

## Comparison of mRNA and ncRNA expression profiles in colon cancer patients with system biology approach between 2020 and 2021

Eliañ Ganji<sup>1</sup>, Maliheh Entezari<sup>2</sup>, Seyed Mohammad Poorhosseini<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Farhikhtegan Medical Convergence sciences Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** A group of cells that divide more than normal tissue is called a cancerous tumor. In most cases, colon cancer which are lumps of flesh originating from the inner lining of the colon staining from intestinal polyps. Elucidating the regulatory relationships between mRNA and lncRNA can contribute to the regulation pattern of gene expression in malignant colorectal cancer. In this study, the integration of weight gene co-expression network in malignant tumor was investigated by analyzing expression data from samples of normal and cancer patients.

**Materials and methods:** The data used in this article included lncRNA and mRNA exosomal sequences extracted from Exorbase and GEO database. The weighted gene co-expression network was used to group genes and find gene groups that have a significant correlation.

**Results:** In this study, the pathological importance of the groups was classified using the level of expression of the groups. Between the groups, the green group had the most correlation and significance, and for this reason, it is assumed that they have the top impact on the progression of cancer.

**Conclusion:** Considering the key genes HSPA1B, PPP2R3B and HSPA1A suggested in this study by comparing healthy and sick people and identifying the difference in gene expression profile, a suitable biomarker can be identified to detect people with colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal cancer, Gene expression, Gene regulation networks, System biology.

**Cited as:** Ganji E, Entezari M, Poorhosseini SM. Comparison of mRNA and ncRNA expression profiles in colon cancer patients with system biology approach between 2020 and 2021. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 33(4): 322-337.

**Correspondence to:** Maliheh Entezari & Seyed Mohammad Poorhosseini

**Tel:** +98 9127796007 & 09121933329

**E-mail:** entezarimali@yahoo.com

**ORCID ID:** 0000-0003-4191-3351 & 0000-0001-6492-1018

**Received:** 27 May 2023; **Accepted:** 18 Aug 2023

## مقایسه پروفایل بیانی mRNA و ncRNA در بیماران مبتلا به سرطان روده با رویکرد سیستم بیولوژی بین سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰

الین گنجی<sup>۱</sup>، ملیحه انتظاری<sup>۲</sup>، سید محمد پورحسینی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات علوم همگرایی پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** به دسته‌ای از سلول‌ها که بیش از بافت نرمال تقسیم شوند، تومور سرطانی گفته می‌شود. سرطان روده بزرگ در اکثر موارد، از پولیپ‌های روده نشأت می‌گیرد. پولیپ‌های روده بزرگ، تکه‌های گوشتی برآمده است که از پوشش داخلی روده بزرگ نشأت می‌گیرند. توضیح روابط تنظیمی بین mRNA و lncRNA می‌تواند به شناسایی الگوی تنظیم بیان ژن در سرطان کولورکتال بدخیم کمک کند. در این مطالعه یکپارچه سازی شبکه هم بیان ژنی وزندار در تومور بدخیم با آنالیز داده‌های بیانی به دست آمده از نمونه‌های افراد نرمال و مبتلا به سرطان بررسی شد.

**روش بررسی:** داده‌های استفاده شده در این مقاله شامل توالی‌های اگزوزومی mRNA و lncRNA بود که از exorbase و پایگاه اطلاعاتی GEO استخراج شد. شبکه هم بیان ژنی وزندار برای گروه‌بندی ژن‌ها و یافتن گروه‌های ژنی که همبستگی قابل توجهی دارند، به کار برده شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه اهمیت پاتولوژیکی گروه‌ها، با استفاده از میزان بیان گروه‌ها دسته بندی شد. از بین گروه‌ها، گروه سبز دارای بیشترین مقدار همبستگی و معنی‌داری بود و به همین دلیل فرض بر این است که بیشترین تأثیر را در روند پیشرفت سرطان دارند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به ژن‌های کلیدی HSPA1B و HSPA1A، PPP2R3B در این مطالعه پیشنهاد می‌شود با مقایسه افراد سالم و بیمار و شناسایی تفاوت پروفایل بیان ژنی به یک بیومارکر مناسب جهت شناسایی و تشخیص افراد مبتلا به سرطان کولورکتال دست یافت. **واژگان کلیدی:** سرطان کولورکتال، بیان ژن، شبکه‌های تنظیم ژن، سیستم بیولوژی.

### مقدمه

می‌شود که متاستاز نکند، معمولاً دارای کپسول است و عروق کمی دارد. به تومورهای بدخیم، سرطان گفته می‌شود. تومورهای بدخیم می‌توانند به بافت‌های مجاور حمله کنند و آنها را آلوده کرده و در آنجا تکثیر یابند. این نوع تومورها بسیار خطرناک بوده و در صورت درگیری عروق و اعصاب نیز بسیار خطرناک هستند. حدود ۳/۱ درصد از همه سرطان‌ها، با کاهش مواجهه با عوامل سرطان زا مثل مواد شیمیایی، تغییر روش زندگی (رژیم سالم، ورزش، ترک سیگار و الکل)، اشعه و

به دسته‌ای از سلول‌ها که بیش از بافت نرمال تقسیم شوند، تومور سرطانی گفته می‌شود. علت این رشد غیرعادی این است که سلول‌های سرطانی به طور نرمال به عوامل تنظیم کننده سلول مانند تومور ساپرسورها و عوامل محرک رشد پاسخ نمی‌دهند. تومورها معمولاً به دو دسته خوش خیم و بدخیم تقسیم بندی می‌شوند. تومورهای خوش خیم، به توموری گفته

يا تابش بيش از حد خورشيد قابل پيش گيري هستند. سرطان اصلي ترين علت مرگ و مير در دنيا محسوب مي شود. در سال ۲۰۲۰، ۱۲ درصد مرگ ها در کل دنيا به دليل سرطان اتفاق افتاده است. احتمال ابتلا به سرطان، در محدوده سني بين ۵۵ تا ۷۵ سال (محدوده بيشترين مرگ و ميرهاي ناشي از سرطان) اتفاق مي افتد و در اين سرطان ها بيشترين ميزان مرگ و ميرها ناشي از سرطان هاي سينه، روده بزرگ، کبد و معده است. سرطان پستان در زنان شايع ترين سرطان تشخيص داده شده در جهان است که از موارد تشخيص داده شده سرطان ريه نيز پيشي گرفته است. سرطان روده بزرگ، به ترتيب دومين و سومين سرطان شايع در زنان و مردان است. در سال ۲۰۱۲، ۶۱۴۰۰۰ زن و ۷۴۶۰۰۰ مرد در سراسر جهان با سرطان روده بزرگ تشخيص داده شدند. در مجموع، در هر دو جنس، سرطان روده بزرگ سومين سرطان شايع است و ۹/۷ درصد از همه سرطان ها را تشکيل مي دهد. بيش از نيمي از موارد در مناطق توسعه يافته جهان رخ مي دهد. سرطان کولورکتال، سومين سرطان شايع در کشور ايران و چهارمين در جهان محسوب مي شود. بنا بر اين مي توان با تشخيص و درمان زود هنگام درصد زنده ماندن را افزايش داد (۶-۱). فرض بر اين است که، ابتلا به سرطان کولورکتال باعث تغيير مشخص و قابل رد يابي در پروفايل بيان ژني والگوي ترانسکريپتومي اگزوزوم هاي موجود در خون افراد بيمار مي شود؛ در نتيجه با مقايسه افراد سالم و بيمار و شناسايي تفاوت پروفايل بيان ژني مي توان به يک بيومارکر مناسب جهت شناسايي و تشخيص افراد مبتلا به سرطان کولورکتال دست يافت. واحد عملکردي اطلاعات در DNA، ژن است. تعدادي از ژن ها معمولاً کمتر يا بيشتر رونويسي مي شوند. معمولاً رونويسي به اندازه انجام مي شود و تنظيم رونويسي يک ژن به طيف وسيعي از شرايط داخل سلولي و خارج سلولي پاسخ مي دهد. رمزگشايي کد تنظيمي ژنوم (زمان و چگونگي خاموش و روشن شدن ژن ها) هدف اساسي بيولوژي و تکنیک میکروآري است که با اندازه گيري ميزان بيان ژن ها تحت شرايط مختلف سلولي به اين هدف کمک مي کند. در اين مطالعه هدف پيدا کردن ميزان بيان هر يک از نشانگرهاي mRNA، ncRNA و lncRNA جهت تشخيص ميزان ارتباط هر يک از ژن ها با سرطان کولورکتال با استفاده از رويکرد سيستم بيولوژي است. تمرکز ما روي داده هاي بياني miRNA و mRNA است. با بررسي هايي که در اين راستا انجام شد مشاهده شد که اين نوع داده ها در پايگاه داده هاي TCGIA و GEO و Array express وجود دارند. با توجه به اينکه وجود داده هاي بياني miRNA و

mRNA براي تحقيق ما مناسب است، به همين دليل داده هاي موجود را بررسي کرديم. خواسته ما از انجام آزمايش ميکرو آري، دستيابي به ژن هايي با بيان مشابه در شرايط يکسان است. ماژول هاي مختلف شناخته شده، مسيرها و کمپلس هاي پروتئيني را مشخص مي کنند. براي انجام اين کار داده هاي بياني mRNA و ncRNA و lncRNA مورد استفاده قرار گرفت. پس از نرمال سازي و انجام عمليات پيش پردازش روي مجموعه داده هاي ژني، شبکه هم بياني با استفاده از داده هاي بيان ژني براي مراحل ساخته مي شوند. سپس براي هر کدام از شبکه هاي هم بياني ساخته شده، تعدادي ماژول ژني به دست مي آيد. بعد از مشخص شدن ماژول ها، آن دسته از ماژول ها که بين مراحل مختلف سرطان کولورکتال، داراي تغييرات بيان ژني معني داري هستند، انتخاب مي شوند. براي ژن هاي هر کدام از ماژول ها آن دسته از mRNA هايي که در تنظيم اين ژن ها تأثير گذار هستند از پايگاه داده هاي معتبر و روش هاي آزمايشگاهي به دست آورده مي شوند. داده هاي به دست آمده اول براي تشخيص پيشرفت سرطان کولورکتال مي تواند مورد استفاده قرار گيرند. در نهايت با توجه تغييرات بيان mRNA بين مراحل مختلف اين بيماري، مي توان از اين RNA هاي غير کدکننده به عنوان نشانگرهاي زيستي براي تشخيص پيشرفت سرطان کولورکتال استفاده کرد. ميزان تغييرات بياني هر يک از ژن ها در نمونه بيمار نسبت به نمونه نرمال نشان دهنده ميزان ارتباط ژن مورد نظر با سرطان کولورکتال است.

### مواد و روشها

اين مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.254 از داده هاي سايت exorbase با کد دسترسی GSE100063 مربوط به اگزوزوم خون ۴۴ نمونه (۳۲ نمونه نرمال و ۱۲ نمونه مربوط به بيماران سرطان کولورکتال) بود. ابتدا ۱۸۳۳۴ ژن که در پايگاه داده مرتبط با کولورکتال بودند تهيه و سپس ۵۰۰۰ ژن اول که بيشترين تغييرات بياني و بيشترين ارتباط با سرطان کولورکتال را دارد انتخاب کرديم تا وارد شبکه WGCNA شوند که در شکل ۱ تعدادي از آنها مشاهده مي شود. براي اين منظور ميانيگين تمامي ژن ها بررسي شده و ژن هايي که ميانيگين بيان آنها کمتر از ۲ بود حذف شدند. سپس داده ها بر اساس  $\log_2 x + 1$  تبديل و سپس واريانس ژن ها گرفته شده و داده ها از صعودي به نزولي مرتب شدند. به منظور فيلتر سازي با استفاده از دستور hclust، آنها را در هر ماتريس بياني به طور مجزا خوشه بندي سلسله مراتبي را انجام داديم. با استفاده از اين روش، داده هاي پرت مشخص شدند.

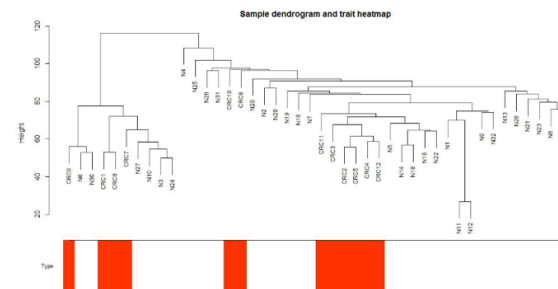
مناسب برای  $\beta$  تعیین شد و حد آستانه برای شاخص برازش برابر ۰/۹۱ در نظر گرفته شد (جدول ۱).

پس از شناسایی ماژول‌ها آنچه مهم و ضروری است، تعیین مهم‌ترین ماژول بر اساس همبستگی است. بنابراین با استفاده از ماتریس همپوشانی توپولوژیکی، خوشه بندی سلسله مراتبی انجام شد. ماژول‌ها مطابق با شاخه‌های دندروگرام از یکدیگر تفکیک شدند و رنگ‌ها بیانگر ماژول‌های ژنی در فرایند خوشه بندی هستند. ماژول‌های شناسایی شده در گام نخست ۷ ماژول بود که پس از فرایند ادغام به ۶ ماژول کاهش پیدا کرد. مجموعه‌ای از ژن‌ها که اساسا مدل نتوانست آنها را شناسایی کند و در هیچ یک از ماژول‌ها دسته بندی نشدند، در ماژول خاکستری قرار گرفتند.

بعد از تعیین ماژول‌ها، برای هر یک از ماژول‌ها با استفاده از eigengene نماینده‌ای از پروفایل بیان ژن‌های متعلق به آن ماژول تعیین کردیم. همچنین برای آنکه بتوانیم ماژول‌هایی که از نظر همبستگی به هم نزدیک هستند را با هم ترکیب کنیم نمودار خوشه بندی سلسله مراتبی متعلق به نماینده ماژول‌ها را در هر بیماری ترسیم کردیم. این نمودارها در شکل ۲ قابل مشاهده هستند. ماژول سبز بهترین خروجی WGCNA را داشت (طبق شکل ۳) که شامل ۸۶ ژن است که Upregulate (افزایش بیان) بود (شکل ۳).

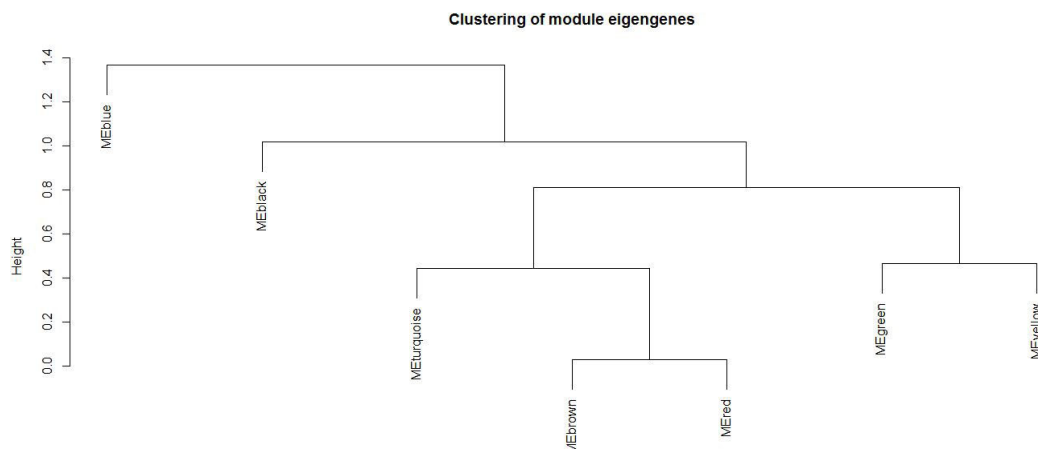
سپس، با استفاده از نمودار خوشه بندی سلسله مراتبی، ماژول‌هایی که همبستگی بردار eigengene آنها بیش از آستانه مورد انتظار بود را با هم ترکیب کردیم. به طوری که تعداد ماژول‌های به دست آمده برای سرطان کولورکتال برابر با چهار شد.

با توجه به این دستورهیچ کدام از نمونه‌ها به صورت پرت ظاهر نشد و همه نمونه‌ها برای آنالیز و تولید شبکه هم بیانی به وسیله ابزار WGCNA مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج دستور hclust از داده mRNA متعلق به نمونه‌های افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و نرمال در مرحله کنترل کیفیت

همان طور که پیش از این بیان شد برای ساخت شبکه هم بیانی داده های بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از چارچوب WGCNA استفاده شد. در این راستا و با استفاده از آستانه نرم شبکه هم بیانی را ساخته و ۷ ماژول در آن شناسایی شد. در این میان پارامتر بتا نقش مهمی در ایجاد خاصیت مقیاس آزاد برای شبکه هم بیانی ایفا می‌کند. بر این اساس ابتدا مجموعه‌ای از مقادیر ممکن برای بتا تولید شد. جدول ۱ پارامترهای مورد بررسی برای انتخاب بتا مناسب به منظور ساخت شبکه هم بیانی ژنی وزن دار را نشان می‌دهد. ستون power بیانگر مقادیر مختلف بتا است. همچنین ستون k بیانگر مقدار ارتباط است به طوری که k.max بیانگر بیشترین ارتباط است. بر این اساس و به منظور دستیابی به جواب‌های قابل قبول توان ۳ به عنوان مقدار



شکل ۲. نمودار خوشه بندی نماینده ماژول

جدول ۱. پارامترهای مورد بررسی برای انتخاب توان بتا مناسب برای ساخت شبکه هم بیان ژنی وزندار

Max.k	Median.k	Mean.k	Truncated.R.Sq	Slope	SFT.R.Sq	Power	
۲۷۶۰	۱/۷۲e+۰۳	۱۶۹۰/۰۰	۰/۶۳۴	۰/۳۶۱	۰/۵۱۷	۱	۱
۱۸۵۰	۷/۳۶e+۰۲	۸۰۰/۰۰	۰/۸۱۴	-۰/۴۱۲	۰/۷۷۴	۲	۲
۱۳۶۰	۳/۴۸e+۰۲	۴۵۵/۰۰	۰/۹۳۶	-۰/۶۷۸	۰/۹۱۷	۳	۳
۱۰۵۰	۱/۷۵e+۰۲	۲۸۳/۰۰	۰/۹۴۲	-۰/۸۲۸	۰/۹۳۱	۴	۴
۸۴۵	۹/۱۶e+۰۱	۱۹۸/۰۰	۰/۹۶۳	-۰/۹۱۰	۰/۹۴۸	۵	۵
۶۹۶	۴/۹۵e+۰۱	۱۳۳/۰۰	۰/۹۶۷	-۰/۹۶۵	۰/۹۵۰	۶	۶
۵۸۵	۲/۷۶e+۰۱	۹۶/۹۰	۰/۹۷۶	-۰/۹۹۶	۰/۹۵۹	۷	۷
۴۹۹	۱/۶۰e+۰۱	۷۲/۹۰	۰/۹۷۱	-۱/۰۲۰	۰/۹۵۳	۸	۸
۴۳۳	۹/۷۶e+۰۰	۵۶/۲۰	۰/۹۶۶	-۱/۰۵۰	۰/۹۵۵	۹	۹
۳۸۱	۵/۹۹e+۰۰	۴۴/۳۰	۰/۹۷۷	-۱/۰۷۰	۰/۹۶۵	۱۰	۱۰
۳۳۸	۳/۷۷e+۰۰	۳۵/۶۰	۰/۹۶۹	-۱/۰۹۰	۰/۹۶۱	۱۱	۱۱
۳۰۳	۲/۳۷e+۰۰	۲۹/۰۰	۰/۹۶۴	-۱/۱۰۰	۰/۹۶۰	۱۲	۱۲
۲۷۳	۱/۵۳e+۰۰	۲۳/۹۰	۰/۹۶۳	-۱/۱۲۰	۰/۹۶۲	۱۳	۱۳
۲۴۸	۱/۷۴e-۰۱	۲۰/۰۰	۰/۹۶۶	-۱/۱۲۰	۰/۹۶۶	۱۴	۱۴
۲۲۶	۶/۴۶e-۰۱	۱۶/۹۰	۰/۹۶۱	-۱/۱۳۰	۰/۹۶۴	۱۵	۱۵
۲۰۸	۴/۱۹e-۰۱	۱۴/۴۰	۰/۹۶۱	-۱/۱۴۰	۰/۹۶۶	۱۶	۱۶
۱۹۲	۲/۷۹e-۰۱	۱۲/۴۰	۰/۹۵۸	-۱/۱۵۰	۰/۹۶۵	۱۷	۱۷
۱۷۸	۱/۸۹e-۰۱	۱۰/۸۰	۰/۹۴۸	-۱/۱۶۰	۰/۹۵۸	۱۸	۱۸
۱۶۶	۱/۸۲e-۰۱	۹/۴۰	۰/۹۵۰	-۱/۱۶۰	۰/۹۶۰	۱۹	۱۹
۱۵۵	۸/۷۸e-۰۲	۸/۲۷	۰/۹۵۱	-۱/۱۶۰	۰/۹۶۱	۲۰	۲۰

جدول ۲. مسیرهای بیولوژیکی و انتولوژی ژنی معنی دار متعلق به مازول سبز

Term	P.val	Adjusted p.val	Oddsratio	Combined score	Genes
Legionellosis	۰/۰۰۱۹	۰/۰۹۲۷۷۹	۱۳/۲۹۳۱۷۲۶۹	۸۳/۲۹۶۸۴۷۸۶	CXCL8;HSPA1B;HSPA1A
Coronavirus disease	۰/۰۰۳۲۶۹	۰/۰۹۲۷۷۹	۵/۳۵۳۵۱۰۶۳۳	۳۰/۶۳۸۸۲۶۳۲	RPS26;CXCL8;RPL21;RPL36A-HNRNPH2;RPL36A
Spliceosome	۰/۰۰۴۰۱	۰/۰۹۲۷۷۹	۶/۶۰۴۷۴۴۰۴	۳۶/۴۵۲۰۱۳۱۹	U2AF1L5;U2AF1;HSPA18;HSPA1A
Ribosome	۰/۰۰۴۸۲	۰/۰۹۲۷۷۹	۶/۲۵۹۱۰۶۷۴۷	۳۳/۳۹۲۶۰۹۷۷	RPS26;RPL21;RPL36A-HNRNPH2;RPL36A
Prion desease	۰/۰۳۰۱۸۲	۰/۴۶۴۸۰۳	۳/۵۶۲۴۲۶۳۳۱	۱۲/۴۷۰۳۰۷۸۱	PSMC1;HSPA1B;SLC25A 6;HSPA1A
Antigen processing and presentation	۰/۰۴۴۴۶۲	۰/۵۷۰۵۹۳	۶/۲۱۴۹۱۲۲۸۱	۱۹/۳۴۷۸۰۳۸۹	HSPA1B;HSPALA
Lipid and atherosclerosis	۰/۰۶۵۵۶۷	۰/۶۰۷۹۴۸	۳/۳۵۹۰۵۸۸۷۷	۹/۱۵۲۳۰۳۷	CXCL8;HSPA18;HSPA1A
Longevity regulating pathway	۰/۰۷۱۴۳۷	۰/۶۰۷۹۴۸	۴/۷۱۷۶۱۹۰۴۸	۱۲/۴۴۹۴۸۰۰۵	HSPA1B;HSPA1A
Other glycan degradation	۰/۰۷۴۶۶۵	۰/۶۰۷۹۴۸	۱۳/۷۶۹۵۵۰۱۷	۳۵/۷۲۸۴۴۲۲۵۸	GBA
Toxoplasmosis	۰/۰۸۳۹۰۴	۰/۶۰۷۹۴۸	۴/۲۸۶۵۸۰۰۸۷	۱۰/۶۲۲۴۹۱۲۳	HSPA1B;HSPA1A
shigellosis	۰/۰۸۹۶۹۷	۰/۶۰۷۹۴۸	۲/۹۲۵۹۲۵۹۲۶	۷/۰۵۵۳۴۹۵۷۹	U2AF1L5;CXCL8;U2AF1
RIG-I-like receptor signaling pathway	۰/۲۶۰۷۸۸	۰/۶۶۵۲۸۳	۳/۳۸۳۶۳۱۷۱۴	۴/۵۴۷۵۶۶۶۱	CXCL8
Pertussis	۰/۲۷۹۷۲۴	۰/۶۶۵۲۸۳	۳/۱۱۲	۳/۹۶۴۵۳۷۴۶۵	CXCL8
Parkinson disease	۰/۲۹۰۴۳۳	۰/۶۶۵۲۸۳	۱/۸۹۵۷۹۷۱۸۵	۲/۳۴۳۹۳۰۰۵۵	PSMC1;SLC25A6
phpmatoidarthritic	۰/۳۳۰۸۱۱	۰/۶۶۵۲۸۳	۲/۵۳۴۷۸۲۶۰۹	۲/۸۰۴۰۰۰۴۹۶	CXCL8

برای تعیین مهم ترین مازول ها، بر روی مازول های به دست آمده در هر بیماری، آنالیز ارتباط مازول-صفت را انجام دادیم که نتایج این آنالیز در شکل قابل مشاهده هستند (شکل های ۳ و ۴).

با همراه EigenGenes adjacency heatmap نیز این مرحله را به ترتیب در شکل‌های ۶ و ۷ نشان می‌دهد.

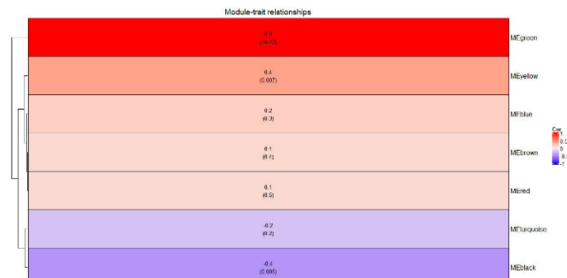
در شکل ۶ نیز heatmap بیان ژن‌های ۵۰۰ ژن منتخب ماژول‌ها نمایش داده می‌شود و مشخص گردید که تمامی ژن‌های ماژول سبز رنگ دارای افزایش بیان معنی‌دار هستند. سپس برای ماژول سبز تجزیه و تحلیل غنی سازی ژنی ۱ انجام شد. ۷۷ مسیر سلولی مشخص گردید که از Enrichment analysis بین این مسیرها معنی‌دارترین انتخاب گردید (جدول ۲).

سپس آنالیز فرایندها و مسیرهای زیستی معنی‌دار و مرتبطی با ژن‌های موجود در این ماژول که Pvalue آنها کمتر از ۰/۱ بود، بررسی شد تا بتوان ژن‌هایی که با هم برهمکنش داشته و در یک مسیر زیستی قرار می‌گیرند انتخاب شوند. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود ۶ ژن انتخاب شد و با استفاده از NCBI تعداد رونوشت آنها مشخص شد (جدول ۳).

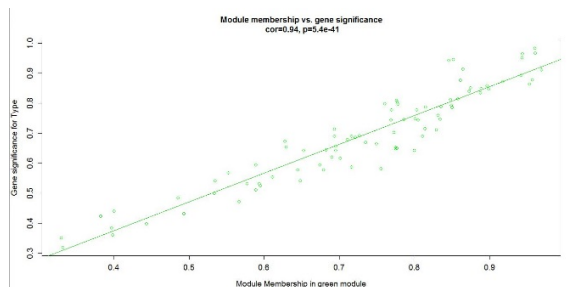
سپس با استفاده از پکیج Limma آنالیز تعیین لیست ژن‌های افتراقی (DEG) انجام گردید. برای این منظور از بیان ژن‌های ورودی TPM میانگین گرفته و ژن‌های دارای واریانس TPM بیشتر از ۲ را نگه داشتیم. سپس به منظور نرمال سازی داده‌ها از روش eBayes به مدل خطی استفاده کردیم. در این آنالیز از معیار P-value برای انتخاب مجموعه ژن‌های منتخب استفاده کردیم. بعد از آنالیز DEGs، ژن‌هایی که دارای adj.P.Value کمتر از ۰/۰۵ بودند را انتخاب کردیم. ژن‌ها را براساس افزایش یا کاهش بیان دسته بندی کردیم. نکته جالب توجه این مورد بود که ژن‌های DEG+ با ماژول سبز رنگ همپوشانی بالایی داشتند. در مرحله بعد ژن‌های با کاهش بیان را که دارای P-value Adjusted کمتر از ۰/۰۱ بودند را انتخاب کرده و بر اساس اطلاعات موجود در keGG مسیرهای دخیل را غنی سازی کردیم (جدول ۴).

همان طور که مشخص شده است، معنی‌دارترین مسیرها به صورت پر رنگ نشان داده شده‌اند که از این بین مسیر سیگنالینگ MAPK بیشترین معنی‌داری را نشان داده است. پس از آن همان طور که در ابتدای مطالعه گزارش گردید در مورد lncRNA نیز از توالی‌های مورد نظر DEG گرفته و آنها را بر اساس افزایش upRegulate و downRegulate شدن در فایل‌های جداگانه قرار دادیم تا در مراحل بعد اینتراکشن‌های آنها را با یکدیگر بباییم (جدول‌های ۵ و ۶).

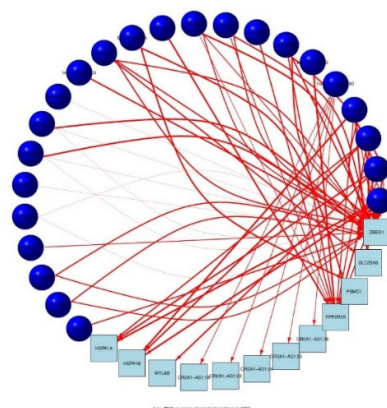
شبکه فیزیکی اینترکشن به دست آمده از IncTAR طبق شکل ۶ است. در این شبکه دایره‌ها نشان دهنده lncRNAها و مربع‌های آبی نشان دهنده mRNA است. خطوط قرمز پر رنگ اینترکشن‌های up-regulated و خطوط قرمز کم‌رنگ برهمکنش‌های down-regulated می‌باشد. همان طور که مشاهده می‌شود



شکل ۳. نتایج حاصل از آنالیز ماژول-صفت مرتب شده



شکل ۴. آنالیز عضویت در ماژول سبز و تجزیه و تحلیل اهمیت ژن در سرطان کولورکتال برای داده‌های mRNA



شکل ۵. فیزیکی اینتراکشن نهایی بین mRNA و ncRNAهای منتخب

در ادامه آنالیز عضویت در ماژول سبز و تجزیه و تحلیل اهمیت ژن نیز انجام شده که نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. برخی از ماژول‌ها مانند ماژول‌های سبز دارای ضریب همبستگی قابل توجه ۰/۹۴ با  $pvalue=5/4e^{-41}$  هستند.

برای درک بهتر ماهیت هر ماژول، مطالعه برهمکنش ژن‌های مهم هر ماژول حیاتی است (شکل ۵).

یک روش مورد قبول برای مطالعه روابط EigenGenes ماژول‌ها با یکدیگر، قراردادن آنها در یک heatmap adjacency است. به منظور نمایش میزان ارتباط بین آنها به مربوط EigenGenes dendrogram

جدول ۳. لیست ژن های منتخب UP-regulated پس از دو مرحله فیلتر GEPIA و KEGG

Transcript1	Number of transcript	KEGG	GEPIA	GeneSymbol
NM_001636/4	1	1	1	C25A6
NM_005346/6	1	1	1	HSPA1B
NM_002802/3	1	1	1	PSMC1
NM_009962/2	1	1	1	MYL6B
NM_013239/5	1	1	1	PPP2R3B
NM_001171135/2	3	1	1	ZBED1
NM_005345/6	1	.	.	HSPA1A

جدول ۴. لیست ژن های downregulated حاصل از DEG

A	B	C	D	E	F	G	H	I
	logFC	AveExpr	t	P.val	Adj.p.val	B	GEPIA	transcript
AKT3	-۸۲/۱۰۵۰۶۸۸۴	۲۳۱/۷۱۵۶۴۴۳	-۶/۵۶۱۵۵۱۱۸۶	۰۸e-۵/۵۶	۰۵e-۱/۳۶	۵/۹۵۵۷۸۳۹۹۷	-۱	۴
MEF2C	-۶۲/۵۳۱۱۰۲۵۹	۵۴۶۰۹۱۳:۱۸۴	-۶/۴۶۳۶۶۸۳۸۵	۰۸e-۷/۷۲	۰۵e-۱/۸۵	۵/۷۳۳۲۳۰۸۳۵	-۱	۳۶
MARCHF1	-۳۶/۱۸۱۷۳۷۵۴	۲۶/۳۱۳۹۹۰۹۴	-۵/۲۹۱۳۷۹۱۱۶	۰۶e-۳/۸۸	۰/۰۰۰۶۶۸۰۹۸	۳/۰۰۸۳۳۹۳۰۱	-۱	۳
RAB30	-۲۲/۹۷۷۸۶۶۰۸	۴۶/۸۸۱۳۶۵۰۷	-۵/۲۹۲۳۰۵۴۵۳	۰۶e-۳/۸۶	۰/۰۰۰۶۶۸۰۹۸	۳/۰۱۰۵۱۶۳۷۳	-۱	۴
HDAC9	-۲۷/۳۸۶۹۸۴۶۵	۸۳/۰۴۸۱۵۱۳۲	-۴/۸۸۳۲۶۶۱۳	۰۵e-۱/۴۸	۰/۰۰۲۳۱۵۵۷۶	۲/۰۵۰۱۰۳۹۲۱	-۱	۳۹
MARCH2	-۶۲/۲۲۵۲۲۰۴۷	۴۵/۲۵۴۷۰۵۸	-۴/۴۸۳۰۳۶۰۹۹	۰۵e-۵/۳۹	۰/۰۰۷۰۹۷۸۰۲	۱/۱۱۷۶۱۰۲۰۲	-۱	۱
NEMF	-۴۴/۵۷۶۸۸۹۰۵	۱۵۳/۱۲۷۷۱	-۴/۴۷۷۷۲۶۶۴۵	۰۵e-۵/۴۸	۰/۰۰۷۱۳۸۸۰۶	۰/۰۰۷۱۳۸۸۰۶	-۱	۲
ANKRD12	-۹۹/۲۶۳۹۶۹۲	۵۳۵/۰۴۰۶۴۱۷	-۴/۴۴۹۳۴۵۸۴۹	۰۵e-۶/۰۰	۰/۰۰۷۷۲۸۴۹۵	۰/۰۰۷۷۲۸۴۹۵	-۱	۳

جدول ۵. خروجی lncRNA های up-regulated

	Incpedia	LogFC	AveExpr	t	P.value	Adj.p.val	B
CH507-513H4.4	1	۶۹/۰۲۷	۲۵/۰۷۷۷۱۱	۲۵/۰۸۷۷۱۱	۱۰e-۳/۹۴	۰۸e-۲/۴۷	۱۲/۲۵
BMS1P2	1	۵/۹۴۶۸۸	۳/۵۵۵۰۷۲۱	۷/۹۱۱۳۸	۱۰e-۶/۳۷	۰۸e-۳/۶۲	۱۱/۸۳
RP11-144G6.12	۲	۵/۷۷۵۲	۴/۰۴۱۲۳۴۶	۷/۲۷۵۸۷	۰۹e-۵/۱۷	۰۷e-۱/۹۹	۱۰/۰۱
CH507-513H4.6	1	۶/۸۸۱۶۵	۲/۷۷۵۰۰۱۳	۶/۷۶۸۹۷	۰۸e-۲/۷۹	۰۷e-۹/۵۲	۸/۵۳۶
RN7SL1	۲	۱۴۰۸۵/۶	۳۶۳۹۹/۷۷۶	۶/۱۳۴۸۴	۰۶e-۶/۵۱	۰/۰۰۰۱۵	۳/۷۰۳
RP11-206L10.2	1	۳/۴۳۳۷	۲/۰۰۵۵۳۴۸	۵/۰۵۸۸۶	۰۶e-۸/۳۶	۰/۰۰۱۸۸	۳/۴۸۱
RMRP	۲	۱۰۰/۴۰۷	۶۴/۵۵۷۴۳۸	۴/۹۹۸۳۹	۰۵e-۰۲/۱	۰/۰۰۰۲۲۵	۳/۳۰۴
RPPH1	۲	۱۴۲/۶۲۹	۳۱۱/۳۰۸۶۴	۴/۶۵۳۲۶	۰۵e-۳/۱۳	۰/۰۰۰۶۴	۲/۳۰۴
FAM157A	۲	۳/۸۸۲۷۸	۲/۶۵۹۵۲۵	۴/۴۴۶۳۴	۰۵e-۶/۰۷	۰/۰۰۱۱۸۶	۱/۷۱۴
FAM157C	۹	۷/۸۱۹۷۲	۳/۴۱۰۹۷۵۶	۴/۳۸۹۳۹	۰۵e-۷/۲۷	۰/۰۰۱۳۷۶	۱/۵۵۳
RP11-706015.5	۵	۱۷/۶۱۲۷	۱۰/۶۶۳۴۰۳	۴/۳۰۰۱۹	۰۵e-۹/۶۴	۰/۰۰۱۷۴۱	۱/۳۰۲
Rp11-706015.3	۴	۱۵/۱۹۵۵	۸/۴۶۷۸۲۴۴	۳/۷۳۸۶۷	۰/۰۰۰۵۴۲۱۷	۰/۰۰۸۰۷۸	-۰/۲۳
OR2A1	۲۶	۳/۱۲۸۶۲	۲/۵۷۹۶۷۶۵	۳/۷۲۲۵۶	۰/۰۰۰۵۶۸۹۵	۰/۰۰۸۳۷۳	-۰/۳۷

این مشخصات با علائم کلینیکی و پاتولوژیکی بیماری است. تعداد زیادی ژن به عنوان ژن های دخیل در سرطان کولورکتال گزارش شده اند. برخی از این ژن ها در پاره ای از مطالعات به عنوان ژن های مهار شده و در بعضی دیگر به عنوان ژن های القا شده گزارش شده اند. برای روشن شدن این تناقض ها در گزارش ها، درک مکانیسم ها و فرآیندهای

بیشترین اینترکشن با mRNA ژن ZBED1 و سپس PPP2R3B است (شکل ۵).

### یافته ها

سرطان کولورکتال جزء بیماری های شایع در جهان، به خصوص در ایران است. از مشخصه های بارز این بیماری، ناهمگونی زیاد در مشخصات ژنتیکی آن و عدم همبستگی

جدول ۶. خروجی IncRNAهای down-regulated

A	B	C	D	E	F	G	H
	LogFC	AveExpr	t	P.value	Adj.p.val	B	Incpedia
RP11-206F17.2	-۸/۰۰۴۸۸۴۰۷۸	۱۰/۴۶۴۵۰۲۲۶	-۵/۵۷۳۶۰۱۰۸۴	۰۶E-۱/۵۲	۰۵E-۴/۱۳	۴/۹۹۷۲۲۰۴۵۶	.
RPL13p12	-۵۹/۹۹۱۷۶۲	۷۶/۹۶۷۳۲۸۱۶	۴/۱۳۷۴۱۵۵۴	۰/۰۰۰۱۶۰۴۰۳	۰/۰۰۲۸۵۳۷۴۵	۰/۴۸۳۸۱۳۹۲۳	.
ZFAS1	۳۲/۶۴۳۴۵۱۳۵	۳/۳۷۸۰۷۸۱۰۳	۴/۰۰۴۵۵۰۷۵۴	۰/۰۰۰۲۴۱۹۰۵	۰/۰۰۴۱۱۹۲۹۲	۰/۳۷۹۴۳۹۹	۳۰
PSMA6P1	۲/۷۷۰۱۵۷۷۰۹	۱۳/۵۶۹۵۴۵۲	۳/۹۱۴۰۰۴۶۰۴	۰/۰۰۰۳۱۹۱۷۸	۰/۰۰۵۱۴۱۳۶	۰/۰۲۸۰۳۸۸۹	.
RP11-651P23.4	۶/۰۱۹۳۰۰۰۷۱	۲۹/۹۴۳۶۴۸۶۳	۳/۶۹۸۱۱۲۴۳	۰/۰۰۰۶۱۲۰۲۷	۰/۰۰۸۸۹۶۷۷۸	-۰/۳۸۸۸۸۳۷۴	.
ABALONRPS3AP47	۲۲/۳۴۱۱۲۸۹۹	۱۰/۲۲۷۳۹۴۷۵	۳/۶۷۸۸۴۲۳۸۲	۰/۰۰۰۶۴۸۱۷۶	۰/۰۰۹۳۰۸۷۴۸	-۰/۴۲۳۵۷۱۴۶	.
RP11-592N21.1	۲۱/۴۵۷۱۶۶۷	۳۸/۵۳۱۱۶۹۷۲	۳/۴۹۹۲۳۹۸۰۵	۰/۰۰۰۸۸۷۸۸۱	۰/۰۱۲۳۰۰۹۰۳	-۰/۸۵۴۹۵۵۵۹۸	.
UBQLN4p1	۱۰/۵۱۵۵۹۹۶۹	۲/۷۸۱۲۴۱۱۲۸	۳/۴۵۴۴۷۹۲۵۹	۰/۰۰۱۱۲۸۲۵۴	۰/۰۱۴۷۸۹۸۷۱	-۰/۹۶۹۲۴۲۱۱۷	.
RP11-543p15.1	۲/۶۸۰۵۸۶۲۱۷	۷۵۲/۱۰۹۵۹۰۸	۳/۴۵۰۵۰۰۴۳۲	۰/۰۰۱۲۵۲۴۷۲	۰/۰۱۶۰۵۳۱۸۵	۰/۹۷۹۳۶۳۶۰۲	.
RPL13AP25	۴۱۵/۱۶۲۶۹۱۱	۱۰۱/۷۸۶۲۲۷۱	۳/۴۲۶۱۸۴۰۴	۰/۰۰۱۲۶۶۹۸۱	۰/۰۱۶۰۶۶۳۹۴	۱/۰۴۱۰۸۴۴۱۸	.
BCLAF1p2	۵۸۰۶۶۳۷۷۱۶	۹/۶۹۶۹۵۳۳۴۸	۳/۴۱۹۲۵۸۱۵	۰/۰۰۱۳۵۹۲۰۱	۰/۰۱۷۳۵۳۴۱۸	۰/۰۷۴۶۳۹۷۶۷	.
RPSAP19	۱۲/۸۰۵۷۶۶۶۶	۲۲/۲۲۴۹۷۵۲۲	۳/۲۴۴۳۰۷۲۴۵	۰/۰۰۲۱۰۰۹۹	۰/۰۲۵۲۲۷۶۸۱	۱/۴۹۵۰۸۸۴۱	.
VIM.AS1	-۵۷/۳۰۰۸۶۸۸۳	۸۴/۶۶۴۶۵۷۴۵	۳/۲۲۸۵۴۵۵۰۳	۰/۰۰۲۳۸۵۵۴۴	۰/۰۲۶۰۸۷۷۸۸	۰/۵۳۳۷۷۲۶۲۸	۱۸
Bp-218909.2	۵/۲۳۲۰۲۸۱۹۶	۶/۱۹۰۴۱۳۶۸۵	۳/۲۲۲۲۱۵۱۹	۰/۰۰۲۴۲۸۲۸۴	۰/۰۲۶۱۹۳۸۹۴	۱/۵۴۹۲۷۸۴۹۹	.

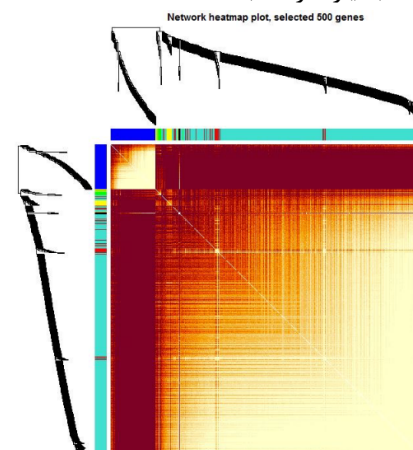
پیشرفت‌های ابزاری که در تولید داده‌های توان بالا در سطوح مختلف بیولوژیکی صورت گرفته است، امکان به دست آوردن دید جامع بر فنوتیپ‌های بیولوژیکی پیچیده مانند سرطان کولورکتال را فراهم می‌کند. یکپارچه سازی شبکه اندرکنش ژنی و شبکه تنظیمی RNA، در درک مسیرهای مهم بیولوژیکی، ژن‌ها و IncRNAهای تأثیرگذار در این مسیرها که در فرآیند ایجاد فنوتیپ مورد بررسی درگیرند، سودمند است. در این مطالعه داده‌های بیانی ژن و IncRNA استخراج شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به افراد سالم، مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۷. Eigengenes adjacency heatmap برای داده‌های mRNA در نمونه‌های مورد مطالعه

برای به دست آوردن گروه‌های ژن هم بیان در سرطان از آنالیز شبکه هم بیان ژنی و زندهار استفاده شد. شبکه‌ها نمایش مستقیمی از تعاملات بین گروه‌ها را ارائه می‌دهند. مفاهیم شبکه بصری (به عنوان مثال، اتصال و ماژول) برای تجزیه و تحلیل تعاملات پیچیده مفید هستند. روش‌های مبتنی بر

سلولی که عامل این تناقض‌ها هستند، زیست شناسی سامانه-ای می‌تواند بسیار کارآمد باشد.



شکل ۸. Heatmap بیان ۵۰۰ ژن mRNA منتخب ماژول‌های سرطان کولورکتال

ژنتیک سامانه‌ای شامل روش‌هایی است که تأکید بر استفاده از شبکه‌ها برای توصیف ارتباط بین ترنسکریپتوم، خصوصیات فیزیولوژیک و مارکرهای ژنتیکی دارد. نمونه‌ای از این روش‌ها، شبکه‌های ژنی هم بیان و زندهار (WGCNA) هستند. این روش با تمرکز بر گروه‌های ژنی هم بیان به جای ژن‌های انفرادی بر مشکلات ناشی از آنالیز اطلاعات میکروآری مرسوم غلبه می‌کند. همچنین به جای مرتبط کردن هزاران ژن به یک متغیر پاتولوژیکی خاص، در این روش همبستگی چند گروه ابرژن با آن متغیر بررسی می‌شود که معمولاً ژن‌های هرگروه در یک مسیر بیولوژیکی خاص درگیر هستند.



شبکه در بسیاری از حوزه‌ها مفید بوده‌اند، به عنوان مثال شبکه‌های بیان همزمان ژن، شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین، شبکه‌های برهمکنش سلول-سلول. در اینجا، شبکه WGCNA مبتنی بر DEG برای شناسایی ژن‌های هاب در شبکه تنظیمی مرتبط با CRC ساخته شد. هنگامی که یک بیماری رخ می‌دهد، ممکن است هزاران ژن وجود داشته باشند که به طور متفاوت بیان می‌شوند، اما این ژن‌ها نقش‌های متفاوتی در روند بیماری ایفا می‌کنند. بنابراین، در اینجا از درجه برای ارزیابی اهمیت یک ژن در شبکه نظارتی استفاده کردیم. به عنوان یک کلاس متمرکز جدید از RNAهای غیرکدکننده، نشان داده شد که lncRNAها در فرآیندهای بیولوژیکی متعددی از جمله غیرفعال‌سازی کروموزوم X، چاپ ژنومی و تغییرات مرتبط با تومور شرکت می‌کنند. گزارش‌های جمع‌آوری شده، عدم تنظیم lncRNA و پتانسیل آنها را به عنوان نشانگرهای زیستی در CRC نشان داده‌اند. شبکه هم بیان mRNA-lncRNA با استفاده از WGCNA بسته R ساخته شد. براساس یافته‌های آنالیز شبکه هم بیان ژنی وزندار، گروه ژنی براساس پروفاایل بیانی ژن‌های با تفاوت بیان در سرطان بدخیم کولورکتال یافت شد. همان گونه که انتظار می‌رفت ژن‌های موجود در هرکدام از این گروه‌ها، یک یا چند فعالیت بیولوژیکی خاص را انجام می‌دهند. اهمیت پاتولوژیکی گروه‌ها را میتوان با استفاده از میزان بیان گروه‌ها دسته بندی کرد. از بین گروه‌ها، گروه سبز دارای بیشترین مقدار همبستگی و معنی‌داری بودند و به همین دلیل فرض بر این است که بیشترین تأثیر را در روند پیشرفت سرطان دارند (شکل‌های ۷ و ۸). بررسی تفسیر و غنی سازی ژن‌های گروه‌های سبز در نقشه heatmap نشان می‌دهد مسیر چسبندگی سلول - سلول، جزء مسیرهای بیولوژیکی مشخصه در سرطان است. بخش مهم دیگری از این مطالعه مرتبط به شناسایی ژن‌های کلیدی است. در این پروژه براساس یافته‌های آنالیز شبکه هم بیان ژنی وزندار، ۸۶ گروه ژنی براساس پروفاایل بیانی ژن‌های با تفاوت بیان در سرطان بدخیم کولورکتال یافت شد. همان گونه که انتظار می‌رفت ژن‌های موجود در هرکدام از این گروه‌ها، یک یا چند فعالیت بیولوژیکی خاص را انجام می‌دهند. اهمیت پاتولوژیکی گروه‌ها را می‌توان با استفاده از میزان بیان گروه‌ها دسته بندی کرد. از بین گروه‌ها همان طور که گفته شد، گروه سبز دارای بیشترین مقدار همبستگی و معنی‌داری بودند و به همین دلیل فرض بر این است که بیشترین تأثیر را در روند پیشرفت سرطان دارند. در مطالعات پیشین، از میان ژن‌های کلیدی گروه سبز، ژن HSPA1B

PPP2R3B.HSPA1A مربوط به سرطان کولورکتال گزارش شده است که در مطالعات گذشته نیز مشترک بودند. همانطور که در سال ۲۰۲۱ مطالعاتی توسط izabela szczuka انجام شد و نشان داد HSPA1 در پولیپ‌ها در سطح قابل مقایسه‌ای بیان شد. تغییر در بیان HSPA1 بین پولیپ و بافت طبیعی در بیماران مبتلا به دیسپلازی درجه بالا یا آدنوکارسینوم در پولیپ به طور قابل توجهی بیشتر بود (۷). تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۸ انجام شد نشان داد PPP2R3B پروتئین فسفاتاز ۲ یکی از چهار فسفاتاز اصلی سرین ترئونینی است و در کنترل منفی رشد و تقسیم سلولی نقش دارد (۹). در سال ۲۰۲۱ تحقیقاتی که بر روی ملانوما انجام شد، حساسیت ژنتیکی گزارش نشده قبلی به ملانوم و خال‌های ملانوسیتیک و تکرارهای خانوادگی ژن PPP2R3B را شناسایی کردند. Ppp2r3b تکرار بیان PR70 را در خال انسان افزایش می‌دهد و افزایش بیان در بافت ملانوم با بقا از طریق یک مکانیسم غیر ایمونولوژیک ارتباط دارد. بیان بیش از حد PPP2R3B باعث تغییر سلول‌های رنگدانه به سمت تکثیر و دور شدن از مهاجرت می‌شود (۱۸).

به طور خلاصه در این مطالعه داده‌های بیانی ژن و lncRNA که از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد سالم استخراج شده بود مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز هم بیان ژنی وزندار برای به دست آوردن گروه‌های ژنی در تومور بدخیم استفاده شد و همبستگی این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر مبنای تحلیل‌های انجام شده روی داده‌های زیستی به دست آمده از پایگاه داده‌های معتبر و مقایسه‌های به عمل آمده به این نتیجه رسیدیم که گروه ژنی و شبکه‌ی اینترکشن فیزیکی بین mRNA و lncRNAهای منتخب با مطالعات قبلی همسو هستند و می‌توانند باعث تغییر مشخص و قابل ردیابی در پروفاایل بیان ژنی و الگوی ترانسکریپتومی خون افراد مبتلا به سرطان کولورکتال شوند. در نتیجه با مقایسه افراد سالم و بیمار و شناسایی تفاوت پروفاایل بیان ژنی می‌توان به یک بیومارکر مناسب جهت شناسایی و تشخیص افراد مبتلا به سرطان کولورکتال دست یافت.

### بحث

در این پروژه براساس یافته‌های آنالیز شبکه هم بیان ژنی وزندار، ۸۶ گروه ژنی براساس پروفاایل بیانی ژن‌های با تفاوت بیان در سرطان بدخیم کولورکتال یافت شد. همان گونه که انتظار می‌رفت ژن‌های موجود در هرکدام از این گروه‌ها، یک یا چند

جمله خانواده‌های HSP70 و HSP90، مولکول‌هایی هستند که در همه جا حاضر هستند و از نظر فیلوژنتیکی حفظ شده‌اند. به طور مداوم، HSP70 و HSP90 در تعدادی از انواع سرطان، از جمله CRC، اطمینان از تکثیر سلول‌های سرطانی، بقا و تهاجم و پیش بینی نتایج بدتر در بیماران سرطانی بیان می‌شوند. بیان HSPA1 و HSP90AA1 در بیماران مبتلا به پولیپ کولورکتال تجزیه و تحلیل دوتایی پولیپ منطبق با بیمار و بافت مجاور (طبیعی) افزایش سه برابری قابل توجهی را در بیان HSPA1 و HSP90AA1 در پولیپ نشان داد.

HSPA1 در پولیپ‌ها در سطح قابل مقایسه‌ای بیان شدند. تغییر در بیان HSPA1 بین پولیپ و بافت طبیعی در بیماران مبتلا به دیسپلازی درجه بالا یا آدنوکارسینوم در پولیپ به طور قابل توجهی بیشتر بود. تغییر در بیان HSP90AA1 در بیماران مبتلا به پولیپ با درجه بالا یا آدنوکارسینوم به دلیل بیان کمتر در مخاط طبیعی مجاور پولیپ، بیشتر بود. بیان HSPA1 و HSP90AA1، پروتئین‌های کلیدی شوک حرارتی که در تسهیل تحول نئوپلاستیک و توسعه سرطان نقش دارند، در ضایعات پیش سرطانی کولورکتال و بافت اطراف آن تا حدی تغییر می‌کند که به پتانسیل پولیپ برای بدخیمی وابسته است. پروتئین‌های شوک حرارتی به دلیل نقش اصلی آنها در پروتئوستاز و سیگنال‌دهی سلولی، یک هدف منحصر به فرد برای درمان‌های ضد نئوپلاستیک هستند که نویدبخش دور زدن انعطاف‌پذیری سرطان هستند. در اینجا، ما نشان دادیم که هر دو رونوشت HSPA1 و HSP90AA1 در پولیپ‌های کولورکتال در مقایسه با بافت مجاور پولیپ به یک میزان تنظیم مثبت می‌شوند. ارتباط بین بیان پروتئین Hsp70 و پیش آگهی بیماران، اما نه درجه تومور یا مرحله سرطان، متعاقباً توسط دیگران تأیید شد. به همین ترتیب، افزایش Hsp70 در سرم با پیش آگهی ضعیف و پیشرفت بیماری مرتبط است. در اینجا، میزان بیان HSPA1 بین پولیپ و بافت مجاور به طور قابل توجهی همراه با افزایش پتانسیل بدخیمی افزایش یافت. بالاترین پتانسیل برای بدخیمی به همین ترتیب، میزان بیان HSPA1 در پولیپ‌های مبتلا به دیسپلازی درجه بالا به طور قابل توجهی بالاتر بود. به غیر از نوع پولیپ و درجه دیسپلازی، اعتقاد بر این است که پتانسیل بدخیم مستقیماً با اندازه پولیپ ارتباط دارد (۷). اخیراً در یک مطالعه در سال ۲۰۲۱ که توسط Yufeng Guan و همکارانش انجام شد، متیلاسیون HSPA1A و HSPA9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخص شد که متیلاسیون پروموتور HSPA1A به طور قابل توجهی افزایش و متیلاسیون پروموتور HSPA9 به طور قابل توجهی در بافت‌های

فعالیت بیولوژیکی خاص را انجام می‌دهند. اهمیت پاتولوژیکی گروه‌ها را می‌توان با استفاده از میزان بیان گروه‌ها دسته بندی کرد. از بین گروه‌ها، گروه سبز دارای بیشترین مقدار همبستگی و معنی‌داری بودند و به همین دلیل فرض بر این است که بیشترین تأثیر را در روند پیشرفت سرطان دارند. بخش مهم دیگری از این مطالعه مرتبط به شناسایی ژن‌های کلیدی است. در مطالعات پیشین، از میان ژن‌های کلیدی گروه سبز، ژن HSPA1B و HSPA1A، PPP2R3B مربوط به سرطان کولورکتال گزارش شده است. همچنین لازم به ذکر است که یکی از مسیرهای شایع دخیل که در مطالعه ما نیز به آن اشاره شد، مسیر سیگنالی MAPK است. این مسیر یکی از مهم‌ترین مسیرهای دخیل در تکثیر سلولی است. مسیرهای MAPK در پایین دست بسیاری از گیرنده‌های فاکتور رشد، از جمله گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی، قرار دارند. بیان و فعال شدن بیش از حد این گیرنده در سرطان کولورکتال شناسایی می‌شود و شواهد نشان می‌دهد که بیان و فعال شدن بیش از حد MAPK نقش مهمی در پیشرفت و متاستاز این سرطان دارد. به طور خلاصه در این مطالعه داده‌های بیانی ژن و lncRNA که از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد سالم استخراج شده بود مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز هم بیان ژنی و زنادار برای به دست آوردن گروه‌های ژنی در تومور بدخیم استفاده شد و همبستگی این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر مبنای تحلیل‌های انجام شده روی داده‌های زیستی به دست آمده از پایگاه داده‌های معتبر و مقایسه‌های به عمل آمده به این نتیجه رسیدیم که گروه ژنی و شبکه اینترکشن فیزیکی بین mRNA و lncRNA‌های منتخب با مطالعات قبلی همسو هستند و می‌توانند باعث تغییر مشخص و قابل ردیابی در پروفایل بیان ژنی و الگوی ترانسکرپتومی خون افراد مبتلا به سرطان کولورکتال شوند. در نتیجه با مقایسه افراد سالم و بیمار و شناسایی تفاوت پروفایل بیان ژنی می‌توان به یک بیومارکر مناسب جهت شناسایی و تشخیص افراد مبتلا به سرطان کولورکتال دست یافت. در مورد ژن‌های به دست آمده، تاکنون در مقالات مختلف و در بیماری‌های مرتبط چندین بار نام برده شده که به تعدادی از آنها می‌پردازیم. یکی از ژن‌هایی که در مطالعات گذشته بررسی شده ژن‌های شوک حرارتی هستند. در یک مطالعه که در سال ۲۰۲۱ توسط izabela Szczuka انجام شد، نشان داده شد پروتئین‌های شوک حرارتی HSPA1/Hsp70 و HSP90AA1/Hsp90α برای رشد سرطان بسیار مهم هستند. پروتئین‌های-Weighted Gene Co-expression Network Analysis (HSP)، از

سرطان روده کاهش یافته است. افزایش سطح متیلاسیون ژن HSPA1A و کاهش سطح متیلاسیون HSPA9 با پیش آگهی مطلوب مرتبط بود. تفاوت بیان HSPA1A/HSPA1B/HSPA7/HSPA9 در رده‌های سلولی سرطان کولون و سلول‌های اپیتلیال کولون تایید شد. در این مطالعه به طور خلاصه گزارش شد که افزایش بیان HSPA1A1، HSPA1B، و HSPA7 با پیش آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان کولون همراه است (۸).

در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۸ انجام شد شبکه PPI نشان داد که ژن‌های هاب CCND1، PPP2CA، و YAP1 هستند. در این مطالعه پایگاه‌های داده Oncomine را بررسی کردند و دریافتند که بیان mRNA ژن PPP2CA در بافت‌های CRC در مقایسه با بافت‌های عادی کمتر بود. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد که بیان PPP2CA با مسیر سیگنالینگ انتقال اپیتلیال - مزانشیمی مرتبط است. بیان کم PPP2CA با بقای کلی بدتر برای CRC همراه بود و اهمیت خود را به عنوان یک عامل پیش آگهی مستقل برای CRC حفظ کرد. PPP2CA ممکن است به عنوان یک انکوژن در پیشرفت سرطان کولورکتال عمل کند. علاوه بر این، PPP2CA پتانسیل استفاده به عنوان نشانگرهای پیش آگهی یا اهداف درمانی در CRC را دارد. نمودارهای غنی سازی GSEA نشان داد که امضاهای ژنی آنژیوژن (NES=۰/۱۴) در بیماران با بیان PPP2CA کمتر نسبت به بیماران با بیان PPP2CA بالاتر فعال‌تر بود. این نشان می‌دهد که PPP2CA ممکن است با درگیر شدن در چندین مسیر سیگنالینگ مرتبط با سرطان در بیماران CRC به پیشرفت بیماری کمک کند. در مقایسه با بافت طبیعی، مشخص شد که PPP2CA در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. تجزیه و تحلیل بقای Kaplan-Meier نشان داد که بیماران با بیان PPP2CA کم، زمان بقای قابل توجهی کوتاه‌تری نسبت به بیماران با بیان بالا داشتند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیان بیش از حد PPP2CA می‌تواند رشد و متاستاز تومور پروستات را مهار کند و انواع ژنتیکی در PPP2CA با خطر سرطان معده مرتبط است. مطالعه قبلی نشان داد که متیلاسیون و فسفوریلاسیون PPP2CA نقش مهمی در فعالیت پروتئین فسفاتاز ۲ A ایفا می‌کند. فعالیت PP2A پس از کاهش سطح بیان PPP2CA کاهش یافت و غیرفعال شدن PP2A باعث رگرایی سلول‌های اندوتلیال همانژیوم می‌شود (۹). PPP2R3B پروتئین فسفاتاز ۲ یکی از چهار فسفاتاز اصلی سرین ترئونینی است و در کنترل منفی رشد و تقسیم سلولی نقش دارد. هولوآنزیم‌های پروتئین

فسفاتاز ۲ پروتئین‌های هتروتریمری هستند که از یک زیرواحد ساختاری A، یک زیرواحد کاتالیزوری C و یک زیر واحد تنظیمی B تشکیل شده‌اند. زیرواحد تنظیمی توسط مجموعه متنوعی از ژن‌ها کدگذاری می‌شود که در B/PR55، B39/PR61 گروه بندی شده‌اند. خانواده‌های B39/PR72 این زیر واحدهای تنظیمی مختلف، ویژگی‌های آنزیمی متمایز و محلی سازی‌های درون سلولی را به هولوآنزیم می‌بخشند. مطالعات مختلف تایید کردند که تغییرات بیانی این ژن می‌تواند موجب تغییرات اساسی در تقسیم سلولی و تمایل به سرطانی شدن سلول شود (۱۰). یکی دیگر از ژن‌های شناسایی شده در این شبکه MYL6B بود. میوزین یک ابرخانواده از پروتئین‌های حرکتی است که به‌خاطر اثرات بارز آن بر فرآیندهای حرکتی شناخته شده است و یک زنجیره سبک میوزین می‌تواند انتقال  $Ca^{2+}$  را تعدیل کند. به عنوان یک زنجیره سبک ضروری میوزین، زنجیره سبک میوزین ۶ (MYL6B) در زنده ماندن سلولی، چسبندگی، مهاجرت و اندوسیتوز، نقش دارد. اخیراً توجه فزاینده‌ای به نقش MYL6B در پیشرفت سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولون و کارسینوم کبدی شده است. با این حال، عملکرد MYL6B در آنوکارسینوم رکتوم هنوز مشخص نشده است (۱۱). رابطه تنظیمی بسیار نزدیکی بین سطح بیان ژن lncRNA و microRNA وجود دارد. lncRNAها توألی‌های بلند و غیرکدشونده RNA هستند و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر، تقسیم و تمایز سلولی، پیام رسانی سلولی و آپوپتوز نقش دارند. بنابراین، برهم خوردن تنظیم آنها باعث بروز بیماری‌ها و ناهنجاری‌های مختلف می‌شود. برهم خوردن تعادل در این شبکه تنظیمی که می‌تواند با عملکرد نادرست عوامل تنظیم شونده، تنظیم کننده و یا هر دو اتفاق بیافتد، باعث بروز بیماری‌های مختلف می‌شود. یکی از lncRNAهای مهم شناخته شده اعضای خانواده SNHG شامل SNHG1، SNHG2/GAS5، SNHG3، SNHG4، SNHG5، SNHG6، SNHG7، SNHG8، SNHG9، SNHG11، SNHG10، SNHG28، SNHG2، هستند که به تازگی مشخص شده است در چندین سرطان انکوژن هستند، در مطالعه ما نیز معنی‌دار محاسبه شدند. همچنین اعضای این خانواده به شدت با ژن‌های مرتبط از جمله ZEBD1 که معرفی شدند ارتباط داشتند. همچنین، چندین عضو از خانواده SNHG از جمله SNHG1، SNHG3 و SNHG5 مشخص شده‌اند که تنظیم نشده‌اند و نقش مهمی در سرطان‌های دستگاه گوارش دارند (۱۲).

سرطان‌های مختلفی، مانند سرطان تیروئید، سینه، پانکراس، تخمدان و پروستات در ارتباط است. در این مطالعه انواع SNHG‌ها بررسی شدند. به عنوان مثال، نشان داده شده که، ژن‌های میزبان snoRNA‌ها، ژن‌های میزبان RNA هسته‌ای کوچک (lncRNA (SNHGs)، به طور غیر طبیعی در سرطان‌های متعدد بیان می‌شوند و می‌توانند در تکثیر سلولی، پیشرفت تومور، متاستاز، و مقاومت شیمیایی شرکت کنند. در اینجا، عملکردهای بیولوژیکی و مکانیسم‌های نوظهور SNHG‌های دخیل در توسعه و پیشرفت سرطان‌های مرتبط با غدد درون ریز از جمله سرطان تیروئید، سرطان سینه، سرطان پانکراس، سرطان تخمدان و سرطان پروستات بررسی می‌شود. SNHG1 با رقابت با miR-199a-5p به عنوان یک انکوژن در سرطان تیروئید عمل می‌کند. SNHG7 همچنین به طور قابل توجهی در نمونه‌های سرطان تیروئید تنظیم مثبت می‌شود. در واقع، شکست SNHG7 منجر به سرکوب تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی تیروئید، و القای آپوپتوز می‌شود. همچنین SNHG12 در بافت‌های کارسینوم تیروئید پاپیلاری (PTC) نسبت به نمونه‌های بافت مجاور طبیعی به میزان ۳/۸ برابر تنظیم می‌شود. همچنین تکثیر و مهاجرت سلول‌های بافت‌های کارسینوم تیروئید پاپیلاری را از طریق Wnt/ $\beta$  ترویج می‌کند. در مسیر سیگنال دهی 23. catenin، SNHG13، که به عنوان RNA مهارکننده تمایز شناخته می‌شود، به عنوان یک سرکوب کننده تومور در PTC عمل می‌کند. مطالعه نشان داد که SNHG15 در بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطان تیروئید کاهش می‌یابد و پیشرفت تومور را سرکوب می‌کند که نشان می‌دهد SNHG15 ممکن است به عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل کند. در نهایت، SNHG16 هم در بافت‌های PTC و هم در رده‌های سلولی تنظیم مثبت می‌شود و نشان داد که باعث تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی تیروئید می‌شود، در حالی که آپوپتوز را مهار می‌کند. به طور خلاصه، به نظر می‌رسد SNHG1، SNHG5، GAS5، SNHG7، SNHG12، DANCER، SNHG15، و SNHG16 همگی در سرطان تیروئید نقش اساسی دارند. SNHG1 به عنوان یک انکوژن در سرطان پانکراس عمل می‌کند و رشد سلول‌های سرطانی را تسریع می‌کند. علاوه بر این، بیان بیش از حد SNHG1 می‌تواند با تنظیم چرخه سلولی، تکثیر سرطان پانکراس را تقویت کند. سلول‌های سرطانی با سرکوب مسیر سیگنال دهی Notch-1.80 به طور مشابه، کاهش SNHG1 مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT را در آدنوکارسینوم مجرای پانکراس (PDAC) مهار می‌کند. SNHG7 در بافت‌های

در سال ۲۰۲۰ تحقیقاتی که توسط Jin انجام شد نشان داد ZBED1 دارای خواص ساختاری و عملکردی مشابه با عامل اتصال عنصر مرتبط با تکثیر DNA همولوگ مگس سرکه (DREF) است و نقش مهمی در تنظیم رونویسی دارد. ZBED1 بیان چندین ژن مرتبط با تکثیر سلولی از جمله تنظیم چرخه سلولی، بازسازی کروماتین و متابولیسم پروتئین و برخی از ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و تمایز را تنظیم می‌کند. در بررسی حاضر، منشأ، ساختار و نقش عملکردی ZBED1 به طور جامع ارزیابی شد. پروتئین‌های انگشت روی یکی از رایج‌ترین موتیف‌های اتصال به DNA هستند و ۲ تا ۳ درصد از فاکتورهای رونویسی در ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌ها با چندین عملکرد بیولوژیکی از جمله تمایز، بازسازی کروماتین و توسعه مرتبط هستند. تغییرات فنوتیپی متناقضی با غیرفعال سازی ZBED6 در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال انسانی HCT116 و RKO، با پیامدهای کاهش و افزایش رشد، به ترتیب القا شد که نشان می‌دهد ZBED6 خواص تعدیل کننده رونویسی را نشان می‌دهد و اثر ZBED6 بر رشد تومور است. پروتئین ZBED3 با اکسین که برای مدولاسیون سیگنال Wnt/ $\beta$ -catenin در سرطان زایی و جنین زایی پستانداران حیاتی است، تعامل دارد. قابل ذکر است، سطوح بیان بیشتری از ZBED3 را در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی ریه گزارش شده است و نشان داده که سطح بیان ZBED3 دارای اهمیت بالینی آسیب‌شناسی است. این نتایج نشان می‌دهد که تهاجم سلول‌های سرطانی ریه ممکن است توسط ZBED3 القا شود. بنابراین، ZBED3 کاربرد بالقوه‌ای در مدیریت سرطان، به ویژه سرطان ریه سلول غیرکوچک دارد. ZBED1 به عنوان همولوگ انسانی فاکتور اتصال عنصر مرتبط با تکثیر DNA مگس سرکه (DREF) از طریق جستجوی BLAST شناسایی شد. مشخص شده است که ZBED1 از طریق تنظیم بیان ژن نقش مهمی در تکثیر سلولی ایفا می‌کند. علاوه بر این، ZBED1 به طور بالقوه در تنظیم بیان ژن‌های خانه‌داری در ژنوم پستانداران شرکت می‌کند. ZBED3 و ZBED6 با توسعه تومور مرتبط هستند. یک مطالعه اخیر نشان داده است که ZBED1 در سلول‌های سرطانی معده تنظیم مثبت می‌شود، در نتیجه تکثیر آنها را تقویت می‌کند و حساسیت شیمیایی آنها را کاهش می‌دهد. بنابراین، نتیجه گیری می‌شود که ZBED1 ممکن است یک بیومارکر جدید سرطان و هدف درمانی در آینده باشد (۱۳). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ توسط yuan qin و همکارانش بر روی SNHG‌ها انجام شد دریافتند به طور کلی SNHG‌ها با lncRNA

سرطان پانکراس به شدت بيان می‌شود. اين داده‌ها نشان می‌دهد که SNHG9 ممکن است یک نشانگر پيش آگهي جديد برای سرطان پانکراس باشد. انکوژن SNHG14 همچنین از طريق تعديل بيان انکسين A2 (ANXA2) تکثير سلول‌های سرطانی پانکراس را تقويت می‌کند. بيان SNHG1 در بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطان تخمدان اپیتلیال انسان در مقایسه با بافت‌های سالم طبیعی افزایش یافته و تکثير و تهاجم سلول‌های سرطان تخمدان را از طريق تنظيم EMT و مسير- $\beta$ -Wnt catenin افزایش می‌دهد. افزایش بيان SNHG3 با پيش آگهي ضعيف در سرطان تخمدان همراه است و با فعال کردن مسير سيگنال دهی  $\beta$ GSK3/-catenin باعث تکثير و تهاجم می‌شود. SNHG12 همچنین در بافت‌های سرطان تخمدان تنظيم می‌شود و ظرفيت تکثير و مهاجرت سلول‌ها را افزایش می‌دهد. SNHG12 و SNHG14 به شدت در بافت‌های سرطان تخمدان بيان می‌شوند. SNHG15 و SNHG16 نیز ممکن است به عنوان انکوژن در سرطان تخمدان اپیتلیال عمل کنند. نشان داده شده است که SNHG16 تکثير، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی را از طريق فعال سازی مسير سيگنالینگ PI3K/AKT ترويج می‌کند. اين بررسی نشان می‌دهد که بيان غيرطبیعی SNHG‌ها به طور قابل توجهی با پيش آگهي ضعيف و عملکرد (مانند تکثير، تهاجم، مهاجرت، آپوپتوز، اتوفازي، و مقاومت شیمیایی) در سرطان‌های متعدد مرتبط با غدد درون‌ریز مرتبط است. برخی از SNHG‌ها نقش مشابهی در تومورهای مختلف داشتند. به عنوان مثال، SNHG1، SNHG3، SNHG4، SNHG6، SNHG7، SNHG12، SNHG14، SNHG16، SNHG17، SNHG20 و SNHG22 رشد تومور را به عنوان انکوژن افزایش می‌دهند، در حالی که GAS5 و SNHG9 نقش افزایش تومورها را ایفا می‌کنند. علاوه بر این، SNHG5، DANCR، SNHG15 نقش دوگانه‌ای ایفا کردند که توجه بیشتر محققان را به خود جلب کرده است. در سرطان کولورکتال مسیرهای مولکولی درگیر هستند که در نهایت منجر به جهش در ژن‌هایی مثل hsp، ppp2r3b، SNHG، می‌شود. در این مقاله به بررسی تعدادی از مسیرهای درگیر در سرطان کولورکتال پرداخته شد (۱۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط zahra koveitypour و همکارانش بر روی آبشارهای پروتئين کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) در پایین دست گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) انجام شد، به بررسی، Notch، مسير PI3K/AKT، تبدیل فاکتور رشد  $\beta$ -(TGF- $\beta$ ) و سیگنال دهی Wnt تمرکز شده. جهش‌های مختلف در اجزای این مسیرهای سیگنالینگ

با ایجاد CRC مرتبط است. همانطور که گفته شد، مسیرهای سیگنالینگ PI3K، Notch، EGFR/MAPK، TGF- $\beta$  و Wnt در تنظيم چندین فرآیند بیولوژیکی از جمله تکثير سلولی، تمایز، رگرایی، آپوپتوز و بقا نقش دارند. چندین مطالعه، ژن‌هایی را که مسئول افزایش تکثير، تهاجم، پیشرفت یا مهار آپوپتوز در سلول‌های CRC هستند، از جمله ppp2r3b، hsp، ZBED را مشخص کرده‌اند. PI3K/Akt یک مسير سيگنال درون سلولی مهم است که مسئول انواع فعاليت‌های سلولی مانند رشد، تکثير، تمایز و مهاجرت سلولی است و در جهش ژن‌هایی مثل ppp2r3b، hsp، ZBED، Akt یک پروتئين سرین/ترئونین کیناز (Ser/Thr) واسطه اثرات PI3K بر رشد و پیشرفت تومور است. بنابراین، Akt یک فاکتور پایین دستی PI3K است. فسفوریلاسیون Akt با تکثير سلولی و مهار آپوپتوز در CRC‌های انسانی مرتبط است. به طور کلی، گزارش شده است که مسير سيگنالینگ PI3K نقش انکوژنی را در شروع و پیشرفت CRC ایفا می‌کند. چندین گزارش وجود دارد که مهار هدفمند این مسير باعث کاهش رشد سلول‌های CRC و افزایش آپوپتوز می‌شود (۱۵). مشابه مطالعه ما در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ توسط yiping Zhu و همکارانش انجام شد، شبکه تنظیمی مرتبط با CRC ساخته شد. در این شبکه از درجه اهمیت برای ارزیابی یک ژن در شبکه نظارتی استفاده کردند. پنج DEG برتر با بالاترین درجه عبارت از CDK1، TOP2A، CCNB1، CCNA2 و CCNB2 بود. در مطالعات بعدی همین گروه، مشخص شد که CDK1 ارتباط نزدیکی با LINC00365 دارد و مکانیسم تنظيم ceRNA بالقوه وجود دارد. علاوه بر این، در پایگاه داده TCGA تأیید شد که بیان بالای CDK1 ارتباط نزدیکی با پيش آگهي ضعيف بیماران مبتلا به CRC دارد، که با پژوهش قبلی مطابقت دارد. مشابه مطالعه ما در این مطالعه نیز دو lncRNA (SNHG5 و LINC00365) انتخاب شدند. SNHG5 در چندین سرطان از جمله CRC گزارش شده است. برعکس، LINC00365 یک lncRNA تازه شناخته شده است، اگرچه گزارش شده است که به طور قابل توجهی در سرطان مری وجود دارد و ارتباط منفی با بقای کلی بیماران مبتلا به سرطان مری دارد و در سرطان معده کاهش می‌یابد، اما تمام این مطالعات هنوز به تأیید بیشتر نیاز دارند (۱۶).

همچنین لازم به ذکر است که یکی از مسیرهای شایع دخیل که در مطالعه ما نیز به آن اشاره شده شد، مسير سيگنالی MAPK است. این مسير یکی از مهم‌ترین مسیرهای دخیل در تکثير سلولی است. مسیرهای MAPK در پایین دست بسیاری از گیرنده‌های فاکتور رشد، از جمله گیرنده‌های فاکتور رشد

اپیدرمی، قرار دارند. بیان و فعال شدن بیش از حد این گیرنده در سرطان کولورکتال شناسایی می‌شود و شواهد نشان می‌دهد که بیان و فعال شدن بیش از حد MAPK نقش مهمی در پیشرفت و متاستاز این سرطان دارد (۱۷).

تعدادی از ژن‌های موثر در سرطان‌های گذشته را بررسی می‌کنیم. در سال ۲۰۲۱ تحقیقاتی که بر روی ملانوما انجام شد یک حساسیت ژنتیکی گزارش نشده قبلی به ملانوم و خال‌های ملانوسیتیک، تکرارهای خانوادگی ژن PPP2R3B را شناسایی کردند. Ppp2r3b تکرار بیان PR70 را در خال انسان افزایش می‌دهد و افزایش بیان در بافت ملانوم با بقا از طریق یک مکانیسم غیر ایمنولوژیک ارتباط دارد. بیان بیش از حد PPP2R3B باعث تغییر سلول‌های رنگدانه به سمت تکثیر و دور شدن از مهاجرت می‌شود. تکرارهای گزارش نشده قبلی ژن PPP2R3B، با فرکانس قابل مقایسه با انواع بیماری‌زای CDKN2A کشف شد. مدل‌سازی گسترده بیولوژی بیان بیش از حد PPP2R3B ترویج تکثیر و کاهش مهاجرت در سلول‌های ملانوما را نشان داد. تعادل بین تکثیر و مهاجرت/تهاجم به عنوان تغییر فنوتیپ سلول‌های رنگدانه شناخته می‌شود و تنظیم آن در پیشرفت و درمان ملانوم بسیار مهم است. فاکتور رونویسی مرتبط (MITF)، نشان داد که بیان بیش از حد PPP2R3B باعث تغییر فنوتیپ رنگدانه از طریق ژن عمدتاً نامشخص C21orf91 می‌شود (۱۸). در سال ۲۰۱۸ تحقیقاتی روی ZBED1 در سرطان معده شد که به شرح زیر است. ZBED1 یک فاکتور رونویسی است. با این حال، بیان، نقش و اهمیت بالینی آن در سرطان نامشخص است.

هدف از این مطالعه بررسی بیان ZBED1 و تأثیر آن بر تکثیر سرطان معده (GC) بود. از روش کمی PCR برای تشخیص سطح mRNA ZBED1 در بافت‌های GC و بافت‌های طبیعی معده استفاده شد. سنجش تکثیر و تشکیل کلنی زمانی انجام شد که ZBED1 به صورت نابجا بیان شد یا توسط وکتورهای ساخته شده خاموش شد. علاوه بر این، نرخ آپوپتوز ناشی از شیمی درمانی با فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت، زمانی که ZBED1 به صورت نابجا خاموش شد و نشان داده شد سطح mRNA ZBED1 در ۱۰ مورد از ۱۱ مورد نمونه بافت تومور GC به طور قابل توجهی افزایش یافت. نتایج تجزیه و تحلیل به دست آمده از یک پایگاه داده ریزآرایه بالینی عمومی نشان می‌دهد که بیان بالای ZBED1 نتیجه ضعیفی را پیش بینی می‌کند. ZBED1 تکثیر سلولی و تشکیل کلنی را ترویج می‌کند. علاوه بر این، ZBED1 حساسیت شیمیایی سلول‌های GC را کاهش داد. بیان ZBED1 در سلول‌های GC تنظیم

می‌شود. ZBED1 تکثیر را ترویج می‌کند و حساسیت شیمیایی سلول‌های GC را کاهش می‌دهد. ZBED1 یک هدف درمانی بالقوه و نشانگر زیستی پیش بینی کننده در سرطان معده است. در این مطالعه نشان دادند که ZBED1 در بافت‌های GC بالینی در مقایسه با بافت‌های غیرسرطانی مجاور، بیشتر بیان می‌شود و سطوح بالاتر ZBED1 پیامد ضعیفی را پیش‌بینی می‌کند. همچنین نشان دادند که ZBED1 می‌تواند تکثیر سلول‌های GC را ترویج کرده و آپوپتوز ناشی از عوامل شیمی‌درمانی را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. علاوه بر این، اولین شواهدی را ارائه کردند که ZBED1 ممکن است نقش انکوژن در سرطان معده ایفا کند. سنجش تشکیل کلنی نشان داد که خاموش کردن ZBED1 توانایی تشکیل کلنی را کاهش می‌دهد (۱۹). در سال ۲۰۲۱ طی تحقیقاتی که بر پروتئین‌های شک حرارتی شد، نشان داده شد حذف Hspa1a به طور خاص از پیشرفت بدخیم سرطان‌های ریه در هر دو رده سلولی و همچنین مدل‌های حیوانی جلوگیری می‌کند. درمان با یک مهارکننده HSPA1A می‌تواند به طور قابل توجهی از پیشرفت بدخیم سرطان ریه با کمبود ARID2 جلوگیری کند. HSPA1A را به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در LUADهای دارای کمبود ARID2 شناسایی می‌کند (۲۰). همچنین تحقیقاتی نیز در سال ۲۰۲۱ بر سرطان کولورکتال انجام شد. Hspa1a متعلق به خانواده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) است و در ایجاد سرطان و حساسیت دارویی نقش دارد. خانواده HSP70 انسانی نوعی پروتئین شوک حرارتی (HSP) است که از ۱۳ عضو تشکیل شده است که توسط ژن‌های HSPA کدگذاری می‌شوند. HSPها نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌ها و عملکردهای سلولی در طول سرطان زایی دارند، اما ارتباط آنها با سرطان روده بزرگ نامشخص است. در مطالعه ما متوجه شدیم که بیان HSPA1B، HSPA4، HSPA5، HSPA6، HSPA8، HSPA9، HSPA13 و HSPA14 به طور قابل توجهی افزایش یافته است، در حالی که بیان HSPA1A، HSPA2، HSPA7، HSPA12B و HSPA12B به طور قابل توجهی در بافت‌های سرطان روده کاهش یافته است. علاوه بر این، روش Kaplan-Meier تحلیل رگرسیون کاکس نشان داد که عبارات HSPA1A، HSPA1B و HSPA7 بالا با بقای نامطلوب مرتبط بودند و HSPA9 بالا با بقای مطلوب مرتبط بودند. روابط بین بقای HSPA1A و HSPA9 در مجموعه داده GEO تأیید شد، و تفاوت‌های بیان پروتئین HSPA1A و HSPA9 بین بافت‌های سرطان روده بزرگ و بافت‌های طبیعی در پایگاه داده UALCAN تأیید شد. متیلاسیون HSPA1A و HSPA9 نیز

پیش آگهی ضعیف همراه بود، در حالی که HSPA9 با پیش آگهی مطلوب برای بیماران مبتلا به سرطان کولون مرتبط بود (۲۱).

### تشکر و قدردانی

از همکاری اساتید محترم سرکار خانم دکتر ملیحه انتظاری و جناب آقای دکتر محمد پور حسینی تشکر می‌شود.

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخص شد که متیلاسیون پروموتور HSPA1A به طور قابل توجهی افزایش یافته است و متیلاسیون پروموتور HSPA9 به طور قابل توجهی در بافت‌های سرطان روده کاهش یافته است. افزایش سطح متیلاسیون ژن HSPA1A و کاهش سطح متیلاسیون HSPA9 با پیش آگهی مطلوب مرتبط بود. تفاوت بیان HSPA1A/HSPA1B/HSPA7/HSPA9 در رده‌های سلولی سرطان کولون و سلول‌های اپیتلیال کولون تایید شد. به طور خلاصه، افزایش بیان HSPA1A1، HSPA1B و HSPA7 با

## REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66:683-91.
3. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2017;3:524-48.
4. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JL, Kasi PM, Wallace M. Pure-AMC. *Lancet* 2019;394:1467-80.
5. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:713-32.
6. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin* 2021;71:7-33.
7. Szczuka I, Wierzbicki J, Serek P, Szczęśniak-Sięga BM, Krzystek-Korpacka M. Heat shock proteins HSPA1 and HSP90AA1 are upregulated in colorectal polyps and can be targeted in cancer cells by anti-inflammatory oxicams with arylpiperazine pharmacophore and benzoyl moiety substitutions at thiazine ring. *Biomolecules* 2021;11:1588.
8. Chung C. Unique glioma requiring unique management. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2020;108:520-21.
9. Yong L, YuFeng Z, Guang B. Association between PPP2CA expression and colorectal cancer prognosis tumor marker prognostic study. *Int J Surg* 2018;59:80-9.
10. Wang H, Liu J, Li J, Zang D, Wang X, Chen Y, et al. Identification of gene modules and hub genes in colon adenocarcinoma associated with pathological stage based on WGCNA analysis. *Cancer Genet* 2020;242:1-7.
11. Acharya UR, Fujita H, Oh SL, Hagiwara Y, Tan JH, Adam M. Application of deep convolutional neural network for automated detection of myocardial infarction using ECG signals. *Information Sciences* 2017;415:190-8.
12. Zhao H, Chen S, Fu Q. Exosomes from CD133+ cells carrying circABCC1 mediate cell stemness and metastasis in colorectal cancer. *J Cell Biochem* 2020;121:3286-97.
13. Jin Y, Li R, Zhang Z, Ren J, Song X, Zhang G. ZBED1/DREF: A transcription factor that regulates cell proliferation. *Oncol Lett* 2020;20:137.
14. Qin Y, Sun W, Wang Z, Dong W, He L, Zhang T, et al. RBM47/SNHG5/FOXO3 axis activates autophagy and inhibits cell proliferation in papillary thyroid carcinoma. *Cell Death Dis* 2022;13:270.
15. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci* 2019;9:1-4.
16. Kumar A, Deep A, Gupta RK, Atam V, Mohindra S. Brain Microstructural Correlates of Cognitive Dysfunction in Clinically and Biochemically Normal Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Exp Hepatol* 2017;7:198-204.
17. Katz DH, Deo RC, Aguilar FG, Selvaraj S, Martinez EE, Beussink-Nelson L, et al. Phenomapping for the identification of hypertensive patients with the myocardial substrate for heart failure with preserved ejection fraction. *J Cardiovasc Translat Res* 2017;10:275-84.
18. Polubothu S, Zecchin D, Al-Olabi L, Lionarons DA, Harland M, Horswell S, et al. Inherited duplications of PPP2R3B predispose to nevi and melanoma via a C21orf91-driven proliferative phenotype. *Genet Med* 2021;23:1636-47.

19. Jiang S, Wang Y, Xiong Y, Feng Y, Tang J, Song R. Highexpression of ZBED1 affects proliferation and apoptosis in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11:4019.
20. Wang X, Wang Y, Fang Z, Wang H, Zhang J, Zhang L, et al. Targeting HSPA1A in ARID2-deficient lung adenocarcinoma. *Nat Sci Rev* 2021;8:nwab014.
21. Guan Y, Zhu X, Liang J, Wei M, Huang S, Pan X. Upregulation of HSPA1A/HSPA1B/HSPA7 and downregulation of HSPA9 were related to poor survival in colon cancer. *Front Oncol* 2021;11:749673.