

تعیین مشخصات مولکولی مرتبط با اتوفازژی با هدف درمان با استفاده از آنالیز مولتی اومیکس

چکیده:

اتوفازژی یکی از عوامل اصلی مقاومت در برابر درمان سرطان است. تلاش‌های بسیاری برای فهم و غلبه بر مقاومت درمانی مرتبط با اتوفازژی انجام شده است اما این تلاش‌ها در مرحله کلینیک ناموفق بوده‌است. در این مطالعه، ما اثر اتوفازژی برای تخمین وضعیت اتوفازژی تومور را ایجاد می‌کنیم. سپس ما تقریباً ۱۰۰۰۰ نمونه تومور را در ۳۳ نوع سرطان از The Cancer Genome Atlas به گروه‌های با اسکور بالا و پایین اتوفازژی طبقه‌بندی می‌کنیم. ما ارتباط بین ویژگی‌های مولکولی چند بعدی و اتوفازژی تومور را مشخص می‌کنیم و اثرات وضعیت اتوفازژی را بر پاسخ دارویی بیشتر تحلیل می‌کنیم. برخلاف دیدگاه مرسوم که القای اتوفازژی به عنوان یک مکانیسم مقاومتی کلیدی در طول درمان سرطان عمل می‌کند، تجزیه و تحلیل ما نشان می‌دهد که القای اتوفازژی ممکن است سلول‌های سرطانی را به داروهای ضد سرطان نیز حساس کند. ما اثر چندین داروی ضد سرطان را در شرایط *in vitro* و *in vivo* به صورت تجربی تأیید می‌کنیم و نشان می‌دهیم که القاکننده‌های اتوفازژی به طور بالقوه سلول‌های تومور را از طریق کاهش سطح بیان DDIT4 به اتوپوزید حساس می‌کنند. مطالعه ما یک دید جامع از تغییرات در سطح مولکولی مرتبط با اتوفازژی تومور ارائه کرده و فرصتی را برای تجزیه و تحلیل با استفاده از مولتی اومیکس مرتبط با بررسی همزمان حساسیت چند دارو بر اتوفازژی فراهم می‌کند.

مقدمه:

اتوفازژی که به عنوان ماکرواتوفازژی نیز شناخته می‌شود، یک فرآیند کاتابولیک تخریب لیزوزومی است و در طی



زهرا انشاری^۱

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس زن



و تحلیل جامع مولتی اومیکس برای توضیح بیشتر در مورد تغییرات مولکولی مربوط به اتوفاژی در سرطان وجود دارد.

مطالعات اخیر شواهد محکمی را در پیش‌بینی اتوفاژی از طریق سنجش‌های مبتنی بر LC3، سنجش‌های مبتنی بر SQSTM1/p62 و بررسی مستقیم ساختارها و سرنوشت مرتبط با اتوفاژی توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند. با این حال، هیچ یک از این رویکردها در حال حاضر تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک انسان امکان پذیر نیست. با وجود تعداد زیادی ژن مرتبط با اتوفاژی که در چندین پایگاه داده از جمله، MSigDB15، Autophagy Database، THANATOS، HADB، HAMDB و ncRDeathDB شناسایی و جمع‌آوری شده‌اند، هیچ نشانی از تأثیر ژنی برای تخمین وضعیت اتوفاژی در نمونه‌های سرطان مشاهده نشده است. در این مطالعه، ما از آنالیز ژن تک‌نمونه (ssGSEA)، یک روش پرکاربرد برای تخمین وضعیت اتوفاژی در تعداد زیادی از نمونه‌های سرطان، و به دنبال آن یک آنالیز جامع برای درک تغییرات مولکولی در اتوفاژی استفاده می‌کنیم.

علاوه بر این، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که اتوفاژی به عنوان یک مکانیسم مقاومتی کلیدی در درمان ضد سرطان عمل می‌کند و مهار اتوفاژی می‌تواند حساسیت دارویی را بهبود بخشد. به عنوان مثال، تیوکونازول که ATG4 را هدف قرار می‌دهد، می‌تواند اتوفاژی را برای افزایش سمیت سلولی شیمی درمانی در رده‌های سلولی سرطانی متعدد مهار کند. شواهد *in vivo* بیشتر نشان داده‌اند که مهارکننده‌های اتوفاژی رشد تومورهای ایجاد شده را مهار می‌کنند و پاسخ به درمان سرطان را بهبود می‌بخشند. بر اساس این شواهد امیدوارکننده، ده‌ها کارآزمایی بالینی شامل مهارکننده‌های اتوفاژی در حال انجام است، به عنوان مثال، کلروکین یا هیدروکسی کلروکین، در ترکیب با سایر داروها، مانند مهارکننده mTOR تمسیرولیموس، مهارکننده پروتئازوم بورتوزومیب و هیستاتینوبیتورلاس ترکیب مهارکننده اتوفاژی پانتوپرازول با دوستاگل نیز در سرطان پروستات مقاوم به اختگی متاستاتیک مورد بررسی قرار گرفته است. بیشتر تلاش‌ها بر مهار اتوفاژی برای ارتقای اثربخشی درمان سرطان متمرکز است.

در این کار، ما وضعیت اتوفاژی تومور را برای ۱۰۰۰۰

تکامل حفظ شده است که توسط آن سلول‌ها هموستاز سلولی را از طریق بازیافت مواد مغذی از اندامک‌ها و پروتئین‌های آسیب‌دیده حفظ می‌کنند. اتوفاژی، به عنوان تلاقی فرآیندهای بیولوژیکی متعدد، می‌تواند سرطان‌ها را از طریق چندین لایه تغییرات مولکولی، از ژنومیکس (بررسی تمام محتوای ژنی یک جاندار) گرفته تا ترنسکریپتومیکس (بررسی تمام محتوای ترنسکریپتوم یا محتوای قابل رونویسی) و پروتئومیکس (بررسی محتوای پروتئینی) را تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال، حذف تک آلی ژن تنظیم‌کننده اتوفاژی BECN1 به تومورزایی در بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان سینه، پروستات و ریه کمک می‌کند. بیان بیش از حد BECN1 تکثیر سلولی را در سلول‌های سارکوم سینوویال سرکوب می‌کند. کاهش بیان ژن ۵ مربوط به اتوفاژی (ATG5) سرطانزایی ملانوم پوستی در مراحل اولیه را افزایش می‌دهد. تجزیه و تحلیل پروتئومیکس نشان داده است که مهار APE1 و اتوفاژی می‌تواند بر مقاومت به سیسپلاتین (داروی شیمی درمانی) در آدنوکارسینوم ریه در رده سلولی A549 با افزایش آپوپتوز، غلبه کند. علاوه بر این، یک شبکه تنظیم‌کننده مولکولی چند بعدی توسط miRNAها و فاکتورهای رونویسی (TFs) نقش ضروری در فرآیند اتوفاژی ایفا می‌کند، ساخته شده است. حاصل از گرسنگی و اتوفاژی القا شده با راپاماسین را تنظیم می‌کند و miRNA-30a اتوفاژی را مهار می‌کند و سلول‌های توموری را با تنظیم کاهشی بیان BECN1 در تومورهای استرومایی دستگاه گوارش به آمیتینیب حساس می‌کند. مطالعات گسترده نشان داده است که FOXO که عضوی از خانواده TFs است در افزایش بیان ژن‌های دخیل در اتوفاژی نقش دارند. FOXO1، یکی از اعضای FOXO TFs، می‌تواند با برهمکنش با ATG7، مسیر اتوفاژیک را القا کند و منجر به افزایش آپوپتوز در تومورها شود. فعال‌سازی FOXO3 مراحل متعددی را برای پروموت کردن مسیر اتوفاژیک تسهیل می‌کند، از جمله افزایش تشکیل نقاط WIPI و القای ULK2 و تجمع LC3h در این نقاط. FOXO3 می‌تواند FOXO1 را برای تنظیم منفی اتوفاژی در سلول‌های سرطانی مهار کند. این مطالعات یک تعامل پیچیده در فرآیند اتوفاژی را نشان می‌دهد. با این حال، در حال حاضر یک تجزیه

نمونه تومور در ۳۳ نوع سرطان از TCGA برآورد می‌کنیم. ما بیشتر ارتباط بین ویژگی‌های مولکولی چند بعدی و اتوفازی تومور را مشخص می‌کنیم و اثرات وضعیت اتوفازی را بر پاسخ به دارو نشان می‌دهیم. از طریق این چشم انداز جامع تغییرات مولکولی مرتبط با اتوفازی تومور، مطالعه ما بینش بیولوژیکی را در مورد هدف گیری درمانی اتوفازی ارائه می‌دهد.

نتایج

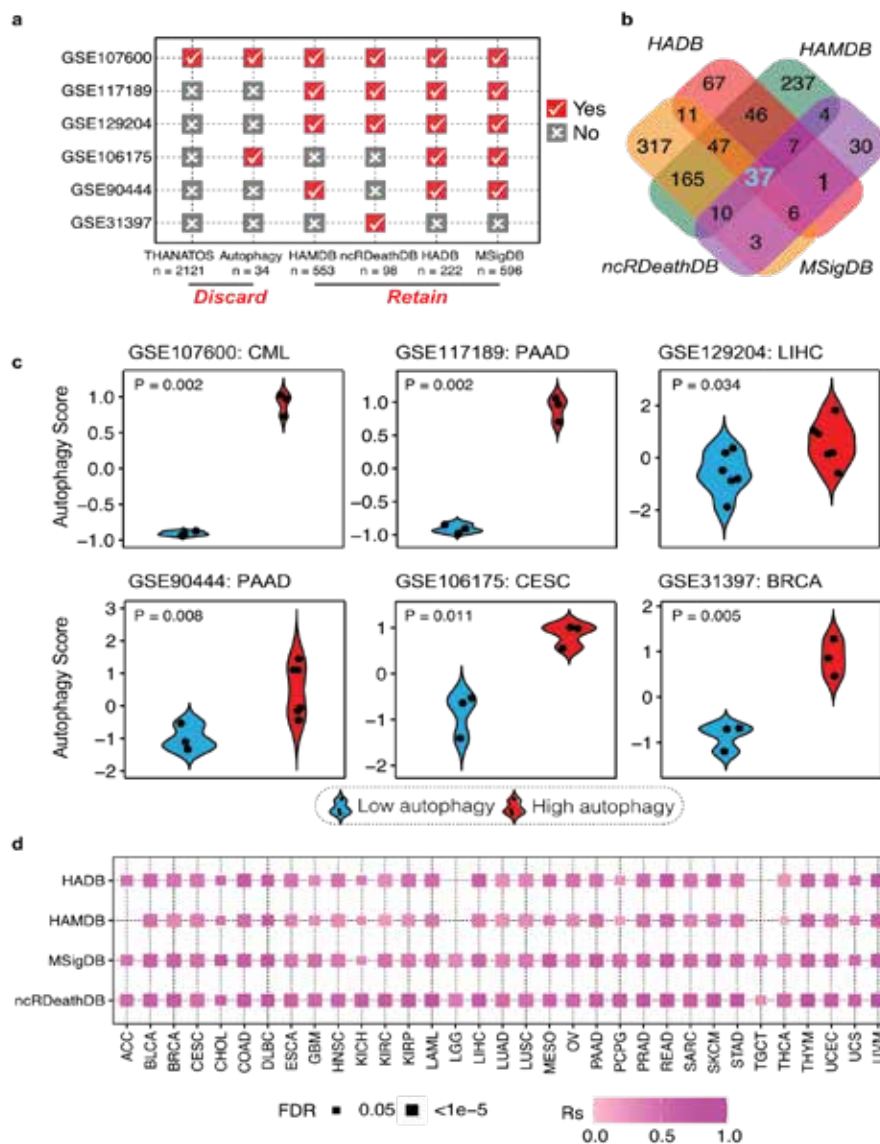
شناسایی یک امضای ژن برای تخمین وضعیت اتوفازی در نمونه‌های سرطانی

برای تخمین وضعیت اتوفازی، ابتدا ژن‌های مربوط به اتوفازی را از شش پایگاه داده (MSigDB، HADB، HAMDB، ncRDeathDB، THANATOS، Autophagy) و همچنین شش مجموعه داده مستقل با وضعیت اتوفازی شناخته شده (GSE107600، GSE117189، GSE11746، GSE129020، GSE117600، GSE117466، GSE12902، HAMDB، HAMDB، HAMDB) و اتوفازی جمع‌آوری کردیم. و سپس از الگوریتم ssGSEA برای محاسبه امتیازات اتوفازی بر اساس ژن‌های مربوط به اتوفازی در هر پایگاه داده در تمام شش مجموعه داده مستقل استفاده کردیم. نمرات ssGSEA بر اساس ژن‌های مربوط به اتوفازی از ۴ پایگاه داده (ncRDeathDB، MSigDB، HADB، HAMDB) می‌تواند خطوط سلولی را در وضعیت اتوفازی بالا در مقابل وضعیت اتوفازی کم در حداقل ۴ مجموعه داده مستقل (که با رنگ قرمز مشخص شده اند) به دقت تشخیص دهد (شکل ۱a). ما مجموعه‌های دقیق ژن اتوفازی را با استفاده از ژن‌های (n=۳۷) که در هر چهار پایگاه داده در این مطالعه همپوشانی دارند، ادغام کردیم (شکل ۱b). سی و دو ژن از ۳۷ ژن به طور مستقیم در مراحل کلیدی اتوفازی نقش دارند. به عنوان مثال، آنها در شروع (به عنوان مثال، ULK1، ULK2، ATG13، RB1CC1، همچنین به عنوان FIP200 شناخته می‌شوند)، هسته زایی (به عنوان مثال، PIK3C3، همچنین به عنوان VPS34، BCL2، UVRAG، و ATG14 شناخته می‌شود)، افزایش طول (به عنوان مثال، ATG5، ATG7، ATG3، ATG12، ATG16L1، GABARAPL1، MAP1LC3A و MAP1LC3B)، بارگیری محموله (به عنوان مثال،

چشم انداز کلی تغییرات مرتبط با اتوفازی مولتی اومیکس در انواع مختلف سرطان

برای درک الگوی جهانی تغییرات مولکولی مرتبط با فرآیند اتوفازی، ما این نمونه‌ها را از TCGA به گروه‌های دارای امتیاز اتوفازی با امتیاز بالا، نمره متوسط و امتیاز پایین با استفاده از توزیع سه‌کال‌های امتیاز طبقه‌بندی کردیم. در مجموع، ۲۴ نوع سرطان با بیش از ۳۰ نمونه در گروه اتوفازی با امتیاز بالا و گروه اتوفازی با نمره کم برای آنالیز بعدی استفاده شد. برای شناسایی تغییرات مولکولی مرتبط با اتوفازی، از الگوریتم تطبیق امتیاز گرایش (PSM) استفاده کردیم که به طور گسترده در مطالعات قبلی مورد استفاده قرار گرفته است تا اثرات مخدوش کننده‌های بالینی (مانند جنس، سن در تشخیص اولیه پاتولوژیک، خلوص تومور، مرحله پاتولوژیک و نوع بافت شناسی). آنالیز کلی را در شکل ۲a خلاصه کردیم.

در این مطالعه، ما ۵ ویژگی مولکولی مختلف از جمله mRNA، پروتئین، miRNA، ۲۱۸ ۲۰۲۸۸، ۳۷۸۵ ۲۴۳۵، جهش و ۴۵۰ تغییر تعداد کپی سوماتیک (SCNA) را در ۲۴ نوع سرطان آزمایش کردیم (شکل ۲a). ما تعداد قابل توجهی از تغییرات مولکولی مرتبط با وضعیت اتوفازی را شناسایی کردیم (شکل ۲b) و تغییرات به طور قابل توجهی در انواع مختلف سرطان متفاوت بود. به عنوان مثال، بیان mRNA بیشترین تعداد تغییرات را نشان داد (۸۵۳۱ نوع mRNA)، که از ۵۸ ژن در کارسینوم مری



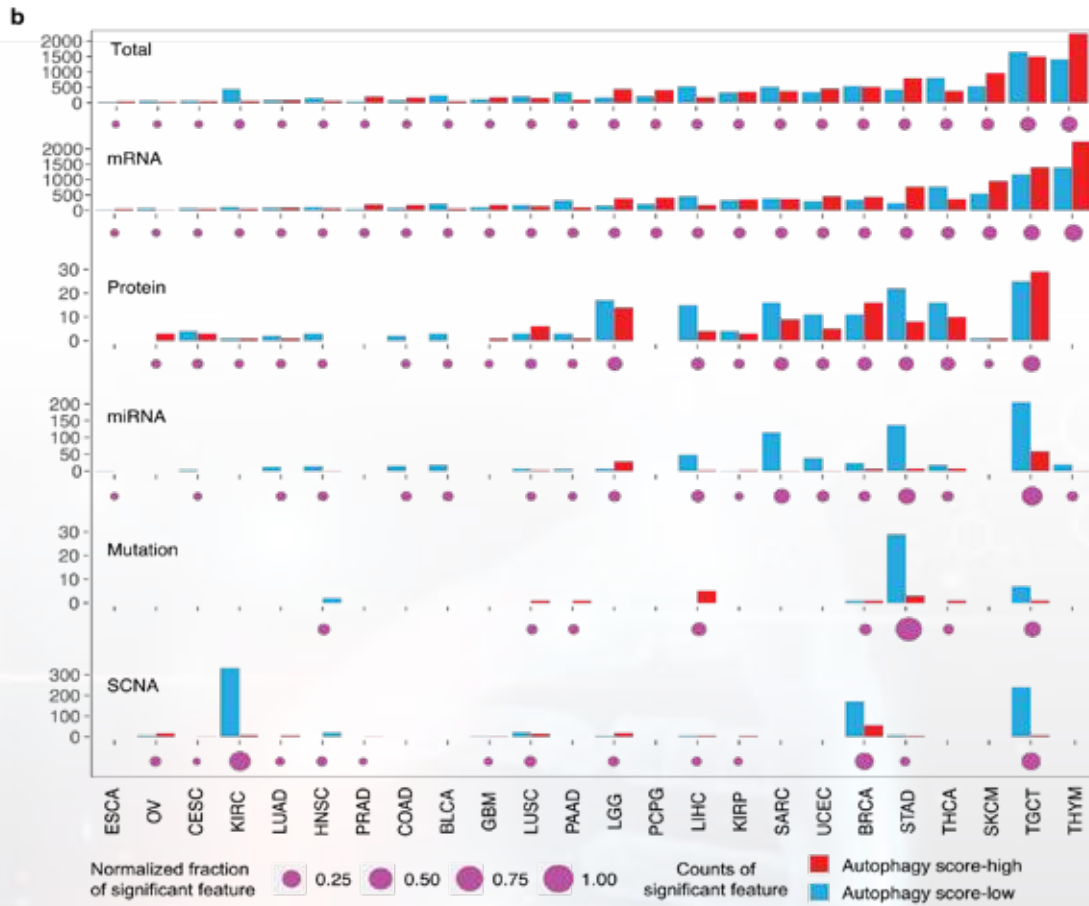
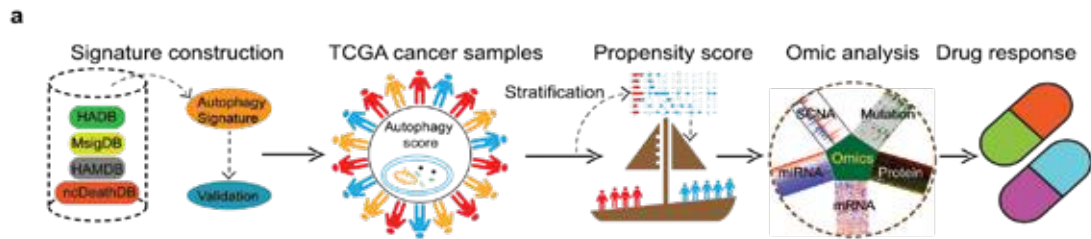
شکل ۱: شناسایی امضای ژن برای تخمین وضعیت اتوفازی در نمونه‌های سرطانی.

الف) وضعیت اتوفازی با نمرات اتوفازی بر اساس لیست‌های ژنی از ۶ پایگاه داده در ۶ مجموعه داده عمومی ارزیابی شد. «Yes» (علامت بررسی) نشان‌دهنده یک لیست ژن است که برای وضعیت اتوفازی تأیید شده است. «No» (x) نشان‌دهنده بی‌اعتباری فهرست ژنی است.

ب) نمودار ون لیست ژن‌های مربوط به اتوفازی از ۴ پایگاه داده با عملکرد بهتر.

ج) امتیازات اتوفازی از ۶ مجموعه داده بر اساس امضای مجموعه ۳۷ ژن در گروه با امتیاز اتوفازی بالا (قرمز) و گروه کم امتیاز اتوفازی (آبی). برای ارزیابی تفاوت از آزمون t دو طرفه دانشجویی استفاده شد. $P < 0.05$.

د) همبستگی بین نمرات اتوفازی بر اساس مجموعه ۳۷ ژنی و مجموعه‌های ژنی از HAMDB, HADB, MSigDB, و ncRDeathDB در بین نمونه‌های تومور TCGA. شدت رنگ نشان دهنده ضریب همبستگی اسپیرمن (R_s) است. اندازه مستطیل نشان دهنده FDR برای همبستگی اسپیرمن است. $FDR < 0.05$ عدم وجود مستطیل به معنای عدم اهمیت است برای آزمون فرضیه‌های چندگانه از روش بنجامینی و هوچبرگ استفاده شد. مخفف‌ها: کارسینوم ACC آدنوکورتیکال، کارسینوم اروتنلیال مثانه BLCA، کارسینوم مهاجم پستان BRCA، کارسینوم سلول سنگفرشی دهانه رحم CESC و آدنوکارسینوم اندوسرویکال، کلاژیوکارسینوم CHOL، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، کربوموفوب کلیه KICH، کارسینوم سلول شفاف کلیوی KIRC، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه کلیه، لوسمی حاد میلوئیدی LAML، کلیوم با درجه پایین تر مغز LGG، کارسینوم کبدی کوآدسلو کارس لومبارسینوما مزوتلیوما Meso، سیستادنوکارسینوم سرووز تخمدان، PAAD آدنوکارسینوم پانکراس، فنوکروموسیتوم و پاراگانگلیوما PCPG، آدنوکارسینوم پروستات PRAD، آدنوکارسینوم رکتوم، سارکوم سارکوم، SKCM تومور پوستی تست، تومور پوستی STTHM، تومور پوستی UCEC Uterine Corpus End، کارسینوسارکوم رحم، UCS، ملانوم UVM، لوسمی میلوژن مزمن CML.



شکل ۲: مروری بر پنج ویژگی مولکولی در انواع سرطان.

الف) آنالیز یکپارچه مولتی-اومیکس و پاسخ دارویی در انواع مختلف سرطان.

ب) تعداد هر ویژگی مولکولی تغییر یافته (mRNA، miRNA، جهش، پروتئین و SCNA) و کل ویژگی‌های مولکولی تغییر یافته در گروه‌های با امتیاز اتوفازی بالا (قرمز) و امتیاز اتوفازی پایین (آبی) از نمونه‌های تومور TCGA. نقطه سرخابی نشان‌دهنده درصد ویژگی‌های مهم نسبت به کل ویژگی‌ها در هر سرطان است. SCNA= تغییرات تعداد کپی سوماتیک.



دو سرطان غنی شده است (گلیوبلاستوما مولتی فرم: FDR = 0.041; PRAD: FDR = 0.017؛ شکل ۳b). غنی سازی انتقال اپیتلیال - مزانشیمی (EMT) در گروه STAD و TGTC با امتیاز اتوفازی بالا، ارتباط بین اتوفازی و EMT را نشان می دهد (شکل ۳b).

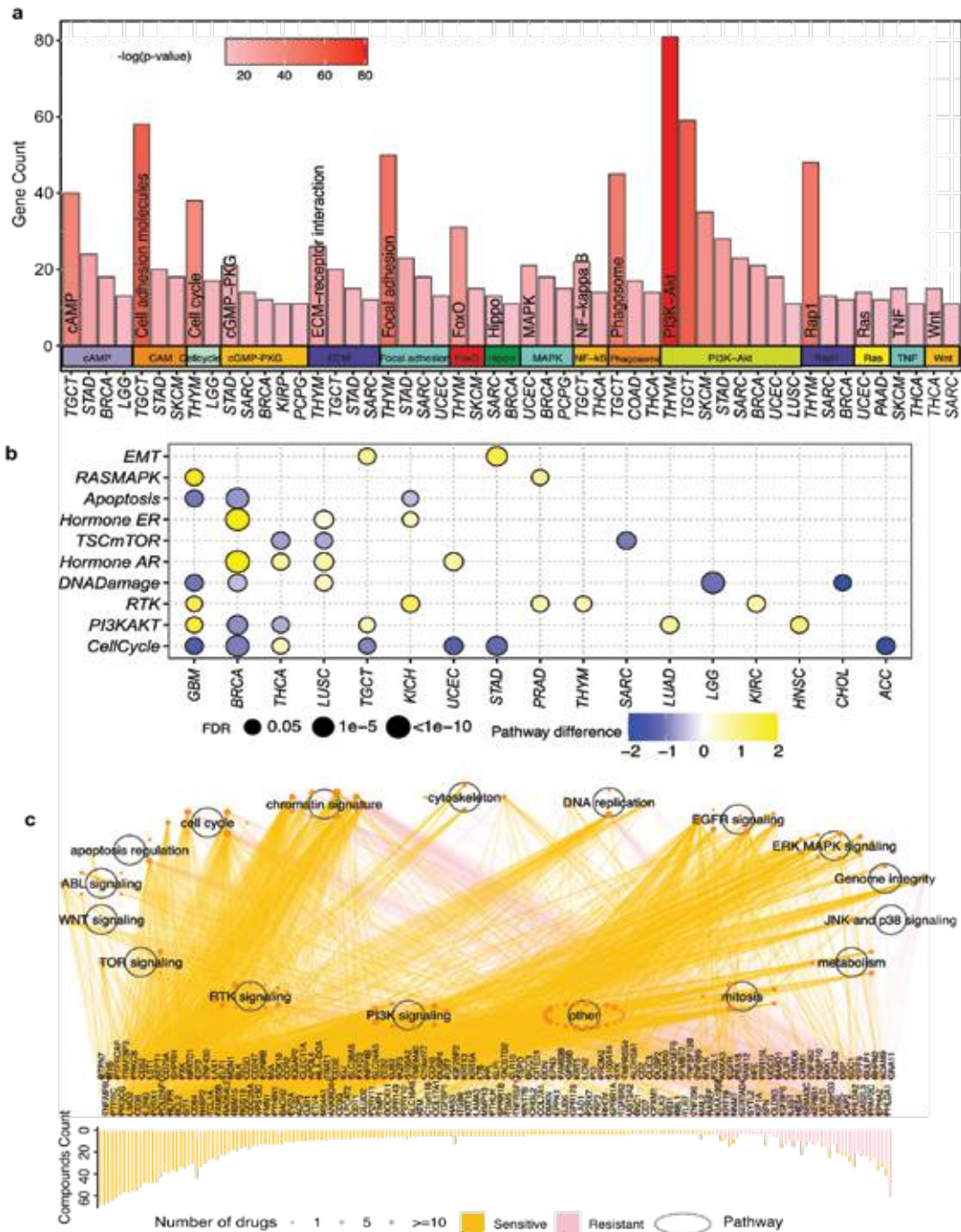
برای بررسی بیشتر ارتباط بین مسیرهای بیولوژیکی و پاسخ دارویی، ما همبستگی بین بیان mRNA ژن ها در مسیرهای مرتبط با سرطان و ناحیه زیر منحنی دوز-پاسخ 252 (AUC) داروی ضد سرطان در ژنومیک حساسیت دارویی را محاسبه کردیم. ما دریافتیم که ۱۹۷ ژن مرتبط با اتوفازی بیان شده متفاوت در ۱۶ مسیر سیگنال دهی سرطان با پاسخ دارویی به ۱۱۹ داروی ضد سرطان در حداقل سه نوع سرطان (FDR < 0.05، |Rs| > 0.3) و اکثر ژن ها مرتبط هستند. با حساس شدن داروهای ضد سرطان مرتبط است (شکل ۳c) این مسیرها شامل برخی از مسیرهای مرتبط با اتوفازی، مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، مسیر سیگنالینگ MAPK و مسیر سیگنالینگ mTOR هستند (شکل ۳c). به عنوان مثال، مسیر سیگنالینگ PI3K، که گزارش شده است یک مهارکننده حساسیت شیمیایی است، به طور قابل توجهی در هر دو پروفایل mRNA و پروتئین متفاوت بود. ما دریافتیم که ۷۹ ژن در مسیر سیگنال دهی PI3K با حساسیت ۱۱ داروی ضد سرطان و ۳۴ ژن در مسیر سیگنالینگ PI3K با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند. تنظیم مسیر سیگنالینگ MAPK حساسیت دارویی سلول های سرطانی را در انواع مختلف سرطان افزایش می دهد. ما دریافتیم که ۳۶ ژن در مسیر سیگنال دهی MAPK با حساسیت ۱۱ داروی ضد سرطان و چهار ژن در مسیر سیگنالینگ MAPK با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند. مطالعات قبلی همچنین نشان داده اند که تنظیم مسیر سیگنالینگ mTOR می تواند سلول های سرطانی را نسبت به داروهای ضد سرطان حساس کند. ما دریافتیم که ۲۶ ژن در مسیر سیگنال دهی mTOR با حساس شدن دو داروی ضد سرطان و ۱۰ ژن در مسیر سیگنالینگ mTOR با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند این نتایج یک دیدگاه جامع برای کاوش استراتژی های درمانی از طریق هدف قرار دادن ژن ها در مسیرهای سیگنالینگ ارائه می دهد.

تا ۳۶۳۲ ژن در تیموما متغیر بود (THYM؛ شکل ۲b). در مقابل، تنوع جسمی حداقل تغییرات را نشان داد، با تنها ۵۱ جهش در هشت نوع سرطان، از ۱ جهش در کارسینوم سلول سنگفرشی ریه (LUSC) تا ۳۲ جهش در آدنوکارسینوم معده (STAD). فراوانی هر ویژگی مولکولی در پروفایل های مولکولی مختلف در سرطان ها بسیار متفاوت است. به عنوان مثال، چندین نوع سرطان، از جمله THYM، تومور سلول زایای بیضه (TGCT)، و ملانوم پوستی پوست (SKCM)، تعداد بیشتری از تغییرات را بین گروه های امتیاز اتوفازی بالا و کم امتیاز اتوفازی نشان دادند (شکل ۲b).

ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA/پروتئین و مسیرهای سیگنالینگ

برای بررسی ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA، ما بر روی mRNA های تغییر یافته قابل توجه در ۲۴ سرطان تمرکز کردیم. این ژن های تغییر یافته در ۱۶ مسیر از دایره المعارف ژن ها و ژنوم های کیوتو (KEGG) که با بیش از ۱۰ ژن در حداقل دو نوع سرطان غنی شده بودند (p value < 0.05؛ شکل ۳a). این مسیرها شامل برخی از مسیرهای مرتبط با اتوفازی مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، مسیر سیگنالینگ MAPK و فاگوزوم است که اغلب گزارش شده است که فرآیند اتوفازی را در چندین سرطان تعدیل می کند.

داده های پروتئومیکس عملکردی آرایه های پروتئین فاز معکوس، پروتئین های کل و سفریله شده مرتبط با سرطان را پوشش می دهند. برای درک بیشتر اثرات بالقوه اتوفازی بر بیان پروتئین، نمرات مسیر را بین گروه با امتیاز اتوفازی بالا و گروه نمره کم اتوفازی بر اساس بیان پروتئین در ۱۰ مسیر سیگنالینگ سرطان، که بر اساس فاز معکوس تعریف شده اند، مقایسه کردیم. آرایه پروتئین از TCGA قابل ذکر است، ما دریافتیم که مسیر mTOR در گروه کم امتیاز اتوفازی در سه سرطان به طور قابل توجهی غنی شده است (LUSC: نرخ کشف کاذب [FDR] = 0.032؛ SARC: FDR = 0.004، کارسینوم تیروئید (THCA): FDR = 0.09؛ 3b)، که با مشاهدات قبلی که مسیر mTOR از اتوفازی جلوگیری می کند، مطابقت داشت. علاوه بر این، ما دریافتیم که مسیر RAS-MAPK، به عنوان فعال کننده اتوفازی، در گروه با امتیاز اتوفازی در



شکل ۳: ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA / روتین و مسیرهای سیگنالینگ.

الف) مسیرهای غنی شده با تعداد ژن بیش از ۱۰ در حداقل دو سرطان توسط mRNAهای تغییر یافته قابل توجهی در مقایسه گروه با نمره بالا در اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی. بارپلات ژنهای غنی شده را نشان می‌دهد. شدت رنگ بارپلات نشان دهنده اهمیت مسیرهای غنی شده است. غنی سازی مسیرها با بسته "clusterProfile" ارزیابی شد.

ب) مسیرهای سیگنال دهی تغییر یافته بر اساس داده‌های پروتئومیکس عملکردی آرایه‌های پروتئین فاز معکوس در گروه با امتیاز اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی برای سرطان‌های متعدد، رنگ نشان دهنده تفاوت امتیاز مسیر است. اندازه نقطه نشان دهنده FDR برای امتیاز مسیر است.

ج) همبستگی اسپیرمن بین سطوح بیان mRNA ژن‌های مرتبط با اتوفازی در مسیرهای سیگنالینگ مختلف و ناحیه زیر منحنی در ۱۰۷۴ رده سلول سرطانی. بارپلات تعداد داروهایی را که هر ژن را هدف قرار می‌دهند، نشان می‌دهد. نقطه نارنجی مسیر هدف دارو را نشان می‌دهد. اندازه نقطه نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با حساسیت دارویی است.



در گروه ۴ نوع سرطان با امتیاز اتوفازی بالا تنظیم شد و FOXA2 توسط فعالیت اتوفازی در سلول‌های بنیادی سرطان تخمدان تنظیم شد. در مجموع، نتایج ما نشان می‌دهد که TFها نقش نظارتی مهمی در اتوفازی دارند که بینش‌های بیولوژیکی را برای تحقیقات بیشتر ارائه می‌دهد.

ارتباط بین اتوفازی و تغییرات تعداد کپی سوماتیک

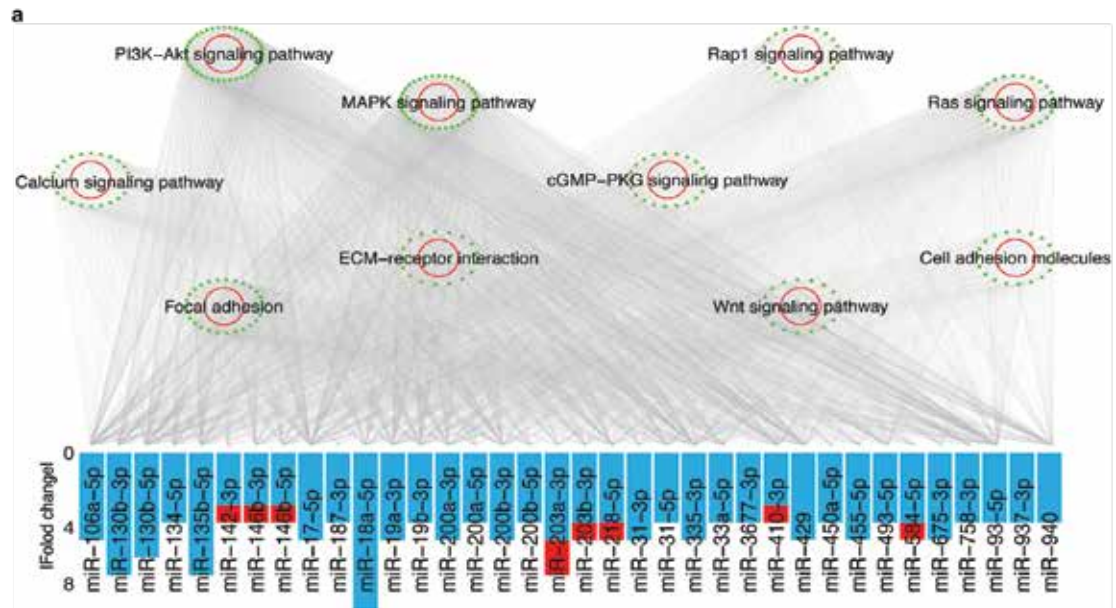
SCNAها می‌توانند بر سطح بیان ژن‌ها در فرآیندهای متعدد اتوفازی در انواع مختلف سرطان تأثیر بگذارند. به عنوان مثال، افزایش تعداد کپی 5q منجر به بیان بیش از حد SQSTM1، یک محموله اتوفازی، در سرطان کلیه می‌شود. تقویت تعداد کپی در 2q37 منجر به افزایش سطح بیان ATG16L1، یک جزء کلیدی از یک مجتمع پروتئینی بزرگ مرتبط با اتوفازی در سرطان پروستات می‌شود. برای بررسی نقش SCNAها در سرطان‌های متعدد، ما ۸۲ SCNA را ارزیابی و شناسایی کردیم که به طور قابل توجهی در ۱۴ نوع سرطان تغییر یافته بودند (شکل 5a)، از ۱ SCNA در آدنوکارسینوم پروستات (PRAD) تا ۳۳ SCNA در BRCA. این مناطق ۸۵۰ ژن را پوشش می‌دهند که از ۱ ژن در PRAD تا ۳۴۱ ژن در کارسینوم سلول شفاف کلیه را شامل می‌شود (KIRC؛ شکل 2b). به عنوان مثال، ما در مجموع ۶۹ حذف را در ۱۳ نوع سرطان شناسایی کردیم (شکل 5a)، با پوشش ۵۸۸ ژن در این مناطق. ما تنها ۳۶ تقویت را در ۱۰ نوع سرطان با ۲۶۷ ژن واقع در این مناطق شناسایی کردیم (شکل 5a).

علاوه بر این، ۱۶ ژن قابل عمل بالینی در این SCNAهای تغییر یافته نگهداری شدند (شکل 5b)، و آنها توسط ۳۷ داروی ضد سرطان از چهار دسته، از جمله درمان هدف و ایمونوتراپی (شکل 5c) مورد هدف قرار گرفتند. به عنوان مثال، حذف 2q37.3 شایع‌ترین SCNA در گروه چهار سرطانی با امتیاز اتوفازی است (BRCA، LGG، OV، و KIRP؛ شکل 5a). پروتئین مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (PDCD1)، به عنوان هدف پمبرولیزوماب و نیولوماب برای ایمونوتراپی سرطان، در ناحیه 2q37.3 در BRCA و LGG قرار دارد (شکل 5b). MTOR، به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین مؤلفه‌هایی که فرآیند اتوفازی را در

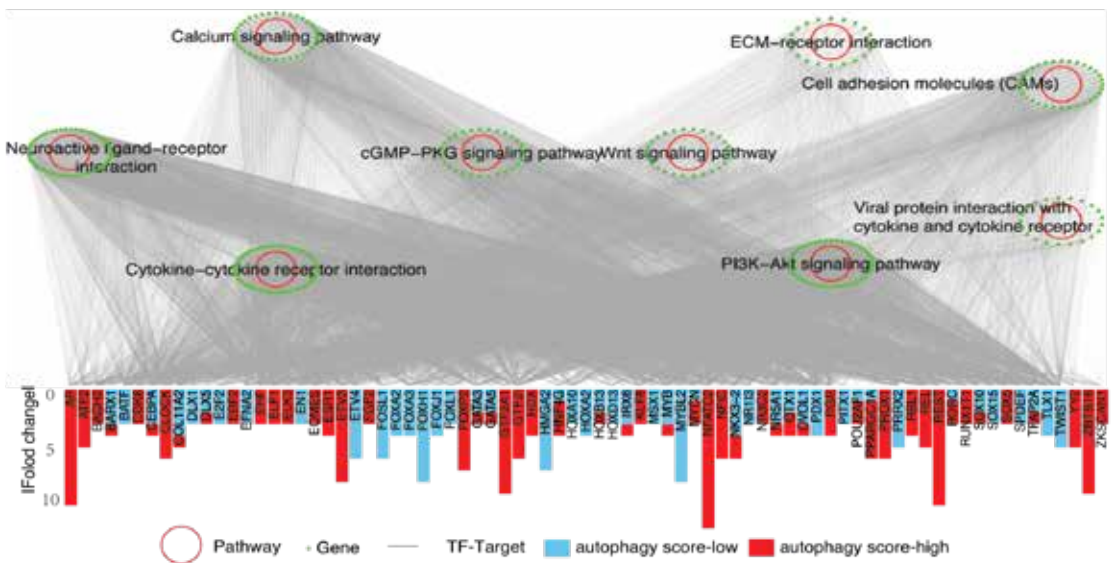
شبکه تنظیمی در میان miRNAهای مربوط به اتوفازی، ژن‌های هدف و TFs

برای درک بیشتر شبکه تنظیمی در اتوفازی، ما ۳۶ miRNA مربوط به اتوفازی را در حداقل چهار سرطان شناسایی کردیم و یک شبکه تنظیمی هدف miRNA برای بررسی اثرات miRNAها بر اتوفازی ساختیم. ما ۴۰۶۲ لبه بین ۳۶ miRNA و ژن ۱۹۹۴ را با تغییرات بیانی قابل توجه در حداقل سه سرطان شناسایی کردیم (شکل 4a). این ژن‌های هدف‌گیری شده توسط miRNAها در چندین مسیر مرتبط با اتوفازی، از جمله مسیرهای سیگنالینگ PI3K-AKT و MAPK غنی شدند (شکل 4a). به عنوان مثال، در مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، miR-106a، miR-17-5p و miR-93-5p بیان کمتری در گروه با امتیاز اتوفازی در حداقل چهار سرطان دارند (شکل 4a). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که miR-106a، miR-17-5p و miR-93-5p به عنوان اعضای خانواده miR-17 می‌توانند با هدف قرار دادن ژن‌های مرتبط با اتوفازی، اتوفازی را مهار کنند. این miRNAها و فعل و انفعالات متنوع، بینش‌های مهمی را در مورد مکانیسم‌های تنظیمی اتوفازی درگیر در سرطان ارائه می‌دهند.

TFs تنظیم کننده‌های حیاتی بیان ژن هستند. ما دریافتیم که ۹۴ TF به طور قابل توجهی در حداقل ۹ سرطان تغییر یافته است، و این 1759 mRNA TFهای متفاوت را مورد هدف قرار می‌دهد (شکل 4b). mRNAهای مورد هدف توسط TFها در ۹ مسیر سیگنالینگ، از جمله مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT مربوط به اتوفازی غنی شدند (شکل 4b). ژن‌های مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT توسط ۶۶ TF مورد هدف قرار گرفتند که شامل FOXA1، FOXA3، FOXJ1، FOXL1 و FOXH1 بود. این TFها، به عنوان اعضای خانواده TF سرچنگال (FOX)، به طور قابل توجهی در گروه با امتیاز اتوفازی از انواع سرطان‌های متعدد تنزل یافتند (شکل 4b)، که با دانش قبلی که از بین رفتن FOXA3 فرآیند اتوفازی را افزایش می‌دهد، مطابقت دارد. جالب توجه است، ما همچنین تغییراتی را در چندین عضو دیگر خانواده FOX تحت وضعیت اتوفازی مشاهده کردیم. به عنوان مثال، FOXP2 در گروه ۷ نوع سرطان با امتیاز اتوفازی بالا تنظیم شد (شکل 4b)، و جهش بی‌هوده FOXP1، به عنوان همان زیر کلاس FOXA2، می‌تواند باعث ایجاد اتوفازی ۵۶ شود.



b ○ Pathway - Gene — miRNA-Target ■ autophagy score-low ■ autophagy score-high

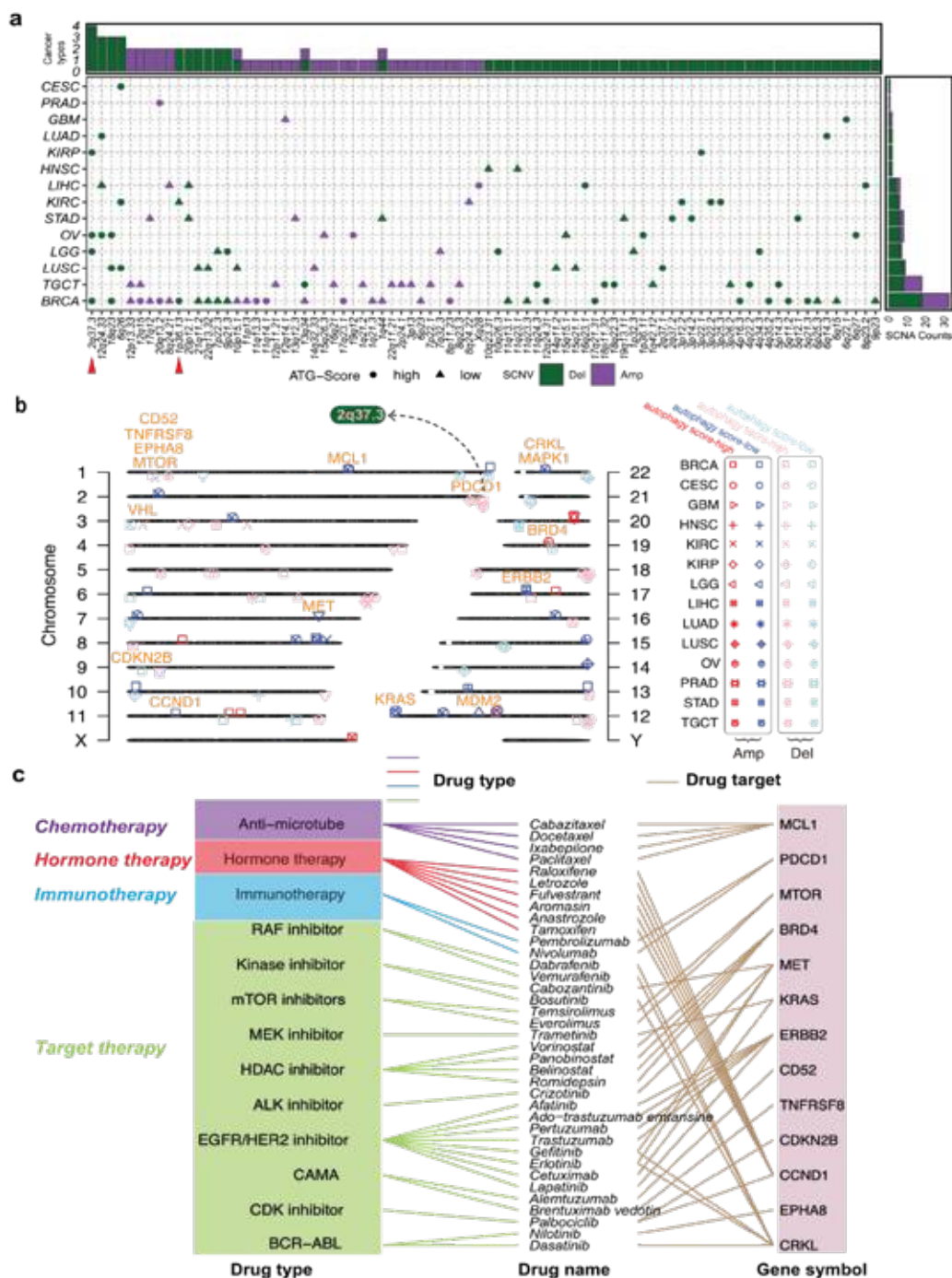


○ Pathway - Gene — TF-Target ■ autophagy score-low ■ autophagy score-high

شکل ۴: شبکه‌های تنظیم کننده miRNA-target و TF-target در اتوفازی.

(الف) مسیرهای مهم KEGG که توسط lncRNA در شبکه تنظیمی هدف miRNA غنی شده است. نقاط سبز: ژن دایره‌های قرمز: مسیرهای KEGG غنی شده با $FDR < 0.05$. بارپلات تعداد انواع سرطان با miRNAهای تغییر یافته را نشان می‌دهد. محور Y نشان دهنده | fold change | است.

(ب) مسیرهای KEGG قابل توجهی که توسط lncRNA در شبکه تنظیمی TF-هدف غنی شده است. نقاط سبز: ژن: دایره قرمز: مسیرهای KEGG غنی شده با $FDR < 0.05$. بارپلات تعداد انواع سرطان با TFهای تغییر یافته را نشان می‌دهد. محور Y نشان دهنده | fold change | است.



شکل ۵: ارتباط بین SCNA و اتوفازی در چندین سرطان.

الف) ویژگی‌های خلاصه SCNA در سرطان‌های متعدد نوار بالایی تعداد انواع سرطان با تقویت (بنفش) یا حذف (سبز تیره) را نشان می‌دهد. نوار سمت راست تعداد تقویت (بنفش) یا حذف (سبز تیره) در هر سرطان را نشان می‌دهد. دایره‌ها نشان دهنده امتیاز اتوفازی بالا هستند. مثلث‌ها نشان دهنده امتیاز اتوفازی کم است.

ب) نمودار کروموزوم مکان‌های SCNAهای مرتبط با اتوفازی را با تغییرات قابل توجه یا ژن‌های ذخیره شده در گروه با امتیاز اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی نشان می‌دهد. قرمز نشان دهنده تقویت است. آبی نشان دهنده حذف در گروه با امتیاز اتوفازی است. صورتی نشان دهنده تقویت است. آبی روشن نشان دهنده حذف در گروه کم امتیاز اتوفازی است. برجسب نارنجی CAGها را نشان می‌دهد. c داروهای مورد تایید FDA که CAGها را در SCNAهای مرتبط با اتوفازی هدف قرار می‌دهند.

سرطان با امتیاز اتوفازی به بسیاری از داروها از جمله ارلوتینیب در هفت نوع سرطان حساس تر هستند (شکل ۶). این یافته در تضاد با دیدگاه سنتی است که اتوفازی منجر به مقاومت دارویی می‌شود، که نشان‌دهنده اثرات پیچیده اتوفازی بر پاسخ دارویی است.

پاسخ دارویی حساس کننده اتوفازی در شرایط *in vivo* و *in vitro*

ملانوما یکی از برترین انواع سرطان (THYM، TGCT، SKCM) با بیشترین تعداد تغییرات تحت تاثیر وضعیت اتوفازی است (شکل ۲b)، و شایع‌تر از دو نوع سرطان دیگر است. بنابراین ما پاسخ دارویی حساس شده توسط اتوفازی در ملانوم را بررسی کردیم. ما پنج دارو (BMS708163، CMK، BMS536924، DMOG، etoposide) را انتخاب کردیم که پیش بینی می‌شد در وضعیت اتوفازی بالا به SKCM حساس باشند (شکل ۷a)، به استثنای CGP.082996 به دلیل در دسترس نبودن. در میان این داروها، هر دو رده سلولی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی به اتوپوزید و BMS536924 تحت شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین حساس شدند (شکل ۷b). ما وضعیت اتوفازی سلول‌های ملانوما را در شرایط مختلف با وسترن بلات LC3A/B و p6268 بررسی کردیم که فعال شدن اتوفازی با درمان راپامایسین را تایید می‌کند (شکل ۷c). بنابراین، etoposide و BMS536924 برای آزمایش‌های بیشتر در این مطالعه انتخاب شدند. ما سنجش حساسیت دارویی را بر روی داروهای انتخاب شده در سه رده سلولی مختلف ملانوم (SK-MEL-28، SK-MEL-5، SK-MEL-28) تحت شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین در مقابل شرایط کنترل انجام دادیم. آزمایش‌های ما نشان داد که سه رده سلولی ملانوما به اتوپوزید و BMS536924 در شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین حساس تر هستند (شکل ۷b). با در نظر گرفتن سایر اثرات ضد سرطانی بالقوه راپامایسین بر روی رده‌های سلولی ملانوما، ما بیشتر از گرسنگی (به جای راپامایسین) برای القای اتوفازی استفاده کردیم و مشاهده کردیم که سلول‌های SK-MEL-28، SK-MEL-5، SK-MEL-28 و SK-MEL-5 به اتوپوزید و BMS536924 حساس تر هستند. (شکل ۷d). علاوه بر این، ما سنجش مرگ سلولی را انجام دادیم و مشاهده کردیم که اتوپوزید و

توسعه دارو هدف قرار می‌دهد، در ناحیه حذف 1p36.13 در نمونه‌های با امتیاز اتوفازی KIRC و BRCA قرار دارد (شکل ۵b). قابل توجه، MTOR توسط مهارکننده‌های mTOR تمسیرولیموس و اورولیموس (RAD001؛ شکل ۵c) مورد هدف قرار گرفت، که در مطالعات متعدد به‌عنوان داروهای امیدوارکننده‌ای برای بهبود حساسیت درمان ترکیبی با واسطه وضعیت اتوفازی گزارش شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که SCNAهای مرتبط با اتوفازی می‌توانند بر حساسیت داروهای ضد سرطان، از جمله داروهای برای درمان هدف و ایمونوتراپی تأثیر بگذارند.

اثرات عملکردی وضعیت اتوفازی بر پاسخ دارویی

مطالعات گسترده نشان داده‌اند که اتوفازی می‌تواند تومورزایی را افزایش دهد و مهار اتوفازی می‌تواند سلول‌های تومور مقاوم را نسبت به شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان هدفمند حساس کند. ما به طور جامع ارتباط بین وضعیت اتوفازی و پاسخ دارویی را به تصویر کشیدیم. ما ابتدا همبستگی بین امتیاز اتوفازی و داده‌های دارویی ۱۳۸ دارو را در TCGA64 محاسبه کردیم. ما دریافتیم که تعداد داروهای مرتبط با اتوفازی از ۷ در ACC تا ۷۳ در TGCT متفاوت است. در میان این داروها، در مجموع ۴۱ دارو، ۳۲ ژن قابل عمل بالینی (CAG) را هدف قرار می‌دهند که توسط ۱۳ داروی مورد تایید سازمان غذا و دارو (FDA) مورد هدف قرار می‌گیرند. این CAGها در چهار لایه مولکولی مختلف (بیان mRNA، بیان پروتئین، SCNA و جهش جسمی) از ۲۰ نوع سرطان تغییر یافتند (شکل ۶). به عنوان مثال، ژن قابل عمل بالینی AR به طور قابل توجهی در سطوح mRNA و پروتئین در ۱۰ نوع سرطان، از جمله PRAD، تغییر کرد. AR مورد هدف بیکالوتامید آنتی‌آندروژن (شکل ۶) به طور مداوم گزارش شده است که باعث افزایش اتوفازی در سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۶۵،۶۶). علاوه بر این، ما مشاهده کردیم که پاکلیتاکسل در بیماران مبتلا به LUAD و امتیاز اتوفازی بالا مقاوم‌تر بود، که با مشاهدات قبلی مطابقت دارد که ۳ - متیل آدنین (MA-3)، یک مهارکننده اتوفازی، سلول‌های A549 را به حساسیت بیشتری نسبت به پاکلیتاکسل سوق می‌دهد. با کمال تعجب، نمونه‌های



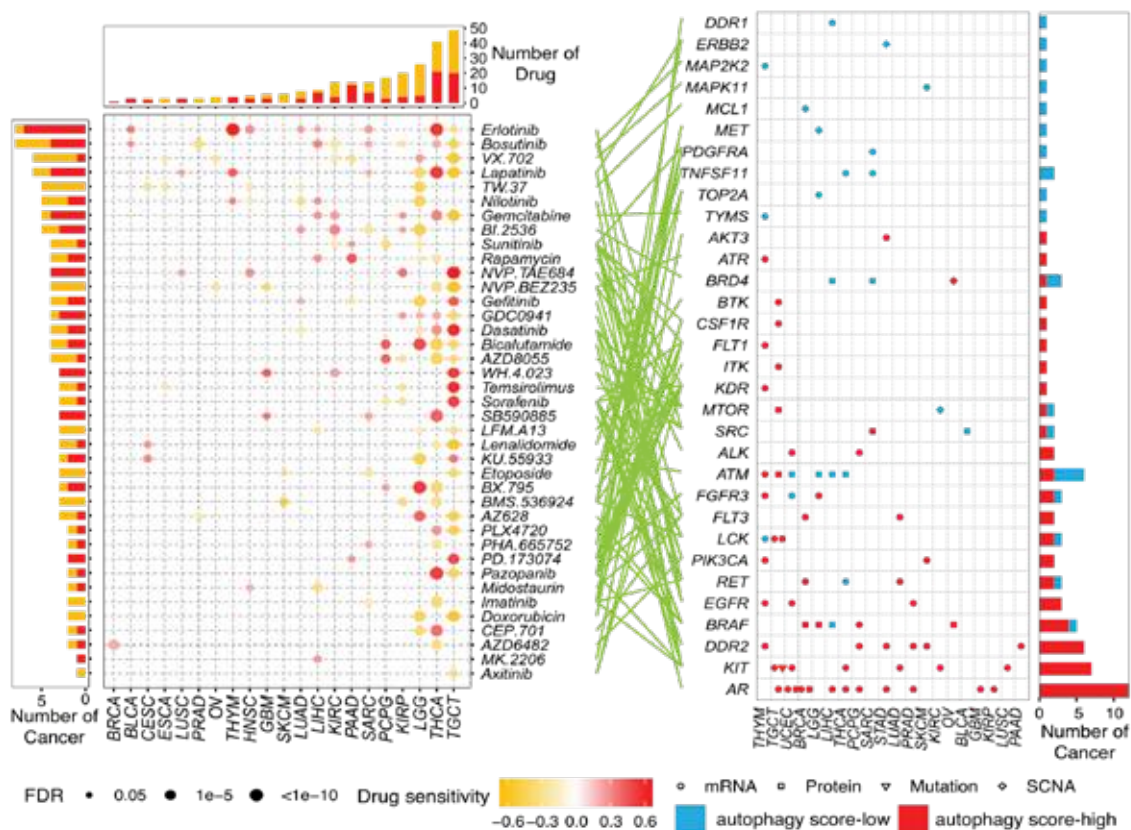
تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشانگرهای اتوفازی، شامل هر دو LC3A/B و p62، نشان داد که وضعیت اتوفازی بافت‌های تومور توسط راپامایسین افزایش یافته است (شکل Yg). ما مشاهده کردیم که رشد تومور به طور قابل توجهی توسط اتوپوزید با راپامایسین القاء کننده اتوفازی (شکل Yf) مهار شد، همانطور که با حجم تومور در مقاطع زمانی مختلف (شکل Yh)، و حجم تومور و وزن تومور در نقطه زمانی که موش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند، مهار شد. قربانی کرد.

مکانیسم بالقوه پاسخ دارویی حساس کننده القاء اتوفازی

برای توضیح اینکه چگونه القاکننده اتوفازی سلول‌های تومور را به اتوپوزید حساس می‌کند، آنالیز توالی‌یابی

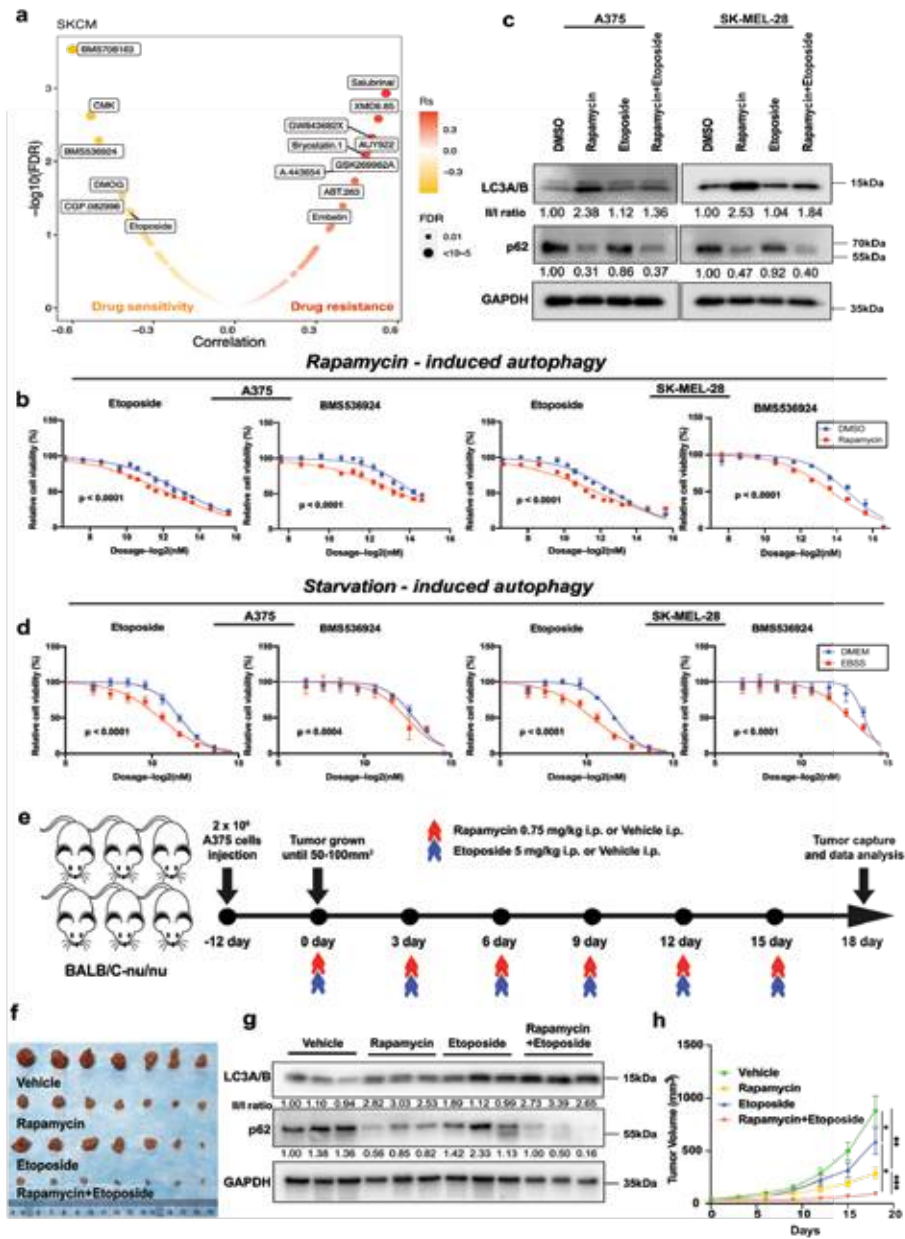
BMS536924 سلول‌های ملانوم بیشتری را در شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین/گرسنگی از بین بردند. این نتایج نشان می‌دهد که القای اتوفازی احتمالاً باعث حساسیت دارویی می‌شود.

برای تایید بیشتر اثرات اتوفازی بر پاسخ دارویی در داخل بدن، اتوپوزید، یک داروی ضد تومور مورد استفاده در کلینیک، را برای ایجاد یک مدل زونگرافت با رده سلولی A375 انتخاب کردیم، که الگوی بسیار مشابهی با SK-MEL- دارد. ۲۸ در حساسیت دارویی (شکل Yb، d). ما از اتوپوزید به تنهایی یا در ترکیب با راپامایسین القاء کننده اتوفازی برای درمان موش‌های BALB/C-nu/nu استفاده کردیم (شکل Ye). همه موش‌ها قربانی شدند و تومور در روز هجدهم برداشته شد (شکل Yf).



شکل ۶: اثرات تغییرات مولکولی در ژن‌های بالینی قابل عمل بر پاسخ دارویی.

حساسیت داروهایی که ژن‌های قابل عمل بالینی را با هرگونه تغییر در سطوح mRNA، پروتئین، جهش و SCNA هدف قرار می‌دهند. نقطه در پانل سمت چپ نشان دهنده همبستگی اسپیرمن بین داده‌های دارویی متناسب شده و نمرات اتوفازی در سرطان‌های متعدد است (قرمز: مثبت، مشبک، مقاوم به دارو؛ نارنجی: منفی، حساس به دارو). اشکال مختلف در پانل سمت راست نشان دهنده انواع مختلفی از امضاهای مولکولی است. نقطه قرمز: گروه اتوفازی امتیاز بالا. نقطه آبی: امتیاز اتوفازی-گروه پایین.



شکل ۷: مشخصات پاسخ دارویی مرتبط با اتوفژی در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی.

الف) پاسخ دارویی مرتبط با وضعیت اتوفژی در SKCM. نقطه نارنجی نشان دهنده حساسیت است. نقطه قرمز نشان دهنده مقاومت است.

ب) دمنحنی‌های دوز-پاسخ برای مقدار میانگین زنده‌مانی سلولی اتوپوزید و BMS536924 در شرایط القا شده با رایامایسین (ب) یا ناشی از گرسنگی (د) و غیر القا شده در رده سلولی ملانوم A375 و SK-MEL-28. زنده ماندن سلول به سطح سلول‌های تیمار شده با DMSO (ب) یا DMEM (د) نرمال شد. DMEM: مدیوم Eagle Modified Dulbecco برای کنترل. EBSS: محلول نمک متعادل برای گرسنگی. نوارهای خطا میانگین \pm SD را نشان می‌دهد. داده‌های غربالگری دارو گروه‌های مختلف (n=4) برآزش و با منحنی‌های دوز-پاسخ سیگموتیدی مقایسه شدند.

ج) وسترن بلات مارکرهای اتوفژی در رده‌های سلولی A375 و SK-MEL-28 تیمار شده با DMSO، رایامایسین، اتوپوزید و رایامایسین + اتوپوزید. نسبت شدت باند LC3-II/LC3-I و LC3-II/LC3-I p62 نرمال شده به DMSO در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود. نتایج مشابهی در حداقل سه آزمایش مستقل مشاهده شد. ه) طراحی آزمایش‌های پیوند زئوگرافت. موش نود با 2×10^6 سلول A375 تزریق شد. هنگامی که اندازه تومور به 50 تا 100 میلی‌متر مکعب رسید، موش‌ها با حامل، 75/0 میلی‌گرم بر کیلوگرم رایامایسین به صورت داخل صفاقی، 5 میلی‌گرم بر کیلوگرم اتوپوزید یا ترکیب رایامایسین و اتوپوزید هر 3 روز (n=7) تحت درمان قرار گرفتند. موش‌ها با استفاده از "mouse-animal-rodent-mammal-little" که تحت مجوز ساده شده (https://www.fda.gov/oc/ohrt/mouse-animal-rodent-mammal-little) به تصویر کشیده شدند. و) تومورهای بریده شده برای نشان دادن اندازه تومور در روز 18 (ز). وسترن بلات مارکرهای اتوفژی در بافت موش با درمان وسیله نقلیه، رایامایسین، اتوپوزید و رایامایسین + اتوپوزید. نسبت شدت باند LC3-II/LC3-I و LC3-II/LC3-I p62 نرمال شده به وسیله نقلیه در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود (n=3). ح) آنالیز کمی حجم تومور در مقاطع زمانی مختلف با درمان (n=7). نوارهای خطا میانگین \pm SD را نشان می‌دهد. تفاوت در گروه‌های متعدد با آنالیز ANOVA یک طرفه برآورد شد. مقادیر P به شرح زیر است: p=0.011 (وسایل نقلیه در مقابل اتوپوزید)، p=0.0012 (خودرو در مقابل رایامایسین)، p=0.026 (اتوپوزید در مقابل رایامایسین+رایامایسین) و c. g. p=0.0012



و راپامایسین با لنتی ویروس DDIT4-OE یا لنتی ویروس کنترل منفی آلوده شدند و بیان نسبی DDIT4 در سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس etoposide + راپامایسین DDIT4-OE افزایش یافت. سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس + etoposide راپامایسین + کنترل منفی، همانطور که توسط وسترن بلات نشان داده شده است (شکل ۸e). هنگامی که DDIT4 بیش از حد بیان شد، زنده ماندن سلول بازسازی شد (شکل ۸f). کارایی و ویژگی siRNAهای DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 مورد بررسی قرار گرفت، و وضعیت اتوفازی سلول‌ها در هنگام کوبیدن DDIT4 نیز مورد بررسی قرار گرفت. کارایی لنتی ویروس DDIT4-OE در A375 و SK-MEL-28 و وضعیت اتوفازی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

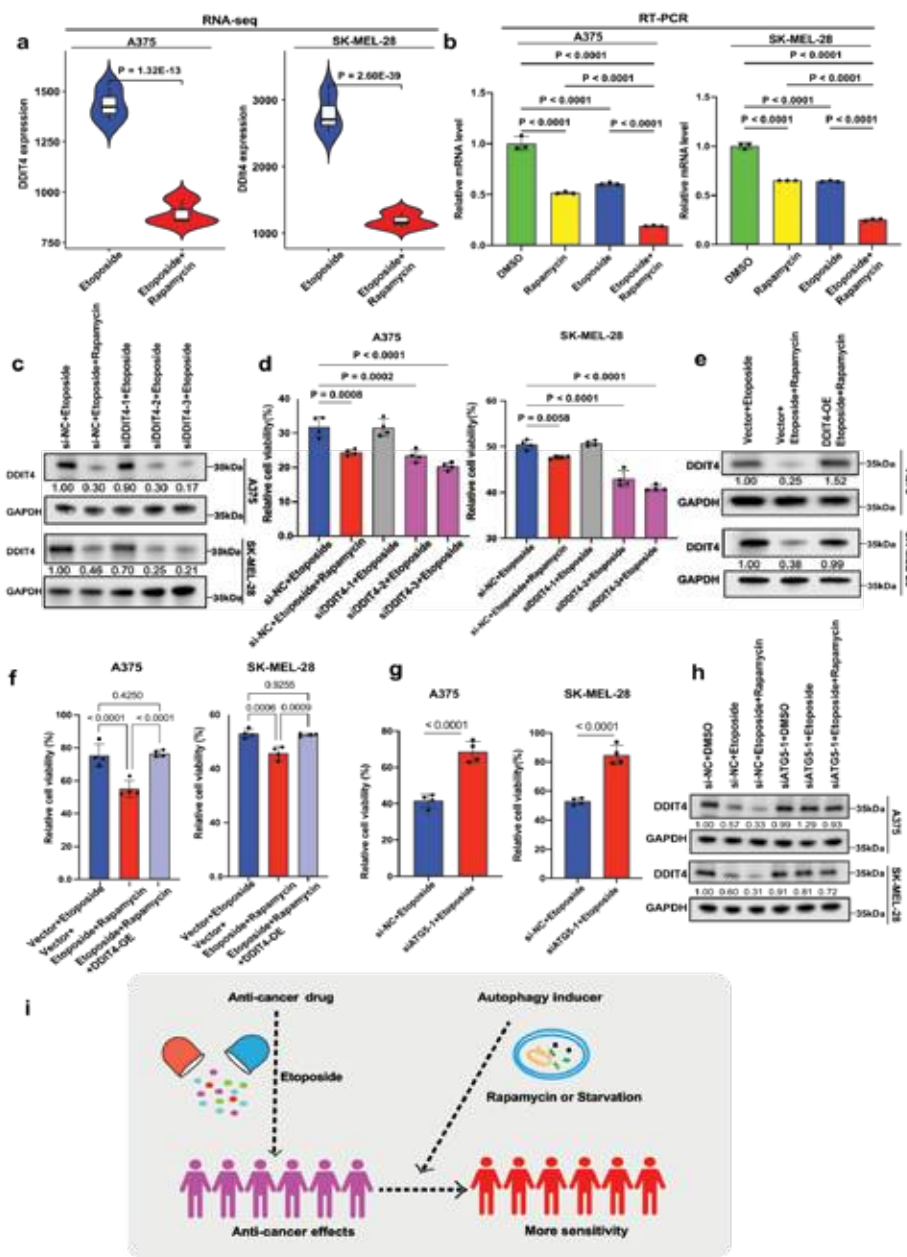
علاوه بر این، ما اتوفازی را با ترانسفکشن سه siRNAهای ATG5 (si-ATG5) به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید مهار کردیم و کارایی siRNAهای ATG5 با وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. زنده ماندن سلولی نسبی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی با اتوپوزید و si-ATG5-1 افزایش یافت (شکل ۸g). بیان DDIT4 همچنین زمانی که si-ATG5-1 به ترتیب به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید ترانسفکت شد، به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۸h). در مجموع، نتایج ما نشان می‌دهد که سلول‌های ملانوما ممکن است در صورت حضور با یک القاکننده اتوفازی نسبت به اتوپوزید حساس‌تر باشند و این الگو ممکن است از طریق DDIT4 واسطه شود (شکل ۸i).

بحث

اتوفازی می‌تواند تومورزایی را افزایش دهد و با پاسخ سلولی به ایمونوتراپی، هورمون درمانی و درمان هدف مرتبط است. آنالیز جامع مولتی اومیکس و پاسخ‌های درمانی مرتبط با اتوفازی به طور قابل توجهی به درمان سرطان کمک می‌کند. علیرغم نقش حیاتی اتوفازی، هیچ روش کاربردی برای تخمین وضعیت اتوفازی در تعداد زیادی از بیماران وجود ندارد. در این مطالعه، ما پیشنهاد کردیم تا وضعیت اتوفازی بیماران را بر اساس امضای ژن اتوفازی تعریف کنیم که بررسی نقش

(RNA-seq) RNA را برای سلول‌های A375 و SK-MEL-28 انکوبه شده با اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین انجام دادیم. آنالیز PCA نشان داد که نمونه‌ها به خوبی خوشه‌بندی شدند. ما ۹۴۶ ژن با بیان متفاوت بین اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین در سلول‌های A375 و ۷۸۲ ژن بیان شده متفاوت در سلول‌های SK-MEL-28 شناسایی کردیم. در میان این ژن‌ها، ۲۹۰ ژن با هم تداخل دارند که بیان متفاوتی بین اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین در A375 و SK-MEL-28 با $|\text{fold change}| > 1.5$ و مقدار p تنظیم شده < 0.05 بر اساس این ۲۹۰ ژن با همپوشانی بیان شده متفاوت، ما بیشتر آنالیز غنی‌سازی مسیر KEGG را انجام دادیم و متوجه شدیم که چندین ژن تنظیم شده (EGF, FGF1, BINP3, DDIT4, PPP2R2B, SFN) اغلب در مسیرهای مرتبط با سرطان یا اتوفازی، مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT و مسیر سیگنالینگ mTOR. ما بیشتر این ژن‌های مرتبط با عملکرد را با RT-PCR بررسی کردیم و دریافتیم که بیان نسبی DDIT4 در گروه راپامایسین + اتوپوزید در مقایسه با راپامایسین یا اتوپوزید به تنهایی کمترین میزان بود، که با حجم تومور چهار گروه در یک مدل زنگرافت (شکل ۹h). RNA-seq نشان داد که DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 هنگام درمان با اتوپوزید و راپامایسین در مقایسه با اتوپوزید به تنهایی به طور قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۸a)، که در A375 و SK-MEL-28 با RT-PCR تأیید شد (شکل ۸b). علاوه بر این، ما همچنین مشاهده کردیم که بیان DDIT4 توسط راپامایسین در یک داده عمومی از GSE2778470 کاهش یافت.

برای بررسی نقش عملکردی DDIT4 در سلول‌های ملانوما حساس کننده اتوفازی به اتوپوزید، ما سه siRNA (si-DDIT4) را به ترتیب به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید انتقال دادیم. بیان DDIT4 در اتوپوزید + si-DDIT4-2 یا si-DDIT4-3 و سلول‌های اتوپوزید + راپامایسین کاهش یافت، همانطور که توسط وسترن بلات نشان داده شده است (شکل ۸c). زنده ماندن سلولی نسبی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی با etoposide و si-DDIT4-2 یا si-DDIT4-3 مهار شد (شکل ۸d). علاوه بر این، سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تیمار شده با اتوپوزید



شکل ۸: مکانیسم بالقوه از طریق توصیف عملکردی DDIT4 در شرایط آزمایشگاهی.

الف) بیان mRNA DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 توسط RNA-seq (n=3) در جعبه میانه 1± چارک را نشان می‌دهند، با سبب‌هایی که تا شدیدترین نقطه داده در محدوده ۱.۵ بین چارکی از مرزهای جعبه گسترش می‌یابند. اهمیت (p value) بین‌های بیان شده متفاوت با بسته "DESeq2" ارزیابی شد.

ب) بیان mRNA نسبی DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 توسط RT-PCR (n=3).

ج) وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا si-DDIT4ها در ترکیب با اتوپوزید. شدت باند DDIT4 نرمال شده به si-NC + etoposide در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود.

د) زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا si-DDIT4ها در ترکیب با اتوپوزید (n=4). نوارهای صورتی نشان‌دهنده شکست موفقیت‌آمیز (si-DDIT4-1 (si-DDIT4-2 و si-DDIT4-3) است، در حالی که نوار خاکستری نشان‌دهنده شکست ناموفق (si-DDIT4-4) است. وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 ترانسفکت شده با لنتی ویروس یا وکتور DDIT4-OE در ترکیب با اتوپوزید و رایپامایسین. شدت باند DDIT4 نرمال شده به Vector+Et نمایش داده می‌شود.

ه) زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 ترانسفکت شده با لنتی ویروس یا وکتور DDIT4-OE در ترکیب با اتوپوزید و رایپامایسین (n=4) و زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا si-ATG5 در ترکیب با اتوپوزید (n=4).

و) وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا si-ATG5 در ترکیب با اتوپوزید. شدت باند DDIT4 نرمال شده به si-NC + DMSO در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود. (ز تصویر برای مکانیسم بالقوه پاسخ دارویی حساس کننده القاکننده اتوفاجی. a, b, d, f, g. داده‌ها به عنوان میانگین ±SD ارائه شد.



مهیار اتوفازای به دلیل کاهش تخریب متابولیت‌های ایمنی تضعیف می‌شود. بنابراین، ترکیب محرک‌های اتوفازای و ایمونوترابی ممکن است یک جهت جایگزین برای درمان سرطان ارائه دهد.

چالش‌هایی در مطالعه اتوفازای وجود دارد که نیاز به بررسی بیشتری دارد. ما وضعیت اتوفازای نسبی را در نمونه‌های تومور تخمین زدیم، که ممکن است در توانایی آن برای انعکاس وضعیت واقعی اتوفازای در بیماران محدود باشد. اتوفازای یک فرآیند بیولوژیکی پویا است که شامل تنظیم مولکول‌های مختلف مرتبط است. بنابراین، ارزیابی دقیق آن با ارزیابی تعداد کمی از نشانگرهای مرتبط با اتوفازای، مانند LC3 یا P62 و غیره دشوار است. اگرچه می‌توان از شمار اتوفازای برای نظارت بر وضعیت اتوفازای استفاده کرد، این رویکرد حتی در سلول‌های کشت شده نیز چالش برانگیز است. خطوط و ارگانایسم‌های مدل ۸۰، در نمونه‌های بزرگ مقیاس (10000~) بیمار ناگفته نماند. مشابه این، هیچ رویکرد مستقیمی برای ارزیابی وضعیت هیپوکسی در بیماران وجود ندارد، در حالی که ما فقط می‌توانیم به طور غیرمستقیم از طریق امضای ۱۵ ژنی به وضعیت هیپوکسی دسترسی پیدا کنیم. آنالیز ما بر اساس RNA-seq در انواع مختلف سلول در یک نمونه است. تلاش‌های بیشتر باید ناهمگونی تومور را در نظر بگیرد، به‌ویژه با پیشرفت‌های فناوری پروفایل تک سلولی. در نهایت، اکثر کارآزمایی‌های بالینی به دلیل چالش فنی نظارت بر وضعیت اتوفازای در داخل بدن، اطلاعاتی در مورد وضعیت اتوفازای نمونه‌های سرطانی بیماران ندارند. در حال حاضر، بیشتر مطالعات بر روی مهیار اتوفازای متمرکز شده‌اند، در حالی که اهمیت القای اتوفازای نادیده گرفته شده است، که منجر به درک محدودی از نحوه تأثیرگذاری امضاهای مولکولی توسط ریزمحیط اتوفازای و تفسیر منطقی از پیامدهای نامطلوب دارویی غیرمنتظره در درمان ضد سرطان می‌شود. با این وجود، مطالعه ما بر اهمیت نظارت بر وضعیت اتوفازای تومور در مطالعات بالینی آینده تأکید دارد.

منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-33946-x>

عملکردی اتوفازای در بیماران را تسهیل می‌کند. سپس تمام نمونه‌های سرطان TCGA را بر اساس امضای اتوفازای به گروه‌های با امتیاز اتوفازای بالا و گروه‌های با امتیاز اتوفازای پایین طبقه‌بندی کردیم. برای بررسی اثرات اتوفازای بر مولکول‌های بیولوژیکی در سرطان‌ها، از یک الگوریتم امتیاز گرایش برای به حداقل رساندن اختلال عوامل مخدوش‌کننده مختلف استفاده کردیم: خلوص تومور، جنسیت، قومیت، سن در هنگام تشخیص و وضعیت سیگار کشیدن. ما چندین ویژگی مولکولی مرتبط با اتوفازای را در ۲۴ نوع سرطان، از جمله mRNA، miRNA و بیان پروتئین، جهش‌های سوماتیک و SCNA شناسایی کردیم. علاوه بر این، ما تأثیر شبکه تنظیمی را در بین مولکول‌های مختلف بر روی فرآیند اتوفازای، که جامع‌ترین چشم‌انداز تا کنون است، بررسی کردیم. این نقشه جامع بینش‌های بیولوژیکی قوی را برای تحقیقات آینده ارائه می‌کند، که با آنالیز دقیق قبلی داده‌های مقیاس بزرگ، از جمله TCGA و ICGC22 نشان داده شده است. آنالیز یکپارچه ما نشان می‌دهد که وضعیت اتوفازای می‌تواند بر تغییرات ویژگی‌های مولکولی در لایه‌های مولتی اومیکس در تومورهای مختلف تأثیر بگذارد.

قابل ذکر است، ما دریافتیم که در مجموع ۳۲ CAG به طور قابل توجهی در بین ۲۰ نوع سرطان تغییر کرده‌اند، و انواع سرطان‌های متعدد می‌توانند به داروهایی که این CAGها را هدف قرار می‌دهند پس از القای اتوفازای مقاوم یا حساس باشند (شکل ۶). برخلاف دیدگاه مرسوم که مهیار اتوفازای حساسیت دارویی را ایجاد می‌کند، آنالیز جامع ما و آزمایش‌های *in vitro/in vivo* فرصتی را برای استفاده از تحلیل ویژگی‌های مولکولی شخصی‌شده برای غلبه بر مقاومت دارویی چندگانه ناشی از اتوفازای برجسته می‌کند. با این حال، توجه به این نکته مهم است که تنها با آزمایش‌های منفرد (به عنوان مثال، تک دارو یا رده سلولی)، نتیجه‌گیری اینکه اتوفازای ممکن است حساسیت دارویی را برای تعداد قابل توجهی از داروهای ضد سرطان ایجاد کند، بسیار چالش برانگیز خواهد بود. تجزیه و تحلیل ما بیشتر نشان داد که DDIT4 یک هدف بالقوه برای واسطه‌های القای اتوفازای برای حساس کردن سلول‌های تومور به اتوپوزید است. مطالعات اخیر نشان داده است که سیستم ایمنی بدن با