

## **Bioinformatic Prediction of miRNAs Targeting NOTCH1 and HBx Genes in Chronic Hepatitis B-Induced Hepatocellular Carcinoma**

Niloofer Moradi<sup>1</sup>, Mehdi Paryan<sup>2</sup>, Behzad Khansarinejad<sup>3</sup>, Mohammad Rafiei<sup>4</sup>, Mahdieh Mondanizadeh<sup>5\*</sup>

1. MSc of Biotechnology, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2. Assistant Professor, Department of Research and Development, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4. Associate Professor, Department of Biostatistics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 14 Jan 2017, Accepted: 1 Feb 2017

---

### **Abstract**

**Background:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third major cause of cancer death worldwide. Hepatitis B virus (HBV) and HBx gene play an important role in the development of HCC by influencing signaling pathways. Since there is no detectable symptom in the early phase of HCC, there is need to find new HCC-specific markers with high sensitivity for early detection and diagnosis of HCC. On the other hand, by the advent and development of bioinformatic sciences, it is now possible to predict miRNAs as biomarkers, and their targets. Therefore, in the present study, based on the results of the bioinformatic software applications with different algorithm, we selected the miRNA targeting HBx and NOTCH1 mRNAs according to higher score, suitable connection with target gene and confirming them in more softwares.

**Materials and Methods:** First, the sequences of NOTCH1 and HBx genes were retrieved from NCBI. Afterwards, several software applications such as TargetScan, mirWalk, miRBase, Miranda, PicTar, miRVir, and DIANA were applied to predict miRNAs.

**Results:** Based on the high scoring by bioinformatics softwares and suitable targeting, miR-34a were selected to target NOTCH1 and miR-6510, miR-5193 and miR-214 were chosen to target HBX gene.

**Conclusion:** Because of tumor suppression roles of miR-214 and miR-34a, they probably could be used as therapeutic strategy in cancer researches. It is also seems that the miR-5193 could act as a specific marker in Hepatocellular carcinoma.

**Keywords:** Bioinformatics, Hepatocellular carcinoma, MicroRNA

\*Corresponding Author:

Address: Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: m.mondanizadeh@arakmu.ac.ir

## پیش بینی بیوانفورماتیکی miRNAهای هدف گیرنده ژنهای HBx و NOTCH1 در هپاتوسلولار کارسینوما ناشی از هپاتیت B مزمن

نیلوفر مرادی<sup>۱</sup>، مهدی پریان<sup>۲</sup>، بهزاد خوانساری نژاد<sup>۳</sup>، محمد رفیعی<sup>۴</sup>، مهدیه موندنی زاده<sup>۵\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست فناوری، گروه زیست فن آوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. استادیار، بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. دانشیار، گروه آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۵. استادیار، گروه زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) سومین عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان محسوب می‌شود. ویروس هپاتیت B و ژن HBx آن به واسطه تداخل در مسیرهای سیگنالینگ نقش بسیار مهمی در پیشرفت سرطان HCC دارند. همچنین به دلیل عدم وجود علائم بالینی در مراحل اولیه‌ی ابتلا، ضرورت شناسایی مارکرهای اختصاصی با حساسیت بالا جهت شناسایی زود هنگام افراد مبتلا به HCC احساس می‌گردد. از سوی دیگر، با پیشرفت و توسعه علوم بیوانفورماتیک، امکان پیش‌بینی انواع مختلفی از miRNAها و ژنهای هدف این بیومارکرها به وجود آمده است. بدین منظور، در این مطالعه با توجه به داده‌های حاصل از نرم افزارهای بیوانفورماتیک با الگوریتم‌های مختلف، miRNAهای هدف گیرنده ژنهای HBx و NOTCH1 براساس بالاتر بودن امتیاز، اتصال مناسب با ژن هدف و تایید در نرم افزارهای بیشتر انتخاب و معرفی گردیدند.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا توالی ژنهای HBx و NOTCH1 از سایت NCBI دریافت گردید و سپس با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک TargetScan، mirWalk، miRBase، Miranda، PicTar، miRVir و DIANA به بررسی و پیش‌گویی miRNAها پرداخته شد.

**یافته‌ها:** با توجه به امتیاز دهی توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیک و بالاتر بودن امتیاز و هدف گیری مناسب تر، miR-34a به عنوان هدف گیرنده ژن NOTCH1 و miR-6510، miR-5193 و miR-214 به عنوان عوامل هدف گیرنده ژن HBx معرفی گردیدند.

**نتیجه گیری:** با توجه به نقش تومورسپرسوری miR-214 و miR-34a در انواع سرطان‌ها احتمالاً بتوان از آنها به عنوان استراتژی درمانی در تحقیقات سرطان استفاده کرد. همچنین به نظر می‌رسد که miR-5193 یکی از مارکرهای اختصاصی در تشخیص سرطان HCC باشد.

**واژگان کلیدی:** بیوانفورماتیک، هپاتوسلولار کارسینوما، miRNA

\*نویسنده مسئول: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه زیست فن آوری و پزشکی مولکولی

Email: m.mondanizadeh@arakmu.ac.ir

## مقدمه

سرطان علت اصلی مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین علت شایع مرگ در کشورهای در حال توسعه است (۱). هیپاتوسلولار کارسینوما (HCC) یا سرطان اولیه کبد، یکی از شایع ترین سرطان‌های بدخیم کبدی است، که سومین عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان محسوب می‌شود (۲). از سوی دیگر یکی از مهم ترین ویژگی‌های این بیماری عدم وجود علائم بالینی در مراحل اولیه ابتلا می‌باشد، که موجب شده تشخیص رضایت بخش و درمان در زمان مناسب برای این سرطان وجود نداشته باشد (۳). لذا ضرورت شناسایی مارکرهای اختصاصی با حساسیت بالا، جهت شناسایی زود هنگام افراد مبتلا به HCC احساس می‌گردد. با توجه به مطالعات اخیر مشخص شده که miRNA (microRNA)، یک کلاس به شدت حفاظت شده از RNA های کوچک غیر کد کننده‌اند که بیان ژن را در سطح بعد از رونویسی تحت تاثیر قرار می‌دهند (۴) و به طور بالقوه‌ای می‌توانند جنبه‌های مختلف فعالیت‌های سلولی مانند تمایز، نمو، متابولیسم و تکثیر را تنظیم نمایند (۵). از این رو استفاده از miRNA ها به عنوان بیومارکرهای غیر تهاجمی با پایداری قابل ملاحظه‌ای در گردش خون (۶)، یک علاقه‌ی ویژه و مورد توجه را در بین محققان برای تشخیص و درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها ایجاد کرده است (۷). به عبارت دیگر miRNA های موجود در گردش خون به صورت آزاد نیستند، بلکه به عنوان بخشی از یک کمپلکس لیپیدی یا پروتئینی می‌باشد تا از عملکرد ریبونوکلازها در امان باشند (۸). هم چنین مطالعات انجام شده در گذشته نشان داده که پروفایل بیان miRNA در مبتلایان به HCC و افراد سالم به طور چشم گیری متفاوت هستند و هر تومور پروفایل بیانی مخصوص به خود را دارد (۹، ۱۰). بنابراین با استفاده از این یافته‌ها می‌توان انواع مختلفی از سرطان‌ها را با استفاده از شناسایی و بررسی میزان بیان miRNA مخصوص هر تومور در خون با به کارگیری روش‌های مولکولی و بیوانفورماتیکی تشخیص داد.

تحقیقات اخیر حاکی از بیان متفاوت miR-375، miR-16، miR-21، miR-25، miR-122، miR-223 و let-7f در میان بیماران مبتلا به HCC، بیماران با هیپاتیت B مزمن و اشخاص سالم می‌باشد (۱۱). از سویی دیگر HBx یک پروتئین ویروس هیپاتیت B است که از روی ژن HBx ویروس رونویسی شده و شامل ۱۵۴ اسید آمینه است (۱۲). HBx تنها پروتئین ویروسی بیان شده است که نقش بسیار مهمی در بروز و پیشرفت سرطان HCC دارد (۱۳). عملکردهای HBx در ایجاد و پیشرفت HCC از طریق دخالت در تنظیم بیان فاکتورهای مختلف رونویسی، ژن‌های کنترل کننده چرخه‌ی سلولی، اختلال در مسیرهای مختلف سیگنالینگ، اختلال در کنترل تکثیر سلول‌های سرطانی و ایجاد متاستاز و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۴). از طرفی یکی از مهم ترین مسیرهای سیگنالینگ که در پیشرفت این سرطان دخیل است، مسیر سیگنالینگ Notch1 می‌باشد. ژن HBx ویروس با تاثیر بر مسیر سیگنالینگ Notch1 باعث افزایش بیان ژن Notch1 و فعال شدن این مسیر و در نتیجه پیشرفت HCC می‌شود. با توجه با این یافته‌ها احتمالاً پایین آمدن سطح بیان ژن Notch1 در این مسیر می‌تواند اثرات ضد توموری را القا نماید (۱۵). اگر چه امروزه می‌توان با استفاده از تکنیک‌هایی هم چون نورترن بلات، میکروآرای، هیبریدیزاسیون در جا و Real-time PCR، به وجود miRNA در بافت‌های مختلف و ارتباط آن‌ها با انواع بیماری‌ها پی برد ولی به دلیل هزینه‌های بسیار بالای دستگاه‌ها، مواد و وسایل مورد نیاز جهت شناسایی این مارکرها، هم چنین نیاز به داشتن کاربران متخصص، امکان استفاده از این تکنیک‌ها در تمامی مراکز علمی و پژوهشی امکان پذیر نیست. از سوی دیگر با پیشرفت و توسعه علوم بیوانفورماتیک و طراحی نرم افزارها و سایت‌های بیوانفورماتیکی با اهداف متفاوت، امکان پیش بینی و شناخت انواع مختلفی از miRNA ها و ژن‌های هدف گیرنده آن‌ها و تعیین عملکرد این مارکرها به وجود آمده است. بدین ترتیب استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی به منظور شناسایی اهداف miRNA

این پایگاه یک منبع اطلاعاتی قابل دسترسی از طریق آدرس (<http://www.microna.org>) می باشد و در مرکز بیولوژی کامپیوتری مرکز سرطان Memorial Sloan-Kettering قرار گرفته است. این نرم افزار مجموعه کاملی از پیش گویی های miRNA برای اهداف mRNA هم چنین پروفایل بیانی آن ها در موجودات مختلف است. اهداف این سایت با استفاده از یک مدل رگرسیون به نام مدل miRSVR مورد ارزیابی قرار می گیرد. این مدل نتایج را بر اساس توالی و خصوصیات زمینه ای دابلکس miRNA-mRNA رتبه بندی می نماید. هم چنین مدل Phast Cons Score روشی از رتبه دهی بر اساس مدل Markov است، که احتمال حفاظت شده بودن یک نوکلئوتید در توالی miRNA در طی تکامل را تخمین می زند. برای پیش گویی miRNA در این سایت بعد از ورود به صفحه ای اصلی سایت وارد بخش Target mRNA شده و اسم ژن مورد نظر (NOTCH1) و گونه ای مورد نظر (Homo sapiens) را انتخاب نموده و جستجو انجام شد و در صفحه ای نتایج miRNA های تارگت کننده ژن نمایش داد شد.

پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه میربیس (miRBase):

پایگاه

اطلاعاتی (<http://www.mirbase.org>) (miRBase) یک منبع online برای دسترسی به سکانس و اطلاعات شناسنامه ای miRNAs است. مبنای رتبه بندی در این پایگاه اطلاعاتی براساس E-Value و رابطه ای مکملی بین miRNA با ژن هدف می باشد. برای پیش گویی miRNA در این سایت توالی 3'-UTR ژن که از سایت NCBI دریافت شده بود در قسمت search by sequence وارد شد و نتایج به صورت BLASTN توسط سایت ارائه گردید.

پیشگویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه اطلاعاتی پیکتار (PicTar):

موجب سهولت و صرفه جویی در زمان و هزینه می گردد. امروزه چندین برنامه کامپیوتری و سایت های بیوانفورماتیکی با الگوریتم های متفاوت جهت پیش بینی اهداف miRNA ها موجود است که یکی از معیارهای مشترک مورد بررسی در تمامی آن ها امکان بررسی رابطه ای مکملی بین ناحیه ی سید از miRNA با 3'-UTR از mRNA هدف می باشد. با این وجود الگوریتم ها و معیارهای محاسبه و امتیازدهی در هر نرم افزار اختصاصی و متفاوت است (۱۶). با توجه به مطالب ذکر شده می توان گفت دو ژن HBx و Notch1 و هم چنین miRNA های هدف گیرنده آن ها از عوامل کلیدی دخیل در ایجاد و پیشرفت هیاتوسلولار کارسینوما می باشند. لذا هدف از انجام این مطالعه در این مطالعه با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مختلف و اختصاصی برای اولین بار جهت پیش بینی miRNA های هدف گیرنده ژن های Notch1 و HBx پرداخته می باشد. بدین ترتیب با توجه به داده های حاصل از نرم افزارهای موجود با الگوریتم مختلف، miRNA هایی که بالاترین امتیاز و بیش ترین احتمال را در هدف گیری ژن های مذکور داشتند، به منظور بررسی های عملی و آزمایشگاهی در پژوهش های بعدی انتخاب شدند.

## مواد و روش ها

پژوهش حاضر به صورت یک بررسی تئوری بیوانفورماتیک می باشد.

اخذ توالی مربوط به ژن های Notch1 و HBx: به منظور پیش گویی miRNA های هدف گیرنده 3'-UTR ژن های Notch1 و HBx، ابتدا توالی ژن ها به ترتیب بانماد رسمی NOTCH1 و X و شماره ی دسترسی NC\_003977 و NG\_007458 (توالی ۱۳۷۶ تا ۱۸۴۰) از پایگاه داده Gene در سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) گرفته شد.

پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن Notch1 در پایگاه میراندا (Miranda):

اساس پیش‌بینی محل اتصال miRNA در توالی‌های کامل تمام ژنوم‌های شناخته شده (حتی میتوکندری) در موجودات نامبرده است. هم‌چنین به عنوان یک پایگاه داده ثانویه، نتایج مقایسه محل اتصال miRNA با mRNA های هدف را به صورت اجمالی با جمع‌آوری نتایج شش برنامه (TargetScan, RNA hybrid, Diana-microT, miRanda, Pictar, RAN22) امکان‌پذیر می‌نماید (۱۷). در این سایت یک بار سرچ براساس مدل پیش‌گویی (Predicted target module) و یک بار براساس مدل تایید شده (Validated target module) و بر اساس اسامی مختلف ژن مورد نظر انجام شد.

پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه دایانا (DIANA):

در این سایت به آدرس (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr>)، از نتایج و داده‌های TarBase 5.0 که شامل بیش از ۱۳۰۰ هدف اثبات شده تجربی است، استفاده می‌گردد. هم‌چنین این پایگاه داده به چندین پایگاه مشهور دیگر مانند HUGO, UCSC, SwissProt, Ensembl متصل می‌باشد. این پایگاه اطلاعاتی الگوریتمی برای شناسایی اهداف mRNA بر مبنای چندین پارامتر محاسبه شده برای هر miRNA به طور جداگانه است. سپس امتیاز نواحی محافظت شده و غیر محافظت شده با هم ترکیب شده و یک امتیاز کلی که حاکی از تغییرات بیان mRNA هدف است، ارائه می‌گردد. این نرم افزار برای هر پیش‌بینی شاخصی مثل نمره دقت یا miTG score را بیان می‌کند، که به عنوان شاخصی برای تشخیص میزان مثبت‌های کاذب محسوب می‌شود (۱۸). در این پایگاه نیز سرچ براساس نام ژن مورد نظر در بخش SOFTWARE انجام شد.

پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx در پایگاه میریسیس (miRBase):

برای پیش‌گویی بیوانفورماتیکی miRNA برای ژن HBx ابتدا توالی 3'-UTR این ژن را از پایگاه داده Gene

این پایگاه اطلاعاتی پیش‌گویی miRNAs را در مهره داران، هفت گونه نماتود و هم‌چنین miRNA های انسانی که حفاظت شده نیستند را فراهم می‌نماید. اما تمامی miRNA های پیش‌گویی شده در این موجودات در بافت mRNA مورد هدف مشترک هستند. نتایج در ارگانسیم‌های مختلف که در یک گونه قرار دارند مقایسه و امتیاز دهی می‌گردند. برای پیش‌گویی در این سایت مانند سایت Miranda سرچ بر اساس نام ژن و نوع گونه مورد نظر انجام شد.

پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه تارگت اسکن (TargetScan):

این پایگاه (<http://www.TargetScan>) برای پیش‌گویی miRNA ها در انسان و پستانداران، موش، کرم، مگس و قورباغه کاربرد دارد. این سایت براساس نحوه‌ی اتصال نوکلئوتیدهای ناحیه سید هر miRNA به mRNA هدف، امکان هدف‌یابی یک ژن توسط یک miRNA را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. این نرم‌افزار نحوه اتصال هر miRNA را به ناحیه 3'-UTR هر ژن بر اساس نوع هیبرید شدن به سه دسته اتصال 8mer، اتصال 7mer-m8 و اتصال 7mer-A1 تقسیم می‌کند. در این سایت پیش‌بینی براساس فاکتوری به نام P<sub>ct</sub> یا احتمال هدف‌گیری محافظت شده صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر P<sub>ct</sub> نشان دهنده این مطلب است که miRNA به ناحیه هدف به طور تصادفی متصل نشده است و میزان این فاکتور بین ۰ تا ۱ می‌باشد.

برای پیش‌گویی miRNA در این سایت از شماره Ensembl ژن مورد نظر و اسم گونه برای سرچ استفاده شد.

پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه میرواک (mirWalk):

این پایگاه داده به آدرس (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>)، اطلاعات miRNA های انسان، موش و رت را که اهداف آن‌ها به صورت پیش‌بینی یا به صورت تجربی تأیید شده است، در اختیار قرار می‌دهد. الگوریتم به کار رفته در این نرم افزار بر

در صفحه‌ی اصلی سایت وارد و سرچ انجام شد. بعد از دریافت نتایج این سایت برای مشخص شدن این که توالی پیش‌گویی شده مربوط به کدام miRNA است، توالی‌ها یک به یک در سایت miRBase جستجو و miRNA مورد نظر تعیین گردید.

نحوه‌ی گزینش و انتخاب miRNA های برتر:

نتایج دریافت شده از هر سایت به ترتیب براساس بالاتر بودن امتیاز هر miRNA در فایل Excel ذخیره گردید. سپس از میان داده‌ها، miRNA هایی که بیش‌ترین رابطه‌ی مکملی را با ژن هدف داشتند و حداقل در سه نرم افزار پیشگویی و تایید شدند، مورد انتخاب قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

نتایج حاصل از پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه‌های اطلاعاتی TargetScan، PicTar، miRBase، Miranda، DIANA و mirWalk:

NCBI با فرمت FASTA دریافت شد و براساس توالی ژن، miRNA های هدف گیرنده آن پیش‌گویی شد. این سایت براساس E-Value و رابطه‌ی مکملی بین miRNA با ژن هدف امتیازدهی انجام می‌دهد. برای پیش‌گویی miRNA های تارگت کننده ژن HBx نیز همانند ژن NOTCH1 توالی ژن در بخش search by sequence وارد شد و سرچ براساس BLASTN انجام گردید.

پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx در پایگاه میرویر (miRVir):

این پایگاه داده به آدرس (<http://alk.ibms.sinica.edu.tw>) با هدف پیش‌گویی miRNA برای ژن های ویروسی استفاده شد. در این پایگاه نتایج به صورت توالی هایی مکمل با ژن هدف در اختیار قرار می‌گیرد. هم‌چنین نتایج را براساس P-Value ارائه می‌کند. برای پیش‌گویی در این سایت شماره دسترسی ژن مورد (NC\_003977) در بخش تعیین شده

نتایج بررسی در پایگاه Miranda نشان می‌دهد، miR-34a، miR-34c و miR-449a با بالاترین امتیاز و با اتصال مناسب‌تر می‌توانند ژن NOTCH1 را مورد هدف قرار دهند. این نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. نتایج پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه Miranda

نام ژن	miRNA	mirSVR score	PhastCons score
NOTCH1	miR-200c	-۰/۲۵۴۹	۰/۵۹۵۲
NOTCH1	miR-200b	-۰/۲۵۴۹	۰/۵۹۵۲
NOTCH1	miR-34a	-۱/۲۴۰۱	۰/۶۲۵۵
NOTCH1	miR-449a	-۱/۲۴۱۳	۰/۶۲۵۵
NOTCH1	miR-34c	-۱/۲۴۲۶	۰/۶۲۵۵

نتایج بررسی در پایگاه miRBase نشان می‌دهد، miR-4763 با E-Value ۲۲ و امتیاز ۷۹ اتصال مناسب‌تری با ژن NOTCH1 دارد. این نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. نتایج پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه miRBase

نام ژن	miRNA	E-	امتیاز
NOTCH1	hsa-miR-4763	۲۲	۷۹
NOTCH1	hsa-miR-96	۵/۷	۷۴
NOTCH1	hsa-miR-802	۵/۷	۷۴
NOTCH1	hsa-miR-6789	۸/۴	۷۲

نتایج بررسی در پایگاه PicTar حاکی از این بود که miR-34a با امتیاز ۹/۶۴ بهترین اتصال را با ژن NOTCH1 برقرار می‌کند. این نتایج در جدول ۳ نشان نشان داده شده است.

جدول ۳. نتایج پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه PicTar

نام ژن	miRNA	امتیاز
NOTCH1	hsa-miR-34a	۹/۶۴
NOTCH1	hsa-miR-34c	۷/۰۶
NOTCH1	hsa-miR-34b	۷/۰۶
NOTCH1	hsa-miR-32	۴/۴۰
NOTCH1	hsa-miR-139	۲/۰۴

نتایج بررسی در پایگاه TargetScan حاکی از هدف‌گیری ژن NOTCH1 توسط miR-34a، miR-34c و miR-449a با بالاترین امتیاز و بهترین شرایط اتصال می‌باشد. این نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴. نتایج پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه TargetScan

نام ژن	miRNA	نحوه اتصال	P <sub>ct</sub>
NOTCH1	has-miR-34a	7mer-m8	۰/۷۹
NOTCH1	has-miR-449a	7mer-m8	۰/۷۹
NOTCH1	has-miR-34c	7mer-m8	۰/۷۹
NOTCH1	has-miR-200b	8mer	۰/۸۷
NOTCH1	has-miR-139	8mer	<۰/۱

نتایج بررسی در پایگاه mirWalk حاکی از این بود که miR-34a هم به صورت پیش‌گویی شده و هم به صورت تایید شده، یکی از تارگت‌کننده‌های قوی ژن NOTCH1 می‌باشد. به علاوه نتایج این پایگاه توسط پایگاه‌های TargetScan، Miranda و RNA22 نیز تایید می‌گردد. این نتایج به ترتیب در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵. نتایج پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه mirWalk

نام ژن	miRNA Predicted	miRNA Validated	miRWalk	Miranda	RNA22	Targetscan
NOTCH1	has-miR-34a	has-miR-34a	✓	✓	✓	✓
NOTCH1	has-miR-449a	has-miR-129	✓	✓	✓	✓
NOTCH1	has-miR-200b	has-miR-30a	✓	✓	✓	✓
NOTCH1	has-miR-940	has-miR-24	✓	✓	✓	✓
NOTCH1	has-miR-139	has-miR-34b	✓	✓	✓	✓

نتایج بررسی در پایگاه DIANA نشان دهنده هدف گیری ژن NOTCH1 توسط miR-34a با امتیاز ۰/۹۸۵ می باشد. این نتایج به ترتیب در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶. نتایج پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن NOTCH1 در پایگاه DIANA

نام ژن	miRNA	miTG score
NOTCH1	has-miR-34a	۰/۹۸۵
NOTCH1	has-miR-200b	۰/۹۵۳
NOTCH1	has-miR-449a	۰/۹۶۶
NOTCH1	has-miR-129	۰/۷۲۰

نتایج حاصل از پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx: نتایج حاصل از پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx در پایگاه اطلاعاتی miRBase در جدول ۷ نشان می دهد که miR-5193 و miR-214 به ترتیب با امتیازهای ۷۴ و ۷۳ بهترین اتصال را با ژن HBx برقرار می کنند.

جدول ۷. نتایج پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx در پایگاه miRBase

نام ژن	miRNA	E	امتیاز
HBx	hsa-miR-5193	۱/۶	۷۴
HBx	hsa-miR-214	۱/۹	۷۳
HBx	hsa-miR-6880	۶/۰	۶۷
HBx	hsa-let-7a-2	۸/۸	۶۵
HBx	hsa-miR-6770	۸/۸	۶۵

هم چنین نتایج حاصل از پیش گویی در پایگاه miRVir حاکی از هدف گیری ژن HBx توسط miR-6510 با امتیاز ۶۱ و E-Value=7.3 می باشد. این نتایج در جدول ۸ نشان داده شده است.

جدول ۸. نتایج پیش گویی miRNA های هدف گیرنده ژن HBx در پایگاه miRVir

نام ژن	توالی miRNA	P-Value	miRNA	E-Value	امتیاز
HBx	3'CUGCAUCUGUUUCCUGCAGGGCGCGU5'	1.6e-05	miR-6510	۷/۳	۶۱
HBx	3'CUCCGAACUUGUCAUCCUGUACUUGU5'	6.4e-05	miR-6744	۷/۳	۶۱
HBx	3'UUCUUCUUGAGGGAGCGGAGCGUCUG5'	1e-05	miR-3180	۲/۸	۶۶
HBx	3'UCCCAAGUGGGGUGGUGGCCUCCGG5'	2e-06	miR-7114	۶/۰	۶۲

نحوه ی گزینش و انتخاب miRNA های برتر:

نحوه انتخاب و گزینش miRNA هدف گیرنده ژن NOTCH1 در جدول ۹ و miRNA هدف گیرنده ژن HBx در جدول ۱۰ قابل مشاهده می باشند. بدین ترتیب در جدول ۹ miRNA های با امتیاز بالاتر و اتصال بهتر با ژن NOTCH1 انتخاب و

گردآوری شدند. سپس از بین این miRNA ها miR-34a با بیشترین تکرار و تایید در ۵ پایگاه به عنوان miRNA هدف گیرنده این ژن در این مطالعه انتخاب گردید. هم چنین در جدول ۱۰ miRNA های هدف گیرنده ژن HBx که توسط دو پایگاه miRBase و miRVir پیش گویی شده است، گردآوری شد و از بین آن ها miR-214، miR-6510 و miR-5193 با احتمال اتصال بهتر با ژن هدف در این مطالعه انتخاب گردیدند. هم چنین miRNA های منتخب (miR-214، miR-34a، miR-6510 و miR-5193) برای بررسی میزان بیان در افراد مبتلا به سرطان هپاتوسلولار کارسینوما و افراد سالم کنترل در مطالعات فاز عملی در جدول ۱۱ نشان داده شده است.

جدول ۹. نحوه گزینش miRNA هدف گیرنده ژن NOTCH1

نام ژن	miRNA	miRWalk	PicTar	Miranda	Targetscan	miRBase	DIANA	مجموع
NOTCH1	has-miR-34a	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۵
NOTCH1	has-miR-200b	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۳
NOTCH1	has-miR-34c	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۳
NOTCH1	has-miR-139	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۴
NOTCH1	has-miR-449a	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۴
NOTCH1	has-miR-200c	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱

جدول ۱۰. نحوه گزینش miRNA هدف گیرنده ژن HBx

نام ژن	miRNA	Vir-Mir	miRBase	Sum
HBx	<i>has-miR-6770</i>	۰	۱	۱
HBx	<i>has-miR-6510</i>	۱	۰	۱
HBx	<i>has-miR-6880</i>	۰	۱	۱
HBx	<i>has-miR-6744</i>	۱	۰	۱
HBx	<i>has-miR-214</i>	۰	۱	۱
HBx	<i>has-miR-5193</i>	۰	۱	۱
HBx	<i>has-miR-3180</i>	۱	۰	۱
HBx	<i>has-let-7a-2</i>	۰	۱	۱
HBx	<i>has-miR-7114</i>	۱	۰	۱

جدول ۱۱. miRNA های انتخاب شده جهت بررسی میزان بیان در افراد مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما

نام ژن	miRNA	شماره شناسایی
HBx	has-miR-5193	MIMAT0021124
HBx	has-miR-214-3p	MIMAT0000271
HBx	has-miR-6510	MIMAT0025477
NOTCH1	has-miR-34a-5p	MIMAT0000255

## بحث

miRNA های انکوژن (Onco-miR) و miRNA های تومورسپرسور (ST-miR) باعث پیشرفت HCC می‌گردد. ارزیابی بیان این miRNA ها در سرم یا بافت‌های بیماران مبتلا به سرطان HCC می‌تواند به تشخیص و درمان این بیماری کمک کند (۲۲). چندین مطالعه‌ی *in vitro* نشان داده که ژن HBx در مراحل اولیه از سرطان HCC می‌تواند با ایجاد سطح بالایی از بیان miR-21 باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود (۲۴). هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده که HBx می‌تواند باعث کاهش بیان miR-192 شده و احتمالاً این ژن نقش آنتی آپوپتوتیک در سرطان HCC دارد (۲۵). این نتایج نشان می‌دهد که HBx می‌تواند miRNA هایی با رفتارهای مختلف را کنترل نماید (۲۶). بنابراین مطالعات بیشتر بر روی ژن‌های HBx و NOTCH1 و بررسی miRNA های هدف گیرنده ژن‌های مذکور در سرطان HCC می‌تواند به یافتن راهی برای تشخیص زود هنگام این سرطان یا درمان موثر آن کمک کند. لذا در این مطالعه برای اولین بار miR-214, miR-6510 و miR-5193 را براساس احتمال اتصال موثرتر با ژن HBx و ویروس با توجه به امتیازدهی در نرم افزارهای بیوانفورماتیکی انتخاب گردید. هم‌چنین miR-34a به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن NOTCH1 با پیش‌گویی و تایید در ۵ نرم افزار بیوانفورماتیکی انتخاب شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Khlaiphuengsin A و همکارانش در رابطه با نقش miRNA ها در خاموش کردن بیان ژن‌های ویروس هپاتیت صورت گرفت، با پیش‌گویی ۵ miRNA (miR-5193, miR-4731-5p, miR-500b, miR-142 و

در حال حاضر مطالعات متعددی نشان دادند که بیان غیر طبیعی miRNA ها با توسعه و پیشرفت انواع مختلفی از سرطان‌های انسانی در ارتباط است و هم‌چنین miRNA های در گردش به طور بالقوه می‌توانند به عنوان بیومارکر در تشخیص و ردیابی سرطان‌ها از جمله هپاتوسلولار کارسینوما مورد استفاده قرار گیرند (۱۹). از این رو روش‌های مولکولی موجود برای تشخیص و ارزیابی miRNA ها مانند میکروآرای، روش‌هایی پرهزینه و مشکل محسوب می‌شوند که امکان استفاده از آن‌ها به راحتی در کشورهای در حال توسعه وجود ندارد (۱۶). از طرفی بیوانفورماتیک فرصتی منحصر به فرد برای سرعت بخشیدن به توسعه ی بیومارکرهایی بر پایه ی miRNA در سرطان و پیشرفت علم پزشکی می‌باشد (۲۰). بنابراین استفاده از علوم کامپیوتری و به کار بردن روش‌های بیوانفورماتیکی جدید تا حدودی دست محققان را برای بررسی و شناخت بهتر عملکرد این عوامل مولکولی باز گذاشته است. در این مطالعه با انتخاب ژن‌هایی که با توجه به مطالعات گذشته (۱۲، ۱۳، ۱۵ و ۲۱) از جمله عوامل موثر در پیشرفت و ایجاد HCC می‌باشند، به بررسی بیوانفورماتیک و پیش‌گویی miRNA هایی پرداخته شد، که می‌توانند در بیان این ژن‌ها و در نهایت ایجاد سرطان دخیل باشند. مطالعات پیشین حاکی از ایجاد HCC به واسطه اختلال در مسیر سیگنالینگ NOTCH می‌باشند (۲۲). از طرفی مطالعات متعددی نشان دهنده تاثیر پروتئین HBx بر ژن NOTCH1 در مسیر سیگنالینگ NOTCH می‌باشد و از این طریق باعث فعال شدن ژن NOTCH1 و در نهایت پیشرفت سرطان می‌شود (۲۳). هم‌چنین پروتئین HBx با تاثیر بر بیان

مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما انتخاب و معرفی گردیدند. هم‌چنین با توجه به نقش تومورسپرسوری و کاهش میزان بیان miR-214 و miR-34a در بیشتر سرطان‌ها از جمله سرطان HCC شاید بتوان با استفاده از miRNAهای تقلیدگر به عنوان یک استراتژی درمانی، بیان این عوامل مولکولی را در سلول‌های سرطانی افزایش داد و مانع رشد تومور و پیشرفت سرطان شد. از طرفی براساس مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۵ توسط Khlaiphuengsin A و همکاران، miR-5193 به عنوان یک عامل هدف گیرنده و خاموش کننده ژن‌های ویروس HBV در نظر گرفته شده است، لذا به نظر می‌رسد احتمالاً این miRNA یکی از مارکرهای اختصاصی در تشخیص سرطان HCC ناشی از عفونت هپاتیت B می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در بردارنده بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به وسیله معاونت تحقیقات و فناوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در انستیتوپاستور و آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک اعلان می‌دارند.

### منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011;61(2):69-90.
2. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2008;134(6):1752-63.
3. Zhao YJ, Ju Q, Li GC. Tumor markers for hepatocellular carcinoma: Mol Clin Oncol. 2013 Jul;1(4):593-598. Epub 2013 May 13.
4. Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. Journal of cellular biochemistry. 2015;116(6):943-53.

miR-384) توسط سایت miRBase و RNAhybrid با استفاده از تکنیک qRT-PCR و آزمون لوسیفراز نشان دادند که از بین این miRNAها، miR-5193 بیش‌ترین اثر خاموشی را بر روی کلونوم ویروس هپاتیت دارد (۲۷). از آنجایی که براساس بررسی‌های انجام شده مطالعه‌ی اختصاصی و مشخصی در رابطه با نقش miR-6510 و miR-5193 در پیشرفت سرطان هپاتوسلولار کارسینوما و حتی سایر سرطان‌ها و هم‌چنین مطالعه‌ای در رابطه با نقش miR-34a و miR-214 بر روی ژن‌های HBx و NOTCH1 مرتبط با اتیولوژی HCC مشاهده نشده است، لذا مطالعه‌ی حاضر به عنوان اولین مطالعه، امکان معرفی و بررسی miRNAها و ژن‌های جدید در کمک به تشخیص مبتلایان به هپاتوسلولار کارسینوما ناشی از عفونت هپاتیت B را فراهم می‌آورد. هم‌چنین در هیچ یک از مطالعات انجام شده استفاده از بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های HBx و NOTCH1 گزارش نشده است. بنابراین با بررسی‌های دقیق‌تر در فاز مطالعات عملی احتمالاً بتوان از این بیومارکرهای (miR-214, miR-6510, miR-5193) و miR-34a) در جهت تشخیص و استراتژی‌های درمانی برای این سرطان استفاده کرد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به پیشرفت علم بیوانفورماتیک و وجود پایگاه‌های اطلاعاتی و سایت‌های فراوان در زمینه‌ی پیش‌گویی، بررسی عملکرد و خصوصیات بیوشیمیایی miRNAها، استفاده از علوم کامپیوتری برای بررسی و تشخیص بیومارکرهای جدید باعث صرفه جویی در زمان و هزینه در جهت به کارگیری miRNAها در پیش‌آگهی و درمان زود هنگام سرطان خواهد شد. در این مطالعه عوامل مولکولی miR-214, miR-6510 و miR-5193 به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن HBx ویروسی و miR-34a به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن NOTCH1 انسانی برای آنالیزهای میزان بیان ژن در افراد

5. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, et al. A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PloS one*. 2014;9(9):e107986.
6. Yang N, Ekanem NR, Sakyi CA, Ray SD. Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;81:62-74.
7. Chen Y-J, Zhu J-M, Wu H, Fan J, Zhou J, Hu J, et al. Circulating microRNAs as a fingerprint for liver cirrhosis. *PloS one*. 2013;8(6):e66577.
8. Blanco-Calvo M, Calvo L, Figueroa A, Haz-Conde M, Antón-Aparicio L, Valladares-Ayerbes M. Circulating microRNAs: molecular microsensors in gastrointestinal cancer. *Sensors*. 2012;12(7):9349-62.
9. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(3):671-8.
10. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467-77.
11. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(36):4781-8.
12. Wang F, Xia X, Wang J, Sun Q, Luo J, Cheng B. Notch1 signaling contributes to the oncogenic effect of HBx on human hepatic cells. *Biotechnology letters*. 2013;35(1):29-37.
13. Geng M, Xin X, Bi L-Q, Zhou L-T, Liu X-H. Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2015;21(38):10732.
14. Xu C, Zhou W, Wang Y, Qiao L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*. 2014;345(2):216-22.
15. Sun Q, Wang R, Luo J, Wang P, Xiong S, Liu M, et al. Notch1 promotes hepatitis B virus X protein-induced hepatocarcinogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *International journal of oncology*. 2014;45(4):1638-48.
16. Mondanizadeh M, Mosayebi G, Arefian E, Saidijam M, Khansarinejad B. Bioinformatic evaluation of the miR-124 effect on transcription factors involved in neogenesis process. *Arak Medical University Journal*. 2014;17(2):73-81.
17. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics*. 2011;44(5):839-47.
18. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic acids research*. 2009:gkp292.
19. Li L-M, Hu Z-B, Zhou Z-X, Chen X, Liu F-Y, Zhang J-F, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer research*. 2010;70(23):9798-807.
20. Lussier YA, Stadler WM, Chen JL. Advantages of genomic complexity: bioinformatics opportunities in microRNA cancer signatures. *Journal of the American Medical Informatics Association*. 2012;19(2):156-60.
21. Gao J, Xiong Y, Wang Y, Wang Y, Zheng G, Xu H. Hepatitis B virus X protein activates Notch signaling by its effects on Notch1 and Notch4 in human hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*. 2016;48(1):329-37.
22. Huang Jf, Guo Yj, Zhao Cx, Yuan Sx, Wang Y, Tang Gn, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin. *Hepatology*. 2013;57(5):1882-92.
23. Wang F, Zhou H, Xia X, Sun Q, Wang Y, Cheng B. Activated Notch signaling is required for hepatitis B virus X protein to promote proliferation and survival of human hepatic cells. *Cancer letters*. 2010;298(1):64-73.
24. Li CH, Xu F, Chow S, Feng L, Yin D, Ng TB, et al. Hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma transformation through interleukin-6 activation of microRNA-21 expression. *European Journal of Cancer*. 2014;50(15):2560-9.
25. Xie Q, He X, Chang Y, Jiang X, Lin J. [HBx gene down-regulates miR-192 expression and inhibits apoptosis of human hepatoma cell line HepG2]. *Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing*

zazhi= Chinese journal of hepatology. 2011;19(11):857-60.

26. Bandopadhyay M, Banerjee A, Sarkar N, Panigrahi R, Datta S, Pal A, et al. Tumor suppressor micro RNA miR-145 and onco micro RNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by hepatitis B

virus X protein in malignant hepatocytes. BMC cancer. 2014;14(1):1.

27. Khlaiphuengsin A, Panjaworayan T, Thienprasert N, Tangkijvanich P, Posuwan N, Makkoch J, et al. Human miR-5193 Triggers Gene Silencing in Multiple Genotypes of Hepatitis B Virus. MicroRNA. 2015;4(2):123-30.