

Co-Expression and MicroRNA Regulatory Network Integration in Metastatic Prostate Tumor Using Microarray Expression Data Analysis

Mehdi Sadeghi¹, Mohammad Reza Ganjalikhani², Bijan Ranjbar^{1*}

¹Department of Biophysics,
Faculty of Biological
Sciences, Tarbiat Modares
University, Tehran, Iran.

²Department of Biology,
Faculty of Sciences,
University of Isfahan,
Isfahan, Iran.

*Corresponding Author:
Bijan Ranjbar, Department
of Biophysics, Faculty of
Biological Sciences, Tarbiat
Modares University, Tehran,
Iran.

Email:
ranjbarb@modares.ac.ir

Received: 13 Mar, 2016

Accepted: 9 May, 2016

Abstract

Background and objectives: Prostate cancer is one of the most prevalent cancer in men which shows high heterogeneity in genetic and pathological features. Elucidating the regulatory relationships between microRNAs and mRNAs can help to identification of gene regulatory patterns in metastatic prostate cancer.

Methods: In the present study prostate cancer patient's expression data (gene and microRNA) was used to study gene interactions in metastatic prostate tumor. Weighted gene co-expression network have been implemented for gene clustering and finding gene modules correlation with biochemical recurrence free survival variable. Differentially expressed microRNA gene targets were obtained from experimentally validated and prediction based databases and alongside with gene and microRNA expression, Pearson correlations measurements were implemented to constructing microRNA regulatory network.

Results: Two significant modules were detected in co-expressed modules significant analysis for biochemical recurrence free variable. One of them involved in cell cycle regulation and cell proliferation pathways which are hallmark pathways of progressed cancers. Integration of gene co-expression network with microRNA regulation network shows, first: MicroRNAs target pathways which involved in the progression of prostate cancer to metastatic stage, and second: introduce several key factors including microRNA and genes.

Conclusion: Present study revealed more details on key functional components in prostate cancer development. These details may provide opportunities for the development of alternative therapeutic approaches.

Keywords: Prostatic Neoplasms; Gene expressions; MicroRNA; Gene regulatory networks.

یک پارچه سازی شبکه هم بیان ژنی و شبکه تنظیمی microRNA در تومور بدخیم پروستات با آنالیز داده های بیانی میکرواری

مهدی صادقی^۱، محمدرضا گنجعلی خانی^۲، بیژن رنجبر^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پروستات از جمله سرطان های شایع میان مردان است که ناهمگونی بسیار بالایی را در ویژگی های ژنتیکی و پاتولوژیکی از خود نشان می دهد. توضیح روابط تنظیمی بین mRNA و microRNA می تواند به شناسایی الگوی تنظیم بیان ژن در سرطان پروستات بدخیم کمک کند. در این مطالعه یک پارچه سازی شبکه هم بیان ژنی و شبکه تنظیمی microRNA در تومور بدخیم پروستات با آنالیز داده های بیانی میکرواری بررسی گردید.

روش بررسی: در مطالعه حاضر از داده های بیانی (ژن و microRNA) بیماران مبتلا به سرطان پروستات، به منظور بررسی شبکه اندرکنش ژنی تومور بدخیم پروستات استفاده شد. شبکه هم بیان ژنی وزن دار برای گروه بندی ژن ها و یافتن گروه های ژنی که همبستگی قابل توجهی با متغیر زمان عود بیوشیمیایی بیماری دارند، به کار برده شد. هدف های ژنی microRNA های با تفاوت بیان از پایگاه های داده مبتنی بر پیشگویی و شواهد آزمایشگاهی گردآوری شد. با تلفیق آن با نتایج همبستگی پیرسون داده های بیانی ژن و microRNA، شبکه تنظیمی microRNA به دست آمد.

یافته ها: دو گروه ژنی با همبستگی بالا با زمان عود بیوشیمیایی شناسایی شدند. یکی از این دو در مسیرهای تنظیم و تقسیم چرخه سلولی درگیر شده که جزء مسیرهای مشخصه سرطان است. تلفیق شبکه هم بیان با شبکه تنظیمی microRNA نشان داد اولاً این microRNA ها، مسیرهایی را هدف قرار می دهند که در بدخیم شدن تومور پروستات نقش دارند و دوماً چندین عنصر کلیدی شامل microRNA و ژن را معرفی می کنند.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر، جزئیات بیشتری از اجزای عملکردی کلیدی که باعث بدخیم شدن تومور پروستات می شوند به دست آمد. این جزئیات ممکن است فرصت های جدیدی را برای توسعه روش های جایگزین درمانی فراهم کند.

کلید واژه ها: سرطان پروستات؛ بیان ژن؛ میکرو آر ان آ؛ شبکه های تنظیمی ژن.

^۱گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

بیژن رنجبر، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
ranjbarb@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sadeghi M, Ganjalikhani MR, Ranjbar B. Co-expression and microRNA regulatory network integration in metastatic prostate tumor using microarray expression data analysis. Qom Univ Med Sci J 2017;11(7):98-116. [Full Text in Persian]

مقدمه

سرطان پروستات جزء بیماری‌های شایع در میان مردان، به‌خصوص در جوامع توسعه‌یافته است (۱). از مشخصه‌های بارز این بیماری، ناهمگونی زیاد در مشخصات ژنتیکی آن و عدم همبستگی این مشخصات با علائم کلینیکی و پاتولوژیکی بیماری می‌باشد (۲). تعداد زیادی ژن به‌عنوان ژن‌های دخیل در سرطان پروستات گزارش شده‌اند. برخی از این ژن‌ها در پاره‌ای از مطالعات به‌عنوان ژن‌های مهارشده و در بعضی دیگر به‌عنوان ژن‌های القا شده گزارش شده‌اند. برای روشن شدن این تناقض‌ها در گزارش‌ها، درک مکانیسم‌ها و فرآیندهای سلولی که عامل این تناقض‌ها هستند؛ زیست‌شناسی سامانه‌ای می‌تواند بسیار کارآمد باشد. ژنتیک سامانه‌ای شامل روش‌هایی است که تأکید بر استفاده از شبکه‌ها برای توصیف ارتباط بین ترنسکرپتوم، خصوصیات فیزیولوژیکی و مارکرهای ژنتیکی دارد.

نمونه‌ای از این روش‌ها، شبکه‌های ژنی هم‌بیان وزن‌دار (Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA) هستند (۳). این روش با تمرکز بر گروه‌های ژنی هم‌بیان به جای ژن‌های انفرادی بر مشکلات ناشی از آنالیز اطلاعات میکرواروی مرسوم غلبه می‌کند. همچنین به جای مرتبط کردن هزاران ژن به یک متغیر پاتولوژیکی خاص، در این روش همبستگی چند گروه (Module) یا ابرژن (Metagene) با آن متغیر بررسی می‌شود که معمولاً ژن‌های هر گروه در یک مسیر بیولوژیکی خاص درگیر هستند.

پیشرفت‌های ابزاری که در تولید داده‌های توان بالا در سطوح مختلف بیولوژیکی صورت گرفته است، امکان به دست آوردن دید جامع بر فنوتیپ‌های بیولوژیکی پیچیده مانند سرطان پروستات را فراهم می‌کند. رابطه تنظیمی بسیار نزدیکی بین سطح بیان ژن و microRNA وجود دارد. microRNAها توالی‌های کوتاه (۲۲ نوکلئوتیدی) و غیرکدشونده RNA هستند که با اتصال به توالی مکمل خود روی mRNA پس از نسخه‌برداری باعث تجزیه آن شده و یا مانع ترجمه آن به پروتئین می‌شوند. microRNAها در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر، تقسیم و تمایز سلولی، پیام‌رسانی سلولی و آپوپتوز نقش دارند، بنابراین، برهم خوردن تنظیم آنها باعث بروز بیماری‌ها و ناهنجاری‌های مختلف

می‌شود. برهم خوردن تنظیم microRNAها با توجه به اینکه در مهار اونکوژن‌ها (Oncogene) و ژن‌های مهارکننده تومور نقش دارند باعث ورود سرطان به مراحل پیشرفته می‌شود (۴،۵).

فاکتورهای رونویسی و microRNAها، تنظیم‌کننده‌های کلیدی فرآیند تنظیم بیان ژن هستند که می‌توانند بیان ژن‌های هدف خود را به‌صورت هماهنگ تنظیم کنند (۶،۷). برهم خوردن تعادل در این شبکه تنظیمی که می‌تواند با عملکرد نادرست عوامل تنظیم‌شونده، تنظیم‌کننده و یا هر دو اتفاق بیافتد، باعث بروز بیماری‌های مختلف می‌شود (۸). یک پارچه‌سازی شبکه اندرکنش ژنی و شبکه تنظیم microRNA، در درک مسیرهای مهم بیولوژیکی، ژن‌ها و microRNAهای تأثیرگذار در این مسیرها که در فرآیند ایجاد فنوتیپ مورد بررسی درگیرند، سودمند است. در این مطالعه داده‌های بیانی ژن و microRNA استخراج شده از بیماران مبتلا به سرطان پروستات در دو فاز خوش‌خیم و بدخیم، مورد استفاده قرار گرفت. برای به دست آوردن گروه‌های ژن هم‌بیان در سرطان بدخیم نیز از آنالیز شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار استفاده شد.

از بین گروه‌های شناسایی‌شده، دو گروه آبی و سیاه در تنظیم تقسیم سلولی و چرخه سلولی نقش دارند که همبستگی بالایی با متغیر پاتولوژیکی زمان عود بیوشیمیایی بیماری دارد. ژن‌های موجود در این دو گروه از لحاظ اهمیت پاتولوژیکی و ساختار شبکه مورد جستجو قرار گرفت و برای هر کدام از گروه‌ها چند ژن کلیدی معرفی گردید، سپس شبکه تنظیم microRNA برای تومور بدخیم پروستات به دست آمد و اثر آن بر تنظیم بیان ژن، در تومور بدخیم و ارتباط آن با گروه‌های هم‌بیان ژنی مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج جالب توجه این است که اهداف هر کدام از microRNAها در گروه‌های هم‌بیان مشابهی قرار دارند؛ بدین معنا که اهداف ژنی در مسیر بیولوژیکی یکسانی قرار دارند. در این مطالعه آنالیز ساختار شبکه تنظیمی microRNA چندین ژن و microRNA به‌عنوان ژن‌های کلیدی در تومور بدخیم پروستات معرفی گردید که می‌توانند به‌عنوان اهداف درمانی جدید در سرطان پروستات مورد بررسی قرار گیرند.

روش بررسی

داده‌های میکروآرای استفاده‌شده در این مطالعه از پایگاه داده GEO به دست آمد (با شماره دسترسی GSE 21032). از مجموع ۲۱۸ نمونه موجود در این مجموعه داده که از بیماران مبتلا به سرطان پروستات استخراج شد؛ ۹۸ نمونه تومور خوش‌خیم، ۱۳ نمونه تومور بدخیم و ۲۸ نمونه مربوط به بافت سالم پروستات (مجموعاً ۱۳۹ نمونه) دارای پروفایل‌های بیان ژن و microRNA بودند.

پروفایل بیان ژن به‌وسیله پلتفرم Affymetrix Human Exon 1.0 ST و پروفایل بیان microRNA به‌وسیله پلتفرم Agilent 019118 Human RNA Microarray 2.0 G4470B اندازه‌گیری شد.

آنالیزهای آماری و محاسبات انجام‌شده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار R نسخه ۳ انجام گرفت. پیش پردازش آرایه اگزونی (Exon array) (تصحیح پس‌زمینه، نرمالیزاسیون و خلاصه‌سازی) با استفاده از پکیج aroma.affymetrix در نرم‌افزار R انجام شد (۹). داده‌های بیانی پردازش‌شده microRNA، مقادیر بیانی برای ۳۷۵ microRNA منحصر به فرد را در خود دارد. آنالیز برای شناسایی ژن‌ها و microRNAهایی با تفاوت بیان با استفاده از مدل برازش خطی (Linear regression) که در پکیج limma در نرم‌افزار R وجود داشت انجام شد (۱۰). از پکیج Limma از آماره t -statistics برای مقایسه مقادیر بیانی ژن و microRNA در گروه بدخیم نسبت به خوش‌خیم استفاده گردید. ژن‌ها و microRNAها با مقدار قدر مطلق (Log Fold Change, LFC) بیشتر از ۰/۵ و مقدار $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان ژن و microRNA با تفاوت بیان انتخاب شد. از روش تصحیح

BH (Benjamini-Hochberg) نیز برای آنالیز نتایج آزمون آماره تی و کاهش نتایج مثبت کاذب استفاده گردید.

تفسیر لیست ژن پس از آزمون آماری انجام گرفت. پکیج Gage نرم‌افزار R برای تفسیر لیست ژن‌ها با تفاوت بیان، با استفاده از مسیرهای بیولوژیکی KEGG و فعالیت‌های بیولوژیکی GO انجام شد (۱۱-۱۳). آزمون آماری هایپرژئومتریکی (Hypergeometric) و تصحیح نتایج با استفاده از روش BH

صورت گرفت و از حد آستانه ۰/۰۵ برای شناسایی مسیرهای بیولوژیکی KEGG و GO استفاده گردید. همچنین افزونه BiNGO از نرم‌افزار Cytoscape، برای شناسایی فرآیندهای بیولوژیکی GO مهم و نمایش گرافیکی این فرآیندهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

برای شناسایی گروه‌های ژنی، از شبکه ژنی هم‌بیان وزن‌دار (Weighted Gene Co-expression Network) استفاده شد (۳). مشخصه اصلی شبکه‌های ژنی هم‌بیان، فاقد-مقیاس (Scale free) بودن آنها، به‌خصوص توزیع لگاریتمی درجه (تعداد اتصالات یک گره به گره‌های دیگر) در این شبکه‌ها می‌باشد (۱۵): اگر k نشان‌دهنده درجه یک گره باشد، احتمال اینکه یک گره جدید در شبکه دارای درجه k باشد $p(k)$ (به‌ازای مقادیر خاصی از β) برابر $k^{-\beta}$ خواهد بود.

برای محاسبه ماتریس مشابهت از رابطه زیر استفاده گردید:

$$|S_{ij}| = \frac{1 + \text{Cor}(i,j)}{2}$$

S_{ij} نشان‌دهنده مشابهت اندازه‌گیری‌شده و $\text{Cor}(i,j)$ نشان‌دهنده همبستگی پیرسون بین دو ژن i و j است.

میزان مجاورت برای شبکه وزن‌دار برای هر کدام از جفت ژن‌ها با رساندن مقادیر مشابهت هر کدام از آنها به توان β قابل محاسبه است.

$$a_{ij} = |S_{ij}|^{\beta}$$

روش کار به این صورت است که مقادیری برای β تعریف کرده و شبکه‌هایی براساس این مقادیر β ساخته می‌شود. این شبکه‌های به‌دست‌آمده از لحاظ معیار و فاقد مقیاس بودن بررسی می‌شوند. هر مقدار از توان β که این معیار را برآورده کند برای ادامه مراحل انتخاب می‌شود. مقدار β انتخاب‌شده باید حداقل این فاکتورها را برای شبکه برآورده کند:

$$R^2 > ۰/۸ - ۱$$

۲- بیشینه میانگین درجه در شبکه؛

۳- شیب خط برازش برای نمودار $\log_{10}(p(k))$ در برابر $\log_{10}(k)$ باید تقریباً برابر ۱- باشد.

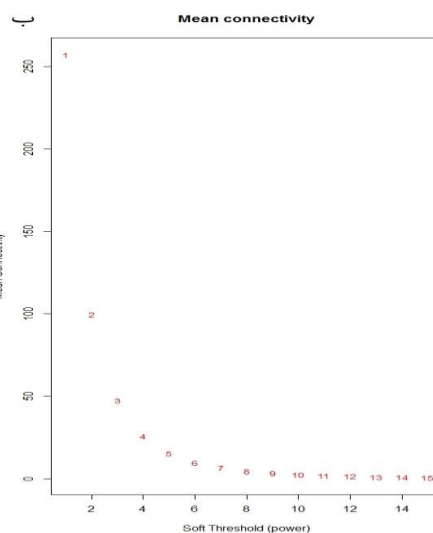
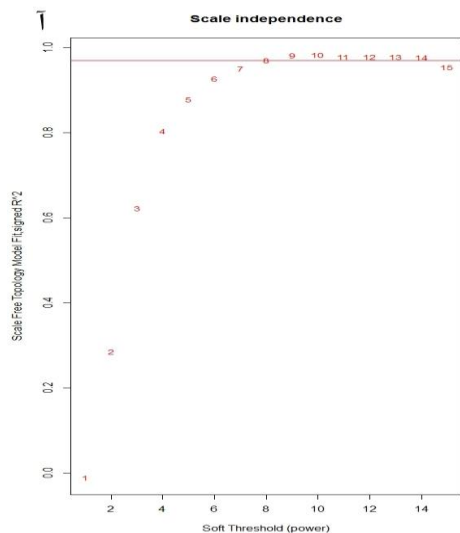
برای نمونه‌های سرطان پروستات مورد بررسی، توان β و فاکتورهای مهم گفته‌شده مطابق جدول شماره ۱ به دست آمد.

جدول شماره ۱. پارامترهای مورد بررسی برای انتخاب توان β مناسب برای ساخت شبکه هم‌بازنی وزن‌دار.

Power	R.square	slope	mean.k.	median.k.	max.k.
۱	۰/۰۱۰	۰/۲۹۷	۲۵۷/۰۲۴	۲۵۲/۹۵۸	۳۶۷/۸۴۸
۲	۰/۲۸۵	۰/۹۲۴	۹۹/۵۶۸	۹۴/۳۶۳	۱۹۵/۱۸۰
۳	۰/۶۲۲	۱/۲۶۴	۴۷/۵۰۳	۴۳/۳۵۶	۱۲۲/۵۳۲
۴	۰/۸۰۳	۱/۴۶۵	۲۵/۸۵۳	۲۲/۲۴۸	۸۴/۷۷
۵	۰/۸۷۸	۱/۵۴۵	۱۵/۴۳۳	۱۲/۳۷۷	۶۲/۴۵۰
۶	۰/۹۲۷	۱/۶۱۱	۹/۸۷۱	۷/۲۵۲	۴۸/۱۶۹
۷	۰/۹۵۱	۱/۶۳۴	۶/۶۶۱	۴/۴۶۴	۳۸/۳۶۱
۸	۰/۹۷۰	۱/۶۳۶	۴/۶۹۰	۲/۸۶۶	۳۱/۳۰۴
۹	۰/۹۸۱	۱/۶۲۷	۳/۴۲۰	۱/۹۳۸	۲۶/۰۴۲
۱۰	۰/۹۸۳	۱/۶۲۱	۲/۵۶۶	۱/۲۹۰	۲/۰۰۷

شکل شماره ۱، توان ۷ به‌عنوان مقدار مناسب برای β تعیین شد.

برای حصول نتایج قابل قبول، حد آستانه برای شاخص برازش برابر ۰/۹۵ در نظر گرفته شد و با این حد آستانه با توجه به



شکل شماره ۱: در شکل نمودار الف) محور عمودی شاخص برازش R^2 و محور افقی توان‌های (β) مختلف استفاده شده را نشان می‌دهد.

حد آستانه ۰/۹۵ برای انتخاب توان در نظر گرفته شده که با خط افقی قرمز مشخص است.

نمودار ب) میانگین اتصالات در محور عمودی و توان در محور افقی را نشان می‌دهد.

میانگین اتصالات فاکتور دیگری است که در انتخاب توان مورد استفاده برای ایجاد شبکه باید در نظر گرفته شود.

به‌طور اختصاصی همپوشانی توپولوژیکی بین دو ژن i و j با رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\omega_{ij} = \frac{l_{ij} + a_{ij}}{\min\{k_i, k_j\} + 1 - a_{ij}}$$

L_{ij} ، نشان‌دهنده تعداد گره‌هایی است که دو گره i و j به آن متصل هستند و a_{ij} نشان‌دهنده سایر گره‌های شبکه می‌باشد.

$$l_{ij} = \sum_{u=i,j} a_{iu}a_{uj}$$

شناسایی گروه‌ها در شبکه: از دیدگاه مطالعه شبکه، گروه‌ها مجموعه‌ای از ژن‌ها بوده که دارای الگوهای مشابهی از اتصالات به سایر ژن‌ها در شبکه هستند. به بیان اختصاصی‌تر، گروه‌ها مجموعه‌ای از ژن‌ها هستند که دارای همپوشانی توپولوژیکی (Topological overlap) بالایی می‌باشند. یک جفت از ژن‌ها، می‌توانند همپوشانی توپولوژیکی بالایی داشته باشند؛ در صورتی که هر دو آنها به گروه یکسانی از ژن‌ها متصل باشند.

ماتریس همپوشانی توپولوژیکی

(Topological Overlap Matrix, TOM) با مقادیر ω_{ij} برای همه گره‌ها در یک ماتریکس متقارن، نشان داده می‌شود. مقادیر ω_{ij} شامل مقادیری بین ۰ و ۱ است. با استفاده از خوشه‌بندی سلسله مراتبی (Hierarchical clustering) و براساس عدم تشابه (Dissimilarity)، بین ژن‌ها یک درخت خوشه‌ای سلسله مراتبی {دندروگرام (Dendrogram)} به دست می‌آید که شاخه‌های این درخت، نشان‌دهنده گروه‌های ژنی می‌باشد. برای تعیین گروه‌ها نیز از فاکتورهای مانند میزان عدم تشابه و کمینه تعداد گره‌ها در یک گروه استفاده می‌شود.

ژن‌های کلیدی: ژن‌هایی هستند که دارای اتصالات داخل گروهی زیادی می‌باشند:

$$K_i = \sum_{j=1}^n a_{ij} \quad i, j \in \text{Module } q$$

K_i برابر تعداد اتصالات ژن i و a_{ij} : برابر مقدار مجاورت بین ژن‌های i و j می‌باشد.

برای وارد کردن پارامترهای پاتولوژیکی در شبکه هم‌بیان، کمیت ارزش ژنی (Gene significance) تعریف می‌شود.

$GS_i^{(T)} = |\text{cor}(x_i, T)|^\beta$
ارزش ژنی برای ژن i یعنی $GS_i^{(P)}$ برابر همبستگی بین پروفایل بیانی ژن i و پارامتر پاتولوژیکی T به توان β (همان مقداری است که از آن برای ساخت شبکه هم‌بیان استفاده می‌شود).

پارامتر خارجی مورد استفاده‌شده، زمان عود بیوشیمیایی (BioChemical Recurrence) بیماری پس از درمان اولیه بوده که به ماه محاسبه می‌شود.

با محاسبه این دو پارامتر برای همه ژن‌های داخل گروه و قراردادن یک حد آستانه برای هر دوی این پارامترها؛ ژن‌هایی که هم اتصالات زیاد داخل گروهی دارند و هم از لحاظ پارامتر پاتولوژیکی خارجی دارای اهمیت هستند به‌عنوان ژن‌های کلیدی انتخاب می‌شوند.

آنالیز شبکه تنظیمی microRNA با توجه به حد آستانه تعیین‌شده، ۱۷۹ microRNA دارای تفاوت بیان هستند. MirTarbase داده‌های مربوط به اهداف ژنی microRNAها را که با استفاده از شواهد آزمایشگاهی تأیید شده‌اند، در خود

دارند (۱۶)، miRanda و TargetScan نیز داده‌های مربوط به اهداف ژنی microRNA را که با استفاده از الگوریتم‌های پیشگویی به دست آمده، در خود دارند (۱۷، ۱۸). از این پایگاه‌های داده بر خط، برای شناسایی اهداف ژنی ۱۷۹ microRNA شناسایی شده، استفاده می‌شود. سپس از بین این ژن‌های هدف شناسایی شده، آنهایی که در بین ژن‌های با تفاوت بیان برای سرطان پروستات هستند، انتخاب می‌شوند. با توجه به اثر مهارکنندگی microRNA بر ژن‌های هدف، انتظار می‌رود بین سطوح بیان ژن و microRNA، همبستگی منفی وجود داشته باشد. همبستگی پیرسون بین سطوح بیانی microRNAها و ژن‌هایی که در مرحله قبل شناسایی شده بودند محاسبه گردید (جفت‌های تنظیمی microRNA و ژن که همبستگی پیرسون کمتر از ۴- و pvalue کوچکتر از ۰/۰۵ داشته باشند به‌عنوان جفت تنظیمی قابل توجه در نظر گرفته می‌شود).

برای یافتن ژن‌های مهم در شبکه تنظیمی microRNA، این شبکه برای یافتن موتیف‌های ساختاری مورد جستجو قرار گرفت، برای جستجوی موتیف‌ها از یکی از افزونه‌های نرم‌افزار Cytoscape به نام NetMatch استفاده شد. سپس برحسب تعداد دفعات حضور هر ژن یا microRNA در موتیف‌های یافته‌شده، ژن‌ها و microRNAهای مهم شبکه استخراج شدند (۱۹، ۲۰).

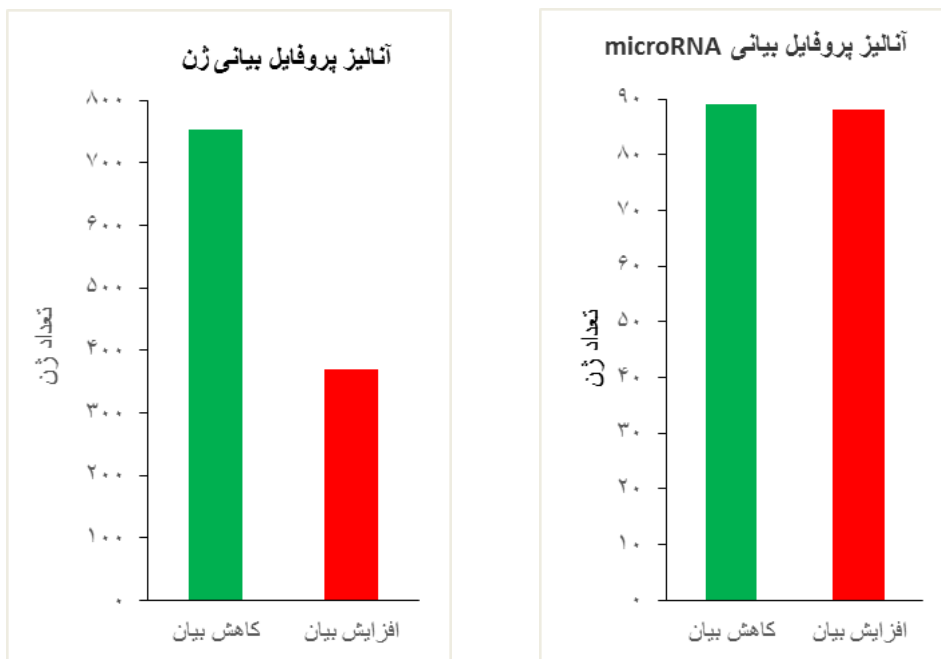
یافته‌ها

در تومور بدخیم پروستات با توجه به معیارهای در نظر گرفته‌شده، ۱۰۰۸ ژن نسبت به تومور خوش خیم دچار تفاوت بیان شدند که از این مقدار ۳۷۰ ژن، افزایش بیان و ۷۵۴ ژن، کاهش بیان از خود نشان دادند (شکل شماره ۲).

برای تفسیر ژن لیست به‌دست آمده، از پکیج Gage نرم‌افزار R استفاده شد. این نرم‌افزار فرآیندها و مسیرهای بیولوژیکی فعال شده و مهارشده را براساس پایگاه‌های داده GO و KEGG در اختیار قرار می‌دهد. براساس نتایج حاصل، مسیرهای درگیر در تقسیم سلولی، چرخه سلول و تقسیم DNA، افزایش فعالیت داشتند و مسیرهای درگیر در چسبندگی سلول، سازمان‌یابی ماتریکس خارج سلولی، تمایز سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی، به‌ویژه آنهایی که در پاسخ به محرک‌های رشد (Cytokine) درگیر بودند (مانند

آنالیز پروفایل بیانی microRNA نشان داد در تومور بدخیم پروستات، ۱۷۷ microRNA نسبت به تومور خوش خیم دارای تفاوت بیان معنی داری هستند که از این مقدار، ۸۸ مورد فعال و ۸۹ مورد مهار شدند (شکل شماره ۲).

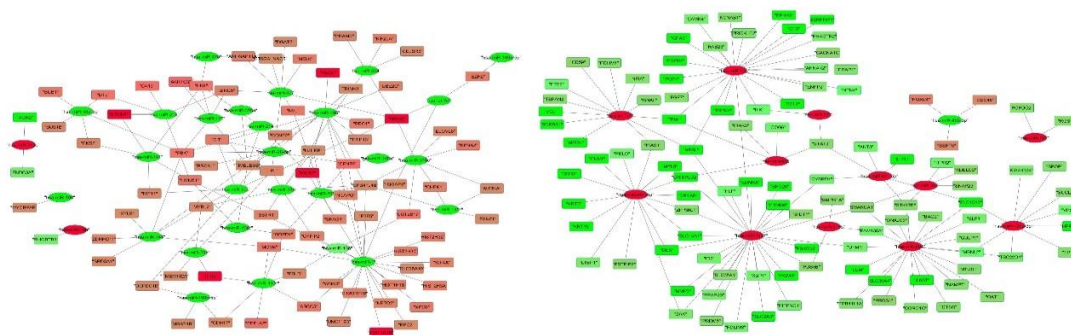
مسیر JAK/STAT، پاسخ به interleukin-1، پاسخ به اینترفرون گاما، مسیر پیام رسانی MAPK و مسیر پیام رسانی NF-kappaB، جزء مسیرهای بیولوژیکی مهار شده بودند.



شکل شماره ۲: نمودار استوانه‌ای که ژن‌ها و microRNAهای با تفاوت بیان را در تومور بدخیم نشان می‌دهد. در هر نمودار، رنگ قرمز، نشان‌دهنده موارد افزایش بیان و رنگ سبز، نشان‌دهنده موارد کاهش بیان می‌باشد.

پیشگویی برای اهداف ژنی microRNAها به دست آمد. آنالیز مقادیر همبستگی برای این روابط تنظیمی بالقوه، ۲۸۴ رابطه تنظیمی فعال بین ۴۲ microRNA و ۱۸۴ ژن دارای تفاوت بیان را نشان می‌دهد (همبستگی پیرسون کمتر از ۰/۴-) (شکل شماره ۳).

برای تومور بدخیم پروستات، ۵۲۸۸ اندرکنش تنظیمی بالقوه بین ۹۶ microRNA و ۸۴۲ ژن منحصر به فرد که همگی نسبت به تومور خوش خیم تفاوت بیان دارند، شناسایی شد که این اندرکنش‌های تنظیمی از پایگاه‌های داده تأیید شده به وسیله نتایج آزمایشگاهی، همچنین پایگاه‌های داده مبتنی بر الگوریتم‌های

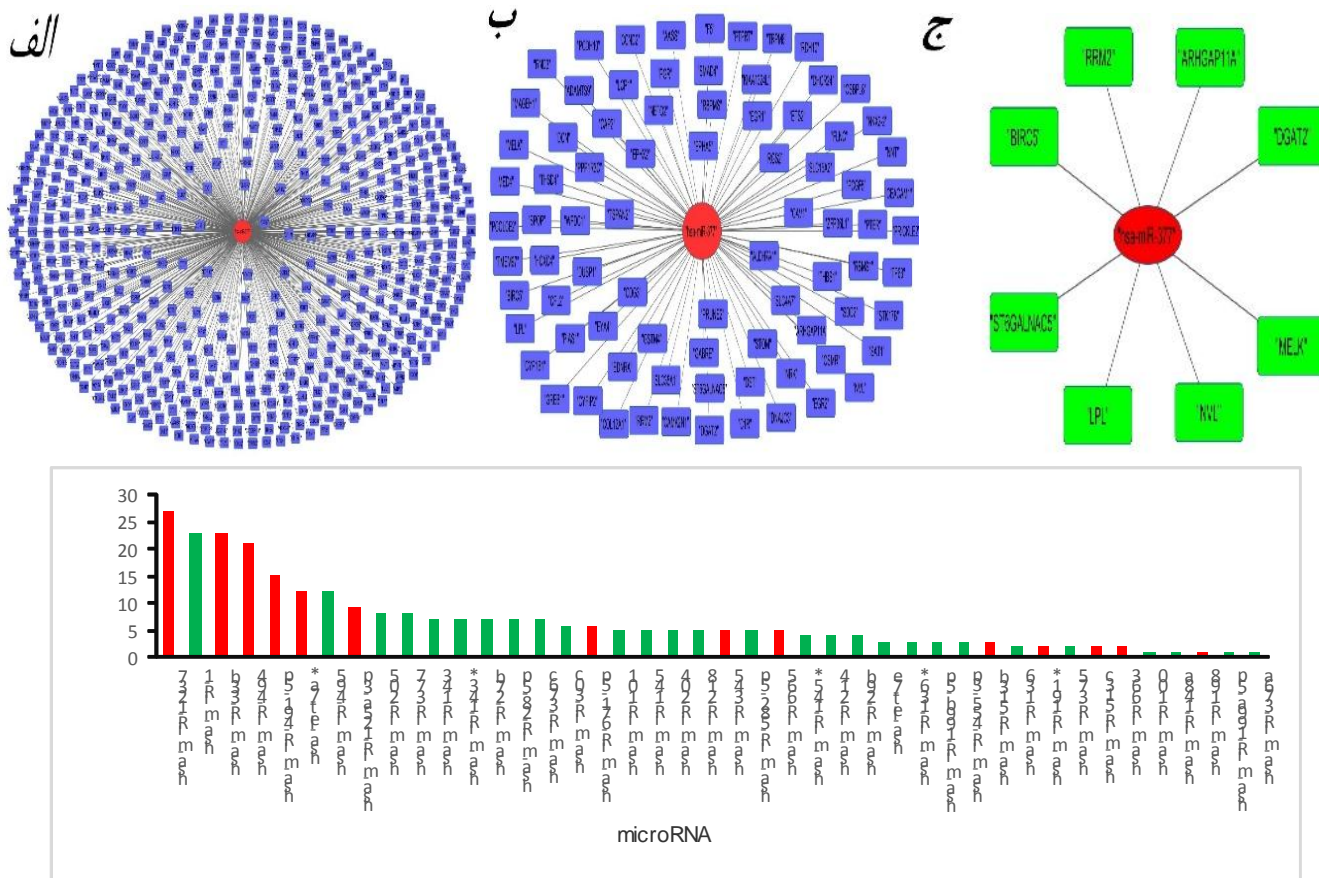


شکل شماره ۳: شبکه تنظیمی microRNA برای تومور بدخیم.

گره‌های بیضی، نشان‌دهنده microRNA و گره‌های مستطیل برای ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. رنگ گره‌ها جهت تنظیم بیان را نشان می‌دهند. رنگ قرمز، نشان‌دهنده افزایش بیان و رنگ سبز، کاهش بیان را نشان می‌دهد.

همان گونه که مشخص است این روش تعداد ژن های هدف برای هر microRNA را از صدها ژن هدف به تعداد اندکی ژن هدف کاهش می دهد.

کارایی روش به کار گرفته شده در کاهش ابعاد داده ها در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.



شکل شماره ۴: کارایی روش به کار گرفته شده در ساخت شبکه تنظیمی microRNA

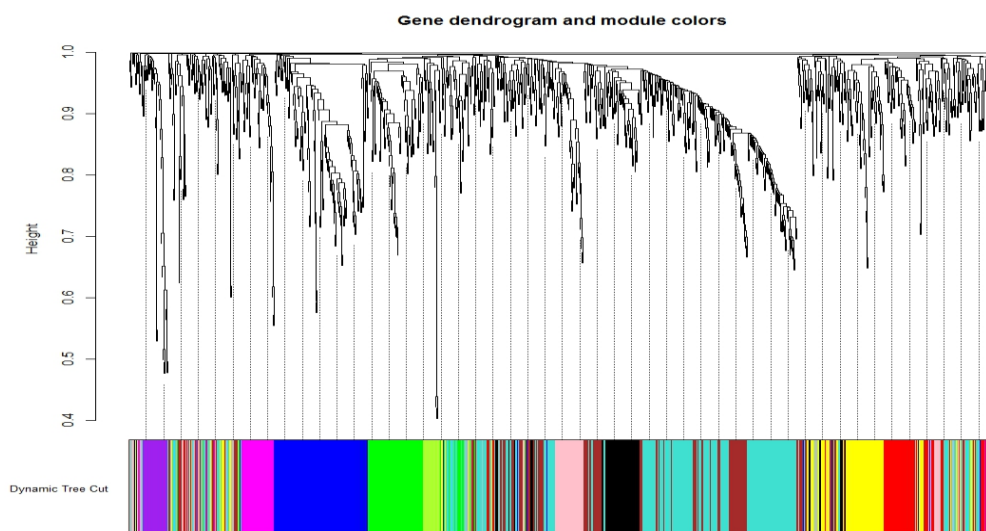
(الف) همه ژن های هدف برای hsa-miR-377 را نشان می دهد که از پایگاه های داده اشاره شده در بخش روش ها به دست می آیند.

(ب) از میان ژن های هدف تنها مواردی انتخاب شده اند که در میان ژن های با تفاوت بیان در تومور بدخیم پروستات هستند.

(ج) ژن هایی هستند که همبستگی پیرسون کمتر از ۰.۵- با این microRNA دارند. نمودار میله ای نیز نشان دهنده تعداد ژن های هدف برای هر کدام از microRNA ها می باشد. رنگ سبز و قرمز به ترتیب، نشان دهنده کاهش و افزایش بیان microRNA است.

یازده گروه ژنی شناسایی گردید که از ۳۵ ژن تا ۲۶۰ ژن در هر گروه عضو وجود داشت. از بین همه ژن ها، ۴۳ ژن هیچ الگوی مشابهی را با سایر گروه ها نشان نداد. بنابراین، در هیچ کدام از گروه ها دسته بندی نشدند (جدول شماره ۲).

با استفاده از ماتریکس همپوشانی توپولوژیک و مقادیر عدم تجانس حاصل از آن، یک دندروگرام به دست آمد (شکل شماره ۵). گروه ها به وسیله روش خوشه بندی سلسله مراتبی و معیارهایی که براساس میزان عدم تجانس و کمینه تعداد ژن های اعضای گروه وجود دارد انتخاب شدند.



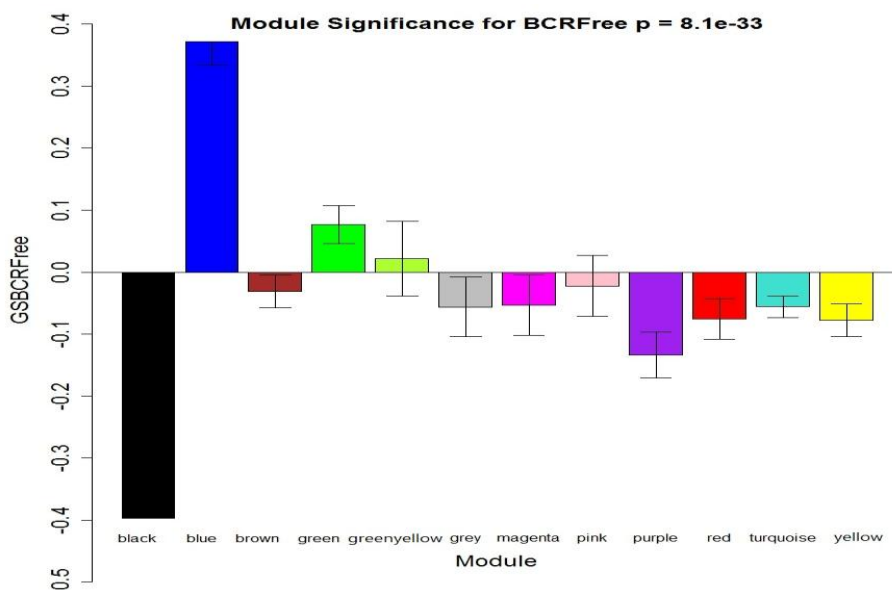
شکل شماره ۵. دندروگرام (بالا) و رنگ های مربوط به گروه های شناسایی شده (پایین). نمودار با استفاده از ماتریکس همپوشانی توپولوژیکی (TOM) به عنوان معیار تشابه رسم شده است. محور عمودی عدم تجانس را نشان می دهد. گروه ها مطابق شاخه های دندروگرام بوده و رنگ ها برای نمایش آنها استفاده شده اند.

جدول شماره ۲. گروه های شناسایی شده در شبکه هم بیان ژنی وزن دار با تعداد ژن های موجود در هر گروه نشان داده شده است.

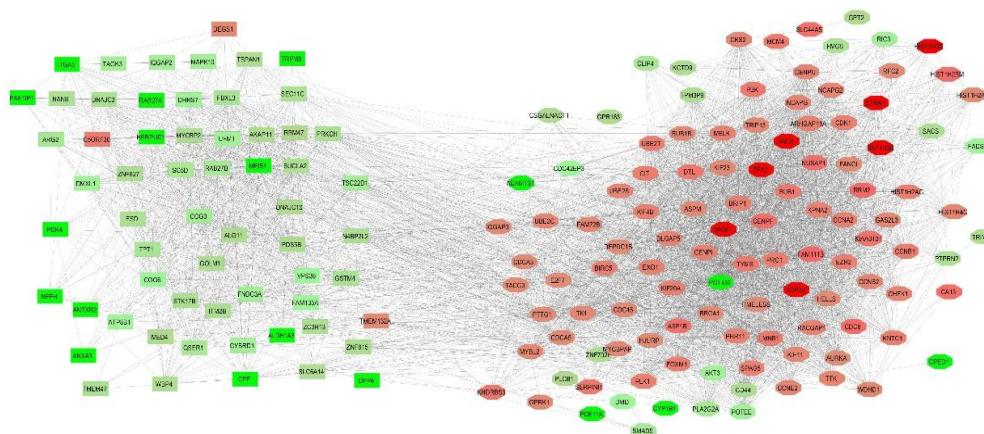
رنگ گروه	تعداد ژن ها
سیاه	۶۱
آبی	۱۲۱
قهوه ای	۱۱۹
سبز	۸۳
سبز روشن	۲۵
ارغوانی	۴۳
صورتی	۴۷
بنفش	۳۴
قرمز	۷۶
فیروزه ای	۲۶۰
زرد	۹۶

پاتولوژیکی می باشند. شکل شماره ۷، ژن های این دو گروه و نحوه ارتباط بین ژن های دو گروه با یکدیگر را نشان می دهد. در کل، ژن های گروه آبی با افزایش بیان و ژن های گروه سیاه با کاهش بیان روبرو هستند.

برای پاتولوژیکی گروه های ژنی در شبکه، همبستگی مقادیر ویژه هر کدام از گروه ها با پارامتر کلینیکی زمان عود بیوشیمیایی بیماری که برای هر کدام از نمونه ها موجود است برای هر گروه محاسبه شد. همان گونه که در شکل شماره ۶ مشخص است دو گروه ژنی آبی و مشکی دارای همبستگی قابل توجه با این پارامتر



شکل شماره ۶. محور عمودی همبستگی پیرسون، مؤلفه اصلی هر کدام از گروه‌ها با متغیر پاتولوژیکی عود بیوشیمیایی می‌باشد. (Gene Significance for BioChemical Recurrence Free, GSBCRFree) همان گونه که از شکل نیز مشخص است گروه آبی دارای همبستگی مثبت و گروه مشکی دارای همبستگی منفی می‌باشد.



شکل شماره ۷: شبکه هم‌بیان ژنی برای دو گروه آبی و سیاه نشان داده شده است. گره بیضی برای ژن‌های گروه آبی و گره مستطیل برای گروه سیاه است. رنگ سبز، نشان‌دهنده کاهش بیان و رنگ قرمز افزایش بیان برای گره را نشان می‌دهد.

چند مسیر بیولوژیک مرتبط برای آن به دست آید (جدول شماره ۳).

با توجه به اینکه اعضای هر گروه حاوی ژن‌هایی با همبستگی بالا می‌باشند، انتظار می‌رود با تفسیر ژن‌های هر گروه، یک یا

جدول شماره ۳. مسیرهای بیولوژیکی به‌دست آمده برای هر گروه.

نام مسیر	تعداد ژن	گروه
intra-Golgi vesicle-mediated transport melanosome localization establishment of melanosome localization melanosome transport cellular pigmentation cell-cell adhesion mediated by integrin pigment granule transport	۶۰	سیاه
cell cycle cell cycle process mitotic cell cycle process mitotic cell cycle mitotic nuclear division cell division cell cycle phase transition organelle organization mitotic cell cycle phase transition chromosome organization	۱۱۴	آبی
sequestering of metal ion sequestering of calcium ion commissural neuron axon guidance response to type I interferon type I interferon signaling pathway cellular response to type I interferon cell fate commitment response to interleukin-4 cellular response to interleukin-4	۱۱۵	قهوه‌ای
skeletal system development complement activation, classical pathway extracellular matrix organization extracellular structure organization humoral immune response mediated by circ bone development skeletal system morphogenesis	۷۹	سبز
tissue regeneration embryo implantation regulation of wound healing oxygen transport hydrogen peroxide catabolic process response to amino acid	۲۴	سبز-زرد
phospholipid metabolic process cellular lipid catabolic process lipid metabolic process glycerolipid metabolic process alcohol catabolic processes glycerophospholipid metabolic processes flavonoid metabolic process flavonoid biosynthetic process plasma lipoprotein particle clearance low-density lipoprotein particle clearance	۴۱	ارغوانی
regulation of extrinsic apoptotic signal negative regulation of acute inflammation nitric oxide homeostasis caveola assembly	۴۶	صورتی
regulation of receptor activity regulation of transmembrane transporter regulation of ion transmembrane transporter cellular response to zinc ion ion transmembrane transport regulation of ion transmembrane transporter synapse assembly cellular response to cadmium ion glutamate receptor signaling pathway synapse organization	۲۵	بنفش

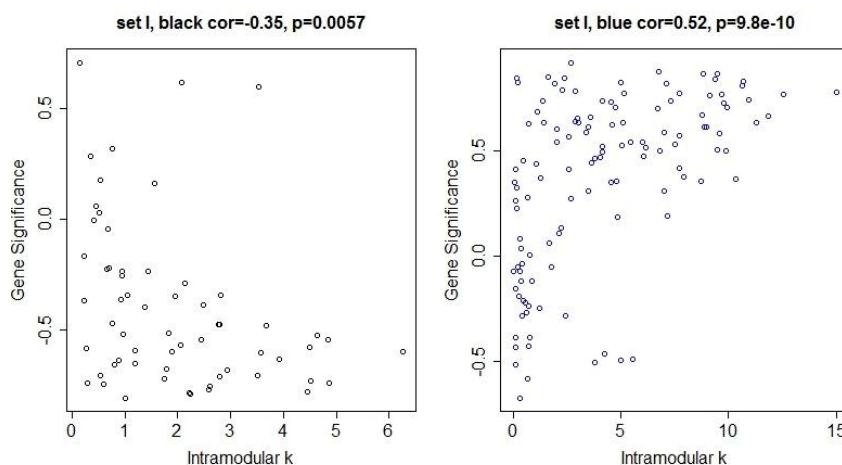
protein folding T cell differentiation in thy us acute inflammatory response negative regulation of muscle hypertrophy	۷۱	قرمز
cardiac muscle tissue development positive regulation of glial cell differ embryonic digestive tract development heart development digestive tract development digestive system development synaptic transmission regulation of muscle contraction	۲۴۶	فیروزه ای
regulation of transcription from RNA pol transcription from RNA polymerase II pro apoptotic process multicellular organismal development	۸۷	زرد

همان گونه که مشخص است هر کدام از گروه‌ها در یک مسیر خاصی درگیر هستند،

به خصوص توجه به گروه آبی نشان می‌دهد که این گروه در فرآیندهای مربوط به تنظیم تقسیم سلولی و چرخه سلولی نقش دارند.

از لحاظ همبستگی با زمان عود بیوشیمیایی شناسایی شده‌اند. برای گروه آبی، ۲۱ ژن و برای گروه سیاه، ۹ ژن کلیدی با استفاده از این روش شناسایی شد (جدول شماره ۴).

در شکل شماره ۸، ارزش ژنی در برابر تعداد اتصالات داخل گروهی برای دو گروه آبی و سیاه نشان داده شده است. همان گونه که قبلاً به آن اشاره شد با قرار دادن حد آستانه برای این دو پارامتر، ژن‌های مهم هم از لحاظ اهمیت در شبکه هم بیان و هم



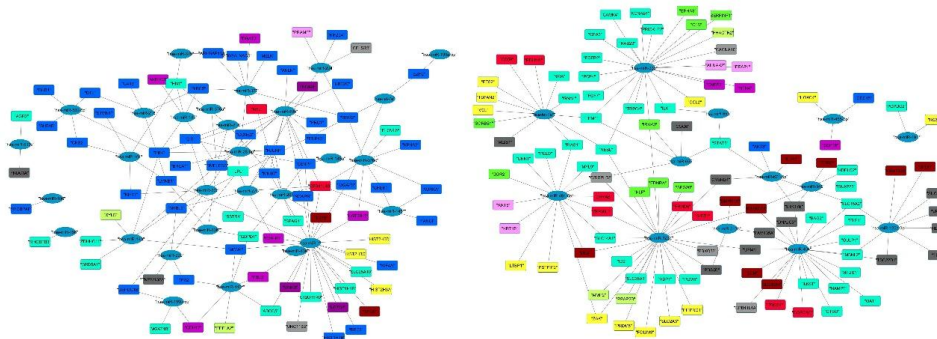
شکل شماره ۸: در این نمودارها محور افقی تعداد اتصالات ژن‌های داخل هر کدام از گروه‌ها (Intramodular k) و محور عمودی ارزش ژنی (Gene Significance) برای ژن‌های داخل هر دو گروه را (دو گروه آبی و سیاه) نشان می‌دهد.

جدول شماره ۴: ژن‌های کلیدی داخل هر کدام از گروه‌های سیاه و آبی.

گروه آبی	گروه آبی	گروه سیاه
DTL	BUB1B	SC5D
EXO1	KIF23	UFM1
ASPM	FANCI	AKAP11
UBE2T	PRC1	COG3
KIF20A	SPAG5	FBXL3
ANLN	BRIP1	MYCBP2
PBK	ASF1B	VPS36
MELK	TPX2	ALG11
FOXM1	NUSAP1	MEIS1
KIAA0101	CCNB2	
NCAPG		

به این صورت که با نسبت دادن رنگ هرکدام از گروه های شناسایی شده به ژن متعلق به آن گروه می توان ژن های همه گروه ها را ردیابی کرد (شکل شماره ۹)

در جهت یک پارچه سازی شبکه تنظیمی microRNA با شبکه هم بیان ژنی وزن دار برای ردیابی هرکدام از ژن های موجود در شبکه تنظیمی microRNA و مطابقت دادن آن با شبکه هم بیان ژنی وزن دار، از نرم افزار Cytoscape استفاده شد (۲۰)؛



شکل شماره ۹: گره های بیضی برای microRNA و گره های مستطیل برای ژن های هدف. رنگ ژن های هدف، نشان دهنده گروه مشخص شده برای آن در شبکه هم بیان ژنی می باشد.

با توجه به اینکه ژن های موجود در این موتیف ها نیز از درجه بالای اهمیت برخوردارند؛ این موتیف های ساختاری، به منظور یافتن عناصر تنظیم شونده و تنظیم کننده مهم شبکه جستجو شدند. عناصر موجود در موتیف ها براساس تعداد دفعات حضور در موتیف ها، مرتب و عناصری که بیش از ۵ بار در موتیف ها حضور داشتند، به عنوان عناصر مهم در شبکه تنظیمی microRNA از لحاظ ساختاری معرفی شدند. همان گونه که در جدول شماره ۵ نیز مشخص است ۱۲ گره در شبکه، بیش از ۵ بار در موتیف ها تکرار شدند که از این تعداد، ۵ عدد ژن و ۷ عدد microRNA می باشد.

در شکل شماره ۹، شبکه به دو گروه جدا از هم تقسیم شده است. این تقسیم بندی را می توان براساس فعالیت microRNAها گروه بندی کرد. یک گروه مربوط به شبکه ای است که با microRNAهای مهار شده در ارتباط هستند و گروه دیگر با microRNAهای فعال مرتبط می باشند. برای آنالیز این شبکه تنظیمی از دیدگاه ساختاری، موتیف های ساختاری ۳ و ۴ عضوی مورد بررسی قرار گرفت. در این آنالیزها، ۶۳ موتیف از نوع bifan شناسایی شد. این نوع از موتیف ها از موتیف های غالب در شبکه های تنظیم بیان ژن بوده و نقش عملکردی در ساختار شبکه ایفا می کنند (۲۱).

جدول شماره ۵: ژن های موجود در موتیف های شناسایی شده در شبکه تنظیمی microRNA که بیش از ۵ بار در موتیف ها تکرار شده اند.

نام گره در شبکه	تعداد تکرار در موتیف ها
NCAPG	7
EPB41L4B	7
CENPF	8
HJURP	10
TIMELESS	10
hsa-miR-1237	12
hsa-miR-205	14
hsa-miR-1	14
hsa-miR-495	21
hsa-miR-494	6
hsa-miR-28-5p	7
hsa-miR-491-5p	10

بحث

بر اساس یافته‌های آنالیز شبکه هم‌بیان ژنی وزن دار، ۱۱ گروه ژنی بر اساس پروفایل بیانی ژن‌های با تفاوت بیان در سرطان بدخیم پروستات یافت شد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت ژن‌های موجود در هر کدام از این گروه‌ها، یک یا چند فعالیت بیولوژیکی خاص را انجام می‌دهند. اهمیت پاتولوژیکی گروه‌ها را می‌توان با استفاده از آنالیز مؤلفه اصلی (Principal component analysis) گروه‌ها و مقادیر ویژه (Eigenvalue) که برآیندی از مقدار بیان ژن کل گروه‌ها است، و بررسی همبستگی این مؤلفه‌ها با پارامتر پاتولوژیکی زمان عود بیوشیمیایی بیماری مورد توجه قرار داد. از بین گروه‌ها، دو گروه سیاه و آبی دارای بیشترین مقدار همبستگی با این پارامتر بیولوژیکی بوده و به همین دلیل بیشترین تأثیر را در روند پیشرفت سرطان پروستات دارند. بررسی تفسیر ژن‌های گروه‌های سیاه و آبی که به ترتیب دارای ۶۰ و ۱۱۴ ژن هستند نشان می‌دهد مسیر چسبندگی سلول - سلول به‌واسطه اینترگرین در گروه سیاه و همه مسیرهای ذکر شده برای گروه آبی که دربرگیرنده تنظیم چرخه و تقسیم سلولی می‌باشد، جزء مسیرهای بیولوژیکی مشخصه در سرطان است.

بخش مهم دیگری از این مطالعه مرتبط به شناسایی ژن‌های کلیدی می‌باشد. ژن‌های کلیدی ژن‌هایی هستند که دارای اتصالات داخل گروهی بالایی بوده، همچنین ارزش ژنی (همبستگی ژن با پارامتر پاتولوژیکی) بالایی دارند. هرگونه اختلال در عملکرد این ژن‌ها منتهی به تغییرات چشمگیر در شبکه خواهد شد. ژن‌های یافت شده علاوه بر ارتباطات بالای درون گروهی، دارای همبستگی بالایی با پارامتر خارجی مورد نظر نیز می‌باشند (جدول شماره ۴).

در مطالعات پیشین، از میان ژن‌های کلیدی گروه سیاه، ژن MEIS1 مربوط به سرطان پروستات گزارش شده است. این ژن در آغاز برخی از سرطان‌ها نقش دارد، ولی در سرطان پروستات برخلاف آنچه در سایر سرطان‌ها گزارش شده با کاهش بیان روبرو است. علاوه بر این، به‌عنوان ژن اثرگذار در عود بیوشیمیایی سرطان پروستات معرفی شده که به طریقی مؤید نتایج مطالعه حاضر نیز می‌باشد. این ژن پروتئینی همین نام را کد می‌کند که عضو اصلی از پروتئین‌های homebox است. این ژن در رشد و تمایز طبیعی سلول نقش دارد (۲۲، ۲۳)، دسته دیگری از ژن‌ها که

در این گروه حضور دارند ژن‌های فعال در مسیر Ubiquitination هستند که مهم‌ترین آنها، MYCBP2 می‌باشد. این ژن به‌عنوان تنظیم‌کننده نسخه‌برداری، به‌واسطه اتصال به MYC است (۲۴)، که خود یک پروتئین کوژن بوده و در سرطان پروستات نقش دارد (۲۵، ۲۶).

افزایش فعالیت ژن‌های چرخه سلولی با برخی پارامترهای پیش‌آگهی سرطان پروستات مانند عود بیوشیمیایی که بررسی شده، همبستگی دارد. همه ژن‌های کلیدی یافت شده در گروه آبی (جدول شماره ۴)؛ در سازمان‌دهی تقسیم سلولی، سازمان‌یابی دوک میکروتوبولی برای تقسیم سلولی، تقسیم DNA و تنظیم چرخه سلولی نقش دارند. از بین ۲۱ ژن شناسایی شده، افزایش بیان ۱۰ ژن (*MELK, BUB1B, NUSAP1, KIAA0101, FOXM1*,) همراه با فنوتیپ‌های تهاجمی سرطان پروستات می‌باشد و ژن‌های *PBK, MELK, TPX2, NUSAP1* با توجه به اهمیتی که در پیشرفت سرطان پروستات دارند، به‌عنوان اهداف دارویی جدید برای سرطان پروستات معرفی شده‌اند (۳۵-۲۷). نقاط کنترل چرخه سلولی (Cell Cycle Check Point)، به‌عنوان گلوگاه‌هایی در کنترل رشد و تقسیم سلول هستند که مانع تقسیم غیرقابل کنترل سلول و تقسیم سلول‌های معیوب می‌شوند. هرگونه آسیب در فرآیند تقسیم DNA باعث می‌شود تا ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلول مانع از ورود سلول به مرحله میتوز شوند. همچنین هرگونه ایراد در عملکرد این ژن‌ها، جزء مشخصه‌های بارز سلول‌های بدخیم سرطانی است. ژن‌های *FOXMI, BUB1B* و *MELK* سه ژن از ژن‌های کلیدی یافت شده هستند که از ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی می‌باشند. ژن *FOXMI* (Forkhead Box M1) تنظیم‌کننده اصلی فاز G2/M چرخه سلولی است. این ژن در فاز M فسفریله شده و بیان ژن‌های درگیر در چرخه سلول را تنظیم می‌کند. *CDC6* یکی از ژن‌های هدف *FOXMI* بوده و در آغاز فرآیند تقسیم DNA نقشی کلیدی دارد. *FOXMI* بیان ژن *AR*، همچنین اهداف این ژن را افزایش می‌دهد. ژن *AR* از ژن‌های کلیدی در بدخیم شدن سرطان پروستات است که در این مطالعه با افزایش بیان روبرو بود.

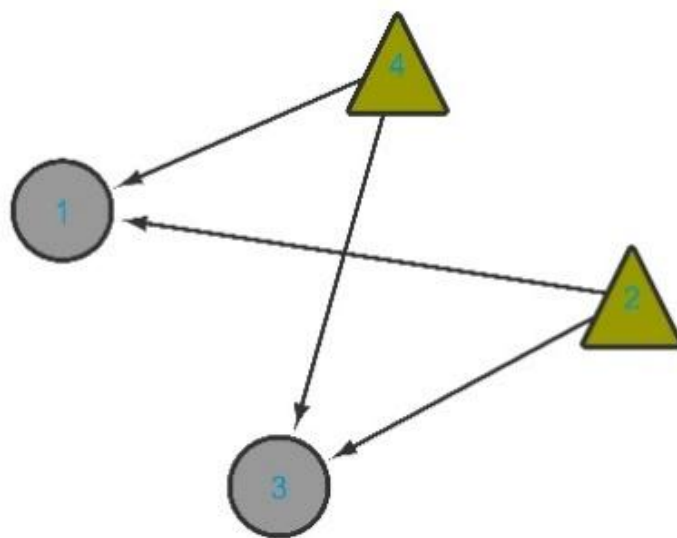
مسیرهای بیولوژیکی مشترکی درگیر هستند، شناسایی شدند. مهم‌ترین مورد مشاهده اندرکنش تنظیمی چندین microRNA بود که صرفاً ژن‌های گروه آبی را کنترل می‌کردند.

hsa-miR-377, hsa-miR-376a, hsa-miR-495, hsa-miR-(28-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-101, hsa-miR-30c از این قبیل microRNA هستند)، همان‌گونه که پیشتر نیز عنوان شد این گروه از لحاظ پاتولوژیکی دارای همبستگی بالایی با عود بیوشیمیایی بیماری است. همچنین اثر تنظیمی تعاونی که بین چند microRNA خاص با ژن‌های گروه آبی وجود دارد نشان می‌دهد گروهی تنظیمی از microRNAها و ژن‌هایی که در یک مسیر بیولوژیکی خاص (تنظیم چرخه سلول، تقسیم سلولی) درگیر هستند در وارد شدن تومور پروستات به فاز بدخیمی بسیار مهم می‌باشند. در این مطالعه وجود روابط تنظیمی بالقوه بین حدود ۱۷۰ microRNA و چندین هزار ژن هدف، به تعداد کمی روابط تنظیمی بین این مولکول‌ها را کاهش داد که از لحاظ بیولوژیکی نیز معنی‌دار بودند. روش‌هایی که توانایی شناسایی روابط تنظیمی برپایه microRNA را دارند را می‌توان وسیله‌ای برای تعیین مسیرهای سلولی در نظر گرفت که در آغاز یک فرآیند بیولوژیکی خاص مانند سرطان نقش دارند.

تعدادی از ژن‌های یافت‌شده در این مطالعه، تحت تأثیر AR قرار داشتند که شامل *NCAPG*, *FANCI*, *KIF20A*, *SPAG5* بود (۳۶). از دیگر ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، *MELK* را می‌توان نام برد که پروتئین کیناز سرین/ترئونین است و در فرآیندهای مختلفی مانند چرخه سلولی، آپوپتوز، تقسیم سلول، سرطان‌زایی (Carcinogenesis) و تنظیم ویرایش ژن‌ها (Splicing) نقش دارد. این ژن که پروتئین melk را کد می‌کند با فسفریله کردن طیف وسیعی از پروتئین‌ها فعال است (۳۱).

BUB1B، سرین/ترئونین، پروتئین کیناز دیگری است که در تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. همان‌گونه که پیشتر اشاره شد این سه ژن از ژن‌های کلیدی هستند که در بدخیم شدن سلول‌های سرطانی پروستات نقش دارند (۲۴).

برای پاسخ به سؤال‌های متعددی که درباره مکانیسم تنظیمی microRNAها در سرطان پروستات وجود دارد، تعیین گروه‌های تنظیمی microRNA که در فعالیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی خاصی درگیرند، بسیار مهم است. در این مطالعه با استفاده از شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار که ژن‌هایی با تفاوت بیان را در گروه‌های هم‌بیان با عملکرد یکسان دسته‌بندی کرده و رهگیری این گروه‌ها در میان ژن‌های هدف microRNAها با تفاوت



شکل شماره ۱۰: موتیف bifan. دو گره با شکل مثلث، نشان‌دهنده عناصر تنظیم‌کننده و گره‌های کروی، نشان‌دهنده عناصر تنظیم‌شونده هستند.

از مشخصه های انواع سرطان ها، برهم خوردن ساختار سلولی است، EPB41L4B جزء پروتئین های اسکلت سلولی بوده که افزایش بیان آن در تومورهای بدخیم پروستات مشاهده شده است (۴۰). از میان ۷ microRNA شناسایی شده سه مورد با افزایش بیان (hsa-miR-1237, hsa-miR-494, hsa-miR-491-5p) و مابقی موارد با کاهش بیان چشمگیری روبرو هستند.

(hsa-miR-495, hsa-miR-1, hsa-miR-205, hsa-miR-28-5p) از hsa-miR-1 (5p) microRNA های مهم در سرطان پروستات می باشند که با کاهش بیان مواجه بوده و در تنظیم بیان طیف وسیعی از ژن ها نقش دارند. کاهش بیان این microRNA ها به عنوان نشانگری از میزان عود سرطان پروستات است (۴۱).

(hsa-miR-205, hsa-miR-495, hsa-miR-494, hsa-miR-491) از microRNA هایی هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف بیولوژیکی شامل: تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارند، همچنین در مهار بیان اونکوژن ها، نقشی کلیدی داشته که در این مطالعه با کاهش بیان چشمگیری روبرو است و به نظر می رسد در بدخیم شدن سرطان پروستات نقش داشته باشد (۴۲، ۴۳).
Hsa-miR-28-5p نیز در مهار رشد، تقسیم سلولی و القای آپوپتوز نقش ویژه داشته که در برخی از سرطان ها با کاهش بیان روبرو می باشد (۴۴).

نتیجه گیری

در این مطالعه داده های بیانی ژن و microRNA که از بیماران مبتلا به سرطان پروستات در دو فاز خوش خیم و بدخیم استخراج شد مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز هم بیان ژنی وزن دار برای به دست آوردن گروه های ژنی در تومور بدخیم استفاده شد و همبستگی این گروه ها با متغیر پاتولوژیکی عود بیوشیمیایی بیماری مورد بررسی قرار گرفت. دو گروه آبی و سیاه، گروه های مهم از لحاظ همبستگی با این پارامتر پاتولوژیکی بودند. نتایج نشان داد ژن های گروه آبی با افزایش بیان روبرو هستند و در تنظیم تقسیم و چرخه سلولی نقش دارند که از مشخصه های سلول های سرطانی است. در این مطالعه با بررسی ژن های موجود در این دو گروه از لحاظ اهمیت پاتولوژیکی و ساختار شبکه، چند ژن کلیدی معرفی شد که اغلب در سازمان دهی تقسیم سلولی، سازمان یابی دوک میکروتوبولی برای تقسیم سلولی، تقسیم DNA و تنظیم چرخه سلولی نقش دارند.

آنالیز ساختار شبکه تنظیم microRNA، امکان محدود کردن بیشتر نتایج و به دست آوردن عناصر ساختاری شبکه که نقش عملکردی مهمی در شبکه دارند را در اختیار قرار می دهد. همان گونه که اشاره شد برای این منظور موتیف های ساختاری موجود در شبکه استخراج شدند. موتیف ها، الگوهای تکرار شونده در ساختار شبکه هستند که از اتصال عناصر سازنده شبکه (ژن ها و microRNA ها) تشکیل می شوند. موتیف ها در دسته بندی شبکه ها، آنالیز شبکه و شناسایی عناصر عملکردی در شبکه بسیار کاربرد دارند. bifan تنها نوع موتیف موجود در شبکه است، این موتیف از لحاظ آماری، فراوان ترین موتیف موجود در شبکه های پیام رسانی و تنظیم بیان ژن است (۲۱). این موتیف ها از ۴ عضو تشکیل شده اند که در آنها دو عضو تنظیم کننده را که در اینجا microRNA هستند و دو عضو تنظیم شونده که ژن ها را شامل می شوند به طور همزمان مورد هدف قرار می دهند (شکل شماره ۱۰). براساس فیلتری که در بخش یافته ها به آن اشاره شد ۱۲ عنصر از شبکه به عنوان ژن های مهم از دیدگاه ساختاری شناسایی شدند. از ۵ ژن موجود در این لیست، NCAPG جزء ژن های کلیدی یافت شده در شبکه هم بیان ژنی وزن دار در گروه آبی بوده که همان گونه که اشاره شد جزء ژن های تنظیم شده توسط AR می باشند. مابقی ژن های موجود در لیست، طبق شواهد آزمایشگاهی جزء ژن های با بیان بالا در سرطان پروستات هستند.

CENPF (سنترور پروتئین F)، پروتئینی است که در کمپلکس کیتوکور - سنترور و جابه جایی کروموزوم ها در طول میتوز نقش دارد. طبق شواهد آزمایشگاهی، افزایش بیان این ژن در بدخیم شدن سرطان پروستات، نقش ویژه ای دارد و به عنوان شاهدهی بر مراحل پیشرفته این تومور است (۳۷).
HJURP (Holliday Junction Recognition Protein)، که در اندرکنش با CENPF بوده و در ساختار سنترور فعالیت می کند، از ژن های مهم در سرطان پستان و بیومارکری برای سنجش حساسیت سرطان پستان در برابر انواع درمان ها می باشد (۳۸). ژن دیگر، TIMELESS است که در تنظیم ساعت بیولوژیکی سلول، نقش کلیدی ایفا می کند. همچنین این ژن جزء عناصر اصلی سیستم کنترل چرخه سلولی است. افزایش بیان این ژن همراه با افزایش قدرت تومورزایی در انواع بافت ها می باشد (۳۹).

مهار بیان اونکوژن ها نقشی کلیدی دارند که در این مطالعه با کاهش بیان چشمگیری روبرو بود که به نظر می رسد در بدخیم شدن سرطان پروستات نقش ویژه داشته باشد. ژن های *CENPF* و *TIMELESS* طبق مطالب گفته شده می توانند در کنار microRNA های اشاره شده، به عنوان اهداف درمانی جدید برای سرطان پروستات در نظر گرفته شوند. در مجموع با استفاده از روش های به کار گرفته شده در این مطالعه، حجم داده های اولیه از هزاران ژن و microRNA اولیه به تنها چند مورد کاهش یافت و اهمیت آنها با توجه به پارامتر کلینیکی عود بیوشیمیایی که از فاکتورهای مهم در تومورهای بدخیم است در سرطان پروستات بررسی شد. استفاده از این روش مطالعه می تواند برای روشن شدن نقش تنظیمی microRNA ها در تنظیم بیان ژن ها در سایر بیماری ها نیز سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تهران به سبب حمایت مادی و معنوی این مطالعه در قالب رساله دکتری اعلام می دارند.

از میان این ژن های کلیدی؛ *PBK, MELK, TPX2, NUSAP1* قبلاً به عنوان اهداف دارویی برای سرطان پروستات معرفی شده اند که به نوعی تصدیق کننده آنالیز انجام شده در این مطالعه هستند. سپس شبکه تنظیمی microRNA برای تومور بدخیم پروستات به دست آمد و رابطه بین چگونگی تنظیم microRNA با گروه های مختلف ژنی، بررسی و با آنالیز ساختار شبکه عناصر مهم در این شبکه تنظیمی به دست آمد. با استفاده از یک پارچه سازی شبکه تنظیمی microRNA با شبکه هم بیان ژن، اثر تنظیمی آن بر بیان ژن در سرطان بدخیم مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج جالب توجه این است که اهداف هر کدام از microRNA ها در گروه های هم بیان مشابهی قرار دارند؛ بدین معنا که اهداف microRNA ها در مسیرهای بیولوژیکی یکسانی فعالیت می کنند. آنالیز ساختار شبکه تنظیمی microRNA با استفاده از یافتن موتیف های ساختاری این شبکه انجام شد.

hsa-miR-205, hsa-miR-495, hsa-miR-494, hsa-miR-491 از microRNA هایی هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف بیولوژیکی مانند تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش داشته، همچنین در

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65(1):5-29.
2. Fraser M, Berlin A, Bristow RG, van der Kwast T. Genomic, pathological, and clinical heterogeneity as drivers of personalized medicine in prostate cancer. *Urol Oncol* 2015;33(2):85-94.
3. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:559.
4. Iorio M V, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012;4(3):143-59.
5. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7(4):147-54.
6. Shalgi R, Lieber D, Oren M, Pilpel Y. Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Comput Biol* 2007;3(7):e131.
7. Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. MicroRNA-Mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Mol Cell* 2007;26(5):753-67.
8. Martinez NJ, Ow MC, Barrasa MI, Hammell M, Sequerra R, Doucette-Stamm L, et al. A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev* 2008;22(18):2535-49.

9. Bengtsson H, Simpson K, Bullard J, Hansen K. Aroma. Affymetrix: A generic framework in R for analyzing small to very large Affymetrix data sets in bounded memory. *Methods* 2008;Tech Repor(745):1-9.
10. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43(7):e47.
11. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinform* 2009;10:161.
12. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;28(1):27-30.
13. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Database issue):D258-61.
14. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinforma* 2005;21(16):3448-9.
15. Zhao W, Langfelder P, Fuller T, Dong J, Li A, Hovarth S. Weighted gene coexpression network analysis: State of the art. *J Biopharm Stat* 2010;20(2):281-300.
16. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D239-47.
17. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 2015;4:e05005.
18. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010;11(8):R90.
19. Ferro A, Giugno R, Pigola G, Pulvirenti A, Skripin D, Bader GD, et al. Net Match: A Cytoscape plugin for searching biological networks. *Bioinformatics* 2007;23(7):910-2.
20. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13(11):2498-504.
21. Wong EA, Baur B. On Network Tools for Network Motif Finding: A Survey Study. *Lab Comput Popul Biol* 2010;1-21.
22. Chen JL, Li J, Kiriluk KJ, Rosen AM, Paner GP, Antic T, et al. Deregulation of a Hox protein regulatory network spanning prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 2012;18(16):4291-302.
23. Orlovsky K, Kalinkovich A, Rozovskaia T, Shezen E, Itkin T, Alder H, et al. Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(19):7956-61.
24. Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Database issue):D115-9.
25. Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer* 2010;1(6):617-28.
26. Hawksworth D, Ravindranath L, Chen Y, Furusato B, Sesterhenn IA, McLeod DG, et al. Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010;13(4):311-5.
27. Wen M, Kwon Y, Wang Y, Mao JH, Wei G. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. *Oncotarget* 2015 6(28):25226-39.

28. Wang L, Tang H, Thayanithy V, Subramanian S, Oberg AL, Cunningham JM, et al. Gene networks and microRNAs implicated in aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69(24):9490–7.
29. Tamura K, Furihata M, Tsunoda T, Ashida S, Takata R, Obara W, et al. Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles. *Cancer Res* 2007;67(11):5117–25.
30. Brown-Clay JD, Shenoy DN, Timofeeva O, Kallakury B V, Nandi AK, Banerjee PP. PBK/TOPK enhances aggressive phenotype in prostate cancer via beta-catenin-TCF/LEF-mediated matrix metalloproteinases production and invasion. *Oncotarget* 2015 20;6(17):15594-609.
31. Kuner R, Falth M, Pressinotti NC, Brase JC, Puig SB, Metzger J, et al. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(2):237–48.
32. Rajan P, Stockley J, Sudbery IM, Fleming JT, Hedley A, Kalna G, et al. Identification of a candidate prognostic gene signature by transcriptome analysis of matched pre- and post-treatment prostatic biopsies from patients with advanced prostate cancer. *BMC Cancer* 2014;14:977.
33. Gordon CA, Gulzar ZG, Brooks JD. NUSAP1 expression is upregulated by loss of RB1 in prostate cancer cells. *Prostate* 2015;75(5):517–26.
34. Vainio P, Mpindi JP, Kohonen P, Fey V, Mirtti T, Alanen KA, et al. High-throughput transcriptomic and RNAi analysis identifies AIM1, ERGIC1, TMED3 and TPX2 as potential drug targets in prostate cancer. *PLoS One* 2012;7(6):e39801.
35. Shaw GL, Whitaker H, Corcoran M, Dunning MJ, Luxton H, Kay J, et al. The early effects of rapid androgen deprivation on human prostate cancer. *Eur Urol* 2016;70(2):214-8.
36. Wang Z. Androgen-responsive genes in prostate cancer: Regulation, function and clinical applications. New York: Springer; 2013. p. 187–200.
37. Zhuo YJ, Xi M, Wan YP, Hua W, Liu YL, Wan S, et al. Enhanced expression of centromere protein F predicts clinical progression and prognosis in patients with prostate cancer. *Int J Mol Med* 2015;35(4):966-72.
38. Hu Z, Huang G, Sadanandam A, Gu S, Lenburg ME, Pai M, et al. The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12(2):R18.
39. Mao Y, Fu A, Leaderer D, Zheng T, Chen K, Zhu Y. Potential cancer-related role of circadian gene TIMELESS suggested by expression profiling and in vitro analyses. *BMC Cancer* 2013;13:498.
40. Schulz WA, Ingenwerth M, Djuidje CE, Hader C, Rahnenfuhrer J, Engers R. Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. *BMC Cancer* 2010;10:505.
41. Karatas OF, Guzel E, Suer I, Ekici ID, Caskurlu T, Creighton CJ, et al. miR-1 and miR-133b are differentially expressed in patients with recurrent prostate cancer. *PLoS One* 2014;9(6):e98675.
42. Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol* 2012;6(4):458–72.
43. Xun M, Ma CF, Du QL, Ji YH, Xu JR. Differential expression of miRNAs in enterovirus 71-infected cells. *Virology* 2015;12:56.
44. Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, et al. Strand-Specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells." *Gastroenterology* 2012;142(4):886–96.e9.