

پیش بینی بیوانفورماتیکی microRNA های تنظیم کننده فرایند EMT در سلول های سرطانی

صدیقه سادات مرتضوی^۱، صدیقه غربی^{۲*}، مریم شاه علی^۳

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۲- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۳- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۱۰

*نویسنده مسئول: m_shahali@pasteur.ac.ir , Gharbi@uk.ac.ir

کد پستی: ۳۱۵۹۹۱۵۱۱۱ - ۷۶۱۶۹۱۳۴۳۹

چکیده

هدف: EMT فرایندی برگشت پذیر و ضروری در طول جنین زایی، بهبود زخم و پیشرفت سرطان است. در بسیاری از سرطان ها، EMT می تواند ویژگی های تهاجمی تومور را افزایش دهد. اخیراً miRNA ها به عنوان کلاس جدیدی از RNA های غیر کد کننده تنظیم گر بیان ژن در مراحل پس از ترجمه دخیل در EMT شناخته می شوند. با این حال، مکانیسم و اثر دقیق miRNA ها در EMT در سلول های سرطانی انسان هنوز به خوبی مشخص نیست. این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک پیش بینی کننده miRNA های تنظیم کننده ژن های اصلی در فرایند EMT، تلاش می کند نقش miRNA ها را در فرایند EMT روشن کند.

مواد و روش ها: در این مطالعه، با استفاده از پایگاه های داده های تحت وب و ابزارهای پیش بینی برهم کنش miRNA ها نظیر DIANA، TargetScan، miRSystem، برهم کنش miRNA های تنظیم کننده ژن های SNAIL، ZEB1، TWIST1، N-cadherin و Vimentin به عنوان بیومارکرهای اصلی سلول های مزانشیمی بررسی شد.

نتایج: اثرات miRNA های متفاوت براساس الگوریتم هر پایگاه بر ژن های نامزد بررسی و داده های به دست آمده از پایگاه های مختلف باهم اشتراک گرفته شد. نتایج نشان داد که یازده miRNA با احتمال بالا به طور مشترک می توانند در EMT/MET نقش داشته باشند.

نتیجه گیری: براساس یافته های ما، می توان پیش بینی کرد که با توجه به نمره بالا miRNA های انتخاب شده با ژن های نامزد، این miRNA ها می توانند نقشی مهم در فرایند EMT/MET داشته باشند. از این رو، می توان از آنها به عنوان کاندیدهای مناسب برای تحقیقات بالینی آینده استفاده کرد.

کلید واژگان: EMT، MET، TargetScan، miRSystem، microRNA

مقدمه

تبدیل سلول‌های اپی‌تلیال به مزانشیمال یا EMT^۱ و فرایند معکوس آن یعنی MET^۲، یک فرایند بیولوژیک شناخته‌شده برگشت‌پذیر است که براساس زمینه بیولوژیکی که در آن رخ می‌دهد، به سه نوع طبقه‌بندی می‌شود. EMT نوع I، II و III که به ترتیب در جنین‌زایی، بهبود زخم و بازسازی بافت و پیشرفت سرطان دخیل هستند [1]. در فعال‌شدن این فرایند در سرطان، سلول‌های اپی‌تلیال تومور تحت تحولات مولکولی و ژنتیکی مختلف، اتصالات سلولی و قطبیت اپیکال بازال خود را از دست می‌دهند و توان تحرک و افزایش ظرفیت مهاجرت، تهاجم، مقاومت در برابر آپوپتوز و همچنین توانایی سازماندهی مجدد ماتریکس خارج سلولی و بازسازی الگوهای بیان ژنی متفاوت را به دست می‌آورند [2][3]. در فرایند EMT بیان پروتئین‌های مانند E-cadherin، اوکلودین و سیتوکراتین در سلول‌های اپی‌تلیال کاهش و بیان ژن‌های خاص فنوتیپ مزانشیمی مانند N-cadherin و vimentin افزایش می‌یابد [3][4][5]. فرایندهای مولکولی مختلفی در شروع و انجام فرایند EMT نقش دارند؛ فعال‌سازی عوامل رونویسی، بیان پروتئین‌های خاص سلولی، سازماندهی مجدد و بیان پروتئین‌های اسکلت سلولی، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریس خارج سلولی و تغییرات در بیان microRNA (miRNA)های خاص از این عوامل هستند که اغلب به عنوان بیومارکرهای فرایند EMT استفاده می‌شوند [2]. این عوامل رونویسی یا عوامل رونویسی القاکننده snail (EMT-TFs^۳)، به یکی از سه خانواده snail (شامل snail و slug که به عنوان SNAI1 و SNAI2 نیز

شناخته می‌شوند)، ZEB (شامل ZEB1 و ZEB2) و TWIST1، TWIST2 (شامل helix-loop-helix (TCF3 و TCF3) تعلق دارند [4][6]. EMT-TFها علاوه بر تعامل و تنظیم یکدیگر [4]، با سازوکارهای تنظیم‌کننده مانند مسیرهای سیگنالینگ و miRNAها نیز کنترل می‌شوند. اعضای خانواده miR-200 از تنظیم‌کننده‌های معروف این فرایند هستند که بیان ZEB1 و ZEB2 را تنظیم می‌کنند [7][8]. بدین ترتیب، بیان SNAIL توسط اعضای خانواده miR-34 تنظیم می‌شود [4][9].

miRNAها، مولکول‌های RNA کوچک غیرکدکننده، تک‌رشته‌ای به طول ۱۹-۲۵ نوکلئوتید هستند که اغلب در سطح پس از رونویسی با اثر بر قسمت 3'UTR در مولکول mRNA هدف سبب مهار بیان [10][11] یا تخریب mRNA هدف می‌شوند [12]. در پستانداران miRNAها از یک توالی حدود ۷ نوکلئوتیدی در انتهای 5'UTR خود با نام توالی (ناحیه) مرکزی، برای شناسایی mRNA هدف استفاده می‌کنند [13]. طبق آخرین نسخه miRBase (v22)، حدود ۴۸۸۶۰ miRNA بالغ از ۲۷۱ موجود زنده مختلف جمع‌آوری شده است. این تعداد همواره رو به افزایش و نقش تنظیمی این مولکول‌ها در فرایندهای مختلف به اثبات رسیده است [14]. مطالعات اخیر، نقش miRNAها را در تنظیم فرایندهای مختلف درگیر در سرطان نیز نشان داده است که از آن جمله می‌توان به EMT اشاره کرد [15][16][17]. با توجه به نقش سرکوبگر توموری و آنکوژنیک miRNAهای مختلف [18]، در مقالات اخیر از این عناصر تنظیمی به عنوان مارکرهای مناسب

4. 3' untranslated region (3'-UTR)

5. 5' untranslated region (5'-UTR)

6. Seed Region (Sequence)

1. Epithelial to mesenchymal transition

2. Mesenchymal to epithelial transition

3. EMT-transcription factor

برای تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان نام برده می‌شود [19][20].

از آنجاکه هر miRNA می‌تواند چندین mRNA مختلف را هدف قرار دهد، معمولاً برای حل این مشکل ابتدا تعاملات احتمالی از طریق ابزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی و سپس اعتبارسنجی تجربی و آزمایشگاهی انجام می‌شود [21].

با توجه به نقش ویژه و اهمیت فرایند EMT/MET در پیشروی سرطان و نقش miRNA ها به عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن، هدف از این مطالعه، پیش‌بینی miRNA های تنظیم‌کننده ژن‌های دخیل در فرایند EMT/MET مانند ZEB1, TWIST1, N-cadherin, SNAIL و vimentin، از طریق پایگاه داده‌های پیش‌بینی نظیر TargetScan, DIANA- microT_CDS و miRSystem است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تئوری- بیوانفورماتیکی و با استفاده از پایگاه‌های داده تحت وب انجام شده است. استفاده از پایگاه‌های داده به‌رغم مفیدبودن، ضعف‌هایی چون نقصان در نتایج و خروجی‌های مثبت کاذب، نداشتن هم‌پوشانی خروجی الگوریتم‌های پایگاه داده‌های مختلف و به‌روزرسانی دیر هنگام آنها دارد. بنابراین، نمی‌توان به نتایج یک پایگاه داده اکتفا کرد و همواره لازم است بیش از یک پایگاه داده بررسی شود. با توجه به این موضوع، پایگاه داده miRWalk که در آخرین نسخه از حالت هابی خارج شده بود [22]، با miRSystem به عنوان هابی ۷ به‌روز و مناسب جایگزین شد. در این مطالعه برای پیش‌بینی‌های مورد نظر، از

پایگاه‌های TargetScan, DIANA- microT_CDS و miRSystem استفاده شد.

پایگاه داده TargetScan: Bartel و همکاران در سال ۲۰۰۳ به عنوان اولین الگوریتم پیش‌بینی هدف miRNA در مهره‌داران، این پایگاه داده را معرفی کردند و پس از آن، با ارائه نسخه‌های جدید و بهبود الگوریتم‌های مورد استفاده، امکانات و دقت پیش‌بینی آن بهبود یافت و از شمار "مثبت کاذب" آن کاسته شد. این پایگاه داده محیطی مناسب برای کاربران است که به تنظیمات خاصی نیاز ندارد و با استفاده از نام ژن یا miRNA امکان جستجو در آن برای کاربران وجود دارد. بهترین معیار انتخاب محتمل‌ترین برهم‌کنش در این پایگاه براساس پیش‌بینی هدفیابی مؤثر (Context++ Score و Context++ score percentile) و بررسی احتمال هدفیابی حفاظت‌شده (PCT) ۸ است. PCT مقداری بین ۰ و ۱ است و برای بررسی میزان حفاظت‌شدگی سکانس در نواحی مورد بررسی کاربرد دارد [23].

پایگاه داده DIANA: این پایگاه داده خدمات تحت وب متنوعی دارد که امکان تجزیه و تحلیل داده‌های مختلف را برای miRNA فراهم می‌کند. ابزارهای DIANA بخش‌های مختلفی چون پایگاه داده‌های حاوی اطلاعات تجربی آزمایش و تأییدشده (TarBase v7.0 و LncBase) [24] الگوریتم‌های پیش‌بینی هدف (microT v5 و microT-CDS) و بخش مربوط به شناسایی مسیرهای مولکولی تغییر یافته مرتبط با بیان یک یا چند miRNA (mirPath) را شامل می‌شوند. [25]

پایگاه داده miRSystem: یک پایگاه تحت وب بسیار کاربردی و مناسب برای کاربران است که اولین بار در سال ۲۰۱۲ معرفی و آخرین نسخه آن در

Hub: ۷ در اینجا هاب به معنی پایگاه داده‌ای است که اطلاعات را از پایگاه‌های دیگر جمع‌آوری و به‌صورت خروجی درخورد فهم به محقق ارائه می‌کند.

سال ۲۰۱۶ رونمایی شد. این پایگاه امکان پیش‌بینی تعامل ژن هدف/ miRNA، عملکرد بیولوژیکی و مسیرهای اصلی مرتبط با تعامل miRNA ها و ژن‌های هدف آنها در انسان و موش را برای محققان فراهم می‌کند. این پایگاه برای کاهش پیش‌بینی‌های "مثبت کاذب" از الگوریتم‌های پیش‌بینی چندگانه و منابع داده‌های تجربی تأییدشده کمک می‌گیرد. این پایگاه نتایج پیش‌بینی تعاملات ژن هدف/ miRNA را براساس الگوریتم‌های شناخته‌شده شامل DIANA، miRanda، miRBridge، PicTar، PITA، rna22 و TargetScan و به‌صورت جدول ارائه می‌دهد. همچنین، داده‌های تأییدشده برای تعامل بین miRNA و ژن هدف آن از TarBase و miRecords در این پایگاه فراهم شده است. به‌روزرسانی و استفاده از الگوریتم‌های معتبر درمجموع این پایگاه داده را به یک هابی کاربردی تبدیل کرده است [26].

با توجه به نقش مهم بیومارکرهای vimentin ، N-cadherin ، TWIST1 ، ZEB1 و SNAIL در فرایند تبدیل اپیتلیال به مزانشیمال و نقش miRNA ها در تنظیم ژن‌های این فرایند، در این مطالعه براساس بهترین محدوده معناداری آماره‌ها و الگوریتم‌های سه پایگاه داده مذکور، miRNA های مناسب برای بیومارکرهای مذکور پیش‌بینی شد. سپس، از نتایج به‌دست‌آمده از هر سه پایگاه، با نرم‌افزار اکسل اشتراک گرفته شد و برای به‌دست‌آوردن miRNA هایی با اهداف مشترک نتایج با هم مقایسه شد.

نتایج

برای پیش‌بینی miRNA هایی که mRNA ژن‌های منتخب SNAIL ، ZEB1 ، TWIST1 ، N-cadherin و vimentin را هدف قرار می‌دهند، به‌ترتیب از پایگاه

داده‌های TargetScan، DIANA- microT_CDS و miRSystem استفاده شد. در مرحله اول، miRNA هایی که در miRSystem امتیاز مناسب داشتند، انتخاب شدند. در این مرحله miRNA هایی که Hit آنها از نصف به بالا محاسبه شده بود (یعنی نیمی از لیست پایگاه داده‌ها برای آنها دارای اطلاعات گزارش شده بودند) درنظر گرفته شدند. در مرحله بعد، مطابق الگوریتم DIANA-microT-CDS، miRNA های مناسب فیلتر شدند. مطابق الگوریتم این پایگاه، نتایج با miTG score نزدیک یک مناسب‌تر هستند [21]. بنابراین miRNA های با miTG بزرگ‌تر و نزدیک‌تر به یک انتخاب شد. در مرحله سوم، miRNA های مناسب براساس ترکیبی از سه معیار PCT و Context ++ Score و Context ++ و TargetScan انتخاب شدند. Context ++ Score، میزان موفقیت هدف‌گیری پیش‌بینی‌شده و PCT، احتمال هدف‌گیری محافظت‌شده را مشخص می‌کند. مطابق الگوریتم این پایگاه، هرچه میزان PCT به یک نزدیک‌تر، Context ++ score percentile با درصد بالاتر و Context ++ Score به ۱- نزدیک‌تر باشد، میان‌کنش پیش‌بینی‌شده مناسب‌تر است [21]. Context ++ score percentile بالا در این تحقیق به‌عنوان آماره انتخابی کلی برای نمایش در جداول درنظر گرفته شده است. درنهایت، لیست‌های حاصل از هر مرحله با قوانین Excel با هم اشتراک گرفته شدند. (نتایج حاصل در جداول ۱ تا ۵، جداگانه برای هر ژن آورده شده است). مطابق نتایج به‌دست‌آمده miRNA ها مشترکاً چندین ژن کاندید را هدف قرار دادند (جدول ۶). به نظر می‌رسد، می‌توان برای مطالعات بعدی از بررسی هم‌زمان این تعاملات پیش‌بینی‌شده استفاده کرد.

جدول ۱. miRNAهای منتخب ژن N-cadherin

miRNA	context++ score percentile	TOTAL_HIT	miTG score
hsa-miR-199b-5p	۷۹	۵	۰/۸۸۳۷۸۹
hsa-miR-320a	۸۴	۵	۰/۹۲۸۹
hsa-miR-199a-5p	۷۹	۴	۰/۸۵۱۶۷۷
hsa-miR-543	۹۴	۴	۰/۹۸۱۴
hsa-miR-369-3p	۹۱	۴	۰/۸۹۴۹۸۱
hsa-miR-544a	۹۵	۴	۰/۷۹۵۳۵۱
hsa-miR-320c	۸۴	۳	۰/۹۲۹۳۵۸
hsa-miR-105-5p	۹۵	۳	۰/۸۹۷۸۰۱
hsa-miR-190a-5p	۸۳	۳	۰/۷۶۴۲۲۳
hsa-miR-194-5p	۹۱	۳	۰/۷۶۴۲۲۳
hsa-miR-26a-5p	۸۳	۳	۰/۹۲۶۸۵۵
hsa-miR-450b-5p	۶۳	۳	۰/۷۳۲۱۰۲
hsa-miR-511-5p	۹۶	۳	۰/۹۶۸۴۳۵
hsa-miR-520d-5p	۹۰	۳	۰/۹۸۸۸۲۲
hsa-miR-520f-3p	۸۷	۳	۰/۹۶۹۳۲۲
hsa-miR-524-5p	۸۴	۳	۰/۹۸۶۶۵
hsa-miR-573	۸۷	۳	۰/۷۳۴۸۳۸
hsa-miR-603	۹۴	۳	۰/۹۳۶۳۰۲
hsa-miR-605-5p	۹۲	۳	۰/۹۶۱۱۳۴
hsa-miR-655-3p	۶۶	۳	۰/۸۸۶۹۱۵
hsa-miR-766-3p	۸۰	۳	۰/۷۹۳۹۳۶
hsa-miR-320b	۸۴	۳	۰/۹۲۹۴۴۴

جدول ۲. miRNAهای منتخب ژن Snail

miRNA	context++ score percentile	TOTAL_HIT	miTG score
hsa-miR-30a-5p	۹۸	۶	۰/۹۹۹۹۱۸۶۵۲
hsa-miR-30b-5p	۹۸	۶	۰/۹۹۹۹۵۰۰۴۵
hsa-miR-30c-5p	۹۸	۶	۰/۹۹۹۹۹۱۶۶
hsa-miR-30d-5p	۹۸	۶	۰/۹۹۹۹۳۱۷۱۱
hsa-miR-30e-5p	۹۸	۶	۰/۹۹۹۸۰۴۶۶۷
hsa-miR-199a-5p	۹۷	۵	۰/۸۳۰۱۸۱۶۶۱
hsa-miR-410-3p	۹۷	۴	۰/۹۷۰۷۲۹۵۳۷
hsa-miR-153-3p	۹۹	۴	۰/۹۹۵۸۷۵۴۶۷
hsa-miR-199b-5p	۹۷	۳	۰/۸۰۶۳۱۷۴۹۷
hsa-miR-22-3p	۹۸	۳	۰/۷۵۱۱۳۶۴۶۹
hsa-miR-296-5p	۹۷	۲	۰/۷۶۰۷۸۶۰۸۳
hsa-miR-34a-5p	۹۷	۲	۰/۸۴۰۰۵۴۳۹۶
hsa-miR-449a	۹۷	۲	۰/۸۱۳۶۲۶۸۴۸
hsa-miR-548g-3p	۹۹	۲	۰/۹۴۲۰۱۶۸۸۴

جدول ۳. miRNAهای منتخب ژن TWIST

miRNA	context++ score percentile	TOTAL_HIT	miTG score
hsa-miR-525-5p	۸۹	۴	۰/۸۸۳۸۶۲۷۸
hsa-miR-92a-3p	۸۴	۴	۰/۷۷۱۷۷۵۵۸۶
hsa-miR-151a-3p	۸۸	۳	۰۹۲۴۵۷۷۹۱
hsa-miR-543	۹۷	۳	۰/۸۳۱۶۳۰۷۸۹
hsa-miR-96-5p	۹۱	۳	۰/۸۱۴۳۴۷۲۹۹
hsa-miR-409-3p	۹۸	۳	۰/۸۲۳۷۹۵۹۰۳
hsa-miR-92b-3p	۸۵	۳	۰/۷۷۱۷۷۵۵۸۶
hsa-miR-137	۹۲	۳	۰/۸۸۸۳۰۱۱۷۳
hsa-miR-520d-5p	۹۷	۳	۰/۸۸۰۴۰۲۹۷۲
hsa-miR-524-5p	۹۸	۳	۰/۸۸۹۳۲۸۴۱۴
hsa-miR-580-3p	۹۴	۳	۰/۹۳۲۷۰۱۴۰۴
hsa-miR-526b-5p	۸۸	۳	۰/۷۱۶۷۶۷۱۹۱
hsa-miR-586	۹۶	۳	۰/۷۳۵۴۱۰۴۱۹
hsa-miR-9-5p	۹۱	۲	۰/۷۷۷۰۵۸۶۱۵
hsa-miR-576-5p	۹۴	۲	۰/۹۴۱۲۱۷۹۸۹
hsa-miR-875-3p	۸۷	۲	۰/۹۱۸۸۸۶۸۹۴
hsa-miR-942-5p	۶۷	۲	۰/۸۹۳۲۷۶۱۴۱
hsa-miR-450b-5p	۶۹	۲	۰/۷۲۹۴۰۵۹۴۲
hsa-miR-361-5p	۸۳	۲	۰/۹۲۶۳۰۲۰۱۶

جدول ۴. miRNAهای منتخب ژن VIM

miRNA	context++ score percentile	TOTAL_HIT	miTG score
hsa-miR-124-3p.1	۹۹	۴	۰/۷۴۰۶۹۵۵۶
hsa-miR-320a	۹۸	۴	۰/۸۵۹۳۵۱۲۲۴
hsa-miR-28-3p	۹۸	۳	۰/۹۶۹۶۱۲۱۰۶
hsa-miR-509-3-5p	۹۹	۳	۰/۹۰۳۳۴۲۸۹۵
hsa-miR-590-5p	۹۳	۳	۰/۷۱۴۳۵۱۴۳۲
hsa-miR-320b	۹۸	۳	۰/۸۵۹۳۵۱۲۲۴
hsa-miR-320c	۹۸	۳	۰/۸۵۹۳۶۳۴۸۷
hsa-miR-320d	۹۸	۳	۰/۸۴۹۴۸۶۷۲۹
hsa-miR-30a-5p	۹۵	۲	۰/۹۲۰۹۸۰۰۹۳
hsa-miR-30b-5p	۹۵	۲	۰/۹۱۵۸۳۹۸۳۵
hsa-miR-30c-5p	۹۵	۲	۰/۹۱۸۹۷۲۲۵۳
hsa-miR-30d-5p	۹۵	۲	۰/۹۲۱۶۴۹۱۹۷
hsa-miR-30e-5p	۹۵	۲	۰/۹۳۴۳۹۲۴۷۳
hsa-miR-548e-3p	۹۱	۲	۰/۷۲۰۰۳۲۲۶۲
hsa-miR-548f-3p	۹۰	۲	۰/۷۳۲۱۳۸۹۹۷
hsa-miR-548l	۹۵	۲	۰/۹۲۲۵۹۰۰۷
hsa-miR-548n	۹۵	۲	۰/۸۴۶۷۱۸۴۴۹

جدول ۵) miRNA های منتخب ژن Zeb1

miRNA	context++ score percentile	TOTAL_HIT	miTG score
hsa-miR-200b-3p	۹۶	۸	۰/۹۹۹۹۹۲۲۹
hsa-miR-200c-3p	۹۷	۸	۰/۹۹۹۹۹۶۲۶۵
hsa-miR-150-5p	۹۸	۶	۰/۹۴۸۳۲۹۲۵
hsa-miR-23a-3p	۷۶	۶	۰/۸۸۴۴۴۶۲۲۲
hsa-miR-23b-3p	۷۷	۶	۰/۸۷۲۰۸۰۲۶۶
hsa-miR-429	۹۷	۶	۰/۹۹۹۹۹۷۰۹۳
hsa-miR-142-3p.1	۷۷	۴	۰/۷۱۰۲۸۱۳۹۳
hsa-miR-142-3p.2	۸۴	۴	۰/۷۱۰۲۸۱۳۹۳
hsa-miR-199a-3p	۸۹	۳	۰/۸۵۶۳۸۹۰۴۷
hsa-miR-217	۹۵	۳	۰/۷۲۴۸۷۴۴۹
hsa-miR-342-3p	۷۰	۳	۰/۸۷۱۱۶۷۸۷۴
hsa-miR-369-3p	۹۲	۳	۰/۹۲۶۹۳۷۴۶۳
hsa-miR-513a-3p	۷۸	۳	۰/۷۶۷۷۲۸۱۹۷
hsa-miR-548a-3p	۸۷	۳	۰/۹۴۶۱۱۴۶۴۱
hsa-miR-942-5p	۶۱	۳	۰/۹۵۶۱۶۶۷۲۲

جدول ۶) لیست نهایی miRNA های مشترک

miRNA	cad	TWIST	snail	zeb1	Vim
hsa-miR-942-5p		*		*	
hsa-miR-543	*	*			
hsa-miR-524-5p	*	*			
hsa-miR-520d-5p	*	*			
hsa-miR-450b-5p	*	*			
hsa-miR-369-3p	*			*	
hsa-miR-320d	*				*
hsa-miR-320c	*				*
hsa-miR-320b	*				*
hsa-miR-320a	*				*
hsa-miR-30e-5p			*		*
hsa-miR-30d-5p			*		*
hsa-miR-30c-5p			*		*
hsa-miR-30b-5p			*		*
hsa-miR-30a-5p			*		*
hsa-miR-199b-5p	*		*		
hsa-miR-199a-5p	*		*		
hsa-miR-124-3p.1	*				*

miRNA های منتخب تنظیم‌کننده هر ژن، با علامت (*) در ستون هر ژن مشخص شدند.

بحث

فرایند EMT به عنوان رویکرد درمانی جدید در درمان سرطان برای جلوگیری از انتشار سلول‌های تومور در مرحله‌های ابتدایی یا از بین بردن سلول‌های متاستاز تیک در مراحل پیشرفته سرطان در نظر گرفته می‌شود. در این فرایند، بیان برخی مارکرهای اپی‌تلیال چون E-cadherin کاهش می‌یابد. در حالی که بیان نشانگرهای مزانشیمی چون vimentin, N-cadherin, فیبرونکتین و TWIST افزایش می‌یابد. بیان این پروتئین مارکرها به طور کلی توسط عوامل رونویسی مرتبط با EMT به ویژه snail و slug کنترل می‌شود [27]. SNAI1 با سرکوب بیان E-cadherin و القای EMT به عنوان عنصر کلیدی در بدخیمی و متاستاز در سرطان‌های مختلف شناخته می‌شود. بیان بیش از حد miR-199a-5p با تأثیر بر SNAI1 مانع از پیشرفت PTC₉ در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی ۱۰ می‌شود [28]. miR-199a-5p در تکثیر، مهاجرت، تهاجم و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی در سرطان پستان مرتبط است. بیان برخی از ژن‌های مرتبط با EMT مانند Cadherin, ZEB1 و TWIST در تعامل با miR-199a-5p در سلول‌های MDA-MB-231 به میزان زیادی تغییر یافته است. TWIST به عنوان یکی از القاکندگان مهم EMT که امکان دستیابی به فنوتیپ مزانشیمی و اجازه حمله و متاستاز از محل اولیه تومور را برای سلول فراهم می‌کند، می‌تواند موجب مهار E-cadherin و بیان نشانگرهای فیبروبلاستیک چون اکتین، فیبرونکتین و vimentin شود. در سرطان معده، افزایش بیان پروتئین TWIST همراه کاهش بیان پروتئین cadherin گزارش شده است. miR-199a-5p از طریق EMT مهاجرت و تهاجم در سرطان پستان را مهار می‌کند و همچنین با مقاومت چند دارویی در سرطان روده بزرگ ارتباط دارد [29].

خانواده miR-30 پنج نوع زیرگروه a, b, c, d و e دارد که به عنوان سرکوبگر تومور در انواع مختلف تومورهای بدخیم مانند سرطان پستان، NSCLC₁₁، کارسینوم کلیوی و سرطان معده عمل می‌کنند. کاهش بیان اعضای خانواده miRNA-30 با رفتارهای تهاجمی سرطان‌های مختلف ارتباط دارند. miR-30b مستقیم به SNAIL 3'UTR متصل می‌شود و ترجمه آن را مهار می‌کند. بیش بیان miR-30b به کاهش بیان بیومارکر مزانشیمی N-cadherin منجر می‌شود [27]. در واقع، ثابت شده است که اعضای خانواده miR-30، پیشرفت سرطان به سمت وضعیت متاستاتیک و تهاجم را از طریق تعدیل EMT تنظیم می‌کنند. بیان نابجای miR-30c بر بیان مارکرهای EMT مانند E-cadherin, Snail و vimentin تأثیر می‌گذارد و به سرکوب EMT منجر می‌شود. همچنین، miR-30c می‌تواند EMT را مهار و تهاجم سلول‌های سرطانی را از طریق هدف‌گیری ژن اسکلت سلولی، vimentin کاهش دهد. در مطالعه دیگری، miR-30a در سرطان پستان با اتصال به 3'-UTR از vimentin و سرکوب بیان این ژن، مانع از مهاجرت از طریق فعال شدن EMT و تهاجم توموری شد [30]. miR-524-5p به عنوان یک سرکوبگر تومور در سرطان معده انسان عمل می‌کند. نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد miR-524-5p ممکن است با القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی در سرکوب سرطان معده نقش داشته باشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که miR-524-5p با کاهش سطح بیان MMP-2 و MMP-9 باعث مهار تهاجم ناشی از miR-524-5p در سلول‌های معده می‌شود. بیش بیان miR-524-5p آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی معده القا می‌کند [31]. مطابق تحقیقات اخیر TWIST1 با بالا بردن بیان ماتریکس متالوپروتئین‌های (MMP) در تهاجم تومور و متاستاز نقش دارد. پروتئین Zeb با کاهش E-cadherin و افزایش

11. NSCLC=non-small cell lung cancer

9. Papillary Thyroid Carcinoma
10. In vitro & In vivo

بیان تعدادی دیگر از نشانگرهای مزانشیمی مانند vimentin، فیبرونکتین، N-cadherin و MMPs باعث القا EMT و تسهیل مهاجرت سلولی، تهاجم و متاستاز نهایی به اندام‌های دوردست می‌شود [32]. miR-524-5p با هدف‌گیری ZEB2 و SMAD4، در مراحل اولیه القا پرتوانی با افزایش تکثیر سلولی، مهار آپوپتوز و افزایش MET نقش دارد. ZEB2 سرکوب را با اتصال به موتیف E-box و تنظیم توالی ژن E-cadherin تنظیم می‌کند [33]. miR-520-5p بیان ژن مربوط به TWIST1 را کاهش می‌دهد که این کاهش بیان، به افزایش بیان E-cadherin، کاهش حرکت و تهاجم سلول منجر می‌شود [34]. مطالعات اخیر نشان داده است که miR-450b به‌عنوان یک سرکوب‌کننده جدید، سبب سرکوب شدن تکثیر سلول‌های تومور در سرطان پستان می‌شود. همچنین miR-450b-5p بنیادینگی ۱۲ و توسعه مقاومت به شیمی‌درمانی در سرطان کلورکتال را مهار می‌کند. بیش بیان miR-450b-5p باعث افزایش تکثیر سلولی، رشد تومور و مهار آپوپتوز سلول‌های سرطان کلورکتال می‌شود [35]. در مطالعات اخیر، ارتباط miR-543 و EMT به اثبات رسیده است [36]. بیش بیان miR-543 سبب القای تکثیر سلولی و EMT می‌شود. مطالعات دورن‌تنی نشان داده است که افزایش بیان miR-543 به افزایش اندازه تومور و تنظیم مقادیر ژن‌های القاکننده EMT منجر می‌شود [37]. miR-320 به‌عنوان یک سرکوبگر تومور در سرطان معده شناخته شده است که بیان آن در بافت‌های سرطانی معده کاهش می‌یابد و نقش این miRNA در مهار پیشرفت و تهاجم سرطان معده و اثر تنظیمی آن در EMT از طریق مسیر انتقال پیام 1α -HIF/KLF5-320 miR- در مطالعات اخیر بررسی شده است. [38] در مطالعه دیگری نتایج آزمایش‌های بالینی بیماران با بیان کم miR-320b، نشان‌دهنده پیش‌آگهی ضعیف بوده است. بیش بیان این

miRNA می‌تواند میزان آپوپتوز سلولی و مهار تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلولی را افزایش دهد [39]. miR-942-5p با بقای بیماران مبتلا به سرطان پستان مرتبط است [40]. مطالعات اخیر نشان داده است که miR-369 می‌تواند برنامه‌ریزی مجدد سلولی را القا، فنوتیپ‌های بدخیم سرطان کولورکتال انسان را تنظیم و EMT را مهار و فنوتیپ اپی‌تلیالی را تحریک کند [41]. در مطالعات مختلفی ارتباط و نقش has-miR-124 به‌عنوان سرکوبگر تومور در سرطان‌های مختلف مانند هپاتوسلولار کارسینوما، گلیوما و پستان بررسی شده است. در مطالعات رده‌های سلولی سرطانی پستان، نقش has-miR-124 در EMT، متاستاز و تهاجم سلول‌های سرطانی از طریق تنظیم ژن‌های SNAIL و E-cadherin گزارش شده است [42].

بنابراین، به دلیل اهمیت فرایند EMT/MET در ایجاد بدخیمی و ویژگی‌های دیگر تهاجمی سرطان و نیز اهمیت نقش تنظیم‌کنندگی miRNAها در این فرایندها، در این مطالعه با کمک پایگاه داده‌های DIANA، TargetScan و miRSystem، برهم‌کنش miRNAهای تنظیم‌کننده ژن‌های N-cadherin، TWIST1، ZEB1، SNAIL و vimentin به‌عنوان بیومارکرهای اصلی سلول‌های مزانشیمی بررسی شد (جدول ۶). به‌رغم مطالعات انجام‌شده درباره نقش miRNAها در سرطان و فرایند EMT، هیچ مطالعه‌ای به بررسی هم‌زمان تعامل بین miRNAهای منتخب و ژن‌های مذکور نپرداخته است. همچنین، با در نظر گرفتن این موضوع که ژن‌های انتخاب‌شده با هم در تعامل بوده‌اند و miRNAها توان تأثیر هم‌زمان بر ژن‌های مختلف را دارند، بررسی هم‌زمان بین ژن‌ها و miRNAهای منتخب این مطالعه می‌تواند در روشن‌تر شدن مکانیسم مولکولی فرایند EMT و همچنین یافتن بیومارکرهای مناسب برای پیشگیری و درمان سرطان مؤثر باشند. بنابراین، می‌توان از

regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*. 2008 May;10(5):593.

9. Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Yoon D, Fearon ER, Rowe RG. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2011 Oct 31;195(3):417-33.

10. Moradi S, Asgari S, Baharvand H. Concise review: harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. *Stem Cells*. 2014 Jan;32(1):3-15.

11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

12. Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer. *Journal of oncology*. 2015;2015.

13. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. 2007 Jul 6;27(1):91-105.

14. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*. 2018 Nov 13;47(D1):D155-62.

15. Li HY, Liang JL, Kuo YL, Lee HH, Calkins MJ, Chang HT, Lin FC, Chen YC, Hsu TI, Hsiao M, Ger LP. miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2017 Dec;19(1):133.

16. Behbahani GD, Ghahhari NM, Javidi MA, Molan AF, Feizi N, Babashah S. MicroRNA-mediated post-transcriptional regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Pathology & Oncology Research*. 2017 Jan 1;23(1):1-2.

17. Zare M, Bastami M, Solali S, Alivand MR. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT- involving miRNAs in breast cancer metastasis: diagnosis and therapeutic implications. *Journal of cellular physiology*. 2018 May;233(5):3729-44.

این تعاملات در مطالعات بالینی آینده در سرطان‌های مختلف استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی جانبی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه باهنر کرمان بوده است که انجام آن با حمایت‌های مالی و معنوی انستیتو پاستور ایران میسر شد. همچنین، نویسندگان از خانم‌ها مژده اماندادی و پدیده کریمی برای همراهی و زحمات ایشان تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018 Nov 20:1.
2. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun 1;119(6):1420-8.
3. Gyamfi J, Lee YH, Eom M, Choi J. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Scientific reports*. 2018 Jun 11;8(1):8859.
4. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017 Oct;14(10):611.
5. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45.
6. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature cell biology*. 2019 Jan;21(1):102.
7. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports*. 2008 Jun 1;9(6):582-9.
8. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205

27. Xiong Y, Wang Y, Wang L, Huang Y, Xu Y, Xu L, Guo Y, Lu J, Li X, Zhu M, Qian H. MicroRNA-30b targets Snail to impede epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells. *Journal of Cancer*. 2018;9(12):2147.
28. Ma S, Jia W, Ni S. miR-199a-5p inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting SNAI1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018 Feb 26;497(1):181-6.
29. Chen J, Shin VY, Siu MT, Ho JC, Cheuk I, Kwong A. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer. *BMC cancer*. 2016 Dec;16(1):887.
30. Su-Jin Y, Su-Yu Y, Dan-Dan W, Chen X, Hong-Yu S, Xiao-Hui Z, Shan-Liang Z, Jin-Hai T, Zhao JH. The miR-30 family: Versatile players in breast cancer. *Tumor Biology*. 2017 Mar 1;39(3).
31. Liu GH, Liu YH, Yang Z, Zhu AL, Zhao CL. MicroRNA-524-5p suppresses the growth and invasive abilities of gastric cancer cells. *Oncology letters*. 2016 Mar 1;11(3):1926-32.
32. Tania M, Khan MA, Fu J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumor Biology*. 2014 Aug 1;35(8):7335-42.
33. Nguyen PN, Choo KB, Huang CJ, Sugii S, Cheong SK, Kamarul T. miR-524-5p of the primate-specific C19MC miRNA cluster targets TP53IPN1-and EMT-associated genes to regulate cellular reprogramming. *Stem cell research & therapy*. 2017 Dec;8(1):214.
34. Tsukerman P, Yamin R, Seidel E, Khawaled S, Schmiedel D, Bar-Mag T, Mandelboim O. MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastatic miR-10b. *Oncotarget*. 2014 Dec;5(23):12141.
35. Ye YP, Wu P, Gu CC, Deng DL, Jiao HL, Li TT, Wang SY, Wang YX, Xiao ZY, Wei WT, Chen YR. miR-450b-5p induced by oncogenic KRAS is required for colorectal cancer progression. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61312.
36. Shi Y, Yang Z, Zhang T, Shen L, Li Y, Ding S. SIRT1-targeted miR-543 autophagy inhibition and epithelial-mesenchymal transition promotion in
18. Chen H, Liu H, Zou H, Chen R, Dou Y, Sheng S, Dai S, Ai J, Melson J, Kittles RA, Pirooznia M. Evaluation of plasma miR-21 and miR-152 as diagnostic biomarkers for common types of human cancers. *Journal of cancer*. 2016;7(5):490.
19. Nassar FJ, Nasr R, Talhouk R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacology & therapeutics*. 2017 Apr 1;172:34-49.
20. Zhao XG, Hu JY, Tang J, Yi W, Zhang MY, Deng R, Mai SJ, Weng NQ, Wang RQ, Liu J, Zhang HZ. miR-665 expression predicts poor survival and promotes tumor metastasis by targeting NR4A3 in breast cancer. *Cell death & disease*. 2019 Jun 17;10(7):479.
21. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose?. *International journal of molecular sciences*. 2016 Dec;17(12):1987.
22. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018 Oct 18;13(10):e0206239.
23. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in genetics*. 2014 Feb 18;5:23.
24. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A. DIANA-TarBase v7. 0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA: mRNA interactions. *Nucleic acids research*. 2014 Nov 21;43(D1):D153-9.
25. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5. 0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research*. 2013 May 16;41(W1):W169-73.
26. Lu TP, Lee CY, Tsai MH, Chiu YC, Hsiao CK, Lai LC, Chuang EY. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PloS one*. 2012 Aug 1;7(8):e42390.

40. Zhang K, Wang YW, Wang YY, Song Y, Zhu J, Si PC, Ma R. Identification of microRNA biomarkers in the blood of breast cancer patients based on microRNA profiling. *Gene*. 2017 Jul 1;619:10-20.
41. Ogawa H, Wu X, Kawamoto K, Nishida N, Konno M, Koseki J, Matsui H, Noguchi K, Gotoh N, Yamamoto T, Miyata K. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*. 2015 May 13;10(5):e0127119.
42. Liang YJ, Wang QY, Zhou CX, Yin QQ, He M, Yu XT, Cao DX, Chen GQ, He JR, Zhao Q. MiR-124 targets Slug to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Dec 17;34(3):713-22.
- Helicobacter pylori CagA-associated gastric cancer. *Cell death & disease*. 2019 Aug 19;10(9):1-4.
37. Du Y, Zhu HC, Liu XH, Wang L, Ning JZ, Xiao CC. MiR-543 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer via targeting RKIP. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(3):1135-46.
38. Zhou Y, Xu Q, Shang J, Lu L, Chen G. Crocin inhibits the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells via miR-320/KLF5/HIF-1 α signaling. *Journal of cellular physiology*. 2019 Mar 9.
39. Lv QL, Du H, Liu YL, Huang YT, Wang GH, Zhang X, Chen SH, Zhou HH. Low expression of microRNA-320b correlates with tumorigenesis and unfavorable prognosis in glioma. *Oncology reports*. 2017 Aug 1;38(2):959-66.

Bioinformatics Prediction of microRNAs Regulating Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Cells

Sedigheh Sadat Mortazavi¹, Sedigheh Gharbi^{2*}, Maryam Shahali^{3*}

1. M.Sc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman,

Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Assistant Professor, Department of Quality Control, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Accepted: 2020/10/31 Received: 2020/1/1

* Corresponding authors: Gharbi@uk.ac.ir, m_shahali@pasteur.ac.ir.

ABSTRACT

Aims: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an essential step in the developmental process, wound healing and cancer progression. In many cancers, EMT can increase aggressive properties including invasion, metastasis and tumor resistance to apoptosis. Recently, miRNAs as a new class of non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression have been demonstrated to have a crucial role in the regulation of EMT. However, the detailed mechanisms of miRNAs involvement in EMT in human cancer cells are still unclear. This study aimed to clarify this issue by using bioinformatics tools for predicting competent miRNAs target the main genes in EMT.

Materials and Methods: To ascertain an effective miRNA for the EMT, we assessed five genes from EMT/MET as key genes. Then, to predict the most suitable miRNA: target interactions, different online databases, including DIANA, TargetScan and miRSystem were applied.

Results: Possible targeting effects of different miRNAs on candidate genes were analyzed. Merging data from databases has shown that 11 miRNAs with a strong possibility communally can be involved in EMT/MET.

Conclusion: To conclude, it can be predicted that according to the high interaction scores of these elected miRNAs with candidate genes in the databases mentioned above, these miRNAs probably can have critical roles in EMT/MET. Hence, these miRNAs can be introduced as appropriate candidates for future investigations.

Keywords: microRNA, miRSystem, TargetScan, EMT, MET.