

ارزیابی بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 در سلول‌های 4T1 در معرض متوتروکسات: مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و تجربی

فریدون عابدی‌گیلو^۱، بهزاد منصورى^۲، غلامرضا دهقان^{۳*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از جدی‌ترین تهدیدکننده‌های حیات انسان است و بعد از سرطان ریه به‌عنوان دومین سرطان شایع در میان زنان مطرح است. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی بیوانفورماتیکی و تجربی تأثیر متوتروکسات بر بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 در رده سلولی 4T1 سرطان پستان، تیمار شده با داروی متوتروکسات می‌باشد.

مواد و روش کار: برای انجام این مطالعه، ابتدا داده‌های میکروآرایه از پایگاه داده GEO جمع‌آوری شده و با استفاده از جعبه‌ابزار شبکه عصبی (PNN) در نرم‌افزار MATLAB 2018a آنالیز شد. در مرحله‌ی بعد، پرایمرهای ویژه ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 طراحی شدند. سمیت سلولی متوتروکسات روی رده سلولی 4T1 به روش MTT ارزیابی شد. و در نهایت تأثیر دارو بر بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 به روش Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی نشان داد که متوتروکسات سطح بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 را به ترتیب کاهش و افزایش داد. ارزیابی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که متوتروکسات زنده‌مانی سلول‌های 4T1 را به‌صورت وابسته به غلظت دارو کاهش داد و همچنین در غلظت ۲۰۸ μg/ml رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها مهار می‌شود. نتایج مربوط به Real-time PCR نشان داد که سطح بیان ژن HMGA2 به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت، این در حالی است که بیان ژن SMARCA5 به‌صورت معنی‌داری ($p \leq 0.05$) افزایش یافت که با نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی همخوانی دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده پیشنهاد می‌کند که ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 احتمالاً به‌عنوان ژن‌های هدف متوتروکسات در درمان سرطان پستان استفاده شوند. البته برای تأیید یافته‌های این پژوهش مطالعات بیشتری باید انجام گیرد.

کلیدواژه‌ها: آنکوژن، آنالیز بیوانفورماتیکی، ژن‌های SMARCA5 و HMGA2

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره دهم، ص ۸۳۰-۸۱۹، دی ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تلفن: +۹۸۳۳۳۹۲۷۱۷

Email: dehghan2001d@yahoo.com

مقدمه

می‌شود که تا سال ۲۰۳۰ نزدیک به ۱۱/۵ میلیون نفر در اثر ابتلا به سرطان جان خود را از دست بدهند (۲). در تشکیل سرطان فرایندهای چندمرحله‌ای و پیچیده‌ای همراه با مجموعه‌ای از تغییرات سلولی دخالت دارد و جهت پیشروی خود تا غلبه کامل بر بدن از پدیده رگ زایی کمک می‌گیرد. روش‌های درمانی در بیماران مبتلا به سرطان وابسته به فاکتورهای فردی، مشخصات پاتولوژیک و مولکولی، محل بیماری و وسعت بیماری متفاوت هستند. از جمله راهکارهای درمانی این بیماری می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، درمان بیولوژیک (ایمنی درمانی و ژن‌درمانی) و هورمون

بعد از بیماری قلبی عروقی، سرطان به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان بوده و سالانه هزینه‌های زیادی صرف تحقیق، تشخیص و درمان آن می‌شود. حدود ۳۰ درصد مرگ‌ومیرها در جوامع پیشرفته ناشی از سرطان است، بنابراین می‌توان گفت که این بیماری یکی از جدی‌ترین تهدیدکننده‌های حیات انسان می‌باشد. از بین انواع سرطان‌ها، در حال حاضر سرطان پستان به‌عنوان دومین عامل منجر به مرگ‌ومیر بعد از سرطان ریه در بین زنان است (۱). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی پیش‌بینی

۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲ دانشجوی دکترای ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳ استاد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

درمانی اشاره کرد، باین‌حال میزان مرگ‌ومیر در این بیماران بالا بوده که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد (۳). داروی متوتروکسات (یک آنتی‌متابولیک و آنتی‌فولات) در درمان سرطان و بیماری‌های خود ایمن کاربرد داشته و معمولاً به‌عنوان عامل شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته و یک داروی مختص فاز G1 برای چرخه سلولی است. بنابراین در معرض قرار دادن سلول‌های سرطانی در برابر دارو برای مدت‌زمان طولانی ضروری به نظر می‌رسد. متوتروکسات برای درمان طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، پوست، سر و گردن و ریه مورد استفاده قرار می‌گیرد. مکانیسم اثر متوتروکسات از طریق مهار فعالیت دی‌هیدروفولات رودکتاز بوده و این امر هم باعث مهار سنتز نوکلوتیدهای پورینی می‌شود. بنابراین سنتز DNA مهار شده و منجر به کاهش تکثیر می‌شود (۵، ۶). اگرچه متوتروکسات در درمان بعضی از سرطان‌ها تجویز می‌شود، اما تأثیر این دارو بر بیان ژن‌های انکوژنی و مهارکننده‌ی توموری تا به حال مورد مطالعه قرار نگرفته است. تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در ایجاد سرطان‌های رایج بررسی شده‌اند. جهش‌هایی که منجر به ایجاد سرطان می‌شوند، سه گروه از ژن‌های تنظیمی را مورد هدف قرار می‌دهد که شامل انکوژن‌ها، ژن‌های مهار کننده توموری و ژن‌های ترمیم کننده DNA است. پروتئین‌ها از جمله ژن‌های معمولی هستند که در سلول‌های سالم وجود دارند. آن‌ها پروتئین‌های مهم و درگیر در مسیرهای مختلف چون انتقال سیگنال، چرخه سلولی و مسیرهای آپوپتوزی را ترجمه می‌کنند. تغییرات در پروتئین‌ها، غالباً آن‌ها را تبدیل به انکوژن می‌کند. نتیجه نهایی این فرآیند، غالباً تکثیر سلولی به‌صورت کنترل نشده است. ژن‌های مهار کننده توموری، پروتئین‌های مهار کننده‌ای را فعال می‌سازند که با مهار پروتئین‌های دخیل در تکثیر سلولی، سبب مهار رشد و تقسیم سلول‌های مختلف می‌شود (۷، ۸). در سلول‌های توموری اغلب ژن‌های پروتئین‌های جهش پیدا کرده و یا در سطح بالایی بیان می‌شوند که اگر از عوامل ضد سرطانی مانند سیستم ایمنی و ترمیمی DNA فرار کنند می‌توانند باعث بروز سرطان گردند (۹). در مقابل بیان ژن‌های سرکوب‌گر تومور در سرطان‌های مختلف کاهش می‌یابد (۱۰). بنابراین در صورتی که ترکیبات دارویی اعم از ترکیبات طبیعی، داروهای شیمی‌درمانی، داروهای ژنتیکی بر پایه siRNA و miRNA بتوانند بیان ژن‌های انکوژنی را کاهش و مهارکننده‌ی توموری را افزایش دهند، می‌توانند راهکار نویدبخشی

در زمینه درمان سرطان باشند. برای مثال اثر ضد سرطانی کورکومین (از ترکیبات طبیعی استخراج شده از زرد چوبه) به واسطه مهار بیان ژن انکوژن Bcl2 و افزایش بیان ژن Bax (سرکوب کننده تومور) صورت می‌گیرد (۱۱). SMARCA5^۱ همولوگ ISWI (کمپلکس بازسازی کروماتین) انسانی بوده و نقش ATPase داشته و در ساختار و عملکرد کمپلکس‌های متفاوت بازسازی کروماتین از جمله^۲ CHRAC،^۳ WICH،^۴ NoRC و RSF یافت شده است (۱۲-۱۴). جایگاه کروموزومی ژن SMARCA5 در 4q31 بوده و میزان این ژن در تکثیر طبیعی سلول‌ها افزایش می‌یابد. باین‌حال SMARCA5 در 5.6 درصد از سرطان کلورکتال (۱۵) و 5.2 درصد از کارسینوماهای ایندومتروئید (endometrioid uterine corpus) جهش یافته است (۱۶). مطالعات نشان داده است که ژن‌های خانواده ISWI از جمله SMARCA5 نقش سرکوب‌گر تومور را ایفا می‌کنند (۱۷). ژن HMGA2^۵ پروتئینی به نام high mobility group (HMG) از خانواده پروتئینی غیر هیستونی را رمز گذاری می‌کند. مکانیسم عمل پروتئین HMGA2 بدین صورت می‌باشد که ابتدا از ناحیه غنی از AT به شیار کوچک از DNA متصل می‌شود (۱۸)، به دنبال این اتصال تغییرات ساختاری در کونفورماسیون DNA اتفاق افتاده و این امر منجر به تشکیل enhanceosomes و کمپلکس‌های رونویسی می‌شود که قادر هستند به توالی‌های تقویت کننده در ژن هدف متصل شده و میزان رونویسی آن‌ها را تنظیم کنند (۱۹). میزان بیان ژن HMGA2 در انواع سرطان‌ها به ویژه سرطان پستان افزایش یافته و باعث متاستاز سلول‌های سرطانی به سایر نقاط بدن می‌شود (۲۰). بنابراین HMGA2 یک انکوژن بوده و هدف قرار دادن این ژن با عوامل دارویی مختلف از جمله ترکیبات دارویی و ژنتیکی می‌تواند راهکار نوید بخشی در درمان سرطان پستان باشد. برای این منظور در مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار انجام شد، ابتدا با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی میزان بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های 4T1 (به‌عنوان مدل سرطان سینه) تیمار شده با متوتروکسات (حاصل مطالعه‌ای با کد دسترسی GSE100973) مورد مطالعه قرار گرفت. سپس جهت تأیید یا عدم تأیید یافته‌های بیوانفورماتیکی، سلول‌های 4T1 با متوتروکسات تیمار شدند و میزان سمیت سلولی و بیان ژن HMGA2 و SMARCA5) به ترتیب با استفاده از MTT و Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

³ Chromatin assembly factor⁴ Nucleolar Remodeling Complex⁵ High mobility group AT-hook 2¹ SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5² Chromatin accessibility complex

میکرولیتر از محیط کشت RPMI 10% FBS حاوی ۱۰۰۰۰ هزار سلول توزیع شد. از آنجایی که سلول 4T1 چسبنده است و جهت بررسی باید در شرایط نرمال رشد قرار داشته، تمامی آزمایشات بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون و چسبیدن کامل سلول به کف پلیت و همینطور بعد از رسیدن به تراکم مناسب صورت گرفت. پس از این زمان انکوباسیون، محیط رویی با محیط جدید (محیط کامل) حاوی رقت‌های ۱، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از داروی متوتروکسات (تهیه شده از شرکت سیگما) جایگزین شد و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی هر چاهک برداشته شده و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (با غلظت ۲mg/ml) به هر خانه اضافه شد. سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی برای مقایسه استفاده شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط به دقت برداشته شد و ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر خانه اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و جذب فرمازان بلو در ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه الیزاریدر سنجیده شد. زنده‌مانی نسبی به شکل درصد سلول‌های زنده به سلول‌های تیمار نشده نشان داده شد.

استخراج RNA:

به منظور بررسی بیان ژن‌ها، ۲۰۰ هزار سلول در داخل هر کدام از چاهک‌های شش خانه توزیع شدند و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با داروی متوتروکسات در غلظت IC_{50} ۴۸ ($2.8 \mu\text{g/ml}$) ساعت تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون، RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج TRIZOL استخراج گردید. برای این منظور ابتدا یک میلی لیتر از محتوی این کیت بر روی حدود یک میلیون سلول اضافه شده و پپیٹاز کامل سلولی انجام و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به مقدار ۲۰۰ میکرو-لیتر کلروفورم (Merck، آلمان) به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. نمونه به دست آمده پس از ورتکس و قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. فاز بالایی با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Merck، آلمان) مخلوط شد و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد و در ادامه سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ rpm صورت گرفت تا RNA شسته شود. در مرحله‌ی نهایی RNA در آب حاوی دی اتیل پیروکربنات (DEPC، سیگما

مواد و روش کار

بررسی‌های بیوانفورماتیکی:

برای بررسی تأثیر متوتروکسات بر بیان ژن‌های انکوژنی و سرکوب کننده توموری آنالیز داده‌های میکرو آرایه بوسیله‌ی تکنیک‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این پژوهش، ابتدا داده‌های بیان چندین هزار ژن که توسط تکنولوژی-های میکروآرایه به دست آمده از بانک داده‌ی GEO Dataset و پایگاه داده‌ی NCBI با کد دسترسی GSE100973 جمع‌آوری شد. در مرحله‌ی دوم پیش پردازش‌هایی روی داده‌های تهیه شده صورت گرفت و توسط الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی شبکه عصبی که تحت عنوان روش PNN^۱ گفته می‌شود آنالیز شدند (۲۱). مکانیسم عمل این روش بر پایه‌ی جستجو بین ژن‌ها بوده و از بین آن‌ها، ژن‌هایی را که با بیشترین دقت، حساسیت و اختصاصیت می‌توانند بین نمونه‌های کنترل و غیر کنترل تمایز قائل شوند را انتخاب می‌کند. در مرحله‌ی سوم top 10 hub genes (۱۰ ژن مهم) که دارای بیشترین امتیازها (تائیری پذیری ژن‌ها تحت تأثیر تیمار سلولی با داروی متوتروکسات) بود، توسط الگوریتم انتخاب و دسته بندی شدند. تمامی پیاده سازی‌ها توسط نرم‌افزار MATLAB 2018 a انجام گردید. در مرحله چهارم اعتبار بیولوژیکی top 10 hub genes با بررسی مقالات منتشر شده و سایت Gene MANIA سنجیده شد. در مرحله نهایی شبکه بیانی ژن‌های انتخاب شده توسط نرم‌افزار Cytoscape رسم شد.

کشت سلولی:

به منظور کشت سلولی، رده‌های سلولی سرطان پستان 4T1 بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها از بانک اژت موجود در دانشکده علوم طبیعی در دانشگاه تبریز خارج شده و بعد از عمل یخ زدائی، در داخل ۷ میلی لیتر محیط کشت کامل (RPMI حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین 100 U/ml، استرپتوماسین ۱۰۰ mg/ml و ۱۰ درصد سرم گوساله تازه متولد شده FBS) کشت داده شدند و تحت شرایط دی اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تست سمیت سلولی:

اثر سمیت متوتروکسات بر روی سلول‌های 4T1 توسط تست MTT در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۰۰

¹ Probabilistic neural networks

به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. به منظور مهار عملکرد آنزیم DNase I، یک میکرولیتر EDTA به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. در مرحله بعد، ۳/۵ میکرو لیتر از محتویات کیت سنتز cDNA به RNA ی تیمار شده با آنزیم DNase I اضافه شده و طبق پروتکل شرکت (Invitrogen) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ادامه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

آدریچ، آلمان) حل شد. کیفیت RNA به دست آمده با استفاده از نانودراپ بررسی شد.

سنتز cDNA:

برای اینکه بتوان بیان ژن‌ها را مورد ارزیابی قرار داد ابتدا باید بعد از استخراج RNA آن را به توالی DNA تبدیل کرد. بدین منظور از تکنیک RT-PCR استفاده می‌شود. در این روش با استفاده از توالی‌های شش نوکلئوتیدی تصادفی که به‌طور تصادفی به توالی mRNA متصل می‌شوند واکنش RT-PCR شروع می‌گردد. برای سنتز cDNA ابتدا ۲ میکروگرم از RNA را در میکروتیوب ریخته و یک میکرولیتر DNase I و بافر آن به میکروتیوب اضافه شد. سپس

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده به همراه توالی آن‌ها

پرایمر	پرایمرهای فوروارد (F) و ریورس (R)	Tm	توالی (5'-3')
Beta-actin	F	61.66	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
	R	60.88	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
HMGA2	F	54.83	ACTACTCTGTCTCTGCC
	R	55.97	GATTGAGATTGAAAGTGCCTTG
SMARCA5	F	56.16	GCAAATCCTAAGCATAGAGTACA
	R	55.36	TATACTTATCAGTTCAGCATCCC

مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز بیوانفورماتیکی مطالعه‌ی فوق نشان داد که به دنبال تیمار سلول‌های 4T1 با متوتروکسات، میزان بیان ژن‌های انکوژنی و مهار کننده‌ی توموری تغییرات متفاوتی نشان می‌دهد. شکل ۱ مربوط است به top 10 hub genes از بین چندین هزار ژن و اساس انتخاب این ژن‌ها میزان تأثیر پذیری آنها در پاسخ به داروی متوتروکسات می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود میزان بیان ژن‌های ¹Ano10، HMGA2، ²Optn و ³Syt11 در گروه تیمار شده با داروی متوتروکسات در مقایسه با گروه سالم (تیمار نشده) کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد. این در حالی است که به دنبال تیمار سلول‌های 4T1 با ۲۰ μg/ml متوتروکسات، میزان بیان ژن‌های SMARCA5، ⁴Pmsd1، ⁵Mfsd11، ⁶Ykt، ⁷Dna14 و ⁸Capn3 در مقایسه با گروه تیمار نشده افزایش یافته است.

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS PASW Statistic18 و با استفاده از آزمون‌های student's t-Test و Bivariate Correlate مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمامی نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad PRISM Version 6.01 رسم شدند.

یافته‌ها

نتایج مربوط به ارزیابی بیوانفورماتیکی:

در مطالعه حاضر ابتدا مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های بیان ژن موسوم به میکرو آرایه حاصل از مطالعه shun و همکاران در سال ۲۰۱۵ که طی آن سلول‌های سرطانی 4T1 را با غلظت‌های ۲۰ μg/ml متوتروکسات تیمار کرده بودند، انجام شد. داده‌های مطالعه‌ی مذکور با کد دسترسی GSE100973 تهیه و

⁵ Major Facilitator Superfamily Domain Containing 11

⁶ Yeast v-SNARE

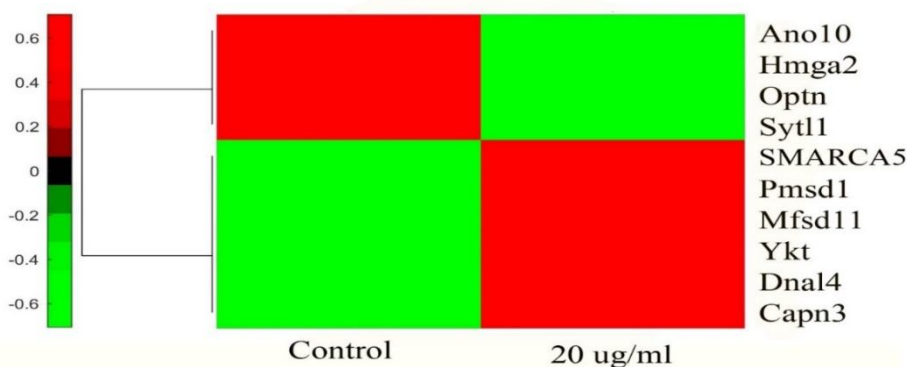
⁷ Calpain 3

¹ Anoctamin 10

² Optineurin

³ Synaptotagmin 11

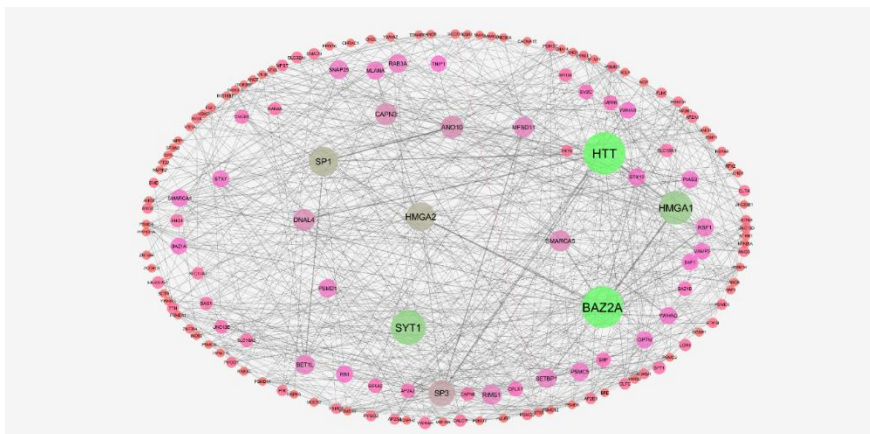
⁴ Proteasome non-ATPase regulatory subunit 1



شکل (۱): آنالیز مربوط به تأثیر متتروکسات بر بیان ژن‌ها (top 10 hub genes) در سلول‌های 4T1 تیمار شده با متتروکسات (با غلظت ۲۰ $\mu\text{g/ml}$).

که top 10 hub genes می‌توانند به صورت غیر مستقیم هم با سایر ژن‌ها هم ارتباط برقرار کنند. برای مثال ژن HMGA2 به واسطه ژن RB1^۱ (ارتباط غیر مستقیم) با ژن PSMD13^۲ ارتباط برقرار می‌کند. همچنین ژن HMGA2 قادر است به طور مستقیم با ژن‌های SMARCA5، BAZ2A^۳، SYT1^۴، SP1^۵ ارتباط داشته باشد. در مطالعه حاضر ژن HMGA2 و SMARCA5 برای مطالعه‌ی تجربی (بررسی بیان ژن) انتخاب شدند.

نمودار شبکه‌ی عصبی top 10 hub genes در آنالیز بیوانفورماتیکی و ارتباطشان با همدیگر و سایر ژن‌های عملکردی سلول‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود top 10 hub genes دارای ارتباط بسیار گسترده‌ای با همدیگر و سایر ژن‌های عملکردی سلول هستند. در این نمودار ضخامت خطوط اتصال بین top 10 hub genes با ژن‌های دیگر نشان دهنده شدت ارتباط (مستقیم) می‌باشد. این در حالی است



شکل (۲): نمودار مربوط به ارتباط شبکه‌ای top 10 hub genes در آنالیز بیوانفورماتیکی (به دنبال تیمار سلول‌های 4T1 با ۲۰ $\mu\text{g/ml}$ متتروکسات) با همدیگر و سایر ژن‌های عملکردی سلول

۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ متتروکسات را نشان می‌دهد. مطابق این نمودار میزان بقای سلول‌های 4T1 در گروه

شکل شماره ۳ اثر متتروکسات بر میزان بقای سلول‌های 4T1 در گروه کنترل و گروه مواجه شده با غلظت‌های ۱، ۵۰، ۱۰۰،

^۴ Synaptotagmin 1

^۵ Specific protein 1

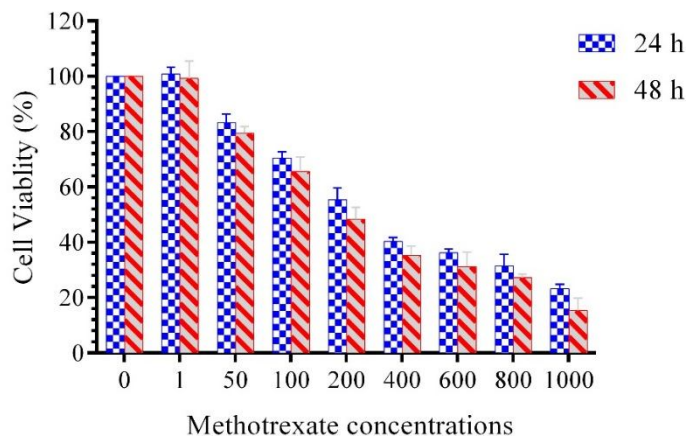
^۱ Retinoblastoma susceptibility gene

^۲ Proteasome 26S subunit, non-ATPase 13

^۳ Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A

به صورت وابسته به غلظت کاهش یافته است، به طوری که مهار ۵۰ درصد زیستایی سلول‌ها (IC_{50}) در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۲۷۸ $\mu\text{g/ml}$ و ۲۰۸ $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

تیمار شده با غلظت ۱ $\mu\text{g/ml}$ نسبت به گروه شاهد در ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی داری ندارد. در مقابل به دنبال افزایش غلظت متوتروکسات از ۱ $\mu\text{g/ml}$ به ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ میزان بقای سلولی

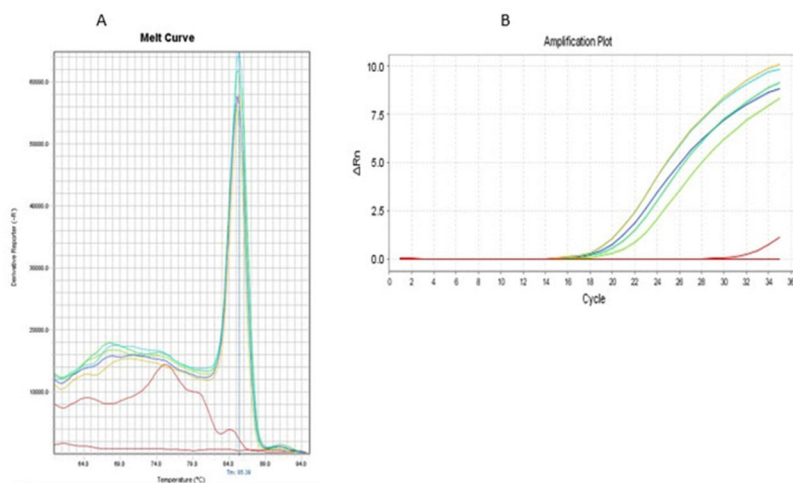


شکل (۳): اثر سایتوتوکسیک داروی متوتروکسات (۱-۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$) بر روی رده سلول‌های سرطانی 4T1 در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.

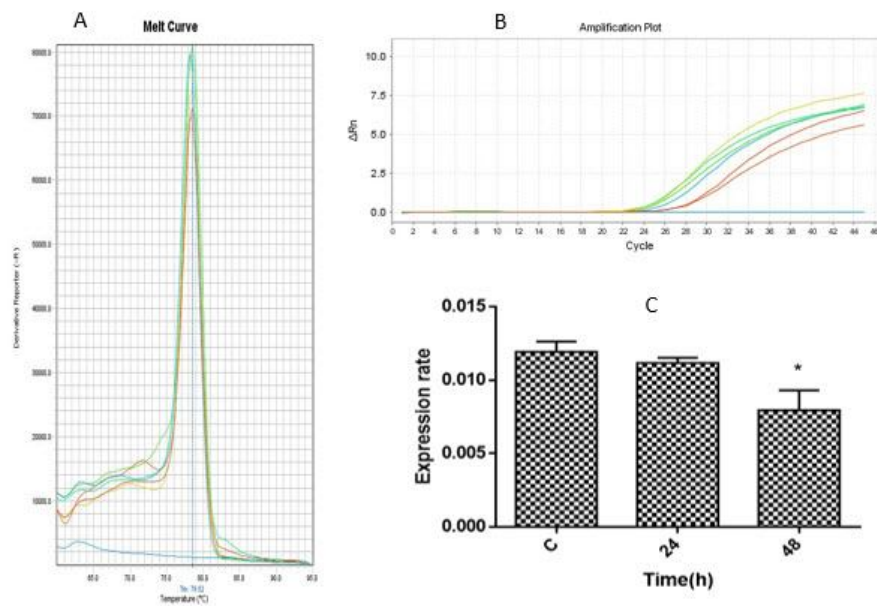
در هر نمونه در برابر β -actin نرمال سازی شد و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با نمونه کنترل متناظر (گروه تیمار نشده)، که ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد توسط روش $2^{-\Delta Ct}$ محاسبه شد. به علاوه نتایج آماری نشان داد که نسبت بیان ژن SMARCA5 به ژن مرجع (β -actin) در رده سلولی 4T1 مواجهه شده با متوتروکسات در غلظت IC_{50} ۴۸ (۲۰۸ $\mu\text{g/ml}$) ساعت نسبت به گروه کنترل، در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش معنی داری ($p \leq 0.05$) نشان داد (شکل ۶- C).

نتایج مربوط به Real-time PCR:

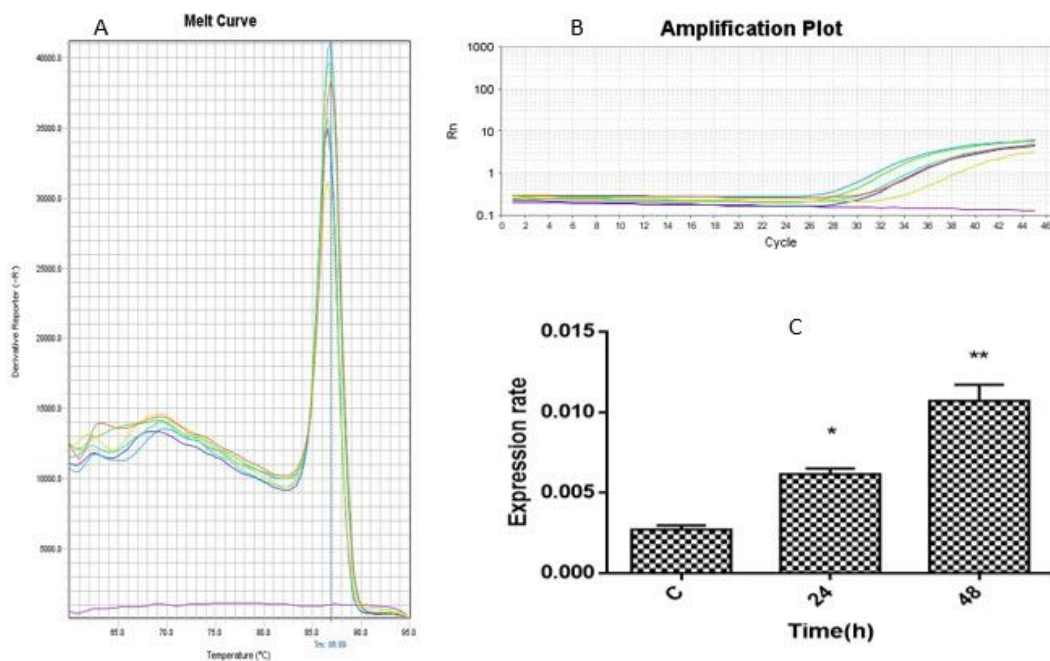
نتایج مربوط به Real-time PCR نشان داد که میزان بیان ژن‌های HMGA2 در سلول‌های 4T1 تیمار شده با متوتروکسات (در غلظت ۲۰۸ $\mu\text{g/ml}$) برای ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری ($p \geq 0.05$) نشان نداد (شکل ۵- C). این در حالی است که بعد از گذشت ۴۸ ساعت، میزان بیان HMGA2 کاهش معنی داری ($p \leq 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. گروه کنترل در این مطالعه β -actin می‌باشد که دمای ذوب و نمودار تکثیر این ژن در شکل ۴ مشاهده می‌شود. داده‌های کمی



شکل (۴): دمای ذوب ژن β -actin (A) و تکثیر ژن β -actin (B).



شکل (۵): ارزیابی مهار بیان ژن HMGA2 به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی 4T1 با متوتروکسات (۲۰۸ μg/ml) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ (A). دمای ذوب ژن‌ها. (B) تکثیر ژن‌ها و (C) بیان ژن HMGA2 به روش Real-time PCR ($p < 0.05$).



شکل (۶): ارزیابی مهار بیان ژن SMRCA5 در سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با متوتروکسات (۲۰۸ μg/ml) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. (A) دمای ذوب ژن‌ها. (B) تکثیر ژن‌ها و (C) بیان ژن SMRCA5 به روش Real-time PCR ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در هر دو روش در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابند. استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی به روش میکرو آرایه اطاعات ارزشمندی در مورد میزان بیان ژن‌های بیماری زا

در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار اثر متوتروکسات بر روی میزان بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 در سلول‌های 4T1 به دو روش بیوانفورماتیکی و تجربی مورد بررسی قرار گرفت و

باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود که هم راستا با نتایج سمیت سلولی مطالعه حاضر می‌باشد (۳۰).

ارزیابی میزان بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 با دستگاه Real-time PCR در سلول‌های 4T1 تیمار شده با متوتروکسات نشان داد که میزان بیان ژن HMGA2 کاهش یافته و این اثر وابسته به زمان می‌باشد. در مقابل میزان بیان ژن SMARCA5 افزایش معنی‌داری نشان داد که موافق یافته‌های آنالیز بیوانفورماتیکی است. در تأیید نتایج مطالعه‌ی حاضر Li و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که داروی متوتروکسات باعث کاهش بیان ژن و پروتئین HMGB1 در آرتروئید روماتوئید می‌شود (۳۱). در پژوهشی دیگر مشخص شد که مهار انکوژن HMGA2 در سرطان پروستات رشد و تهاجم سلولی را کمتر و آپوپتوز سلولی را افزایش می‌دهد (۳۲). همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، طی مطالعه‌ی Z و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشاهده کردند که افزایش بیان CircSMARCA5 (مشتمل شده از ژن SMARCA5) در کارسینومای کبدی باعث مهار تکثیر، تهاجم سلولی و افزایش آپوپتوز را سبب می‌شود (۳۳). همانطور که در مقدمه این مطالعه عنوان شد ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 در سرطان سینه به ترتیب نقش انکوژنی و سرکوب کننده‌ی توموری را ایفاء می‌کنند و نتایج این مطالعه می‌تواند مؤید این موضوع باشد. هدف قرار دادن ژن‌های بیماری‌زا و سرکوب کننده‌ی توموری توسط عوامل درمانی یک موضوع بسیار مهم در درمان هدفمند سرطان است. به‌طوریکه در تحقیقات گسترده‌ای از ترکیبات مختلفی بر هدف قرار دادن ژن‌های انکوژنی و سرکوب کننده توموری استفاده شده است. برای مثال در مطالعه‌ی استفاده همزمان ترکیب Resveratrol و Tetraiodothyroacetic acid تأثیر مضاعفی بر علیه سرطان کلورکتال نشان داده است و این تأثیر به وسیله مهار انکوژن HMGA2 انجام شده است (۳۴). Xu و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشاهده کردند که میزان بیان ژن HMGA2 در سرطان کلورکتال افزایش یافته و باعث مقام شدن سلول‌ها به داروی ۵-فلوئوروراسیل می‌شود (۳۵). در مطالعه‌ی دیگری، Y و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی بررسی اثر ضد التهابی داروی متوتروکسات نتیجه گرفتند که این دارو به‌صورت مستقیم به پروتئین HMGB1 متصل می‌شود. به علاوه اتصال متوتروکسات به RAGE (نواحی اتصال در پروتئین HMGB1) باعث مهار میانکنش HMGB1/RAGE در سطح مولکولی و سلولی می‌شود (۳۶). بنابراین با استناد به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که داروی متوتروکسات علاوه بر مهار بازهای پورینی برای سنتز DNA، به واسطه کنترل بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 اثر ضد سرطانی خود را القاء می‌کند.

(انکوژن‌ها)، فاکتورهای رونویسی، miRNA و siRNA در سرطان‌ها ارائه می‌دهد. برای مثال شناسایی ژن‌های انکوژنی و سرکوب کننده توموری که می‌توانند مجموعه ژنی را هدفگیری کنند از گام‌های اساسی در درمان هدفمند است که الگوریتم‌ها و پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک نقش کلیدی در این زمینه دارند (۲۲). مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی ما نشان داد که متوتروکسات به ترتیب باعث کاهش و افزایش میزان بیان ژن‌های انکوژنی و مهار کننده‌ی توموری می‌شود. طبق نتایج حاصل از ارزیابی بیوانفورماتیکی، میزان بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 بیشترین تأثیرپذیری را در مقایسه با سایر ژن‌ها دارند که احتمالاً به بیشتر بودن بیان این ژن‌ها در سرطان سینه مربوط است (۱۲، ۲۳). به علاوه ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 بیشترین ارتباط (ارتباط مستقیم و غیر مستقیم) را با هر کدام از top 10 hub genes و ژن‌های پایین دست خودشان دارند که نشان دهنده‌ی قابلیت هدفگیری آنها توسط داروی متوتروکسات است. همسو با مطالعه‌ی حاضر ZHANG و همکاران در سال ۲۰۱۸ آنالیز بیوانفورماتیکی را برای مشخص نمودن ژن‌های بیماری‌زای مهم با قابلیت هدفگیری درمانی در سرطان پانکراس انجام دادند. نتیجه‌ی مطالعه آن‌ها نشان داد که ژن HMGA2 جزء یکی از دو ژن مهم بیماری‌زا بوده که از قابلیت هدفگیری بالایی برخوردار است (۲۴). طی پژوهشی دیگر Li و همکاران در سال ۲۰۱۷ با آنالیز بیوانفورماتیکی روی داده‌های بیان ژن miRNA‌ها، فاکتورهای رونویسی و top 10 hub genes های مرتبط با کارسینومای مهاجم سرطان پستان را مشخص کردند (۲۵). همچنین در مطالعات مختلف از آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای بررسی تأثیرپذیری ژن‌های انکوژنی و مهار کننده‌ی توموری در بیماری‌های مختلف استفاده کرده‌اند (۲۶-۲۸). با استناد به نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی و مطالعات علمی پیشین ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 برای بررسی تجربی انتخاب شدند.

قسمت تجربی مطالعه‌ی حاضر برای تأیید یافته‌های بیوانفورماتیکی انجام شد. برای این منظور ابتدا سمیت سلولی متوتروکسات روی سلول‌های 4T1 ارزیابی شد و نتایج نشان داد که متوتروکسات به‌صورت وابسته به غلظت و زمان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. نتایج مربوط به سمیت سلولی متوتروکسات در مطالعه‌ی حاضر همسو با یافته‌های Fodor و همکاران در سال ۲۰۱۵ می‌باشد (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری AIBasher و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر ضد تکثیری متوتروکسات را روی سلول SKOV-3 (به‌عنوان مدل سرطان تخمدان) ارزیابی کردند. نتایج این گروه نشان داد که متوتروکسات به‌صورت وابسته به غلظت

بیان ژن مهارکننده‌ی توموری (SMRCA5) اثر ضد سرطانی خود را القاء کرده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر بهزاد برادران رئیس محترم مرکز تحقیقات ایمونولوژی و همکاران این مرکز بابت همکاری بی دریغ‌شان اعلام می‌دارند. همچنین از آقای علی امامی که در قسمت بررسی بیوانفورماتیکی مطالعه کمک کردند، نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

برای مشخص شدن بهتر مکانیسم مولکولی داروی متوتروکسات و تنظیم بیان ژن‌های HMGA2 و SMARCA5 می‌توان میزان بیان پروتئین این ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در مسیر سیگنالینگ را ارزیابی کرد که به دلیل محدودیت ابزاری و مالی میسر نشد و از محدودیت‌های بسیار مهم این مطالعه می‌باشد. از محدودیت دیگر این مطالعه می‌توان به انتخاب تنها دو ژن از بین top 10 hub genes ها برای ارزیابی تجربی اشاره کرد. به‌طور کلی نتایج حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی و تجربی نشان داد که داروی متوتروکسات ممکن است به واسطه مهار بیان ژن انکوژنی HMGA2 و افزایش

References:

- Gandomani HS, Aghajani M, Mohammadian-Hafshejani A, Tarazoj AA, Pouyesh V, Salehiniya H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomed Res and Thera* 2017;4:1656-75.
- Pawar H, Surapaneni SK, Tikoo K, Singh C, Burman R, Gill MS, et al. Folic acid functionalized long-circulating co-encapsulated docetaxel and curcumin solid lipid nanoparticles: in vitro evaluation, pharmacokinetic and biodistribution in rats. *Drug Deliv* 2016;23:1453-68.
- Abedi-Gaballu F, Abbaspour-Ravasjani S, Mansoori B, Yekta R, Hamishehkar H, Mohammadi A, et al. Comparative of in vitro evaluation between erlotinib loaded Nanostructured lipid carriers and liposomes against A549 lung cancer cell line. *Iran J Pharm Res* 2019;18:1168-79.
- Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl Mater Today* 2018;12:177-90.
- Wong P, Choi S. Mechanisms and implications of dual-acting methotrexate in folate-targeted nanotherapeutic delivery. *Int J Mol Sci* 2015;16:1772-90.
- Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res* 2010;2:293.
- Shen L, Shi Q, Wang W. Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* 2018;7:25.
- Zhu K, Liu Q, Zhou Y, Tao C, Zhao Z, Sun J, et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC Genom* 2015;16:S8.
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *oncologist* 2004;9:361-77.
- Sun W, Yang J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer* 2010;1:136.
- Yang J, Ning J, Peng L, He D. Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 8(8):9272-8.
- Jin Q, Mao X, Li B, Guan S, Yao F, Jin F. Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. *Tumour Biol* 2015;36:1895-902.
- LeRoy G, Orphanides G, Lane WS, Reinberg D. Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro. *Science* 1998;282:1900-4.
- Poot RA, Dellaire G, Hülsmann BB, Grimaldi MA, Corona DF, Becker PB, et al. HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J* 2000;19:3377-87.

15. Levine DA, Network CGAR. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67.
16. Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 2012;488:660.
17. Chen J, H Herlong F, R Stroehlein J, Mishra L. Mutations of chromatin structure regulating genes in human malignancies. *Curr Protein Pept Sci* 2016;17:411-37.
18. Kuipers A, Zhang Y, Cauley JA, Nestlerode CS, Chu Y, Bunker CH, et al. Association of a high mobility group gene (HMGA2) variant with bone mineral density. *Bone* 2009;45:295-300.
19. Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Chau K-Y, et al. Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 2003;42:4569-77.
20. Mohammadi A, Mansoori B, Savadi P, Khaze V, Minouei M, McMillan NA, et al. Targeting of high mobility group A2 by small interfering RNA - loaded nanoliposome - induced apoptosis and migration inhibition in gastrointestinal cancer cells *J Cell Biochem* 2019;120:9203-12.
21. Wasserman PD. *Advanced methods in neural computing*: John Wiley & Sons, Inc.; 1993.
22. Zhang T, Guo J, Gu J, Wang Z, Wang G, Li H, et al. Identifying the key genes and microRNAs in colorectal cancer liver metastasis by bioinformatics analysis and in vitro experiments. *Oncol Rep* 2019;41:279-91.
23. Sun M, Song C-X, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Gomes S, et al. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:9920-5.
24. Tang Y, Zhang Z, Tang Y, Chen X, Zhou J. Identification of potential target genes in pancreatic ductal adenocarcinoma by bioinformatics analysis. *Oncol Lett* 2018;16:2453-61.
25. Li Y, Wang Y. Bioinformatics analysis of gene expression data for the identification of critical genes in breast invasive carcinoma. *Mol Med Rep* 2017;16:8657-64.
26. Zhu Q, Sun Y, Zhou Q, He Q, Qian H. Identification of key genes and pathways by bioinformatics analysis with TCGA RNA sequencing data in hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2018;9:597-606.
27. Huang S, Sun C, Hou Y, Tang Y, Zhu Z, Zhang Z, et al. A comprehensive bioinformatics analysis on multiple Gene Expression Omnibus datasets of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* 2018;8:7630.
28. Dong H, Zhang S, Wei Y, Liu C, Wang N, Zhang P, et al. Bioinformatic analysis of differential expression and core GENES in breast cancer. *I Int J Clin Exp Pathol* 2018;11:1146-56.
29. Fodor T, Szántó M, Abdul-Rahman O, Nagy L, Dér Á, Kiss B, et al. Combined treatment of MCF-7 cells with AICAR and methotrexate, arrests cell cycle and reverses Warburg metabolism through AMP-activated protein kinase (AMPK) and FOXO1. *PLoS One* 2016;11:e0150232.
30. AlBasher G, AlKahtane AA, Alarifi S, Ali D, Alessia MS, Almeer RS, et al. Methotrexate-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells via ROS-mediated bax/bcl-2-cyt-c release cascading. *Onco Targets Ther* 2019;12:21.
31. Li Y-b, Xu P, Xu K, Cai Y-S, Sun M-y, Yang L, et al. Methotrexate affects HMGB1 expression in rheumatoid arthritis, and the downregulation of HMGB1 prevents rheumatoid arthritis progression. *Mol Cell Biochem* 2016;420:161-70.
32. Cai J, Shen G, Liu S, Meng Q. Downregulation of HMGA2 inhibits cellular proliferation and invasion, improves cellular apoptosis in prostate cancer. *Tumour Biol* 2016;37:699-707.
33. Li Z, Zhou Y, Yang G, He S, Qiu X, Zhang L, et al. Using circular RNA SMARCA5 as a potential novel

- biomarker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2019;492:37-44.
34. Nana AW, Chin Y-T, Lin C-Y, Ho Y, Bennett JA, Shih Y-J, et al. Tetrac downregulates β -catenin and HMGA2 to promote the effect of resveratrol in colon cancer *Endocr-Relat Cancer* 2018;25:279-93.
35. Xu X, Wang Y, Deng H, Liu C, Wu J, Lai M. HMGA2 enhances- δ fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer via the Dvl2/Wnt pathway. *Oncotarget* 2018;9:9963.
36. Kuroiwa Y, Takakusagi Y, Kusayanagi T, Kuramochi K, Imai T, Hirayama T, et al. Identification and characterization of the direct interaction between methotrexate (MTX) and high-mobility group box 1 (HMGB1) protein. *PloS one* 2013;8:e63073.

EVALUATION OF HMGA2 AND SMARCA5 GENES EXPRESSION IN 4T1 CELLS EXPOSED TO METHOTREXATE: BIOINFORMATIC AND EXPERIMENTAL STUDY

Fereydoon Abedi- Gaballu¹, Behzad Mansoori², Gholamreza Dehghan^{*3}

Received: 01 Sep, 2019; Accepted: 24 Nov, 2019

Abstract

Background & Aims: Breast cancer is a threatening disease in females and is the second common cancer among women after lung cancer. The aim of this research is to bioinformatically and experimentally evaluate the effect of methotrexate (MTX) on the expression of HMGA2 and SMARCA5 genes in the MTX treated 4T1 cancer cell line.

Materials & Methods: To perform this study, initially microarray data were collected from Gene Expression Omnibus (GEO) then they were analyzed using Probabilistic neural networks (PNN) in MATLAB 2018a software as a bioinformatics tool. In the next step, the specific primers were designed for HMGA2 and SMARCA5 genes. MTX cytotoxicity was assessed on 4T1 cancer cells using MTT assay. Finally, Real-time PCR was used for evaluating the effect of MTX on the rate of HMGA2 and SMARCA5 genes expression.

Results: The bioinformatic analysis showed that HMGA2 and SMARCA5 expression levels notably reduced and increased respectively in MTX treated group in comparison with the control (untreated) group. MTT assay indicated that MTX decreased the 4T1 cell viability in a concentration-dependent manner and the IC₅₀ value of MTX was estimated to be 208 µg/ml in 48 hours. Real-time PCR data showed that the expression level of HMGA2 decreased significantly ($p \leq 0.05$), while the SMARCA5 gene was significantly ($p \leq 0.05$) upregulated which is consistent with bioinformatic analysis results.

Conclusion: The obtained results suggest that HMGA2 and SMARCA5 genes may be used as MTX target genes in breast cancer therapy. However, further studies need to be carried out to confirm the results.

Keywords: Oncogene, Bioinformatics analysis, SMARCA5 and HMGA2 genes.

Address: Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Tel: +9833392717

Email: dehghan2001d@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2020; 30(10): 830 ISSN: 1027-3727

¹ MSc of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

² Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Corresponding Author)