

## piRNA های دارای افتراق بیان در سلول های سرطان سینه

مریم عابدی<sup>۱</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۲\*</sup>

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

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹

### چکیده

سرطان سینه شایع ترین سرطان زنان می باشد که علی رغم پیشرفت های علمی زیاد همچنان علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان محسوب می شود. برای حل این معضل جهانی به مطالعات مولکولی عمیق تری در حوزه سرطان سینه نیاز است. امروزه، نقش piRNA ها به عنوان تنظیم کننده بیان ژن ها در سرطان های مختلف مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. در این مطالعه هدف ما شناسایی piRNA های مهم درگیر در سرطان سینه و ژن های هدف آنها می باشد. برای این منظور، داده های RNA small seq خام مربوط به نمونه های 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  $p \leq 0.05$ ,  $\log_2 FC \geq 2$  به دست آمد که ۱۹۱ عدد افزایش بیان و ۱۸۱ عدد کاهش بیان معنی دار را نشان دادند. بیشترین افزایش مربوط به hsa-piR-33125 می باشد که هدف آن GATAD2A است و در پروسه های سرطان زایی از قبیل توسعه عروق خونی، آپوپتوز، تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی و ... نقش دارد. بیشترین کاهش مربوط به hsa-piR-33073 با  $\log_2 FC = -4.20$  می باشد. پیدا کردن لیستی از piRNA های مهم که افتراق بیان معنی دار در سرطان سینه نسبت به بافت نرمال دارند و همچنین مشخص کردن افزایش و یا کاهش بیان آنها در بافت سرطانی و تشخیص ژن های هدف و بررسی نقش آنها در مسیرهای بیولوژیکی دخیل در توسعه و پیشرفت سرطان، می تواند آغازگر مطالعاتی باشد که در نهایت منجر به پیشرفت در پژوهش های سرطان سینه و روش های درمانی شود.

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

## ۱- مقدمه

سرطان سینه یک مشکل عمده بهداشت عمومی است که زنان را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می دهد. این سرطان، شایع ترین سرطان تشخیص داده شده و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان، در سطح جهان محسوب می شود [۱]. سرطان سینه در سراسر جهان با نرخ های متفاوتی رخ می دهد و کشورهای غربی نسبت به کشورهای شرقی نرخ بروز بیشتری دارند. با این حال، 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].

مطالعه ی RNA های برهمکنش کننده با PIWI (piRNAs) در سرطان سینه به دلیل نقش بالقوه آنها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام، پیش آگهی و همچنین پتانسیل آنها به عنوان اهداف درمانی برای درمان سرطان بسیار مهم است. piRNA ها دسته ای از RNA های کوچک غیر کدکننده هستند که در فرایندهای بیولوژیکی مختلف از جمله تنظیم ژن، خاموش کردن اپی ژنتیکی و خاموش کردن ترانسپوزون ها نقش دارند [۲]. در زمینه سرطان نشان داده شده است که piRNA ها نقش مهمی در توسعه و پیشرفت بیماری دارند [۳]. مطالعات piRNA ها در زمینه ی سرطان سینه نشان داده است که این مولکول ها با جنبه های مختلف سرطان سینه از جمله تکثیر سلول های تومور، آپوپتوز، مهاجم و متاستاز مرتبط هستند. از نظر تکثیر سلولی تومور، piRNA ها در تنظیم پیشرفت چرخه سلولی و تقسیم سلولی نقش دارند. به عنوان مثال، نشان داده شده است که که piR-651 تکثیر سلولی و مهاجرت را در سلول های سرطان سینه تقویت می کند [۴]. از سوی دیگر، piR-17458 تکثیر سلولی را در سلول های سرطان سینه مهار می کند و عامل القای آپوپتوز در این سلول ها می باشد [۵].

پتانسیل piRNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص و پیش آگهی سرطان سینه قابل توجه است. به عنوان مثال، اخیراً در یک مطالعه گزارش شده است که piR-651 در سرم های انسانی و بافت های سرطانی جامد، مانند سرطان سینه، معده و ریه بیش از حد بیان می شود و می تواند به عنوان نشانگر زیستی به کار رود [۶]. علاوه بر این، piRNA ها دارای پتانسیل درمانی در سرطان سینه نیز می باشند. به عنوان مثال، piRNA-36712 به عنوان 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 می کند و منجر به سرکوب بیان SEPW1 می شود که به نوبه خود بر بیان ژن های دخیل در تکثیر، مهاجم و مهاجرت سلول های سرطانی تاثیر می گذارد. علاوه بر این، piRNA-36,712 می تواند اثرات برخی از عوامل شیمی درمانی را در درمان سرطان سینه افزایش دهد [۷]. بنابراین، با توجه به این واقعیت که piRNA ها در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی مختلف مرتبط با سرطان، از جمله تنظیم بیان ژن، سیگنال دهی سلول به سلول، مرگ و بقای سلول، تکثیر، مهاجرت، مهاجم، متاستاز و چرخه سلولی نقش دارند، اهمیت مطالعه آنها در زمینه سرطان روز به روز افزایش می یابد.

در این مطالعه، به مقایسه بیان piRNA 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 معنی داری را نشان می دهند دست یابیم. به طور خلاصه، مطالعه piRNA ها در سرطان سینه به دلیل پتانسیل آنها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام، پیش آگهی و همچنین به عنوان اهدافی بالقوه برای درمان بسیار مهم است. با این حال، مطالعات بیشتری برای درک کامل نقش piRNA ها

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

## ۲- مواد و روش ها

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

در این مطالعه، برای شناسایی piRNA های دارای بیان افتراقی در سرطان سینه از داده های 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 مورد 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 توالی یابی high-throughput باشد.

با جستجو در پایگاه داده GEO، مطالعه ای که دارای داده های high-throughput در مورد piRNA در سرطان سینه باشد یافت نشد. بنابراین، تصمیم گرفته شد از مطالعاتی که حاوی داده های small RNA seq باشند استفاده شود. داده های توالی یابی small RNA شامل تمام انواع small RNA از جمله piRNA نیز می شود. 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 داده ها ارزیابی شد تا مطالعه ای با بالاترین کیفیت داده ها برای ادامه مطالعه انتخاب شود. برای ارزیابی کیفیت داده ها و انتخاب مطالعه ای با بالاترین کیفیت از نرم افزار FastQC استفاده شد.

### ۲-۲ معیارهای FastQC برای کنترل کیفیت داده ها

۱- Per-base sequence quality: این شاخص میانگین کیفیت هر پایه را در دنباله اندازه گیری می کند. نمره کیفیت بالاتر نشان می دهد که پایه به احتمال زیاد دقیق است.

۲- Per-base N content: این شاخص درصد بازهای ناشناخته (N) را در توالی اندازه گیری می کند. درصد بالاتری از N می تواند نشان دهنده کیفیت توالی ضعیف باشد.

۳- Sequence duplication levels: این شاخص تعداد توالی های یکسان در مجموعه داده را اندازه گیری می کند. سطح بالای تکرار می تواند نشان دهد که داده ها کاملاً تصادفی نیستند.

۴- Adapter content: این شاخص درصد توالی هایی را اندازه گیری می کند که شامل دنباله های آداپتور هستند (مانند آداپتورهای Illumina). درصد بالایی دنباله های آداپتور می تواند نشان دهد که داده ها به درستی از آداپتور پاک نشده اند.

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

۶- Sequence length distribution: این شاخص توزیع طول توالی در مجموعه داده را اندازه گیری می کند. توزیع اریب، می تواند نشان دهد که برخی از توالی ها کوتاه یا ناقص هستند.

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

### ۳-۲ آنالیز بیوانفورماتیکی داده ها

برای آنالیز داده ها، از پایگاه داده آنالیز Galaxyuse استفاده شد که یک پلتفرم باز و مبتنی بر وب برای تحقیقات زیست پزشکی با داده های دارای حجم بالا می باشد. به همین منظور، مجموعه داده های مطالعات انتخاب شده به Galaxyuse وارد شدند و کنترل کیفیت اولیه داده ها توسط نرم افزار FastQC انجام شد. مطالعات دارای داده های RNA-Seq با کیفیت ضعیف از مطالعه ای ما

حذف شدند. در نهایت، مجموعه داده‌های مطالعه‌ی GSE117452 که دارای با کیفیت‌ترین داده‌های 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 داده‌های خام انجام شد: ۱- کیفیت خوانش‌های RNA-Seq با استفاده از نرم افزار FastQC بررسی شد. ۲- نرم افزار trimgalore برای برش آداپتور و حذف سوگیری‌های ناخواسته از داده‌های RNA-Seq استفاده شد. ۳- بار دیگر کنترل کیفیت بر روی خروجی‌های trimgalore با استفاده از نرم افزار FastQC انجام شد. ۴- از نرم افزار HISAT2 برای تراز کردن خوانش‌های RNASeq (فایل fastq) بر روی ژنوم مرجع انسانی (نسخه hg38) استفاده شد (فرمت فایل خروجی BAM می‌باشد). ۵- فایل annotation (فرمت GTF) برای piRNA ها از پایگاه داده piRNA (piRNAdb) دریافت شد و به Galaxy وارد شد. ۶- برای شمارش خوانش‌های تراز شده از نرم افزار htseq-count استفاده شد. ۷- در نهایت شمارش‌ها توسط نرم افزار DESeq2 نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل انجام شد.

## ۲-۴ تجزیه و تحلیل نتایج

در این بخش سطوح بیان piRNA ها بین بافت سرطانی و بافت طبیعی مقایسه و مشخص شد. استانداردهای ما برای ارزیابی تغییرات بیان piRNA ها  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 2$  و  $p \leq 0.05$  بود. در نهایت با آنالیز بیوانفورماتیکی، لیستی از piRNA ها با تغییرات بیانی کاهشی یا افزایشی در بافت سرطان سینه نسبت به بافت طبیعی سینه به دست آمد و همچنین با استفاده از piRNAdb، هدف‌های 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 به دلیل کمبود تعداد نمونه‌ها و برخی دیگر به دلیل 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 ۶۸ نمونه است که ۵۸ نمونه از بافت سرطان سینه و ۱۰ نمونه از بافت نرمال سینه می‌باشد.

### ۳-۲ پردازش داده‌ها

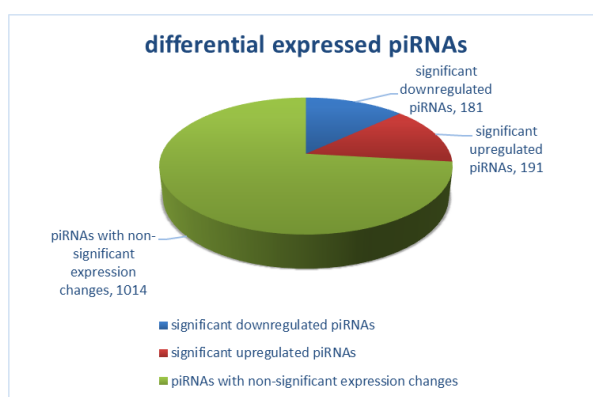
داده‌های خام این مطالعه شامل توالی‌یابی RNA های کوچک است که برای ادامه‌ی مطالعه از پایگاه داده GEO استخراج شد. ابتدا داده‌ها با فرمت fastq در پلتفرم Galaxy وارد و سازماندهی شدند. سپس، کیفیت آنها با استفاده از FastQC بررسی شد. تمام پارامترهای FastQC از لحاظ بررسی کیفیت داده‌ها مناسب بود؛ اما داده‌ها دارای آداپتور Illumina Universal بودند که در مرحله‌ی بعد با استفاده از نرم افزار trimgalore بریده شد و حذف شد. این نرم افزار 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. به طور متوسط توزیع داده‌ها از لحاظ طول توالی بین ۵۰-۲۰ نوکلئوتید بود. سپس، این داده‌ها بر روی ژنوم hg38 انسان با استفاده از نرم افزار 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

بعد، piRNA ها بر اساس معیار آماری ( $p < 0.05$ ) فیلتر شد و ۳۷۲ عدد piRNA با بیان افتراقی معنی‌دار به دست آمد. بر اساس  $\text{Log}_2 \text{FC}$ ، 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 piRNA های دارای افتراق بیان (افزایش یا کاهش یافته) را به خوبی نشان می‌دهد (شکل ۲).

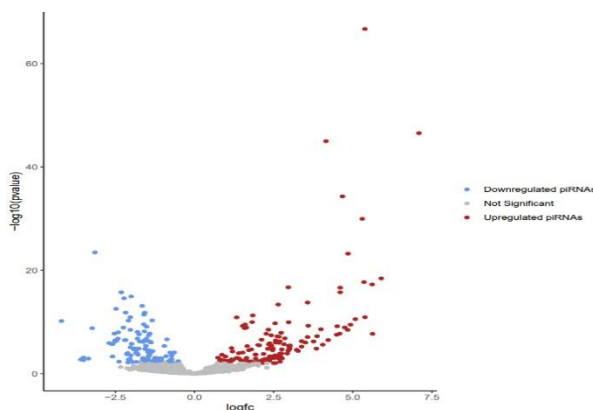
تراز شده که به صورت فایل BAM بود با استفاده از نرم افزار htseq-count شمارش شد.

### ۳-۳ آنالیز بیان piRNA ها و یافتن piRNA های دارای بیان افتراقی در سرطان سینه

در مرحله آخر، برای پیدا کردن piRNA های دارای بیان افتراقی در سرطان سینه نسبت به کنترل نرمال از نرم‌افزار DEseq2 استفاده شد. DEseq2 به ما نتایجی ارائه داد که ۱۳۸۶ عدد piRNA با بیان افتراقی معرفی کرد. در مرحله



شکل ۱ بیان افتراقی piRNA ها در بافت سرطان سینه در مقایسه با بافت نرمال. piRNA هایی که دارای  $\text{Log}_2 \text{FC}$  مثبت هستند، بیان افزایشی را نشان می‌دهند و piRNA ها با  $\text{Log}_2 \text{FC}$  منفی بیان کاهش را نشان می‌دهند. همه آنها دارای  $p \leq 0.05$  هستند.



شکل ۲ تفکیک piRNA های دارای افزایش و کاهش بیان بر اساس  $p$ -value و  $\text{Log}_2 \text{FC}$ ، حد آستانه برای  $p$ -value و  $\text{Log}_2 \text{FC}$  به ترتیب ۰،۰۵ و ۰ در نظر گرفته شده است.

بیشتر بود. بالاترین میزان افزایش بیان مربوط به hsa-piR-33125 بود، با  $\text{Log}_2 \text{FC} = 7.09$ ، که نشان دهنده افزایش تقریباً ۱۴ برابری این piRNA در سلول‌های سرطان سینه

از بین ۱۹۱ عدد piRNA دارای افزایش بیان در سرطان سینه، بر اساس معیار  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 2$ ، ۹۷ عدد piRNA به دست آمد که بیان آنها در سرطان سینه تقریباً ۱۴-۴ برابر

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 پروسه‌های 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  $\text{Log}_2 \text{FC} = -4.20$  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 piRNA های دارای  $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -2$  که بیان آنها به صورت معنی‌دار در سرطان سینه کاهش یافته و هدف‌های آنها در piRNadb معرفی شده است در جدول ۲ آورده شده است.

| هدف                         | Log2 FC | piRNA         | هدف          | Log2 FC | PiRNA         |
|-----------------------------|---------|---------------|--------------|---------|---------------|
| MAST2,SLC39A12              | ۲,۶۹    | hsa-piR-32933 | GATAD2A      | ۷,۰۹    | hsa-piR-33125 |
| TTN                         | ۲,۶۶    | hsa-piR-9198  | miR183       | ۵,۳۰    | hsa-piR-32997 |
| ZHX1                        | ۲,۶۶    | hsa-piR-33042 | FAM104A      | ۴,۹۲    | hsa-piR-33199 |
| ZNF3                        | ۲,۶۴    | hsa-piR-32836 | DHX33        | ۴,۸۵    | hsa-piR-33198 |
| miR452,COL5A2               | ۲,۴۷    | hsa-piR-32872 | TRPC2        | ۴,۶۰    | hsa-piR-33093 |
| GPR155,ZNF683               | ۲,۴۶    | hsa-piR-30274 | IKZF3,PACRGL | ۴,۶۰    | hsa-piR-33134 |
| C2orf15,HIST2H2BF           | ۲,۳۷    | hsa-piR-1727  | APOB         | ۴,۵۰    | hsa-piR-33154 |
| HIST1H2BJ                   | ۲,۳۷    | hsa-piR-20895 | SPACA6P-AS   | ۴,۱۵    | hsa-piR-11119 |
| CTSB                        | ۲,۳۱    | hsa-piR-12582 | FLJ30901     | ۳,۸۶    | hsa-piR-32368 |
| CRAT                        | 7۲,۲    | hsa-piR-32847 | HES7         | ۳,۷۵    | hsa-piR-28104 |
| LINC00317                   | ۲,۲۴    | hsa-piR-27306 | NEFL         | ۳,۵۹    | hsa-piR-28400 |
| GABRA4                      | ۲,۲۳    | hsa-piR-24154 | SIKE1        | ۳,۵۰    | hsa-piR-32889 |
| EED,RNY3,QRFPR              | ۲,۱۷    | hsa-piR-33046 | SPACA6P-AS   | ۲,۹۷    | hsa-piR-11120 |
| LINC00317                   | ۲,۱۱    | hsa-piR-32938 | ZCWPW2       | ۲,۷۴    | hsa-piR-32888 |
| DNAJC27,TUBB1,<br>LINC01976 | ۲,۰۰    | hsa-piR-11015 | PWRN2        | ۲,۷۰    | hsa-piR-33011 |

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

(همه piRNA ها دارای  $\text{log}_2 \text{FC} \geq 2$  و  $p \leq 0.05$  می‌باشند).

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

جدول ۲ piRNA های دارای بیان کاهش یافته در سرطان سینه نسبت به کنترل نرمال و هدف های بالقوه آنها (تمام piRNA ها دارای  $\text{Log2 FC} \leq -2$  و  $p \leq 0.05$  می باشند).

#### ۴- بحث و نتیجه گیری

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی نقش مهمی در زمینه های مختلف تحقیقات زیست پزشکی به ویژه در مطالعات رونویسی ایفا می کند. از روش هایی مانند توالی یابی RNA (RNA-Seq) و میکروآرای برای شناسایی ژن های دارای افتراق بیان استفاده می شود. تجزیه و تحلیل بیان افتراقی می تواند نقش مهمی در درک رویدادهای مولکولی درگیر در پروسه های مختلف از قبیل رشد [۹]، پاسخ به درمان بیماری ها [۱۰] و همچنین بیماری زایی ایفا کند.

با مقایسه نمودارهای بیان ژن در انواع مختلف سلول یا مراحل رشد، پژوهشگران می توانند شبکه های پیچیده تنظیم کننده ژنی را کشف کنند که رشد جنینی، تشکیل اندام و پاتوژنز بیماری را هماهنگ می کنند. به عنوان مثال، نجفی در مطالعه ای ابتدا، از داده های توالی RNA BrainSpan برای به دست آوردن ژن های دارای افتراق بیان بین دو مرحله از رشد استفاده کرد و سپس، فرایندهای بیولوژیکی مربوطه و مسیرهای پیام رسانی را با تجزیه و

تحلیل غنی سازی مجموعه ژن استنتاج کرد [۹]. این نوع آنالیز در مورد سرطان نیز می تواند نقایص مولکولی خاص بیماری را تشخیص دهد و اهداف بالقوه ای را برای مطالعات بیشتر در زمینه راهبردهای درمانی شخصی و پیش بینی پیش آگهی در سرطانهای مختلف ارائه کند.

امروزه piRNA ها به دلیل نقش مهم و مؤثر آنها در انواع سرطانها و بیماری ها مورد توجه تحقیقات مولکولی قرار دارند و مطالعات در این زمینه روز به روز در حال افزایش است. در ابتدا به دلیل اینکه این مولکول ها برای اولین بار در سلول های رده زایا شناسایی شده بودند، دانشمندان به دنبال کشف نقش آنها در این نوع سلول ها بودند. اما با مطالعات بیشتر، مشخص شد piRNA ها علاوه بر سلول های رده زایا، در سلول های سوماتیک نیز بیان می شوند. بنابراین، دانشمندان در صدد کشف اهمیت و نقش بیشتر و متنوع تری برای این مولکول ها برآمدند.

امروزه، نقش برخی از piRNA ها در انواع مختلف سرطانها و بیماری ها ثابت شده است. به عنوان مثال، نقش

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 piRNA به صورت پس از ترجمه با هدف قرار دادن پروتوکاده‌ترین ۹ (PCDH9)، که به عنوان مهار کننده تومور عمل می‌کند، بیان آن را کاهش داده و نقش انکوژنی در سرطان پروستات ایفا می‌کند [۱۲].

علاوه بر این، piRNA در سایر بیماری‌ها نیز نقش دارند. مطالعه‌ای با توالی‌یابی RNAهای کوچک نشان داد که ۵۶۴ عدد piRNA با بیماری‌های مغزی انسان و ۴۵۱ عدد piRNA با بیماری آلزایمر مرتبط است [۱۳]. نقش piRNAهای مختلف در بیماری‌هایی همچون پارکینسون، رتینیت پیگمنتوزا، ناباروری مردان و... نیز مشخص شده است [۱۴]. همچنین، ثابت شده است که می‌توان از piRNAها به عنوان 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 به طور قابل توجهی در سرم بیماران سرطانی در مقایسه با افراد سالم بیان متفاوت دارند و بر اساس سطوح piR-28876 و 5937، تمایز بین بیماران سرطانی و افراد سالم با حساسیت و ویژگی بالا امکان‌پذیر بود [۱۵].

یک پژوهش بر روی piRNAهای مشتق شده از اگزوزوم های سرم خونی که دارای بیان افتراقی در کارسینوما سلول کبدی نسبت به سلول‌های نرمال هستند، ۵ عدد piRNA با پتانسیل بیومارکر بودن را برای این بیماری را معرفی کرده است [۱۶].

با توجه به آشکار شدن روزافزون نقش و اهمیت piRNAها در 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 به دست 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 ۴۶ عدد piRNA دارای  $\text{Log F} \geq 2$  و هدف مشخص رسیدیم که ۳۰ عدد دارای افزایش بیان و ۱۶ 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 هدف‌های آنها، می‌توان به نقش احتمالی آنها در پروسه‌های بیولوژیکی و مسیرهای پیام رسانی احتمالی پی برد. به عنوان مثال، نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی برای hsa-piR-24828 با  $\text{Log}_2 \text{FC} = -2.22$  حدود ۴ 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 RNAهای کوچک منجر به مهار رشد قابل توجهی در سلول‌های سرطان سینه SKBR3 می‌شود [۱۷]. با ترکیب نتایج این مطالعه و یافته‌های ما، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این small RNA تنظیم‌گر می‌تواند hsa-piR-24828 باشد و از آنجایی که 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



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*.

بر عملکرد ضد آپوپتوز، CFLAR همچنین یک واسطه مهم برای رشد تومور است و سطح بالای بیان CFLAR با تومور تهاجمی تر ارتباط دارد [۱۸]. بر اساس نتایج مطالعه ما، CFLAR به عنوان هدف برای hsa-piR-1510 معرفی شده است و این piRNA حدود ۵ برابر کاهش بیان در بافت سرطان سینه نسبت به نرمال نشان می دهد. بنابراین، انتظار می رود که هدف آن افزایش بیان نشان دهد و موجب رشد و پیشرفت سرطان شود. مشابه این نتیجه گیری ها را می توان برای اغلب piRNA ها و هدف های بالقوه معرفی شده برای آنها انجام داد و این خود می تواند دریچه ای رو به مطالعات بیشتر و دقیق تر در این زمینه باز کند و با مشخص شدن 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.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی ویژه خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تهران ابراز می کنند.

##### 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-382<sup>o</sup>-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

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.

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 17 $\beta$ -HSD12, the 3-ketoacyl-CoA reductase of long-chain fatty acid synthesis, on

# Differentially expressed piRNAs in breast cancer cells

Maryam Abedi<sup>1</sup>, Majid Sadeghizadeh<sup>1\*</sup>

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  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 2$ ,  $p \leq 0.05$ , 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  $\text{Log}_2 \text{FC} = -4.20$ . 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