

بررسی ترنسکرپتوم و تخمین بیان ایزوفرم‌های سه ژن از مسیر پیام‌رسانی PI3K و FGFR در سرطان مثانه

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۴ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۳۱

زمینه و هدف: پیرایش متناوب غیرمعمول در سلول‌های سرطانی، شایع بوده و ایزوفرم‌های حاصل می‌توانند به‌عنوان بیومارکر و یا هدف درمانی برای طراحی دارو مورد استفاده قرار گیرند. شناسایی ایزوفرم‌ها، جهت توسعه استراتژی‌های درمانی سرطان حایز اهمیت می‌باشد. هدف این مطالعه شناسایی ایزوفرم‌ها و بیان ۳ ژن PIK3CA، FGFR1 و FGFR3 با استفاده از فناوری جدید تعیین توالی RNA و Real-Time PCR در سرطان مثانه بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، که در بازه زمانی شهریور ۱۳۹۳ تا مهر ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات اورولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. ۳۰ نمونه بافت تازه تومور و ۳۰ نمونه بافت نرمال مجاور تومور در فاصله مناسب، از افراد مبتلا به سرطان مثانه تهیه شد. RNA از بافت‌ها استخراج و پس از بررسی کمی و کیفی و ساخت کتابخانه cDNA، تعیین توالی RNA انجام و داده‌های حاصله توسط نرم‌افزارهای مربوطه آنالیز گردید.

یافته‌ها: ایزوفرم‌های هر سه ژن در بافت نرمال و تومور از لحاظ تعداد و الگوی بیان تفاوت نشان دادند. ژن PIK3CA در بافت نرمال یک رونوشت و در بافت سرطانی سه ایزوفرم، ژن FGFR1 و FGFR3 در بافت تومور به‌ترتیب ۶ و ۱۲ و در بافت نرمال ۷ و ۹ رونوشت داشتند. افزایش بیان ژن (P=۰/۰۱) FGFR3 و کاهش بیان ژن (P=۰/۰۱) FGFR1 معنادار بود.

نتیجه‌گیری: پیرایش متناوب غیرمعمول در سلول‌های سرطانی مثانه منجر به ایجاد ایزوفرم‌هایی گردید که بعضی از آن‌ها در سلول‌های نرمال وجود نداشته و یا میزان بیان متفاوتی داشتند و به‌عنوان هدف درمانی و یا مارکر تشخیصی در مطالعات آتی قابل استفاده می‌باشند.

کلمات کلیدی: پژوهش‌های مقطعی، تعیین توالی RNA، ترنسکرپتوم، PIK3CA، گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاست.

زهرا اوسطی آشتیانی^۱ اد

جواد توکلی بزاز^۲

سید علیرضا سلامی^۳

محمد رضا پورمند^۴

غلامرضا پورمند^{۱*}

۱- مرکز تحقیقات اورولوژی، بیمارستان سینا،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تهران،

ایران.

۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، میدان حسن آباد، بیمارستان

سینا، مرکز تحقیقات اورولوژی.

تلفن: ۰۲۱-۶۳۴۸۵۶۰

E-mail: pourmand@tums.ac.ir

مقدمه

پیام‌رسانی و در نتیجه ایجاد و پیشرفت سرطان می‌گردد.^۱ مکانیسم‌های دیگری از جمله پیرایش متناوب (Alternative splicing) غیرطبیعی، در تومورزایی مشارکت دارند. پیرایش متناوب pre-mRNA نقش مهمی در ایجاد تنوع رونوشت‌ها (Transcript) و پروتئین‌های سلولی ایفا می‌کند.^۲ اختلال و بی‌نظمی در فرآیند پیرایش منجر به ایجاد واریانت‌های غیرطبیعی RNA شده که در بسیاری از بیماری‌ها و سرطان تأثیر بسزایی دارند.^۳ تعداد زیادی پروتئین متصل

سرطان مثانه یکی از سرطان‌های شایع در مردان و با فراوانی کمتر در زنان می‌باشد و بر اساس گزارش کشوری ثبت سرطان در ایران چهارمین و در بعضی از استان‌ها دومین رتبه را در بین سرطان‌ها به‌خود اختصاص داده است.^{۱-۳} تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سرطان‌ها از جمله سرطان مثانه موجب بی‌نظمی در مسیرهای

مولکول‌های مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در کارسینوژنز را هدف قرار دهند و شناسایی ایزوفرم‌های حاصل از پیرایش متناوب غیرطبیعی که بتوانند به‌عنوان بیومارکر و یا هدف درمانی مورد استفاده قرار گیرند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است.

هدف این مطالعه، بررسی ترنسکرپتوم و شناسایی ایزوفرم‌های ژن‌های مسیرهای پیام‌رسانی PI3K و FGFR در بافت تومور مثانه در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور با یکی از جدیدترین فناوری‌های مولکولی به‌نام تعیین توالی RNA (RNA sequencing) می‌باشد که برای اولین بار انجام می‌شود. این تکنیک پژوهشگران را قادر می‌سازد علاوه بر تفاوت بیان ژن‌ها، اطلاعات زیادی در خصوص ایزوفرم‌ها، ژن‌های جدید دخیل در سرطان، جفت شدن ژنی، واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی و کل ترنسکرپتوم را به‌دست بیاورند. جهت تایید نتایج حاصل از تعیین توالی RNA، بیان سه ژن مذکور نیز با تکنیک Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه مقطعی در بازه زمانی شهریور ۱۳۹۳ تا مهر ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، انجام گرفت، ۳۰ نمونه بافت تازه تومور و ۳۰ نمونه بافت نرمال مجاور تومور در فاصله مناسب، از افراد مبتلا به سرطان مثانه پس از توضیح در خصوص هدف طرح تحقیقاتی و دریافت رضایت‌نامه کتبی، در بیمارستان سینا و امام‌خمینی (ره) دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهیه گردید. بیماران تحت جراحی سیستم اسکوپ و یا رادیکال سیستکتومی قرار گرفته بودند.

یکی از مهمترین معیارهای ورود بیماران به این پژوهش، عدم دریافت درمان مانند شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و یا BCG تراپی پیش از دریافت نمونه بود. نمونه‌های بافت تومور و نرمال بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر 80°C قرار گرفت تا در زمان مناسب مورد استخراج RNA قرار گیرند. اطلاعات هیستوپاتولوژیک و برخی از داده‌های بالینی نیز گردآوری گردید.

استخراج RNA از نمونه‌ها با استفاده از محلول Tripure (Roche, Germany) بر اساس دستورکار شرکت سازنده انجام گرفت. پس از

شونده به RNA (RBP) شناخته شده که در انجام صحیح پیرایش و تنظیم آن نقش دارند. در طی دو دهه گذشته مکانیسم مولکولی تنظیم فرایند پیرایش مورد مطالعه قرار گرفته و داده‌های زیادی در خصوص نقش بسیاری از RBPها در تولید رونوشت‌های RNA و ایزوفرم‌های آنکوژنی در سلول‌های توموری مشخص شده است.^{۷-۱۰} این فاکتورها در کنترل پیرایش متناوب ژن‌هایی با عملکرد زیستی متفاوت دخالت داشته و فعالیت غیرطبیعی بعضی از آنها موجب تغییر فرآیندهای مرتبط با سرطان مانند رشد و تکثیر سلول، مرگ برنامه‌ریزی سلولی و ناپایداری ژنومی می‌گردد.^{۱۱} اگرچه اختلال در پیرایش mRNA نابالغ ژن‌های مرتبط با سرطان و فاکتورهای پیرایش و بسیاری از ایزوفرم‌های حاصله و محصولات آنها در سلول‌های سرطانی از جمله سرطان سینه مشاهده و ارتباط آنها با رشد سرطان و یا استفاده از ایزوفرم‌های جدید به‌عنوان بیومارکر نشان داده شده است،^{۱۲-۱۴} ولی ارتباط بیولوژیکی بسیاری از وقایع پیرایش غیرطبیعی RNA و ژن‌های مسیرهای پیام‌رسانی ناشناخته باقی مانده است.

مسیر پیام‌رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) در تنظیم بسیاری از فعالیت‌های سلولی نقش داشته و از اصلی‌ترین مسیرهایی است که در سرطان از تنظیم خارج می‌شود. اعضای مختلف این مسیر دستخوش تغییرات شده و یکی از مهمترین آنها ژن PIK3CA می‌باشد که اختلالات مولکولی آن مانند جهش‌های متفاوت و افزایش بیان در سرطان‌های مختلف مانند سرطان مثانه، سینه، و سروگردن و غیره گزارش گردیده است.^{۱۵-۱۸} و به‌عنوان یک هدف مولکولی جهت طراحی دارو در نظر گرفته می‌شود. افزون بر آن تغییرات مولکولی ژن PIK3CA از نظر بالینی دارای اهمیت بوده و بودن آنها در پاسخ به درمان مؤثر می‌باشد. در مطالعه‌ای گزارش گردیده که جهش‌های آنکوژنی این ژن می‌تواند مانع از پاسخ درمانی به ممانعت‌کننده‌های مختص مولکول‌های هدف، مانند anti-EGFR شود.^{۱۹}

تغییرات مولکولی در ژن‌های مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با مسیر PI3K از جمله FGF/FGFR نیز در سرطان نقش داشته و بعضی از اعضای این مسیرها نیز به‌عنوان هدف درمانی مطرح شده‌اند. تغییراتی مانند جهش، پیرایش غیرمتعارف و تکثیر ژنی اعضای این مسیر در سرطان گزارش شده است.^{۲۰-۲۲}

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های نوین و هوشمند برای تشخیص و درمان سرطان، طراحی داروهایی که بعضی از

ژن‌ها و ایزوفرم‌های مربوطه در این مطالعه، پرایمرها به نحوی طراحی گردید که همه ایزوفرم‌ها را در بر گیرند. از ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع (Housekeeping) جهت انجام Real-Time PCR استفاده شد. بررسی بیان ژن و ایزوفرم‌ها با استفاده از محلول SYBR Premix EX Rotor-Gene Q (Qiagen, در دستگاه Takara, Japan) انجام گرفت و محلول واکنش بر اساس دستورکار شرکت سازنده تهیه گردید. شرایط انجام واکنش عبارت است از: ۱۰ ثانیه در 95°C و در ادامه ۴۰ سیکل، ۱۰ ثانیه در 95°C و ۲۰ ثانیه در 60°C . تغییرات بیان ژن نیز با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه شد. برای بررسی آماری در مورد بیان ژن‌ها از SPSS software, version 21 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) استفاده گردید. برای مشخص کردن نرمال بودن داده‌ها Kolmogorov-Smirnov test به‌کار برده شد. آنالیز داده‌ها با آزمون پارامتری Student's t-test و غیرپارامتری Mann-Whitney U test بر حسب توزیع نرمال یا غیرنرمال داده‌ها و رگرسیون خطی چند متغیره با روش گام به گام رابطه تغییرات در بیان با متغیرها انجام گرفت. سطح معناداری $P=0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۳۰ بیمار مورد بررسی (۸۷٪ مرد و ۱۳٪ زن) بودند. میانه سن آن‌ها ۶۶ سال (محدوده ۳۳-۸۸ سال) بود. نتایج پاتولوژی نشان داد که بیشتر تومورها (۷۳٪) High grade بودند. عادت سیگار کشیدن در ۶۶٪ بیماران دیده شد و بیشتر آن‌ها بیش از ۱۰ سال اعتیاد به سیگار داشتند. در میان بیماران ۱۶٪ سابقه ابتلا به سرطان مثانه نشان دادند. داشتن سابقه سرطان‌های دیگر، بیماری دیابت و اعتیاد به تریاک نیز در این بیماران بررسی شد. جالب توجه است که ۵۳٪ از بیماران شغل‌های پر خطر داشته و در معرض مواد شیمیایی (الکل‌های صنعتی، لاک‌های صنعتی، چسب‌ها، قیر، آسفالت، صنایع فلزی، منسوجات، پشم‌شویی، رنگ‌رزی، معادن ذغال سنگ و غیره) بودند. آنالیز داده‌های خام حاصل از تعیین توالی RNA، تفاوت بیان تعداد زیادی ژن در بافت تومور و نرمال را نشان داد که با توجه به بررسی آماری نرم‌افزار Cuffdiff بر روی نمونه‌هایی که برای RNA

بررسی کیفی و کمی تمام RNA های استخراج شده توسط دستگاه NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، ۱۰ نمونه بافت تومور و بافت نرمال مجاور برای تعیین توالی RNA و آنالیز ترنسکرپتوم ارسال گردید. با توجه به دقت و حساس بودن تکنیک RNA sequencing که روشی با بازدهی بالا برای بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها یا ترنسکرپت‌های مختلف می‌باشد، معمولاً تعداد کم نمونه کافی خواهد بود. روش کار به این ترتیب است که پس از کنترل کیفیت RNA ها و حذف RNA ریبوزومی و tRNA ها، mRNA به قطعات کوچکتر برش داده شده و از آن‌ها کتابخانه cDNA تهیه می‌گردد. سپس پرایمرها برای توالی یابی متصل شده و در Lane دستگاه قرار گرفته و توالی قطعات کوچک خوانش می‌شود. برای هر نمونه ۵۰-۴۰ میلیون خوانش کوتاه (۱۰۰-۹۰ نوکلئوتیدی) به دست می‌آید.

داده‌های خام به دست آمده از روش تعیین توالی RNA توسط نرم‌افزارهای مختلف مورد آنالیز قرار گرفت. ابتدا خوانش‌های حاصله به کمک FastQC software (Babraham Bioinformatics, UK) بررسی و کنترل کیفی خوانش‌ها انجام گردید، سپس با TopHat software (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) (Align) شده و با مقایسه با ژنوم رفرانس نقشه‌یابی (Map) شدند. نرم‌افزار دیگری که مورد استفاده قرار گرفت Cufflinks software (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) بود که بیان ژن‌ها و ایزوفرم‌ها را مشخص می‌کند. Cuffdiff software (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) نیز نشان می‌دهد کدام ژن‌ها و ایزوفرم‌ها از لحاظ آماری تفاوت دارند. با استفاده از CummeRbund software (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>) و R-studio software (R-studio Inc., Boston, MA, USA) گراف‌های مربوط به بیان ژن‌ها و ایزوفرم‌ها قابل رؤیت شدند.

همچنین از هر یک از نمونه‌های RNA به میزان ۱ μg با استفاده از کیت PrimeScriptTM RT reagent kit (Takara, Japan) که شامل بافر، پرایمرهای oligo dT، Random 6 mer و آنزیم رونویسی معکوس می‌باشد و بر اساس پروتکل شرکت سازنده، با اضافه کردن مواد به مخلوط واکنش و قراردادن در حرارت 37°C به مدت ۱۵ دقیقه، سپس پنج ثانیه در 85°C cDNA ها تهیه گردید. برای بررسی

نرمال بیان هفت رونوشت مشاهده می‌گردد که ایزوفرم FGFR3-203 بیشترین بیان را نشان می‌دهد و رونوشت‌های دیگر، بیان کمتر و بعضاً بسیار ناچیز است. ولی در بافت تومور الگوی بیان متفاوت بوده و تعداد شش ایزوفرم با میزان بیان متفاوتی مشاهده می‌شود.

در بیشتر موارد بزرگترین رونوشت، پروتیین اصلی را رمزگذاری می‌کند ولی در مورد این ژن ترنسکریپت FGFR3-203 در بافت نرمال مثانه بیشترین بیان و در بافت تومور به میزان کمتر بیان دارد و ایزوفرم‌های دیگر در تومور افزایش بیان نشان می‌دهند.

تعداد ایزوفرم‌های ژن FGFR1 در بافت تومور بیشتر از بافت نرمال و بیان ۵-۷ ایزوفرم کمابیش مشابه بود ولی در بافت نرمال دو ایزوفرم نسبت به ایزوفرم‌های دیگر بیان بیشتری داشتند (شکل ۳).

بحث

این پژوهش اولین مطالعه‌ای است که در سرطان مثانه برای شناسایی ایزوفرم‌های چند ژن با استفاده از تکنیک نوین RNA sequencing انجام می‌شود. بیشتر ژن‌ها در ژنوم انسان واریانت‌ها و ایزوفرم‌های مختلف در سطح mRNA ایجاد می‌کنند که منجر به ساخت پروتیین‌هایی با عملکرد زیستی متفاوت می‌گردد. شواهد رو به افزایشی نشان می‌دهد که ایزوفرم‌های حاصل از پیرایش غیرطبیعی با تشکیل سرطان‌ها مرتبط هستند.^{۳۳} در این مطالعه با استفاده از روش

sequencing ارسال شده بود، بسیاری از تفاوت‌های مشاهده شده معنادار بودند. از میان ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش، دو ژن PIK3CA و FGFR3 در بافت تومور نسبت به بافت نرمال افزایش بیان داشتند و ژن FGFR1 کاهش بیان نشان داد.

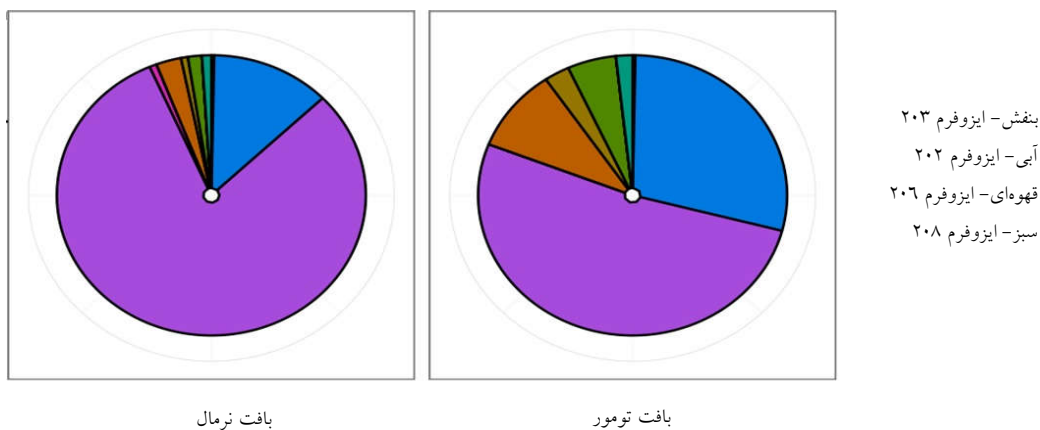
ایزوفرم‌های این ژن‌ها نیز توسط آنالیز تعیین توالی RNA مشخص شدند. تغییرات بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR تایید شد. افزایش بیان ژن PIK3CA در ۴۲٪ نمونه‌های تومور مشاهده گردید. بیان ژن FGFR3 در ۹۳/۳٪ تومورها افزایش یافت. تفاوت میانگین CT در بافت تومور و نرمال معنادار بود ($P=0/01$). افزایش بیان با کشیدن سیگار ($P=0/037$) و سابقه سرطان فامیلی ($P=0/004$) ارتباط معنادار داشت. کاهش بیان ژن FGFR1 در بافت سرطان مثانه در مقایسه با بافت نرمال ($P=0/01$) با درجه بالای تومور (High grade) ارتباط معناداری را نشان داد ($P=0/047$). گفتنی است که در تومورها با درجه پایین (Low grade) افزایش بیان این ژن مشاهده گردید.

ایزوفرم‌های ژن PIK3CA در بافت تومور و نرمال در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در بافت نرمال فقط ترنسکریپت بزرگ‌تر و اصلی بیان می‌گردد، در صورتی که در بافت تومور سه ایزوفرم با نسبت‌های مختلف بیان شده‌اند که نشان دهنده تفاوت در بیان ایزوفرم‌ها در بافت سرطانی می‌باشد. ایزوفرم‌های ژن FGFR3 در شکل ۲ نمایش داده شده است. در بافت



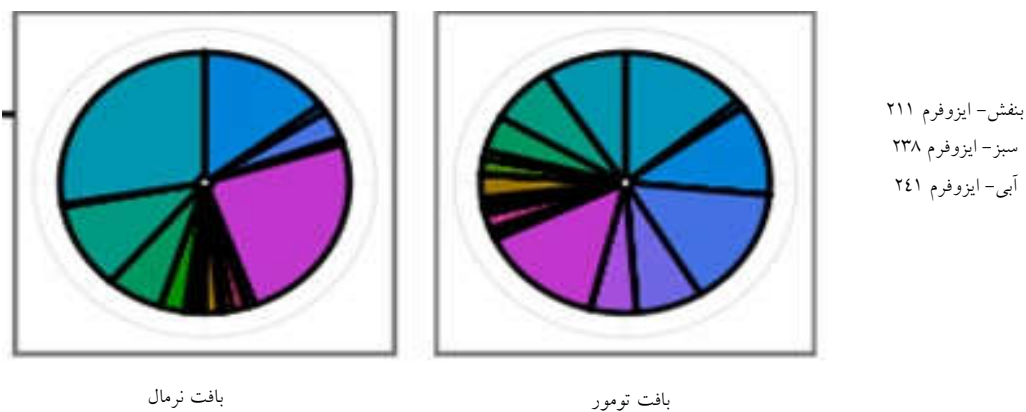
شکل ۱: ایزوفرم‌های بیان شده ژن PIK3CA در بافت تومور و نرمال مثانه

FGFR3



شکل ۲: ایزو فرم‌های بیان شده ژن FGFR3 در بافت تومور و نرمال مثانه

FGFR1



شکل ۳: ایزو فرم‌های بیان شده ژن FGFR1 در بافت تومور و نرمال مثانه

بررسی ژنوم مرجع نسخه ۳۸ (GRCh38.p10) (www.ensembl.org) چهار رونوشت یا ترنسکرپت برای ژن PIK3CA مشخص کرده است که سه ترنسکرپت رمز گذار پروتیین می‌باشد. در بافت نرمال

تعیین توالی RNA با بازده بالا، تفاوت در تعداد و میزان بیان ایزو فرم‌های مربوط به سه ژن PIK3CA, FGFR1 و FGFR3 در بافت تومور و بافت نرمال مجاور تومور در سرطان مثانه نشان داده شد.

از ۴۱ ایزوفرم ژن FGFR1 که در ژنوم مرجع آورده شده است تنها تعداد ۲۰ رونوشت آن رمزگذار پروتیین می‌باشد. در بافت تومور مثانه و بافت نرمال آن تعداد کمتری از ایزوفرم‌ها بیان می‌شوند. گزارشات کمی در خصوص کاربرد ایزوفرم‌های ژن FGFR1 به‌عنوان بیومارکر ارایه شده است ولی برخی مطالعات نشان داده‌اند که ایزوفرم‌های این ژن با تعداد زیادی از فاکتورهای رونویسی مشارکت نموده و همانند miRNA ها می‌توانند ژن‌های رمزگذار mRNA را مورد هدف قرار دهند.^{۲۸}

الگوی بیان ژن FGFR1 در این پژوهش با مطالعات دیگر تفاوت دارد. کاهش بیان در ۶۰٪ بیماران مشاهده گردید که اغلب آن‌ها High grade بودند و این ارتباط معنادار بود ($P=0/01$), در صورتی که در مطالعات دیگر بیان در سطح mRNA و پروتیین کمابیش در تومور مثانه از نوع Non-muscle invasive افزایش داشته است.^{۳۰،۲۸} تفاوت در نتایج مطالعات افزون بر ویژگی سلولی، می‌تواند مربوط به پیرایش متناوب در بخش خارج سلولی FGFRs و ایجاد ایزوفرم‌های مختلف باشد که به نوبه خود می‌تواند بر ویژگی اتصال به لیگاند (FGFs) تاثیر گذارد. در این پژوهش نیز آن دسته از بیماران که تومور آن‌ها از نوع Non-muscle invasive بود افزایش بیان داشتند که نشان می‌دهد این تغییر از وقایع اولیه در تومورهای در سرطان مثانه می‌باشد. نتایج Real-time PCR مربوط به ژن‌های FGFRs، داده‌های به‌دست آمده از روش تعیین توالی RNA را تایید نمود.

پیرایش متناوب غیرمعمول باعث رشد و نمو سرطان از طریق ایجاد ایزوفرم‌های آنکوژنی و یا کاهش بیان ایزوفرم نرمال می‌گردد. افزایش دانش و درک مکانیسم پیرایش متناوب غیرطبیعی mRNA نابالغ برای ژن‌های مرتبط با سرطان، جهت توسعه استراتژی‌های سرطان درمانی از چندین منظر از جمله استفاده از ایزوفرم‌های ویژه سرطان به‌عنوان بیومارکر و هدف‌گیری محصولات آنکوژنی دارای اهمیت بوده و مطالعات زیادی را می‌طلبد.

نتایج حاصل از این پژوهش نیز افزایش و کاهش ایزوفرم‌ها را در بافت تومور نسبت به نرمال نشان داد. با توجه به یافته‌ها فرضیه‌ای را می‌توان مطرح کرد که تعیین سطح بیان ایزوفرم‌ها نسبت به سطح بیان ژن، شاید تفکیک کننده بهتری بین سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی باشد. تفاوت مشاهده شده در رونوشت‌ها در سرطان مثانه، که نتیجه پیرایش غیرطبیعی mRNA های نابالغ است یا محصولات متفاوت

مثانه تنها بیان ترنسکریپت PIK3CA-201 نشان دهنده اهمیت این ایزوفرم در سلول‌های نرمال می‌باشد ولی ترنسکریپت غیر رمزگذار PIK3CA-202 که در بافت تومور به‌طور چشمگیری بیان شده می‌تواند کاندید مناسبی به‌عنوان بیومارکر جهت تشخیص باشد. تفاوت بیان ایزوفرم‌ها در مورد این ژن می‌تواند در صورت تایید در تعداد بیشتر نمونه به‌عنوان بیومارکر، جهت شناسایی سلول‌های سرطانی و تشخیص افتراقی به‌کار رود. در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران انجام شد گزارش دادند که تفکیک رده سرطانی از غیرسرطانی بدون در نظر گرفتن منشا سلولی، با بیان در سطح ایزوفرم قابل انجام است.^{۳۳}

نتایج ما نیز گویای قابل انجام بودن تفکیک سلول‌های نرمال و تومور با استفاده از تفاوت بیان ایزوفرم‌ها می‌باشد. افزایش بیان ژن PIK3CA در سرطان مثانه نه تنها اهمیت آن را در پیشرفت سرطان نشان می‌دهد بلکه توانایی آن را در مطالعات مداخله‌ای برای درمان هدفمند آشکار می‌سازد.

در ژنوم مرجع، ۱۰ ترنسکریپت برای ژن FGFR3 نشان داده شده است که دو رونوشت آن غیر رمزگذار هستند. با توجه به نتایج تعیین توالی RNA، در بافت نرمال و سرطانی مثانه تعداد کمتری ایزوفرم با الگوی متفاوت بیان می‌گردد. این تفاوت مشاهده شده در بیان ایزوفرم‌ها می‌تواند در تشخیص افتراقی و تفکیک سلول‌های سرطانی از غیرسرطانی مؤثر بوده و حتی به‌عنوان بیومارکر قابل استفاده باشد. نتایج ما نیز با مطالعاتی دیگر در خصوص تغییرات بیان ایزوفرم‌ها در سرطان مطابقت دارد.^{۲۴،۳۱،۳۲}

مطالعات دیگری توانایی استفاده از FGFR3 را در درمان‌های هدفمند برای سرطان کارسینومای اوروتلیال نشان می‌دهند.^{۲۶،۲۵} در مطالعه حاضر افزایش بیان ژن FGFR3 در اکثر نمونه‌ها بدون در نظر گرفتن نوع، درجه و مرحله تومور مطالعه گردید که بیانگر اهمیت نقش ژن FGFR3 در افراد مبتلا به سرطان مثانه ایرانی می‌باشد در صورتی که در گزارشات دیگر افزایش بیان را در تومورهای Non-muscle invasive مشاهده کرده‌اند.^{۲۸،۲۷} با توجه به ارتباط معنادار بیان این ژن با کشیدن سیگار و نیز سابقه فامیلی، نقش زمینه ژنتیکی و به عبارتی آرایش ژنتیکی افراد و نیز تغییرات اپی‌ژنتیک در تومورهای سرطان مثانه نمایان است. تغییرات فرآیند اپی‌ژنتیک به‌طور وسیعی بر بیان ژن در سطح رونویسی تاثیر می‌گذارد.^{۲۹}

ناهمگنی بین جمعیت‌ها، نژادها، تفاوت‌ها بین افراد یک جمعیت و نیز وجود پلی‌مورفیسم‌ها، مطالعات بیشتر با حجم بیشتر نمونه بیمار و کنترل و نیز بررسی‌های اپی‌ژنتیکی ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی ترنسکرپتوم و شناسایی تغییرات رونوشت‌های ژن‌های مسیر علامت‌دهی PI3K در سرطان مثانه" در مقطع دکتری پژوهشی می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

آن‌ها و یافتن ایزوفرم‌های ویژه سرطان، در صورت تایید در تعداد نمونه بیشتر که بتوان با توجه به مرحله و درجه سرطان، آن‌ها را طبقه‌بندی نمود و استفاده از پرایمر مختص هر ایزوفرم، می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی در ارتباط با سرطان برای تشخیص به‌کار رود.

به‌نظر می‌رسد در آینده برای به‌کارگیری استراتژی پزشکی فرد محور در سرطان مثانه ایزوفرم‌های ژن‌های PIK3CA، FGFR1 و FGFR3 می‌تواند هدف مناسبی برای مداخلات درمانی باشند. به‌دلیل

References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
- Salehi A, Khezri A, Malekmakan L, Aminsharifi A. Epidemiologic status of bladder cancer in Shiraz, southern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12(5):1323-7.
- Rafieanesh H, Rajaei-Behbahani N, Khani Y, Hosseini S. Incidence trend and epidemiology of common cancers in the center of Iran. *Glob J Health Sci* 2016;8(3):146-55.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4(2): 143-53.
- Chen M, Manley J L. Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Cell Biol* 2009;10(11):741-54.
- Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* 2016;35(19):2413-27.
- Fu XD, Ares M Jr. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 2014;15(10):689-701.
- Zhong XY, Wang P, Han J, Rosenfeld MG, Fu XD. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Mol Cell* 2009;35(1):1-10.
- Twyffels L, Gueydan C, Krays V. Shuttling SR proteins: More than splicing factors. *FEBS J* 2011;278(18):3246-55.
- Song J, Richard S. Sam68 regulates S6K1 alternative splicing during adipogenesis. *Mol cell Biol* 2015;35(11):1926-39.
- Jia R, Zhang S, Liu M, Zhang Y, Liu Y, Fan M, et al. HnRNPL is important for the expression of oncogene SRSF3 and oncogenic potential of oral squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* 2016;6: 35976.
- Meseure D, Vacher S, Lallemand F, Alsibai KD, Hatem R, Chemlali W, et al. Prognostic value of newly identified MALAT1 alternatively spliced transcript in breast cancer. *Br J Cancer* 2016;114(12):1395-404.
- Prochazka L, Tesarik R, Turanek J. Reculation of alternaqtive splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal* 2014;26(10):2234-9.
- Tian N, Li J, Shi J, Sui G. From general aberrant alternative splicing in cancers and its therapeutic application to the discovery of an oncogenic DMTF1 isoform. *Int J Mol Sci* 2017;18(3):191.
- Duenas M, Martinez-Fernandez M, Garcia-Escudero R, Villacampa F, Marques M, Saiz-Ladera C, et al. PIK3CA gene alterations in bladder cancer are frequent and associate with reduced recurrence in non-muscle invasive tumors. *Mol Carcinog* 2015;54(7):566-76.
- Kandula M, Chennaboina KK, Ys AR, Raju S. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KCA) oncogene mutation analysis and gene expression profiling in primary breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(9):5067-72.
- Dirican E, Akkiprik M, Özer A. Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Tumour Biol* 2016;37(6):7033-45.
- Kommineni N, Jamil K, Pingali UR, Addala L, M V, Naidu M. Association of PIK3CA gene mutations with head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 2015;62(1):72-80.
- Vorkas PA, Poumpouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulis V, Lianidou ES. PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn* 2010;12(5):697-704.
- di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A decade of FGF receptor research in bladder cancer: past, present, and future challenges. *Adv Urol* 2012;2012:429213.
- Lim S, Koh MJ, Jeong HJ, Cho NH, Choi YD, Cho do Y, et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Overexpression Is Associated with Poor Survival in Patients with Resected Muscle Invasive Urothelial Carcinoma. *Yonsei Med J* 2016;57(4):831-9.
- Choi CH, Chung JU, Kim JH, Kim BG, Hewitt SM. Expression of fibroblast growth factor receptor family members is associated with prognosis in early stage cervical cancer patients. *J Transl Med* 2016;14(1):124-35.
- Zhang Z, Pal S, Bi Y, Tchou J, Davuluri RV. Isoform level expression profiles provide better cancer signatures than gene level expression profiles. *Genome Med* 2013;5(4):33-45.
- Ueno N, Shimizu A, Kanai M, Iwaya Y, Ueda S, Nakayama J, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 3 IIIc promotes human esophageal carcinoma cell proliferation. *J Histochem Cytochem* 2016;64(1):7-17.
- Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD, Knowles MA. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br J cancer* 2011;104(1):75-82.
- Guancial EA, Werner L, Bellmunt J, Bamias A, Choueiri TK, Ross R, et al. FGFR3 expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Med* 2014;3(4):835-44.

27. Maeng YH, Eun SY, Huh JS. Expression of fibroblast growth factor receptor 3 in the recurrence of non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Korean J Urol* 2010;51(2):94-100.
28. Stachowiak MK, Stachowiak EK. Evidence-based theory for integrated genome regulation of ontogeny: an unprecedented role of nuclear FGFR1 signaling. *J Cell Physiol* 2016;231(6):1199-218.
29. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* 2010;105(1):4-13.
30. Cheng T, Roth B, Choi W, Black PC, Dinney C, McConkey DJ. Fibroblast growth factor receptor-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting. *PLoS One* 2013;8:e57284.

Estimation of isoform expression of PI3K and FGFR signaling pathway components by transcriptome analysis in bladder cancer

Zahra Ousati Ashtiani Ph.D.
Student^{1,2}
Javad Tavakkoly-Bazzaz M.D.,
Ph.D.²
Seyed Alireza Salami Ph.D.³
Mohammad Reza Pourmand
Ph.D.⁴
Gholamreza Pourmand Ph.D.^{1*}

1- Urology Research Center, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Biotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Urology Research Center, Sina Hospital, Hasan Abad Sq. Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 66348560
E-mail: pourmand@tums.ac.ir

Abstract

Received: 15 Jul. 2017 Revised: 11 Sep. 2017 Accepted: 21 Sep. 2017 Available online: 22 Sep. 2017

Background: Aberrant pre-mRNA alternative splicing is a common event in cancer cells. Many abnormally spliced RNA variants have been observed in tumor cells and they can be used as biomarkers or therapeutic targets in new drug design. Increasing our knowledge in understanding the mechanisms of alternative pre-mRNA splicing for cancer-related genes and determination of cancer specific isoforms are important for the development of new strategies in cancer therapy. The aim of this study was isoforms identification and expression of PIK3CA, FGFR3 and FGFR1 genes in bladder cancer by RNA Sequencing and Real-Time PCR.

Methods: This cross-sectional study was conducted at Urology Research Center of Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, from September 2014 to October 2016. Paired tumor and adjacent normal tissues samples were obtained from 30 bladder cancer subjects. Total RNAs were extracted from bladder tumor and normal tissues. Quantitative and qualitative examinations have been done. After quality control, fragmentation of RNAs and cDNA library construction, next-generation RNA sequencing was performed. Resulting raw data were analyzed with different bioinformatics software. Differential expression was confirmed by Real-Time PCR.

Results: RNA sequencing results showed the number of PIK3CA (1 vs 3), FGFR3 (7 vs 6) and FGFR1 (9 vs 12) isoforms and their expression were different in bladder normal tissues in comparison to tumor tissues. Overexpression of PIK3CA gene have been observed in 42% of tumor samples but statistically was not significant. Increased FGFR3 gene (P=0.01) and decreased FGFR1 (P=0.01) expression were significant. There was an association with overexpression of FGFR3 and cigarette smoking (P=0.037) and family history (P=0.004).

Conclusion: RNA sequencing make possible to do the accurate assessment of transcript abundance and identification of different isoforms resulted from aberrant pre-mRNA alternative splicing, which is a crucial process for the maturation of transcripts of multi-exon genes. Regarding the differences in isoforms expression in tumor and normal tissues of bladder cancer, they have potential to be used as biomarkers and sensitive targets for cancer therapy.

Keywords: cross-sectional studies, fibroblast growth factor receptors, PIK3CA, RNA sequencing, transcriptome.