای یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار می گیرد. مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود و محلول رویی دور ریخته می شود و معمولاً در کف میکروتیوب رسوب سفیدرنگی دیده می شود. سپس یک میلی لیتر الکل ۷۰ درصد سرد به میکروتیوب اضافه شده و تا کنده شدن رسوب از ته لوله ورتکس می شود. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای خشک کردن سانتریفوژ می شود. بعد از آن محلول رویی دور ریخته شده و در حالی که درب لوله باز است ۱۰ دقیقه زمان داده می شود تا رسوب خشک شود. حدود ۳۰ میکرولیتر آب RNase-DNase free به میکروتیوب اضافه می شود.

cdNA سازی miRNAها

برای ساخت cdNA از First strand cdNA synthesis kit (Fermentas، لیتوانی) استفاده شد. ۵۰۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم از miRNA تخلیص شده را در هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر جداگانه، با ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر ۱ پیکومول Stem-Loop اختصاصی هر miRNA یا کنترل داخلی مخلوط کرده و حجم در هر تیوب به ۱۵ میکرولیتر رسانده می شود. درب لوله ها بسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در ترموسایکلر گذاشته می شود. سپس لوله ها فوراً در ظرف یخ گذاشته شده و ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) و ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase به آن افزوده شد. رونویسی معکوس با برنامه دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای غیر فعال کردن آنزیم انجام شد.

DU-145 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط (Gibco، آمریکا) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) به همراه ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco، آمریکا) کشت داده شد و پس از رسیدن به میزان مناسب (یک میلیون سلول) برای مرحله بعدی استفاده شدند. از طرف دیگر سه نمونه هایپرپلازی خوش خیم پروستات (Benign Prostatic Hyperplasia: BPH)، به عنوان کنترل با هم مخلوط شد و در مراحل بعدی استفاده شد.

طراحی آغازگر برای miRNAکاندید و کنترل داخلی

توالی miRNAهای انتخاب شده از miRBase (<http://www.mirbase.org>) به دست آمد و طراحی آغازگر (Primer) با استفاده از روش Stem Loop بر اساس کار محمدی یگانه و همکاران صورت گرفت [۲۰]. در این روش در مرحله اول با یک آغازگر RT (Reverse Transcription) اختصاصی cDNA سازی صورت می گیرد و در مرحله دوم با آغازگرهای رشته بالایی (Forward)، رشته پایینی Reverse و پروب (Probe) واکنش Real Time صورت می پذیرد. آغازگرها با استفاده از نرم افزار AlleleID 6 طراحی شدند و اختصاصیت هر آغازگر از طریق NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) تعیین شد. تمامی اولیگونوکلوئیدها توسط شرکت Metabion (آلمان) ساخته شد و توالی آغازگرها و پروب در جدول ۱ نشان داده شده است.

استخراج miRNA از سلولهای سرطان پروستات

در مرحله اول برای لیز سلولها به ازای هر ۱۰^۶ سلول رسوب داده شده ۱ میلی لیتر از RNXTM-Plus (سیناکلون، ایران) استفاده می شود. اگر در این مرحله توده سلولی ایجاد شد باید به مدت یک دقیقه ورتکس (Vortex) شود. بعد از ورتکس این مخلوط پنج دقیقه در دمای اتاق گذاشته می شود. به ازای هر ۱ میلی لیتر از RNXTM-Plus، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و ۱ دقیقه میکروتیوب به شدت تکان داده شد. سپس ۵ دقیقه در

Real Time PCR

آزمون Real Time PCR در ۱۰ میکرولیتر واکنش که شامل ۵ میکرولیتر از کیت PCR QuantiTect Probe (QIAGEN)، آلمان، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۱ میکرومولار از پروب، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۱/۶ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. تکثیر با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده با استفاده از یک دستگاه

Rotor-Gene6000 (Corbett Research، استرالیا) انجام شد. ژن SNORD47 (U47) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تمام واکنش‌ها در سه نسخه به همراه کنترل مثبت، کنترل منفی، کنترل بدون RT و کنترل بدون الگو انجام شد. نتایج حاصل برای تجزیه و تحلیل به نرم افزار REST 2009 (QIAGEN، آلمان) وارد شد و تجزیه و تحلیل‌های مربوط صورت گرفت.

جدول ۱ نتایج ۱۰ الگوریتم متفاوت پیش‌بینی برهمکنش خانواده miR-29 با ژن‌های مسیر PI3K/AKT

ژن	DIANAmt	miRanda	miRDB	miRWalk	RNAHybrid	PITA	mintarget2	PICTAR5	RNA22	Targetscan	مجموع
hsa-miR-29a-3p											
AKT2	×	×	×	×	×	×	×	×		×	۹
PDK1		×			×	×		×			۴
PDPK1		×			×	×		×		×	۵
PIK3CA					×						۱
RICTOR	×	×		×	×	×		×		×	۷
RPS6KB2	×	×		×	×	×		×	×	×	۸
hsa-miR-29b-3p											
AKT2	×	×	×	×	×	×		×		×	۸
PDK1		×			×	×		×			۴
PDPK1		×			×	×		×		×	۵
PIK3CA					×						۱
RICTOR	×	×		×	×	×		×		×	۷
RPS6KB2	×	×		×	×	×	×	×	×	×	۹
hsa-miR-29c-3p											
KT2	×	×	×	×	×	×	×	×		×	۹
PDK1		×			×	×		×			۴
PDPK1		×			×	×		×		×	۵
PIK3CA					×						۱
RICTOR	×	×		×	×	×		×		×	۷
RPS6KB2	×	×		×	×	×		×	×	×	۸

نتایج

بررسی‌های بیوانفورماتیکی هدف‌یابی ژن‌ها

ابتدا بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای یافتن میکروRNAهای مؤثر بر ژن‌های کاندید شده و به دست آوردن

میکروRNAهایی که تعداد بیشتری از ژن‌های کاندید را مورد هدف قرار می‌دهند، صورت گرفت. طبق روند معمول بررسی میکروRNAهای دخیل در تنظیم ژن‌ها، از اطلاعات ۱۰ الگوریتم پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکروRNAها در انتهای 3' UTR ژن‌ها استفاده شد. ژن‌ها در هر یک از الگوریتم‌ها وارد

بررسی های بیوانفورماتیکی بیان miRNA های کاندید

در گام اول بیان خانواده miR-29 در رده های سلولی سرطان پروستات نسبت به بافت پروستات سالم با استفاده از بانک اطلاعاتی miRNA بررسی شد. انتظار بر این بود که چون خانواده miR-29 طبق پیش بینی های صورت گرفته از روند سرطان جلوگیری می کند در رده های سلولی سرطان پروستات نسبت به بافت سالم بیان کمتری داشته باشد که برای همه خانواده miR-29 چنین اتفاقی نیفتاد و نتایج حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است.

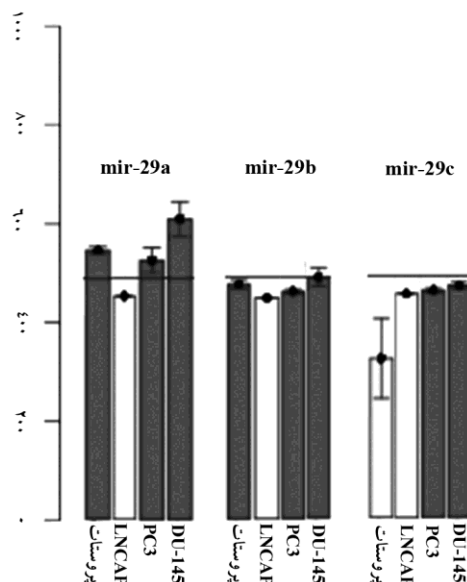
بررسی بیوانفورماتیکی چرخه PI3K/AKT

هر یکی از خانواده miR-29 از لحاظ هدف گیری در نرم افزار DIANA miRPath v.2.0 با الگوریتم های پیش بینی و نتایج تجربی ارزیابی قرار شد. نتایج حاصل از مجموعه خانواده miR-29 روی چرخه PI3K/AKT در شکل ۲ نمایش داده شده است.

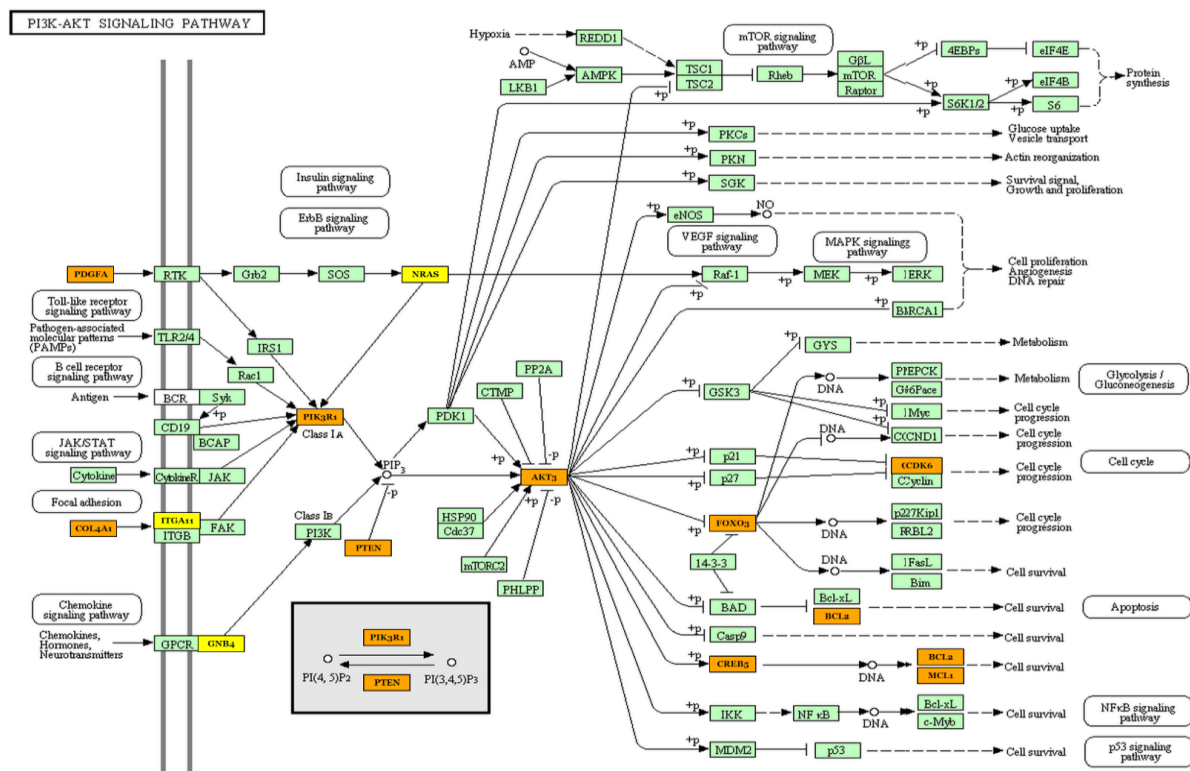
استخراج miRNA، سنتز cDNA و Real Time PCR

برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد نقش خانواده miR-29 در زمینه سرطان پروستات، بیان این میکروRNA ها در سلول های سرطان پروستات نسبت به نمونه کنترل BPH بررسی شد. بیان hsa-miR-29a-3p، hsa-miR-29b-3p و hsa-miR-29c-3p در رده های سلولی LNCAP، PC3 و DU-145 نسبت به نمونه کنترل BPH در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنی دار بیان خانواده miR-29 در سلول های سرطان پروستات در مقایسه با نمونه کنترل با (P-value < 0.001) است. به طور کلی نتایج حاصل از نقش بالقوه خانواده miR-29 در سلول های سرطانی پروستات پشتیبانی می کند.

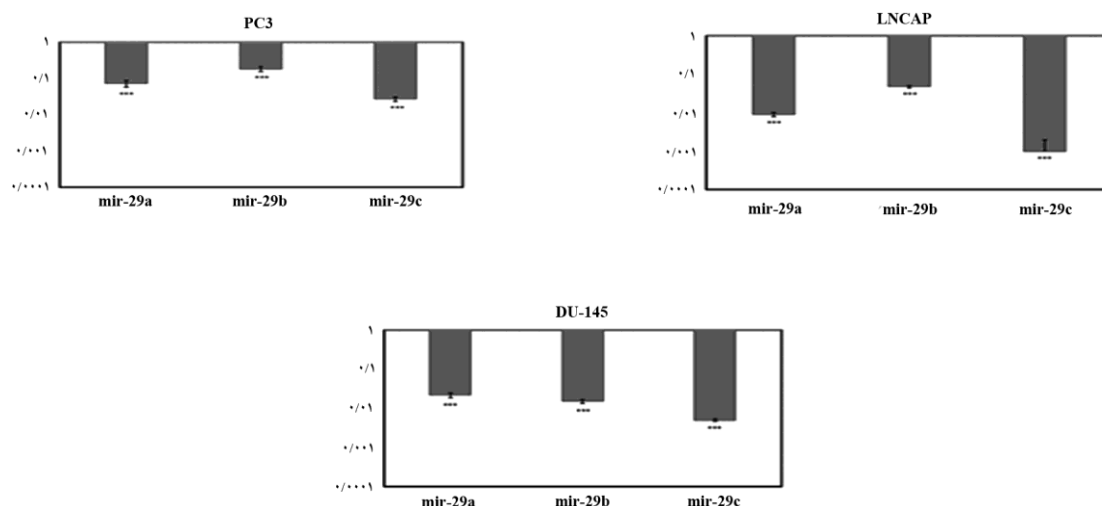
شد و میکروRNA هایی که قابلیت شناسایی انتهای 3' UTR ژن مربوط را دارد حاصل می شود. تمام ژن هایی که به عنوان کاندید در نظر گرفته شده است در هر یک از نرم افزار ارزیابی شده و اطلاعات میکروRNA ها و تعداد جایگاه های اتصال هر میکروRNA بر اساس هر الگوریتم در یک جدول EXCEL به ازای هر ژن ذخیره می شود. سپس اطلاعات فایل های اکسل مربوط به کلیه ژن ها با هم ترکیب شد و فایل بر اساس نام میکروRNA ها مرتب شد. در مرحله بعدی از مجموعه میکروRNA های به دست آمده مواردی مد نظر است که تعداد بیشتری از ژن های کاندید را شناسایی کند یا روی یک ژن تعداد جایگاه های اتصال بیشتری داشته باشد که طبق نتایج حاصل خانواده miR-29 شامل hsa-miR-29a-3p، hsa-miR-29b-3p و hsa-miR-29c-3p انتخاب شد. خلاصه بررسی برهمکنش های الگوریتم های مختلف برای خانواده miR-29 با ژن های مورد نظر در جدول ۱ آمده است.



شکل ۱ بیان miR-29a-3p، miR-29b-3p، miR-29c-3p در بافت پروستات و رده های سلولی سرطان پروستات LNCAP، PC3 و DU-145 که از پایگاه داده miRNA گرفته شده است.



شکل ۲ ژن‌هایی که با miR-29c-3p و miR-29b-3p، miR-29a-3p روی مسیر PI3K/AKT هدف‌یابی شده‌است با رنگ‌های زرد و نارنجی مشخص شده و این شکل از پایگاه داده Diana mirpath گرفته شده است.



شکل ۳ بیان miR-29a-3p، miR-29b-3p و miR-29c-3p در رده‌های سلولی LNCAP، PC3 و DU-145 که کلیه خانواده miR-29 در سه رده سلولی نسبت به نمونه کنترل کاهش بیان دارد. علامت (***) نشان دهنده P-value کمتر از ۰/۰۰۱ است.

بحث

بر طبق آمار آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer: IARC) در سال ۲۰۱۲، ۱۵ درصد از موارد جدید سرطان و ۶/۶ درصد از مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان در سراسر جهان به سرطان پروستات مربوط است [۱]. با توجه به میزان بالای شیوع این سرطان همراه با اثربخشی کم درمان‌های معمول، توسعه درمان‌های جدید که می‌تواند از تکثیر و تهاجم سرطان پروستات جلوگیری کند امری ضروری به نظر می‌رسد [۳]. یکی از روندهای تنظیمی ژن‌ها، میکرو RNAها است که امروزه امید زیادی برای استفاده آن‌ها به عنوان دارو است. توانایی متمایز میکرو RNAها برای کنترل چندین ژن و مسیر به طور هم‌زمان آن‌ها را کاندید قابل توجهی برای اهداف درمانی به خصوص در زمینه سرطان می‌کند [۱۵]. مطالعات مختلفی در مورد استفاده از میکرو RNAها برای مهار سرطان‌ها صورت گرفته که از جمله آن‌ها، لیو (Liu) و همکارانش نشان دادند که miR-34a می‌تواند تکثیر سلول‌های بنیادی سرطان پروستات را مهار و از گسترش بعدی و متاستاز (Metastasis) در مدل موشی بیماری جلوگیری کند [۲۱]. از طرف دیگر miR-34a به عنوان اولین میکرو RNA ضد سرطان است که در حال حاضر در مرحله اول کارآزمایی بالینی برای سرطان کبد است [۲۲]. چندین میکرو RNA دیگر نیز در مرحله توسعه برای روندهای بالینی است [۱۵].

شناسایی میکرو RNAهایی که می‌تواند مجموعه ژنی یا مسیر متابولیک را هدف‌گیری کند از گام‌های اساسی در استفاده از میکرو RNAها به عنوان مهار کننده هدفمند است که الگوریتم‌ها و پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک نقش کلیدی در این زمینه دارد [۱۶]. در مطالعات مختلف از ارزیابی‌های بیوانفورماتیک برای پیدا کردن میکرو RNA مناسب استفاده شده است که از جمله آن مطالعه هین (Heyn) و همکاران در زمینه بررسی بیوانفورماتیک برای مهار چرخه‌های دخیل در سرطان پانکراس است که در نهایت منجر به miR-548d شد.

بررسی به منظور یافتن میکرو RNA مهار کننده مسیر PI3K/AKT

این میکرو RNA چندین ژن دخیل در بیماری‌زایی سرطان پانکراس را هدف‌یابی می‌کند و افزایش بیان آن در سلول‌های سرطان پانکراس منجر به توقف چرخه سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود [۲۳]. مطالعات ژنتیکی و آزمایشگاهی متعدد نشان داده است که مسیر PI3K/AKT نقش اساسی در بیماری‌زایی سرطان پروستات دارد. به دلیل نقش اصلی این مسیر در پیشروی سرطان، مطالعات مختلفی برای مهار این چرخه صورت گرفته و راه‌کارهای متفاوتی به کار گرفته شده است تا داروهای جدید برای مهار انتقال پیام مسیر PI3K/AKT حاصل شود [۴، ۶]. برای پیدا کردن میکرو RNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT، شش ژن این مسیر که به عنوان هدف‌های دارویی برای درمان سرطان پروستات مطرح است، در ده الگوریتم متفاوت پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکرو RNAها در انتهای 3' UTR ژن‌ها، بررسی شد. خانواده miR-29 بیشترین شناسایی را از مجموعه ۶ ژنی مورد نظر بررسی حاضر داشتند که برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش بیان معنی‌دار خانواده miR-29 در رده‌های سلولی سرطان پروستات LNCAP، PC3 و DU-145 نسبت به نمونه کنترل سالم است. انتظار محققان حاضر این بود که خانواده miR-29 چون نقش ممانعت کننده از مسیر PI3K/AKT دارد در سلول‌های سرطانی نسبت به بافت پروستات سالم بیان کمتری داشته باشد که نتایج حاصل مؤید این انتظار است. دلیل استفاده از رده‌های سلولی سرطان پروستات متعدد در مطالعه به این دلیل است که از مراحل مختلف بیماری مشتق شده و دارای ویژگی‌های متمایز است. LNCAP از متاستاز سرطان پروستات به غدد لنفاوی، PC3 از متاستاز به استخوان و DU-145 از متاستاز به مغز جدا شده است. از لحاظ تومورزایی، رده سلولی PC3 دارای قدرت تومورزایی بالا بوده ولی رده‌های DU-145 و LNCAP از نظر قدرت تومورزایی متوسط و خیلی ضعیف است [۲۴]. با توجه به تفاوت‌های رده‌های سلولی سرطان پروستات و نتایج یکسان خانواده miR-29 در این سلول‌ها نشان دهنده نقش کلیدی این miR ها در روند بیماری‌زایی

با داشتن قابلیت تأثیر بر روندهای سلولی از طریق کنترل تنظیم بیان ژن نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند. میکروRNAها این قابلیت را دارد که به صورت همزمان بر تعداد زیادی از ژن‌ها و چرخه‌های سلولی مؤثر در یک روند تأثیر بگذارد و به نتایج بهتری نسبت به هدفگیری تنها یک ژن یا پروتئین خاص دست یابد [۳۲، ۱۵]. در این مطالعه برخی شواهد مبتنی بر تأثیرگذاری خانواده miR-29 بر مسیر PI3K/AKT وجود دارد و همچنین این miRها در رده‌های سلولی سرطان پروستات نسبت به کنترل سالم کاهش بیان نشان داد. در مجموع این نتایج نشان دهنده امکان استفاده از خانواده miR-29 برای مهار مسیر PI3K/AKT در سرطان پروستات است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط انستیتو پاستور ایران، تهران تأمین مالی شده است. نویسندگان از مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته برای ارایه پشتیبانی فنی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

سرطان پروستات است. همچنین در مطالعات دیگر کاهش بیان خانواده miR-29 در رده‌های سلولی سرطان پروستات و نمونه‌های بیماران نشان داده شده است [۲۵، ۲۶]. در بررسی که توسط لی (Li) و همکاران انجام شد متیله شدن پروموتور miR-29a در سرطان پروستات نشان داده شد که منجر به کاهش بیان miR-29a و جلوگیری از عملکرد ممانعت از تکثیر سلولی و تهاجم آن می‌شود [۲۷]. ملو (Melo) و همکاران نیز نقش ممانعت کننده miR-29b از متاستاز را نشان دادند [۲۸] و همچنین استیل (Steele) و همکاران در مطالعه‌ای عملکرد مهاری miR-29b بر رشد سلول‌های سرطان پروستات را نشان دادند [۲۹]. در مطالعه‌ای که توسط رو (Ru) و همکاران صورت گرفت نشان داده شد که miR-29b نقش جلوگیری از متاستاز را در رده سلولی PC3 دارد [۳۰]. مطالعه نیشیکاوا (Nishikawa) و همکاران هم مؤید عملکرد خانواده miR-29 در جلوگیری از مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی در سرطان پروستات است [۳۱].

استفاده از میکروRNAها در مهار بیماری‌ها یکی از استراتژی‌های جذاب برای ژن درمانی است و میکروRNAها

منابع

- [1] Ferlay J, SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. In: Cancer IAfRo, editor. 2013, Available at: globcan.iarc.fr/pages/references.asp%1
- [2] Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012; 61(6): 1079-92.
- [3] Lassi K, Dawson NA. Drug development for metastatic castration-resistant prostate cancer: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2011; 7(4): 551-8.
- [4] Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(15): 4799-805.
- [5] Maira SM, Furet P, Stauffer F. Discovery of novel anticancer therapeutics targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Future Med Chem* 2009; 1(1): 137-55.
- [6] Wu P, Hu YZ. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. *Curr Med Chem* 2010; 17(35): 4326-41.

- [7] Falasca M. PI3K/Akt signalling pathway specific inhibitors: a novel strategy to sensitize cancer cells to anti-cancer drugs. *Curr Pharm Des* 2010; 16(12): 1410-6.
- [8] Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(2): 237-49.
- [9] Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008; 27(41): 5511-26.
- [10] Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 2011; 676: 3-22
- [11] Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 2010; 11(7): 537-61.
- [12] Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010; 101(11): 2309-15.
- [13] Thieu W, Tilki D, deVere White RW, Evans CP. The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol* 2014; 32(5): 517-23.
- [14] Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussell S, Hamdy FC, Kallioniemi O, Mengual L, Schlomm T, Visakorpi T. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2011; 59(5): 671-81.
- [15] Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* 2011; 18(12): 1121-6.
- [16] Ritchie W, Rasko JE, Flamant S. MicroRNA target prediction and validation. *Adv Exp Med Biol* 2013; 774: 39-53.
- [17] Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes Cells* 2012; 17(1): 11-27.
- [18] Ritchie W, Flamant S, Rasko JE. mimiRNA: a microRNA expression profiler and classification resource designed to identify functional correlations between microRNAs and their targets. *Bioinformatics* 2010; 26(2): 223-7.
- [19] Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(Web Server issue): W498-504.
- [20] Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Mirab Samiee S, Soleimani M, Arefian E, Azadmanesh K, Mostafavi E, Mahdian R, Karimipour M. Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(5): 3665-74.
- [21] Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011; 17(2): 211-5.
- [22] Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet* 2012; 3: 120.
- [23] Heyn H, Schreek S, Buurman R, Focken T, Schlegelberger B, Begger C. MicroRNA miR-

- 548d is a superior regulator in pancreatic cancer. *Pancreas* 2012; 41(2): 218-21.
- [24] Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280(43): 36529-40.
- [25] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008; 27(12): 1788-93.
- [26] Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6130-5.
- [27] Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Dyson G, Sarkar FH. Epigenetic deregulation of miR-29a and miR-1256 by isoflavone contributes to the inhibition of prostate cancer cell growth and invasion. *Epigenetics* 2012; 7(8): 940-9.
- [28] Melo SA, Kalluri R. miR-29b moulds the tumour microenvironment to repress metastasis. *Nat Cell Biol* 2013; 15(2): 139-40.
- [29] Steele R, Mott JL, Ray RB. MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 2010; 1(4): 381-7.
- [30] Ru P, Steele R, Newhall P, Phillips NJ, Toth K, Ray RB. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(5): 1166-73.
- [31] Nishikawa R, Goto Y, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Sakamoto S, Fuse M, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. *Int J Oncol* 2014; 45(1): 401-10.
- [32] Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; 70(18): 7027-30.