

Identification of lncRNA LINC02747 as a Novel Potential Biomarker for Breast Cancer

Mandana Kazemi¹,
Maryam Peymani²,
Mehrdad Behmanesh³,
Razieh Ghasemi⁴

¹ PhD Student in Biology, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Professor, Department of Biology, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

³ Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴ Assistant professor, Department of Biology, Naghshejahan Higher Education Institute, Isfahan, Iran

(Received December 6, 2025; Accepted April 26, 2026)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer-related mortality among women worldwide. Consequently, the early identification of breast cancer is crucial for improving patient survival, and biomarkers represent promising tools for achieving this objective. This study aims to identify long non-coding RNAs (lncRNAs) associated with breast cancer as potential prognostic biomarkers, given their significant role in cancer pathogenesis.

Materials and methods: This experimental study analyzed gene expression data from the TCGA database, identified differentially expressed mRNAs, miRNAs, and lncRNAs, and constructed a competing endogenous RNA (ceRNA) network to identify potential biomarkers associated with the diagnosis and prognosis of breast cancer. The expression of the target lncRNA in MCF-7 and HEK293T cell lines was examined to validate the bioinformatics findings.

Results: Analysis of TCGA data revealed that LINC02747 expression, which showed the strongest interactions with other miRNAs and mRNAs identified within the ceRNA network, was upregulated in breast cancer. Furthermore, according to the ceRNA network, hsa-miR-195-5p and ten mRNAs- CCNB1, CCNB2, CCNA2, PLK1, CDC6, CDC20, CDC45, BUB1B, CDT1, and ESPL1- were linked to the aforementioned lncRNA, with decreased microRNA expression and increased mRNA expression. The RT-qPCR analysis validated these bioinformatics findings. ROC analysis indicated that LINC02747 is a highly promising biomarker for breast cancer.

Conclusion: The elevated expression of LINC02747 may function as a molecular biomarker for breast cancer, potentially through sponging hsa-miR-195-5p, thereby enhancing the expression of target mRNAs involved in carcinogenesis.

Keywords: Breast cancer, cell cycle pathway, LINC02747, Bioinformatics, TCGA, Biomarker

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (256): 25-41 (Persian).

Corresponding Author: Maryam Peymani - Department of Biology, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
(E-mail: : m.peymani@iau.ir)

شناسایی *lncRNA LINC02747* به عنوان یک نشانگر زیستی جدید بالقوه برای سرطان پستان

ماندانا کاظمی^۱مریم پیمانی^۲مهرداد بهمنش^۳راضیه قاسمی^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان جهان است. در نتیجه، شناسایی زود هنگام سرطان پستان برای افزایش بقای بیمار مهم است و نشانگرها به عنوان ابزارهای امیدوارکننده برای دستیابی به این هدف می‌باشند. این مطالعه با هدف شناسایی *lncRNA*‌های مرتبط با سرطان پستان به عنوان نشانگرهای پیش‌آگهی جدید برای این بیماری انجام پذیرفت، زیرا نقش مهمی در پاتولوژی سرطان دارند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، بررسی داده‌های بیان ژن از پایگاه داده TCGA آنالیز گردید، mRNA‌های با بیان متفاوت، *miRNA*ها و *lncRNA*ها را شناسایی و یک شبکه RNA‌های درون‌زارقیب (*ceRNA*) برای شناسایی نشانگرهای بالقوه مرتبط با تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان ایجاد شد. بیان *lncRNA* هدف در سلول‌های MCF7 و HEK293T برای اعتبارسنجی داده‌های بیوانفورماتیکی بررسی شد.

یافته‌ها: بررسی داده‌های TCGA نشان داد بیان *LINC02747*، که قوی‌ترین تعامل را با سایر *miRNA*ها و mRNA‌های شناسایی شده توسط شبکه *ceRNA* داشت، در سرطان پستان افزایش یافته است. هم‌چنین، طبق شبکه *ceRNA*، *hsa-miR-195-5p* و ده mRNA شامل *CDC45*، *CDC20*، *CDC6*، *PLK1*، *CCNA2*، *CCNB2*، *CCNB1*، *ESPL1* و *CDT1*، *BUB1B* با *lncRNA* فوق‌الذکر مرتبط بودند، که با کاهش بیان *microRNA* و افزایش بیان mRNA همراه بود. آنالیز RT-qPCR یافته‌های بیوانفورماتیک مطالعه حاضر را تأیید کرد. آنالیز ROC نشان داد که *LINC02747* یک نشانگر امیدوارکننده برای سرطان پستان است.

استنتاج: بیان بالای *LINC02747* ممکن است به عنوان یک نشانگر مولکولی برای سرطان پستان عمل کند، شاید از طریق اسفنج *hsa-miR-195-5p*، بیان mRNA‌های هدف را که در فرآیند سرطان‌زایی مؤثر هستند، افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، بیوانفورماتیک، نشانگرهای زیستی، *LINC02747*، مسیر چرخه سلولی

E-mail: m.peymani@iaui.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم پیمانی شهرکرد، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. استاد تمام، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. استاد تمام، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. استادیار، اصفهان، موسسه آموزش عالی نقش جهان، دپارتمان زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۹/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۹/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۲/۶

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان است که به طور قابل توجهی در میزان بروز سرطان نقش دارد (۱). هر ساله حدود ۱/۲ میلیون زن به سرطان پستان مبتلا می‌شوند (۲). تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که تشخیص زود هنگام سرطان پستان، همراه با درمان مناسب، می‌تواند میزان مرگ و میر طولانی مدت مرتبط با این بیماری را به میزان قابل توجهی کاهش دهد (۳). با وجود تلاش‌های قابل توجه در پیشرفت تکنیک‌های تشخیصی و پیش‌آگهی، درصد قابل توجهی از بیماران در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند که منجر به نتایج درمانی نامطلوب می‌شود (۴). با وجود شناسایی عوامل خطر محیطی و ژنتیکی متعدد مرتبط با سرطان پستان، مسیرهای مولکولی دقیق زمینه‌ساز توسعه آن، همچنان مبهم است (۵). RNA های غیر کدکننده (ncRNAs) شامل گروه‌های مختلفی از جمله میکرو RNA ها (miRNAs) و RNA های غیر کدکننده بلند (lncRNAs) هستند. به طور خلاصه، فرض می‌شود که miRNA ها و lncRNA ها با سرطان پستان مرتبط هستند (۶). miRNA ها مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای کوتاهی هستند که تقریباً ۲۲ نوکلئوتید دارند. آن‌ها با تنظیم نامطلوب رونوشت‌های mRNA، مانع شدن از شروع و طویل شدن ترجمه mRNA هدف و تخریب یا بی‌ثبات کردن mRNA ها، به طور قابل توجهی بر فرآیندهای بیولوژیکی تأثیر می‌گذارند (۷). تحقیقات اخیر یافته‌های مهمی را در مورد نقش حیاتی lncRNA ها در جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی سلولی، از جمله تکثیر سلولی، مرگ، متاستاز و مقاومت به درمان، آشکار کرده است. این مولکول‌ها ممکن است در پیشرفت و تکامل انواع مختلف تومور، از جمله سرطان پستان، نقش داشته باشند (۸-۱۰). lncRNA ها مولکول‌های RNA هستند که توانایی رمزگذاری پروتئین‌ها را ندارند (۱۱). آن‌ها به طور فعال در شبکه بیان ژن از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله جداسازی miRNA، اصلاح هیستون و کروماتین و ترجمه پروتئین شرکت می‌کنند (۱۲، ۱۳). داده‌های اخیر نشان

می‌دهد که این lncRNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی آینده‌نگر برای تشخیص و درمان این بیماری پیشنهاد شده‌اند (۱۴، ۱۵). lncRNA ها به وسیله‌ی تعامل با mRNA ها از طریق رقابت برای microRNA های رایج، به عنوان RNA های درون‌زا رقیب (ceRNA) عمل می‌کنند و lncRNA های متعدد به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی مؤثر بر سطح بیان ژن‌های هدف متعدد عمل می‌کنند (۱۶). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بیان غیرطبیعی ceRNA ها به طور پیچیده‌ای با شروع، پیشرفت و پیش‌آگهی بدخیمی‌ها، از جمله سرطان پستان، مرتبط است. شبکه‌های ceRNA می‌توانند نقش mRNA های کدکننده پروتئین را با RNA های غیر کدکننده، از جمله miRNA ها و lncRNA ها، مرتبط کنند (۱۷). پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های با توان عملیاتی بالا، از جمله ریزآرایه و توالی‌یابی نسل بعدی، شناسایی چندین ژن حیاتی مرتبط با سرطان پستان را که ممکن است در شروع و پیشرفت آن نقش داشته باشند، تسهیل کرده است (۱۸). این مطالعه برای شناسایی lncRNA هایی که به عنوان نشانگرهای زیستی حیاتی در سرطان پستان عمل می‌کنند، انجام شد. برای دستیابی به این هدف، در مطالعه حاضر ابتدا lncRNA ها، miRNA ها و mRNA های با بیان متفاوت قابل توجه را از اطلس ژنوم سرطان (TCGA) به دست آورده و این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌هایی که مسیر چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند، با تأکید ویژه بر سرطان پستان انجام شد. در نتیجه، با مقایسه، پیش‌بینی و ادغام RNA های با بیان متفاوت، یک شبکه ceRNA از lncRNA-miRNA-mRNA برای سرطان پستان ایجاد گردید. در نهایت، برای همسو کردن نتایج با درمان بالینی، یک تجزیه و تحلیل بالینی جامع از lncRNA در شبکه ceRNA انجام گرفت تا نشانگرهای زیستی مرتبط با سرطان پستان را شناسایی گردد. برای اعتبارسنجی نتایج تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، بیان lncRNA هدف در سلول MCF7 به عنوان رده سرطانی پستان و سلول HEK293T به عنوان رده سالم بررسی شد و برای اولین بار، یک نشانگر زیستی lncRNA جدید برای

آخرین داده‌های بالینی برای همه نمونه‌ها به دست آمد و در مطالعه ادغام شد. همه تجزیه و تحلیل‌ها مطابق با دستورالعمل‌های انتشار TCGA و با استفاده از داده‌های دسترسی آزاد انجام شد که نیازی به تأیید اخلاقی نداشتند (۱۹). یک نقشه حرارتی با استفاده از تابع ۲ heatmap از بسته gplots (نسخه ۳،۱،۳)، با خوشه‌بندی سلسله مراتبی بر اساس فاصله اقلیدسی، ایجاد شد.

شناسایی *lncRNA*، *miRNA*، و *lncRNA* های با بیان متفاوت

ماتریس بیان نرمال شده برای شناسایی mRNA ها، *miRNA* ها و *lncRNA* هایی که تغییرات بیان قابل توجهی را در نمونه‌های سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های نرمال نشان دادند، استفاده شد. یک رویکرد مدل خطی برای ارزیابی تفاوت‌های بیان در بین گروه‌ها به کار گرفته شد و معیارهای $|\log FC| > 1$ ، $|\log FC| \leq 1$ و $FDR < 0.01$ برای انتخاب ژن‌ها اعمال شد. فهرست ژن‌ها و داده‌ها برای *lncRNA* ها و *miRNA* ها با ابزار BioMart به دست آمد. علاوه بر این، تغییرات بیان با استفاده از بسته Enhanced Volcano ۱/۱۸ از طریق یک نمودار آتشفشانی نشان داده شد.

تحلیل مسیر و عملکرد ژن‌ها

همه DEGs های معنی‌دار با $\log FC > 1$ یا $\log FC \leq -1$ برای شناسایی عملکرد (GO) و تحلیل مسیر ژن‌ها (KEGG) برای بررسی عملکردهای بیولوژیکی مرتبط استفاده شد. پایگاه داده هستی‌شناسی ژن (GO) به سه دسته خاص، عملکرد مولکولی (MF)، جزء سلولی (CC) و فرآیند بیولوژیکی (BP) تقسیم می‌شود (۲۰). پایگاه داده KEGG دسترسی جمعی به اطلاعات مربوط به فعالیت‌های ژن در چندین مسیر بیولوژیکی فراهم می‌کند (۲۱). این مطالعه از بسته‌های DOSE 3.20، ClusterProfiler 4.2.0 و 3.14.0 org.Hs.db در زبان برنامه‌نویسی R برای انجام تحلیل‌های غنی‌سازی GO و KEGG *miRNA* ها

تشخیص بیماری پستان پیشنهاد شد. این مطالعه درک ما از مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی سرطان پستان را افزایش می‌دهد و نشانگرهای زیستی تشخیصی *lncRNA*، *miRNA* و mRNA احتمالی را شناسایی می‌کند و در نتیجه به تشخیص زود هنگام، درمان و پیش‌آگهی بیماری کمک می‌کند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی است. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مطالعه با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.۰۴۷،۱۴۰۳) انجام گرفته است.

بخش بیوانفورماتیکی

پایگاه داده اطلس ژنوم سرطان (<http://cancergenome.nih.gov/>) (TCGA) برای شناسایی mRNA ها، *miRNA* ها و *lncRNA* های مرتبط با توسعه و آسیب شناسی سرطان پستان به کار گرفته شد. داده‌های خام رونوشت برداری سرطان پستان (TCGA-BRCA) در قالب STAR-Counts از طریق بسته TCGAbiolinks به دست آمد. ژن‌هایی با تعداد در میلیون (CPM) کم‌تر از ۱۰ در حداقل ۷۰ درصد نمونه‌ها به دلیل بیان ناچیز، با استفاده از بسته edgeR حذف شدند. متعاقباً، داده‌ها با استفاده از روش (edgeR) TMM نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل بیان افتراقی با بسته limma انجام شد. ماتریس بیان حاصل برای تمام تجزیه و تحلیل‌های بعدی، شامل ۱۱۱۸ نمونه تومور و ۱۱۳ نمونه طبیعی برای mRNA ها و *lncRNA* ها، و همچنین ۱۱۰۳ نمونه تومور و ۱۰۴ نمونه طبیعی برای *miRNA* ها، به دلیل در دسترس بودن داده‌های توالی‌یابی *miRNA*، مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq با استفاده از نرم‌افزار R (نسخه ۴،۳،۱) انجام شد. علاوه بر این،

1- $|\log FC| \leq 1$ و $|\log FC| > 1$ و $FDR < 0.01$ از تجزیه و تحلیل های قبلی، انتخاب شدند. در نهایت، داده ها با استفاده از نرم افزار Cytoscape 3.7.2 برای نشان دادن شبکه ceRNA به تصویر کشیده شدند.

قدرت تشخیصی ژن ها

به منظور بررسی اختصاصیت و حساسیت هر یک از ژن های مورد نظر در این مطالعه، از آزمون ROC برای ترسیم ROC curve استفاده شد. تعیین یک نشانگر به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای تشخیص سرطان پستان با استفاده از مقادیر مساحت زیر منحنی (AUC) با معیارهای زیر تعیین شد: مقادیر AUC از 0.9 تا 1 به عنوان عالی (A)، 0.8 تا 0.9 به عنوان خوب (B)، 0.7 تا 0.8 به عنوان متوسط (C) و 0.6 تا 0.7 به عنوان ضعیف (D) طبقه بندی شدند، در حالی که مقادیر بین 0.5 تا 0.6 به عنوان شکست (F) در نظر گرفته می شوند (24). تحلیل منحنی ROC بر روی داده های TCGA به صورت binary classification و توسط نرم افزار GraphPad Prism v10 انجام شد تا توانایی mRNA های انتخاب شده، lncRNA و miRNA مورد مطالعه برای تمایز نمونه های سرطانی از طبیعی ارزیابی و نشانگرهای زیستی بالقوه شناسایی شوند.

استخراج RNA سنتتر cDNA و Real-time polymerase chain reaction (Real Time PCR)

رده سلولی MCF7 به عنوان رده سرطان پستان و رده سلولی HEK293T به عنوان رده نرمال برای بررسی بیان LINC02747 استفاده شد. منبع این رده های سلولی، انستیتو پاستور ایران بود. فرآیند تکثیر سلولی با استفاده از محیط کشت اصلاح شدهی DMEM که با سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, USA)، استرپتومایسین (Gibco, USA)، و پنی سیلین (Gibco, USA)، غنی شده بود، انجام شد. استخراج RNA با استفاده از معرف

استفاده کرد. معیار تعیین اهمیت آماری، مقدار FDR کم تر از 0.05 تعیین شد. ژن های مسیر چرخه سلولی برای بررسی برهمکنش های ژنی انتخاب شد.

تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI)

پایگاه داده STRING (<http://string-db.org/>) برای تحلیل و پیش بینی برهمکنش های بین ژن های مسیر چرخه سلولی از طریق پروتئین های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. این پایگاه داده به عنوان یک منبع قابل اعتماد برای روشن کردن روابط بین پروتئین های شناسایی شده و پیش بینی شده عمل می کند (22). برنامه Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>), یک پلتفرم نرم افزاری متن باز برای تجسم آن لاین، برای ساخت یک شبکه PPI برای ژن های مرتبط با مسیر چرخه سلولی مورد استفاده قرار گرفت. الگوریتم Degree در افزونه Cytoscape به نام cytoHubba برای ارزیابی اتصال ژن های هاب شناسایی در شبکه PPI مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت شبکه ceRNA

ژن های هاب درون شبکه PPI برای ایجاد شبکه ceRNA مورد استفاده قرار گرفتند. شبکه ceRNA با پیش بینی miRNA های مرتبط با 10 ژن هاب با بسته Multi MRI در R ایجاد شد که چهار پایگاه داده، miRNA-mRNA، MRIDB، miRTarBase و TargetScan پایگاه داده ادغام می کند (23). فقط جفت های miRNA-mRNA که توسط چهار پایگاه داده تأیید شده بودند، انتخاب شدند. علاوه بر این، از پایگاه داده (LncBase) 3 DIANA-LncBase v برای بررسی تعاملات miRNA-lncRNA استفاده شد. معیارهای انتخاب شامل نوع اعتبارسنجی = مستقیم، سطح اطمینان miRNA = بالا و گونه = انسان بود. در نتیجه، زوج های miRNA-mRNA و miRNA-lncRNA بر اساس تفاوت های بیانشان در سرطان پستان، با رعایت معیارهای

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به TCGA و تجزیه و تحلیل بیان افتراقی

پرو فایل‌های بیان mRNA، miRNA و lncRNA در نمونه‌های سرطان پستان و نمونه‌های طبیعی به دست آمده از TCGA بررسی شدند. از بسته limma برای استخراج و تجزیه و تحلیل داده‌ها برای بیان افتراقی استفاده شد. با استفاده از تغییر لگاریتمی بر اساس افزایش بیان ($\log FC > 1$) یا کاهش بیان ($\log FC \leq -1$) و $FDR < 0.01$ تنظیم شده به عنوان معیار معنی‌داری، در مجموع ۱۹۵۲ mRNA با بیان افتراقی شناسایی شد که شامل ۷۵۳ mRNA با بیان افزایشی و ۱۱۹۹ mRNA با بیان کاهشی بود. همچنین، ۷۶ lncRNA با بیان افتراقی و ۱۰۲ miRNA با بیان افتراقی کشف شد که به ترتیب شامل ۱۷ lncRNA با بیان افزایشی و ۵۹ lncRNA با بیان کاهشی و همچنین ۵۲ miRNA با بیان افزایشی و ۵۰ miRNA با بیان کاهشی بود. تصویر شماره ۱، A، B، C، D، E، F تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نقشه‌های حرارتی RNA و نمودارهای آتشفشان را نشان می‌دهند.

تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها

در ابتدا، مطالعات مسیر KEGG برای پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی همه mRNAهای معنی‌دار با بیان متفاوت (DEmRNAها) انجام شد. آنالیز KEGG نشان داد که این ژن‌ها به طور قابل توجهی در مسیرهای متعدد، از جمله چرخه سلولی، مسیر سیگنالینگ MAPK، چسبندگی کانونی، هدایت آکسون، مسیر سیگنالینگ Rap ۱ غنی شده‌اند (تصویر شماره ۲، A). علاوه بر این، این ژن‌ها عملکردهای مولکولی قابل توجهی مربوط به اتصال گلیکوزآمینوگلیکان، اتصال هپارین، اتصال ترکیبات گوگردی، اجزای ساختاری کروماتین، اتصال اسید هیالورونیک را نشان دادند (تصویر شماره ۲، B).

(Invitrogen) TRIzol انجام شد. پس از آن، سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (YTA) انجام شد و RT-qPCR با استفاده از کیت SYBR (YTA) با استفاده از Rotor-gene 6000 و green master-mix انجام شد. ژن *B actin* به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی سطوح بیان عمل کرد. هر واکنش سه بار انجام شد تا دقت تضمین شود. نتایج با استفاده از روش $2^{-\Delta Ct}$ یک تکنیک تجزیه و تحلیل کمی پرکاربرد برای تحقیقات بیان ژن، بررسی شدند. پرایمرهای اختصاصی برای همه ایزوفرم‌های lncRNA *LINC02747* و ژن *B actin* با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7، بر اساس توالی‌های ژنی از NCBI، ایجاد شدند. جدول شماره ۱، توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

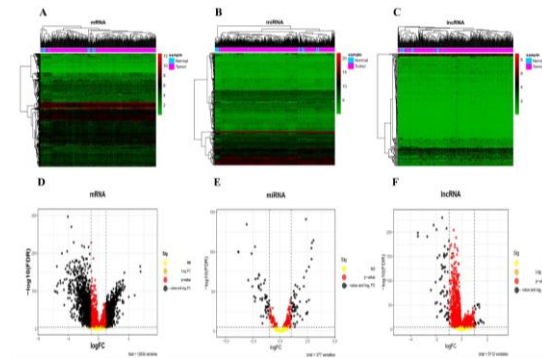
Gene name	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>LINC02747</i> - F	TCAGATGAGAAGAGGCAGAG	104
<i>LINC02747</i> - R	CCCAGATACATCGCATGCAC	
<i>B-actin</i> - F	GCACAGAGCCTCGCCTTTG	63
<i>B-actin</i> - R	ATCCATGGTGAGCTGGCG	

آنالیزهای آماری

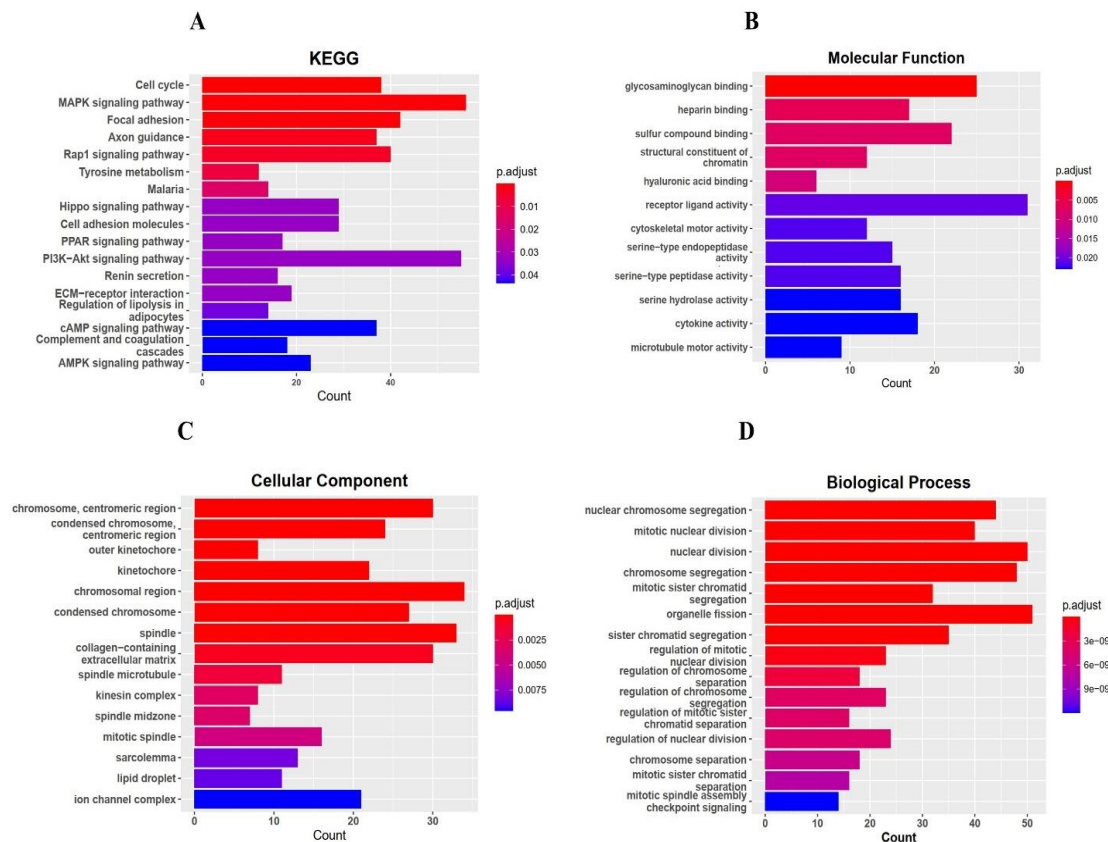
تمام آماده‌سازی‌ها و تحلیل داده‌ها با استفاده از زبان برنامه‌نویسی R (نسخه ۴٫۳٫۱) انجام شد. از FDR برای تعیین درجه اهمیت استفاده شد، به طوری که آستانه FDR کم‌تر از ۰/۰۱ برای همه تحلیل‌ها معنی‌دار تلقی شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شدند. تحلیل آماری و پردازش منحنی داده‌های آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ (نرم‌افزار GraphPad، سن دیگو، کالیفرنیا) انجام شد. تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های t-student یا Mann-Whitney U، بسته به شرایط داده‌ها، ارزیابی شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار انجام شد و مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

می دهند. نقاط سیاه به ترتیب نشان دهنده mRNA ها، miRNA ها و lncRNA های با بیان کم و زیاد هستند که در آن ها $1 \leq \log_2FC$ ، $1 \leq \log_2FC$ و مقدار FDR تنظیم شده > 0.01 است

آن ها در اجزای سلولی، از جمله نواحی کروموزومی، نواحی سانترومری، کینتوکورها، کروموزوم های متراکم، نواحی سانترومری و دوک های تقسیم شناسایی شدند (تصویر شماره ۲، C). این ژن ها با چندین فرآیند بیولوژیکی مانند جداسازی کروموزوم هسته ای، تقسیم هسته ای میتوزی، تقسیم هسته ای، جداسازی کروموزومی، جداسازی کروماتیدهای خواهری میتوزی مرتبط بودند (تصویر شماره ۲، D). همان طور که در جدول شماره ۲ فهرست شده اند، در این مطالعه در مجموع ۳۸ ژن مرتبط با مسیر چرخه سلولی را برای بررسی بیش تر انتخاب گردید.



تصویر شماره ۱: نقشه های حرارتی، بیان متفاوت (A) mRNA ها، (B) miRNA ها و (C) lncRNA ها بین نمونه های طبیعی و سرطان پستان را نشان می دهند. محور افقی، تحلیل خوشه ای هر نمونه را نشان می دهد که رنگ آبی نشان دهنده بافت طبیعی و رنگ صورتی نشان دهنده نمونه های تومور است. محور عمودی، تحلیل خوشه ای mRNA ها، miRNA ها و lncRNA ها را نشان می دهد که بلوک های سبز و قرمز به ترتیب نشان دهنده بیان نسبتاً کم و زیاد هستند. نمودارهای آتشفشانی، بیان متفاوت (D) mRNA ها، (E) miRNA ها و (F) lncRNA های مرتبط با سرطان پستان را نشان



تصویر شماره ۲: تحلیل غنی سازی KEGG و GO از ژن های معنی دار، (A) KEGG، (B) GO: عملکرد مولکولی (MF)، (C) جزء سلولی (CC)، (D) فرآیند بیولوژیکی (BP)

جدول شماره ۴: ژن‌های مرتبط با مسیر چرخه سلولی

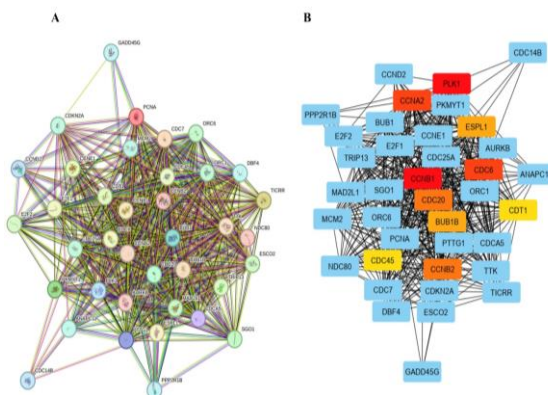
Gene ID	p.adjust	Count
PCNA, CDC7, TICRR, CCNE1, PKMYT1, CDC20, BUB1, PLK1, PITG1, CDCA5, CCNB2, NDC80, AURKB, CCNA2, BUB1B, TTK, CCNB1, CDC6, ESPL1, E2F1, CDC45, CDT1, TRIP13, ESCO2, E2F2, MAD2L1, SGO1, ORC6, ORC1, CDC25A, CDKN2A, MCM2, ANAPC11, DBF4, GADD45G, PPP2R1B, CCND2, CDC14B	3.48E-67	38

جدول شماره ۳: ۱۰ هاب ژن براساس سطح ارتباط

Rank	Name	Score
1	CCNB1	36
2	PLK1	36
3	CCNA2	35
3	CDC6	35
5	CCNB2	34
5	CDC20	34
7	ESPL1	33
7	BUB1B	33
9	CDC45	32
9	CDT1	32

تحلیل شبکه PPI و شناسایی ژن‌های هاب

در این مطالعه ۳۸ ژن مرتبط با چرخه سلولی برای تحلیل برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین به پایگاه داده STRING ارسال شدند (تصویر شماره ۳، A). همبستگی بین DEG‌های شناسایی شده در مسیر چرخه سلولی سرطان پستان با تحلیل شبکه PPI با استفاده از Cytoscape، بیش‌تر ارزیابی شد. این تحلیل ۱۰ ژن هاب را که با استفاده از افزونه Cytohubba ارتباط قوی نشان می‌دادند، شناسایی کرد (تصویر شماره ۳، B).



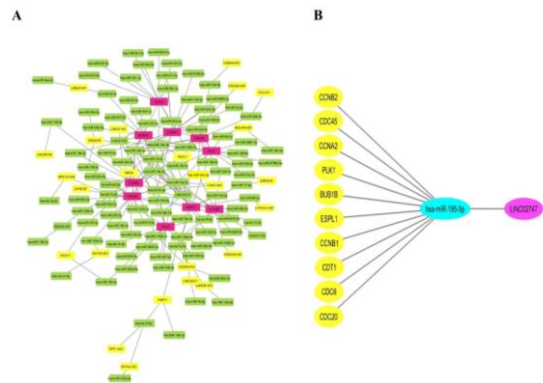
تصویر شماره ۳: (A) پایگاه داده STRING شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) را می‌سازد. (B) الگوریتم Degree در افزونه Cytohubba Cytoscape برای شناسایی ژن‌های هاب در فرآیند ساخت شبکه PPI به کار گرفته شد.

ژن‌های هاب شناسایی شده عبارتند از *PLK1*، *CCNB1*، *ESPL1*، *CDC20*، *CCNB2*، *CDC6*، *CCNA2*، *BUB1B* و *CDT1* که نشان دهنده نقش حیاتی آن‌ها در پیشرفت سرطان پستان است (۶۷- E، P=۳/۴۸). سطح ارتباط، معیار انتخاب این ۱۰ ژن هاب بود (جدول شماره ۳).

ساخت شبکه تنظیمی mRNA-miRNA-lncRNA در سرطان پستان

یک شبکه ceRNA از mRNA-miRNA-lncRNA برای بیماران مبتلا به سرطان پستان بر اساس پیش‌بینی‌ها و اعتبارسنجی‌های قبلی ساخته شد. این شبکه شامل ۱۲۷ lncRNA، ۹۹ miRNA و ۱۰ mRNA هاب بود که از طریق Cytoscape ادغام شدند. نتایج بر یک lncRNA خاص، *LINC02747*، تأکید داشت که بیش‌ترین تعداد تعامل را با سایر miRNA‌ها و Mrna‌های شناسایی شده داشت (تصویر شماره ۴، A). علاوه بر این، *hsa-mir-195-5p* به عنوان miRNA متصل به lncRNA فوق‌الذکر (*LINC02747*) و در مجموع ۱۰ mRNA هاب، یعنی *ESPL1*، *PLK1*، *CDC45*، *CDC20*، *CDC6*، *CDT1*، *CCNB2*، *CCNB1* و *CCNA2* شناسایی شد. تجزیه و تحلیل نشان داد که سطح بیان *hsa-mir-195-5p* در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های طبیعی کاهش یافته است، در حالی که سطح بیان lncRNA *LINC02747* و ۱۰ mRNA هاب افزایش یافته است. یک زیرشبکه جدید از mRNA-miRNA-lncRNA که به طور قابل توجهی با پیش‌آگهی سرطان پستان مرتبط است، کشف شد. این زیر شبکه ممکن است کشف نشانگرهای زیستی تشخیصی آینده‌نگر یا اهداف درمانی برای سرطان پستان را تسهیل کند (تصویر شماره ۴، B).

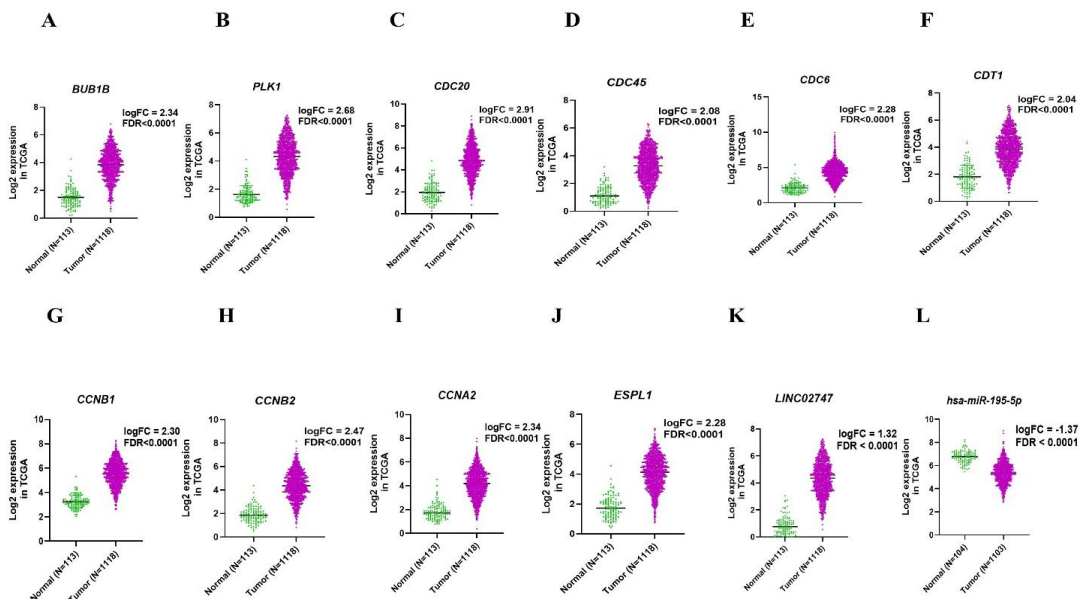
کرد. تصویر شماره ۵، A، B، C، D، E، F، G، H، I، J افزایش قابل توجهی در بیان ژنهای ($\log_{FC} = 2/34$) *PLK1* ($\log_{FC} = 2/68$) *BUB1B* ($\log_{FC} = 2/18$) *CDC45* ($\log_{FC} = 2/08$) *CDC20* *CCNB1* ($\log_{FC} = 2/30$) *CDT1* ($\log_{FC} = 2/04$) *CDC6* و *CCNA2* ($\log_{FC} = 2/34$) *CCNB2* ($\log_{FC} = 2/47$) را در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های طبیعی نشان می‌دهد ($P < 0/0001$). علاوه بر این، تصویر شماره ۵، K افزایش بیان قابل توجه *LINC02747* را نشان می‌دهد ($\log_{FC} = 1/32$) $P < 0/0001$ ، در حالی که تحقیق حاضر از یک مجموعه داده RNA-Seq برای miRNAها شامل ۱۱۰۳ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۴ مورد طبیعی استفاده کرده است. تصویر شماره ۵، L کاهش بیان قابل توجه *has-miR-195-5p* را نشان می‌دهد ($\log_{FC} = 1/37$) $P < 0/0001$. فرضیه ceRNA بیان می‌کند که بیان miRNA با بیان mRNA و lncRNA همبستگی منفی دارد، در حالی که بیان lncRNA با بیان mRNA همبستگی مثبت دارد.



تصویر شماره ۴: (A) تصویر شبکه ceRNA بین lncRNAها، miRNAها و mRNAها در سرطان پستان، در این شبکه، مستطیل‌های زرد نشان دهنده lncRNAها، مستطیل‌های صورتی نشان دهنده mRNAها و مستطیل‌های سبز نشان دهنده miRNAها هستند. (B) زیر شبکه miRNA-lncRNA-mRNAs، ارتباط‌های مرکزی *LINC02747* و *hsa-miR-195-5p* را

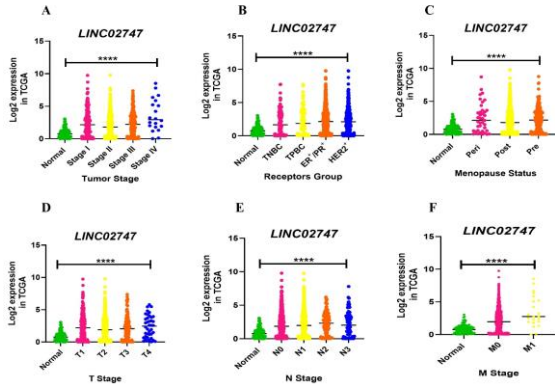
بیان افتراقی شبکه ceRNA در سرطان پستان بر اساس پایگاه داده TCGA

اختلافات در بیان ژن بین نمونه‌های بدخیم و طبیعی با استفاده از داده‌های TCGA بررسی شد. مطالعه حاضر از مجموعه داده‌های RNA-Seq متشکل از ۱۱۱۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۱۳ مورد طبیعی از TCGA استفاده



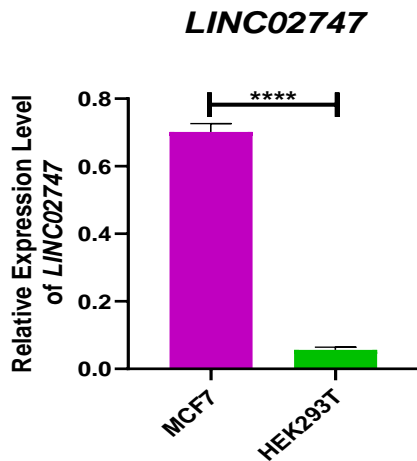
تصویر شماره ۵: (A) تا (L)، سطوح بیان شبکه‌های ceRNA در بیماران سرطان پستان با استفاده از داده‌های TCGA RNA-seq تجزیه و تحلیل شد.

TNM و وضعیت یائسگی در سرطان پستان مرتبط است (P < ۰/۰۰۰۱).



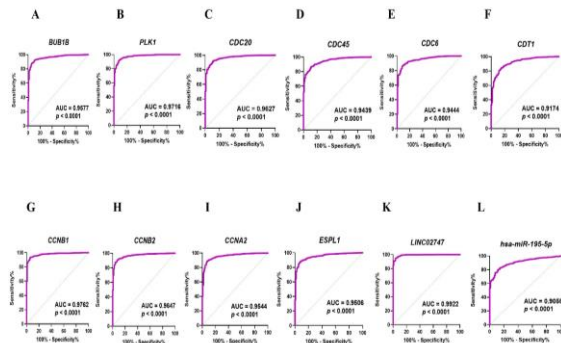
تصویر شماره ۷: (A) تا (F) ارزیابی جامع پارامترهای بالینی در بیماران مبتلا به سرطان پستان برای *LINC02747*

اعتبارسنجی بیان *LINC02747* بر اساس RT-qPCR سطح بیان *LINC02747* از طریق RT-qPCR در رده سلولی MCF7 به عنوان رده سرطان پستان و رده سلولی HEK293T به عنوان رده نرمال ارزیابی شد. نتایج نشان دهنده افزایش قابل توجه بیان *LINC02747* در سلول توموری (MCF7) نسبت به سلول سالم (HEK293T) بود (تصویر شماره ۸).



تصویر شماره ۸: مقایسه سطح بیان *LINC02747* در سول سرطانی و سالم بر اساس داده‌های RT-qPCR

قابلیت‌های تشخیصی شبکه *ceRNA* بررسی شده تحلیل ROC نشان داد که شبکه *ceRNA* عملکرد تشخیصی قوی دارد. مقادیر AUC برای *PLK1*، *BUB1B*، *CCNB1*، *CDT1*، *CDC6*، *CDC45*، *CDC20*، *hsa-miR-195-5p*، *LINC02747*، *ESPL1*، *CCNA2*، *CCNB2*، *۰/۹۴۳۹*، *۰/۹۶۲۷*، *۰/۹۷۱۶*، *۰/۹۵۷۷* به ترتیب *۰/۹۵۰۶*، *۰/۹۵۴۴*، *۰/۹۶۴۷*، *۰/۹۷۶۲*، *۰/۹۱۷۴*، *۰/۹۴۴۴* و *۰/۹۹۲۲* و مقدار $P < ۰/۰۰۰۱$ بودند. مقادیر طبق بخش روش کار مربوط به AUC، پتانسیل تشخیصی قابل توجه شبکه *ceRNA* را در تجزیه و تحلیل بافت‌های سرطانی در مقابل بافت‌های طبیعی نشان می‌دهند. مقدار AUC از *۰/۹* تا *۱* نشان دهنده عملکرد عالی است (تصویر شماره ۶). در نتیجه، این شبکه‌های *ceRNA* خاص ممکن است به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تشخیص سرطان پستان عمل کنند.



تصویر شماره ۶: (A) تا (L) تحلیل منحنی ROC شبکه‌های *ceRNA* کاندید در بیماران مبتلا به سرطان پستان را ارائه می‌دهد که ارزش تشخیصی *ceRNA* های اختصاصی تومور را بر اساس داده‌های TCGA ارزیابی می‌کند. (AUC = مساحت زیر منحنی)

رابطه بین ویژگی‌های بیماران و بیان *LINC02747* تصویر شماره ۷، ویژگی‌های بالینی نمونه‌ها و همبستگی بین ویژگی‌های بالینی و بیان *LINC02747* را بر اساس داده‌های TCGA نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌های TCGA نشان داد که بیان *LINC02747* به طور قابل توجهی با مرحله تومور، گروه گیرنده‌ها، مرحله

بحث

سرطان پستان دومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان است و شناسایی به موقع بیماری می تواند منجر به بهبود پیش آگهی و افزایش قابل توجه احتمال بقا شود (۲۵، ۲۶). این مطالعه بیان mRNA ها، miRNA ها و lncRNA ها را در نمونه های سرطان پستان و نمونه های طبیعی از پایگاه داده TCGA با استفاده از بسته limma بررسی کرد. تجزیه و تحلیل GO و KEGG برای بررسی نقش های بیولوژیکی انجام شد. تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر KEGG نشان داد که "مسیر چرخه سلولی" برجسته ترین مسیر مرتبط با سرطان پستان است. یک شبکه تعامل پروتئین-پروتئین شامل ژن های چرخه سلولی با استفاده از پایگاه داده STRING و نرم افزار Cytoscape ایجاد شد و ژن های هاب یافت شدند. شبکه PPI داخلی شامل ۳۸ ژن مرتبط با مسیر چرخه سلولی بود که امتیاز اطمینان بالای ۰/۹ را نشان می داد که نشان دهنده تعاملات قابل اعتماد است. پس از آن، ۱۰ ژن هاب که ارتباط بالایی را نشان می دادند با استفاده از افزونه CytoHubba شناسایی شدند. ژن های هاب شناسایی شده عبارتند از *CDC6*، *CCNA2*، *PLK1*، *CCNB1*، *CDC45*، *BUB1B*، *ESPL1*، *CDC20*، *CCNB2* و *CDTI* که نشان دهنده نقش حیاتی آن ها در پیشرفت سرطان پستان است. میزان ارتباط، معیار انتخاب این ۱۰ ژن هاب بود. این مطالعه به دنبال روشن کردن عملکرد mRNA های خاص و نقش احتمالی آن ها در مسیر چرخه سلولی بود. هدف، افزایش درک ما از فرآیندهای مولکولی دخیل در رشد سرطان پستان و یافتن اهداف درمانی جدید بود. یک شبکه تنظیمی از mRNA، miRNA و lncRNA برای روشن کردن مکانیسم های پیچیده پست سرطان پستان ایجاد شد. یافته های مطالعه حاضر یک lncRNA به نام *LINC02747* را شناسایی کرد که بیشترین تعداد برهمکنش را با سایر miRNA ها و mRNA های شناسایی شده نشان داد. بیان *LINC02747* که بیشترین تعداد برهمکنش را با سایر miRNA ها و

mRNA های کشف شده نشان می دهد، در سرطان پستان افزایش یافته است، همان طور که با بررسی RT-qPCR در سلول تومور پستان در مقایسه با سلول طبیعی نشان داده شده است. علاوه بر این، یافته های بیوانفورماتیک نشان می دهد که ۱۰ mRNA هاب مرتبط با مسیر چرخه سلولی، با *LINC02747* و *hsa-miR-195-5p* مرتبط هستند. با توجه به کاهش بیان miRNA و افزایش سطح lncRNA و mRNA هدف، محورهای mRNA/miRNA/LncRNA مطالعه را ضروری می سازد. LncRNA ها در تنظیم چرخه سلولی، ترویج تکثیر سلولی، تعدیل پاسخ های ایمنولوژیکی و حفظ پرتوانی سلول بسیار مهم هستند (۱۳، ۲۷). برخی از lncRNA ها نقش محوری در مسیرهای متعدد مرتبط با تومور ایفا می کنند و برای شروع و توسعه تومور ضروری هستند (۲۸). تحقیقات قبلی نشان داده است که *LINC02747* تهاجمی بودن کارسینوم سلول کلیوی را افزایش می دهد (۲۹). تحقیقات مطالعه حاضر افزایش قابل توجهی در بیان *LINC02747* در بافت های سرطان پستان نشان داد. در حال حاضر هیچ مطالعه مرتبط دیگری در مورد *LINC02747* در مقالات علمی وجود ندارد. lncRNA ها از طریق توالی های مکمل با miRNA ها درگیر می شوند و در نتیجه به طور رقابتی مانع اتصال miRNA ها به RNA های پیام رسان هدف (mRNA ها) و تنظیم بیان ژن می شوند که یک روش اساسی برای تنظیم پس از رونویسی است (۳۰). در دهه های اخیر، تحقیقات miRNA به عنوان یک نقطه کانونی تحقیقات در بروز بدخیمی های انسانی ظهور کرده است (۳۱، ۳۲). آن ها می توانند با مشارکت در تنظیم بیان ژن، تکثیر و متاستاز سلول های تومور را مهار کنند (۳۳). مطابق با یافته های قبلی، *has-miR-195-5p* به طور قابل توجهی در بافت ها و رده های سلولی بیماران مبتلا به سرطان پستان کاهش می یابد (۳۴). طبق یک مطالعه دیگر، *has-miR-195-5p* با تمرکز بر چندین ژن، رشد، تهاجم و متاستاز سرطان پستان را مهار کرد (۳۵). هم چنین مشخص شده است که

has-miR-195-5p کاهش بیان دارد و ممکن است به عنوان یک سرکوبگر تومور در چندین بدخیمی، از جمله سرطان پروستات، ریه و روده بزرگ عمل کند (۳۸-۳۶). در دو دهه گذشته، ژنتیک سرطان نشان داده است که جهش‌های بیش فعال کننده در مسیرهای سیگنالینگ رشد، همراه با غیر فعال شدن پروتئین‌های سرکوبگر تومور، تکثیر سرطان‌زا را تسهیل می‌کنند (۳۹). تکثیر DNA یک مکانیسم ضروری در تکثیر سلولی است و افزایش تکثیر سلولی نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد (۴۰). پروتئین‌های *MCM2-7*، *CDC6* و *CDT1* با هم برای کنترل تکثیر DNA همکاری می‌کنند (۴۱). ماهادوپا (Mahadevappa) و همکاران ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان پروتئین چرخه تقسیم سلولی ۶ (*CDC6*) و *CDT1* و افزایش بیان بیش از حد ژن‌های *MCM2-7* شناسایی کردند. مطابق با این یافته، سطح *CDC6* و *CDT1* در سلول‌های سرطان پستان نسبت به سلول‌های اپیتلیال پستان طبیعی افزایش یافته است (۴۲). پروتئین چرخه تقسیم سلولی ۴۵ (*CDC45*) برای تکثیر DNA ضروری است. بیان *CDC45* ارتباط نزدیکی با جمعیت‌های سلولی در حال تقسیم فعال دارد. سطح پروتئین *CDC45* در سلول‌های انسانی مشتق از سرطان به طور مداوم بالاتر از سلول‌های اولیه انسان است (۴۳). *CDC20* چرخه سلولی را کنترل می‌کند و به عنوان یک عامل انکوژنیک در سرطان‌زایی شناخته شده است. بیان بیش از حد *CDC20* در بسیاری از سرطان‌ها ثبت شده است (۴۴). همچنین نشان داده شده است که *CDC20* در آدنوکارسینوم مجرای پانکراس (PDAC) افزایش یافته است (۴۵). در سرطان پستان، نشان داده شده است که *CDC20* به *SMAR1* متصل شده و تجزیه پروتئازومی آن را تسهیل می‌کند؛ از این رو، ظرفیت مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد (۴۶). کینازهای شبه پولو (PLKs) اجزای مهمی از خانواده پروتئین کیناز سرین/ترئونین هستند که فرآیندهای بیولوژیکی ضروری متعددی، از جمله تنظیم چرخه سلولی را کنترل

می‌کنند (۴۷). *PLK1*، عضو محوری خانواده *PLK*، برای تقسیم سلولی ضروری است و به عنوان تنظیم کننده پاسخ آسیب DNA و حفظ پایداری ژنومی در طول تکثیر عمل می‌کند (۴۸، ۴۹). *PLK1* به عنوان یک تنظیم کننده حیاتی تقسیم سلولی میتوزی عمل می‌کند (۵۰). علاوه بر این، بیان بیش از حد *PLK1* در تحقیقات قبلی با پیش آگهی نامطلوب در سرطان پستان مرتبط دانسته شده است (۵۱). *CCNA2* انتقال‌های G1-S و G2-M چرخه سلولی را تنظیم می‌کند و به عنوان یک نشانگر زیستی پیش آگهی برای بقای بیماران سرطان پستان شناخته می‌شود (۵۲). گان (Gan) و همکاران کشف کردند که حذف ژن *CCNA2* انتقال G2-M را مهار می‌کند، در حالی که حذف *CCNA2* با واسطه RNA کوچک مداخله‌گر، میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد (۵۳). *CCNB1* عمدتاً در طول فاز G2/M بیان می‌شود و در کنترل میتوز نقش دارد. *CCNB1* به عنوان یک شاخص پیش آگهی بالقوه برای بقای بیمار مبتلا به سرطان پستان عمل می‌کند (۵۴). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که *CCNA2*، *CDK1* و *CCNB1* در نمونه‌های بافت سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های طبیعی در سطوح بسیار بالاتری بیان می‌شوند و سطح بیان آن‌ها با مرحله تومور همبستگی مثبت دارد (۵۵). ژن *CCNB2*، عضوی از خانواده سیکلین B، با فعال کردن کنترل تقسیم سلولی (*CDC2*)، انتقال G2/M را تقویت می‌کند و مهار آن منجر به توقف چرخه سلولی می‌شود (۵۶). *CCNB2* یک عنصر حیاتی در تنظیم چرخه سلولی است و بیان *CCNB2* معمولاً به شدت کنترل می‌شود (۵۷، ۵۸). با این وجود، سطح بالای *CCNB2* در بدخیمی‌های انسانی، از جمله بدخیمی‌های ریه، کبد، مثانه و سرطان پستان مشاهده شده است (۶۱-۵۸). ممکن است به عنوان یک انکوژن عمل کند و به طور بالقوه می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای پیامدهای منفی عمل کند (۶۲). فعال شدن بیش از حد اجسام اضافی قطب دوکی مانند ۱ (*ESPL1*)، به عنوان یک انکوژن عمل می‌کند و سلول‌ها را مستعد

یک مجموعه داده منحصر به فرد و گسترده توالی‌یابی RNA سرطان پستان از TCGA، افزایش قابل توجهی در بیان ۱۰ هاب ژن (*CDC20*، *CDC45*، *CDC6*)، *CDT1*، *ESPL1* و *PLK1*، *CCNB1*، *CCNB2*، *CCNA2*، *ESPL1* و *BUB1B*) در بافت‌های سرطان پستان نسبت به بافت‌های غیر سرطانی نشان داد.

به‌طور خلاصه داده‌های این مطالعه نشان داد که بیان بالای lncRNA هدف، *LINC02747*، ممکن است به عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص تومور پستان عمل کند. داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که *LINC02747* با کاهش *hsa-miR-195-5p* به عنوان یک اسفنج مولکولی عمل می‌کند و منجر به افزایش بیان mRNAهای هدف، از جمله *PLK1*، *CDT1*، *CDC20*، *CDC45*، *CDC6*، *CCNB1*، *CCNB2*، *CCNA2*، *ESPL1* و *BUB1B* می‌شود که با توسعه و پیشرفت سرطان پستان از طریق تعدیل مسیر چرخه سلولی مرتبط هستند. بررسی جامع نقش‌ها و تعاملات این ژن‌ها می‌تواند بینش‌های جدیدی در مورد علل اساسی سرطان پستان ایجاد کند و به‌طور بالقوه توسعه روش‌های درمانی را تسهیل کند.

آنیوپلوئیدی ناشی از ناهماهنگی کروموزومی و هم‌چنین مستعد آسیب DNA و از دست دادن ژن‌های سرکوبگر تومور حیاتی مرتبط با سرطان‌زایی می‌کند (۶۳). فینتی (Finetti) و همکاران نشان دادند که *ESPL1* به عنوان یک محرک انکوژنیک در سرطان‌های پستان لومینال B عمل می‌کند و اهمیت پیش‌آگهی قابل توجهی دارد (۶۴). *BUB1B*، یک پارالوگ *BUB1*، نیز برای توسعه میتوزی مناسب ضروری است. *BUB1B* برای شروع آپوپتوز در سلول‌های پلی‌پلوئیدی که به‌طور نامناسب از حالت سکون میتوزی خارج می‌شوند، ضروری است، فرآیندی که به سرکوب تومور کمک می‌کند (۶۵، ۶۶). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که *BUB1B* با فعال کردن مسیر سیگنالینگ هدف مکانیکی کمپلکس ۱ را پامایسین (mTORC1) تکثیر سرطان کبد را افزایش می‌دهد (۶۷). طبق گفته موسسه ملی سرطان، بیان بیش از حد *BUB1B* رشد سرطان پروستات را افزایش می‌دهد (۶۸). بیان بیش از حد *BUB1* و *BUB1B* در بافت‌های تومور با پیش‌آگهی ضعیف در سرطان پستان و همچنین با مرحله پیشرفته تومور مرتبط است (۶۹). تجزیه و تحلیل در این مطالعه از

References

- Mehraj U, Mushtaq U, Mir MA, Saleem A, Macha MA, Lone MN, Hamid A, Zargar MA, Ahmad SM, Wani NA. Chemokines in triple-negative breast cancer heterogeneity. New challenges for clinical implications. *Semin Cancer Biol* 2022; 86: 769-83.
- Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women an overview. *Updates Surg* 2017; 69(3): 313-7.
- Migowski A. Early detection of breast cancer and the interpretation of results of survival studies/A detecção precoce do cancer de mama e a interpretação dos resultados de estudos de sobrevida. *Cien Saude Colet* 2015; 20(4): 1309-10.
- Onega T, Goldman LE, Walker RL, Miglioretti DL, Buist DS, Taplin S, Geller BM, Hill DA, Smith-Bindman R. Facility mammography volume in relation to breast cancer screening outcomes. *J Med Screen* 2016; 23(1): 31-7.
- Ozmen N, Dapp R, Zapf M, Gemmeke H, Ruiter NV, van Dongen KW. Comparing different ultrasound imaging methods for breast cancer detection. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2015; 62(4): 637-46.

6. Zhang T, Hu H, Yan G, Wu T, Liu S, Chen W, Ning Y, Lu Z. Long non-coding RNA and breast cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2019; 19: 1533033819843889.
7. O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12(2): 201.
8. Liu Y, Sharma S, Watabe K. Roles of lncRNA in breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 2015; 7: 94.
9. Jin H, Du W, Huang W, Yan J, Tang Q, Chen Y, Zou Z. lncRNA and breast cancer: Progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021; 25: 613-37.
10. Bin X, Hongjian Y, Xiping Z, Bo C, Shifeng Y, Binbin T. Research progresses in roles of lncRNA and its relationships with breast cancer. *Cancer Cell Int* 2018; 18(1): 179.
11. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, Barrette TR, Prensner JR, Evans JR, Zhao S, Poliakov A. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet* 2015; 47(3): 199-208.
12. Ponjavic J, Ponting CP, Lunter G. Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Res* 2007; 17(5): 556-65.
13. Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(11): 699-712.
14. Sideris N, Dama P, Bayraktar S, Stiff T, Castellano L. lncRNAs in breast cancer: a link to future approaches. *Cancer Gene Ther* 2022; 29(12): 1866-77.
15. Jariwala N, Sarkar D. Emerging role of lncRNA in cancer: a potential avenue in molecular medicine. *Ann Transl Med* 2016; 4(15): 286.
16. Ergun S, Oztuzcu S. Oncocers: ceRNA-mediated cross-talk by sponging miRNAs in oncogenic pathways. *Tumor Biol* 2015; 36(5): 3129-36.
17. Qi X, Zhang DH, Wu N, Xiao JH, Wang X, Ma W. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications. *J Med Genet* 2015; 52(10): 710-8.
18. Wu M, Li Q, Wang H. Identification of novel biomarkers associated with the prognosis and potential pathogenesis of breast cancer via integrated bioinformatics analysis. *Technol Cancer Res Treat* 2021; 20: 1533033821992081.
19. Deng M, Brägelmann J, Schultze JL, Perner S. Web-TCGA: an online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets. *BMC Bioinformatics* 2016; 17(1): 72.
20. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000; 25(1): 25-9.
21. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 27-30.
22. Mering CV, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1): 258-61.
23. Ru Y, Kechris KJ, Tabakoff B, Hoffman P, Radcliffe RA, Bowler R, Mahaffey S, Rossi S, Calin GA, Bemis L, Theodorescu D. The multiMiR R package and database: integration of microRNA-target

- interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(17): e133.
24. Kazemi M, Peymani M. Expression of Th17 axis as a biomarker panel in diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Gene Rep* 2021; 25: 101363.
 25. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017; 13(11): 1387.
 26. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015:Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 31-42.
 27. Jiang C, Li X, Zhao H, Liu H. Long non-coding RNAs:potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 62.
 28. Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* 2015; 21(11): 1253-61.
 29. Ju X, Sun Y, Zhang F, Wei X, Wang Z, He X. Long non-coding RNA LINC02747 promotes the proliferation of clear cell renal cell carcinoma by inhibiting miR-608 and activating TFE3. *Front Oncol* 2020; 10: 573789.
 30. Wang K, Liang Q, Wei L, Zhang W, Zhu P. MicroRNA-608 acts as a prognostic marker and inhibits the cell proliferation in hepatocellular carcinoma by macrophage migration inhibitory factor. *Tumor Biol* 2016; 37(3): 3823-30.
 31. Yang H, Li Q, Niu J, Li B, Jiang D, Wan Z, Yang Q, Jiang F, Wei P, Bai S. microRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget* 2015; 7(3): 2709.
 32. Wang YF, Ao X, Liu Y, Ding D, Jiao WJ, Yu Z, Zhai WX, Dong SH, He YQ, Guo H, Wang JX. MicroRNA-608 promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells treated with doxorubicin through the inhibition of TFAP4. *Front Genet* 2019; 10: 809.
 33. Pastorkova Z, Skarda J, Andel J. The role of microRNA in metastatic processes of non-small cell lung carcinoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016; 160(3).
 34. Li D, Zhao Y, Liu C, Chen X, Qi Y, Jiang Y, Zou C, Zhang X, Liu S, Wang X, Zhao D. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(7): 1722-30.
 35. Singh R, Yadav V, Kumar S, Saini N. MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR, ACACA and CYP27B1. *Sci Rep* 2015; 5(1): 17454.
 36. Cai C, Chen QB, Han ZD, Zhang YQ, He HC, Chen JH, Chen YR, Yang SB, Wu YD, Zeng YR, Qin GQ. miR-195 inhibits tumor progression by targeting RPS6KB1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(21): 4922-34.
 37. Yongchun Z, Linwei T, Xicai W, Lianhua Y, Guangqiang Z, Ming Y, Guanjian L, Yujie L, Yunchao H. MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB. *Cancer Lett* 2014; 347(1): 65-74.
 38. Sun M, Song H, Wang S, Zhang C, Zheng L, Chen F, Shi D, Chen Y, Yang C, Xiang Z, Liu Q. Integrated analysis identifies microRNA-195 as a suppressor of Hippo-

- YAP pathway in colorectal cancer. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 79.
39. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol* 2012; 226(2): 352-64.
 40. Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 2002; 7(6): 523-34.
 41. Kwok HF, Zhang SD, McCrudden CM, Yuen HF, Ting KP, Wen Q, Khoo US, Chan KY. Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer. *Am J Cancer Res* 2014; 5(1): 52.
 42. Mahadevappa R, Neves H, Yuen SM, Bai Y, McCrudden CM, Yuen HF, Wen Q, Zhang SD, Kwok HF. The prognostic significance of Cdc6 and Cdt1 in breast cancer. *Sci Rep* 2017; 7(1): 985.
 43. Pollok S, Bauerschmidt C, Sanger J, Nasheuer HP, Grosse F. Human Cdc45 is a proliferation-associated antigen. *FEBS J* 2007; 274(14): 3669-84.
 44. Gao Y, Zhang B, Wang Y, Shang G. Cdc20 inhibitor apcin inhibits the growth and invasion of osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2018; 40(2): 841-8.
 45. Chang DZ, Ma Y, Ji B, Liu Y, Hwu P, Abbruzzese JL, Logsdon C, Wang H. Increased CDC20 expression is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation and progression. *J Hematol Oncol* 2012; 5(1): 15.
 46. Paul D, Ghorai S, Dinesh US, Shetty P, Chattopadhyay S, Santra MK. Cdc20 directs proteasome-mediated degradation of the tumor suppressor SMAR1 in higher grades of cancer through the anaphase promoting complex. *Cell Death Dis* 2017; 8(6): e2882.
 47. Xie S, Xie B, Lee MY, Dai W. Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene* 2005; 24(2):277-86.
 48. Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis—cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(6): 650-60.
 49. Schmucker S, Sumara I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Mol Cell Oncol* 2014; 1(2): e954507.
 50. Lee SY, Jang C, Lee KA. Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy. *Dev Reprod* 2014; 18(1): 65.
 51. de Carcer G. The mitotic cancer target polo-like kinase 1: oncogene or tumor suppressor? *Genes (Basel)* 2019; 10(3): 208.
 52. Markaverich BM, Shoulars K, Rodriguez MA. Luteolin regulation of estrogen signaling and cell cycle pathway genes in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Biomed Sci* 2011; 7(2): 101.
 53. Gan Y, Li Y, Li T, Shu G, Yin G. CCNA2 acts as a novel biomarker in regulating the growth and apoptosis of colorectal cancer. *Cancer Manag Res* 2018; : 5113-24.
 54. Ding K, Li W, Zou Z, Zou X, Wang C. CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer. *Med Hypotheses* 2014; 83(3): 359-64.
 55. Xing Z, Wang X, Liu J, Zhang M, Feng K, Wang X. Expression and prognostic value of CDK1, CCNA2, and CCNB1 gene clusters in human breast cancer. *J Int Med Res* 2021; 49(4): 0300060520980647.

56. Petri ET, Errico A, Escobedo L, Hunt T, Basavappa R. The crystal structure of human cyclin B. *Cell Cycle* 2007; 6(11): 1342-9.
57. Bellanger S, De Gramont A, Sobczak-Thépot J. Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2. *Oncogene* 2007; 26(51): 7175-84.
58. Li R, Jiang X, Zhang Y, Wang S, Chen X, Yu X, Ma J, Huang X. Cyclin B2 overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Arch Med Res* 2019; 50(1): 10-7.
59. Qian X, Song X, He Y, Yang Z, Sun T, Wang J, Zhu G, Xing W, You C. CCNB2 overexpression is a poor prognostic biomarker in Chinese NSCLC patients. *Biomed Pharmacother* 2015; 74: 222-7.
60. Lei CY, Wang W, Zhu YT, Fang WY, Tan WL. The decrease of cyclin B2 expression inhibits invasion and metastasis of bladder cancer. *InUrologic Oncology* 2016; 34 :237-e1.
61. Shubbar E, Kovács A, Hajizadeh S, Parris TZ, Nemes S, Gunnarsdóttir K, Einbeigi Z, Karlsson P, Helou K. Elevated cyclin B2 expression in invasive breast carcinoma is associated with unfavorable clinical outcome. *BMC Cancer* 2013; 13(1): 1.
62. Bolognese F, Wasner M, Dohna CL, Gurtner A, Ronchi A, Muller H, Manni I, Mossner J, Piaggio G, Mantovani R, Engeland K. The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene* 1999; 18(10): 1845-53.
63. Schöckel L, Möckel M, Mayer B, Boos D, Stemmann O. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol* 2011; 13(8): 966-72.
64. Finetti P, Guille A, Adelaide J, Birnbaum D, Chaffanet M, Bertucci F. ESPL1 is a candidate oncogene of luminal B breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147(1): 51-9.
65. Koyuncu D, Sharma U, Goka ET, Lippman ME. Spindle assembly checkpoint gene BUB1B is essential in breast cancer cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2021; 185(2): 331-41.
66. Kapanidou M, Lee S, Bolanos-Garcia VM. BubR1 kinase: protection against aneuploidy and premature aging. *Trends Mol Med* 2015; 21(6): 364-72.
67. Qiu J, Zhang S, Wang P, Wang H, Sha B, Peng H, Ju Z, Rao J, Lu L. BUB1B promotes hepatocellular carcinoma progression via activation of the mTORC1 signaling pathway. *Cancer Med* 2020; 9(21): 8159-72.
68. Fu X, Chen G, Cai ZD, Wang C, Liu ZZ, Lin ZY, Wu YD, Liang YX, Han ZD, Liu JC, Zhong WD. Overexpression of BUB1B contributes to progression of prostate cancer and predicts poor outcome in patients with prostate cancer. *Onco Targets Ther* 2016; : 2211-20.
69. Wang S, Liu X, Yang M, Yuan D, Ye K, Qu X, Wang X. BUBs are new biomarkers of promoting tumorigenesis and affecting prognosis in breast cancer. *Dis Markers* 2022; 2022(1): 2760432.