

Gene Network Analysis for Identifying Hub Genes and Biological Pathways Associated with Breast Cancer Progression Using Bioinformatics Analysis

Setayesh sadat Hosseini¹, Amirhesan Yahyapour¹, Mohammadmehdi Yaghoobi¹, Nahid Askari^{✉1}

¹Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Received: 2024/12/05
Accepted: 2025/03/14

*Corresponding Author:
n.askari@kgut.ac.ir

Ethics Approval:
Not Applicable

Abstract

Introduction: The molecular process of tumorigenesis in breast cancer is still not fully comprehended. Identifying related genes in breast cancer progression will clarify its basic molecular mechanisms. Therefore, the present study aimed to identify key differentially expressed genes associated with breast cancer prognosis and further investigate their potential link to pathogenicity.

Materials and Methods: The GSE45827, GSE65194, and GSE42568 datasets from Gene Expression Omnibus were downloaded and analyzed in the NCBI database to identify differentially expressed genes. The KEGG gene ontology and pathway were also studied. The STITCH website revealed the protein-protein interaction network of differentially expressed genes, which visualized using Cytoscape and further analyzed using the MCODE plugin. The expression levels of Hub genes were analyzed using UALCAN. Kaplan-Meier plotter was used to assess the association between the expression levels of identified genes and patient survival, and then a gene-drug interaction network was created using Comparative Toxicogenomics Database to explore potential drugs that could target the identified genes.

Results: A total of 599 differentially expressed genes were identified, and four Hub genes were selected for further analysis through a high degree of connectivity and the GTEx database. The results showed that *NDE1*, *RAD21*, *ZWILCH*, and *ZWINT* may be key genes in cell cycle signaling, P53, PI3K-Akt, and AMPK breast cancer progression pathways.

Conclusion: Given the critical role of these four hub genes in the fundamental and well-known pathways of breast cancer, these genes can be considered as valuable potential prognostic biomarkers and novel therapeutic targets. A better understanding of these genes and pathways can provide insights into breast cancer progression. Therefore, further research is required in this regard.

Keywords: Bioinformatics, Biomarkers, Breast Cancer, Gene Expression, Gene Expression Omnibus (GEO), Survival



Introduction

Breast cancer is the most common malignancy among women and a leading cause of cancer-related deaths worldwide (1). Early diagnosis is crucial for improving patient outcomes. Understanding the molecular mechanisms underlying breast cancer progression is essential for developing effective diagnostic and therapeutic strategies. Bioinformatics analysis of gene expression data provides a powerful approach to identify key genes and pathways involved in this complex disease. This study employed a comprehensive bioinformatics analysis of publicly available

gene expression datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database to identify differentially expressed genes (DEGs), investigate their protein-protein interactions (PPIs), and characterize the hub genes and biological pathways associated with breast cancer progression (2) (Figure 1).

To provide more current and reliable insights into breast cancer prognosis, this study analyzes three recent and independent datasets. Furthermore, the use of diverse and powerful bioinformatics databases and tools allows for a more detailed and trustworthy analysis of the associated genes compared to previous research.

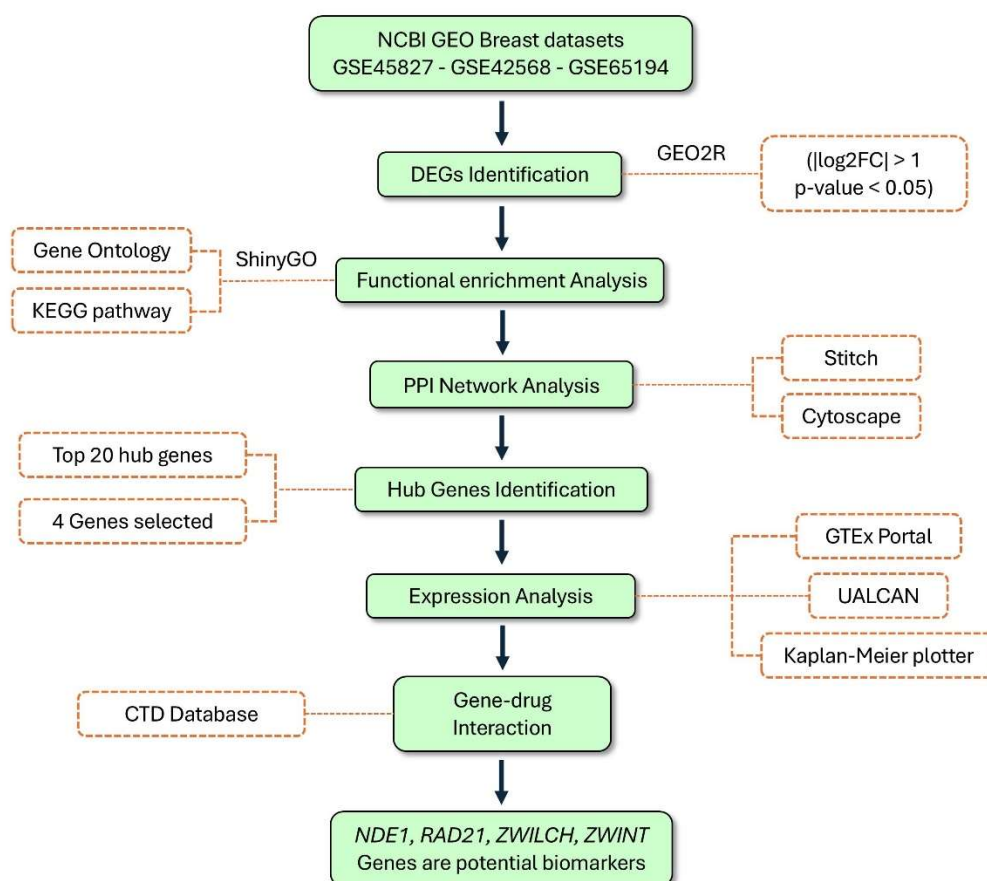


Fig 1: Overview of the bioinformatics workflow

Materials & Methods

Three breast cancer datasets (GSE45827: 11 normal, 130 cancer; GSE42568: 11 normal, 130 cancer; GSE65194: 17 normal, 104 cancer) were downloaded from the GEO database. The DEGs were identified using the GEO2R tool with thresholds of $|\log_2FC| > 1$ and a P -value < 0.05 . The $\log_2$ fold change threshold was selected to identify genes exhibiting at least a two-fold change in expression, which is generally considered biologically significant. A P -value threshold was used to ensure the observed differences in gene expression were statistically significant. The GEO2R tool includes built-in normalization procedures to enhance data comparability and improve the quality of the results, and during initial data exploration, the expression profiles of the samples were visually inspected for any obvious deviations or unusual patterns indicative of low quality. Functional enrichment analysis of DEGs was performed using the ShinyGO web server to identify enriched Gene Ontology terms and KEGG pathways (3). A PPI network of DEGs was constructed using the STITCH database (combined score ≥ 0.7) and visualized using Cytoscape (version 3.9.1) (4). The MCODE plugin (score ≥ 5.0) was used to identify densely connected modules within the PPI network, and the top 20 most highly connected genes were selected. The expression patterns of these top genes were analyzed using the GTEx Portal to assess their expression in normal human tissues. The UALCAN database was used to compare the expression levels of these genes in tumor and normal breast tissues (5). Kaplan-Meier plotter was used to analyze the correlation between the expression of selected hub genes and the overall survival of breast cancer patients. The analysis was conducted on the entire patient cohort, which included data on all levels of ER status, PR status, HER2 status, lymph node status, tumor grade, and molecular subtypes (6). The Comparative Toxicogenomics Database (CTD) was utilized to explore potential interactions between the identified hub genes and drugs or chemicals (7).

Results

Following the identification of differentially expressed genes in each of the three datasets using the criteria outlined in the Methods section, the resulting gene lists were merged.

After removing duplicate entries, a total of 599 unique differentially expressed genes with a consistent trend of expression change across the datasets were obtained (300 upregulated and 299 downregulated). Functional enrichment analysis using ShinyGO revealed significant enrichment of upregulated DEGs in pathways such as CELL CYCLE and P53 SIGNALING PATHWAY, while downregulated DEGs were enriched in ECM-RECEPTOR INTERACTION and PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY. The PPI network was constructed using STITCH and analyzed with Cytoscape, MCODE and GTEx Portal identified several highly interconnected gene clusters, leading to the selection of four hub genes: *NDE1*, *RAD21*, *ZWILCH*, and *ZWINT*, which showed significant differential expression in breast cancer tissues compared to normal tissues based on UALCAN analysis ($P < 1E-12$). Kaplan-Meier survival analysis demonstrated that abnormal expression levels of *ZWINT* ($P < 1e-16$), *ZWILCH* ($P < 4.3e-09$), *RAD21* ($P < 5.6e-11$), and *NDE1* ($P < 1.4e-05$) were associated with significantly poor overall survival in breast cancer patients. Furthermore, analysis using the CTD database identified potential drugs that could modulate the expression of these hub genes, such as Doxorubicin, Aristolochic acid I, and Azathioprine, all of which are predicted to decrease their expression.

Discussion

Analysis of the selected GEO datasets identified a total of 599 DEGs (300 upregulated and 299 downregulated). Functional enrichment analysis using ShinyGO revealed significant enrichment of upregulated DEGs in pathways such as CELL CYCLE and P53 SIGNALING PATHWAY, while downregulated DEGs were enriched in ECM-RECEPTOR INTERACTION and PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY. The PPI network was constructed using the STITCH database and analyzed with Cytoscape software. Using the MCODE plugin, several gene cluster networks were identified. The GTEx Portal database was then used to select genes expressed in breast tissue. Finally, the UALCAN database identified four hub genes (*NDE1*, *RAD21*, *ZWILCH*, and *ZWINT*), which showed significant differential expression in breast cancer tissues compared to normal

tissues. Kaplan-Meier survival analysis demonstrated that abnormal expression levels of these four hub genes was associated with significantly poor overall survival in breast cancer patients. The observed association between abnormal expression of these four hub genes and poor overall survival in breast cancer likely reflects the disruption of fundamental cellular processes crucial for maintaining genomic stability and proper cell division. These hub genes are involved in critical aspects of the cell cycle, DNA repair mechanisms, and chromosome segregation. Furthermore, analysis using the CTD database identified potential drugs that could modulate the expression of these hub genes, such as Doxorubicin, Aristolochic acid I, and Azathioprine.

These findings are based on bioinformatic analysis and require experimental validation.

References

1. Kagita US. An Investigation on Breast Cancer Knowledge in Developing Nations. *International Journal of Current Innovations in Advanced Research*. 2024;7(2):70-5.
2. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2019:151-64.
3. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 2020;36(8):2628-9.
4. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
5. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022;25:18-27.
6. Györfy B. Integrated analysis of public datasets for the discovery and validation of survival-associated genes in solid tumors. *The Innovation*. 2024;5(3).
7. Davis AP, Wiegiers TC, Johnson RJ, Sciaky D, Wiegiers J, Mattingly CJ. Comparative toxicogenomics database (CTD): update 2023. *Nucleic acids research*. 2023;51(D1):D1257-D62.

Future research should include *in vitro* and *in vivo* studies to confirm the results.

Conclusion

In conclusion, our comprehensive bioinformatics analysis of breast cancer gene expression datasets identified four key hub genes (*NDE1*, *RAD21*, *ZWILCH*, *ZWINT*) as important regulators in breast cancer tumorigenesis and progression. Their overexpression in cancerous tissues and significant correlation with adverse clinical outcomes underscore their potential as prognostic biomarkers. These genes could serve as potential targets for further therapeutic investigations. Further research is warranted to validate the identified hub genes as potential therapeutic targets through *in vitro* and *in vivo* studies.

تحلیل شبکه ژنی برای شناسایی ژن‌های هاب و مسیرهای زیستی مرتبط با پیشرفت سرطان پستان با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی

ستایش سادات حسینی^۱، امیرحسان یحیی پور^۱، محمدمهدی یعقوبی^۱، ناهید عسکری^{۱*}

^۱گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

مقدمه: فرآیند مولکولی تومورزایی در سرطان پستان به‌طور کامل شناخته نشده است و شناسایی ژن‌های مربوط به آن، مکانیسم‌های مولکولی اولیه سرطان را روشن می‌سازد. هدف این مطالعه، شناسایی ژن‌هایی با بیان متفاوت دخیل در بیماری‌زایی و پیش‌آگهی سرطان پستان از طریق آنالیز بیوانفورماتیک است.

روش بررسی: مجموعه داده‌های GSE45827، GSE65194، و GSE42568 از قسمت Gene Expression Omnibus در پایگاه داده NCBI جهت شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت دانلود و آنالیز شدند. هستی‌شناسی و مسیر ژنی در KEGG نیز مورد مطالعه قرار گرفت. سپس برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط پایگاه داده STITCH رسم و با استفاده از افزونه MCODE در نرم افزار Cytoscape تحلیل شد. سطح بیان ژن‌های هاب با استفاده از Kaplan-Meier plotter و UALCAN آنالیز و سپس با استفاده از CTD شبکه تعاملی ژن-دارو ایجاد شد.

یافته‌ها: در مجموع ۵۹۹ ژن‌ها با بیان متفاوت انتخاب و چهار ژن هاب با بیشترین تعامل در شبکه، به کمک پایگاه داده GTEx شناسایی شدند. نتایج نشان داد که *ZWILCH*، *RAD21*، *NDE1* و *ZWINT* ممکن است ژن‌های کلیدی در مسیرهای چرخه سلولی، P53، PI3K-Akt و AMPK و پیشرفت سرطان پستان باشند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش کلیدی چهار ژن هاب در مسیرهای اساسی و شناخته شده سرطان پستان، این ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه با ارزش پیش‌آگهی و اهداف درمانی نوین در نظر گرفته شوند. درک بهتر این ژن‌ها و مسیرها می‌تواند به جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان کمک کند. بنابراین تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

کلیدواژه‌ها: سرطان پستان، GEO، بیان ژن، بیوانفورماتیک، بقا، نشانگرهای زیستی

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴

* نویسنده مسئول:

n.askari@kgut.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته است. طبق آمار جهانی، از هر هشت زن، یک نفر به این بیماری مبتلا می‌شود و تقریباً ۷۰ تا ۸۰ درصد بیماران در مراحل اولیه و غیرمتاستاتیک قابل درمان هستند؛ بنابراین، تشخیص زودهنگام این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱).

این بیماری انواع مولکولی مختلفی مانند شبه‌طبیعی، شبه‌پایه‌ای (بازال-لایک)، ERBB2 یا HER2 مثبت، لومینال A و لومینال B دارد. روش‌های مختلفی برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان از جمله ماموگرافی، سونوگرافی و MRI وجود دارد. علاوه بر این روش‌ها، بررسی تغییرات بیان ژن در سطح رونویسی می‌تواند در تشخیص زودهنگام این بیماری بسیار مؤثر باشد. استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک یکی از راه‌های شناسایی تغییرات بیان ژن در این نوع سرطان است (۲، ۳).

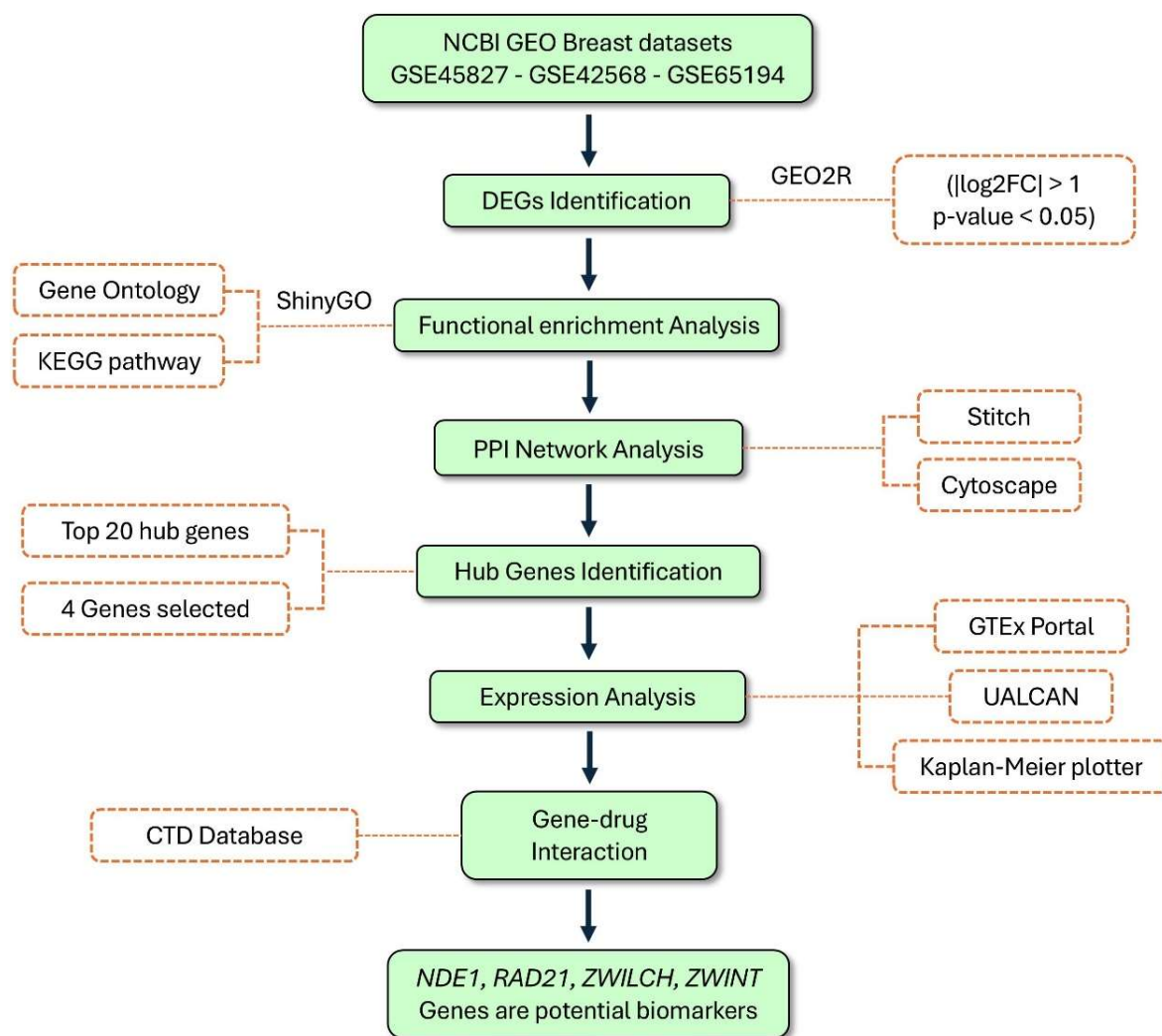
استفاده از انواع داروها، یکی از روش‌های درمانی در کنترل سرطان پستان است که می‌توانند به کمک بیوانفورماتیک بررسی شوند. همچنین، آنالیز شبکه‌های زیستی مانند شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی، هم‌بیانی و تنظیم بیان ژن می‌تواند به پیشبرد این تحقیقات کمک کند. به همین دلیل، مطالعات بیوانفورماتیک می‌تواند در شناسایی ژن‌های کلیدی برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان و همچنین شناسایی داروهای موجود برای درمان این بیماری مؤثر باشد (۴).

در این مطالعه، الگوهای بیان ژن در بافت تومور اولیه پستان با استفاده از مجموعه داده‌های GSE65194، GSE45827 و GSE42568 از پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) در NCBI بررسی

شدند. این مجموعه داده‌ها که به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۳، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ به صورت عمومی منتشر شده‌اند، اطلاعات مفیدی در مورد سلول‌های توموری در گردش خون برای نشانگرهای مزانشیمی در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه ارائه می‌دهند. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های کلیدی و داروهای مؤثر بر آن‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و آنالیز شبکه برهم‌کنش پروتئینی است که به آشکارسازی روابط ناشناخته بین بیان ژن و درک بهتر ما از پیشرفت سرطان پستان کمک کند.

مواد و روش‌ها

مجموعه داده‌های استفاده شده در سرطان پستان
مجموعه داده‌های GSE45827 (یک نوع مطالعه آزمایشگاهی شامل ۱۱ نمونه سالم و ۱۳۰ نمونه سرطانی)، GSE42568 (مطالعه‌ای بالینی شامل ۱۱ نمونه سالم و ۱۳۰ نمونه سرطانی) و GSE65194 (مطالعه‌ای بالینی شامل ۱۷ نمونه سالم و ۱۰۴ نمونه سرطانی) از پایگاه داده GEO در آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> دانلود و برای شناسایی ژن‌هایی با بیان متفاوت یا Differentially expressed genes (DEGs) آنالیز شدند (۵-۷). انتخاب این سه مجموعه داده مبتنی بر معیارهای زیر انجام شد: نخست، تمرکز همه آن‌ها بر سرطان پستان است که با هدف این مطالعه همسو می‌باشد. دوم، وجود تعداد بالا از نمونه‌های سالم و سرطانی در هر مجموعه که قدرت آماری لازم برای شناسایی DEG‌ها را تقویت می‌کند. سوم، استفاده از پلتفرم Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 که صحت بالای در تولید داده‌ها داشته و امکان تجمیع مجموعه‌های مختلف را فراهم می‌کند.



شکل ۱: نمودار فعالیت پژوهشی این مطالعه

Fig 1: Research workflow of the study

شناسایی DEGs

مجموعه داده ها به طور مستقل از یکدیگر با استفاده از ابزار GEO2R (با R ورژن 4.2.2) در بخش GEO تحلیل شدند. DEGs های به دست آمده بر اساس $\log_2FC$ تنظیم شدند و از مقادیر p -value برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب استفاده شد. ژن هایی با تغییر در $\log_2FC$ بیشتر از ۱ و p -value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان DEG بین تومورها و بافت های نرمال در نظر گرفته شدند. برای کاهش تأثیر تفاوت های بین نمونه های رده سلولی و بافتی، هر دیتاست به طور جداگانه تحلیل شد و سپس DEGs های بدست آمده از هر دیتاست در نرم افزار Excel، مقایسه و ادغام شدند. در نهایت موارد تکراری حذف گردید.

تحلیل غنی سازی عملکردی ژن های با بیان متفاوت

تحلیل عملکرد هستی شناسی ژن (GO) و مسیر غنی سازی DEGs با استفاده از وبسایت ShinyGO به آدرس <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/> انجام شد. ShinyGO یک ابزار تحت وب برای تحلیل غنی سازی مجموعه ژن ها است که اجازه میدهد داده های ژنی را در بیش از ۴۲۰ گونه تحلیل کرده و ژن ها، مسیرهای زیستی و دسته بندی های عملکردی غنی شده را با استفاده از پایگاه های داده ای مانند KEGG و Ensembl شناسایی کنند. ShinyGO دارای قابلیت های مصورسازی تعاملی، از جمله نمودارهای مسیر زیستی و شبکه های برهم کنش پروتئین-پروتئین است (۸).

<https://gtexportal.org/> استفاده شد و نموداری از بیان این ژن‌ها ترسیم گردید. سپس، به کمک پایگاه داده‌ی UALCAN به آدرس <http://ualcan.path.uab.edu/> که مختص تحلیل داده‌های سرطانی است، نمودارهای جعبه‌ای (box plot) از تفاوت بیان این ژن‌ها در افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان پستان تهیه گردید (شکل ۸). این پایگاه داده اجازه می‌دهد تا نشانگرهای زیستی تاثیرگذار شناسایی شده و اطلاعات مفیدی در مورد ژن‌های مورد نظر و اهداف تحقیقاتی به دست آید (۱۰، ۱۱).

تحلیل بقای بیماران

پایگاه داده‌ی Kaplan-Meier plotter به آدرس <https://kmplot.com/> می‌تواند همبستگی بین بیان ژن‌ها و بقا را در بیش از ۳۵۰۰۰ نمونه از ۲۱ نوع تومور، تحلیل کند. لازم به ذکر است که این داده‌ها بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده از پایگاه‌های داده‌ی GEO، TCGA و EGA می‌باشند. هدف این ابزار، انجام متآنالیز براساس ارزیابی نشانگرهای زیستی است که به تصمیم‌گیری‌های بالینی بهتر، سیاست‌های مراقبت‌های بهداشتی و تخصیص منابع کمک می‌کند (۱۲). در نمودارها، بیماران مبتلا به سرطان پستان به دو گروه تقسیم‌بندی شدند که نشان‌دهنده‌ی تفاوت بقا بین گروه‌هایی با افزایش و کاهش بیان در ژن‌های مورد نظر است.

برهمکنش‌های بین ژن‌های هاب و داروها

شبکه‌ی برهم‌کنش ژن-دارو با استفاده از پایگاه داده‌ی Comparative Toxicogenomics Database (CTD) به آدرس <https://ctdbase.org/> برای داروها یا مولکول‌هایی که می‌توانند سطوح بیان mRNA و پروتئین ژن‌های هاب را تغییر دهند، ساخته شد (۱۳).

یافته‌ها

شناسایی DEGها

پس از تحلیل مجموعه داده‌های GSE65194،

تحلیل شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI)

برای شناسایی ژن‌های کلیدی در یک شبکه ژنی، از ابزار جستجوی <http://stitch.embl.de/> برای ساخت شبکه PPI ژن‌های با بیان متفاوت، بر اساس تعاملات شناخته‌شده و پیش‌بینی شده استفاده شد. با استفاده از این ابزار می‌توان برهم‌کنش‌های عملکردی بین پروتئین‌ها را تحلیل کرد. ابتدا، برهم‌کنش‌های DEGهای مشخص شده با امتیاز اطمینان ≤ 0.7 در پایگاه داده STITCH (نسخه ۵.۰) ایجاد شدند. این امتیاز اطمینان نشان‌دهنده‌ی احتمال بالای وجود برهم‌کنش معناداری بین یک پروتئین و یک لیگاند مانند دارو، مولکول کوچک، یون و پروتئین‌های دیگر است. این امتیاز ترکیبی از ادغام داده‌های تجربی و پیش‌بینی‌های محاسباتی به دست می‌آید. هرچه این امتیاز به ۱ نزدیک‌تر باشد، احتمال وجود برهم‌کنش بیشتر و قوی‌تر است. سپس، شبکه PPI با نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳.۹.۱) تصویرسازی شد و از افزونه Molecular Complex Detection (MCODE) برای شناسایی تعاملات مهم در این شبکه استفاده گردید. MCODE الگوریتمی در نرم‌افزار Cytoscape است که برای شناسایی شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و کمپلکس‌های زیستی مرتبط در شبکه‌های بزرگ استفاده می‌شود. الگوریتم، گره‌ها را براساس تراکم موضعی شبکه وزن‌دهی می‌کند که نمرات بالاتر نشان‌دهنده‌ی مرکزیت بیشتر در شبکه هستند. سپس، شبکه‌های کوچکتر با استفاده از گره‌های دارای وزن بالا و افزودن تدریجی گره‌های همسایه تشکیل می‌شوند. درنهایت، خوشه‌ها با فیلتر کردن یا افزودن گره‌ها براساس پارامترهای تعریف شده، اصلاح می‌شود. تنظیمات پیشرفته‌تر به صورت $\text{degree cutoff} = 2$ و $\text{Node Score Cutoff} = 0$ و $\text{K-Core} = 2$ تنظیم شدند. در این مرحله، ۲۰ ژنی که بیشترین تعامل را در شبکه اصلی داشتند، شناسایی شدند (۹).

تحلیل بیان ژن‌های با بیشترین برهم‌کنش در شبکه

برای بررسی فعالیت ژن‌ها در بافت‌ها و سلول‌های بدن انسان، از پایگاه داده‌ی GTEx Portal به آدرس

بافت های غیرسرطانی نشان دادند. فهرست کامل این ۵۹۹ ژن با بیان متفاوت در جدول ۱ ارائه شده است.

GSE45827 و GSE42568. تعداد ۵۹۹ DEG شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد، ۳۰۰ ژن افزایش بیان و ۲۹۹ ژن کاهش بیان در بافت های سرطانی نسبت به

جدول ۱: از مجموعه داده ها، ۵۹۹ DEG به دست آمد و تایید شد. این ژن ها شامل ۳۰۰ ژن با افزایش بیان و ۲۹۹ ژن با کاهش بیان در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال هستند.

table 1: From the dataset, 599 DEGs were obtained and validated. These genes include 300 genes with increased expression and 299 genes with decreased expression in tumor tissue compared to normal tissue.

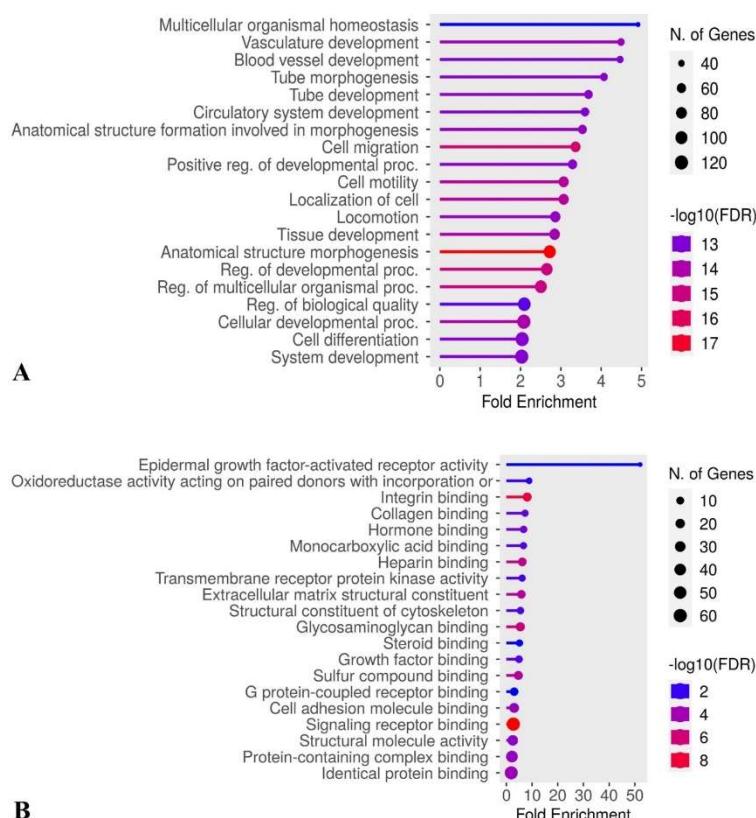
Expression change type	DEGs
LogFc (+)	CEACAM6, GPRC5A, GRB7, PPY, COMP, PLEKHF2, GALNT7, GALNT15, FOXA1, GPR160, POSTN, IL13RA1, MIEN1, BHLHE40, CCN4, KMO, ERBB2, TMEM97, CDH11, ASPN, LRRC15, DAZAP2, CTHRC1, COL1A1, CXXC1, SLC44A4, SRD5A3, CSNK2A2, MS4A7, MS4A4A, SLC39A6, SLC2A10, CPEB4, GREM1, EPPK1, PIP4K2A, FAP, CCNG2, CPD, HOMER2, GCH1, TMEM9B, CFL1, NQO1, SPTLC2, NREP, TLCD1, FBNI, TNFRSF12A, GADD45B, MICAL2, DUSP5, SPAG1, COPS8, CSNK1A1, DAAM1, MYO6, POLR3K, SERPINE1, SCARB2, YIPF5, SDR16C5, SP110, PMP22, PRR15, CDC42SE1, ERMP1, TMEM41B, FOLR1, VAMP3, CEACAM5, JAK1, GALNT10, ETNK1, RAB22A, RHOB, ORMDL3, ARHGD1B, KCTD5, CTSB, UBE2H, FN1, VAV3, RRM2, CXCL10, ANP32E, TOP2A, CDC20, ATAD2, PRC1, ASPM, SMC4, TPX2, COL11A1, UBE2T, CENPF, UBE2C, EIF5A, ENO1, ALYREF, KIF2C, NUSAP1, BIRC5, HSP90AB1, CDK1, S100P, S100A8, ACTB, TPD52, FAM83D, CCNB2, LAPTM4B, ESRP1, CCNB1, CXCL9, MELK, MAD2L1, TYMS, PRR11, YWHAZ, HORMAD1, CDKN3, ANLN, CKS2, UBE2S, TRIP13, P4HB, MMP1, CDCA7, STIP1, EZH2, VCAN, NUF2, COL10A1, SLC52A2, SPPI1, KIF4A, MSH6, AURKA, ZWINT, ATG5, APOBEC3B, CENPU, SLC7A5, INHBA, KIF11, CBX2, CEP55, BUB1, CXCR4, ECT2, FOXM1, CALU, ATP6V1A, MKI67, DSG2, CCNA2, SRSF1, BUB1B, RARRES1, PLAUR, TMEM165, DLGAP5, NDC80, UBXN4, ZIC1, KIF14, HMMR, PATL1, SEC61A1, CTSP1, TMEM30A, C1orf43, TMED2, TRAM1, PTP4A1, KIF20A, SQLE, CENPW, KIF23, COL12A1, STAT1, PPIF, IFI44L, LARP4B, GDI2, TOB1, BCL2A1, UHRF1, CDCA3, MTPAP, RAD51AP1, ZNF146, AGO2, FANCI, HACD3, MRPL42, M6PR, MCM10, EN1, KPNA2, SDHC, FEN1, RAP2B, VMP1, GJB2, UBE2N, NAA50, PTTG1, NOLC1, CENPE, CXCL11, PHF19, CCT2, SMC3, AURKB, PRPF4, TAGLN2, AKIRIN1, LAMP1, MMP11, PGK1, KDELR3, NCAPD2, RANBP9, SAE1, CTSS, SRGN, CSNK2A1, RAD21, GAPDH, HJURP, PRKDC, SUV39H2, CD46, SULF1, MCM4, RIT1, UHMK1, ACLY, S100A9, PSENEN, SETD5, FPR3, SPAG5, HSPH1, PLAUI, ME2, YWHAZ, MYBL1, CDCA5, NDC1, RPRD1A, E2F5, LSM4, GTSE1, CCNE2, SOX11, KLHDC7B, TSN, TWFI, TRIM59, CLDN3, TSEN15, ARFGEF1, MTFR1, GINS1, TIGAR, RHOA, RAB5A, MMP9, EML4, PDLIM5, RDH10, MAPK1, AMD1, RRM1, OAS1, GDE1, ZWILCH, MAPRE1, RAB1A, UBE2M, CARMIL1, LAMP3, ENSA, UGT8, SOAT1, CHAC2, SMC2, HSPD1, KIF15, PIGC, NDE1, LYZ, ERP27, GMFB, NSD2, FNDCl, PSRC1, PIQR, ADIPOQ, SFRP1, ECRG4, FABP4, SCARA5, RBP4, KRT14, ADH1B, GABRP, IRX1, NTRK2, ACACB, PLIN1, CHRDL1, SH3GL3, MYBPC1, CD36, ABCA8, PLIN4, TGFB3, GALNT16, SCGB3A1, RBP7, GPD1, OXTR, CD300LG, SOX10, SYNM, HOXA5, WIF1, COL6A6, BTNL9, ITIH5, TIMP4, CIDEA, F3, KRT5, ELF5, S100B, FMO2, FMO4, KRT15, PI15, CRYAB, KLHL13, ADAMTS5, ATP1A2, PLAC9, PCOLCE2, SCN4B, PPP1R14A, CAVIN2, MYH11, SEMA3G, GOS2, MAOA, CCL28, RELN, IGF1, ZBTB16, IL17RD, SORBS1, LRRN4CL, FXYD1, ZNF595, ACKR1, KIT, ID4, AKR1C1, DMD, GPIHBP1, TP63, THRSF, PDK4, ACVR1C, ROPN1B, GYG2, NPR1, TSHZ2, PAMR1, RSPO3, CLDN11, NDRG2, COL14A1, INMT, SCD5, AOC3, FCGBP, EBF1, ROPN1, CDKN1C, MIA, TMEM100, RNF150, LMOD1, TMEFF2, EDNRB, KLHL29, FHL1, CFH, FAM107A, PPP1R1A, EPAS1, FOXC1, SAMD5, CRISPLD1, ITGA7, GSTM5, CLDN8, DLK1, TRIM29, RAPGEF3, RBMS3, CDO1, TMTC1, CX3CL1, SOBP, IGFBP6, DGAT2, ANKRD35, GPAM, LMF1, ANK2, LAMB3, MEOX2, MAMDC2, ACTG2, RGMA, STOX2, PROM1, ITGA9, CNN1, CXCL14, CACHD1, APOD, JAM2, FABP7, TESC, LRP2, SOD3, ANPEP, CCDC69, TNS1, GNAL, AKAP12, LYVE1, SORBS2, HOXA3, BOC, TRIM4, ITM2A, SLC16A7, FIGN,
LogFc (-)	

EFEMP1, GPR146, LIFR, CDC5L, PID1, MEOX1, COX7A1, SLC25A27, PGM5, LAMA3, LAMA4, CAPN6, PEAR1, PDGFD, GPM6B, LTF, ANGPTL4, ACSM5, PCK1, LGR6, NES, AKR1C3, TM4SF18, SRPX, SYNPO2, GPC3, HSPB2, SLC4A4, ADRA2A, RUNX1T1, ENPP2, AK5, ACTA2, MOB3B, IGSF10, CIDEA, CAV1, CLDN5, PDE2A, BBOX1, CXCL2, FAXDC2, ADH1C, XDH, LIPE, PIP, SCGB2A2, MUCL1, SCGB1D2, AR, ADIRF, ERBB4, TFF3, ESR1, DCLK1, NOSTRIN, ABLIM3, SCUBE2, CLSTN2, PGR, ZCCHC24, STEAP4, C16orf89, LDB2, SLC7A2, ADAMTS15, AFF3, GFRA1, C1orf115, PRICKLE2, SEMA6D, NDN, NR2F1, MAST4, WLS, MGLL, MMRN2, CCDC80, ABI3BP, NFIA, FGF1, DCN, CPED1, ECM2, AMIGO2, KCNIP2, GAS7, CIRBP, SEMA5A, BCL2, AZGP1, EHD2, NTN4, LRRC17, PLA2R1, HSPA12B, ITGBL1, PARVA, NAV3, AQP1, LAMB2, LAMC1, AGTR1, AREG, VWF, CMBL, RNASE4, ROBO4, PTPRB, LIMS2, FZD4, KLB, PDE3B, C14orf180, DEFB132, SLC19A3, GLYAT, SPX, GPX3, MRAP, LGALS12, KLHL31, PPARG, ASPA, ADRB1, PALMD, SPTBN1, TMEM37, CAV2, SGCG, CPM, ACSL1, BHMT2, ANGPT1, DOCK11, DDR2, NPR3, CCDC3, ITGB1BP1, ALDH1A1, LVRN, MMD, TNMD, MYZAP, GPR34

تجزیه و تحلیل غنی سازی عملکردی DEGs

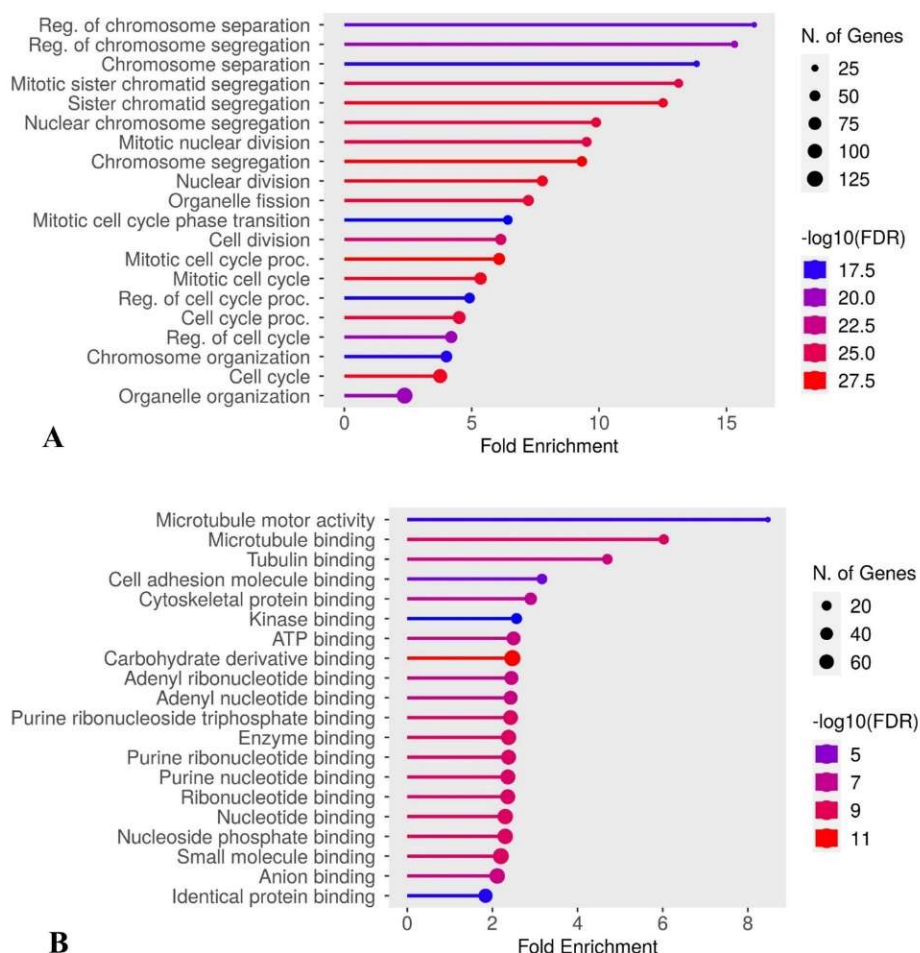
برای بررسی عملکردهای زیستی و مولکولی ۵۹۹ DEGs، آنالیز هستی‌شناسی این ژن‌ها در پایگاه داده ShinyGO انجام شد. نتایج حاکی از آن است که DEGs با کاهش بیان بیشتر، اکثراً به تنظیم مسیر هموستاز ارگانیسم چند

سلولی و فعالیت گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) مرتبط است (شکل ۲). غنی‌سازی عملکردی ژن‌های با بیان افزایش‌یافته عمدتاً در تنظیم جداسازی کروموزوم‌ها، همراه با نقش حرکتی ریزلوله‌ها (میکروتوبول‌ها) فعالیت دارند (شکل ۳).



شکل ۲: تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی DEGs با کاهش بیان در ShinyGO انجام شد. الف: عملکردهای بیولوژیکی ب: عملکرد مولکولی.

Figure 2: Functional enrichment analysis of DEGs with decreased expression was performed in ShinyGO. A: Biological functions B: Molecular function.



شکل ۳: آنالیز غنی سازی عملکردی DEG با افزایش بیان که در ShinyGO انجام شده است. الف: عملکردهای زیستی ب: عملکردهای مولکولی.

Figure 3: Functional enrichment analysis of DEGs with increased expression performed in ShinyGO. A: Biological functions B: Molecular functions.

شده است. این ژن ها بر اساس $\text{combined score} \geq 0.7$ انتخاب شدند. انتخاب این حدآستانه به دلیل ایجاد تعادل بین دقت و حساسیت است. امتیازهای بالاتر از ۰/۷ معمولاً نشان دهنده ی برهمکنش های قابل اعتماد و با کیفیت بالا هستند، در حالی که امتیازهای پایین تر ممکن است شامل نویز یا برهمکنش های ضعیف تر باشند.

در ادامه، آنالیزهای پایگاه داده ShinyGO نشان داد که DEG ها عمدتاً در مسیرهایی که در جدول ۲ فهرست شده اند، غنی شده اند.

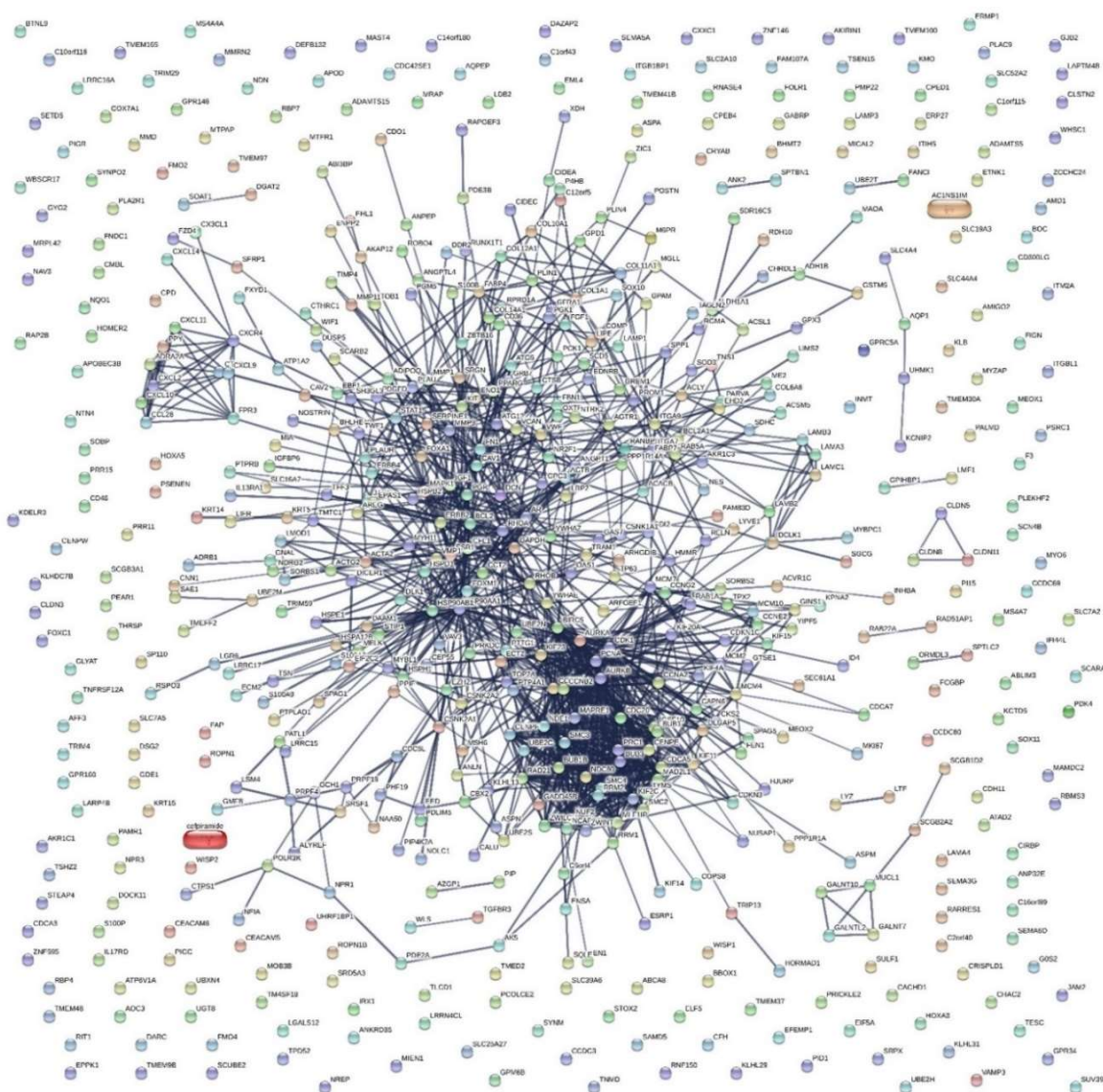
آنالیز شبکه پروتئین-پروتئین

با استفاده از پایگاه داده ی STITCH، شبکه ای از تعاملات DEG رسم شد که به طور کامل در شکل ۴ نشان داده

جدول 2: آنالیز غنی‌سازی مسیرهای KEGG مربوط به DEG‌های شناسایی شده. مسیرهای عملکردی معنی‌دار مرتبط با تمام DEG‌هایی که مقدار p -value کمتر از ۰/۰۵ دارند، در جدول فهرست شده‌اند.

table 2: Enrichment analysis of KEGG pathways associated with identified DEGs. Significant functional pathways associated with all DEGs with p -values less than 0.05 are listed in the table.

Expression change type	Pathway	p -value	Number of Genes	
UP	CELL CYCLE	6.3e-13	22	<i>GADD45B/CDC20/CDK1/CCNB2/CCNB1/MA D2L1/YWHAZ/TRIP13/BUB1/CCNA2/BUB1B/ NDC80/PTTG1/SMC3/AURKB/RAD21/PRKDC /MCM4/YWHAZ/CDCA5/E2F5/CCNE2</i>
	OOCYTE MEIOSIS	7.5e-07	14	<i>GADD45B/CDC20/CDK1/CCNB2/CCNB1/MA D2L1/YWHAZ/TRIP13/BUB1/CCNA2/BUB1B/ NDC80/PTTG1/SMC3/AURKB/RAD21/PRKDC /MCM4/YWHAZ/CDCA5/E2F5/CCNE2</i>
	P53 SIGNALING PATHWAY	1.9e-05	9	<i>GADD45B/CDC20/CDK1/CCNB2/CCNB1/MA D2L1/YWHAZ/TRIP13/BUB1/CCNA2/BUB1B/ NDC80/PTTG1/SMC3/AURKB/RAD21/PRKDC /MCM4/YWHAZ/CDCA5/E2F5/CCNE2</i>
	PROGESTERONE-MEDIATED OOCYTE MATURATION	7.9e-05	10	<i>GADD45B/CDC20/CDK1/CCNB2/CCNB1/MA D2L1/YWHAZ/TRIP13/BUB1/CCNA2/BUB1B/ NDC80/PTTG1/SMC3/AURKB/RAD21/PRKDC /MCM4/YWHAZ/CDCA5/E2F5/CCNE2</i>
	IL-17 SIGNALING PATHWAY	6.5e-04	8	<i>GADD45B/CDC20/CDK1/CCNB2/CCNB1/MA D2L1/YWHAZ/TRIP13/BUB1/CCNA2/BUB1B/ NDC80/PTTG1/SMC3/AURKB/RAD21/PRKDC /MCM4/YWHAZ/CDCA5/E2F5/CCNE2</i>
	PPAR SIGNALING PATHWAY	7.0e-09	12	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>
	ECM-RECEPTOR INTERACTION	4.0e-07	11	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>
DOWN	FOCAL ADHESION	5.2e-07	16	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>
	PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY	5.3e-06	20	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>
	REGULATION OF LIPOLYSIS IN ADIPOCYTES	8.1e-06	8	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>
	AMPK SIGNALING PATHWAY	2.9e-04	9	<i>ADIPOQ/FABP4/PLIN1/CD36/PLIN4/SORBS1/ SCD5/FABP7/ANGPTL4/PCK1/PPARG/ACSL1</i>

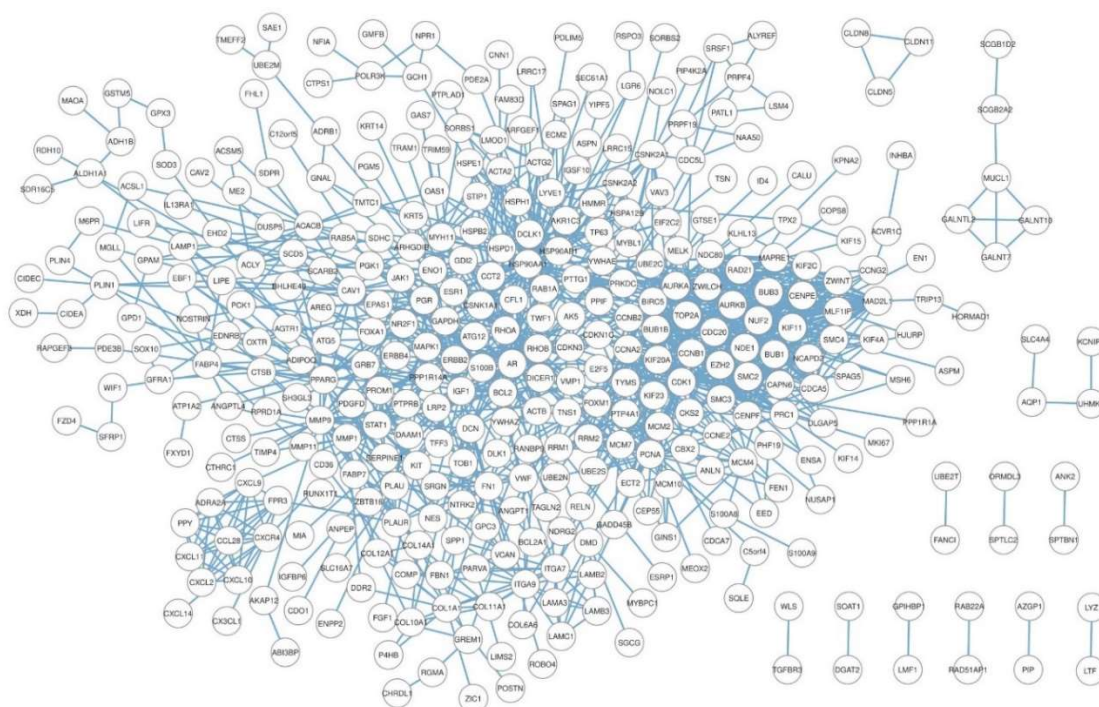


شکل ۴: شبکه ارتباطی بین DEGs که نشان دهنده خوشه های ژنی مختلف است و توسط پایگاه داده STITCH ساخته شده است.

Figure 4: The connection network between DEGs representing different gene clusters, constructed by the STITCH database.

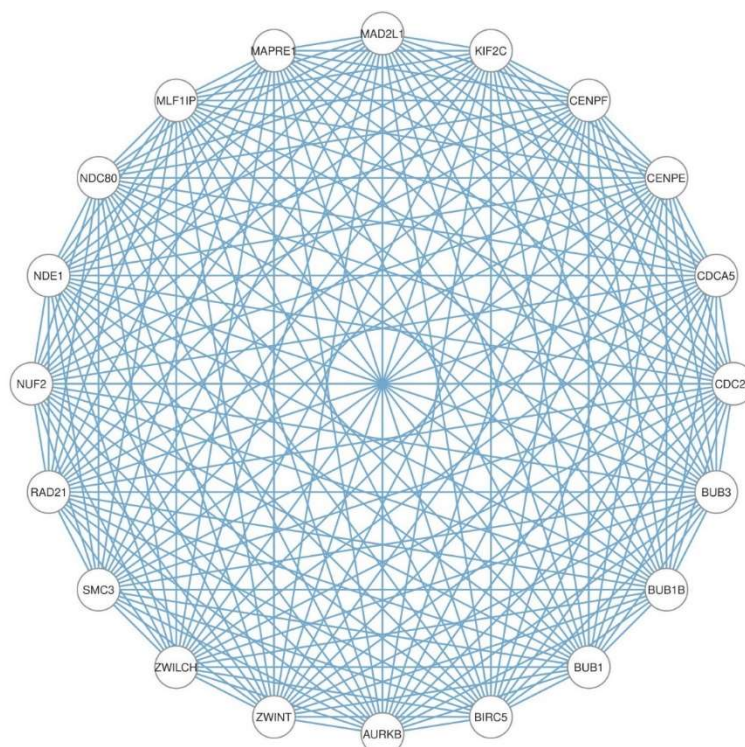
خوشه در مقایسه با شبکه اطراف آن محاسبه می شود. این امتیاز بین ۰ تا ۱ است، و هرچه قدر بالاتر باشد، نشان دهنده تراکم بیشتر اتصالات است. به طور معمول، امتیاز ۰.۵ یا بالاتر بسیار معنادار تلقی می شود، چرا که نشان دهنده خوشه هایی با اتصالات بسیار متراکم و محکم است و احتمالاً نمایان گر کمپلکس های زیستی عملکردی مهم هستند.

سپس آنالیز PPI این DEG ها در Cytoscape انجام شد که این شبکه شامل گره ها و تعاملات در شکل ۵ قابل مشاهده است. با استفاده از افزونه MCODE، امتیاز ≤ 0.5 در نظر گرفته شد. سپس ژن هایی که بیشترین تعامل را در این شبکه داشتند به عنوان یک خوشه ژنی جدا شدند و این خوشه به عنوان یک شبکه مستقل در شکل ۶ ترسیم شد. این امتیاز معیاری برای سنجش تراکم یک خوشه است که بر اساس توپولوژی شبکه و میزان اتصال های درون



شکل ۵: ترسیم شبکه‌ی برهمکنش پروتئین-پروتئین DEGs با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. خوشه‌های ژنی کلیدی با استفاده از افزونه MCODE و با امتیاز ۵ یا بالاتر شناسایی شدند.

Figure 5: Protein-protein interaction network of DEGs was drawn using Cytoscape software. Key gene clusters were identified using the MCODE plugin with a score of 5 or higher.

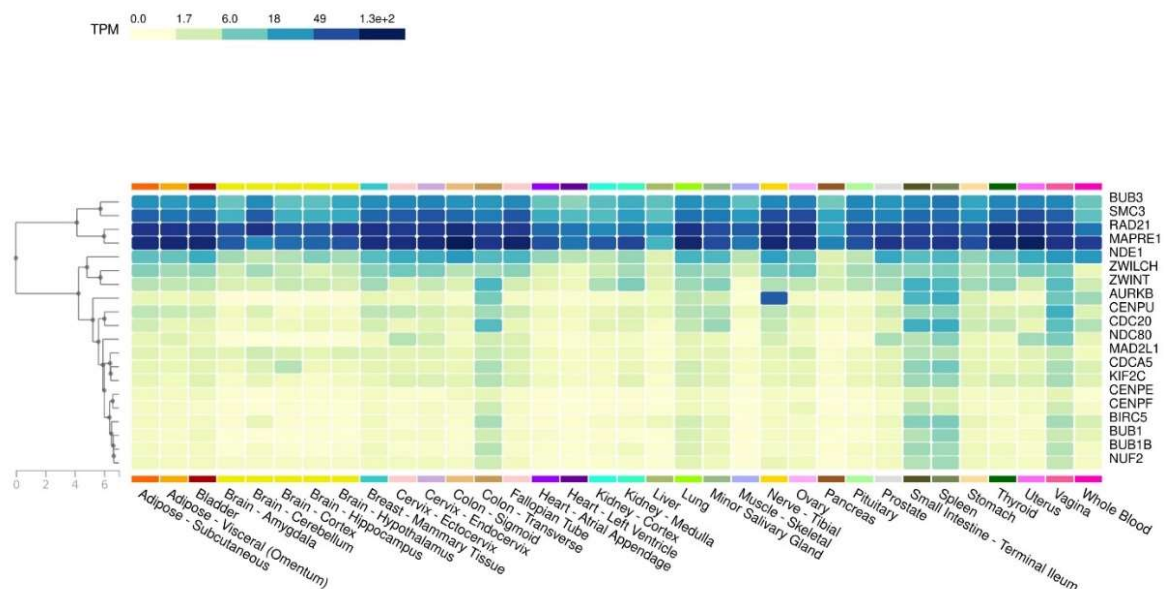


شکل ۶: این شبکه خوشه ژن توسط نرم‌افزار Cytoscape از شبکه اصلی جدا شد. این ژن‌ها به‌طور قابل توجهی با هم تعامل داشتند و از نظر آماری معنادار بودند.

Figure 6: This gene cluster network was separated from the main network by Cytoscape software. These genes significantly interacted with each other and were statistically significant.

در بافت های سالم بدن انسان رسم شد (شکل ۷). هدف، شناسایی ژن هایی بود که معمولاً در بافت پستان بیان معناداری دارند.

تحلیل بیان ژن هایی با بیشترین تعامل در شبکه ابتدا، بیان ژن های با تعامل بالا در شبکه اصلی، در پایگاه داده GTEx Portal بررسی شد و نمودار حرارتی بیان آنها

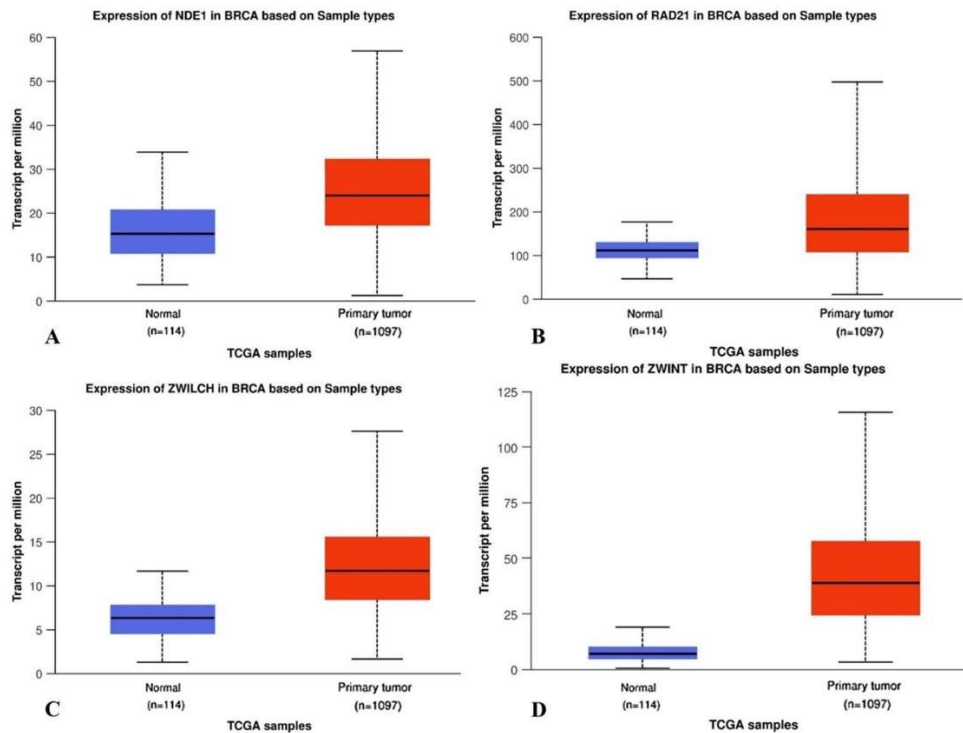


شکل ۷: بیان ژن های با تعاملات بالا در شبکه ی اصلی در سلول ها و بافت های مختلف به دست آمده از پایگاه داده GTEx. Portal هفت ژن اول همگی بیان بالایی در بافت پستان دارند.

Figure 7: Expression of genes with high interactions in the main network in different cells and tissues obtained from the GTEx Portal database. The first seven genes are all highly expressed in breast tissue.

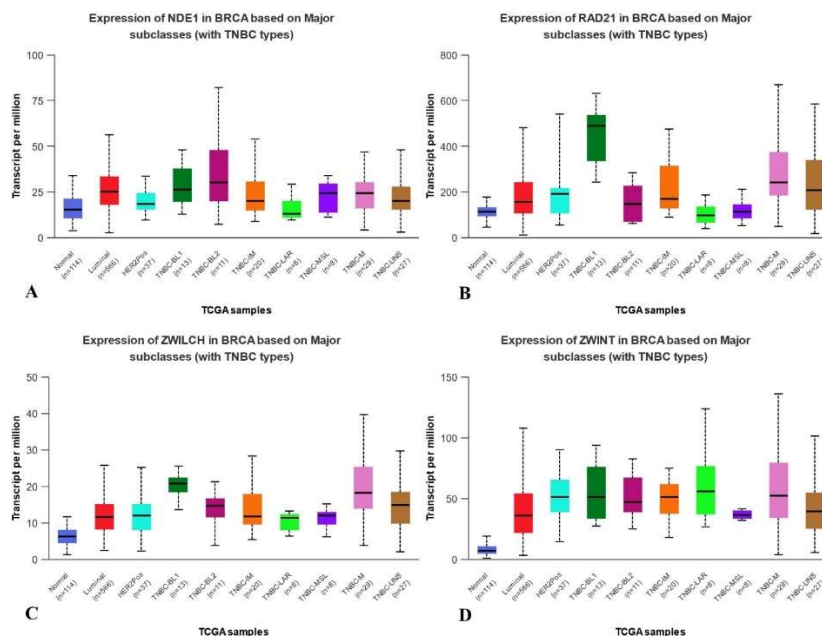
جدا شده و در شکل ۸ و شکل ۹ مشخص و به عنوان ژن های هاب در نظر گرفته شدند. این چهار ژن با توجه به نتایج بدست آمده از دیتابیس های GTEx و UALCAN از مابقی ژن ها غریب تر شدند.

در مرحله بعد، تفاوت سطح بیان این هفت ژن در نمونه های بافت تومور و بافت سالم پستان با استفاده از UALCAN اندازه گیری شد و نمودارهای جعبه ای آن ترسیم گردید. چهار ژن *ZWINT* و *ZWILCH*، *NDE1*، *RAD21* که بیشترین تفاوت بیان را در حالت توموری و سالم داشتند،



شکل ۸: نمودار جعبه‌ای تفاوت سطح بیان ژن در بافت تومور و طبیعی در پایگاه داده UALCAN انجام شد. A: *NDE1* B: *RAD21* C: *ZWILCH* D: *ZWINT* همه *p*-Values معنی‌دار بودند ($<1E-12$).

Figure 8: Box plot of the difference in gene expression levels in tumor and normal tissue was performed in the UALCAN database. A: *NDE1* B: *RAD21* C: *ZWILCH* D: *ZWINT* All *p*-Values were significant ($<1E-12$).



شکل ۹: آنالیز تفاوت سطح بیان ژن‌های Hub در سرطان‌های مختلف برای همه انواع تومورها از نظر بافت‌شناسی که در سایت UALCAN صورت گرفت. در تمامی نمودارهای جعبه‌ای، تفاوت معنی‌داری در سطح بیان ژن‌ها مشاهده شد. A: *NDE1*،

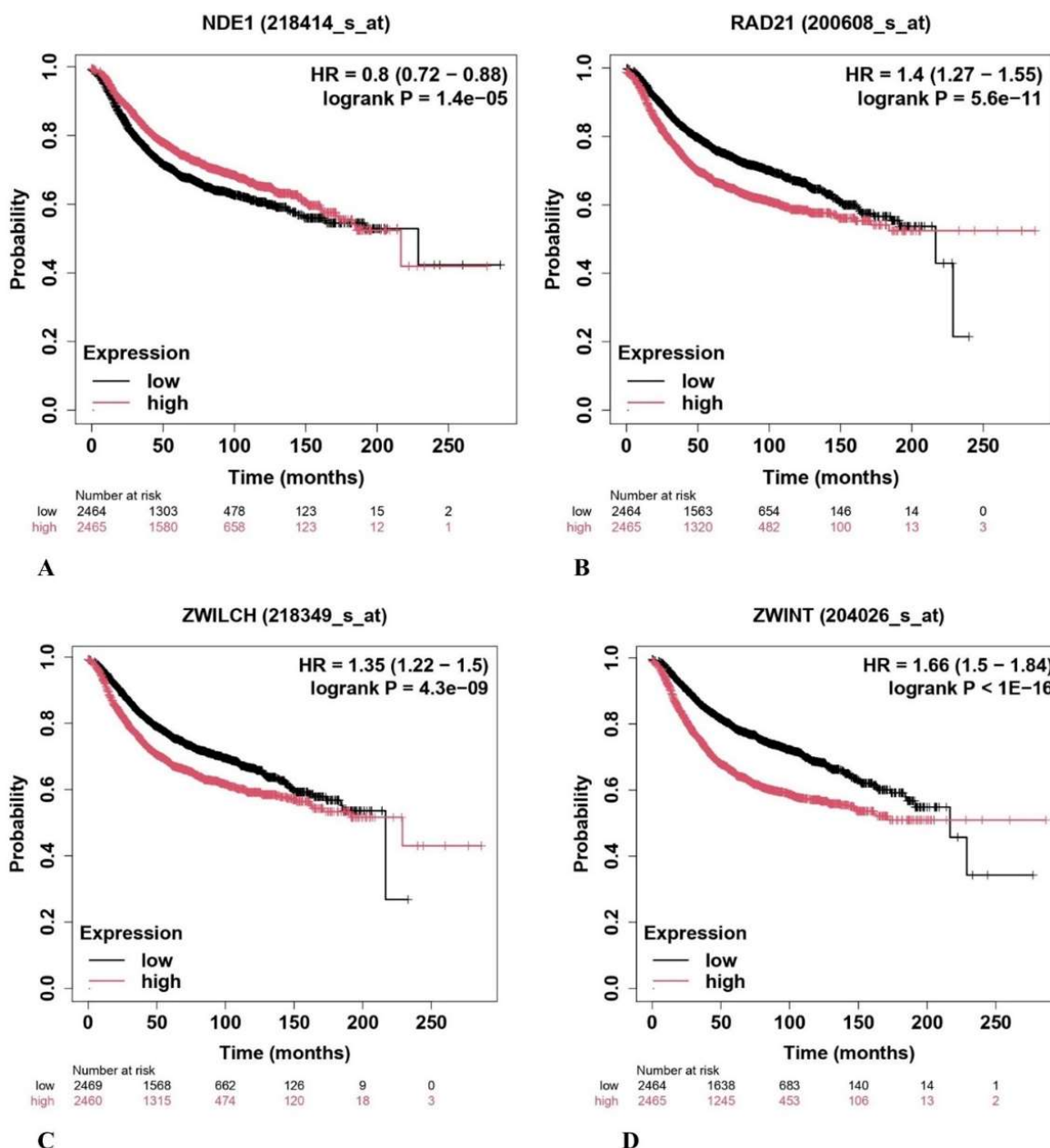
ZWINT D و *ZWILCH* C *RAD21* B

Figure 9: Analysis of the difference in the expression levels of Hub genes in different cancers for all tumor types in terms of histology, which was performed on the UALCAN website. In all box plots, a significant difference in the expression levels of genes was observed. A: *NDE1*, B: *RAD21*, C: *ZWILCH* and D: *ZWINT*

استروژن و تمام انواع تومورها) انجام شد. نتیجه نشان داد که بیان غیرطبیعی این ژن ها با بقای کلی (OS) ضعیف تر در بیماران مبتلا به سرطان پستان همراه است (شکل ۱۰). تخمین تعداد ماه های بقای بیماران در جدول ۳ فهرست شده است.

آنالیز بقای بیماران

تحلیل پیش آگهی بقا در بیماران دارای جهش در ژن های *ZWINT* و *ZWILCH*، *RAD21*، *NDE1* در پایگاه داده Kaplan-Meie plotter بررسی و تحلیل بر روی داده های ۴۹۲۹ بیمار (در تمام انواع وضعیت گیرنده



شکل ۹: منحنی های بقای Kaplan-Meier ژن های Hub در بیماران مبتلا به سرطان پستان با بیان غیر معمول که نشان دهنده تغییر در بقای کلی بیماران است.

Figure 10: Kaplan-Meier survival curves of Hub genes in breast cancer patients with atypical expression indicating a change in overall survival of patients.

جدول ۳: تفاوت میزان بقای بیماران به دلیل کم و زیاد شدن بیان ژن‌های هاب در دیتابیس Kaplan-Meie plotter
 Table 3: Differences in patient survival rates due to increased and decreased expression of hub genes in the Kaplan-Meie plotter database.

Gene names	Low expression group (month)	High expression group (month)
<i>NDE1</i>	228.85	216.66
<i>RAD21</i>	69	38
<i>ZWILCH</i>	216.66	228.85
<i>ZWINT</i>	80.4	35

تعامل ژن‌های هاب و داروها
 درمانی سرطان، تعاملات ژن-دارو با استفاده از پایگاه داده
 برای بررسی تعامل بین ژن هاب، مواد شیمیایی و داروهای CTD در جدول ۴ فهرست شده است.

جدول ۴: دارو ها و مواد شیمیایی تاثیرگذار بر ژن های هاب شناسایی شده.
 Table 4: Drugs and chemicals affecting identified hub genes.

Inhibitor drugs	Genes
Doxorubicin	<i>NDE1</i>
Trovafloxacin	
Valproic Acid	
Dexamethasone	<i>RAD21</i>
Trovafloxacin	
Valproic Acid	
Aristolochic acid I	<i>ZWILCH</i>
Azathioprine	
Ivermectin	
Azathioprine	<i>ZWINT</i>
Dronabinol	
Vancomycin	

غیرسرطانی، با توجه به p-value ذکر شده، بیان متفاوتی داشتند و بیان بیش از حد آن‌ها با بقای کلی ضعیف‌تر و معنی‌داری در بیماران مبتلا به سرطان پستان همراه بود، که نشان‌دهنده آنکوژن بودن این ژن‌های هاب است (۱۴، ۱۵).

ژن *NDE1* (Nuclear Distribution Gene E Homolog 1) در زیست‌شناسی سرطان پستان، به ویژه در

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، از طریق آنالیز مجموعه داده‌های سرطان پستان، می‌توان به دیدگاه ارزشمندی در مورد الگوهای بیان ژن در سرطان پستان در مقیاس ژنومی، شامل ۵۹۹ DEG و ۴ ژن هاب مرتبط با تومورزایی و پیشرفت سرطان پستان، دست یافت. این چهار ژن هاب در بافت‌های سرطانی پستان در مقایسه با بافت‌های طبیعی و

بیان *ZWINT* با فنوتیپ های تهاجمی تر تومور و پیش آگهی ضعیف همراه است. همچنین ممکن است بر حساسیت سلول های سرطان پستان به شیمی درمانی تأثیر بگذارد و به مقاومت در برابر درمان کمک کند (۱۹).

در ابتدای این مطالعه، شبکه های ژنی ایجاد شدند و نشانگرهای زیستی بالقوه ای برای تشخیص و پیش آگهی سرطان پستان شناسایی گردیدند. سپس، تأثیر عوامل پیش آگهی بالینی پاتولوژیک بر بیان ژن های هاب، مانند مراحل تومور و زیرگروه های سرطان پستان، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، تعاملات بین چهار ژن کلیدی و داروهای ضدسرطان مشخص شد که می تواند در یافتن نشانگرهای زیستی و اهداف جدید برای توسعه داروهای سرطان پستان کمک شایانی کند. به طور کلی، یافته های حاصل از تحلیل شبکه تعامل ژن-دارو، اطلاعات ارزشمندی در حوزه سرطان شناسی ارائه می دهد که پتانسیل پیشرفت در شناسایی ژن های هدف و مراقبت از بیمار را مشخص می کند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که چهار ژن هاب *NDE1*، *RAD21*، *ZWILCH* و *ZWINT* به عنوان ژن های کلیدی در مسیرهای چرخه سلولی، *P53*، *PI3K-Akt* و *AMPK* می باشد. نقش *RAD21* در تنظیم چرخه سلولی و عملکرد آن به عنوان یک هدف درمانی در مطالعات قبلی تأکید شده است (۱۷). همچنین، *NDE1* به عنوان یک ژن دارای ارتباطات قوی در مکانیزم های سیگنال دهی سرطان شناسایی شده است (۲۰). *ZWILCH* و *ZWINT* نیز در مطالعات قبلی به عنوان ژن هایی که با پیشرفت تومور مرتبط هستند، عنوان شده اند (۲۱، ۲۳). علاوه بر این، تحقیقات در مورد مسیرهای *PI3K-Akt* و *AMPK* نیز اهمیت این مسیرها را در تنظیم رشد و بقای سلولی و نقش آن ها را در سرطان پستان تأیید کرده اند و اختلال در این مسیرها می تواند به رشد غیرقابل کنترل سلول های سرطانی منجر شود (۲۳). این نتایج، نقش این ژن ها را به عنوان نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی جدید تقویت می کند. با توجه به داده های حاصل از این مطالعه و دیگر تحقیقات موجود،

تقسیم سلولی و پایداری ژنومی، نقشی حیاتی ایفا می کند و چرخه سلولی و دینامیک میکروتوبول ها را که برای جداسازی صحیح کروموزوم ها ضروری هستند، تنظیم می کند. تغییرات در سطح بیان *NDE1* با ویژگی های تهاجمی تومور و پیش آگهی ضعیف بیمار مرتبط است. به عنوان مثال، بیان بالای *NDE1* ممکن است با مقاومت به شیمی درمانی، به ویژه در زیرگروه های تهاجمی سرطان پستان مانند سرطان پستان سه گانه منفی مرتبط باشد. این مقاومت می تواند منجر به شکست درمان و عود بیماری شود (۱۶).

ژن *RAD21* به دلیل نقش کلیدی در ترمیم DNA و تنظیم چرخه سلولی به عنوان جزئی از کمپلکس کوهزین، در سرطان پستان اهمیت دارد. افزایش بیان *RAD21* در رده های سلولی سرطان پستان مشاهده شده است که به رشد و تکثیر تومور کمک می کند. بیان بیش از حد آن ممکن است منجر به افزایش مقاومت به شیمی درمانی نیز شود، زیرا مطالعات نشان می دهند که کاهش بیان *RAD21* حساسیت به عوامل آسیب رسان به DNA را افزایش می دهد. علاوه بر این، مطالعات ژنتیکی، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) را در *RAD21* شناسایی کرده اند که با استعداد ابتلا به سرطان پستان مرتبط هستند و نقش آن را به عنوان یک عامل خطر بالقوه برجسته می سازد (۱۷).

براساس دانش موجود، *ZWILCH* در تنظیم تقسیم سلولی و بخشی از سرهمبندی دوک میتوزی نقش دارد. اختلال در عملکرد آن می تواند منجر به ناپایداری کروموزومی شود که از ویژگی های بسیاری از سرطان ها، از جمله سرطان پستان است. در تنظیم تقسیم سلولی، *ZWILCH* نقش مهمی در تضمین جداسازی صحیح کروموزوم ها در طول میتوز ایفا کرده که ناهنجاری ها در این فرآیند می توانند در تومورزایی نقش داشته باشند (۱۸).

ژن *ZWINT* (*ZW10 Interacting Protein*) به ویژه برای تنظیم چرخه سلولی و حفظ پایداری ژنومی اهمیت داشته و نقش مهمی در سرطان پستان ایفا می کند. افزایش

آماري ($p\text{-Value} < 0.05$) آن با پیامدهای بالینی نامطلوب، نظیر بقای پایین، متاستاز و مقاومت به درمان، نقش آن‌ها را به‌عنوان نشانگرهای زیستی پیش‌آگهی بالقوه برجسته می‌سازد. این ژن‌های هاب در مسیرهای سیگنالینگ حیاتی سلولی، از جمله چرخه سلولی، P53، PI3K-Akt و AMPK، نقش کلیدی ایفا می‌کنند. این یافته‌ها با مطالعات پیشین که به‌طور مجزا به بررسی نقش برخی از این ژن‌ها در سرطان پستان پرداخته‌اند، مطابقت دارد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که مهار فعالیت این ژن‌های هاب می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی درمانی موثر در سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، اعتبارسنجی بالینی این یافته‌ها با استفاده از روش‌های *in vivo* و *in vitro* و نیز بررسی کارایی این ژن‌ها به‌عنوان اهداف درمانی در کارآزمایی‌های بالینی ضروری است.

تأییدیه اخلاقی

مطالعه حاضر براساس تحلیل ثانویه مجموعه داده‌های عموم از پایگاه داده GEO انجام شده است. این مجموعه داده‌ها فاقد هرگونه اطلاعات شناسایی بیمار بوده و به‌صورت ناشناس در دسترس عموم قرار گرفته‌اند. لذا، دریافت کد اخلاق جدید برای این پژوهش ضروری نیست.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تضاد منافی ندارند.

می‌توان نتیجه گرفت که برای بررسی مکانیزم‌های دقیق این ژن‌ها در سرطان پستان و پتانسیل کاربردی آن‌ها در درمان، به مطالعات بیشتر نیاز است. محدودیت‌های این مطالعه‌ی نیز باید بیان شود. در ابتدا، هنگام تجزیه و تحلیل DEGها، به‌دلیل پیچیدگی داده‌ها در این مطالعه، در نظر گرفتن برخی عوامل کلیدی مانند سن، نژاد، منطقه جغرافیایی و همچنین مرحله‌بندی تومور و طبقه‌بندی بیمار دشوار است. علاوه‌براین، براساس نتایج، هر چهار ژن کلیدی در سرطان پستان بسیار تأثیرگذار هستند، اما مکانیسم دقیق آن‌ها مشخص نیست، بنابراین برای یافتن اساس بیولوژیکی به شواهد بیشتری نیاز است. درنهایت، این مطالعه بر تجزیه و تحلیل سطوح بیان و عملکرد چهار ژن هاب تمرکز دارد، و اینکه آیا این ژن‌های هاب می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی مورد استفاده قرار گیرند یا می‌توانند دقت و اختصاصی بودن تشخیص سرطان پستان را بهبود بخشند، نیاز به تحقیقات بیشتری مانند مطالعات *in vivo* دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه با بهره‌گیری از رویکرد بیوانفورماتیک جامع و مبتنی بر آنالیز داده‌های منبع (مانند GEO، UALCAN و ...) شبکه‌ای متشکل از ۵۹۹ DEG را در سرطان پستان آشکار ساخت و چهار ژن کلیدی، *NDE1*، *RAD21*، *ZWILCH*، *ZWINT* را به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم در تومورزایی و پیشرفت این بیماری معرفی می‌کند. بیان بالای این ژن‌ها در بافت‌های سرطانی و همبستگی معنی‌دار

References

1. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2019;151-64.
2. Wang S, Shang P, Yao G, Ye C, Chen L, Hu X. A genomic and transcriptomic study toward breast cancer. *Frontiers in Genetics*. 2022;13:989565.
3. Johnson KS, Conant EF, Soo MS. Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists. *Journal of Breast Imaging*. 2021;3(1):12-24.
4. Cuong DM, Van Ngoc B. Identification of hub genes and drug-gene interactions for targeted breast cancer treatment by integrated bioinformatics analysis. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 2023;21(1):21-34.
5. Gruosso T, Mieulet V, Cardon M, Bourachot B, Kieffer Y, Devun F, et al. Chronic

- oxidative stress promotes H2AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(5):527-49.
6. Maire V, Némati F, Richardson M, Vincent-Salomon A, Tesson B, Rigail G, et al. Polo-like Kinase 1: A Potential Therapeutic Option in Combination with Conventional Chemotherapy for the Management of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*. 2013;73(2):813-23.
7. Clarke C, Madden SF, Doolan P, Aherne ST, Joyce H, O'Driscoll L, et al. Correlating transcriptional networks to breast cancer survival: a large-scale coexpression analysis. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2300-8.
8. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 2020;36(8):2628-9.
9. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
10. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022;25:18-27.
11. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BV, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*. 2017;19(8):649-58.
12. Györfy B. Integrated analysis of public datasets for the discovery and validation of survival-associated genes in solid tumors. *The Innovation*. 2024;5(3).
13. Davis AP, Wieggers TC, Johnson RJ, Sciaky D, Wieggers J, Mattingly CJ. Comparative toxicogenomics database (CTD): update 2023. *Nucleic acids research*. 2023;51(D1):D1257-D62.
14. Shahmoradi M, Fazilat A, Ghaderi-Zefrehei M, Ardalan A, Bigdeli A, Nafissi N, et al. Unveiling Recurrence Patterns: Analyzing Predictive Risk Factors for Breast Cancer Recurrence after Surgery. *Cancer Informatics*. 2024;23:11769351241297633.
15. Amiri R, Nabi PN, Fazilat A, Roshani F, Kararoudi AN, Hemmati-Dinarvand M, et al. Crosstalk between miRNAs and signaling pathways in the development of drug resistance in breast cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2024.
16. Ren Q, Khoo WH, Corr AP, Phan TG, Croucher PI, Stewart SA. Gene expression predicts dormant metastatic breast cancer cell phenotype. *Breast Cancer Research*. 2022;24(1):10.
17. Di Nardo M, Pallotta MM, Musio A. The multifaceted roles of cohesin in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2022;41(1):96.
18. Aslan M, Hsu E-C, Garcia-Marques FJ, Bermudez A, Liu S, Shen M, et al. Oncogene-mediated metabolic gene signature predicts breast cancer outcome. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):141.
19. Li H-N, Zheng W-H, Du Y-Y, Wang G, Dong M-L, Yang Z-F, et al. ZW10 interacting kinetochore protein may serve as a prognostic biomarker for human breast cancer: An integrated bioinformatics analysis. *Oncology Letters*. 2020;19(3):2163-74.
20. Wang P, Ning J, Chen W, Zou F, Yu W, Rao T, et al. Comprehensive analysis indicated that NDE1 is a potential biomarker for pan-cancer and promotes bladder cancer progression. *Cancer Medicine*. 2024;13(5):e6931.
21. Blatkiewicz M, Kamiński K, Szyszka M, Al-Shakarchi Z, Olechnowicz A, Stelcer E, et al. The Enhanced Expression of ZWILCH Predicts Poor Survival of Adrenocortical Carcinoma Patients. *Biomedicines*. 2023;11(4):1233.
22. Lin T, Zhang Y, Lin Z, Peng L. ZWINT is a promising therapeutic biomarker associated with the immune microenvironment of hepatocellular carcinoma. *International Journal of General Medicine*. 2021:7487-501.
23. Lin Y, Kuang W, Wu B, Xie C, Liu C, Tu Z. IL-12 induces autophagy in human breast cancer cells through AMPK and the PI3K/Akt pathway. *Molecular medicine reports*. 2017;16(4):4113-8.