

Research Paper

Evaluation and Comparison of PBK and E2F7 Gene Expression Between Early and Advanced Stages of Colorectal Cancer



Reza Hashemi¹ , *Maryam Peymani¹ , Kamran Ghaedi^{1,2} , Hana Saffar^{1,3} 

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

3. Department of Pathology, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



Citation Hashemi R, Peymani M, Ghaedi K, Saffar H. [Evaluation and Comparison of PBK and E2F7 Gene Expression Between Early and Advanced Stages of Colorectal Cancer (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS)*. 2021; 25(1):14-27. <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.1.5136.3>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.1.5136.3>



Article Info:

Received: 28 Sep 2021

Accepted: 06 Jan 2022

Available Online: 01 Apr 2022

Key words:

PBK expression, E2F7 expression, Colorectal cancer, ROC curve, StageStage

ABSTRACT

Background and Aim PBK is a mitogen-activated protein kinase (MAPKK) among MEK1/2 and MEK7 and can phosphorylate P38, JNK, and ERK in many cellular functions. The E2F transcription factor family also belongs to a class of cellular regulators acting as oncogenes and tumor suppressors. This study aims to investigate the expression of PBK and E2F7 in the early stages of colorectal cancer (CRC) compared to advanced stages based on the experimental and TCGA (The Cancer Genome Atlas) database.

Methods & Materials A total of 32 tissue samples of patients with CRC with the approval of a pathobiologist were collected according to the examination and criteria reported from different stages. After RNA extraction and cDNA synthesis, the RT-qPCR technique was used to evaluate the expression of the desired genes in the study groups. A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was also used to determine the ability of each of the selected genes to differentiate the two populations: stage I+II and stage III+IV.

Ethical Considerations This research was approved by the ethics committee of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. (Code IR.IAU.SHK.REC.1399.022).

Results In this study, it was shown that the expression of PBK and E2F7 significantly increased in stage I+II samples compared to stage III+IV. These data were confirmed by laboratory results and information extracted from the TCGA database. Also, based on the area under curve obtained from the ROC curves, these two genes are significantly distinguishable between stage I+II and III+IV populations in CRC.

Conclusion According to the results of this study, PBK and E2F7 genes are good markers in the diagnosis of CRC.

* Corresponding Author:

Maryam Peymani, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Tel: +98 (913) 2007650

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

Extended Abstract

Introduction

Classification of different stages of the tumor is one of the most important steps in colorectal cancer (CRC). Investigating the relationship between different gene expressions in patients with CRC and clinical features such as the stage of the disease can estimate the survival and prognostic status of patients and identify patients who are at higher risk for recurrence. PBK is a mitogen-activated protein kinase (MAPKK) among MEK1/2 and MEK7 and can phosphorylate P38, JNK, and ERK in many cellular functions [9]. In addition, PBK/TOPK plays an important role in inflammation, cell apoptosis, and cell cycle regulation. A high PBK/TOPK expression contributes to tumor growth, proliferation, and metastasis [10]. E2F is a group of genes that encode the transcription factor family and regulate genes involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis [12]. In this study, the expression level of genes in the early and advanced stages of CRC has been investigated based on laboratory data and the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database.

Materials and Methods

To perform this study, tumor tissue was sampled from 32 patients with CRC at different stages. After surgery, tissue samples were placed in RNALater solution (Behnogen, Iran) and transferred to the Biotechnology Research Center of [Islamic Azad University, Shahrekord Branch](#). In this study, Trisol (Invitrogen, USA) was used to extract total RNA according to the protocol, and the extracted RNA was evaluated qualitatively and quantitatively. The treat-

ed RNAs were used in the presence of DNaseI enzyme for 30 minutes at 37°C to remove possible contamination of the extracted RNA with genomic DNA. Finally, for cDNA synthesis, the kit of Yekta Tajhiz Azma Company and a random Hexamer primer were used. In the present study, the RT-qPCR technique was used to quantitatively measure the expression level of the desired genes. Also, based on RNASeq data extracted from TCGA and clinical information of the samples, the stage information of each sample was determined, and the samples were classified into two groups: stage I+II (n=268) and stage III+IV (n=199). The expression of the two genes was compared between these two groups.

Results

In this study, the expression levels of PKB and E2F7 in different stages of CRC in tumor tissues were analyzed using the RT-qPCR technique and ΔCt method. The results showed that the expression level of these genes changed significantly in different stages of the disease (Figure 1). As can be seen, the expression levels of PBK and E2F7 in stage I+II are 1.3 and 2.5 times higher than in the III+IV stage, respectively (Figure 1).

Also, the expression levels of PKB and E2F7 in colorectal tumor tissues were compared between stage I+II and stage III+IV based on the stage information and expression extracted from the TCGA database. The results showed that both genes in the early stages of the disease show a significant increase in expression (Figure 2).

The results from the TCGA database, based on the ROC curve diagram, showed PBK and E2F7 markers with areas below the surface of the diagram $\text{AUC}=0.7035$ and $\text{AUC}=0.8323$, respectively, as significant genes in isolation of these two populations (Figure 3).

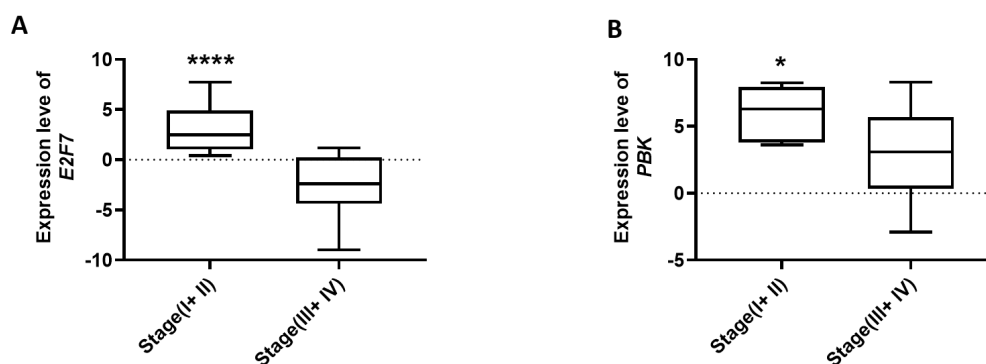


Figure 1. Figure 1. PBK and E2F7 relative expression level change diagram in Stage I+II compared to Stage III+IV based on laboratory studies. The significance of gene expression changes was determined by t-test.

*, **** significance level $P<0.05$ and $P<0.1000$ were considered.

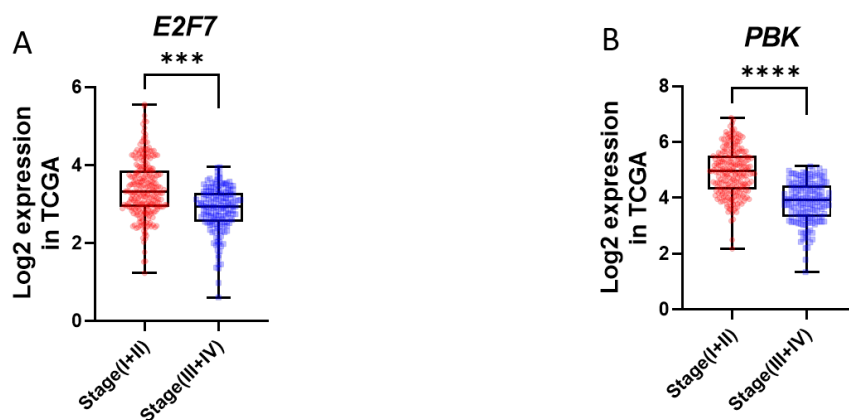


Figure 2. PBK and E2F7 relative expression level change diagram in Stage I+II compared to Stage III+IV based on Cancer Genome Atlas data. The significance of gene expression changes was determined by t-test.

, * significance level $P < 0.100$ and $P < 0.1000$ were considered.

Discussion

The study of molecular genetics and the expression level of determining genes at different stages are useful for further understanding the pathogenesis and early detection of CRC. Therefore, detecting the expression level of PBK and E2F7 genes in the early and advanced stages of CRC with RT-qPCR, as well as confirming the results by transcriptome data set (TCGA), may help in early diagnosis and planning effective therapies. PBK and E2F7 genes have been considered biomarkers in various cancers. Therefore, in this study, for the first time, PBK and E2F7 genes were selected as genes with diagnostic potential in early CRC. The results of studies on gastric cancer showed that nuclear expression of PBK was significantly associated with increased invasion and lymph node metastasis.

On the other hand, the results of the Kaplan-Meier survival analysis showed that higher expression of the PBK gene reduces the survival of patients. These results indicate that PBK increases carcinogenicity and metastasis of gastric cancer and acts as a potential biomarker for the prognosis of the disease. The analysis of laboratory data showed that the expression level of the PBK gene was higher in the early stages compared to the advanced stages. The results of transcriptome data also showed that the expression level of this gene in the early stages is higher than in the advanced stages.

The findings of this study showed that PBK and E2F7 genes have higher expression levels in the early stages than in the advanced stages. These results suggest that PBK and E2F7 genes can be used as biomarkers in the early stages. However, these findings need to be con-

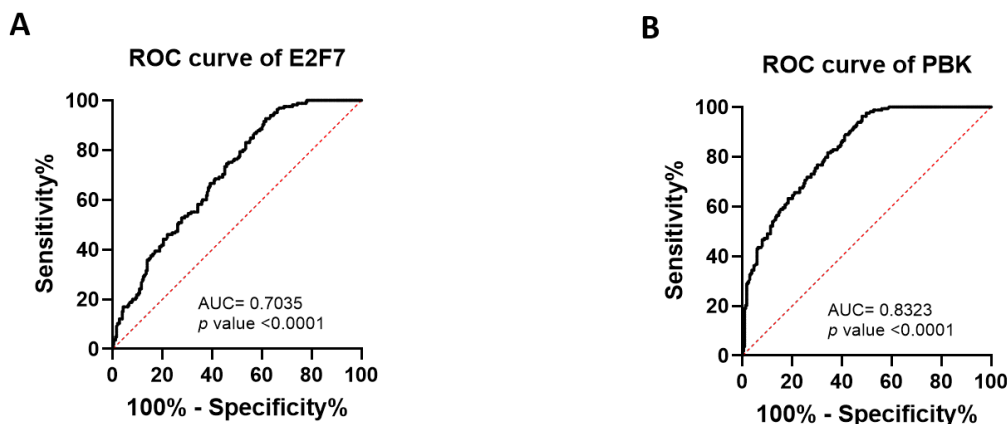


Figure 3. Specificity and sensitivity of PBK and E2F7 markers in separating Stage I+II from Stage III+IV tumors

firmed by further studies. In addition, the level of expression of candidate genes in the early stages can be well distinguished from the advanced stages. Therefore, more molecular studies are needed to provide a deeper picture of the function of PBK and E2F7 in CRC.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research was approved by the ethics committee of [Islamic Azad University, Shahrekord Branch](#). (Code IR.IAU.SHK.REC.1399.022).

Funding

This article is taken from the PhD thesis of the Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, [Shahrekord Branch, Islamic Azad University](#) and was done with the support of the Research and [Technology Vice-Chancellor of Shahrekord Azad University](#).

Authors' contributions

Study design and conceptualization and methodology: Reza Hashemi and Maryam Peymani; Data mining, formal analysis and review: Reza Hashemi; Supervision, validation, visualization and final approval: Maryam Peymani and Kamran Qaidi; Interpretation of obtained information: Maryam Peymani; sample collection: Hana Safar; Article writing, revision and editing: Reza Hashemi; All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank and appreciate all the people who helped in collecting blood samples in this research.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

ارزیابی و مقایسه میزان بیان ژن های PBK و E2F7 در سرطان کلورکتال بین مراحل اولیه و مراحل پیشرفته بیماری

رضا هاشمی^۱، *مریم پیمانی^۱، کامران قائدی^{۱،۲}، هانا صفار^{۱،۳}

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه سلولی، مولکولی و میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. انستیتو کانسر، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: PBK یک پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPKK) بین MEK1/2 و MEK7 است و می‌تواند JNK، P38 و ERK را در بسیاری از عملکردهای سلولی فسفوریله کند. خانواده عوامل رونویسی E2F نیز به گروهی از کلاس تنظیم‌کننده‌های سلولی متعلق هستند که هم به صورت آنکوژن و هم به شکل سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی بیان PBK و E2F7 در مراحل اولیه سرطان روده بزرگ یا کلورکتال در مقایسه با مراحل بالاتر بر اساس مطالعات آزمایشگاهی و اطلاعات پایگاه اطلس ژنوم سرطان است. مواد و روش‌ها: تعداد ۳۲ نمونه بافت بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال با تأییدیه پزشک متخصص پاتوبیولوژیست طبق معاینه و معیار گزارش شده از استیج‌های مختلف، جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA برای بررسی بیان ژن‌های موردنظر، از تکنیک RT-qPCR در گروه‌های مطالعه استفاده شد. همچنین از آنالیز ROC curve در جهت تعیین توانایی هر کدام از ژن‌های انتخاب‌شده برای تفکیک دو جمعیت Stage I+II و Stage III+IV استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.022 ابه تصویب رسیده است. **یافته‌ها:** در این پژوهش نشان داده شد PBK و E2F7 در نمونه‌های Stage I+II در مقایسه با Stage III+IV سرطان کلورکتال افزایش بیان معنادار پیدا می‌کنند. این داده‌ها با اطلاعات آزمایشگاهی و اطلاعات استخراج‌شده از اطلس ژنوم سرطان تأیید شد. همچنین بر اساس AUC به‌دست‌آمده از نمودار ROC مشخص شد این دو ژن، به‌طور معناداری در دو جمعیت Stage I+II و Stage III+IV و در سرطان کلورکتال تفکیک‌شدنی هستند.

نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت دو ژن PBK و E2F7 مارکرهای خوبی در تشخیص بیماری در مراحل اولیه سرطان کلورکتال هستند.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۰۶ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۶ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

بیان PBK، بیان E2F7، سرطان روده بزرگ، مرحله، نمودار ROC،

* نویسنده مسئول:

دکتر مریم پیمانی

نشانی: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۲۰۰۷۶۵۰ (۹۱۳) +۹۸

پست الکترونیکی: m.peymani@iaushk.ac.ir

مقدمه

PBK (اتصال دهنده PDZ کیناز) به عنوان پروتئین کیناز منشأ سلول‌های کشنده فعال شده با T-لنفوکین (TOPK) شناخته می‌شود و در سرطان‌های مختلف مانند لنفوم، لوسمی، ملانوم، روده بزرگ، سرطان سینه، ریه و گلیوما به شدت بیان می‌شود. PBK یک پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPKK) بین MEK1/2 و MEK7 است و می‌تواند JNK، P38 و ERK را در بسیاری از عملکردهای سلولی فسفریله کند [۹]. علاوه بر این، گزارش شده است PBK/TOPK نقش مهمی در التهاب، آپوپتوز سلولی و تنظیم چرخه سلولی دارد و بیان زیاد PBK/TOPK به رشد، تکثیر و متاستاز تومور کمک می‌کند [۱۰].

E2F گروهی از ژن‌ها هستند که خانواده عوامل رونویسی (TF) را کد می‌کند و ژن‌های دخیل در تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول را تنظیم می‌کند. برخی گزارش‌ها بیان غیرطبیعی E2F7 را با سرطان مرتبط می‌دانند. برای مثال افزایش بیان E2F7 در سرطان سلول‌های سنگ‌فرشی و کاهش بیان آن در سرطان تخمدان گزارش شده است [۱۱]. خانواده عوامل رونویسی E2F مهم هستند، زیرا متعلق به گروهی از تنظیم‌کننده‌های سلولی‌اند که هم به صورت انکوژن و هم ژن‌های سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کنند [۱۲].

باتوجه به اهمیت دو ژن E2F7 و PBK در روند پیشرفت سرطان‌ها، ارزیابی سطح بیان این ژن‌ها در بسیاری از سرطان‌ها مطالعه شده است، اما تاکنون بیان این دو ژن در مراحل مختلف سرطان کولورکتال و همچنین پتانسیل این ژن‌ها به عنوان مارکرهای زیستی در مراحل اولیه گزارش نشده است. از این رو در این پژوهش با استفاده از بافت‌های توموری سرطان کولورکتال و همچنین آزمون‌های PCR در زمان واقعی (RT-PCR)، سطح بیان ژن‌های موردنظر در مراحل اولیه و پیشرفته بررسی شده است. همچنین برای تأیید نتایج به دست آمده، سطح بیان این ژن‌ها در **اطلس ژنوم سرطان**^۲ تأیید شد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و نمونه‌گیری

تحقیق حاضر از نوع موردشاهدی است و بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری پیشرفته به عنوان گروه آزمایش با نمونه‌های توموری در مراحل اولیه، به عنوان گروه کنترل مقایسه شد. برای انجام این مطالعه از بافت توموری ۳۲ فرد مبتلا به سرطان کولورکتال در مراحل مختلف نمونه‌گیری انجام شد. پاتولوژیست نمونه بافت‌های این مطالعه را بررسی کرد و طبق معیارهای گزارش شده، توموری بودن آن‌ها را به تأیید رساند. از تمام بیماران در دسترس، فرم رضایت‌نامه دریافت شد.

سرطان به عنوان عامل اصلی مرگ و مانع مهمی برای افزایش امید به زندگی در هر کشوری از جهان شناخته می‌شود [۱]. سرطان روده بزرگ^۱ عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. دلیل این امر تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ است که آن‌ها را به آدنوکارسینوما تبدیل می‌کند [۲]. سرطان کولورکتال سومین سرطان بدخیم و دومین سرطان کشنده است که بر اساس تخمین‌ها باعث ۱,۱۴۸,۵۱۵ مورد ابتلا و ۰/۹ میلیون مرگ در سراسر جهان در سال ۲۰۲۰ شده است [۳]. سرطان کولورکتال در بین سرطان‌های شایع، یکی از چالش‌برانگیزترین آن‌هاست که هتروژنی بالا در سطح بیان ژن، جهش‌های شایع در ژن‌های کلیدی، بقا و رفتارهای مولکولی متفاوت در مراحل مختلف مهم‌ترین چالش‌های آن در نظر گرفته می‌شوند [۴].

طبقه‌بندی مراحل مختلف تومور یکی از اساسی‌ترین گام‌ها در سرطان کولورکتال به شمار می‌آید. تعدادی از معیارهای مرحله‌بندی برای برآورد عمق نفوذ سرطان در روده بزرگ و همچنین میزان درگیری بیماری‌های خارج از روده بزرگ استفاده شده است. در حال حاضر، یک روش مرحله‌بندی رایج برای سرطان روده بزرگ بر اساس سیستم TNM (تومور/گره/متاستاز) است [۵]. تشخیص در مراحل مختلف بالینی CRC ممکن است تا حدی تفاوت‌های قابل توجه در میزان بقا را توضیح دهد. تشخیص در مراحل پیشرفته یکی از عوامل تعیین‌کننده تفاوت در بقا و تعداد زیادی از مرگ‌های CRC در سراسر جهان است. پیش‌آگهی بستگی زیادی به مرحله تومور در زمان تشخیص دارد. بقای پنج ساله بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به ترتیب شامل ۸۳، ۹۳، ۶۰ و ۸ درصد در مراحل یک، دو، سه و چهار است [۶].

بررسی ارتباط بیان ژن‌های مختلف در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با ویژگی‌های کلینکالی مانند مرحله بیماری می‌تواند باعث تخمین وضعیت بقا و وضعیت پیش‌آگهی بیماران و شناسایی بیماران که در معرض خطر بیشتری برای بازگشت مجدد قرار دارند، شود. برای مثال نتایج مطالعات قبلی نشان دادند بیان ZEB2 در بیماران مبتلا به گره منفی (Stage I+II) با کاهش قابل توجه بقای کل همراه بوده است [۷]. همچنین نشان داده شده است سطوح بیان بالای TBL1XR1 در مراحل اولیه بیماران CRC، خطر بالای متاستازهای کبدی را نشان می‌دهند که این نتایج ضرورت ارزیابی سطح بیان ژن‌ها در مراحل مختلف سرطان کولورکتال به عنوان مارکرهای زیستی را نشان می‌دهد [۸].

2. The Cancer Genome Atlas (TCGA)

1. Colorectal Cancer (CRC)

جدول ۱. ویژگی‌های کلینیکی نمونه‌های مطالعه‌شده

ویژگی‌های کلینیکی نمونه‌های توموری	تعداد	
I	۵	TNM مرحله
II	۱۰	
III	۱۰	
IV	۶	
بدون اطلاعات	۱	
I	۱۱	درجه بیماری
II	۱۸	
III	۲	
IV	۱	
<۵ cm	۱۰	سایز تومور
≥۵ cm	۲۲	



استخراج‌شده در حضور آنزیم DNaseI (سیناژن ساخت کشور ایران) ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای حذف آلودگی احتمالی RNA استخراج‌شده به DNA ژنومی استفاده شد و برای خنثی‌سازی آنزیم DNaseI هر نمونه با یک میکرولیتر اتیلن دی‌آمین تتراسیتیک اسید^۳ (مرک ساخت کشور آلمان) تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. در نهایت برای سنتز cDNA، از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و پرایمر شش نوکلئوتیدی تصادفی استفاده شد.

ویژگی‌های کلینیکی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در جدول شماره ۱ گزارش شده است. نمونه‌های بافت پس از جراحی درون محلول RNA Lateral (به‌نوژن و ساخت کشور ایران) قرار داده شد و به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه و سپس در دمای منفی ۲۰ درجه فریز شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این مطالعه برای استخراج RNA تام از ترایزول (Invitro-gen ساخت کشور آمریکا) مطابق پروتکل استفاده شد و RNA استخراج‌شده از نظر کیفی و کمی بررسی شد. از تیمار RN

3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

جدول ۲. توالی آغازگرهای استفاده‌شده به همراه طول محصول و دمای آن‌ها در روش RT-qPCR

پرایمر	توالی پرایمر ۵' به ۳'	دمای اتصال (C°)	سایز محصول (bp)
PKB Forward	5'- ATAGAAGAACGATATAAAGCCA-3'	۵۲	۹۶
PKB Reverse	5'- GTGCAGATACTTTAACCTC-3'		
E2F7 Forward	5'- CTCGCTATCCAAGTTATCCCT-3'	۵۴	۲۲۳
E2F7 Reverse	5'- TTCTGCTCCTCTCCTAGTCTC-3'		
GAPDH Forward	5'- CCACTCCTCCACCTTTGACG-3'	۶۰	۱۰۷
GAPDH Reverse	5'- CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'		



(n=268) و Stage III/IV (n=199) طبقه‌بندی شدند و بیان دو ژن مورد نظر بین دو گروه مطالعه، مقایسه شد.

تحلیل‌های آماری

برای بررسی بیان نسبی ژن‌های PBK و E2F7 در سرطان روده بزرگ از نرم‌افزارهای GraphPad Prism و اکسل^۴ استفاده شد و پس از تأیید نرمال بودن حجم نمونه با آزمون شاپیرو ویلک^۵ Shapiro، برای مقایسه بیان ژن‌ها در مراحل مختلف از آزمون ماتریکس یک‌طرفه استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی و مقایسه بیان PBK و E2F7 در دو گروه Stage I/II و Stage III/IV در نمونه‌های توموری جمع‌آوری‌شده

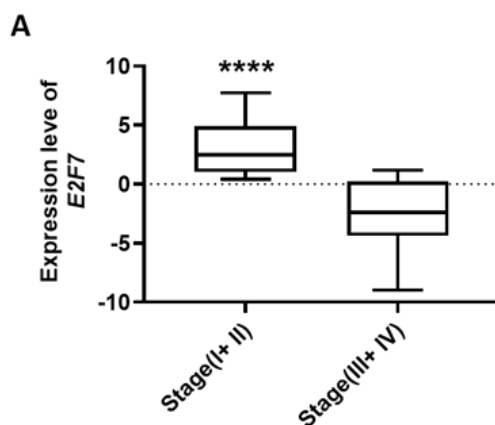
در این مطالعه، سطح بیان PBK و E2F7 در stage‌های مختلف بیماری در بافت‌های توموری با استفاده از تکنیک Real time RT-qPCR و نیز با روش Δ Ct آنالیز شد. نتایج نشان داد سطح بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف بیماری تغییر معناداری داشته است (تصویر شماره ۱). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، سطح بیان PBK و E2F7 در Stage I+II به ترتیب ۳/۱ و ۵/۲ برابر بیش از سایر Stage‌هاست (تصویر شماره ۱).

بررسی و مقایسه بیان PBK و E2F7 در دو گروه Stage I/II و Stage III/IV بر اساس اطلاعات اطلس ژنوم سرطان

سطح بیان PBK و E2F7 در بافت‌های توموری روده بزرگ که اطلاعات stage‌ها و بیان آن‌ها از اطلس ژنوم سرطان استخراج

4. Excel

5. Shapiro-Wilk Test

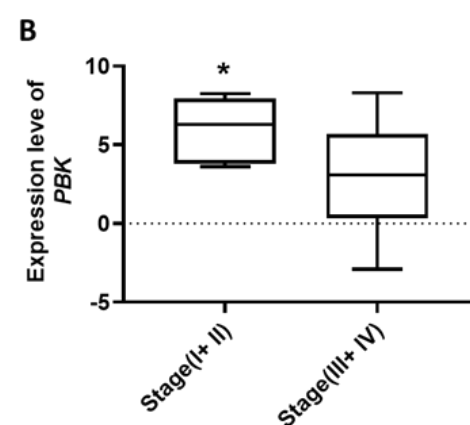


تکنیک Real time RT-PCR

برای بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، نرم‌افزارهای Beacon Designer و Oligo7 پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن را طراحی کردند و پس از BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، شرکت پیشگام آن‌ها را سنتز کرد. در جدول شماره ۲ توالی آغازگرهای PBK و E2F7، GAPDH [۱۳] در روش RT-qPCR به همراه اندازه محصول و دمای بهینه برای تکثیر ژن‌ها ارائه شده است. سپس بهینه‌سازی دمایی پرایمرها با روش PCR انجام شد. در پژوهش حاضر از تکنیک Real Time-RT PCR (دستگاه Corbett rotor gene 6000) برای سنجش کمی سطح بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. برای انجام این تکنیک از میکس SYBR Green (یکتاتجهیز آزما ساخت کشور ایران) استفاده شد. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر میکس SYBR Green، ۱ میکرولیتر cDNA و ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌هاست. در نهایت، پس از محاسبه، بیان ژن هدف در مراحل مختلف نسبت به یکدیگر با فرمول محاسبه شد.

تحلیل داده‌های پایگاه اطلس ژنوم سرطان

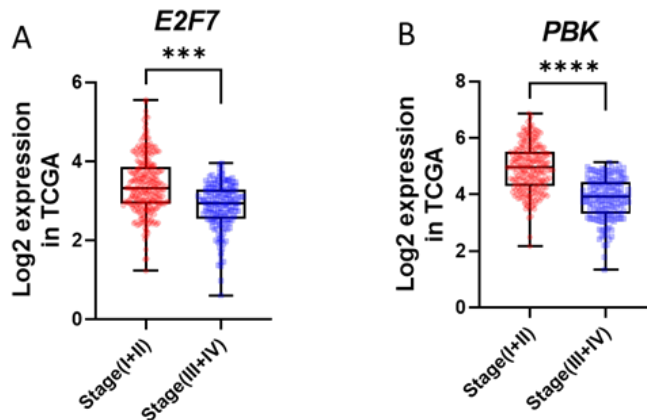
تمام داده‌های RNAseq در فرمت خام (HTseq-Counts) با استفاده از بسته TCGA biolinks از اطلس ژنوم سرطان در محیط زبان برنامه‌نویسی R دانلود شد. در ادامه، پیش پردازش‌های اولیه بر داده‌های بیانی شامل حذف ژن‌های با بیان صفر یا نزدیک به صفر (CPM کمتر از ۱۰ در ۵۰ درصد نمونه‌ها)، نرمال‌سازی داده‌ها به روش TMM و انتقال داده‌ها به حالت لگاریتمی بر پایه ۲، توسط پکیج‌های edgeR و limma انجام شد. از ماتریکس بیانی حاصل هر سرطان برای آنالیزهای بعد در این مطالعه استفاده شد. بر اساس اطلاعات کلینیکی نمونه‌ها، اطلاعات مربوط به Stage هر کدام از نمونه‌ها استخراج شد و نمونه‌ها در دو گروه Stage I/II



تصویر ۱. نمودار تغییر سطح بیان نسبی PBK و E2F7 در Stage I+II در مقایسه با Stage III+IV بر اساس مطالعات آزمایشگاهی. میزان معناداری تغییرات بیان ژن‌ها با آزمون تی انجام شد.



* و **** سطح معنی‌داری $P < 0/0001$ و $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.



تصویر ۲. نمودار تغییر سطح بیان نسبی E2F7 و PBK در Stage I+II در مقایسه با Stage III+IV براساس داده‌های اطلس ژنوم سرطان میزان معناداری تغییرات بیان ژن‌ها با آزمون تی انجام شد.



*** و **** سطح معناداری $P < 0.001$ و $P < 0.0001$ در نظر گرفته شد.

زودهنگام سرطان کولورکتال مفید است. بنابراین، تشخیص سطح بیان ژن‌های E2F7 و PBK در مراحل اولیه و پیشرفته سرطان کولورکتال به‌وسیله آنالیز PCR در زمان واقعی و همچنین تأیید نتایج حاصل به‌وسیله مجموعه داده‌های ترانسکریپتوم (TCGA) ممکن است به تشخیص زودهنگام کمک کند و درمان‌های مؤثری را ممکن سازد.

شد، در دو گروه Stage I+II و Stage III+IV مقایسه شد. نتایج نشان داد هر دو ژن در مراحل اولیه بیماری افزایش بیان معناداری را نشان می‌دهند (تصویر شماره ۲).

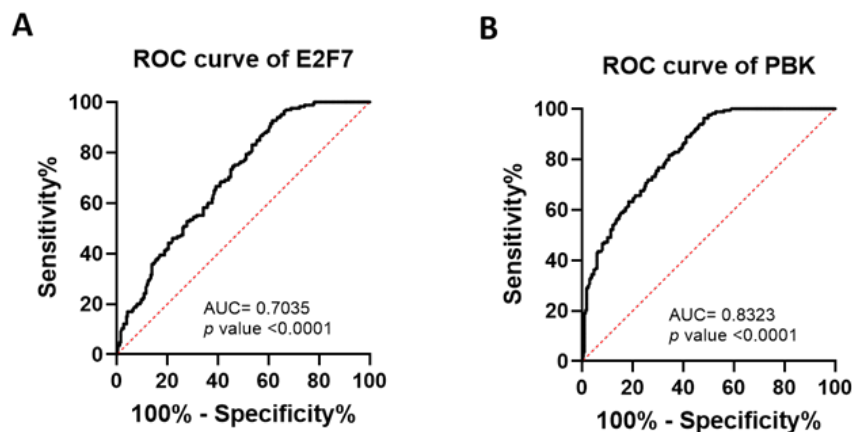
اختصاصیت و حساسیت E2F7 و PBK در جداسازی Stage‌های اولیه از Stage‌های بالاتر بر اساس اطلاعات اطلس ژنوم سرطان

ژن‌های E2F7 و PBK در سرطان‌های مختلف به‌عنوان مارکرهای زیستی در نظر گرفته شدند. از این رو در این مطالعه، برای اولین بار، ژن‌های E2F7 و PBK به‌عنوان ژن‌های با پتانسیل تشخیصی در مراحل اولیه سرطان کولورکتال انتخاب شدند. سطح بیان این ژن‌ها در مراحل اولیه و ثانویه سرطان کولورکتال به‌وسیله ۳۲ بافت توموری و در مراحل مختلف، با استفاده از آنالیز داده‌های PCR در زمان واقعی ارزیابی شد. سپس نتایج به‌دست‌آمده به‌وسیله داده‌های اطلس ژنوم سرطان تأیید شد. PBK یک سرین/ترئونین پروتئین کیناز مرتبط به خانواده پروتئین کیناز (MAPKK) فعال‌شده با میتوزن است. نتایج مطالعات

نتایج بر اساس نمودار ROC curve نشان داد مارکرهای E2F7 و PBK به‌ترتیب با مساحت‌های زیر سطح نمودار $AUC = 0.7035$ و $AUC = 0.8323$ به‌عنوان ژن‌های معناداری در جداسازی تومورهای Stage I+II از Stage III+IV عمل خواهند کرد ($P > 0.0001$) (تصویر شماره ۳).

بحث

مطالعه ژنتیک مولکولی و بررسی سطح بیان ژن‌های با اهمیت زیاد در مراحل مختلف برای درک بیشتر پاتوژنز و تشخیص



تصویر ۳. اختصاصیت و حساسیت مارکرهای E2F7 و PBK در جداسازی تومورهای Stage I+II از Stage III+IV





یا دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های کنترلی که حامل shRNAهای غیراختصاصی بودند، نشان دادند [۱۹]. یافته‌های اخیر درباره سرطان کولورکتال، ارتباط معنادار بین ژن PBK و مارکرهای تکثیر سلولی را در هر دو محیط *in vivo* و *in vitro* نشان داده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد سطح بیان ژن PBK در سرطان کولورکتال با TNM.T ارتباط معکوس داشت. علاوه بر این، یافته‌های مطالعات اخیر نشان داده است که بر اساس نتایج به دست آمده از سطح بیان ژن PBK در سرطان کولورکتال و همچنین بر اساس ارتباط بیان این ژن با تکثیر سلولی، ژن PBK ممکن است به عنوان یک هدف درمانی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در نظر گرفته شود [۲۰]. از طرفی، نتایج آنالیز منحنی ROC بر اساس داده‌های ترنسکرپتوم توانست به صورت معناداری بیمارانی که در مراحل ابتدایی بیماری به سر می‌برند را از بیمارانی که در مراحل پیشرفته بیماری هستند، تفکیک کند. در نهایت، با توجه به نتایج مطالعات قبلی و نتایج حاصل از داده‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیک، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ارزیابی سطح بیان ژن PBK در مراحل ابتدایی ممکن است در روند تشخیص زود هنگام بیماری مؤثر واقع شود و به عنوان یک مارکر تشخیصی کارآمد باشد.

فاکتورهای رونویسی E2F تنظیم‌کننده‌های مهم چرخه سلولی هستند و تنظیم نادرست رونویسی وابسته به E2F یک رویداد مکرر در بسیاری از سرطان‌هاست و تصور می‌شود محرک مهمی در تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی است. برخی از مطالعات نشان می‌دهد E2Fهای غیرمعمول ممکن است به عنوان آنکوژن عمل کنند، در حالی که مطالعات دیگر نتیجه گرفتند که آن‌ها می‌توانند، مهارکننده تومور باشند و این نشان می‌دهد نقش E2F7 به نوع بافت بستگی دارد [۲۱]. نتایج داده‌های ریل تایم نشان داد، سطح بیان این ژن در مرحله یک و دو در مقایسه با مرحله سه و چهار بیشتر است. همان‌طور که این نتایج در تحلیل تفاوت بیان داده‌های اطلس ژنوم سرطان نیز تأیید شد. همچنین نتایج تحلیل منحنی ROC بر اساس داده‌های اطلس ژنوم سرطان نشان داد ژن E2F7 می‌تواند به عنوان یک مارکر زیستی در مراحل ابتدایی سرطان کولورکتال مؤثر واقع شود. مطالعات گذشته نشان دادند بیان E2F7 در بافت‌های سرطان پروستات در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور به میزان چشمگیری بیشتر است [۲۲]. چنگ و همکاران دریافتند پس از ناک‌داون کردن E2F7، تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلولی به طور قابل توجهی مهار شده و آپوپتوز ایجاد می‌شود. علاوه بر این، از طریق روش وسترن بلات، مشاهده کردند که بیان پروتئین BCL-2 کاهش می‌یابد، در حالی که بیان پروتئین BAX و CL-caspase3 افزایش می‌یابد. این نشان می‌دهد، مهار E2F7 می‌تواند باعث آپوپتوز سلولی شود و در نتیجه از تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلولی جلوگیری می‌کند [۲۳]. از طرفی یک مطالعه انجام شده بر روی سرطان گلیوما نشان داد، سطح بیان ژن E2F7

انجام شده بر روی سرطان معده نشان داد، بیان هسته‌ای PBK با افزایش عمق تهاجم و متاستاز به غدد لنفاوی ارتباط معناداری دارد. از طرفی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بقای Kaplan-Meier نشان داد، افزایش بیان ژن PBK بقای بیماران را کاهش می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد PBK، سرطان‌زایی و متاستاز سرطان معده را افزایش می‌دهد و نشانگر زیستی بالقوه‌ای در برای پیش‌آگهی بیماری است. علاوه بر این، PBK نشانگر پروتئین ایمونوهیستوشیمی مفیدی برای کاربرد بالقوه آسیب‌شناسی جراحی است، زیرا پیش‌بینی متاستاز غدد لنفاوی بر اساس ارزیابی نمونه بیوپسی، قبل از برداشتن آندوسکوپی یک نقطه تصمیم‌گیری حیاتی است [۱۴]. نتایج آنالیز داده‌های آزمایشگاهی نشان داد، سطح بیان ژن PBK در مراحل اولیه در مقایسه با مراحل پیشرفته بیشتر بود. همچنین نتایج حاصل از داده‌های ترنسکرپتوم نیز نشان داد، سطح بیان این ژن در مراحل ابتدایی بیشتر از مراحل پیشرفته است. مطالعات مربوط به همبستگی بین PBK/TOPK و بدخیمی‌ها در سال‌های اخیر تأیید کرده است که PBK/TOPK در سلول‌های تکثیری بیش از حد بیان می‌شود. برای مثال PBK/TOPK در طول سیتوزن سلول‌های توموری به احتمال زیاد با فسفوریلاسیون Thr9 و فعال شدن توسط سیکلین B1/cdk1 افزایش می‌یابد [۱۶، ۱۵]. بنابراین، فرض بر این است که PBK/TOPK نقش مهمی در سیتوکینزس ایفا می‌کند.

اخیراً یک مطالعه نشان داد کاهش بیان PBK/TOPK به طور قابل توجهی با پیش‌آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به کلانژیوکارسینوم مرتبط است [۱۷]. مطالعه دیگری گزارش کرد که بیان PBK/TOPK به دلیل مهار EWS-FLI1 کاهش می‌یابد و باعث کاهش سرعت تکثیر سلولی می‌شود. همچنین مشخص شده است که پارامترهای دیگری غیر از بیان PBK/TOPK بر تومورزایی تأثیر می‌گذارد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد PBK/TOPK را می‌توان ژنی مرتبط با سیتوزن در سلول‌های تومور دانست. احتمالاً مسیرهای سیگنالینگ دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند بر روند بالینی CRC تأثیر بگذارند. همچنین یکی از مطالعات اخیر در سرطان کولورکتال نشان داده است که بیان کم این ژن با پیش‌آگهی ضعیف بیماران ارتباط دارد [۱۸]. نتایج مطالعه انجام شده بر روی سرطان کولورکتال نشان می‌دهد که بیان بیش از حد PBK ممکن است، بقای سلول‌های تومور و مقاومت در برابر آپوپتوز ناشی از شیمی‌درمانی را از طریق سرکوب بیان p21 و عملکرد p53 افزایش دهد. یکی از پیش‌بینی‌های این مدل این است که کاهش PBK در سلول‌های تومور باید تکثیر و تومورزایی را از طریق افزایش بیان p21 و عملکرد p53 کاهش دهد. در واقع، سه رده سلولی پایدار PBK در فاز G2/M چرخه سلولی تجمع و آپوپتوز را پس از قرار گرفتن در معرض DMSO

6. Cholangiocarcinoma

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.022 به تصویب رسیده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی است و با حمایت معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد شهرکرد انجام شده است.

مشارکت‌نویسندگان

طراحی و مفهوم‌سازی مطالعه و روش‌شناسی: رضا هاشمی و مریم پیمانی؛ داده‌کاوی، تجزیه و تحلیل رسمی و بررسی: رضا هاشمی؛ نظارت، اعتبار‌سنجی، تجسم و تأیید نهایی: مریم پیمانی و کامران قائدی؛ تفسیر اطلاعات به‌دست‌آمده: مریم پیمانی؛ جمع‌آوری نمونه: هانا صفار؛ نگارش مقاله، بازنگری و ویرایش: رضا هاشمی؛ همه نویسندگان نسخه نهایی را خواندند و تأیید کردند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

مراحل پیشرفته، بیشتر از مراحل ابتدایی است [۲۴]. علاوه‌براین نشان داده شده است بیان E2F7 به‌طور قابل توجهی با مراحل تومور و بقای کلی بیماران مبتلابه سرطان روده بزرگ مرتبط است و در نتیجه این زن ممکن است به‌عنوان هدف درمانی بالقوه برای سرطان روده بزرگ عمل کند [۲۵]. نتایج مطالعه صورت‌گرفته بر سرطان کولورکتال در سال ۲۰۲۱ نشان داد E2F7 پایداری MAPK را برای افزایش و تکثیر سلولی، تهاجم و مهاجرت در سرطان روده بزرگ را ارتقا داد [۲۶]. از طرفی به‌طور مشابه، مطالعه دیگری، ارتباط مسیر سیگنالینگ MAPK را با رشد سرطان روده بزرگ در داخل بدن نشان داده است [۲۷]. همچنین مشخص شده است MAPK فعالیت سلول‌های بنیادی تومور سرطان روده را ارتقا می‌دهد [۲۸]. مطالعات قبلی، نقش مهاری E2F7 را در بیان ژن‌های پایین‌دست آن گزارش کرده است [۲۹]. علاوه‌براین، miR-199b-5p در سرطان کولورکتال بیان کمی دارد [۳۰]. نتایج تشخیص تراشه^۷ نشان داد پس از خاموش کردن E2F7، اتصال E2F7 به پروموتور miR-199b کاهش یافت و در نتیجه بیان miR-199b را تقویت کرد. به‌طور خلاصه، E2F7 بیان miR-199b را با اتصال به پروموتور miR-199b در سرطان کولورکتال کاهش می‌دهد [۲۶]. ازین‌رو ارزیابی سطح بیان این ژن در مراحل اولیه نسبت به مراحل پیشرفته و بررسی پتانسیل تشخیصی وابسته به سطح بیان در مراحل ابتدایی ممکن است در بهبود روند درمان و تشخیص بیماران مبتلابه سرطان کولورکتال مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد ژن‌های PBK و E2F7 در مراحل ابتدایی نسبت به مراحل پیشرفته، سطح بیان بیشتری دارند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند ژن‌های PBK و E2F7 پتانسیل به‌کارگیری به‌عنوان مارکرهای زیستی را در مراحل ابتدایی دارند، اگرچه مطالعات بیشتری برای تأیید این یافته‌ها نیاز است. علاوه‌براین سطح بیان ژن‌های کاندید در مراحل ابتدایی به‌خوبی از مراحل پیشرفته قابل تمایز و تفکیک است. ازین‌رو مطالعات مولکولی بیشتری نیز برای ارائه تصویری عمیق‌تر در مورد عملکرد PBK و E2F7 در سرطان کولورکتال لازم است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به دسترسی بسیار کم به نمونه‌های توموری در مراحل پیشرفته و همچنین ممکن نبودن پیگیری روند پیشرفت بیماری در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود ژن‌های بیشتری برای معرفی بیومارکر در جهت جداسازی دو جمعیت توموری در مراحل اولیه و پیشرفته بررسی شوند. همچنین در مدل‌های سلولی سرطان کولورکتال، به عملکرد این ژن‌ها در جهت تأیید نقش آن‌ها در روند پیشرفت بیماری پرداخته شود.

7. ChIP detection

References

- [1] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021; 127(16):3029-30. [DOI:10.1002/ncr.33587] [PMID]
- [2] Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8(12):686-700. [DOI:10.1038/nrgastro.2011.173] [PMID] [PMCID]
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71(3):209-49. [DOI:10.3322/caac.21660] [PMID]
- [4] Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: Updates and challenges. *Cancers*. 2020; 12(2):319. [DOI:10.3390/cancers12020319] [PMID] [PMCID]
- [5] Freeman HJ. Early stage colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(46):8468-73. [DOI:10.3748/wjg.v19.i46.8468] [PMID] [PMCID]
- [6] Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021; 14(10):101174. [DOI:10.1016/j.tranon.2021.101174] [PMID] [PMCID]
- [7] Sreekumar R, Harris S, Moutasim K, DeMateos R, Patel A, Emo K, et al. Assessment of nuclear ZEB2 as a biomarker for colorectal cancer outcome and TNM risk stratification. *JAMA Netw Open*. 2018; 1(6):e183115. [DOI:10.1001/jamanetworkopen.2018.3115] [PMID] [PMCID]
- [8] Liu H, Xu Y, Zhang Q, Yang H, Shi W, Liu Z, et al. Prognostic significance of TBL1XR1 in predicting liver metastasis for early stage colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2017; 26(1):13-20. [DOI:10.1016/j.suronc.2016.12.003] [PMID]
- [9] Joel M, Mughal AA, Grieg Z, Murrell W, Palmero S, Mikkelsen B, et al. Targeting PBK/TOPK decreases growth and survival of glioma initiating cells in vitro and attenuates tumor growth in vivo. *Mol Cancer*. 2015; 14:121. [DOI:10.1186/s12943-015-0398-x] [PMID] [PMCID]
- [10] Ayllon V, O'connor R. PBK/TOPK promotes tumour cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage response. *Oncogene*. 2007; 26(24):3451-61. [DOI:10.1038/sj.onc.1210142] [PMID]
- [11] Carvajal LA, Hamard P-J, Tonnessen C, Manfredi JJ. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev*. 2012; 26(14):1533-45. [DOI:10.1101/gad.184911.111] [PMID] [PMCID]
- [12] Johnson DG, DeGregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr Mol Med*. 2006; 6(7):731-8. [DOI:10.2174/1566524010606070731] [PMID]
- [13] Bahmani L, Baghi M, Peymani M, Javeri A, Ghaedi K. MiR-141-3p and miR-200a-3p are involved in Th17 cell differentiation by negatively regulating RARB expression. *Hum Cell*. 2021; 34(5):1375-87. [DOI:10.1007/s13577-021-00558-4] [PMID]
- [14] Kwon CH, Park HJ, Choi YR, Kim A, Kim HW, Choi JH, et al. PSMB8 and PBK as potential gastric cancer subtype-specific biomarkers associated with prognosis. *Oncotarget*. 2016; 7(16):21454-8. [DOI:10.18632/oncotarget.7411] [PMID] [PMCID]
- [15] Abe Y, Takeuchi T, Kagawa-Miki L, Ueda N, Shigemoto K, Yasukawa M, et al. A mitotic kinase TOPK enhances Cdk1/cyclin B1-dependent phosphorylation of PRC1 and promotes cytokinesis. *J Mol Biol*. 2007; 370(2):231-45. [DOI:10.1016/j.jmb.2007.04.067] [PMID]
- [16] Chen T-C, Lee S-A, Hong T-M, Shih J-Y, Lai J-M, Chiou H-Y, et al. From midbody protein-protein interaction network construction to novel regulators in cytokinesis. *Proteome Res*. 2009; 8(11):4943-53. [DOI:10.1021/pr900325f] [PMID]
- [17] He F, Yan Q, Fan L, Liu Y, Cui J, Wang J, et al. PBK/TOPK in the differential diagnosis of cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma and its involvement in prognosis of human cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2010; 41(3):415-24. [DOI:10.1016/j.humpath.2009.05.016] [PMID]
- [18] Su T-C, Chen C-Y, Tsai W-C, Hsu H-T, Yen H-H, Sung W-W, et al. Cytoplasmic, nuclear, and total PBK/TOPK expression is associated with prognosis in colorectal cancer patients: A retrospective analysis based on immunohistochemistry stain of tissue microarrays. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0204866. [DOI:10.1371/journal.pone.0204866] [PMID] [PMCID]
- [19] Hu F, Gartenhaus R, Eichberg D, Liu Z, Fang H, Rapoport A. PBK/TOPK interacts with the DBD domain of tumor suppressor p53 and modulates expression of transcriptional targets including p21. *Oncogene*. 2010; 29(40):5464-74. [DOI:10.1038/ncr.2010.275] [PMID]
- [20] Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, et al. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch*. 2021; 479(2):277-84. [DOI:10.1007/s00428-021-03062-0] [PMID]
- [21] Endo-Munoz L, Dahler A, Teakle N, Rickwood D, Hazar-Rethinam M, Abdul-Jabbar I, et al. E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: Implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res*. 2009; 69(5):1800-8. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-2725] [PMID]
- [22] Wang Y, Pei X, Xu P, Tan Z, Zhu Z, Zhang G, et al. E2F7, regulated by miR30c, inhibits apoptosis and promotes cell cycle of prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2020; 44(3):849-62. [DOI:10.3892/or.2020.7682] [PMID] [PMCID]
- [23] Cheng C, Guo L, Ma Y, Wang Z, Fan X, Shan Z. Up-regulation of miR-26a-5p inhibits E2F7 to regulate the progression of renal carcinoma cells. *Cancer Manag Res*. 2020; 12:11723-33. [DOI:10.2147/CMAR.S271710] [PMID] [PMCID]
- [24] Yin W, Wang B, Ding M, Huo Y, Hu H, Cai R, et al. Elevated E2F7 expression predicts poor prognosis in human patients with gliomas. *J Clin Neurosci*. 2016; 33:187-93. [DOI:10.1016/j.jocn.2016.04.019] [PMID]
- [25] Yao H, Lu F, Shao Y. The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer. *PeerJ*. 2020; 8:e8562. [DOI:10.7717/peerj.8562] [PMID] [PMCID]
- [26] Guo X, Liu L, Zhang Q, Yang W, Zhang Y. E2F7 transcriptionally inhibits MicroRNA-199b expression to promote USP47, thereby enhancing colon cancer tumor stem cell activity and promoting the occurrence of colon cancer. *Front Oncol*. 2021; 10:565449. [DOI:10.3389/fonc.2020.565449] [PMID] [PMCID]
- [27] Zhang S-L, Zhu H-Y, Zhou B-Y, Chu Y, Huo J-R, Tan Y-Y, et al. Histone deacetylase 6 is overexpressed and promotes tumor growth of colon cancer through regulation of the MAPK/ERK signal pathway. *Oncotargets Ther*. 2019; 12:2409-19. [DOI:10.2147/OTT.S194986] [PMID] [PMCID]
- [28] Vishnubalaji R, Manikandan M, Fahad M, Hamam R, Alfayez M, Kassem M, et al. Molecular profiling of ALDH1+ colorectal cancer stem cells reveals preferential activation of MAPK, FAK, and

- oxidative stress pro-survival signalling pathways. *Oncotarget*. 2018; 9(17):13551-84. [DOI:10.18632/oncotarget.24420] [PMID] [PMCID]
- [29] Mitxelena J, Apraiz A, Vallejo-Rodríguez J, García-Santisteban I, Fullaondo A, Alvarez-Fernández M, et al. An E2F7-dependent transcriptional program modulates DNA damage repair and genomic stability. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(9):4546-59. [DOI:10.1093/nar/gky218] [PMID] [PMCID] [DOI:10.1093/nar/gky218] [PMID] [PMCID]
- [30] Shen Z-l, Wang B, Jiang K-w, Ye C-x, Cheng C, Yan Y-c, et al. Down-regulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget*. 2016; 7(23):35092. [DOI:10.18632/oncotarget.9042] [PMID] [PMCID] [DOI:10.18632/oncotarget.9042] [PMID] [PMCID]