**Original Article**

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

**Seyed Hamid Aghaee-Bakhtiari[1], Ehsan Arefian[2,3], Masoud Soleimani[4], Siamak Mirab Samiee[5], Farshid Noorbakhsh[6], 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

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 1-12



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

**مقاله اصیل**

# بررسی بیوانفورماتیکی به‌منظور یافتن میکروRNA مهار کننده مسیر PI3K/AKT و ارزیابی در رده‌های سلولی سرطان پروستات

**سید حمید آقایی بختیاری[1]، احسان عارفیان[2,3]، مسعود سلیمانی[4]، سیامک میراب سمیعی[5]، فرشید نوربخش[6]، رضا مهدیان[7*]، پژمان فرد اصفهانی[8**]**

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 یاخته، 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

دریافت مقاله: ۹۳/۰۴/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۸/۱۴

## 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 به‌دلیل نقش کلیدی این مسیر در پیشروی سرطان آن را به هدف جذابی برای استراتژی‌های جدید درمانی تبدیل می‌کند. یکی از روندهای تنظیمی ژن‌ها، میکروRNAها 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 میکروRNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT با روش‌های بیوانفورماتیکی و بررسی نتایج حاصل در سلول‌های رده پروستات انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** برای پیدا کردن میکروRNA 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 میکروRNA 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 میکروRNAهای کاندید در نمونه کنترل و رده‌های سلولی سرطان پروستات ارزیابی شد.

**نتایج:** خانواده miR-29 بیشترین شناسایی را از مجموعه ٦ 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**



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

## 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 ۳۰۷۴۷۱ 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 به‌کار 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 آبشار 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 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 به‌کار 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 میکرو RNA (microRNA: miRNA) است. میکرو RNAها مولکول‌های RNA کوچک (۲۲ نوکلئوتیدی) و تک رشته‌ای است که طی مکانیسم‌هایی از فرم pri-miRNA به pre-miRNA و در نهایت به میکرو RNA تبدیل می‌شود. میکرو RNAمکمل 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 میکرو RNA 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 میکرو RNA در روند آسیب‌شناسی این بیماری پی برده‌اند [۱۳، ۱۴]. هم‌اکنون شرکت‌های متعددی پروژه‌های عظیمی در راستای استفاده از میکرو RNAها 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 میکرو RNAها، پیداکردن میکرو RNA مناسب برای مهار مجموعه ژنی یا مسیر مورد نظر است. روندهای محاسباتی بیوانفورماتیکی ابزارهای مناسبی برای پیش‌بینی بهترین میکرو RNA است که ژن‌های مورد نظر یا مسیر پیام‌دهی را هدف‌یابی می‌کند. مبنای عملکرد این الگوریتم‌ها بر اساس تشابه توالی میکرو RNA و 3´UTR ژن‌های مورد نظر است و هر الگوریتم به ازای هر mRNA یا میکرو RNA تعداد



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

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 راه حل‌ها 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 به‌نظر 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 درنظر گرفته شد که در مطالعات قبلی اهمیت آن‌ها نشان داده شده بود. بررسی‌های بیو انفورماتیکی برای یافتن میکرو RNAهای مؤثر بر این ژن‌ها صورت گرفت که شامل AKT2، PDK1، PDPK1، RICTOR، PIK3CA و RPS6KB2 است. یکی از روندهای معمول بررسی میکرو RNAهای دخیل در تنظیم ژن‌ها، استفاده از اطلاعات الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکرو RNAها در انتهای 3´UTR ژن‌ها است که در این مطالعه الگوریتم‌ها عبارت از DIANAmT، miRanda، miRDB، miRWalk، RNAHybrid، PITA، mirtarget2، PICTAR5، RNA22 و Targetscan است [۱۶]. ژن مورد نظر در هر یک از این ده سایت ارزیابی می‌شود ودر 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 mimiRNA 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 miRPath v.2.0 استفاده شد و تک تک میکرو RNAها هم با الگوریتم پیش‌بینی DIANA-microT-CDS و نتایج تجربی نرم‌افزار 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



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

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 خوش‌خیم پروستات (Benign Prostatic Hyperplasia: BPH)، به‌عنوان 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) به‌دست 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 می‌گیرد و در مرحله دوم با آغازگرهای رشته بالایی (Forward)، رشته پایینی Reverse و پروب (Probe) واکنش Real Time صورت می‌پذیرد. آغازگرها با استفاده ازنرم‌افزار AlleleID 6 طراحی شدند و اختصاصیت هر آغازگر از طریق NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) تعیین شد. تمامی اولیگونوکلئوتیدها 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 $10^6$ سلول رسوب داده شده ۱ میلی‌لیتر از RNXTM-Plus (سیناکلون، ایران) استفاده می‌شود. اگر در این مرحله توده سلولی ایجاد شد باید به‌مدت یک دقیقه ورتکس (Vortex) شود. بعد از ورتکس این مخلوط پنج دقیقه در دمای اتاق گذاشته می‌شود. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر از RNXTM-Plus، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و ۱ دقیقه میکروتیوب به شدت تکان داده شد. سپس ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌شود. 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 سرد اضافه می‌شود. سپس به آرامی میکروتیوب را مخلوط کرده و برای یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. مجدداً به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌شود و محلول رویی دور ریخته می‌شود و معمولاً در کف میکروتیوب رسوب سفیدرنگی دیده می‌شود. سپس یک میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد سرد به میکرو تیوب اضافه شده و تا کنده شدن رسوب از ته لوله ورتکس می‌شود. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای خشک کردن سانتریفوژ می‌شود. بعد از آن محلول رویی دور ریخته شده و در حالی که درب لوله باز است ۱۰ دقیقه زمان داده می‌شود تا رسوب خشک شود. حدود۳۰ میکرولیتر آب RNase-DNase free به میکروتیوب اضافه می‌شود.

## cDNA سازی miRNAها

برای ساخت cDNA از First strand cDNA synthesis kit (Fermentas، لیتوانی) استفاده شد. ۵۰۰ نانوگرم تا ۱میکروگرم 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 می‌شود. درب لوله‌ها بسته و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر گذاشته می‌شود. سپس لوله‌ها فوراً در ظرف یخ گذاشته شده و ٤ میکرولیتر بافر ۵X، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase به آن افزوده شد. رونویسی معکوس با برنامه دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، ٤۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۵ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه برای غیر فعال کردن آنزیم انجام شد.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

## Real Time PCR

آزمون Real Time PCR در ۱۰ میکرولیتر واکنش که شامل ۵ میکرولیتر از کیت QuantiTect Probe PCR (QIAGEN، آلمان)، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۱ میکرومولار از پروب، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۱/٦ 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) به‌عنوان 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 نرم‌افزار 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 | mirtarget2 | PICTAR5 | RNA22 | Targetscan | مجموع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| hsa-miR-29a-3p | | | | | | | | | | | |
| *AKT2* | × | × | × | × | × | × | × | × | | × | ۹ |
| *PDK1* | | × | | | × | × | | × | | | ٤ |
| *PDPK1* | | × | | | × | × | | × | | × | ٥ |
| *PIK3CA* | | | | | | × | | | | | ۱ |
| *RICTOR* | × | × | | × | × | × | | × | | × | ۷ |
| *RPS6KB2* | × | × | | × | × | × | | × | × | × | ۸ |
| hsa-miR-29b-3p | | | | | | | | | | | |
| *AKT2* | × | × | × | × | × | × | | × | | × | ۸ |
| *PDK1* | | × | | | × | × | | × | | | ٤ |
| *PDPK1* | | × | | | × | × | | × | | × | ٥ |
| *PIK3CA* | | | | | | × | | | | | ۱ |
| *RICTOR* | × | × | | × | × | × | | × | | × | ۷ |
| *RPS6KB2* | × | × | | × | × | × | × | × | × | × | ۹ |
| hsa-miR-29c-3p | | | | | | | | | | | |
| *KT2* | × | × | × | × | × | × | × | × | | × | ۹ |
| *PDK1* | | × | | | × | × | | × | | | ٤ |
| *PDPK1* | | × | | | × | × | | × | | × | ٥ |
| *PIK3CA* | | | | | | × | | | | | ۱ |
| *RICTOR* | × | × | | × | × | × | | × | | × | ۷ |
| *RPS6KB2* | × | × | | × | × | × | | × | × | × | ۸ |

# نتایج

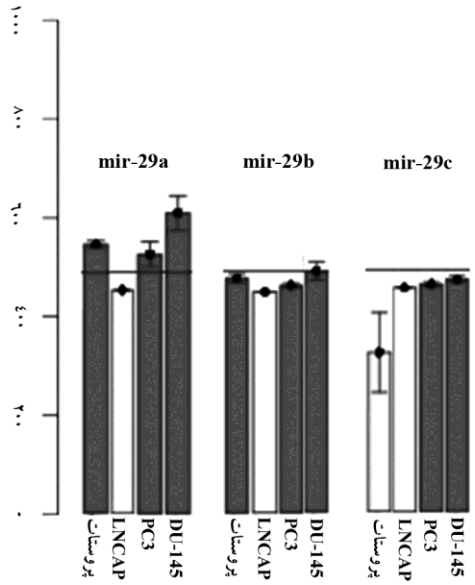
## بررسی‌های بیوانفورماتیکی هدف‌یابی ژن‌ها

ابتدا بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای یافتن میکرو RNAهای مؤثر بر ژن‌های کاندید شده و به‌دست آوردن میکرو RNAهایی که تعداد بیشتری از ژن‌های کاندید را مورد هدف قرار می‌دهند، صورت گرفت. طبق روند معمول بررسی میکرو RNAهای دخیل در تنظیم ژن‌ها، از اطلاعات ۱۰ الگوریتم پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکرو RNAها در انتهای 3´UTR ژن‌ها استفاده شد. ژن‌ها در هر یک از الگوریتم‌ها وارد



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

شد و میکروRNAهایی که قابلیت شناسایی انتهای 3´UTR ژن مربوط را دارد حاصل می‌شود. تمام ژن‌هایی که به‌عنوان کاندید در نظر گرفته شده است در هر یک از نرم‌افزار ارزیابی شده و اطلاعات میکروRNAها و تعداد جایگاه‌های اتصال هر میکروRNA بر اساس هر الگوریتم در یک جدول EXCEL به ازای هر ژن ذخیره می‌شود. سپس اطلاعات فایل‌های اکسل مربوط به کلیه ژن‌ها با هم ترکیب شد و فایل بر اساس نام میکروRNAها مرتب شد. در مرحله بعدی از مجموعه میکروRNAهای به‌دست آمده مواردی مد نظر است که تعداد بیشتری از ژن‌های کاندید را شناسایی کند یا روی یک ژن تعداد جایگاه‌های 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 برهمکنش‌های الگوریتم‌های مختلف برای خانواده miR-29 با ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ آمده است.




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

## بررسی های بیوانفورماتیکی بیان miRNAهای کاندید

در گام اول بیان خانواده miR-29 در رده‌های سلولی سرطان پروستات نسبت به بافت پروستات سالم با استفاده از بانک اطلاعاتی mimiRNA بررسی شد. انتظار بر این بود که چون خانواده miR-29 طبق پیش‌بینی‌های صورت گرفته از روند سرطان جلوگیری می‌کند در رده‌های 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

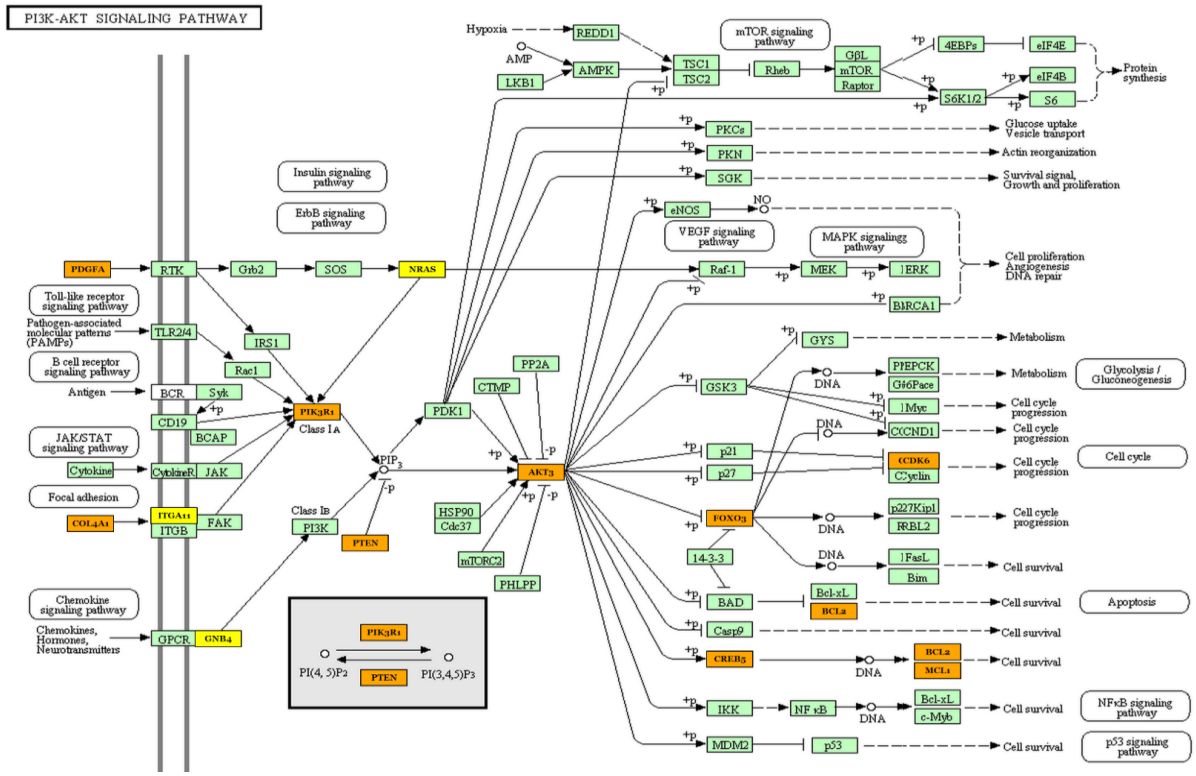
هر یکی از خانواده miR-29 از لحاظ هدف‌گیری در نرم‌افزار DIANA miRPath v.2.0 با الگوریتم‌های پیش‌بینی و نتایج تجربی ارزیابی قرار شد. نتایج حاصل از مجموعه خانواده miR-29 روی چرخه PI3K/AKT در شکل ۲ نمایش داده شده است.

## استخراج miRNA، سنتز cDNA و Real Time PCR

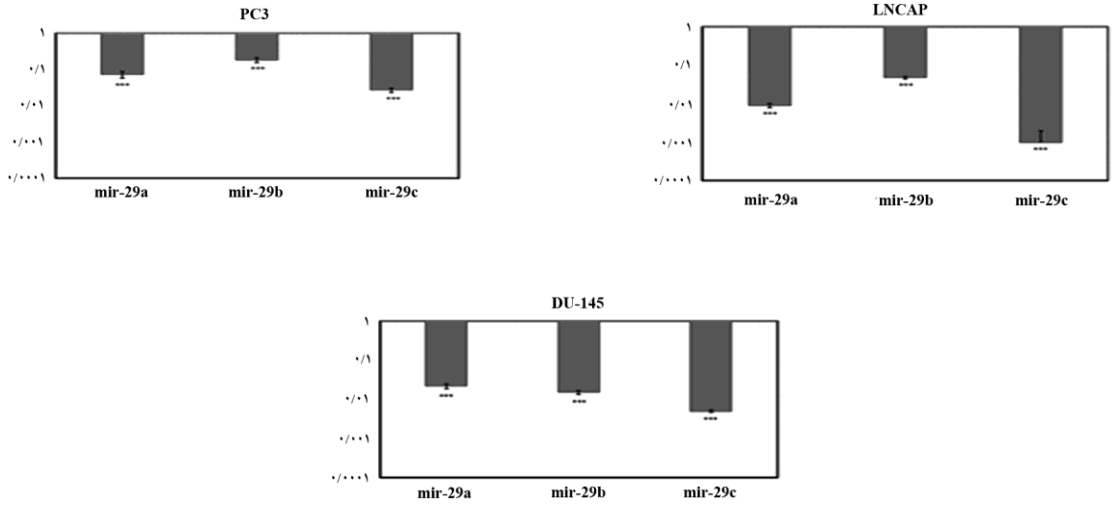
برای به‌دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد نقش خانواده miR-29 در زمینه سرطان پروستات، بیان این میکروRNAها در سلول‌های سرطان پروستات نسبت به نمونه کنترل BPH بررسی شد. بیان hsa-miR-29a-3p، hsa-miR-29b-3p و hsa-miR-29c-3p در رده‌های سلولی LNCAP، PC3 و DU-145 نسبت به نمونه کنترل BPH در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنی‌دار بیان خانواده miR-29 در سلول‌های سرطان پروستات در مقایسه با نمونه کنترل با (P-value<۰/۰۰۱) است. به‌طور کلی نتایج حاصل از نقش بالقوه خانواده miR-29 در سلول‌های سرطانی پروستات پشتیبانی می‌کند.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]




**شکل ۲** ژن‌هایی که با miR-29a-3p، miR-29b-3p و miR-29c-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.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

## 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 ٦/٦ 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 به‌نظر می‌رسد [۳]. یکی از روندهای تنظیمی ژن‌ها، میکرو RNAها است که امروزه امید زیادی برای استفاده آن‌ها به‌عنوان دارو است. توانایی متمایز میکروRNAها برای کنترل چندین ژن و مسیر به‌طور هم‌زمان آن‌ها را کاندید قابل توجهی برای اهداف درمانی به‌خصوص در زمینه سرطان می‌کند [۱۵]. مطالعات مختلفی در مورد استفاده از میکروRNAها 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 به‌عنوان اولین میکروRNA ضد سرطان است که در حال حاضر در مرحله اول کارآزمایی بالینی برای سرطان کبد است [۲۲]. چندین میکروRNA دیگر نیز در مرحله توسعه برای روندهای بالینی است [۱۵].

شناسایی میکروRNAهایی که می‌تواند مجموعه ژنی یا مسیر متابولیک را هدف‌گیری کند از گام‌های اساسی در استفاده از میکروRNAها به‌عنوان مهار کننده هدفمند است که الگوریتم‌ها و پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک نقش کلیدی در این زمینه دارد [١٦]. در مطالعات مختلف از ارزیابی‌های بیوانفورماتیک برای پیدا کردن میکروRNA مناسب استفاده شده است که از جمله آن مطالعه هِن (Heyn) و همکاران در زمینه بررسی بیوانفورماتیکی برای مهار چرخه‌های دخیل در سرطان پانکراس است که در نهایت منجر به miR-548d شد. این میکروRNA 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 به‌کار گرفته شده است تا داروهای جدید برای مهار انتقال پیام مسیر PI3K/AKT حاصل شود [٤، ٦]. برای پیدا کردن میکروRNA مؤثر بر مسیر PI3K/AKT، شش ژن این مسیر که به‌عنوان هدف‌های دارویی برای درمان سرطان پروستات مطرح است، در ده الگوریتم متفاوت پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال میکروRNAها در انتهای 3´UTR ژن‌ها، بررسی شد. خانواده miR-29 بیشترین شناسایی را از مجموعه ٦ 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 متاستار به استخوان و DU-145 از متاستار به مغز جدا شده‌است. 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 [٢٤]. 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



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

سرطان پروستات است. همچنین در مطالعات دیگر کاهش بیان خانواده miR-29 در رده‌های سلولی سرطان پروستات و نمونه های 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 وتهاجم 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 میکرو RNAها در مهار بیماری‌ها یکی از استراتژی های جذاب برای ژن درمانی است و میکرو RNAها با داشتن قابلیت تأثیر بر روندهای سلولی از طریق کنترل تنظیم بیان ژن نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند. میکرو RNAها این قابلیت را دارد که به‌صورت 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 [۱۵، ۳۲]. در این مطالعه برخی شواهد مبتنی بر تأثیرگذاری خانواده miR-29 بر مسیر PI3K/AKT وجود دارد و همچنین این miR ها 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.

## 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, Availabe at: globcan.iarc.fr/pages/references.aspx/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.



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

[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, Fussel 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, Karimipoor 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, Beger C. MicroRNA miR-



[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]

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.

[ Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-02-07 ]