Journal of Arak University of Medical Sciences

August & September 2020. Vol 23. Issue 3

Research Paper

Bioinformatics Prediction of miRNAs Targeting E6 and E7 Genes in Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Cervical Cancer

Tahere Azimi[1], Malihe Bagheri[1], Mahdi Pariyan[2], Behzad Khansarinejad[3], Ashraf Zamani[4], *Mahdieh Mondanizadeh[1,5]

1. Department of Biotechnology and Molecular Medicine, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Department of Research and Development, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
5. Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Azimi T, Bagheri M, Pariyan M, Khansarinejad B, Zamani A, Mondanizadeh M. [Bioinformatics Prediction of miRNAs Targeting E6 and E7 Genes in Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Cervical Cancer (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(3):374-385. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.3686.3

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.3686.3

CC BY NC

Article Info:

Received: 22 Sep 2019

Accepted: 22 Dec 2019

Available Online: 01 Aug 2020

Key words:

Bioinformatics databases, miRNA, Cervical cancer, Human papillomavirus

ABSTRACT

Background and Aim Cervical Cancer (CC) is the third most common malignancy in the women, the main cause of which is human papillomavirus (HPV). Both E6 and E7 oncogenes of the virus play an important role in its tumorigenesis. Today, methods available for screening CC are not capable of detecting the disease at an early stage. Therefore, it is important to identify new biomarkers for early detection of this cancer. For this purpose, in the present study, miRNAs targeting the two oncogenes E6 and E7 of human papillomavirus (types 16 and 18) were studied in CC by bioinformatics.

Methods & Materials First, using the NCBI database, the E6 and E7 gene sequences were obtained for both human papillomavirus types 16 and 18. Then, using the miRBase and RNA22 bioinformatics databases, the most appropriate targeting miRNAs for these genes were selected.

Ethical Considerations This study was approved by Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences.

Results Based on the P obtained from bioinformatics databases, miRNA including miR-92a-5p (P=7.51e-2), miR-195-3p (P=2.24e-1), miR-34a-5p (P=2.73e-1) and miR-155-5p (P=4.95e-2) were introduced for the two genes E6 and E7.

Conclusion Results from bioinformatics studies revealed that of the four miRNAs identified, miR-155-5p and miR-92a-5p are probably the targeting miRNAs specific for the E6 and E7 genes, respectively. Therefore, it seems that these miRNAs can be a suitable candidate for in vitro studies in CC patients.

Extended Abstract

1. Introduction

Cervical Cancer (CC) is the third most common malignancy in the women, the main cause of which is Human Papillomavirus (HPV) [3, 6]. The E6 and E7 genes in the HPV genome are known as viral oncogenes and play an important role in its tumorigenesis [9]. At present, methods available for screening CC are not capable of detecting the disease at an early stage [13]. Therefore, it is important to identify new and non-invasive biomarkers with high sensitivity and specificity for early detection of this cancer. Moreover, miRNAs are found in different tissues with variable expression, and their expression profiles change in the

* *Corresponding Author:*
Mahdieh Mondanizadeh, PhD.
Address: Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (86) 34172526
E-mail: m_mondanizadeh@yahoo.com

disease state [30]. These molecules can be used as novel biomarkers in diagnosis and treatment of various cancers [31]. Therefore, in the present study, miRNAs targeting the two oncogenes E6 and E7 of human papillomavirus (types 16 and 18) were studied in CC by bioinformatics tools.

2. Materials and Methods

First, the E6 and E7 genes sequences were obtained for both human papillomavirus types 16 and 18 using the NCBI database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Then, the most appropriate miRNAs targeting E6 and E7 genes were selected using various bioinformatics databases including Miranda, Vir-Mir, Targetscan, miRNA path, miRBase and RNA22. The sequences of predicted miRNAs were retrieved from miRBase database (www.mirbase.org). Moreover, the complementary relationship between miRNA and target gene based on P-value was determined by the RNA22 bioinformatics database (http://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/). The P value represents the random possibility of binding the target miRNA. That is, a lower P represents a greater chance of binding to the target gene.

3. Results

The bioinformatics analyzes indicated that Miranda, Vir-Mir, Targetscan and miRNA path databases were not able to predict miRNAs targeting E6 and E7 viral genes. The obtained results of miRBase and RNA22 databases demonstrated that four miRNAs including miR-92a-5p (P=7.51e-2), miR-195-3p (P=2.24e-1), miR-34a-5p (P=2.73e-1) and miR-155-5p (P=4.95e-2) are the miRNAs that target E6 and E7 genes (Table 1). Among these miRNAs, miR-155-5p (P=4.95e-2) and miR-92a-5p (P=7.51e-2) are likely the specific target miRNAs for the E6 and E7 genes, respectively.

4. Discussion

Numerous studies have shown that miRNAs are closely linked to various diseases, including cancer, because these molecules are involved in all biological processes, including cell growth and differentiation, cell cycle regulation, stress response, and apoptosis [16]. The structure and function of miRNAs suggest that the expression of many miRNAs in cancerous tissues changes abnormally compared to normal tissue [30]. Therefore, changing the expression profile of miRNAs can be used as biomarkers to diagnose a wide range of diseases [31]. At present, various methods such as microarray analysis, In Situ Hybridization (ISH), northern blot, and Real Time PCR are used to measure miRNAs. This method is time consuming and expensive, while bioinformatics tools are effective and low-cost methods that can be used to predict the interaction between miRNAs and target genes [32, 33].

In this study, considering the oncogenic role of E6 and E7 genes of human papillomavirus in CC, different bioinformatics databases were used to identify and predict the miRNAs targeting these genes. Bioinformatics results indicated that four miRNAs including miR-92a-5p, miR-195-3p, miR-34a-5p and miR-155-5p are the miRNAs that target E6 and E7 genes. Among these miRNAs, miR-155-5p and miR-92a-5p are likely the specific target miRNAs for the E6 and E7 genes, respectively. Other studies have shown that eight miRNAs, including miR-16, miR-25, miR-92a, miR-378, miR-22, miR-27a, miR-29a, and miR-100, have the highest accuracy for CC detection, and they can be used to differentiate between CC patients and healthy individuals [39].

5. Conclusion

Our results suggest that miR-155-5p and miR-92a-5p can be a suitable candidate for in vitro studies in CC patients.

Table 1. All selected miRNAs for evaluation of expression level in patient with cervical cancer

Gene	miRNA	ID
E6 (HPV16)	has-miR-155-5p	MIMAT0000646
E6 (HPV18)	has-miR-195-3p	MIMAT0004615
	has-miR-34a-5p	MIMAT0000255
E7 (HPV16)	has-miR-92a-5p	MIMAT0004507
	has-miR-195-3p	MIMAT0004615
E7 (HPV18)	has-miR-34a-5p	MIMAT0000255

These miRNAs can be used as diagnostic biomarkers if they have a change in expression in CC patients compared to healthy individuals.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study approved in Ethical Committee of Arak University of Medical Science (Code: IR.ARAKMU.REC.1396.296).

Funding

TThe present paper was extracted from the MSc thesis of the first author, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences.

Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Research Assistance of Arak University of Medical Sciences due to its financial grant and support of this study.

پیش‌بینی بیوانفورماتیک miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ در سرطان دهانه رحم

طاهره عظیمی[۱]، ملیحه باقری[۱]، مهدی پریان[۲]، بهزاد خوانساری‌نژاد[۳]، اشرف زمانی[۴]، *مهدیه موندنی‌زاده[۱،۵]

۱. گروه زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲. بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.
۳. گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۵. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۳۱ شهریور ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۲۷ آبان ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف سرطان دهانه رحم (CC) سومین بدخیمی شایع در خانم‌هاست که عمده‌ترین علت ایجاد آن، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) است. دو انکوژن E6 و E7 این ویروس در روند تومورزایی آن نقش مهمی ایفا می‌کنند. امروزه، روش‌های موجود برای غربالگری CC توانایی تشخیص بیماری را در مراحل اولیه ندارند؛ بنابراین، شناسایی بیومارکرهای جدید جهت تشخیص به‌موقع این سرطان حائز اهمیت است. بدین منظور، در مطالعه حاضر، miRNAهای هدف‌گیرنده دو انکوژن E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی (تیپ ۱۶ و ۱۸) در CC با روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها ابتدا با استفاده از پایگاه NCBI توالی ژن‌های E6 و E7 برای هر دو تیپ ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی به دست آمد. سپس با استفاده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی miRBase و RNA22 مناسب ترین miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های مذکور انتخاب شدند.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی اراک تصویب شد.

یافته‌ها با توجه به میزان p-value به‌دست‌آمده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی، miRNAهای miR-92a-5p (p-value=7/51e-2)، miR-34a-5p (p-value=2.73e-1)، miR-195-3p (p-value=2.24e-1) و miR-155-5p (p-value=4.95e-2) برای دو ژن E6 و E7 معرفی شدند.

نتیجه‌گیری نتایج حاصل از بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد از بین چهار miRNA شناسایی‌شده، احتمالاً miR-۱۵۵-۵p و miR-۹۲a-5p به ترتیب به عنوان miRNAهای هدف‌گیرنده اختصاصی ژن‌های E6 و E7 هستند؛ بنابراین، به نظر می‌رسد این miRNAها می‌توانند کاندید مناسبی برای مطالعات آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به CC باشند.

کلیدواژه‌ها:
پایگاه‌های بیوانفورماتیک، miRNA، سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلومای انسانی

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان است که به عنوان دومین علت اصلی مرگ‌ومیر شناخته شده است [۱]. امروزه، سرطان سرویکس[1] یا سرطان دهانه رحم یکی از بدخیمی‌های شایع است که در اثر رشد غیرطبیعی سلول‌ها در ناحیه انتهایی رحم که به واژن متصل می‌شود، ایجاد می‌شود [۲]. این سرطان سومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان‌های سینه و کولورکتال است [۳] که حدود ۵۲۷۶۲۴ مورد جدید و ۲۶۵۶۷۲ مرگ‌ومیر سالانه در ارتباط با آن گزارش شده است [۴].

عوامل مؤثر در ابتلا به این سرطان ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)، داشتن شرکای جنسی متعدد، سن کمتر از ۱۶ سال در اولین مقاربت، عفونت‌های مقاربتی و نقص و یا سرکوب سیستم ایمنی است [۵]. در این میان عمده‌ترین علت ایجاد CC ویروس پاپیلومای انسانی است که دو تیپ ۱۶ و ۱۸ آن سبب بیش از ۷۰ درصد موارد این سرطان می‌شوند [۶، ۷]. این ویروس، شایع‌ترین عفونت منتقله از راه جنسی است که می‌تواند در طی چندین سال سبب بروز کارسینومای سنگفرشی دهانه رحم شود [۸].

1. Cervical Cancer (CC)

* نویسنده مسئول:
مهدیه موندنی‌زاده
نشانی: اراک، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی.
تلفن: ۳۴۱۷۲۵۲۶ (۸۶) ۹۸+
پست الکترونیکی: m_mondanizadeh@yahoo.com

پروتئین‌های E6 وE7 در ژنوم HPV به عنوان انکوژن‌های ویروسی شناخته شده‌اند [۹]. این دو پروتئین از طریق مهار ژن‌های سرکوبگر تومور P53 و Rb سبب طولانی شدن چرخه سلولی، مهار آپوپتوز و پیشروی سلول‌ها به سمت بدخیمی می‌شوند [۱۰، ۱۱]. این سرطان یک بدخیمی بسیار کشنده است، اما به دلیل دارا بودن مراحل پیش‌سرطانی طولانی، در صورتی که در مراحل اولیه شناسایی و درمان شود، قابل پیشگیری است [۱۲]. با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه غربالگری CC باز هم تکنیک‌ها و روش‌های موجود جهت شناسایی و تشخیص این سرطان، تهاجمی و نامناسب هستند [۱۳]؛ بنابراین، ضرورت نیاز به بیومارکر هایی که توانایی تشخیص بیماری را در مراحل اولیه به صورت سریع و با حساسیت و اختصاصیت بالا داشته باشند، احساس می‌شود.

میکرو RNAها (miRNAs) مولکول‌های RNA غیرکدکننده با طول تقریبی ۱۸ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که سبب تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها می‌شوند. این مولکول‌ها از طریق اتصال به mRNA هدف سبب تجزیه آن یا مهار ترجمه شده و بدین صورت سبب تنظیم بیان ژن در مرحله بعد از رونویسی می‌شوند [۱۴]. شواهد مختلف نشان داده است که یک نوع miRNA توانایی اتصال به چندین ژن هدف را دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که یک miRNA می‌تواند بیان تعداد زیادی از پروتئین‌ها را تنظیم کند [۱۵]. همچنین، نقش miRNAها در تنظیم فرایندهای مختلف از جمله رشد، تکثیر، تمایز، آپوپتوز و چرخه سلولی نشان‌دهنده نقش مستقیم miRNAها در سرطان‌هاست [۱۶]. از این رو استفاده از این مولکول‌ها به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی در تشخیص سرطان‌ها از جمله CC در بین محققین بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

از طرفی استفاده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی متعدد برای پیش‌بینی miRNAها موجب می‌شود تا در ابتدا برهم‌کنش احتمالی ژن‌ها با miRNAها پیش‌بینی شود و سپس آزمایشات تجربی برای اثبات این ارتباط صورت پذیرد که این امر خود باعث کاهش هزینه و اتلاف وقت خواهد شد [۱۷]؛ بنابراین رویکردهای بیوانفورماتیکی بسیار حساسی برای پیشگویی miRNAها طراحی شده است که مطالعات گسترده‌ای با بهره‌گیری از این رویکردها، به پیشگویی miRNAها در بیماری‌های مختلف پرداخته‌اند. مطالعه مرادی و همکاران به پیش‌بینی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های HBx و NOTCHE1 در هپاتوسلولار کارسینوما با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی با الگوریتم‌های مختلف پرداخته است [۱۸]. علاوه بر این، مطالعه رستمیان دلاور و همکاران نشان‌دهنده پیش‌بینی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های Sirt1 و Bcl2 در مدل بیماری پارکینسون با بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی بود [۱۹].

لی و همکارانش با استفاده از پایگاه بیوانفورماتیکی DIANA ارتباط بین miR-195-5p و مسیر سیگنالینگ TNF را در CC تایید کردند [۲۰]. در مطالعات دیگر با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داده شد ژن‌های هدف miR-155-5p و miR-92a در CC می‌تواند به ترتیب ژن‌های TP53INP1 و FBXW7 باشد [۲۱، ۲۲]. همچنین، miRNAهای مؤثر در فرایند مهار رگ‌زایی در سرطان با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی شناسایی شد [۲۳].

در این مطالعه نیز با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی به پیش‌بینی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ در CC پرداخته شد و miRNAهای منتخب بر اساس بهترین اتصال به ژن‌های هدف جهت استفاده در پژوهش‌های آزمایشگاهی شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک بررسی تئوری بیوانفورماتیک است.

اخذ توالی ژن‌های E6 و E7 از بانک جهانی ژنی NCBI

در مرحله اول به منظور اخذ توالی مربوط به ژن‌های E6 و E7 از تیپ ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا در پایگاه داده Gene نام ژن‌های موردنظر با نمادهای رسمی E6 و E7 به ترتیب مورد جست‌وجو قرار گرفت و سپس توالی ژن E6 برای HPV16 و HPV18 به ترتیب با شماره‌های دسترسی NC_ 001526/4 (توالی ۷۱۲۵ تا ۷۶۰۱) و NC_ 001357.1 (توالی ۱۰۵ تا ۵۸۱) و همچنین توالی ژن E7 برای HPV۱۶ و HPV۱۸ به ترتیب با شماره‌های دسترسی NC_ 001526/4 (توالی ۷۶۰۴ تا ۷۹۰۰) و NC_ 001357/1 (توالی ۵۹۰ تا ۹۰۷) با فرمت FASTA دریافت شد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی Miranda، Vir–Mir، Target scan و miRNA path

به منظور پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی Miranda، Vir-Mir، Target scan و miRNApath استفاده شد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه بیوانفورماتیکی miRBase:

پایگاه‌اطلاعاتی miRBase (www.mirbase.org) یک منبع آنلاین است. این پایگاه در پیشگویی خیلی نقشی ندارد و بیشتر برای شناسایی توالی و خصوصیت miRNAها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، برای تعیین توالی miRNAهای شناسایی‌شده، از پایگاه miRBase استفاده شد. بدین صورت

که در قسمت By miRNA identifier or keyword نام هر miRNA وارد شد و بعد از submit و انتخاب miRNA موردنظر توالی مربوط به آن دریافت شد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه بیوانفورماتیکی RNA22

این پایگاه اطلاعاتی از طریق سایت http://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/ در دسترس است و از آن برای تأیید پیشگویی‌های صورت‌گرفته استفاده شد. بدین صورت که با قرار دادن توالی miRNA که از سایت miRBase به دست آمده بود و توالی ژن موردنظر که از سایت NCBI به دست آمده بود- با فرمت FASTA، رابطه مکملی بین miRNA و ژن هدف بر اساس p-value مشخص شد. مقدار p-value امکان تصادفی متصل شدن به miRNA هدف را بیان می‌کند؛ به طوری که هر چه میزان p-value کمتر باشد، معنادارتر است و نشان می‌دهد که miRNA شانس بیشتری برای اتصال به ژن هدف دارد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی Miranda، Vir–Mir، Target scan و miRNA path

در این مطالعه از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی متعددی از جمله Target scan، Vir-Mir، Miranda و miRNA path برای پیشگویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ استفاده شد، اما به دلیل اختصاصیت این پایگاه‌ها به توالی‌های انسانی و همچنین ناقص بودن بانک‌های ویروسی امکان پیشگویی برای ژن‌های این ویروس میسر نبود و هیچ داده‌ای به دست نیامد؛ بنابراین، با استفاده از نتایج مطالعات پیشین، miRNAهای مربوط به ژن‌های ویروسی E6 و E7 از جمله miR-195-3p، miR-92a-5p، miR-34a-5p و miR-155-5p شناسایی شدند [۲۰، ۲۲] و با استفاده از پایگاه‌های miRBase و RNA22 مورد تأیید قرار گرفتند [۲۴-۲۶].

جدول ۱. نتایج پیشگویی miR-92a-5p هدف‌گیرنده ژن E7 در پایگاه RNA22

miRNA	Type HPV	P
miR-92a-5p	HPV16 E6	–
miR-92a-5p	HPV16 E7	7.51e-2
miR-92a-5p	HPV18 E6	–
miR-92a-5p	HPV18 E7	–

جدول ۲. نتایج پیشگویی miR-195-3p هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 در پایگاه RNA22

miRNA	Type HPV	P
miR-195-3p	HPV16 E6	–
miR-195-3p	HPV16 E7	2.24e-1
miR-195-3p	HPV18 E6	3.99e-2
miR-195-3p	HPV18 E7	–

جدول۳. نتایج پیش گویی miR-34a-5p هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 در پایگاه RNA22

miRNA	Type HPV	P
miR-34a-5p	HPV16 E6	_
miR-34a-5p	HPV16 E7	_
miR-34a-5p	HPV18 E6	2.73e-1
miR-34a-5p	HPV18 E7	5.33e-2

جدول۴. نتایج پیشگویی miR-155-5p هدف‌گیرنده ژن E6 در پایگاه RNA22

miRNA	Type HPV	P
miR-155-5p	HPV16 E6	4.95e-2
miR-155-5p	HPV16 E7	_
miR-155-5p	HPV18 E6	_
miR-155-5p	HPV18 E7	_

جدول ۵. کلیه miRNAهای انتخاب‌شده جهت بررسی میزان بیان در افراد مبتلا به سرطان دهانه رحم

نام ژن	miRNA	شماره شناسایی
E6 (HPV16)	has-miR-155-5p	MIMAT0000646
E6 (HPV18)	has-miR-195-3p has-miR-34a-5p	MIMAT0004615 MIMAT0000255
E7 (HPV16)	has-miR-92a-5p has-miR-195-3p	MIMAT0004507 MIMAT0004615
E7 (HPV18)	has-miR-34a-5p	MIMAT0000255

نتایج حاصل از پیش‌گویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 از پایگاه بیوانفورماتیکی RNA22

پیشگویی miRNA هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 در دو تیپ HPV16 و HPV18 در پایگاه بیوانفورماتیکی RNA22 برای هر چهار miRNA موردنظر (miR-195-3p، miR-92a-5p، miR-155-5p و miR-34a-5p) صورت گرفت. این نتایج نشان داد که miR-92a-5p با p-value برابر با 7/5e-2 فقط ژن E7 مربوط به HPV16 را هدف‌گیری می‌کند (جدول شماره ۱). همچنین، miR-195-3p قابلیت اتصال به ژن‌های E7 مربوط به HPV16 و E6 مربوط به HPV18 را به ترتیب با میزان p-value ۱-۲/۲۴e و ۲-۳/۹۹e را دارد (جدول شماره ۲)؛ بنابراین، miR-195-3p می‌تواند به هر دو ژن E6 و E7 اتصال یابد که در این بین به دلیل میزان p-value کمتر اتصال قوی‌تری را با ژن E7 مربوط

به HPV16 نسبت به E6 مربوط به HPV18دارد. هرچه میزان p-value کمتر باشد اتصال miRNA موردنظر با ژن هدف بیشتر است. miR-34a-5p نیز قابلیت اتصال به هر دو ژن E6 و E7 مربوط به HPV18 را به ترتیب با p-value برابر با ۲/۷۳e-۱ و ۵/۳۳e-۲ دارد (جدول شماره ۳). اما به دلیل داشتن میزان p-value کمتر، اتصال قوی‌تری با ژن E6 دارد. miR-155-5p نیز بهترین اتصال را با ژن E6 مربوط به HPV16 با میزان p-value برابر با ۴/۹۵e-۲ دارد (جدول شماره ۴). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پایگاه RNA22 پیشگویی چهار miRNA موردنظر (miR-34a-5p، miR-195-3p، miR-92a-5p و miR-155-5p) برای هدف‌گیری ژن‌های E6 و E7 به اثبات رسید و این miRNAها با احتمال اتصال بهتر به ژن‌های هدف، در این مطالعه انتخاب شدند (جدول شماره ۵).

بحث

سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سراسر جهان است که در صورت غربالگری و تشخیص زودهنگام قابل درمان است [۲۷]. امروزه، از روش‌های مختلفی نظیر پاپ اسمیر، کولپوسکوپی و بیوپسی برای تشخیص ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم استفاده می‌شود [۲۸]. مشکل عمده این روش‌ها اختصاصیت و حساسیت پایین و تهاجمی بودن آن‌هاست؛ بنابراین، این سرطان همچنان یکی از مشکلات جدی سلامتی در جهان باقی مانده است [۲۹]. در حال حاضر مشخص شده است که بین miRNAها با بیماری های مختلف از جمله سرطان ارتباط نزدیکی وجود دارد؛ زیرا این مولکول‌ها در تمام فرایندهای بیولوژیکی از جمله رشد و تمایز سلولی، تنظیم چرخه سلولی، پاسخ به استرس و آپوپتوز نقش دارند [۱۶].

ساختار و عملکرد miRNAها حاکی از آن است که بیان بسیاری از miRNAها در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت نرمال به صورت غیرطبیعی تغییر می‌کند [۳۰]. مطالعات گسترده پیشین حاکی از ارتباط بین بیان نابجای miRNAها با شروع و پیشرفت انواع سرطان‌هاست. بنابراین، تغییر پروفایل بیانی miRNAها می‌تواند به عنوان بیومارکرهایی برای شروع و تشخیص محدوده وسیعی از بیماری به کار برده شود [۳۱]. از این رو مطالعات گسترده‌ای در جهت توسعه روش‌های تشخیص و سنجش این مولکول‌ها صورت گرفته است. امروزه از روش‌هایی نظیر میکروآری، هیبریدیزاسیون درجا، نورترن بلات و Real Time PCR برای سنجش miRNAها استفاده می‌شود، اما به دلیل وقت‌گیر بودن و هزینه بالای این تکنیک‌ها امکان استفاده از آن‌ها در همه شرایط میسر نیست؛ در حالی که روش‌های بیوانفورماتیکی روش‌های مؤثر و کم‌هزینه‌ای هستند که با کمک آن‌ها می‌توان برهم‌کنش بین miRNAها با ژن‌های هدف را پیش‌بینی کرد [۳۲، ۳۳]. مطالعه مو و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی miRNAهای دخیل در سرطان و نقش آن‌ها به عنوان بیومارکرهای زیستی پرداخت [۳۴]. مرادی و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیکی و روش miR-5193، Real time PCR را به عنوان یکی از بیومارکرهای اختصاصی در تشخیص هپاتوسلولار کارسینوما معرفی کردند [۳۵]. بختیاری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ مبتنی بر تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک و بررسی بیان، miR-29 را به عنوان مهارکننده مسیر PI3K/AKT در رده‌های سلولی سرطان پروستات معرفی کردند [۳۶]. همچنین، مطالعات پیشین نشان‌دهنده وجود شش miRNA شامل miR-565-5p، miR-6779-3p، miR-4779-3p، miR-6841-3p، 454-5p و miR-3156-3p در سلول‌های دارای ژن‌های E6 و E7 بود که در این میان miR-3156-3p کاهش بیان را در ضایعات CC نشان می‌داد. از این رو مشخص شد که این miRNA دارای نقش سرکوب‌کنندگی در CC است و کاهش بیان آن در استقرار CC در افراد مبتلا به سویه‌های High Risk ویروسی نقش دارد [۳۷]. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که در سلول‌های آلوده با ژن‌های E6 و E7 ویروسی، میزان بیان miRNAهایی از جمله miR-378f، miR-629-5p، miR-7-5p، miR-17-5p، miR-378a-3p، و miR-186-5p کاهش یافت و miRNAهایی از جمله miR-23a-3p، miR-23b-3p، miR-27b-3p و miR-143-3p دچار افزایش بیان شدند. این نتیجه نشان داد که بیان انکوژن‌های ویروسی E6 و E7 احتمالاً پروفایل بیانی برخی از miRNAهای سلولی را تغییر می‌دهد [۳۸].

از طرفی در مطالعه لوئیس و همکارانش نمونه‌های دارای ضایعات پیش‌بدخیم و نمونه‌های مبتلا به CC در کنار نمونه کنترل از افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که هشت miRNA از جمله miR-92a، miR-25، miR-16، miR-29a، miR-27a، miR-22، miR-378 و miR-100 دارای بالاترین دقت برای تشخیص CC هستند و می‌توانند برای تمایز بین بیماران مبتلا به CC و افراد سالم مورد استفاده قرار گیرند [۳۹]. همچنین، نتایج مطالعات دیگر کاهش بیان miR-195 را در بافت‌های سرطانی نشان داد از این رو پیشنهاد شد که این مولکول نیز می‌تواند جهت افتراق بافت نرمال و سرطانی در مراحل اولیه بیماری مورد استفاده قرار گیرد [۴۰]. بنابراین، با توجه به نتایج مطالعات پیشین می‌توان اظهار کرد داشتن یک پروفایل بیانی از miRNAها دارای ارزش بالینی قابل توجهی در تشخیص CC است.

در این مطالعه، با توجه به نقش ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی در ایجاد CC، از نرم‌افزارها و پایگاه‌های بیوانفورماتیکی مختلفی به منظور شناسایی و پیشگویی miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های مذکور استفاده شد که هیچ‌یک از آن‌ها قادر به شناسایی توالی‌های ویروسی نبودند که این مسئله از جمله موارد محدودیت در این مطالعه به حساب می‌آید. بدین منظور از دو سایت اختصاصی پیشگویی مربوط به ویروس‌ها از جمله RNA22 و Vir-Mir استفاده شد که سایت Vir-Mir نیز با

وجود ذکر افزایش یا کاهش میزان بیان miRNAهای موردنظر به ژن هدف، برای ویروس HPV تعریف نشده است؛ بنابراین با استفاده از نتایج مطالعات پیشین، miRNAهای مربوط به ژن‌های E6 و E7 ویروسی شناسایی شدند.

نتایج این مطالعات حاکی از تغییر بیان miRNAهایی از جمله miR-34a، miR-195، miR-92a و miR-155 در CC بود؛ به طوری که بیان miR-34a وmiR-195 کاهش و بیان miR-92a و miR-155 افزایش را در CC نشان داده است [۲۵]. بنابراین، با استفاده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی RNA22 اتصال و عدم اتصال این miRNAها به ژن‌های موردنظر بر اساس میزان p-value مشخص شد و درنهایت miRNAهای هدف‌گیرنده ژن‌های E6 و E7 شناسایی و چهار miRNA (miR-92a-5p، miR-34a-5p، miR-195-3p، و miR-155-5p) به عنوان بهترین کاندیدا برای ژن‌های موردنظر انتخاب شدند. سطح بیان این miRNAهای منتخب می‌تواند در CC نسبت به افراد سالم در پژوهش‌های آزمایشی مورد سنجش قرار بگیرد و در صورت مشاهده تفاوت بیان در دو گروه ذکرشده می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی در CC مورد تحقیق بیشتر قرار بگیرد. بنابراین، انجام چنین مطالعاتی می‌تواند به عنوان مطالعات پایه‌ای به منظور مشخص شدن هرچه بهتر miRNAهای دخیل در CC و به دنبال آن شناسایی miRNAهای مناسب با هدف تشخیص سرطان سرویکس حائز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی می‌توان بیان کرد که احتمالاً miRNAهای ، miR-92a-5p، miR-34a-5p، miR-195-3p و miR-155-5p مهارکننده‌های مناسب برای دو ژن E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی هستند. از طرف دیگر می‌توان اذعان داشت که احتمالاً miR-155-5p و miR-92a-5p به ترتیب به عنوان miRNAهای اختصاصی هدف‌گیرنده ژن‌ها E6 و E7 هستند. بنابراین، به نظر می‌رسد که این miRNAها گزینه مناسبی برای بررسی در افراد مبتلا به CC در شرایط in vitro باشند؛ زیرا در صورت تفاوت بیان، این عوامل مولکولی در افراد مبتلا به CC نسبت به افراد نرمال می‌توانند در جهت تشخیص در این سرطان به کار برده شوند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی اراک با کد IR.ARAKMU.REC.1396.296 تصویب شد.

حامی مالی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی‌ارشد نویسنده اول در گروه زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در نگارش این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

تشکر و قدردانی

تمامی نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در انستیتو پاستور و آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک اعلام می‌دارند.

References

[1] Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2017; 26(4):444-57. [DOI:10.1158/1055-9965.EPI-16-0858] [PMID]

[2] Trott P. International classification of diseases for oncology. J Clin Pathol Suppl Coll Pathol. 1977; 30(8):782. [DOI:10.1136/jcp.30.8.782-c] [PMCID]

[3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010; 127(12):2893-917. [DOI:10.1002/ijc.25516] [PMID]

[4] Shrestha AD, Neupane D, Vedsted P, Kallestrup P. Cervical cancer prevalence, incidence and mortality in low and middle income countries: A systematic review. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19(2):319-24. [DOI:10.22034/APJCP.2018.19.2.319]

[5] Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk factors of cervical cancer: A case-control study. Asia Pac J Oncol Nurs. 2019; 6(3):308-14. http://www.apjon.org/text.asp?2019/6/3/308/255384

[6] Cox JT. Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. Obstet Gynecol Surv. 2006; 61(6):S15-S25. [DOI:10.1097/01.ogx.0000221011.01750.25] [PMID]

[7] Clifford G, Smith J, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: A meta-analysis. Br J Cancer. 2003; 88(1):63-73. [DOI:10.1038/sj.bjc.6600688] [PMID] [PMCID]

[8] Khodakarami N, Farzaneh F, Yavari P, Khayamzadeh M, Taheripanah R, Esmaeil Akbari M. [The new guideline for cervical cancer screening in low risk Iranian women (Persian)]. Iran J Obstet Gynecol Infertility. 2014; 17(95):8-17. [DOI:10.22038/IJOGI.2014.2801]

[9] Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. Cancer Sci. 2007; 98(10):1505-11. [DOI:10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x] [PMID]

[10] Wallace NA, Galloway DA. Novel functions of the human papillomavirus E6 oncoproteins. Annu Rev Virol. 2015; 2:403-23. [DOI:10.1146/annurev-virology-100114-055021] [PMID]

[11] Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. Mutat Res Rev Mutat Res. 2017; 772:23-35. [DOI:10.1016/j.mrrev.2016.08.001] [PMID]

[12] Ndikom CM, Ofi BA. Pre-screening counseling in cervical cancer prevention: Implications for nursing. Int Jof Nurs Midwifery. 2011; 3(10):158-64. http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1027.9690&rep=rep1&type=pdf

[13] Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. Cancer Cell Int. 2015; 15(1):38. [DOI:10.1186/s12935-015-0185-1] [PMID] [PMCID]

[14] Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2009; 7(4):147-54. [DOI:10.1016/S1672-0229(08)60044-3]

[15] Ben-Hamo R, Efroni S. MicroRNA regulation of molecular pathways as a generic mechanism and as a core disease phenotype. Oncotarget. 2015; 6(3):1594-04. [DOI:10.18632/oncotarget.2734] [PMID] [PMCID]

[16] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. Nat Rev cancer. 2006; 6(4):259-69. [DOI:10.1038/nrc1840] [PMID]

[17] Riffo-Campos Á, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? Int J Mol Sci. 2016; 17(12):1987. [DOI:10.3390/ijms17121987] [PMID] [PMCID]

[18] Moradi N, Paryan M, Khansarinejad B, Rafiei M, Mondanizadeh M. [Bioinformatic prediction of miRNAs targeting Notch1 and HBx genes in chronic hepatitis B-induced hepatocellular carcinoma (Pertsian)]. Arak Med Univ J. 2017; 19(12):89-101. https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?ID=287922

[19] Rostamian Delavar M, Baghi M, Yadegari E, Ghaedi K. [Bioinformatic prediction and introducing of some targeting microRNAs of Sirt1 and Bcl2 genes in model of Parkinson's disease (Pertsian)]. J Arak Univ Med Sci. 2017; 20(8):61-72. https://www.researchgate.net/publication/324476337

[20] Li M, Ren CX, Zhang JM, Xin XY, Hua T, Wang HB, et al. The effects of miR-195-5p/MMP14 on proliferation and invasion of cervical carcinoma cells through TNF signaling pathway based on bioinformatics analysis of microarray profiling. Cell Physiol Biochem. 2018; 50(4):1398-413. [DOI:10.1159/000494602] [PMID]

[21] Zhou C, Shen L, Mao L, Wang B, Li Y, Yu H. MiR-92a is upregulated in cervical cancer and promotes cell proliferation and invasion by targeting FBXW7. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 458(1):63-9. [DOI:10.1016/j.bbrc.2015.01.066] [PMID]

[22] Li N, Cui T, Guo W, Wang D, Mao L. MiR-155-5p accelerates the metastasis of cervical cancer cell via targeting TP53INP1. Onco Targets Ther. 2019; 12:3181-96. [DOI:10.2147/OTT.S193097] [PMID] [PMCID]

[23] Toroghi F, Toroghi Y. [Bioinformatics analysis to predict potential microRNAs inhibiting processes of angiogenesis in cancer (Pertsian)]. J Gorgan Univ Med Sci. 2017; 19(1):83-8. http://goums.ac.ir/journal/article-1-3021-fa.html

[24] Li J, Yu L, Shen Z, Li Y, Chen B, Wei W, et al. MiR-34a and its novel target, NLRC5, are associated with HPV16 persistence. Infect Genet Evol. 2016; 44:293-9. [DOI:10.1016/j.meegid.2016.07.013] [PMID]

[25] Kim HJ, Cho H, Choi CH, Chung J, Hewitt SM, Hewitt SM. MicroRNA as biomarkers for cervical cancer. SM J Gynecol Obstet. 2015; 1(2):1-8. https://www.researchgate.net/publication/306538125

[26] Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. J Natl Cancer Inst. 2014; 106(9):dju241. [DOI:10.1093/jnci/dju241] [PMID] [PMCID]

[27] Denny L. Cervical cancer: Prevention and treatment. Discov Med. 2012; 14(75):125-31. [PMID]

[28] Brown AJ, Trimble CL. New technologies for cervical cancer screening. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2012; 26(2):233-42. [DOI:10.1016/j.bpobgyn.2011.11.001] [PMID] [PMCID]

[29] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The global burden of cancer 2013. JAMA Oncol. 2015; 1(4):505-27. [DOI:10.1001/jamaoncol.2015.0735] [PMID] [PMCID]

[30] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 2005; 435(7043):834. [DOI:10.1038/nature03702] [PMID]

[31] McManus MT. MicroRNAs and cancer. Semin Cancer Biol. 2003; 13(4):253-8. [DOI:10.1016/S1044-579X(03)00038-5]

[32] Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. Mol Oncol. 2010; 4(3):230-41. [DOI:10.1016/j.molonc.2010.04.009] [PMID] [PMCID]

[33] Ritchie W, Rasko JE, Flamant S. MicroRNA target prediction and validation. InMicroRNA Cancer Regulation. Berlin: Springer; 2013. pp. 39-53. [DOI:10.1007/978-94-007-5590-1_3] [PMID]

[34] Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free circulating miRNA biomarkers in cancer. J Cancer. 2012; 3:432-48. [DOI:10.7150/jca.4919] [PMID] [PMCID]

[35] Moradi N, Paryan M, Khansarinejad B, Sarmadian H, Mondanizadeh M. Plasma level of miR-5193 as a novel biomarker for diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma. Hepat Mon. 2019; 19(2):e84455. [DOI:10.5812/hepatmon.84455]

[36] Aghaee-Bakhtiari SH, Arefian E, Soleimani M, Mirab Samiee S, Noorbakhsh F, Mahdian R, et al. [Bioinformatic evaluations for locating the microRNA suppressing PI3K/AKT Pathway and analysis in prostate cancer cell lines (Persian)]. Pathobiol Res. 2015; 17(4):1-12. https://mjms.modares.ac.ir/article-30-11898-en.pdf

[37] Xia YF, Pei GH, Wang N, Che YC, Yu FS, Yin FF, et al. MiR-3156-3p is downregulated in HPV-positive cervical cancer and performs as a tumor-suppressive miRNA. Virol J. 2017; 14(1):20. [DOI:10.1186/s12985-017-0695-7] [PMID] [PMCID]

[38] Honegger A, Schilling D, Bastian S, Sponagel J, Kuryshev V, Sültmann H, et al. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. PLoS Pathog. 2015; 11(3):e1004712. [DOI:10.1371/journal.ppat.1004712] [PMID] [PMCID]

[39] Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. Proc Natl Acad Sci. 2014; 111(11):4262-7. [DOI:10.1073/pnas.1401430111] [PMID] [PMCID]

[40] Song R, Cong L, Ni G, Chen M, Sun H, Sun Y, et al. MicroRNA-195 inhibits the behavior of cervical cancer tumors by directly targeting HDGF. Oncol Lett. 2017; 14(1):767-75. [DOI:10.3892/ol.2017.6210] [PMID] [PMCID]=

This Page Intentionally Left Blank