

Evaluation of changes in hsa-miR-142-5p and MAP9 gene expression in human papillomavirus-infected cervical cancer tissues

Akram Rahimi-Moghaddam¹, Nassim Ghorbanmehr^{* 2}, Sedigheh Gharbi³, Fatemeh Nili⁴

1. Ph.D student, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
4. Associate Professor, Department of Pathology, Imam Khomeini-Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2024/01/14

Accepted: 2024/02/16

Abstract

Introduction: The most common cause of cervical cancer is human papillomavirus, which induces its carcinogenic properties on cells through E6 and E7 oncoproteins. Viral miRNA and oncogenes can alter the expression levels of human miRNAs and genes. Examining the expression profile of miRNAs and their target genes in cervical cancer leads to the identification of miRNAs and genes that can be used as diagnostic biomarkers or therapeutic targets. MAP9 is one of the predicted targets of HPV16-miR-H2-1. In this study, changes in the MAP9 expression level and a human miRNA regulating MAP9 were investigated in cervical cancer, and their potential as diagnostic biomarkers or therapeutic targets was evaluated.

Materials and Methods: After predicting miRNAs regulating MAP9 using the miRDB server, one of these miRNAs associated with squamous cell carcinoma was selected for quantification in clinical samples. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks of cervical tissue from 30 patients with squamous cell carcinoma were used. Deparaffinization, RNA extraction, DNase treatment, and cDNA synthesis were performed. The expression level of selected miRNA and MAP9 in tumor and normal samples was investigated by the Real-Time PCR method. The results were statistically analyzed.

Results: The significant upregulation of hsa-miR-142-5p and downregulation of MAP9 were observed in tumor samples compared with normal tissues. Roc curve analysis showed that hsa-miR-142-5p and MAP9 have high diagnostic capability for cervical cancer (AUC are 0.80 and 0.81 respectively).

Conclusion: hsa-miR-142-5p and MAP9 have the potential to be used as diagnostic biomarkers or therapeutic targets for cervical cancer.

***Corresponding Author:** Nassim Ghorbanmehr

Address: Alzahra University, North Sheikh Bahae St., Deh-e Vanak, Tehran, I. R. of Iran

Tel: +982185692706

E-mail: n.ghorbanmehr@alzahra.ac.ir

Keywords Gene expression, Human papillomavirus, MAP9, MicroRNA

How to cite this article: Rahimi-Moghaddam A., Ghorbanmehr N., Gharbi N., Fatemeh N. Evaluation of changes in hsa-miR-142-5p and MAP9 gene expression in human papillomavirus-infected cervical cancer tissues, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2024; 31(2):195-208.

Introduction

The most common cause of cervical cancer is chronic infection caused by human papillomavirus (HPV). Squamous cell carcinoma (SCC) accounts for 75-90% of cervical cancers. HPV induces its carcinogenic properties in cells through E6 and E7 oncoproteins that target P53 and retinoblastoma protein (Rb), respectively. Previous studies have shown that the expression level of miRNAs and other genes of the infected cells alter in response to the constant expression of E5, E6, and E7 viral oncogenes. In addition to these viral oncogenes, miRNAs encoded by HPV also cause changes in human gene expression. It was reported that the HPV genome encodes miRNAs that target human genes and affect cell cycle, immune activities, cell adhesion, migration, and cancer. A viral miRNA named HPV16-miR-H2-1 has been predicted to target the human MAP9 gene. The MAP9 gene encodes the MAP9 protein, which is a microtubule-associated protein required for spindle function, mitotic progression, and cytokinesis. In response to DNA damage, MAP9 stabilizes TP53 by inducing p-300-mediated acetylation and reducing MDM2-mediated p53 ubiquitination and is involved in regulating the p300-MDM2-p53 cycle. Examining the expression profile of miRNAs and their target genes in cervical cancer leads to the identification of miRNAs and genes that can be used as therapeutic targets or diagnostic biomarkers of cervical cancer. Considering that MAP9 is one of the target genes of viral miRNA and is involved in cell division as well as the stability of TP53, it can be one of the key genes in the carcinogenesis pathways of HPV. In this study, human miRNAs regulating MAP9 are predicted and for the first time, changes in the expression level of MAP9 and one of its inhibitory miRNAs are evaluated in 30 pairs of tumor/normal clinical samples of cervical tissues.

Methodology

This study has been approved by the Research Ethics Committee of Alzahra University with the IR.ALZAHRA.REC.1400.058 code. Prediction of miRNAs regulating MAP9 was done using the miRDB server. The list of miRNAs related to SCC was obtained from Human microRNA Disease Database version 4.0 (HMDD). The intersection of

this list with the list of miRNAs inhibiting MAP9 was obtained and one of these intersected miRNAs was selected for quantification in clinical samples. 30 pairs of tumor/normal cervical tissues were collected from the pathology department of Imam Khomeini Hospital. Four thin slices of each tumor sample and its normal margin were prepared. Deparaffinization and washing were carried out using xylene and ethanol, respectively. Then 400 μ l of digestion buffer (Tris-HCl (100 mM), EDTA (50 mM), NaCl (500 mM)) and 5 μ l of proteinase K (20 mg/mL) (Pishgam, Iran) were added to each sample and incubated at 37 °C for 24 hours. RNA extraction was performed using RNX-Plus (Cinacloon, Iran) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of extracted RNA were investigated by nanodrop and electrophoresis, respectively. For DNase treatment, 1 μ l of DEPC Water, 1 μ l of DNase I enzyme, 2 μ l of buffer, and 1 μ g of RNA were added to a microtube and incubated at 37 °C for 30 minutes. Then, 1 μ l of EDTA (Cinacloon, Iran) was added to each sample and the samples were incubated at 65 °C for 10 minutes. Poly A polymerization was done using 0.3 μ l of poly A polymerase enzyme (NEB, USA), 1 μ l of buffer, 1.5 μ l of ATP (NEB, USA), 1 μ g of RNA and DEPC water up to 10 μ l. The sample was incubated at 37 °C for 30 minutes. cDNA synthesis was performed using the SMO BIO kit (Taiwan) according to the manufacturer's instructions. Used primers for cDNA synthesis are shown in Table 1. The qPCR was performed on the Real-Time PCR machine (StepOne, ThermoFisher, USA). 12.5 μ l of SYBR Green Master Mix (Amplicon, Denmark), 0.5 μ l of forward primer (10 μ M), 0.5 μ l of reverse primer (10 μ M) and 1 μ l of cDNA was added to each microtube. The total volume of each reaction was 25 μ l. Table 1 shows the sequence of used primers in this study. A negative control was considered for each gene and U6 snRNA was used as an internal control. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to investigate gene expression changes. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. P value > 0.05 was considered significant. The ROC curve analysis was done to check the sensitivity and specificity of the MAP9 and miRNA inhibiting it for the diagnosis of cervical cancer.

Table 1. Used primers for cDNA synthesis and Real-Time PCR

Method	Name	Sequence	Length
cDNA synthesis	Primer 1 (C)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTT TTTTTTTTTTTTTTTC	53
	Primer 2 (G)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTT TTTTTTTTTTTTTTTG	53
	Primer 3 (A)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTT TTTTTTTTTTTTTTTA	53
Real-Time PCR	U6(F)	CTCGCTTCGGCAGCACA	17
	U6 (R)	AACGCTTCACGAATTTGCGT	20
	MAP9 (F)	CCAAGCAGAACTGTGTTCCG	20
	MAP9 (R)	TCATTGTCAGCAGGAGTGTCT	21
	hsa-miR-142-5p (F)	CCGCCGCATAAAGTAGAAAGC	21
	Reverse universal primer for miRNA	CCAGTGAGCAGAGTGACG	18

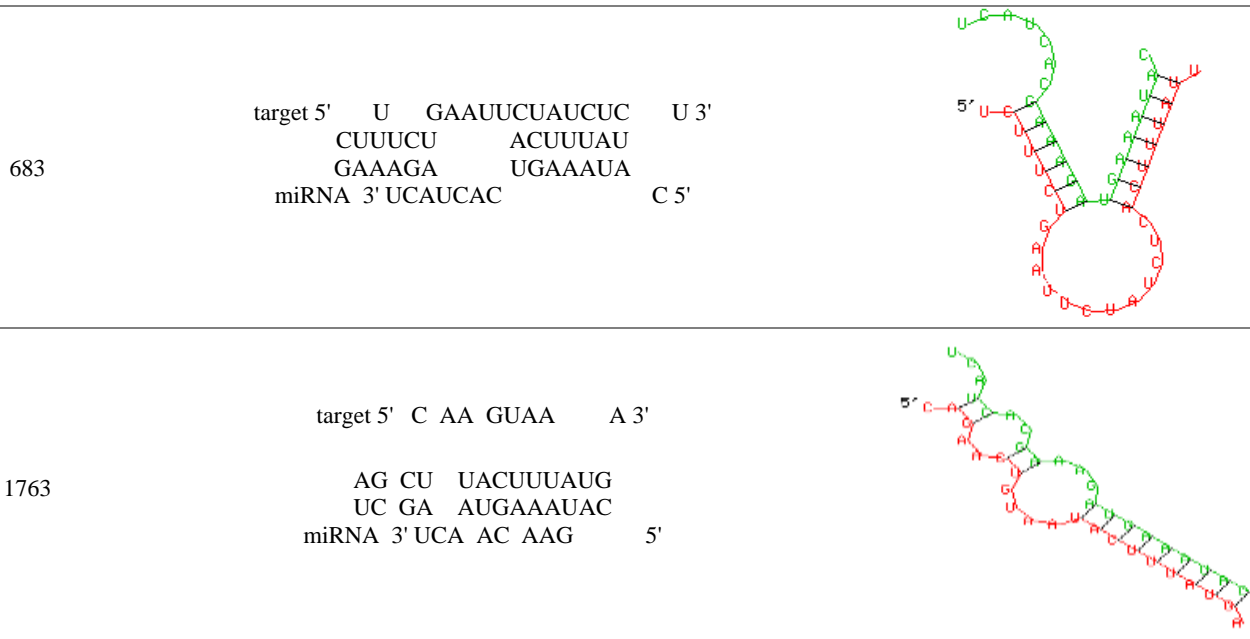
Results

211 miRNAs targeting MAP9 were predicted using the miRDB database. HMDD results reported 64 miRNAs associated with SCC. 2 intersected miRNAs between these two groups

were hsa-miR-142 and hsa-miR-607. In this study, hsa-miR-142-5p was selected for further investigation. Hsa-miR-142-5p had four seed locations in the 3'UTR of the MAP9 gene (Table 2).

Table 2. Hsa-miR-142-5p seed location in 3'UTR of MAP9 gene

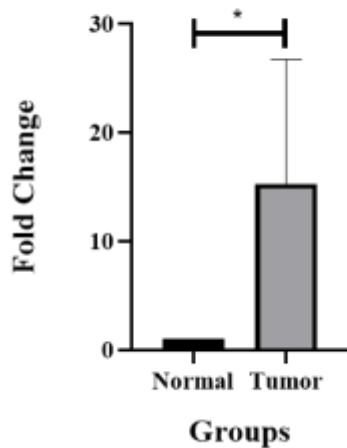
Position	miRNA and target interactions	Graphical form
597	target 5' G C 3' AGUGU ACUUUAU UCACG UGAAUAU miRNA 3' UCA AAAGA C 5'	
634	target 5' U AUAA AUAGG A 3' GUG UC UACUUUAU CAC AG AUGAAUAU miRNA 3' UCAU GAA C 5'	



The expression level of hsa-miR-142-5p in cervical tumor tissues showed a significant increase (FC = 15.3, P = 0.027) compared to normal tissues (Figure 1). While MAP9, which was predicted as one of the target genes of hsa-miR-142-5p and HPV16-miR-H2-1, was significantly decreased (FC = 0.47, P = 0.019) in cervical tumor tissues compared to normal tissues

(Figure 1). Analysis of the ROC curve indicated that hsa-miR-142-5p and MAP9 can significantly distinguish tumors from normal tissue samples (Figure 2). The sensitivity and specificity of the MAP9 gene were 70.59% and 93.75%, respectively. The sensitivity and specificity of hsa-miR-142-5p were 70% and 90%, respectively.

Expression level of hsa-miR-142-5p



Expression level of MAP9

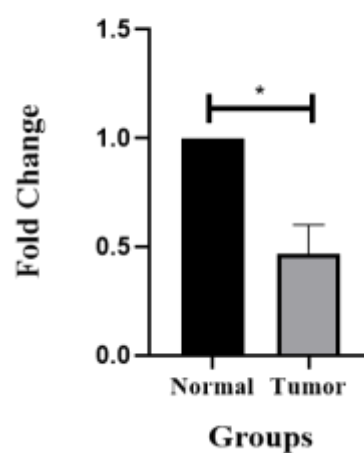


Figure 1. The expression levels hsa-miR-142-5p and MAP9 in normal and tumor samples of the cervix. * indicates P value < 0.05

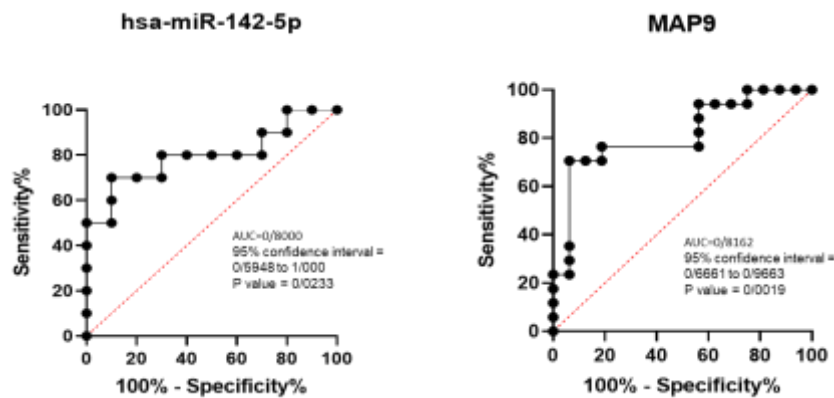


Figure 2. Sensitivity and specificity of hsa-miR-142-5p and MAP9 in cervical cancer in ROC curve

Discussion

The results of the present study showed that there are 211 miRNA sequences in the human transcriptome that have the potential to inhibit MAP9 gene expression. Furthermore, our investigation showed that 64 miRNA sequences have been recorded in the HMDD database and their relationship with squamous cell carcinoma has been experimentally proven. 2 intersected miRNAs between these two groups were hsa-miR-142 and hsa-miR-607. In this study, the expression levels of hsa-miR-142-5p and MAP9 were quantitatively investigated in clinical samples of cervical squamous cell carcinoma. In the present study, downregulation of MAP9 and upregulation of hsa-miR-142-5p in cervical cancer were observed. The MAP9 expression level in cervical cancer was investigated for the first time in our study. MAP9 is a microtubule-associated protein responsible for bipolar spindle assembly, cytokinesis, and centrosome integrity. Dysregulation or hyper-methylation of MAP9 has been identified in certain types of tumors, such as hepatocellular carcinoma, colon cancer, and breast cancer. Wang et al. (2020) also showed that MAP9 expression is decreased in colon cancer. Studies have shown that HPV-16 produces a transcript called HPV16-miR-H2-1 from its genome, which has the potential to inhibit the human MAP9 gene and thus control the cell cycle. Our bioinformatics study showed that many miRNAs which can inhibit MAP9 are coded in the human genome. According to the HDMM database, among miRNAs inhibiting MAP9, hsa-miR-607 and hsa-miR-142-5p are associated with squamous cell

carcinoma. In this study, the increase of hsa-miR-142-5p and the decrease of MAP9 expression were observed simultaneously. It can be a confirmation of the bioinformatics prediction of the inhibitory role of hsa-miR-142-5p in this gene. It should be mentioned that the final confirmation of this inhibitory relationship with tests such as luciferase assay will increase the reliability of the findings. Examining the expression profile of miRNAs and genes in cervical cancer will lead to the identification of miRNAs and genes that can be used as therapeutic targets or diagnostic biomarkers for cervical cancer. Roc curve analysis of the sensitivity and specificity of hsa-miR-142-5p and MAP9 showed that hsa-miR-142-5p and MAP9 can differentiate cervical cancer from normal samples.

Conclusion

Considering the significant difference in the expression of MAP9 and hsa-miR-142-5p in the tumor tissues of the cervix compared to normal tissues and the key role of MAP9 in cell cycle control, we propose further investigation of them as biomarkers or therapeutic targets for cervical cancer

Acknowledgment

The authors thank the patients who participated in this study.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this manuscript.

بررسی میزان تغییرات بیان ژن MAP9 و hsa-miR-142-5p در بافت‌های سرطانی دهانه رحم آلوده به ویروس پاپیلوما‌ی انسانی

اکرم رحیمی مقدم^۱، نسیم قربانمهر*^۲، صدیقه غربی^۳، فاطمه نیلی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۴. دانشیار، گروه پاتولوژی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین عامل سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلوما‌ی انسانی است که خواص سرطان‌زایی خود را توسط آنکوپروتئین‌های E6 و E7 به سلول‌ها القا می‌کند. miRNAها و آنکوژن‌های ویروسی می‌توانند میزان بیان miRNAها و ژن‌های انسانی را تغییر دهند. بررسی پروفایل بیان miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها منجر به شناسایی miRNAها و ژن‌هایی می‌شود که می‌توانند به عنوان اهداف درمانی یا بیومارکر مورد استفاده قرار گیرند. MAP9 یکی از ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای HPV16-miR-H2-1 است. در این مطالعه، تغییرات بیان MAP9 و یک miRNA انسانی تنظیم‌کننده MAP9 در سرطان دهانه رحم بررسی و پتانسیل آن‌ها به عنوان بیومارکر تشخیصی یا اهداف درمانی ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها: پس از پیش‌بینی miRNAهای تنظیم‌کننده MAP9 با سرور miRDB، یک miRNA مرتبط با کارسینوما‌ی سلول‌های سنگفرشی برای بررسی در نمونه‌های بالینی انتخاب شد. بلوک‌های پارانینه ۳۰ بیمار مبتلا به کارسینوما‌ی سلول‌های سنگفرشی استفاده شد. پارانین‌زدایی، استخراج RNA، DNase treatment، و سنتز cDNA انجام شد. میزان بیان miRNA منتخب و MAP9 در نمونه‌های توموری و نرمال با روش Real-Time PCR بررسی شد و نتایج مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: افزایش بیان معنی‌دار hsa-miR-142-5p و کاهش بیان معنی‌دار MAP9 در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های نرمال مشاهده شد. آنالیز منحنی ROC نشان داد که hsa-miR-142-5p و MAP9 قابلیت تشخیصی بالایی برای سرطان دهانه رحم دارند (AUC به ترتیب ۰/۸۰ و ۰/۸۱ هستند).

نتیجه‌گیری: hsa-miR-142-5p و MAP9 قابلیت استفاده به عنوان بیومارکرهای تشخیصی یا اهداف درمانی برای سرطان دهانه رحم را دارند.

* نویسنده مسئول: نسیم

قربانمهر

نشانی: گروه بیوتکنولوژی،

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه

الزهرا (س)، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۵۶۹۲۷۰۶

رایانامه:

n.gorbanmehr@alzahra.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-

0001-7176-2393

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0002-4192-3405

کلیدواژه‌ها:

بیان ژن، MAP9، MicroRNA،

ویروس پاپیلوما‌ی انسانی

مقدمه

سرطان مهاجم دهانه رحم را می‌توان در سه گروه تقسیم‌بندی کرد: کارسینوما‌ی سلول‌های سنگفرشی (SCC)^۱ که ۷۵ تا ۹۰ درصد از سرطان‌های مهاجم دهانه رحم را تشکیل

شایع‌ترین عامل سرطان دهانه رحم، عفونت مزمن ناشی از پاپیلوما ویروس است که از طریق تماس جنسی منتقل می‌شود [۱].

1. Squamous cell carcinoma

Copyright © 2024 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۳۱، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۳، ص ۱۹۵-۲۰۸

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

MAP9 یکی از ژن‌های هدف miRNA ویروسی است و در تقسیم سلولی و همچنین پایداری TP53 دخالت دارد، می‌تواند به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی مسیرهای سرطانزایی ویروس HPV باشد. در این مطالعه miRNAهای انسانی تنظیم‌کننده MAP9 پیش‌بینی می‌شود و برای اولین بار تغییرات میزان بیان MAP9 و یکی از miRNAهای مهارکننده آن در ۳۰ جفت نمونه توموری/نرمال بافت دهانه رحم ارزیابی می‌شود.

۲. مواد و روش

پیش‌بینی و انتخاب miRNA تنظیم‌کننده MAP9 در سرطان دهانه رحم از نوع کارسینومای سلول‌های سنگفرشی: شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده MAP9 با استفاده از سرور miRDB انجام شد. miRDB یک پایگاه داده آنلاین برای پیش‌بینی اهداف miRNAها می‌باشد [۱۷]. از آنجایی که شایع‌ترین و کشنده‌ترین نوع سرطان دهانه رحم کارسینومای سلول‌های سنگفرشی می‌باشد در مرحله بعدی، پایگاه داده Human microRNA Disease HMDD v4.0 (Database) برای miRNAهای مرتبط با این نوع بدخیمی جستجو شد [۱۸]. در این پایگاه داده یافته‌های مبتنی بر شواهد آزمایشگاهی در مورد ارتباط miRNAها با انواع بیماری‌های انسان جمع‌آوری شده است [۱۸]. از میان miRNAهای مشترک بین دو لیست فوق یکی برای ادامه مطالعه و بررسی در نمونه‌های بافتی بیمارستانی و بررسی کارایی به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی و هدف درمانی انتخاب شد.

این طرح با کد IR.ALZAHRA.REC.1400.058 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه الزهرا (س) تصویب شده است. پس از بررسی پرونده‌های بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم که در سال‌های ۹۳ تا ۱۴۰۰ به بیمارستان امام خمینی مراجعه کرده بودند، ۳۰ زن بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم از نوع کارسینومای سلول‌های سنگفرشی که تحت شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی قرار نگرفته بودند و با عمل جراحی دهانه رحم آنها خارج شده بود، انتخاب شدند. بازه سنی این بیماران ۳۱-۶۸ سال و میانگین سن آنها ۴۷/۷ سال بود. تمام بیماران در مراحل اولیه بیماری (مرحله ۱ یا مرحله ۲) بودند. در این بیماران تومور اولیه بود و حاصل عود مجدد بیماری نبود و همچنین متاستاز به اندام‌های مجاور وجود نداشت. پس از تهیه بلوک‌های پارافینه بافت دهانه رحم، برش‌های نازکی از آنها روی لام فیکس شد و پس از رنگ‌آمیزی، توسط پاتولوژیست

می‌دهد، آدنوکارسینوما (ADC) ^۱ و کارسینومای سلول‌های آدنواسکوموس [۲]. امروزه بیش از ۲۰۰ نوع ویروس HPV شناسایی شده است [۳ و ۴] که حداقل ۱۴ نوع از آنها سرطانزا هستند [۵]. ۷۰ درصد از سرطان‌های دهانه رحم و ۵۰ درصد از نفوپلازی‌های داخل اپیتلیال دهانه رحم درجه ۳ (CIN3) ^۲ توسط انواع HPV16 و HPV18 [۶] و ۹۰ درصد از زگیل‌های تناسلی توسط انواع HPV6 و HPV11 ایجاد می‌شوند [۷]. ویروس پاپیلومای انسانی از طریق دو انکوپروتئین اصلی به نام‌های E6 و E7 خواص سرطان‌زایی خود را بر سلول القا می‌کند [۸]. پروتئین E6 باعث تجزیه یک تومور ساپرسور کلیدی و مهارکننده تقسیم کنترل‌نشده سلول به نام P53 می‌شود [۹]. E7 به یکی دیگر از تومور ساپرسورهای کلیدی سلول به نام پروتئین رتینوبلاستوما (Rb) متصل می‌شود و به این طریق در تنظیم سیکل سلولی، دخالت ایجاد می‌کند [۱۰ و ۱۱].

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در پاسخ به بیان دائمی انکوژن‌های ویروسی E5، E6 و E7 تغییراتی در سطح بیان miRNAها و سایر ژن‌ها ایجاد می‌شود [۱۲ و ۱۳]. علاوه بر این انکوژن‌های ویروسی، miRNAهایی که HPV کد می‌کند نیز باعث تغییراتی در میزان بیان ژن‌های انسانی می‌شود [۱۴]. گزارش شده است که ژنوم HPV، miRNAهایی کد می‌کند که ژن‌های انسانی را هدف قرار می‌دهند و بر چرخه سلولی، فعالیت‌های ایمنی، چسبندگی، مهاجرت سلولی و سرطان تأثیر می‌گذارند [۱۴]. پیش‌بینی شده است که miRNA ویروسی با نام HPV16-miR-H2-1 ژن انسانی MAP9 را هدف قرار می‌دهد [۱۴]. ژن MAP9 (Microtubule Associated Protein 9) یا ASAP (Aster-associated protein) پروتئین MAP9 را کد می‌کند. MAP9 یک پروتئین مرتبط با میکروتوبول است که برای عملکرد دوک، پیشرفت میتوزی و سیتوکینز مورد نیاز است [۱۵]. MAP9 در پاسخ به آسیب DNA، با القای استیلاسیون با واسطه p-300 و کاهش یوبیکویتیناسیون P53 با واسطه MDM2 منجر به پایداری TP53 می‌شود و در تنظیم چرخه p300-MDM2-p53 دخالت دارد [۱۶].

بررسی پروفایل بیان miRNAها و ژن‌های هدف آنها در سرطان دهانه رحم، منجر به شناسایی miRNAها و ژن‌هایی می‌شود که می‌توانند به عنوان هدف درمانی یا بیومارکر تشخیصی سرطان دهانه رحم استفاده شوند. با توجه به اینکه

1. Adenocarcinoma
2. Cervical intraepithelial neoplasia

کار استفاده شدند.

تیمار RNAها با آنزیم DNase I: به منظور حذف DNAهای استخراج شده همراه با RNA، تیمار نمونه با آنزیم DNase I (سیناکلون، ایران) انجام شد. یک میکرولیتر DEPC Water، یک میکرولیتر آنزیم DNase I، دو میکرولیتر بافر و یک میکروگرم RNA به یک میکروتیوب اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس یک میکرولیتر EDTA (سیناکلون، ایران) به هر نمونه اضافه و نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

افزودن دم پلی A با استفاده از آنزیم poly A polymerase به RNAها و سنتز cDNA: در این مرحله ۰/۳ میکرولیتر آنزیم poly A polymerase (NEB، آمریکا)، ۱ میکرولیتر بافر آنزیم poly A polymerase، ۱/۵ میکرولیتر ATP (NEB، آمریکا) و یک میکروگرم RNA با هم مخلوط شدند و با DEPC Water به حجم پانزده میکرولیتر رسیدند. میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت SMO BIO (تایوان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای این کار دو محلول آماده شد. محلول A، حاوی ۵۰۰ نانوگرم RNA، یک میکرولیتر dNTP و ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای مخصوص سنتز cDNA (جدول ۱) بود که با DEPC Water به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. محلول B حاوی یک میکرولیتر آنزیم ریورس ترانسکریپتاز، چهار میکرولیتر بافر آنزیم ریورس ترانسکریپتاز، یک میکرولیتر RNase inhibitor و چهار میکرولیتر DEPC Water بود. محلول A به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۱ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس محلول B به آن اضافه و به مدت ده دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنجاه دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دمای هشتاد و پنج درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

بررسی گردید و بخش‌های نرمال و سرطانی بافت دهانه رحم مشخص شد. از هر بیمار یک نمونه توموری و یک نمونه نرمال که متعلق به حاشیه تومور بود تهیه شد. سه تا چهار برش نازک از بلوک‌های پارافینه بافت دهانه رحم با استفاده از میکروتوم تهیه و پس از خرد کردن، بافت در میکروتیوب RNase free قرار داده شد.

پارافین‌زدایی و استخراج RNA: یک میلی‌لیتر زایلین (نوترون، ایران) به هر میکروتیوب حاوی بافت پارافینه اضافه و پس از ورتکس کردن و ۱۰ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. این مراحل دوبار تکرار شدند. هر نمونه دو بار با اتانول مطلق (مرک، آلمان) شستشو داده شد. ۴۰۰ میکرولیتر بافر هضم (Tris-HCl (100 mM), EDTA (50 mM), NaCl (500 mM)) و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/mL) (پیشگام، ایران) به هر نمونه اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر RNX-Plus (سیناکلون، ایران) به هر نمونه اضافه و پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم (مرک، آلمان) به هر نمونه اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و فاز آبی به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن اتانول مطلق اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. پس از شستشوی رسوب با اتانول ۷۵ درصد، میکروتیوب‌ها در دمای اتاق خشک شدند. رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر DEPC Water (سیناکلون، ایران) حل شد. غلظت و خلوص RNAهای استخراج شده با نانودراپ و کیفیت آن‌ها با الکتروفورز بررسی شد و RNAهای با غلظت، خلوص و کیفیت مناسب برای ادامه

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای مرحله سنتز cDNA و Real-Time PCR

روش	نام	توالی	طول
سنتز cDNA	Primer 1 (C)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTC	۵۳
	Primer 2 (G)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTG	۵۳
	Primer 3 (A)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTA	۵۳
Real-Time PCR	U6(F)	CTCGCTTCGGCAGCACA	۱۷
	U6 (R)	AACGCTTCACGAATTTGCGT	۲۰
	MAP9 (F)	CCAAGCAGAAGTGTGTTCCG	۲۰

MAP9 (R)	TCATTGTCAGCAGGAGTGTCT	۲۱
hsa-miR-142-5p (F)	CCGCCGCATAAAGTAGAAAGC	۲۱
پرایمر ریورس برای miRNA	CCAGTGAGCAGAGTGACG	۱۸

نرمال بودن پراکندگی داده‌ها، از تست‌های پارامتریک (paired t test) یا ناپارامتریک (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test) مناسب استفاده شد. $P \text{ value} < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور بررسی حساسیت و اختصاصیت ژن MAP9 و miRNA انسانی مهارکننده آن برای تشخیص سرطان دهانه رحم، تحلیل نمودار ROC انجام شد.

۳. یافته‌ها

MiRNAهای انسانی تنظیم‌کننده MAP9: با استفاده از پایگاه داده miRDB تعداد دویست و یازده miRNA انسانی با قابلیت تنظیم بیان MAP9 پیش‌بینی شدند (فایل ضمیمه ۱). از آنجایی که شایع‌ترین و کشنده‌ترین نوع سرطان دهانه رحم کارسینومای سلول‌های سنگفرشی می‌باشد، در این مرحله پایگاه داده HMDD برای miRNAهای مرتبط با این نوع بدخیمی جستجو شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده ۶۴ عدد miRNA مختلف بود (فایل ضمیمه ۱). در این میان ۲ miRNA مشترک بین این دو گروه وجود داشت که عبارت بودند از hsa-miR-142 و hsa-miR-607. در این مطالعه hsa-miR-142-5p برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شد. طول 3'UTR MAP9، ۵۱۲۵ bp است که چهار جایگاه اتصال در آن دارد. جدول ۲ نشان‌دهنده جایگاه‌ها و جزئیات اتصال این miRNA با جایگاه‌های مختلف توالی MAP9 است.

Real-Time PCR و آنالیز نتایج:

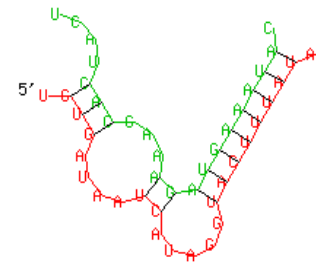
برای بررسی میزان بیان ژن miRNA مورد نظر ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (امپلیکون، دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فروارد (10 μM)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر ریورس (10 μM) و ۱ میکرولیتر cDNA به هر میکروتیوب اضافه و با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. برای هر ژن یک کنترل منفی و برای هر نمونه یک کنترل داخلی در نظر گرفته شد. در این مطالعه از U6 snRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. میکروتیوب‌ها داخل دستگاه Real-Time PCR (StepOne، ترموفیشر امریکا) قرار داده شدند. جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. Real-Time PCR با یک سیکل دناتوراسیون cDNA و فعالسازی آنزیم DNA polymerase در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه آغاز و با ۴۰ سیکل (دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، انلینگ در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و اکستنشن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) ادامه یافت. برنامه مرحله رسم منحنی ذوب، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود. میزان افزایش دما برای مرحله رسم منحنی ذوب ۱ درجه در نظر گرفته شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و برنامه Excel استفاده شد. آنالیزهای آماری با نرم‌افزار GraphPad Prism 8 انجام شد. پس از بررسی

جدول ۲. جایگاه‌های اتصال hsa-miR-142-5p در 3'UTR ژن MAP9

محل اتصال	اتصالات بین miRNA و ژن هدف	تصویر گرافیکی
۵۹۷	target 5' G C3' AGUGU ACUUUAU UCACG UGAAAUA miRNA 3' UCA AAAGA C5'	

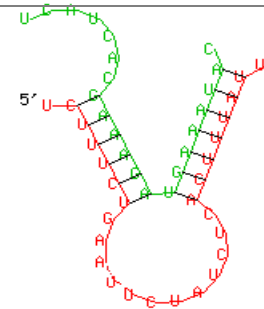
۶۳۴

target 5' U AUAU AUAGG A 3'
GUG UC UACUUUAU
CAC AG AUGAAAUA
miRNA 3'UCAU GAA C 5'



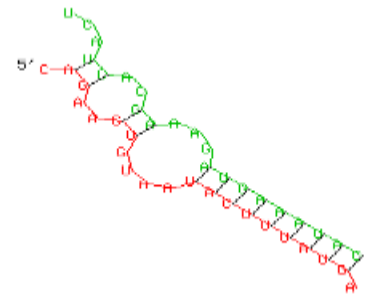
۶۸۳

target 5' U GAAUUCUAUCUC U 3'
CUUUCU ACUUUAU
GAAAGA UGAAAUA
miRNA 3'UCAUCAC C 5'



۱۷۶۳

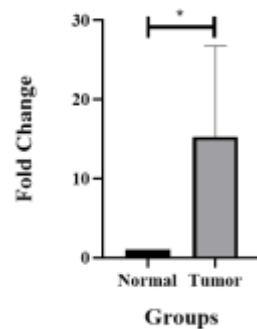
target 5' C AA GUAA A 3'
AG CU UACUUUAUG
UC GA AUGAAAUAC
miRNA 3'UCA AC AAG 5'



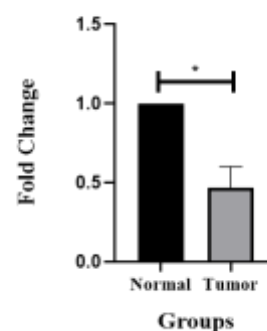
MAP9 که به عنوان یکی از ژن‌های هدف hsa-miR-142-5p و HPV16-miR-H2-1 پیش‌بینی شده بود، در بافت‌های توموری دهانه رحم نسبت به بافت‌های نرمال حاشیه تومور کاهش معنی‌داری (FC = 0.47, P = 0.019) را نشان داد (شکل ۱). به عبارت دیگر نتایج سنجش به روش Real-Time PCR بیانگر ارتباط معکوس بیان این دو با یکدیگر بود و این نتایج می‌تواند تأییدی ضمنی بر یافته‌های بیوانفورماتیکی مطالعه -پیشگویی مهار ژن MAP9 توسط hsa-miR-142-5p باشد.

تغییرات بیان ژن MAP9 و hsa-miR-142-5p در تومور دهانه رحم: یافته‌های حاصل از بررسی کمی بیان hsa-miR-142-5p در ۳۰ جفت نمونه بافت توموری/نرمال به‌دست‌آمده از بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نشان داد که میزان بیان hsa-miR-142-5p در بافت‌های توموری دهانه رحم نسبت به بافت‌های نرمال حاشیه تومور افزایش معنی‌داری (FC = 15.3, P = 0.027) دارد (شکل ۱). از سوی دیگر بررسی کمی بیان ژن

Expression level of hsa-miR-142-5p

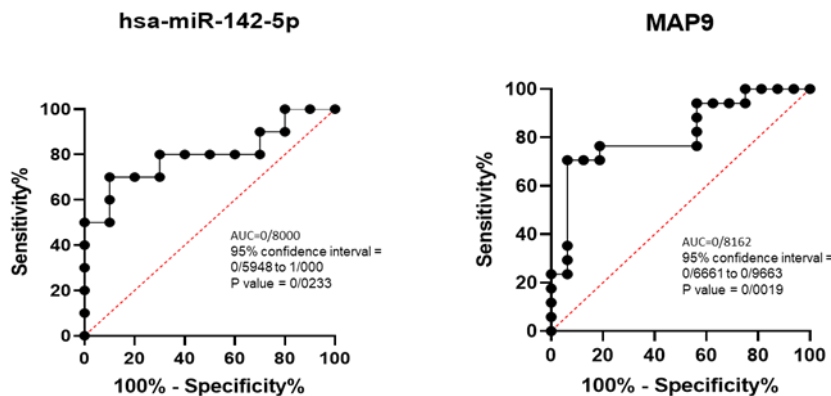


Expression level of MAP9



شکل ۱. میزان بیان hsa-miR-142-5p و MAP9 در نمونه‌های سالم و توموری دهانه رحم. *, P value < 0.05 را نشان می‌دهد

ژن MAP9، به ترتیب ۷۰/۵۹ و ۹۳/۷۵ درصد بود. حساسیت و اختصاصیت hsa-miR-142-5p، به ترتیب ۷۰ و ۹۰ درصد به دست آمد. مقدار سطح زیر نمودار (AUC) برای hsa-miR-142-5p برابر ۰/۸ و برای MAP9، ۰/۸۱ بود که بیانگر قدرت تشخیص خوب این دو و کارایی آن‌ها به عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان دهانه رحم بود (شکل ۲).



شکل ۲. حساسیت و اختصاصیت hsa-miR-142-5p و MAP9 در سرطان دهانه رحم در منحنی ROC

یک پروتئین مرتبط با میکروتوبول است که مسئول مونتاژ دوک دوقطبی، سیتوکینز و یکپارچگی سانتروزوم است [۱۵ و ۱۹]. برای اطمینان از مونتاژ دوک دوقطبی و یکپارچگی سانتروزوم، MAP9 توسط کینازهای میتوزی Aurora A (AURKA) و Polo-like kinase 1 (PLK1) فسفریله می‌شود [۲۰]. MAP9 در دوک میتوزی قرار می‌گیرد و بیان نادرست آن منجر به نقص در میتوز و در نهایت آنوپلوئیدی و مرگ سلول می‌شود [۲۱]. این یافته‌ها نشان می‌دهد که MAP9 اهمیت زیادی در پیشرفت میتوز دارد. در یک مطالعه گزارش شده است که MAP9 برای رشد، ضروری است و از دست دادن MAP9 در جنین گورخرماهی منجر به نقص در رشد و در نهایت باعث مرگ زودرس جنین می‌شود [۲۲]. یکی دیگر از نقش‌های MAP9، کمک به پایداری TP53 در پاسخ به آسیب DNA است [۱۶]. بنابراین تغییر در میزان بیان MAP9 می‌تواند با سرطان نیز مرتبط باشد. اختلال در تنظیم یا هایپرمتیلاسیون MAP9 در انواع خاصی از تومورها، مانند کارسینوم کبدی، سرطان روده بزرگ و سرطان پستان شناسایی شده است [۲۱ و ۲۳ و ۲۴]. علاوه بر این، MAP9 با مهار excision repair cross-complementation group 3 (ERCC3) از تکثیر سلولی، تشکیل کلنی، مهاجرت و تهاجم به سلول‌های کارسینوم کبدی

بررسی اختصاصیت و حساسیت miRNA و ژن

مورد بررسی: تجزیه، تحلیل و ترسیم منحنی ROC به هدف بررسی کارایی مقادیر بیان ژن MAP9 و hsa-miR-142 به عنوان بیومارکر تشخیصی برای سرطان دهانه رحم نشان داد که این دو می‌توانند با اختصاصیت و حساسیت بالا بافت‌های توموری و نرمال را از هم تفکیک کنند. حساسیت و اختصاصیت

۴. بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر، نشان‌دهنده وجود ۲۱۱ توالی miRNA در ترنسکرپتوم انسان است که توانایی احتمالی مهار بیان ژن MAP9 را دارند. از سوی دیگر بررسی‌ها نشان داد که در پایگاه داده HMDD، ۶۴ توالی miRNA ثبت شده‌اند که ارتباط آن‌ها با کارسینومای سلول‌های سنگفرشی در سطح آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. از آنجایی که گزارش‌ها نشان می‌دهند که ۷۵ تا ۹۰ درصد موارد سرطان دهانه رحم از نوع کارسینومای سلول‌های سنگفرشی است [۲]، در این مطالعه بر miRNAهای دخیل در این نوع سرطان تمرکز شد. در میان این ۶۴ توالی miRNA مرتبط با کارسینومای سلول‌های سنگفرشی، دو مورد از miRNAهای پیشگویی شده با توانایی مهار MAP9 وجود داشت. از بین آن دو، میزان بیان hsa-miR-142-5p به همراه MAP9 در نمونه‌های بیمارستانی از نوع سرطان سلول‌های سنگفرشی دهانه رحم مورد بررسی کمی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بافت‌های توموری دهانه رحم بیان ژن MAP9 به میزان معنی‌داری، کاهش و بیان hsa-miR-142-5p افزایش می‌یابد. جستجوهای ما نشان داد که مطالعه حاضر اولین گزارش بررسی تغییرات میزان بیان MAP9 در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی دهانه رحم است. MAP9

نمونه‌های سالم نشان داد که hsa-miR-142-5p و MAP9 با توانایی بالایی قادر به شناسایی بافت‌های مبتلا به سرطان دهانه رحم و تفکیک آن از بافت سالم هستند. سطح زیر نمودار بالای این دو بیانگر قابلیت بالای آن‌ها به‌عنوان بیومارکر سرطان دهانه رحم است.

با در نظر گرفتن تفاوت معنی‌دار بیان MAP9 و hsa-miR-142-5p در بافت‌های توموری بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم و نقش کلیدی MAP9 در کنترل چرخه سلولی می‌توان آن دو را به‌عنوان اهدافی برای تشخیص و درمان سرطان دهانه رحم مورد بررسی‌های تکمیلی قرار داد. مطالعه حاضر گام مقدماتی در معرفی MAP9 و hsa-miR-142-5p به‌عنوان کاندیداهایی با ارزش مطالعات بیشتر در زمینه تشخیص و درمان سرطان دهانه رحم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی بیماران شرکت‌کننده در این مطالعه تشکر می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این طرح با کد IR.ALZAHRA.REC.1400.058 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه الزهرا (س) تصویب شده است.

سهام نویسندگان

الف: آزمایش‌ها را انجام داد و مقاله را نوشت. ن.ق: مطالعه را طراحی و مقاله را مطالعه و ویرایش کرد. ص.غ: مقاله را مطالعه و آن را ویرایش کرد. ف.ن: بررسی نمونه‌های بیماران و ویرایش مقاله را انجام داد.

حمایت مالی

بخشی از هزینه‌های این مطالعه را دانشگاه الزهرا (س) فراهم کرد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی در مورد انتشار این مقاله وجود ندارد.

جلوگیری می‌کند [۲۵]. Wang و همکاران (۲۰۲۰) نیز نشان دادند که میزان بیان MAP9 در سرطان روده بزرگ کاهش می‌یابد [۲۶]. برخی مطالعات نیز نشان دادند که میزان بیان MAP9 در سرطان افزایش می‌یابد. برای مثال Zhang و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه خود افزایش میزان بیان MAP9 در بافت‌های توموری مثانه را مشاهده کردند [۲۷]. آن‌ها نشان دادند که MAP9 به واسطه مسیر TGF- β 1 باعث فرار از سیستم ایمنی و سرطانی شدن سلول‌های مثانه می‌شود [۲۷].

در میان انواع ویروس HPV دو تیپ HPV-16 و HPV-18 بیشترین ارتباط را با سرطان دهانه رحم نشان داده‌اند. با ورود ژنوم ویروس HPV به ژنوم انسان و بیان ژن‌ها و miRNAهای ویروسی، پروفایل بیان برخی از miRNAها و ژن‌های انسانی تغییر می‌کند [۱۴-۱۲]. مطالعات نشان داده‌اند که HPV-16 قادر به تولید رونوشتی به نام HPV16-miR-H2-1 از ژنوم خود است که قابلیت مهار ژن MAP9 و در نتیجه کنترل چرخه سلولی را دارد [۱۴]. بررسی بیوانفورماتیکی ما نشان داد در ژنوم انسان نیز miRNAهای متعددی با قابلیت احتمالی مهار MAP9 کد می‌شوند که بر اساس گزارش‌های ثبت‌شده در پایگاه داده HDMM در میان آن‌ها hsa-miR-607 و hsa-miR-142-5p با کارسینوما سلول‌های سنگفرشی ارتباط نشان داده‌اند. افزایش میزان بیان miR-142-5p همزمان با کاهش MAP9 در نمونه‌های توموری دهانه رحم که در مطالعه حاضر مشاهده شد می‌تواند تأییدی بر پیشگویی بیوانفورماتیکی نقش مهاری hsa-miR-142-5p بر این ژن باشد. شایان ذکر است که تأیید نهایی این ارتباط مهاری با تست‌هایی از قبیل سنجش لوسیفراز، بر اطمینان یافته‌ها خواهد افزود. افزایش میزان بیان hsa-miR-142-5p و نقش آن در پیشرفت سرطان دهانه رحم را Ke و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز گزارش کرده‌اند. آن‌ها نشان دادند که hsa-miR-142-5p با هدف قراردادن ژن LMX1A و از طریق مسیر Wnt/ β -catenin منجر به پیشرفت سرطان دهانه رحم می‌شود [۲۸]. هدف‌نهایی مطالعاتی از این دست این است که با بررسی پروفایل بیان miRNAها و ژن‌ها در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم که با ویروس HPV آلوده شده‌اند، می‌توان hsa-miRNAها و ژن‌هایی را شناسایی کرد که می‌توانند به‌عنوان هدف درمانی یا بیومارکر برای شناسایی سرطان دهانه رحم باشند. در مطالعه حاضر، بررسی حساسیت و اختصاصیت hsa-miR-142-5p و MAP9 در تفکیک نمونه‌های توموری از

References

- [1] Golfetto L, Alves EV, Martins TR, Sincero TCM, Castro JBS, Dannebrock C, et al. PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test. *Braz J Med Biol Res.* 2018; 51(5):e7098. doi: 10.1590/1414-431X20177098.
- [2] Seoud M, Tjalma WA, Ronsse V. Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention. *Vaccine.* 2011; 29(49):9148-58. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.115.
- [3] Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2014; 26:13-21. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002.
- [4] Pastrana DV, Peretti A, Welch NL, Borgogna C, Olivero C, Badolato R, et al. Metagenomic Discovery of 83 New Human Papillomavirus Types in Patients with Immunodeficiency. *mSphere.* 2018; 3(6):e00645-18. doi: 10.1128/mSphereDirect.00645-18.
- [5] World health organization. Human Papillomavirus (HPV) and Cervical Cancer. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer).
- [6] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007; 121(3):621-32. doi: 10.1002/ijc.22527.
- [7] Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, C Kitchener H. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013; 382(9895): 889-99. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7.
- [8] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(8):550-60. doi: 10.1038/nrc2886.
- [9] Koivusalo R, Mialon A, Pitkänen H, Westermarck J, Hietanen S. Activation of p53 in cervical cancer cells by human papillomavirus E6 RNA interference is transient, but can be sustained by inhibiting endogenous nuclear export-dependent p53 antagonists. *Cancer Res.* 2006; 66(24):11817-24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2185.
- [10] Mütter K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989; 8(13):4099-105. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08594.x.
- [11] Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2006; 281(1):578-86. doi: 10.1074/jbc.M508455200.
- [12] Chiantore MV, Mangino G, Iuliano M, Zangrillo MS, De Lillis I, Vaccari G, et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016; 142(8):1751-63. doi: 10.1007/s00432-016-2189-1.
- [13] Harden ME, Prasad N, Griffiths A, Munger K. Modulation of microRNA-mRNA Target Pairs by Human Papillomavirus 16 Oncoproteins. *mBio.* 2017; 8(1):e02170-16. doi: 10.1128/mBio.02170-16.
- [14] Qian K, Pietilä T, Rönty M, Michon F, Frilander MJ, Ritari J, et al. Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs. *PLoS One.* 2013; 8(7):e70202. doi: 10.1371/journal.pone.0070202.
- [15] Saffin JM, Venoux M, Prigent C, Espeut J, Poulat F, Giorgi D, et al. ASAP, a human microtubule-associated protein required for bipolar spindle assembly and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(32):11302-7. doi: 10.1073/pnas.0500964102.
- [16] Basbous J, Knani D, Bonneaud N, Giorgi D, Brondello JM, Rouquier S. Induction of ASAP (MAP9) contributes to p53 stabilization in response to DNA damage. *Cell Cycle.* 2012; 11(12):2380-90. doi: 10.4161/cc.20858.
- [17] Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1):D127-31. doi:10.1093/nar/gkz757.
- [18] Cui C, Zhong B, Fan R, Cui Q. HMDD v4.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* 2024; 52(D1):D1327-32. doi: 10.1093/nar/gkad717.
- [19] Monroy BY, Tan TC, Oclaman JM, Han JS, Simó S, Niwa S, et al. A Combinatorial MAP Code Dictates Polarized Microtubule Transport. *Dev Cell.* 2020; 53(1):60-72.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.029.
- [20] Eot-Houllier G, Venoux M, Vidal-Eychenié S, Hoang MT, Giorgi D, Rouquier S. Plk1 regulates both ASAP localization and its role in spindle pole integrity. *J Biol Chem.* 2010; 285(38):29556-68. doi: 10.1074/jbc.M110.144220.
- [21] Rouquier S, Pillaire MJ, Cazaux C, Giorgi D. Expression of the microtubule-associated protein MAP9/ASAP and its partners AURKA and PLK1 in colorectal and breast cancers. *Dis Markers.* 2014; 2014:798170. doi: 10.1155/2014/798170.
- [22] Fontenille L, Rouquier S, Lutfalla G, Giorgi D. Microtubule-associated protein 9 (Map9/Asap) is required for the early steps of zebrafish development. *Cell Cycle.* 2014; 13(7):1101-14. doi: 10.4161/cc.27944.
- [23] Mok EHK, Leung CON, Lee TKW. MAP9/ERCC3 signaling cascade: A new insight on understanding the chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine.* 2020; 54:102709. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102709.
- [24] Rasheed MN. Evaluation of DNA methylation of MAP9 gene in breast cancer as epigenetic biomarker. *Biomedicine.* 2022; 42(2): 27-9. Doi:10.51248/v.42i2.1074
- [25] Zhang J, Huang JZ, Zhang YQ, Zhang X, Zhao LY, Li CG, et al. Microtubule associated protein 9 inhibits liver tumorigenesis by suppressing ERCC3. *EBioMedicine.* 2020; 53:102701. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102701.
- [26] Wang S, Huang J, Li C, Zhao L, Wong CC, Zhai J, et al. MAP9 Loss Triggers Chromosomal Instability, Initiates Colorectal Tumorigenesis, and Is Associated with Poor Survival of Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020; 26(3):746-57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1611.
- [27] Zhang C, Han B, Guo Y, Guan H, Chen Z, Liu B, et al. MAP9 Exhibits Protumor Activities and Immune Escape toward Bladder Cancer by Mediating TGF-β1 Pathway. *J Oncol.* 2022; 2022:3778623. doi: 10.1155/2022/3778623.
- [28] Ke L, Chen Y, Li Y, Chen Z, He Y, Liu J, et al. miR-142-5p promotes cervical cancer progression by targeting LMX1A through Wnt/β-catenin pathway. *Open Med (Wars).* 2021; 16(1):224-36. doi: 10.1515/med-2021-0218.