

## ■ РЕФЕРАТИ СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ В «CYTOLOGY AND GENETICS», № 6, 2020 р.

### IDENTIFICATION AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MICRORNA IN RESPONSE TO ELEVATED PHOSPHOLIPASE C $\gamma$ EXPRESSION IN LIVER RH 35 CARCINOMA CELLS

X. CHEN\*, X. ZHU, Zh. WEI, Q. LV

Animal Science and Technology School, Henan University of Science  
and Technology, 263# Kaiyuan Avenue, Luoyang 471023, China

E-mail: cxgtzr2012@163.com

*Our study has primarily shown the positive effect of PLC $\gamma$ 2 on liver tumor cell proliferation, but the molecular basis for its function remains elusive. miRNAs have been widely accepted as important modulators of various cellular activities. This study attempts to characterize the global influence of PLC $\gamma$ 2 on miRNA expressions in liver cancer RH35 cells. Firstly, the recombinant adenovirus AdPLC $\gamma$ 2 was infected into the cells. High-throughput sequencing technology was applied to measure miRNA expressions in PLC $\gamma$ 2overexpressing cells. Moreover, the target genes and signaling pathways modulated by PLC $\gamma$ 2specific miRNAs were identified using target prediction program, GO annotation and KEGG analysis. As a result, totally 246 known and 1075 novel candidate miRNAs were identified, among which 34 known and 191 novel miRNAs exhibited  $\geq 2$ fold changes in the AdPLC $\gamma$ 2-infected cells. Correspondingly, 6985 target genes of above 225 differently-expressed miRNAs were predicted, mainly involved in Hippo signaling, Wnt signaling etc., and responsible for tumor development, cell proliferation, apoptosis, migration, lipid metabolism and so on. In aggregate, PLC $\gamma$ 2 induces the significant alterations in miRNA expression, thus providing mechanistic insights into tumorigenesis mediated by PLC $\gamma$ 2, and maybe offers some clues on identifying potential candidates for controlling liver cancer cell growth.*

**Key words:** Phospholipase C $\gamma$ 2, liver carcinoma, high-throughput sequencing, microRNA expression, target prediction.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ І ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА  
ЕКСПРЕСІЯ МІКРОРНК У ВІДПОВІДЬ НА  
ПІДВИЩЕНУ ЕКСПРЕСІЮ ФОСФОЛІПАЗИ C $\gamma$   
У КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ ПЕЧІНКИ RH-35

© X. CHEN, X. ZHU, Zh. WEI, Q. LV, 2020

В основному наше дослідження продемонструвало позитивний вплив PLC $\gamma$ 2 на проліферацію клітин печінкової пухлини, однак молекулярні основи цієї функції залишаються невиявленими. міРНК – це загальновізанні важливі модулятори різної клітинної активності. Метою цього дослідження було охарактеризувати загальний вплив PLC $\gamma$ 2 на експресію міРНК у злоякісних клітинах RH35. Спочатку клітини були інфіковані рекомбінантним аденовірусом AdPLC $\gamma$ 2. Технологію секвенування з високою пропускну здатністю застосували для вимірювання експресії міРНК у клітинах з надмірною експресією PLC $\gamma$ 2. Окрім того, цільові гени та сигнальні шляхи, модульовані PLC $\gamma$ 2специфічними міРНК, ідентифікували за допомогою програми цільового прогнозування, анотації генної онтології (GO) та аналізу за Енциклопедією генів і геномів Інституту хімічних досліджень в Кіото (KEGG). В результаті було ідентифіковано всього 246 відомих і 1075 нових кандидатних міРНК, з-поміж яких 34 відомих і 191 нових міРНК продемонстрували  $\geq 2$ кратні зміни у клітинах, інфікованих AdPLC $\gamma$ 2. Відповідно, було передбачено 6985 цільових гени вищевказаних 225 по-різному експресованих міРНК, які в основному залучені до сигнальних шляхів Hippo, Wnt, тощо, та відповідають за розвиток пухлини, проліферацію клітин, апоптоз, міграцію, метаболізм ліпідів, тощо. Загалом, PLC $\gamma$ 2 індукує значні зміни в експресії міРНК, таким чином забезпечуючи механістичне уявлення про онкогенез за сприяння PLC $\gamma$ 2, і, можливо, пропонуючи деякі підказки до ідентифікації потенційних кандидатів для контролю росту клітин раку печінки.

**Ключові слова:** фосфоліпаза C $\gamma$ 2, карцинома печінки, секвенування з високою пропускну здатністю, експресія мікроРНК, цільове прогнозування.

#### REFERENCES

1. Regad, T., Targeting RTK signaling pathways in cancer, *Cancers (Basel)*. 2015, vol. 7, pp. 1758–84.
2. Browaeys-Poly, E., Perdereau, D., Lescuyer, A., Burnol, A.F., and Cailliau K. Akt interaction with PLC(gamma) regulates the G(2)/M transition triggered by FGF receptors from MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2009, vol. 29, no. 12, pp. 4965–9.
3. Zhang, P., Zhao, Y., Zhu, X., Sedwick, D., Zhang,

- X., and Wang, Z., Cross-talk between phospho-STAT3 and PLC $\gamma$ 1 plays a critical role in colorectal tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* 2011, vol. 9, no. 10, pp. 1418–28.
4. Khoshyomn, S., Penar, P.L., Rossi, J., Wells, A., Abramson, D.L., and Bhushan, A., Inhibition of phospholipase C-gamma1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery.* 1999, vol. 44, no. 3, pp. 568–78.
  5. Koss, H., Bunney, T.D., Behjati, S., and Katan, M., Dysfunction of phospholipase C $\gamma$  in immune disorders and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014, vol. 39, no. 12, pp. 603–11.
  6. Tensen, C.P., PLCG1 gene mutations in Cutaneous T-Cell Lymphomas Revisited. *J. Invest. Dermatol.* 2015, vol. 135, no. 9, pp. 2153–4.
  7. Feng, L., Reynisdtytir, I., and Reynisson, J., The effect of PLC- $\gamma$ 2 inhibitors on the growth of human tumour cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, vol. 54, pp. 463–9.
  8. Huynh, M.Q., GoЯmann, J., Gattenluehner, S., Klapper, W., Wacker, H.H., Ramaswamy, A., Bittner, A., Kaiser, U., and Neubauer, A., Expression and pro-survival function of phospholipase C $\gamma$ 2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2015, vol. 56, no. 4, pp. 1088–95.
  9. Liu, T.M., Woyach, J.A., Zhong, Y., Lozanski, A., Lozanski, G., Dong, S., Strattan, E., Lehman, A., Zhang, X., Jones, J.A., Flynn, J., Andritsos, L.A., Maddocks, K., Jaglowski, S.M., Blum, K.A., Byrd, J.C., Dubovsky, J.A., and Johnson, A.J., Hypermorphic mutation of phospholipase C,  $\gamma$ 2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood.* 2015, vol. 126, no. 1, pp. 61–8.
  10. Ghouri, Y.A., Mian, I., and Rowe, J.H., Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J. Carcinog.* 2017, vol. 16, pp. 1.
  11. Gramantieri, L., Fornari, F., Callegari, E., Sabbioni, S., Lanza, G., Croce, C.M., Bolondi, L., and Negrini, M., MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J. Cell Mol. Med.* 2008, vol. 12, no. 6A, pp. 2189–204.
  12. Aravalli, R.N., Cressman, E.N., and Steer, C.J., Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch. Toxicol.* 2013, vol. 87, no. 2, pp. 227–47.
  13. Lee, J.S., Chu, I.S., Heo, J., Calvisi, D.F., Sun, Z., Roskams, T., Durnez, A., Demetris, A.J., and Thorgerisson, S.S., Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology.* 2004, vol. 40, no. 3, pp. 667–76.
  14. Ji, J., Shi, J., Budhu, A., Yu, Z., Forgues, M., Roessler, S., Ambs, S., Chen, Y., Meltzer, P.S., Croce, C.M., Qin, L.X., Man, K., Lo, C.M., Lee, J., Ng, I.O., Fan, J., Tang, Z.Y., Sun, H.C., and Wang, X.W., MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009, vol. 361, no. 15, pp. 1437–47.
  15. Ranganathan, K., Sivasankar, V., MicroRNAs-Biology and clinical applications. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 2014, vol. 18, no. 2, pp. 229–34.
  16. Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, vol. 6, no. 4, pp. 259–69.
  17. Callegari, E., Gramantieri, L., Domenicali, M., D'Abundo, L., Sabbioni, S., and Negrini, M., MicroRNAs in liver cancer: a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Cell Death. Differ.* 2015, vol. 22, no. 1, pp. 46–57.
  18. Shah, M., Calin, G.A., MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2014, vol. 5, no. 4, pp. 537–48.
  19. Gautam, A., Kumar, R., Dimitrov, G., Hoke, A., Hammamieh, R., and Jett, M., Identification of extracellular miRNA in archived serum samples by next-generation sequencing from RNA extracted using multiple methods. *Mol. Biol. Rep.* 2016, vol. 43, no. 10, pp. 1165–78.
  20. Gyvyte, U., Juzenas, S., Salteniene, V., Kupcinskas, J., Poskiene, L., Kucinskas, L., Jarmalaite, S., Stuoelyte, K., Steponaitiene, R., Hemmrich-Stanisak, G., Hübenthal, M., Link, A., Franke, S., Franke, A., Pangonyte, D., Lesauskaite, V., Kupcinskas, L., and Skieceviciene, J., MiRNA profiling of gastrointestinal stromal tumors by next-generation sequencing. *Oncotarget.* 2017, vol. 8, no. 23, pp. 37225–38.
  21. Chen, X., Lv, Q., Liu, Y., and Deng, W., Construction of recombinant adenovirus Ad-rat PLC $\gamma$ 2 and its effects on apoptosis of rat liver cell BRL-3A in vitro. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 2016, vol. 62, no. 11, pp. 45–50.
  22. Chen, X., Lv, Q., Ma, J., and Liu, Y., PLC $\gamma$ 2 promotes apoptosis while inhibits proliferation in rat hepatocytes through PKCD/JNK MAPK and PKCD/p38 MAPK signaling. *Cell Prolif.* 2018, vol. 51, no. 3, pp. e12437.
  23. Martin, M., Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet J.* 2011, vol. 17, pp. 10–2.
  24. Friedländer, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., and Rajewsky, N., Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat. Biotechnol.* 2008, vol. 26, no. 4, pp. 407–15.
  25. Anders, S., Huber, W., Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010, vol. 11, no. 10, pp. R106.

26. John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S., Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2005, vol. 3, no. 7, pp. e264.
27. Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., Xu, H., Huang, X., Li, S., Zhou, A., Zhang, X., Bolund, L., Chen, Q., Wang, J., Yang, H., Fang, L., and Shi, C., WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucl. Acids Res.* 2018, vol. 46, no. W1, pp. W71-W75.
28. Zhou, K., Liu, M., and Cao, Y., New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene-microRNA-Tumor Suppressor Gene Network. *Front. Mol. Biosci.*, 2017, vol. 4, pp. 46.
29. Tang, W., Wan, S., Yang, Z., Teschendorff, A.E., and Zou, Q., Tumor origin detection with tissue-specific miRNA and DNA methylation markers. *Bioinform.* 2018, vol. 34, no. 3, pp. 398-406.
30. Li, D.B., Liu, J.L., Wang, W., Luo, X.M., Zhou, X., Li, J.P., Cao, X.L., Long, X.H., Chen, J.G., and Qin, C., Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats. *Front. Aging. Neurosci.* 2018, vol. 10, pp. 24.
31. Nour, M., Scalzo, F., and Liebeskind, D.S., Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. *Interv. Neurol.* 2013, vol. 1, no. 3-4, pp. 85-199.
32. Takuma, A., Abe, A., Saito, Y., Nito, C., Ueda, M., Ishimaru, Y., Harada, H., Abe, K., Kimura, K., and Asakura, T., Gene Expression Analysis of the Effect of Ischemic Infarction in Whole Blood, *Int. J. Mol. Sci.* 2017, vol. 18, no. 11, pp.E2335.
33. Chen, F., Wang, R.J., Li, G.Z., Zhang, Y., Yu, S., Liu, Y.F., Chen, X.Y., and Hou, S.K., miRNA array analysis of plasma miRNA alterations in rats exposed to a high altitude hypoxic environment. *Mol. Med. Rep.* 2018, vol. 18, no. 6, pp. 5502-10.
34. Tong, Y.J., miRNA expression analysis of effect of aerobic exercise on apoptosis of spermatogenic cells in high-fat diet rats, *Yangzhou Univer.*, 2017.
35. Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., and Biffo, S., Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J. Biol. Chem.* 2017, vol. 8, no. 1, pp. 45-56.
36. Chen, C., Wells, A.D., Comparative analysis of E2F family member oncogenic activity. *PLoS One.* 2007, vol. 2, pp. e912.
37. Opavsky, R., Tsai, S.Y., Guimond, M., Arora, A., Opavska, J., Becknell, B., Kaufmann, M., Walton, N.A., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., Muthusamy, N., Felsher, D.W., Porcu, P., Caligiuri, M.A., and Leone, G., Specific tumor suppressor function for E2F2 in Myc-induced T cell lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, vol. 104, no. 39, pp. 15400-5.
38. Warren, J.S.A., Xiao, Y., and Lamar, J.M., YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2018, vol. 10, no. 4, pp. E115.
39. Khalaf, A.M., Fuentes, D., Morshid, A.I., Burke, M.R., Kaseb, A.O., Hassan, M., Hazle, J.D., and Elsayes, K.M., Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *J. Hepatocell. Carcinoma.* 2018, vol. 5, pp. 61-73.
40. Scharenberg, A.M., Humphries, L.A., and Rawlings, D.J., Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, vol. 7, no. 10, pp. 778-89.

Received May 31, 2019  
 Received August 18, 2019  
 Accepted November 18, 2020